

165166

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI

OTOİMMÜN TİROİD HASTALIKLARINDA ARI SÜTÜ  
(ROYAL JELLY)'NÜN OTOİMMÜNİTE ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Dr. Cihangir EREM

Şubat-2005

TRABZON

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI

OTOİMMÜN TİROİD HASTALIKLARINDA ARI SÜTÜ  
(ROYAL JELLY)'NÜN OTOİMMÜNİTE ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Dr. Cihangir EREM

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 31.12.2004

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 18.02.2005

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ekin ÖNDER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım ÖREM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ercüment OVALI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Muhlise ALVUR

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Şubat-2005

TRABZON

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince tezin her aşamasında yardımcı olan tez hocam Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER'e, hocalarım Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç. Dr. Caner KARAHAN'a, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ercüment OVALI'ya, Hematoloji laboratuvarından Dr. Tamer DİKMEN'e, Biyokimya Anabilim Dalı'nda görevli Dr. Ahmet ALVER ve doktora öğrencisi Yaşam BARLAK'a, istatistiki hesaplamalardaki yardımlarından dolayı Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Y. Doç. Dr. Murat TOPBAŞ'a, çalışmam boyunca mevcut olanakların kullanıma sunulması ve yardımları için Biyokimya Anabilim Dalı'nda görevli yüksek lisans öğrencileri ve araştırma görevlileri dahil tüm personele teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca bugüne kadar eğitimimde emeği geçen bütün hocalarıma ve çalışmamda bana yardımcı olan, burada isimlerini tek tek sayamadığım çalışma arkadaşlarıma saygı ve sevgilerimi sunuyorum.



Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje Kod No: 2002.114.001.6).

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	i
PROJE KOD NO	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1 - GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 - GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tiroid Bezi	3
2.1.1. Embriyoloji	3
2.1.2. Anatomi	4
2.1.3. Histoloji	4
2.1.4. Tiroid Hormonlarının Sentezi ve Salgılanması	5
2.1.5. Tiroid Fonksiyon Testleri	10
2.1.6. Basedow-Graves Hastalığı	14
2.2. Arı Sütü	27
2.2.1. Arı Sütünün Fiziksel Özellikleri	27
2.2.2. Arı Sütünün Bileşimi	29
2.2.3. Arı Sütünün Fizyolojik Etkileri	30
2.2.4. Doğrulanmamış Bulgular	30
2.2.5. Bilimsel Bazı Kanıtlar	31
2.2.6. Hayvan Çalışmaları	33
2.2.7. İnsan Çalışmaları	34
2.2.8. Arı Sütü, Otoimmünite ve İnflamasyon	34
2.2.9. Arı Sütünün Yan Etkileri	37
2.2.10. Arı Sütünün Depolanması	37
2.2.11. Arı Sütü Solüsyonunun Görünümü ve Larval Deri Fragmanları	38

3 - MATERYAL VE METOD	39
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	39
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.3. Çalışmanın Planlanması	40
3.3.1. Arı Sütünün Temini	40
3.3.2. Arı sütünün İmmünite Üzerindeki Etkisinin Ölçülmesinde Etkin Konsantrasyonunu saptanması.	40
3.3.2.1. Sağlıklı Bireylerden kan Örneklerinin Alınması	40
3.3.2.2. Lenfosit İzolasyonu	40
3.3.2.3. Arı Sütü Örneklerinin Hazırlanması	41
3.3.2.4. Arı Sütü İle lenfosit Hücre Kültürü	41
3.3.2.5. MTT Testi	41
3.3.3. Graves'li Hastalarda Arı Sütünün Otoimmünite Üzerindeki Etkisi ile İlgili Çalışmalar	42
3.3.3.1. Graves'li Hastaların Seçimi	42
3.3.3.2. Gravesli Hastalardan Kan Örneklerinin Alınması ve Lenfosit İzolasyonu	42
3.3.3.3. Arı Sütü İle Graves'li Hastaların Lenfosit Hücre Kültürü	45
3.3.3.4. Hücre Kültürü Süpernatantları İle Yapılan Testler	46
3.3.4. İstatistik	46
4 - BULGULAR	47
5 - TARTIŞMA	55
6 - SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
7 - ÖZET	69
8 - İNGİLİZCE ÖZET	71
9 - KAYNAKLAR	73
10 -EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	92

**KISALTMALAR**

<b>Ab</b>	: Antikor
<b>APC</b>	: Antijen Sunan Hücre
<b>ATİ</b>	: Antitiroid İlaç
<b>CD antijen</b>	: Diferansiyasyon grubuna (Cluster of Differentiation) göre sınıflandırılan hücre yüzey antijenleri
<b>DIT</b>	: Diiyodotirozin
<b>ICAM-1</b>	: İntersellüler Adezyon Molekülü-1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: İnterferon Gamma
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>MIT</b>	: Monoiyodotirozin
<b>MHC</b>	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
<b>MMİ</b>	: Metimazol
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimethylthiazole-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<b>PTU</b>	: Propiltiourasil
<b>RAI</b>	: Radyoaktif İyod
<b>RAIU</b>	: Radyoaktif İyod Uptake
<b>TBG</b>	: Tiroksin Bağlayıcı Globülin
<b>TCR</b>	: T Lenfosit Reseptörü
<b>Tg</b>	: Tiroglobulin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming Growth (büyüme) Faktör Beta
<b>Th</b>	: Yardımcı T hücreleri
<b>TNF-<math>\alpha</math> -<math>\beta</math></b>	: Tümör Nekroz Faktör alfa ve beta
<b>TPO</b>	: Tiroid Peroksidaz
<b>TRH</b>	: Tirotropin Serbestleştirici Hormon
<b>TSH</b>	: Tiroid Stimülan Hormon
<b>TSHR Ab</b>	: TSH Reseptör Antikoru
<b>T<sub>3</sub></b>	: 3,5,3'-Triiyodotironin
<b>T<sub>4</sub></b>	: 3,5,3',5'-Tetraiyodotironin (tiroksin)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1.** Tek bir tiroid folikül hücresinde tiroid hormon sentez ve salınımı.

**Şekil 2.** Antijen sunumu ile başlayan normal immün cevapta anahtar elemanlar.

**Şekil 3.** APC ile CD4+ T hücre aktivasyonunda anahtar moleküller arasındaki etkileşmeler.

**Şekil 4.** Anerji indüksiyon mekanizmaları.

**Şekil 5.** Tiroid hücreleri tarafından MHC class II ekspresyonundan sonra alternatif sonuçlar.

**Şekil 6.** Tiroid hücreleriyle immün sistem arasında sitokinler vasıtasıyla karşılıklı etkileşim.

**Şekil 7.** İşçi arılar tarafından yapılan arı sütü kraliçe arıya takdim ediliyor.

**Şekil 8.** a) Arı sütünde yüzen 3 günlük kraliçe larva. Hücre ürün için hemen hemen hazır.  
b) 5 günlük kraliçe larva. Erişkin halinden hemen önce.

**Şekil 9.** Arı sütü içeren çeşitli ürünler.

**Şekil 10.** 1 no.lu hastada Graves oftalmopatisi.

**Şekil 11.** Şekil 10'daki hastanın tiroid sintigrafisi.

**Şekil 12.** MTT testi.

**Şekil 13.** 400 mg/ml konsantrasyonda arı sütü ile muamele edilen lenfositlerin 72 saatlik inkübasyon sonrasındaki mikroskopik görünümü ( $\times 100$ ).



**TABLolar DİZİNİ**

**Tablo 1.** Graves’li hastaların klinik özellikleri

**Tablo 2.** Tirotoksikozlu hastalarda semptom ve fizik bulguların görülme sıklığı

**Tablo 3.** Arı Sütünün Bileşimi

**Tablo 4.** Graves’li hastaların demografik verileri ve laboratuvar bulguları

**Tablo 5.** Sağlıklı bireylere ait lenfosit hücre kültürlerinde arı sütü ile 72 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen MTT testi sonuçları (absorbans).

**Tablo 6.** Graves’li hastalarda MTT testi sonuçları (Absorbans $\times 10^3$ ), [n=10,  $\bar{X}(\pm SD)$ ]

**Tablo 7.** Hücre kültür supernatanlarında elde edilen sitokin düzeyleri [n=2,  $\bar{X}(\pm SD)$ ]

**Tablo 8.** Tablo 7’deki sitokin düzeylerinin grup ortalamaları [n=6,  $\bar{X}(\pm SD)$ ]

**Tablo 9.** Hücre kültür supernatanlarında elde edilen Th2/Th2sitokin oranlarının grup ortalamaları [n=6,  $\bar{X}(\pm SD)$ ]

**Tablo 10.** Hücre kültür supernatanlarında elde edilen TSHR Ab düzeyleri

**Tablo 11.** Hasta serumundaki sitokin düzeyleri

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Otoimmün tiroid hastalıkları içinde Graves hastalığı, tirotoksikozun, Hashimoto hastalığı ise hipotiroidinin en sık görülen şekilleridir. Basedow-Graves Hastalığı (Toksik diffüz guatr); diffüz guatr, tirotoksikoz, infiltratif oftalmopati (orbitopati, ekzoftalmi) ve infiltratif dermopati ile karakterize klinik bir sendromdur (1-5). Graves hastalığının etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Hastalığın otoimmün patogenezinde Ts ( $T_8$ , CD8+) hücrelerindeki defekt nedeniyle Th ( $T_4$ , CD4+) hücreleri B lenfositlerini tiroid otoantikor sentezi için uyarır (1,2,6). Graves hastalığında CD8+ T hücreleri (T supresör-sitotoksik) azalır. Fizyolojik şartlarda Th1 hücreleri hücrel immünite ile ilişkili olup (makrofajlar ve sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu gibi) predominant olarak hücrel immün cevabı başlatan IFN- $\gamma$  başta olmak üzere TNF- $\alpha$ , ve - $\beta$ , IL-1, IL-2, IL-8, IL-12 ve IL-18 salgılar. Th2 hücreleri ise humoral immünite ile ilişkili olup başlıca IL-4 olmak üzere IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve TGF- $\beta$  salgılar (2,3,5,7-10). Th2 sitokinleri Th1 cevabını inhibe ederken, Th1 sitokinleri de Th2 aracılıklı cevabın gelişmesini inhibe ederler. Yapılan ilk çalışmalarda Graves hastalığında Th1/Th2 sitokin dengesinin Th2 sitokin cevabı yönünde değişiklik gösterdiği (11) fakat daha sonra yapılan çok yeni çalışmalarda ise mikst bir Th1/Th2 cevabının olduğu ileri sürülmüştür (9,12-14). Bu değişiklikler Graves hastalığının patogenezinde humoral immünitenin anahtar rol oynadığı fikrini desteklemekle birlikte hücrel immünitenin de önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. B hücreleri tiroid stimulan antikorlar, anti TPO ve anti Tg salgırlar. Bu antikorlar Graves hastalığında yaklaşık % 90 oranında bulunur (1,4,5). Graves'li hastalardan alınan periferik kan ve tiroid lenfositleri in vitro TSHR Ab üretebilirler (15-17). Hastalığın tedavisinde otoimmün sürecin baskılanması tedavi hedeflerinden birisidir (3,17-18).

Arı sütü (Royal jelly); genç işçi bal arısının hipofarengal glandından salgılanan lapa-jel kıvamında homojen bir maddedir. Ana bileşenleri; su (% 57-70), protein (%12-15 ve kuru ağırlığın %17-45'i), şekerler (%12 ve kuru ağırlığın %18-52'si), lipidler (%3-7 ve

kuru ağırlığın % 3.5-19'i) ve mineral tuzları (kuru ağırlığın % 2-3)'dir (19-22). Oral yoldan veya enjeksiyon şeklinde kullanılabilir. Arı sütünü alan bireyler genel bir iyilik hali hissetmişlerdir. Yorgunluğa karşı direnç artmış, entellektüel performansları (daha yüksek öğrenme kapasitesi ve daha iyi hafıza) yükselmiş ve mental durumda düzelme olmuştur. Diğer bir ifadeyle arı sütünün genel bir stimulan olarak etki ettiği, immün cevabı ve genel vücut fonksiyonlarını düzelttiği ileri sürülmüştür (19). Hayvan ve insanda yapılan in vitro çalışmalarda arı sütünün antimikrobiyal ve antioksidan etkisi (23-24), insülin benzeri etkiler (25), antitümör aktivitesi (26), vazodilatatör aktivitesi (27) ve antiallerjik etkilerinin (28) yanında kan basıncının düzenlenmesi (29), fertilité, seksüel istek ve performansın artırılması (30), hemopoetik disfonksiyona karşı koruyucu aktivite ve anemi tedavisi (31), ateroskleroz ve hiperlipidemi tedavisi (antihiperkolesterolemik aktivite) (32-33), yara iyileşmesi (34), büyüme ve gelişme üzerinde olumlu etkileri (fibroblastlarda büyümeyi uyarıcı aktivite ve cilt turnoveri için stimulan aktivite) (19) olduğu gözlenmiştir. Sver ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada fare ve sıçanlarda arı sütünün potansiyel immünomodülatör olduğu ileri sürülmüştür (20). Oka ve ark. tarafından yapılan daha yeni bir çalışmada ise arı sütünün immünize farelerdeki immünomodülatör etkileri değerlendirilmiş ve sonuç olarak arı sütünün antijen-spesifik IgE yapımı ve mast hücrelerinden histamin salgısını deprese ettiği, makrofaj fonksiyonlarında ve Th1/Th2 hücre cevaplarında düzelmeye yol açtığı ileri sürülmüştür (21). Arı sütünün etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte 10-hidroksi-2-dekenoik asid (10H2DA), royalisin ve apisin dahil yapısındaki bazı maddelerin bu farmakolojik aktiviteleri gösterdiği saptanmıştır (35-37). Son 3 yılda ardarda yapılan önemli bazı çalışmalarda arı sütünün antiallerjik, antiinflamatuvar ve immünomodülatör etkileri teyid edilmiştir (38-41).

Otoimmün tiroid hastalıklarında arı sütünün kullanımına dair literatürde herhangi bir deneysel ya da klinik çalışma mevcut değildir. Biz bu çalışmamızda Basedow-Graves hastalığında arı sütünün otoimmünite üzerindeki etkisini değerlendirmeyi ve tedavi dozunu belirlemeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TİROİD BEZİ

#### 2.1.1. EMBRİYOLOJİ

Embriyoner yaşamın birinci ayının sonunda tiroid bezi gelişimine başlar. Tiroid bezi önbarsaktan gelişir ve normal servikal pozisyonuna dolambaçlı bir yolla iner. İlk olarak, embriyoner hayatın yaklaşık 4. haftasının sonunda 1. ila 2. faringeal keselerin arasında farinksin ventral yüzünün tam orta çizgisi üzerinde evaginasyon ile bir kese olarak gelişir. Bu evaginasyon bir tüp oluşturacak şekilde uzanır, öne ve aşağıya inerek hyoid kemiğin önüne gelir. Boyundaki inişine devam etmeden önce hyoid kemiğin etrafında bir “loop” yapar. İki tane lateral tomurcuk ve bunları birbirine bağlayan dar ve çukur bir boyun şeklindeki tiroglossal duktus oluşur. Bu tomurcuklardan lateral loblar meydana gelir. Her iki lobun arasında tiroid isthmusu vardır. Fötal yaşamın 7. haftasında tiroid isthmus ile birbirine bağlanan 2 lobüllü bir organ olarak tanınabilir. Tiroid folikülleri bu evrede gelişir. Ayrıca tiroid bezi içinde üçüncü brankial keseden kökenini alan parafoliküler hücreler vardır. Bu nedenle foliküler ve parafoliküler hücrelerin orijinleri farklıdır. Farinks ile boyunun ön kısmı arasındaki yol tiroglossal ductus olarak belirlenmiştir. Tiroglossal ductus tübüler yapısını kaybeder ve tedricen solid bir sap halini alır ve 6. haftada atrofiye uğrar. Fakat onun faringeal bağlantısı erişkinlerde dilin arkasına doğru bir çukur (foramen caecum) olarak kalır. Bu göç sırasında herhangi bir yerde aberran tiroid dokusu olabilir. Ancak en sık foramen caecum’un arkasında bulunur (1,42-43).

### 2.1.2. ANATOMİ

Tiroid C5-T1. vertebralar düzeyinde, boynun ön-alt kısmında yerleşmiş, endokrin bir bezdir. Ağırlığı ortalama 20-22 g'dır. Normal bir tiroid bezi, arada bir isthmus ile birleşmiş iki yan lobdan oluşmuştur. İnsanların %40'ında isthmustan hyoid kemiğe lobus piramidalis denilen bir tiroid bez dokusu uzanır. Loblar ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2-4 cm genişliğinde ve 1.5-3.0 cm kalınlığındadır. İsthmusun yüksekliği 1.5-2 cm, genişliği 2 cm. kalınlığı ise 0.5-1 cm'dir. Bazen, özellikle tiroid bezinin büyüdüğü koşullarda, genellikle solda ve orta çizginin dış tarafında isthmustan yukarı doğru parmak gibi uzanan piramidal lob bulunur. Tiroid bezi bütün endokrin bezlerde olduğu gibi, damarlanma bakımından son derece zengindir ve 4-6 ml/g/dakika kan akımına sahiptir. Arterleri a. carotis eksterna'nın dalı olan a. tiroidea superior, a. subklavia'nın dalı olan a. tiroidea inferior ve trunkus brakiosefalikus veya arcus aortadan çıkan a. tiroidea ima'dır. Arterlerin hepsi birbirleriyle anastomoz yaparlar. Venöz drenaj superior, medius ve inferior tiroid venlerine açılan yüzeysel bir pleksusla gerçekleşir. V. tiroidea superior ve medius internal juguler vene, v. tiroidea inferiorlar ise brakiosefalik venlere dökülürler. Lenf damarları doğrudan doğruya duktus torasikus ve duktus lenfatikus dekster'e dökülür (1,44-45).

### 2.1.3. HİSTOLOJİ

Tiroid dokusu; lümende jelatinimsi bir madde olan kolloid ihtiva eden basit bir epitelyal küre şeklindeki foliküllerden yapılmıştır. Tiroid hormonlarını sentezleyen ve sekrete eden epitel hücrelerine folikül hücreleri adı verilir. Folikül hücreleri, tiroglobülin (Tg)'e bağlı depo hormonlarını içeren kolloidin etrafında tek bir tabaka halinde sıralanmıştır. Tiroid foliküllerinin morfolojik görünümü bezin bölgesine ve fizyolojik aktivitesine göre değişir. Aynı anda prizmatik epitelle döşeli foliküller yanında hücrelerin fonksiyon durumuna bağlı olarak kübik ya da yassı epitelle çevrili ve içi kolloid dolu foliküller de bulunur. Folliküllerin 20-50 tanesi biraraya gelerek lobülleri oluştururlar. Lobüller bağ dokusu ve kapsülle çevrilidir. Tiroid follikülleri arasında kalsitonin hormon sentezi yapan parafoliküler hücreler (C hücreleri ) yer alır. Folikülleri saran zengin kan ve lenf kapillerlerinin endotelleri diğer endoteller gibi fenestrate tiplidir ve bu durum bezden salgılanan tiroid hormonlarının kana geçişini kolaylaştırmaktadır (1,45).

### 2.1.4. TİROİD HORMONLARININ SENTEZİ VE SALGILANMASI (Şekil 1)

Tiroid bezi tarafından tiroid hormonlarının sentez ve salınımında başlıca 6 basamak vardır: (1)iyodürün kandan tiroid hücresi içine bazal membran yoluyla aktif transportu (iyot tutulması); (2) tiroglobulin içinde iyodürün oksidasyonu ve tirozil rezidülerinin iyodinasyonu; (3) tiroglobülin içinde iyodotirozin moleküllerinin kenetlenmesi (coupling) ile  $T_3$  ve  $T_4$  oluşması; (4) tiroglobülinin proteolizi ile serbest iyodotirozinlerin ve iyodotironinlerin salınımı; (5) tiroid hücresi içinde iyodotirozinlerin deiyodinasyonu; (6) belirli durumlarda tiroid içinde 5'-deiyodinasyon ile  $T_4$ 'ün  $T_3$ 'e dönüşmesi (1,46).

#### I. Tiroglobulin Sentezi

Tiroid hormon sentezinde öncül molekül tirozin aminoasitidir. Ancak bu sentez serbest tirozinlerden değil Tg molekülü yapısındaki tirozinler üzerinden gerçekleşir. Tg, folikül hücreleri tarafından sentezlenen, tetramerik yapıda 660 kDa'lık büyük bir glikoproteindir. Tg sentezi diğer proteinlerin sentezine oldukça benzerlik göstermektedir. Tg molekülü folikül hücresi ribozomlarında sentezlendikten sonra golgi aparatında glikozillenir ve tersiyer yapısını kazanır. Tg, golgi aparatından itibaren bir vezikül içine alınır ve bu vezikül hücrenin apikal yüzeyine doğru hareket eder. Tg içeren vezikül hücrenin apikal membranına geldiği zaman bu iki membran birbirleriyle kaynaşır ekzositoz ile Tg molekülü folikül lümenine salınarak kolloid damlacıkları halinde depolanır (1,46).

Tiroid hücresi tiroid stimulan hormon (tirotropin, TSH) ile uyarılırsa apikal membranda mikrovillüs içeren membran parçaları kolloid içine çıkıntılar yapar. Bu çıkıntıların aralarındaki membran parçalarının eriyerek birleşmesi sonucu ortalarında kalan bir miktar kolloid parçasının çevrildiği görülür. Bu şekilde meydana gelmiş ve içinde kolloid olan vezikül daha sonra hücre içine alınır (46-47).

#### II. İyodürlerin Yakalanması

Diyetle ağızdan alınan iyot barsakta iyodürler ( $I^-$ ) haline çevrilerek emilir. Kanda dolaşan iyodür, tiroid bezi tarafından tutulur. Bu basamak hormon sentezindeki ilk hız

sınırlayıcı basamaktır. Tiroid bezi içindeki iyodür plazmaya göre yaklaşık 25 kat daha fazladır. İyot eksikliği durumlarında bu oran 500 misli kadar olabilir (1,46-47). İki ortam arasındaki bu konsantrasyon farkı nedeniyle iyot, enerjiye bağımlı iyot transport mekanizması (iyot pompası,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaz) ile tiroid hücresi içine alınarak konsantre edilmektedir. Bu olay TSH tarafından stimüle edilir. Bromür, tiyosiyanat, perklorat, nitrit ve perteknetat gibi anyonlar iyod pompasını inhibe ederler. Normalde tiroid bezi tarafından tutulan iyodür hızla folikül hücresine girer, okside ve organifiye olur. Konjenital olarak tiroid peroksidaz (TPO) enziminde bir defekt olduğunda, Hashimoto tiroiditinde, antitiroid ilaç (ATİ) kullanıldığında ve aşırı miktarda iyod alındığında iyot, tirozin molekülleriyle birleşemez. Perklorat iyodla yarışır. Bunu anlamak için perklorat boşaltma testi yapılabilir. Önce hastada RAIU'ı ölçülür. Hastaya oral olarak potasyum perklorat verilir. Bundan sonra tekrar uptake ölçümü yapılır. Eğer iyot tutulmasında %15'den fazla bir düşme olursa organifikasyon defekti var demektir (1).

İyot, ayrıca gastrik mukozanın paryetal hücreleri, meme bezlerinin glandüler epiteli, tükürük bezleri ve koroid pleksus tarafından tutulur. Ancak bu dokularda tiroid hormon sentezi yapılamaz (1,46-47).

### III. İyodürlerin İyot Haline Oksidasyonu ve Organifikasyonu

Hücre içine alınan iyodür, apikal membrandaki TPO enzimi katalizörlüğünde hidrojen peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ile oksitlenerek aktif iyoda ( $\text{I}^\circ$ ) dönüştürülür (oksidasyon). Elektron mikroskopik çalışmalarda iyodun oksidasyon ve organifikasyonunun kolloid içinde ve apikal membranda meydana geldiğini gösteren bulgular vardır. Aktif iyot, daha sonra folikül lümeni içindeki kolloide geçerek Tg'e bağlı bazı tirozin molekülleri ile birleştirilir (iyodinasyon, organifikasyon). Bu reaksiyon da TPO enzimi tarafından katalizlenir. Tirozin aminoasidinin aromatik yan zincirinin 3. karbon atomuna bir iyot bağlanmasıyla monoiyodotirozin (MİT)'ler ve yine tiroperoksidaz enziminin katalizlediği 2. bir reaksiyonla da monoiyodotirozinlerin aromatik çekirdeğinin 5. karbon atomunun iyotlanması ile de diiyodotirozinler (DİT) sentezlenir. Bu basamak TSH ile stimüle olurken, propiltiyourasil (PTU), metimazol ve lityum tarafından inhibe edilir. Peroksidaz enziminin konjenital eksikliğinde tiroid bezinin radyoaktif iyod uptake (RAIU)'i artar.



Ancak iyod organifiye olamaz. Bu defektle beraber hipotiroidi ve sağırılık varsa “Pendred sendromu” adı verilir (1,46).

Aşırı miktarda alınan iyod geçici olarak organifikasyonu inhibe edebilir. Buna “Wolf-Chaikoff” etkisi denir. Ama kısa bir süre sonra tiroid bu etkiden kurtulur. Buna kaçış (escape) fenomeni adı verilir (46).

#### **IV. Kenetlenme (Coupling)**

İyodotirozinlerin kenetlenerek iyodotironinleri oluşturması coupling olarak ifade edilir. Peroksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile iki DİT molekülü birleştirilerek tetrayodotironin ( $T_4$ ), bir MİT ve bir DİT birleştirilerek triiyodotironin ( $T_3$ ) sentezlenir. ATİ’lar bu basamağı da inhibe ederler (1,46). İki MİT molekülü birleştirilemez, birleştirilse dahi oluşan tironin bileşiği aktivite gösteremez.

#### **V. Tiroid hormonlarının salınımı**

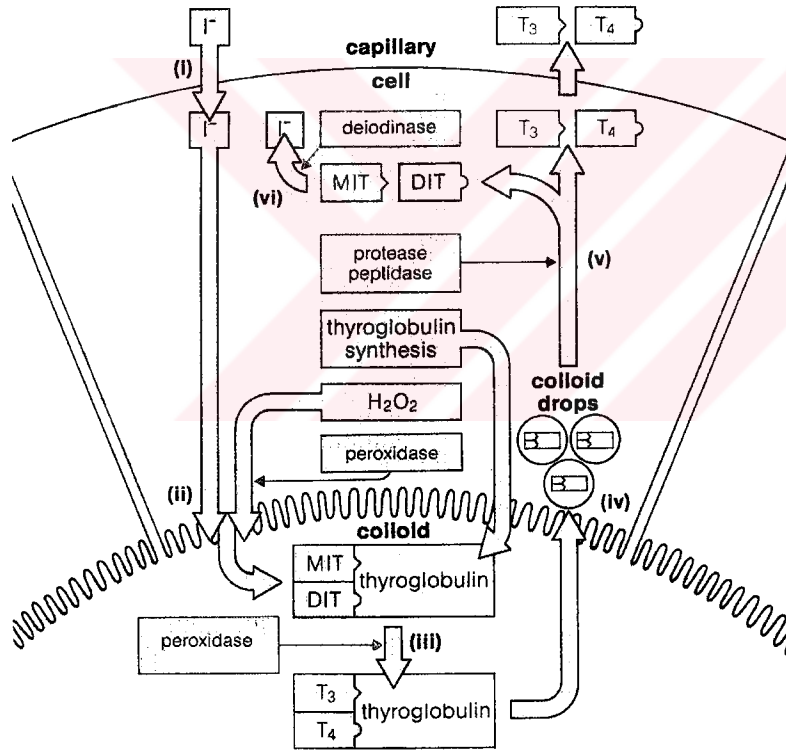
Üzerinde MİT, DİT,  $T_3$  ve  $T_4$  moleküllerini bulunduran ve bir preprohormon olarak ifade edilen Tg molekülleri folikül lümenindeki kolloid içinde ihtiyaç duyuluncaya dek muhafaza edilir. Normalde Tg yapısındaki  $T_4:T_3$  oranı 13:1 kadardır. Tiroid hücrelerinin lümene bakan apikal bölgelerindeki mikrovillüsler aracılığıyla kolloid pinositoz yoluyla tiroid hücresi içine alınır. Hücre apikalinde oluşturulan kolloid dolu endositik veziküller lizozom ile birleştirilir. Proteolitik enzimlerin aracılığıyla Tg parçalanır. İyodotirozinler ve iyodotironinler Tg’den ayrılır. Serbest hale geçen tiroid hormonları folikül hücresinin bazal membranından hücre dışı ortama salınırlar ve buradan kana geçerler. Bu salgı içinde az miktarda serbest iyot, Tg, MİT ve DİT bulunabilir. Buna karşılık hücrede kalan iyodotirozinler deiyodinazlar tarafından deiyodine edilirler ve iyodürler açığa çıkar. Bu şekilde açığa çıkan iyodürler tekrar hormon sentezinde kullanılırlar. Konjenital olarak deiyodinaz enziminde bir kusur varsa MİT ve DİT kana salınırlar. Bunlar metabolik olarak inaktif oldukları için iyot kaybına sebep olurlar (1,46,48).

Periferik kanda bulunan tiroid hormonlarının tamamına yakını 3 grup spesifik proteinlere bağlanarak taşınırlar. Bunlar tiroksin bağlayıcı globülin (TBG), tiroksin bağlayan prealbümin (TBPA) ve albümindir. TBG, her molekülü başına bir bağlanma

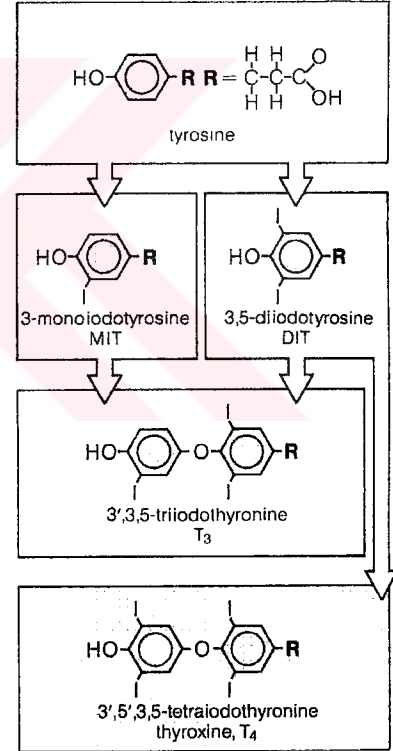


bölgesi içerir ve  $T_4$ 'ün yaklaşık %80'ini ve  $T_3$ 'ün de yaklaşık %55'ini bağlar. TBPA'nin tiroid hormonlarını bağlama sabiti TBG'den 2 kat küçüktür, ancak kanda daha fazla miktarda bulunduğu için  $T_4$ 'ün %15 ve  $T_3$ 'ün %25'ini bağlar. Albümin bağlama sabiti en düşük olanıdır ve  $T_4$ 'ün %5 ve  $T_3$ 'ün %20'sini bağlayabilir.  $T_4$ 'ün yaklaşık %0,03'ü,  $T_3$ 'ün %0,3'ü serbest halde dolaşır. Metabolik olarak aktif olan hormonlar serbest hormonlardır. (1). Bağlayıcı proteinler tiroid hormonlarını yıkımdan ve böbrekler ile atılmaktan koruyarak bir dolaşım rezervi oluştururlar. Aynı zamanda organizmayı ani hormon değişikliklerine karşı da korurlar.  $T_4$  plazma proteinlerine daha fazla bağlandığı için yarılanma ömrü  $T_3$ 'den daha uzundur.

## Tiroid Hormonlarının Sentez ve Salınımı



## İyodotirozinlerin ve İyodotironinlerin Biyosentezi



**Şekil 1. Tek bir tiroid folikül hücresinde tiroid hormon sentez ve salınımı (43).** Başlıca 6 basamak vardır. (i) İyodürün aktif transportu, (ii) Oksidasyon ve iyodinasyon (organifikasyon). (iii) Coupling, (iv) Kolloid rezorpsiyonu, (v) Proteoliz, ve (vi) Deiyodinasyon.

## VI. Hedef hücreye bağlanma

Tiroid hormonlarının sadece serbest formları hedef hücreye girebilir. Hücrelere giriş direkt difüzyonla veya aktif transportla olabilir. Hücrede esas etkili olan  $T_3$ 'dür.  $T_4$ , daha ziyade bir prohormon olarak kabul edilir. Normal tiroid bezi tiroid dışı  $T_3$  havuzunun sadece %20'sinden sorumludur, geri kalan kısmı ise periferik dokularda  $T_4$ 'ün,  $T_3$ 'e çevrilmesiyle oluşur. Bu olaya monodeiyodinasyon adı verilir. 5'-deiyodinaz enzimi katalizörlüğünde  $T_4$ 'ün dış tirozil halkasından bir iyot koparılır.  $T_3$ ,  $T_4$ 'ün en az on katı kadar aktiftir. Hücre içinde tiroid hormonlarının temel etkisi çekirdek üzerinedir. Ayrıca hücrede plazma zarı, sitoplazma ve mitokondride tiroid hormonlarını bağlayan proteinlerin varlığı gösterilmiştir. Ancak bu bağlanmaların fizyolojik etkileri henüz ortaya konulamamıştır. Tiroid hormonları çekirdekteki spesifik reseptörlerine bağlanırlar. Aktive olan reseptör tiroid hormonlarına duyarlı genlerin önünde yerleşen spesifik cevap elemanlarını tanıyarak gen transkripsiyonunu uyarır. Tiroid hormonları memelilerde protein, lipid ve karbohidrat metabolizmasında görevli spesifik proteinlerin ve enzimlerin sentezini uyararak bazal metabolizmayı ve oksijen tüketimini artırır. Buna bağlı olarak mitokondriyal aktivasyon artar,  $Na^+K^+$ -ATPaz aktivitesi artar ve plazma membran fonksiyonları dinamikleşir (1,46,49).

## VII. Tiroid hormonlarının metabolizması

Tiroid hormonlarının biyolojik aktivitesi yapısındaki iyot atomunun yerleşimine bağlıdır. Gerçekten  $T_4$ 'ün dış halkasındaki iyodun, 5'-deiyodinasyonu ile en aktif tiroid hormonu olan 3,5,3' triiyodotironin ( $T_3$ ) oluşmaktadır. Halbuki  $T_4$ 'ün iç halkasındaki "5 deiyodinasyon"u ile oluşan 3,3',5' triiyodotironin (reverse- $T_3$ ,  $rT_3$ ) biyolojik olarak inaktiftir. Daha ileri deiyodinasyon, molekülün biyoaktivitesinin kaybına neden olur. Tiroid hormonları deiyodinatif ve nondeiyodinatif mekanizmalar ile metabolize edilir. Deiyodinasyonla görevli 3 adet deiyodinaz vardır (1,46,49):

**a) Tip 1 (1,5')-deiyodinaz:** Karaciğer, böbrek, tiroid ve kaslarda bulunur. En önemli fonksiyonu plazmaya  $T_4$ 'den  $T_3$  sağlamasıdır. Tirotoksikozda yükselen bu deiyodinazın aktivitesi PTU tarafından engellenir.

**b) Tip 2 (2,5')-deiyodinaz:** Beyin ve hipofizde bulunur. Fonksiyonu merkezi sinir sisteminde ve adenohipofizde hücre içi  $T_3$  düzeyini sabit tutmasıdır. PTU'den etkilenmez, fakat dolaşımdaki  $T_4$ 'e hassastır. Serum  $T_4$  düzeyi yükselince, enzim yoğunluğu düşerek beyni aşırı  $T_3$  etkisine karşı korur. Dolaşımdaki  $T_4$  düzeyi de bu mekanizma ile ayarlanır. Gerçekten beyin ve adenohipofizdeki  $T_3$  yoğunluğunun azalması tiroid hormonlarını kontrol eden mekanizmayı ayarlar.

**c) Tip 3 (3,5)-deiyodinaz :** Plasenta ve merkezi sinir sisteminde bulunur. Fonksiyonu,  $T_4$ 'ü biyoaktif olan  $rT_3$ 'e,  $T_3$ 'ü de biyoaktif olan 3,3' diiyodotironine çevirerek fetus ve beyni  $T_4$ 'deki değişikliklere karşı korumasıdır.

Hücre içerisine giren serbest  $T_3$  ve  $T_3$ 'e dönüşen  $T_4$  spesifik aktivitesini gösterdikten sonra deiyodinasyon ile iyodunu kaybeder.  $T_4$ 'ün %80'i deiyodinasyona uğrar ve %35'i  $T_3$ 'e, %45'i  $rT_3$ 'e dönüşür. Geriye kalan kısım inaktif diiyodotironin'e ( $T_2$ ) sonra monoiyodotironine dönüşür. Deiyodinize edilen  $T_3$  ve  $T_4$  deaminasyon ve dekarboksilasyona uğratarak triiyodoasetik asit (TRÍAC) ve TETRAC metabolitlerine dönüştürülür. Bu esnada bir miktar tironin de oluşur. Karaciğerde glukuronidasyona uğrayıp safraya atılır. Az miktarda  $ST_4$  safra ve idrar yoluyla elimine edilir. Tiroid hormonlarının daha küçük bir miktarının da karaciğer ve böbrekte sulfonasyon ve deiyodinasyon ile inaktivasyonu sağlanır ve vücuttan atılır.

### 2.1.5. TİROİD FONKSİYON TESTLERİ

#### a) Serum Total $T_4$ (TT<sub>4</sub>) ve Serbest $T_4$ (ST<sub>4</sub>), Serum Total $T_3$ (TT<sub>3</sub>) ve Serbest $T_3$ (ST<sub>3</sub>), ve TSH

Tirotoksikozda serum total veya serbest  $T_4$  seviyesi yüksek, TSH konsantrasyonu düşüktür. TSH düzeyinin düşük olmasına rağmen  $T_4$  seviyesi normale  $T_3$  tirotoksikozu olabilir. Serum tiroid hormon düzeylerini değerlendirirken tiroid hormonlarını bağlayan proteinlere dikkat edilmelidir. Serumda bu proteinlerin, özellikle TBG'in artması, total  $T_4$  ve  $T_3$  konsantrasyonunun artmasına yol açar. Gebelik, konjenital TBG fazlalığı, hepatit, hepatoma, HIV enfeksiyonu, östrojen, eroin, klofibrat, 5-fluorourasil kullanımı serum TBG seviyesini artırır. Nadir bir durum olan familial disalbuminemi hipertiroksinemide ise albuminin tiroksine affinitesi ve dolayısıyla total serum  $T_4$ 'ü artmıştır (1). Ayrıca akut

psikiyatrik ve tıbbi hastalıklarda, hipofiz bezinde tiroid hormonuna direnç olduğunda, propranolol, amiodaron, radyokontrast madde kullanımında ve tiroid hormonlarına karşı antikor geliştiğinde serum T<sub>4</sub> seviyesi yükselir (1,50).

Doğuştan TBG eksikliği, androjen, steroid kullanımı ve kronik karaciğer hastalığı varsa serumda TBG seviyesi azalır. Yukarıda belirtilen durumların hepsinde hastalar klinik olarak ötiroid durumdadır ve genellikle serum TSH konsantrasyonları normaldir (1,50).

### **b) Tiroid otoantikörleri**

Tiroid hastalıklarının araştırılmasında immünolojik araştırmaların da önemli yeri vardır. Antitiroid otoantikörleri Basedow-Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, primer hipotiroidi ve basit (toksik olmayan) guatr gibi önemli ve sık görülen hastalıklarda tespit edilebilirler. Bu antikorlar antitiroglobülin (Anti Tg), antitiroid peroksidaz (Anti TPO), tiroid reseptör otoantikörleri (TSH-R Ab) ve tiroid “growth” immünglobülinleridir (TGİ). TSH-R Ab, Basedow-Graves hastalığının patofizyolojisinde rol oynayan ve folikül hücrelerinde bulunan TSH reseptörlerine karşı gelişen antikorlardır (1,51-52). Stimülan ve blokan olmak üzere 2 ayrı alt tipi vardır. Stimülan tipine aynı zamanda tiroid stimülan immünglobülinler (TSİ) de denir. TSH R antikorları Graves hastalığında % 85-95 oranında bulunur. Normal populasyonda ise bulunmaz. Bu antikorlar Graves hastalığının patogenezinde son derece önemlidirler. Stimülan TSH R antikorları tiroid bezindeki TSH reseptörlerine bağlanarak TSH benzeri etki gösterir ve sonuçta tiroid bezi stimüle olarak tiroid hormon sentezini artırır. TSİ’ler tiroid bezini stimüle ederek Graves hastalığına neden olur. Anti Tg, Basedow-Graves hastalarının %50-70’inde ve otoimmün tiroiditli hastaların yaklaşık %80-90’ında artmış olarak bulunur. Normal populasyonda ise % 5-20 oranında saptanmıştır. Anti TPO, tiroid peroksidazına karşı gelişen ve Basedow-Graves hastalarının %50-85’inde saptanan antikorlardır. Otoimmün tiroiditli hastalarda bu antikorlar yaklaşık %90-100 oranında görülürler. Ancak bu antikorlar normal populasyonun %15-20’sinde bulunabildiği için spesifik değildirler.

### c) TRH testi

Günümüzde oldukça duyarlı yöntemlerle TSH tayini yapılabildiği için artık TRH testine gerek duyulmamaktadır. Ama TSH'ın hafifçe baskılanmış, T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> seviyelerinin ise hafifçe artmış olduğu “sınırdaki hipertiroidi” tanısında hala değerlidir. Hastaya 200-500 µg TRH i.v yoldan verilir. Enjeksiyondan önce, enjeksiyondan 30, 60 ve 90 dakika sonra kan alınır. Bu örneklerde TSH tayini yapılır (17). Normalde TSH, TRH enjeksiyonundan sonra bazal düzeye göre 2-4 kat artar veya en az 5 µU/ml'yi aşar (19). Ayrıca 20-30. dakikalarda maksimum seviyeye ulaşan TSH, 60-90. dakikalarda normal düzeye iner. Hipertiroidide hipofiz bezi tiroid hormonları tarafından süprese edildiği için TRH enjeksiyonundan sonra TSH yukardaki seviyelere artmaz. Yaşlı ve depresyonda olan hastalar ile kortikosteroid veya dopamin kullanan vakalarda hatalı pozitif sonuçlar elde edilebilir (1,50).

### d) Radyoaktif iyot uptake testi (RAIU)

RAIU'nun ağızdan verilmesinden sonraki belirli zamanlarda tiroid bezi tarafından ne oranda tutulduğunun araştırılmasıdır. Sıvı veya kapsül formundaki radyonüklidin oral olarak verilmesinden 4 ile 24 saat sonra, tiroid bezinden uptake cihazı ile yapılan eksternal sayım ile verilen aktivitenin ne kadarının bez tarafından tutulduğu ölçülür. RAIU için I-131 veya I-123 kullanılabilir. RAIU'yi yaşam alan bölgeye ve diyetle alınan iyot oranına göre değişmekle birlikte, normalde, I-131 ile ilk 4-6 saatte %5-15 ve 24. saatte de %30 civarındadır. Dozdan sonraki ilk 4 saatlik ölçümler radyoiodun, folikül hücreleri tarafından yakalanmasını (trapping) ve organifikasyonunu gösterirken, 24 saatlik ölçümler ise organik olarak bağlanmış iyodun hormon sentezine giriş ve salınma oranını yansıtır. Bununla birlikte hızlı turnover durumunda 4 saatlik RAIU'yi yüksek iken 24 saatlik RAIU'yi normal bulunabilir (53).

Bu test tirotoksikoz nedeni araştırılırken kullanılır. Tiroid bezinin uptake örneğine göre tirotoksikozları a) yüksek I-131 uptake'i ile ve b) düşük I-131 uptake'i ile karakterli tirotoksikozlar olarak sınıflandırmak mümkündür. Uygun tedavi yönteminin seçilmesinde bu ayırım önemlidir. I-131 tedavisine tabi tutulacak tirotoksikoz vakalarında bezin I-131'i yakalama kapasitesini meydana çıkarmada yararlıdır. T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> supresyon testleri, TSH

stimülasyon testi ve perklorat boşaltma testlerinde tiroidin fonksiyonel değişiklikleri bezin I-131 uptake'i ile izlenir (53).

#### e) T<sub>3</sub> supresyon testi

Bu test tiroid otonomisini araştırmak için kullanılır. Önce 24 saatlik uptake saptanır, sonra 7 gün süreyle günde 75-100 µg T<sub>3</sub> ağızdan verilir. Tekrar 24 saatlik uptake ölçümü yapılır. RAİ tutulumunun bazal seviyeye göre en az %50 azalması tiroidin veya tiroiddeki bir nodülün süprese olabildiğini, otonom çalışmadığını gösterir (54).

#### f) Tiroid sintigrafisi

Tiroid sintigrafisi tiroid dokusunun fonksiyonu ve yapısı hakkında bilgi sahibi olma-mızı sağlar. Sintigrafi tiroid bezinin büyüklüğünü, soliter veya multiple nodülleri ve bunların fonksiyonel olup olmadıklarını, ektopik tiroid ve substernal guatr varlığını araştırmak için kullanılır. Bu amaçla kullanılan başlıca radyofarmasötikler şunlardır: Teknesyum-99m-Perteknetat, İyod-131, İyod-123, Talyum-201, Tc-99m SESTAMİBİ (53).

Tc-99m Perteknetat 140 keV enerjisinde, yarılanma ömrü altı saat olan ve yalnız gamma ışını veren ideal bir radyofarmasötiktir (1,55)

#### g) Tiroid ultrasonografisi

Ultrasonografi (USG) tiroid bezinin yapısını belirlemek için kullanılan basit ve hızlı bir metoddur. Çok yüksek frekanslı ses dalgalarının vücutta yansımaları esasına dayanır. USG birçok klinik durumda kullanılır: 1) Palpe edilmesi güç veya şüpheli olan nodüllerin varlığını göstermede, 2) Kanseri riski yüksek olan (daha önce radyasyon tedavisi görmüş olanlar gibi) okült hastalıkların gösterilmesinde, 3) Nodülün kistik, solid veya kalsifiye olup olmadığını belirlemede, 4) İİAB (İnce iğne aspirasyon biyopsisi)'ye yol göstermede, 5) Malignensiye bağlı tiroidektomiden sonra tiroid lojunun ve servikal lenf nodularının incelenmesinde ve 6) Ektopik tiroid dokusunun değerlendirilmesinde USG çok önemli bilgiler sağlar. Ayrıca Basedow-Graves veya sıcak nodülü olan hastalarda tedavi amacıyla



verilecek olan RAI miktarını belirlemek için tiroid volümünün hesaplanmasında USG'den yararlanılabilir (1,56).

### 2.1.6. BASEDOW-GRAVES HASTALIĞI

Tirotoksikoz; endojen ve/veya ekzojen kaynaklı tiroid hormon fazlalığının neden olduğu bir sendromdur. Hipertiroidi ise tiroid bezinden aşırı miktarda tiroid hormonun sentez ve sekresyonuna bağlı olarak oluşan klinik bir tablodur. Erişkin popülasyonda prevalans %1.8 olup kadın/erkek oranı 4-10/1'dir. Klinik hipertiroidi prevalansı kadınlarda ~%0.5 olup hayat boyu hipertiroidi riski kadınlarda % 5 ve erkeklerde % 1'dir. Yıllık insidansı ise kadınlarda ~%0.4, erkeklerde %0.08'dir (1,5,57).

Tirotoksikozun nedenleri arasında en sık olarak görülen durum Basedow-Graves Hastalığı (toksik diffüz guatr)'dır. Basedow-Graves Hastalığı; diffüz guatr, tirotoksikoz, infiltratif oftalmopati (orbitopati, ekzoftalmi) ve infiltratif dermopati ile karakterize klinik bir sendromdur. Kadınlarda erkeklere göre yaklaşık 5 kat daha fazla görülür. Prevalans, kadınlarda %1.2'dir. Zirve insidans 20- 40 yaşları arasındadır (1,5).

**a) Etiyoloji ve Genetik:** Graves hastalığı etyolojisi bilinmeyen otoimmün bir hastalıktır. Güçlü bir ailevi yatkınlık söz konusudur. Graves'li hastaların akrabalarının ~%50'sinde tiroid otoantikörleri (+)'dir. Sıklıkla beyazlarda HLA-DR3 ve HLA-B8, siyahlarda HLA-B17 ve sarı ırkta HLA-B5 ve Bw46 (+)'tir. Class II HLA-DR3 haplotipi, relatif riski 2-6 kat artırır. Graves hastalığı ile HLA DQA1\*0501 haplotipi arasında birliktelik gösterilmiştir. Bunun aksine HLA DR  $\beta$ 1\*07 ekspresyonunun hastalıktan koruyucu olduğu görülür. İki yeni derlemede Graves hastalığının genetiği şu ana kadar yapılan büyük çalışmaların ışığı altında özetlenmiştir. (2,6). Buna göre çok sayıda genetik faktörlerin Graves hastalığının gelişme riskine katkıda bulunduğu görülüyor. Monozigot ikizlerde hastalığın penetransı yaklaşık %30'dur. Graves hastalığı ve Hashimoto tiroiditi olan hastalarda sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4) gen polimorfizmi bulunmuştur (6,58). Her 2 hastalık için relatif risk ~ 2 kat artar. Aynı gen polimorfizmi Tip 1 DM'da da saptanmıştır. Graves hastalığına özgü bir gen loküsü kromozom 20q11'de bulunur. Ayrıca 5q31-q33 ve 18q21 loküslerinde otoimmün tiroid hastalığı için önemli gen loküsleri olduğu gösterilmiştir. Minör loküs ise kromozom 8'de 8q24 alanındadır ve bu alanda ilginç olarak Tg geni vardır. Yeni yapılan bir çalışmada Tg geninin familial otoimmün tiroid

hastalığına eğilim oluşturan tiroide özgü ilk gen olduğunu ortaya koymuştur. Ancak bugüne kadar Tg sekans değişikliği ile otoimmün tiroid hastalığı arasındaki ilişki çalışılmamıştır. TPO ve TSH reseptör (TSH-R) gen polimorfizmi ile Graves hastalığı arasında ise ilişki bulunamamıştır (59).

**b) Patoloji:** Tiroid foliküllerinde hipertrofi ve hiperplazi vardır. Epitel kolumnardır ve kolloid azalmıştır. Foliküler kolloidde taraklaşma görülür. Tiroidde değişebilir derecede lenfosit infiltrasyonu olup bazen germinal merkez oluşumu ile birliktedir. Dolayısıyla germinal merkezli büyük lenfoid foliküller ve diffüz lenfoplasmositik infiltratla çevrili hiperplastik tiroid folikülleri gözlenir. Lenfositik infiltratlarda IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13 ve IL-15 dahil bir dizi sitokinler üretilir (9). Th1 veya Th2 cevabından birinin hakimiyeti yoktur. Tiroid hücreleri IFN- $\gamma$  ile stimülasyondan sonra class II moleküllerini eksprese ederler. T ve B hücreleri dışında tiroidde monosit/makrofajlar ve dendritik hücreler de birikir. Muhtemelen daha sonra anlatılacak olan kostimülatör sinyallerin sağlanmasından sorumlu antijen sunan hücreler (APC) olarak majör bir role sahiptirler. Lenfositik infiltrattaki Th1 hücrelerinin ürettiği IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 'nın tiroisitleri stimülasyonundan sonra tiroid hücreleri tarafından üretilen tiroid-hücre-kaynaklı monosit kemoatraktan-1 (MCP-1) muhtemelen monositlerin birikmesinden sorumludur. Dendritik hücre kaynaklı IL-1 ve IL-6 aynı zamanda tiroid hücre büyümesini inhibe eder (1,8,9). Timus, lenf düğümleri ve dalakta da lenfoid hiperplazi bulunabilir.

**c) Patogenez:** Tiroid hücre membranındaki TSH R'e karşı antikorlar (TSHR Ab) vardır ve tiroid stimülan antikorlar olarak davranırlar (TSH-R Ab [stim]). Tiroid hücrelerinin büyüme ve fonksiyonunu artırırılar. Genetik predispozisyon zemininde akut atağı tetikleyen çevresel faktörler açık değildir. Otoimmüniteyi başlatan bazı çevresel faktörler; gebelik (özellikle postpartum peryot), iyot fazlalığı (özellikle iyot eksikliği bölgelerinde iyotlama programları sonrası), RAI sonrası ve çocuklarda boyuna radyoterapi yapılması, lityum tedavisi, virüs ve bakteri infeksiyonları (Yersinia enterokolitika ile TSH-R'ü arasında immünolojik yönden benzer proteinler vardır) ve glukokortikoid kesilmesi, stress ve sigara sayılabilir. Graves'li hastalardan alınan periferik kan lenfositleri ve tiroid bezindeki lenfositler in vitro TSHR Ab üretilirler (15,16). TSHR Ab'leri vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörünün lokal ekspresyonunu artırarak tiroidin vaskülaritesini artırırılar.



**Tiroid Otoantijenleri:** En önemli tiroid antijenleri; Tg, TPO, TSH-R ve sodyum-iyot simporter (NIS) antijenleridir (1,3).

1. **Tg:** 660 kDa'luk bu glikoprotein tiroid hücrelerince sentez edilir ve içinde T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> üretimi gerçekleşir. Her bir Tg molekülü ~ 100 tirozin rezidüsü içerir, ¼'ü iyotlanmıştır. İnsan Tg'nin sekansı tayin edilmiştir. Tg içindeki T ve B hücre epitoplarnının yeri hala belli değildir. İki benzer alt birimden oluşur, 330 kDa'lık her birim, 2 majör B hücre epitopuna (konformasyonel) ve 1 minör epitopa sahiptir. Son çalışmalar Tg geninin otoimmünite gelişiminde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir.

2. **TPO:** 103 kDa'luk bu molekül tiroid hormon sentezinde anahtar enzimdir (tirozinlerin iyodinasyon ve couplingi). TSH etkisiyle sentezi artar. Tiroid mikrozomal antijen TPO'dur. Apikal membranda bulunur. Molekül içinde multipl T ve B hücre epitoplarnı vardır. A ve B olmak üzere 2 majör antikor bağlanma domaini içerir.

3. **TSH-R:** 764 aminoasitlik bir glikoproteindir. G protein-coupled reseptör ailesinin bir üyesidir. TSH veya anti-TSH-R Ab, cAMP üzerinden sinyal iletimine neden olur. Tiroid hücreleri uyarılır. Bu reseptör bir hücre yüzey (membran) reseptörüdür. Bir ektramembranöz kısmı, 7 transmembran bölümü ve bir intrasellüler kısmı vardır ve bu bölüm adenilat siklazın Gs bağlama birimine bağlanır. Üzerinde multipl T ve B hücre epitoplarnı (genellikle konformasyonel) bulunur. N-Terminal alana bağlanan antikorlar stimulan etkiye neden olur. Gerçekte stimulan antikorların membrandaki TSH reseptörüne değil, TSH-R'nün dolaşıma dökülen serbest A alt birimine bağlandığı 2002 yılında gösterilmiştir (60). Transmembran bölgeyi içermeyen immünolojik aktiviteye sahip özel bir TSH-R varyantı tiroid dışı yerlerde (orbita) olabilir. TSH-R transkriptleri retrobulber yağ dokusunda ve Graves pretibial dermopatisinde de gösterilmiştir. Bu nedenle Graves oftalmopati ve dermopatisinin patogeneğinde rol oynama olasılığı yüksektir. Hücre yüzeyine komşu 261-370 ve 388-403 no.lu aminoasitlere bağlanma aktiviteyi bloke eder.

4. **NIS:** 65 kDa ağırlığındaki bu molekülün TSH etkisiyle aktivitesi artar. NIS, folikül hücrelerinin bazolateral membranında bulunur ve iyot transportunu sağlar. Tiyosiyanat ve perklorat aktivitesini engeller. Graves hastalığı ve sıcak nodüllerde NIS artarken, soğuk nodüllerde, Hashimoto tiroiditinde ve iyod yetmezliği guatrında düşüktür. NIS antikorları Graves'li hastalarda %10.7 ve Hashimoto tiroiditinde ise %20.8 oranında bulunmuştur.

## Graves Hastalığı Patogenezinde Lenfositler ve Sitokinlerin Rolü

Sitokinler, başlıca inflamatuvar hücreler tarafından üretilen fakat aynı zamanda immün olmayan hücreler tarafından da sentezlenen ve salgılanan bir grup polipeptidlerdir. İnflamatuvar ve immün reaksiyonların başlamasında ve koordinasyonunda anahtar bir role sahiptirler (9).

T helper (yardımcı T hücreleri, Th), salgıladıkları sitokin profillerine ve efektör fonksiyonlarına göre Th1 ve Th2 olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Th1 hücreleri hücrel immünite ile ilişkili olup (makrofajlar ve sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu gibi) predominant olarak hücrel immün cevabı başlatan IFN- $\gamma$  başta olmak üzere TNF- $\alpha$ , ve - $\beta$ , IL-1, IL-2, IL-8, IL-12 ve IL-18 salgılar. Bu sitokinler tirosit destrüksiyonunu artırır. Th1 hücreleri, gecikmiş tip hipersensitivite ve farelerde IgM'den IgG'ye antikor sınıflarındaki bir değişikliğin oluşmasında aracı bir rol oynar. Th2 hücreleri ise humoral immünite ile ilişkili olup başlıca IL-4 olmak üzere IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve TGF- $\beta$  salgılar. Th2 hücreleri, B hücre farklılaşması ve antikor yapımından sorumludurlar. B hücrelerindeki antikor yapımını IgM'den IgG1 ve IgE'ye değişim şeklinde uyarırlar. Th2 sitokinleri tirosit destrüksiyonunu önlerler, humoral immün cevap oluştururlar, Th1 sitokinleri ise immün cevabı inhibe ederler ve antiinflamatuvar etki gösterirler. T hücrelerine ilaveten B hücreleri, makrofajlar, monositler ve dendritik hücreler dahil diğer inflamatuvar hücreler de sitokin üretme yeteneğine sahiptirler (6,7,9).

Son yıllarda otoimmün tiroid hastalıklarının patogenezinde sitokinlerin rolü yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Graves hastalığında sitotoksik T lenfositlerindeki (Ts, T<sub>8</sub>) defekt nedeniyle Th (T<sub>4</sub>); B lenfositlerini tiroid otoantikor sentezi için uyarır. B hücreleri tiroid stimulan antikorlar (TSİ), anti TPO ve anti Tg salgırlar. Otoreaktif T lenfositlerden salınan sitokinler ise inflamasyona neden olurlar (2,7,9,11,61-62).

Graves hastalığında CD8+ T hücreleri (T supresör-sitotoksik) azalırken Th2 sitokin ekspresyonu artmıştır. Bu nedenle tirositte harabiyet yoktur ve yaşamı devam eder. Özellikle fazla miktarda salgılanan IL-4 ve IL-10, tirositleri Th1 immün cevaptan (inflamatuvar etki) korurlar. Bu antiinflamatuvar etkiyi T hücre anejisi yaparak, sitotoksik cevabı suprese ederek ve Th1 cevabı Th2 cevaba dönüştürerek yaparlar. O nedenle IL-10, otoimmün tiroid harabiyetini önleyen potansiyel bir tedavi seçeneğidir. Sitotoksik lenfositler (öldürücü hücreler) ve sitotoksik antikorlar tiroid dokusu, orbita fibroblastlarda

ve orbita kas dokusunda bulunurlar. Foliküler harabiyet olmaksızın nonhomojen lenfosit infiltrasyonu vardır (1,5).

Graves hastalığında immün cevabın tipini belirlemek amacıyla serum sitokin seviyelerindeki değişiklikler de incelenmiştir. Bu çalışmaların avantajı, immün cevap daha spesifik olduğunda hastalığın erken safhasında sitokin profilini analiz etme imkanını sağlamaktır. Bununla birlikte serum sitokin seviyeleri intratiroidal veya retrobulber sitokin profilini yansıtmayabilir. Gravesli hastaların serumlarında kontrollere göre serum IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , soluble IL-2 reseptör (sIL-2R), IL-4, IL-5, IL-6, soluble IL-6 reseptör (sIL-6R), IL-8 ve IL-10'un arttığı bulunmuştur (12-14). Bu durum hastalıkta mikst bir Th1/Th2 cevabı olduğunu göstermektedir. Diğer bazı araştırmalarda ise Th2 cevabının arttığı (11,62-64) ya da Graves hasta serumlarında IL-12 ve IL-18 artışının eşlik ettiği Th1 cevabın hakim olduğu (13,65-66) gözlenmiştir. Sitokin seviyeleri ile hastalık relapsı arasındaki ilişki de incelenmiş ve Graves hastalığı nüksü olan hastalarda serum IL-13 seviyesi yüksek bulunmuştur (67). Bir çalışmada Gravesli hastalarda yüksek saptanan serum IL-6 seviyeleri ile hastalık aktivitesi arasında korelasyon saptanmıştır (68). Diğer araştırmacılar ise Gravesli hastalarda serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , sIL-2R, IL-6, sIL-6R, ve IL-10 seviyelerinin kontrollere göre yüksek olduğunu gözlemişler, fakat bu seviyeler ile hastalık ciddiyeti, aktivitesi, süresi ve sigara içimi arasında bir ilişki tesbit edememişlerdir (69-71). Diğer bir çalışmada ise kortikosteroidlerle tedavi edilen Graves oftalmopati hastalarda steroid tedavisinden sonra IL-4 ve IL-10 seviyelerinde artma bulunmuş ve bu sitokinlerin hastalığın remisyonunda önemli bir role sahip olduğu ileri sürülmüştür (70). Yukardaki çalışmalar Graves hastalığında mikst bir Th1 ve Th2 cevabına neden olduğu düşüncesini desteklemektedir. Nüks Graves hastalığında saptanan yüksek IL-13 seviyeleri hastalık rekürrensinde Th2 cevabının önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu durum aynı zamanda Graves hastalığındaki Th2 cevabının konvansiyonel Th2 sitokini olan IL-4'den ziyade IL-13 aracılığıyla olduğuna işaret edebilir. Diğer yandan steroid tedavisinden sonra IL-4 ve IL-10'da artma, ve IL-18'de azalma tedaviye cevabı önceden tahmin etmede bu sitokinlerin bir markör olarak kullanılabileceğini gösterir (9).

**T Hücre Kostimülasyonu ve Otoimmün Hastalıklar:** Bilindiği gibi bağışıklık sistemi organizmayı infeksiyonlara ve tümörlere karşı savunmada özelleşmiş rolleri olan hücreler ve moleküllerin oluşturduğu bir organizasyondur. Yabancı bir antijene karşı bağışıklık sisteminin verdiği cevap iki şekildedir. 1- doğal immün cevap, 2- edinsel

(kazanılmış) immün cevap. Doğal immün cevapda fagositik hücreler (nötrofiller, monositler ve makrofajlar, dendritik hücreler), inflamatuvar aracılara salgılayan hücreler (eozinofiler, bazofiller ve mast hücreleri) ve doğal öldürücü hücreler (NK) gibi hücreler ve kompleman, akut faz proteinleri, sitokinler (interferonlar) gibi moleküler komponentler rol oynarken edinsel (adaptif) immün cevapta kan hücrelerinden T lenfositleri ve B lenfositleri (Ig ve antijen-spesifik antikorlar üretir) ve antijen sunan hücreler (makrofaj, dendritik hücre gibi) yer alır. T lenfositleri de iki alt gruba ayrılır. Yardımcı (helper) T lenfositleri (Th) ve sitotoksik T lenfositleri (Ts) (5,6,9).

İmmün cevap oluşturmak için henüz aktive olmamış bütün virgin T lenfositler immün cevaba başlarken iki sinyale ihtiyaç gösterirler. 1. sinyal T hücre aktivasyonunu sağlar. Antijen sunan hücre (APC); MCH ile birlikte antijenin T hücrelerine sunulmasında rol oynar (Şekil 2). Aktivasyon sırasında T hücre reseptörü (TCR) stimülasyonu zorunludur, fakat yeterli değildir. T hücresinin tam olarak aktivasyonu için 2. bir sinyale ihtiyaç vardır. Söz konusu olan bu kostimülatör sinyaller, nonpolimorfik proteinlerin karşılıklı etkileşimine bağlı olup aktivasyon kaskadının başlaması, devam etmesi ve düzenlenmesinde rol alırlar. Bu kostimülatör sinyal yolları içinde en iyi tanımlanan B7: CD28/CTLA-4 (Sitotoksik-T lenfosit-ilişkili-4) kostimülatör yoludur (Şekil 2 ve 3). CD28 ve CTLA-4; iki lenfosit yüzey molekülüdür. CD28 (stimülatör bir 2. sinyal ileticisi) hem istirahatteki ve hem de aktive olmuş T hücreleri tarafından eksprese edilir. T lenfositleri üzerindeki CD28 molekülüne APC üzerindeki B7 molekülünün bağlanması, T hücre aktivasyonunu kostimüle ederek, hücre yaşamı için gerekli sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin ekspresyonuna neden olur (Şekil 3). CD28'in aksine CTLA-4 yalnızca aktif T hücreleri tarafından eksprese edilir. CD28'den farklı olarak CTLA-4 bir inhibitör 2. bir sinyal transdüseri (ileticisi) olabilir ve T hücre aktivasyonunu sonlandırabilir. CD28 bağlanma yokluğunda naive T hücreleri üzerindeki TCR'nin MHC class II molekülü ve antijenik epitop ile karşılıklı etkileşimi T hücresinde anerjiye yol açar. T hücresi paralize olur ve bir cevap oluşmaz (Şekil 4) Benzer şekilde CTLA-4'ün işgali T hücre anerjisi ile sonuçlanır. Anerjinin indüksiyonu, otoimmün cevapların önlenmesinde önemli bir mekanizmadır. Diğer önemli membran-bağlı kostimülatör sinyaller de mevcuttur. Örneğin CD40 ile CD40 ligandı ve APC'den kaynaklanan sitokinler (IL-1 gibi) arasındaki etkileşimler önceden aktive olan T ("hafıza") hücreleri için kostimülatör olarak etki edebilir. Böylece antijen sunumundan sonra gönderilen kostimülatör sinyallere bağlı olarak

farklı sonuçlar ortaya çıkabilir. CD40; T hücresine bağlı B hücresi üzerindeki kostimülatör aktivitenin hızlı indüksiyonu için hem gerekli ve hem de yeterlidir. Bu kostimülatör aktivite, hem B7-1 ve hem B7-2'den farklı ve hem de CD28'den bağımsızdır (72-74).

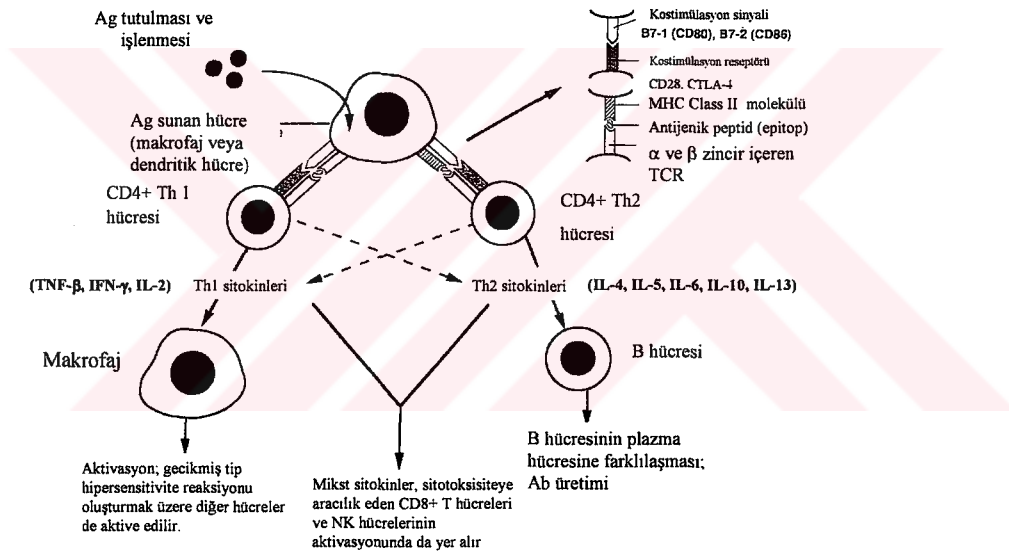
B7 antijenlerinin ekspresyonu B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) ile düzenlenir. Uyarılmamış APC'ler genelde B7-1 ve B7-2 molekülleri yönünden negatiftir. Aktivasyon sonrası dendritik ve epidermal Langerhans hücreleri ile, B hücreleri ve makrofajlarda B7-1 ve B7-2'nin ekspresyonu artar (75).

Akut veya kronik immün cevapların çoğunda B7-2 molekülü B7-1'den daha erken uyarılır ve seviyeleri daha yüksektir. B7-1 ve B7-2 molekülleri T hücrelerinin proliferasyonu, IL-2 yapımı ve hücre yüzeyinde IL-2 reseptörlerinin ekspresyonunu kostimüle edebilir. B7-1 ve B7-2 antagonistleri in vivo ve in vitro olarak immün cevapları durdurabilir ve antikor yapımını bloke edebilir (76).

B7-CD28 yolunun Tip 2 Th hücrelerinin oluşumunda, Tip 1 Th hücre oluşumundan daha önemli olduğu gösterilmiştir. Çünkü CD28 negatif farelerde IgG1'in miktarı azalmıştır. B7 moleküllerinin kostimülatör gücü CD4 T lenfositlerle sınırlı değildir. B7 molekülleri, CD4 T hücrelerinden gelen harici sinyalin yokluğunda da CD8 T hücrelerini kostimüle edebilir (77).

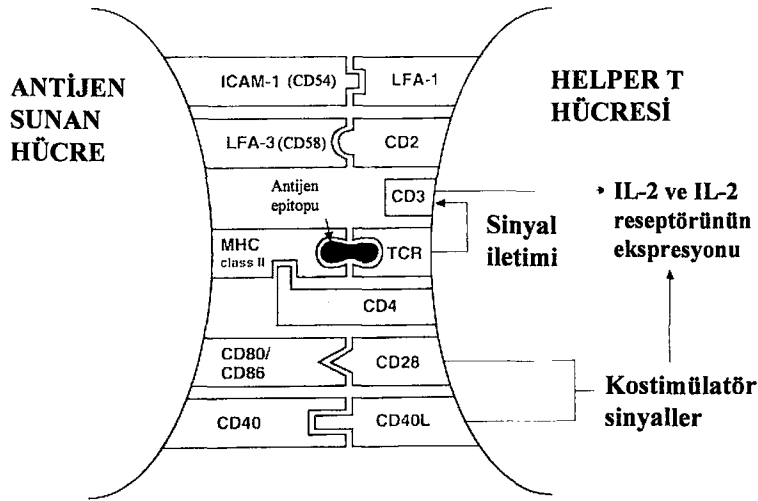
B7 molekülleri, özellikle B7-1, otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynar. Bir modele göre B7-1; öncelikle Th1 hücreleri için bir kostimülatör olarak etki ederken, B7-2; Th2 hücrelerinin yapımını indükler. Bir hipotez olarak Graves hastalığında, TSHR antijeni APC üzerindeki MHC-HLA Class II molekülleri ile TCR'ne sunulur ve bu potansiyel olarak otoreaktif T hücrelerinin gelişmesine yol açar. İmmün cevabın ilerleyebilmesi için APC üzerindeki B7 ve T lenfosit üzerindeki CD28 moleküllerinin karşılıklı etkileşiminin yer aldığı bir kostimülatör sinyal gereklidir. B7 ile CTLA-4'ün karşılıklı etkileşimi; büyük oranda TCR'nin azalması yoluyla T hücrelerinde bir azalmaya neden olur (anergi). CD28 ile CTLA-4 arasındaki dengesizlik ise agresif bir immün cevaba neden olarak Graves hastalığının gelişmesine yardım eder. Daha önce de ifade edildiği gibi Graves ve Hashimoto tiroiditi olan hastalarda CTLA-4 gen polimorfizmi bildirilmiştir (6,58). Ayrıca Graves hastalarında tiroid hücreleri IFN- $\gamma$  ile stimülasyondan sonra class II moleküllerini eksprese ederler. Tiroid hücreleri B7-1 ve B7-2 kostimülatör moleküllerini eksprese edemezler. Tirositler, kostimülasyonun gerekmediği T hücreleri için APC'ler olarak fonksiyon görebilirler (3) (Şekil 5).

Gravesli hastalarda tiroositler üzerinde Bcl-2 ekspresyonu artmış ve Fas ekspresyonu azalmıştır. Buna karşılık Hashimoto tiroiditli hastalara ait lenfositler üzerinde Fas artmış Bcl-2 azalmıştır. Bu durum infiltrate lenfositlerde apoptotik ölüme yol açacak ve tiroidin inflamatuvar cevapların etkilerinden kurtulmasını sağlayacaktır (3). Şekil 6'da tiroositler ile immün sistem arasında sitokinler aracılığıyla gerçekleşen karşılıklı etkileşim gösterilmiştir.

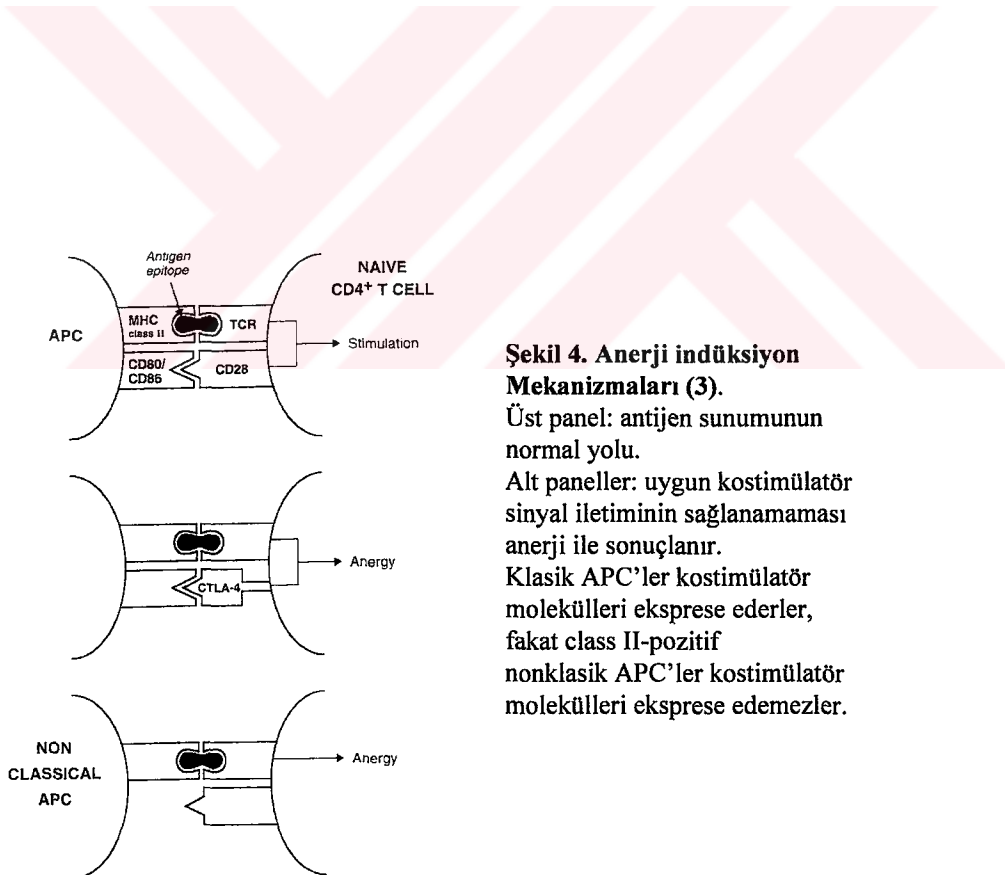


**Şekil 2.** Antijen sunumu ile başlayan normal immün cevapta anahtar elemanlar (3). Otoimmün cevabın şekli uyarılmış T helper hücresinin sitokin profiline bağlıdır.





**Şekil 3.** APC ile CD4<sup>+</sup> T hücre aktivasyonunda anahtar moleküller arasındaki etkileşimler (3).

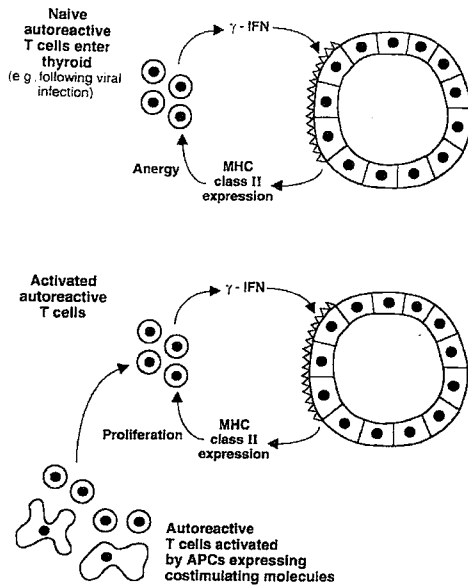


**Şekil 4.** Anerji indüksiyon Mekanizmaları (3).

Üst panel: antijen sunumunun normal yolu.

Alt paneller: uygun kostimülatör sinyal iletiminin sağlanamaması anerji ile sonuçlanır.

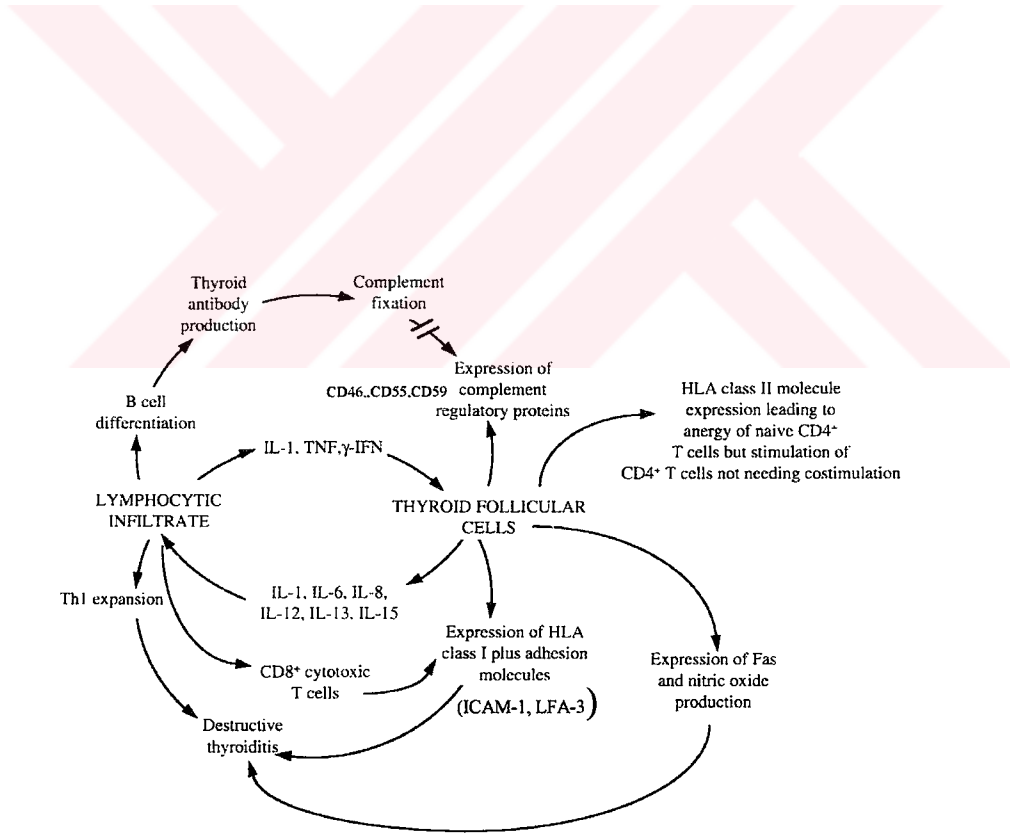
Klasik APC'ler kostimülatör molekülleri eksprese ederler, fakat class II-pozitif nonklasik APC'ler kostimülatör molekülleri eksprese edemezler.



**Şekil 5. Tiroid hücreleri tarafından MHC class II ekspresyonundan sonra alternatif sonuçlar (3).**

Naive T hücrelerinin aktivasyonu için kostimülasyon gereklidir. MHC class II molekülü/antijenik epitop ile etkileşim sonucu anerji meydana getirilebilir (üst panel: periferik tolerans).

Eğer T hücreleri klasik APC'lerden kostimülasyon alırsa tiroid hücreleri tarafından Class II ekspresyonu T hücre cevabını artırabilir ve T hücre proliferasyonu meydana gelir (alt panel).



**Şekil 6. Tiroid hücreleriyle immün sistem arasında sitokinler vasıtasıyla karşılıklı etkileşim.**

IL-1, TNF ve IFN- $\gamma$ 'ya cevap olarak kompleman regülatuar proteinlerin ekspresyonu kompleman ekspresyonu uygun şartlarda T hücre anerjisini indükleyebilir. Diğer sitokin aracılıklı olaylar da otoimmün süreci artıracaktır (3).



#### d) Klinik Bulgular

Basedow-Graves'li hastalarda görülen semptom ve bulguların sıklığı ve ciddiyeti hastadan hastaya değişir (Tablo 1 ve 2).

**Tablo 1.** Graves'li hastaların klinik özellikleri (1,5,57)

<b>Genel</b>	<b>Nöromusküler</b>
Sıcak intoleransı	Çabuk yorulma
Terleme	Hiperaktivite
Yorgunluk	Kas güçsüzlüğü (proksimal )
Uyuşukluk	Koreoatetoz
Tremor	Hipokalemik periyodik paralizi
Diffüz guatr	Myastenia gravis
Nodüler guatr	<b>Psikiyatrik</b>
<b>Kardiyovasküler</b>	Aşırı duyarlılık
Çarpıntı	Sinirlilik
Dispne	Aşırı huzursuzluk
Göğüs ağrısı	Duygusal kararsızlık
Taşikardi	Psikoz
Atrial fibrilasyon	<b>Dermatolojik</b>
Sistolik hipertansiyon	İnce, nemli ve sıcak cilt
Kalp yetmezliği	Kaşıntı
<b>Gastrointestinal</b>	Palmar eritem
İştah artışına rağmen	Pretibial miksödem
kilo kaybı	Saçlar ince ve nemli
Diyare, steatore	Onikoliz
Kusma	Vitiligo
<b>Genitoüriner</b>	Parmaklarda çomaklaşma
Poliüri ve polidipsi	<b>Göz bulguları</b>
İnfertilite	Üst gözkapağı spazmı,
Amenore	Konversiyon bozukluğu,
	Oftalmopati

**Tablo 2.** Tirotoksikozlu hastalarda semptom ve fizik bulguların görülme sıklığı (1,5,57)

Semptomlar	%	Fizik bulgular	%
Sinirlilik	99	Taşikardi	100
Terleme artışı	91	Guatr	100
Sıcağa aşırı hassasiyet	89	Deri değişiklikleri	97
Çarpıntı	89	Tremor	97
Yorgunluk	88	Tiroid üzerinde üfürüm	77
Kilo kaybı	85	Göz belirtileri	71
Taşikardi	82	Atrial fibrilasyon	10
Dispne	75	Splenomegali	10
İştah artışı	65	Jinekomasti	10
Göz şikayetleri	54	Hepatomegali	8
Bacaklarda şişme	35		
Hiperdefekasyon	33		
Diyare	23		
İştahsızlık	9		
Kabızlık	4		
Kilo alma	2		

### e) Tedavi (1,5,18,57)

Hipertiroidi tedavisinde üç seçenek vardır. 1) ATİ tedavisi, 2) Cerrahi tedavi ve 3) RAI tedavisi. Vakanın durumuna göre bu yöntemlerden biri seçilir. Bir tedavi yönteminin ardından bir diğer yöntemi uygulamak da sık yapılan bir işlemdir. Her yöntemin kendine özgü üstünlükleri ve sakıncaları vardır.

### ATİ Tedavisi

Tiyöre, ürenin oksijen atomu yerine kükürt atomunun girmesi ile elde edilen bir bileşiktir. ATİ'lerin önemli bir grubu tiyöre grubu ilaçlardır. Bu bileşikler moleküllerinde bir kısmını tiyörenin oluşturduğu beş üyeli (imidazol) ve altı üyeli (tiyöürasil) heterosiklik halka içerirler. PTU, metimazol ve karbimazol günümüzde kullanılan ATİ'lardır. Metimazol, karbimazolün aktif metabolitidir.

## ATİ'ların etki mekanizması (1,5,18)

### 1- Tiroid içi etkiler

- a) Tiroid hormon sentezinin inhibisyonu: İyodun iyodinasyon ve organifikasyonu ile iyodotirozinlerin coupling'ini inhibe ederler.
- b) Muhtemelen Tg yapısını değiştirirler ve Tg sentezini de inhibe ederler.

### 2- Tiroid dışı etkiler

- a) PTU; periferik dokularda ve tiroide Tip 1-5' deiyodinaz enzim aktivitesini inhibe ederek  $T_4 \rightarrow T_3$  dönüşümünü engellerler.
- b) **İmmüsupresif etki:** ATİ'ların in vitro lenfosit transformasyonunda inhibisyon, lenfosit, monosit ve nötrofil fonksiyonu üzerine ve İL-2 gibi solubül moleküllerin oluşumu üzerinde inhibitör etkileri vardır. Bu ilaçlar kompleman aracılıklı tiroid hücre hasarında, ve T hücre cevabında önemli olan serbest radikal oluşumunda inhibisyona, Graves hastalığının başlaması ve sürdürülmesinde önemli olabilen tiroid hücreleri üzerindeki MHC Class II (HLA-DR) ekspresyonunda inhibisyona, tiroid hücre kültürlerinde MHC Class I mRNA konsantrasyonlarında azalmaya, supresör T hücre sayısında artma (normale gelme), helper T hücre ve NK hücre aktivitesinde azalmaya, tiroid içinde aktif T hücre sayısında azalma ve in vivo TSHR Ab ve anti TPO konsantrasyonlarında azalmaya neden olurlar. Tirositlerden proinflamatuvar moleküllerin salınımını azaltırlar. IL-1 $\beta$ , sİL-2 reseptörleri ve soluble IL-6 reseptör dahil bazı sitokinlerin ve soluble sitokin reseptörlerinin serum konsantrasyonları da ATİ tedavisine cevap olarak azalır. Serum antikor konsantrasyonları ve T hücre alt tiplerindeki bu değişiklikler hastaların hepsinde görülmez ve hastadan hastaya değişebilir. Bunun nedeni açık değildir. Yukarıdaki değişiklikler hastalar ötiroid döneme geçtiklerinde meydana gelir. Eğer immünitinin değişmesinden tirotoksik durum sorumlu ise tirotoksikozun düzelmesiyle immünitadaki değişiklikler azalmaya eğilim gösterecektir. Graves tirotoksikozunun potasyum perkloratla tedavisi de ATİ tedavisine benzer bir şekilde serum TSHR AB'larında azalmaya neden olur. Fakat perklorat da immüsupresif etkilere sahip olabilir. Ayrıca PTU veya karbimazole tedavi edilen hastalarda serum tiroid hormon konsantrasyonundaki azalmalar benzer olmasına rağmen

karbimazolle tedavi edilen hastalarda serum TSHR Ab konsantrasyonlarındaki azalmalar ve supresör T hücre sayısındaki artmalar daha belirgindir. Bu sonuçlar ATİ'lerin immün sistem üzerindeki etkilerinin tiroid fonksiyonundan bağımsız olduğunu göstermektedir. Tedavi sonrası TSHR Ab, IgE ve IL-13 düzeyi yüksek kalan hastalarda relaps daha sık görülür.

## 2.2. ARI SÜTÜ

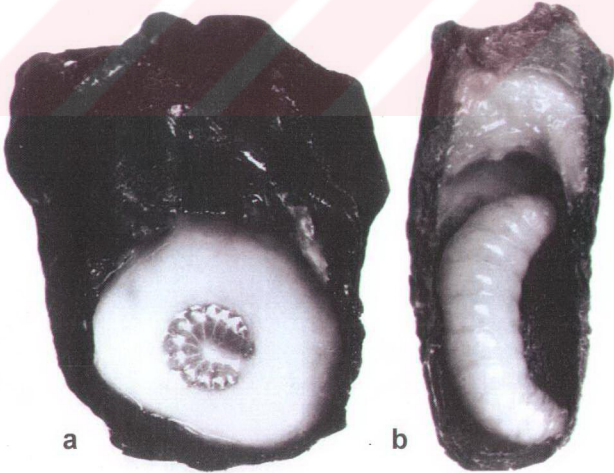
Arı sütü, genç işçi bal arılarının (*Apis mellifera*) hipofarengal (yutak altı) ve mandibülar (alt çene) bezlerinde yapılan ve salgılanan, arı kovanının özel bir maddesidir. Genç larvaların ve erişkin kraliçe arıların temel gıda kaynağıdır. İşçi arının (hemşire arı) kraliçe (bey) arıya dönüşümünün yegane sorumlusudur. Aynı koloniden doğan işçi arılar ile kraliçe arılar arasında genetik olarak bir farklılık yoktur. Hemşire (Nurse) arılar olarak adlandırılan bir grup arı, arı sütü yapımında ham madde olarak kullanılmak üzere büyük miktarda arı poleni ve nektar (bal özü) yerler. Müteakiben arı sütünü farengal bezlerinden salgırlar. Arı sütü kraliçe olacak genç larvalara işçi arılar tarafından doğrudan yedirilir (Şekil 7). Kraliçe arı larvası bu diyete başladıktan hemen sonra daha büyük, üstün bir arıya dönüşür (Kraliçe arı) (Şekil 8). Bu dönüşümde rol oynayan faktör ya da faktörler ("Queen determinatör")'in ne olduğu yapılan bir çok çalışmaya rağmen ortaya konamamıştır. Arı sütünün şeker içeriği (genç kraliçe arı larvalarında daha yüksek) veya viskozitesinin önemli olduğu ileri sürülmüşse de bu durum ispatlanamamıştır (19-21,78).

### 2.2.1. Arı Sütünün Fiziksel Özellikleri

Arı sütü sudan zengin, lapa-jel kıvamında homojen bir maddedir. Sarı, beyazımsı renkte veya hafif renkli, keskin fenolik kokulu ve karakteristik ekşi bir tada sahiptir. Yoğunluğu ~ 1.1 g/cm<sup>3</sup>dür. Suda kısmen çözünür. Viskozitesi su içeriğine ve yaşa göre değişir. Oda sıcaklığında veya buzdolabında 5°C'de depolandığında yavaş olarak daha visköz hale gelir. Depolanmış arı sütünde komponentlerin çökmesine bağlı olarak küçük granüller oluşur (19).



Şekil 7. İşçi arılar tarafından yapılan arı sütü kraliçe arıya takdim ediliyor (19).



Şekil 8. a) Arı sütünde yüzen 3 günlük kraliçe larva (19). Hücre ürün için hemen hemen hazır. b) 5 günlük kraliçe larva. Erişkin halinden hemen önce.

### 2.2.2. Arı Sütünün Bileşimi

Arı sütünün bileşimi Tablo 3’de gösterilmiştir. Azotlu maddelerin ortalama % 73.9’u proteinlerdir. 6 majör proteinin 4’ü glikoprotein yapısındadır. Azotlu maddelerin % 2.3’ü serbest amino asitler ve % 0.16’sı peptidlerden oluşur. Amino asitlerin hepsi insan için esansiyel olup toplam 29 amino asit ve türevleri ayırt edilmiştir. Aspartik asid ve glutamik asid en fazla bulunur. Serbest amino asitler içinde ise prolin ve lizin en yüksek miktardadır. Arı sütünde ayrıca kollajen ve gamma globulin (bağışıklık sisteminin anahtar bir elemanı), glukoz oksidaz, fosfataz ve kolinesteraz gibi pek çok sayıda enzim ve insülin benzeri bir madde de bulunmaktadır (19,79-80).

Tüm şekerlerin % 90’ını fruktoz ve glukoz oluşturur. Sükroz içeriği değişkendir. Maltoz, trehaloz, melibioz, riboz ve erloz da bulunmaktadır.

Lipid fraksiyonunun % 80-90’ını serbest yağ asitleri (FFA) oluşturur. Çoğu kısa zincirli (8-10 karbon atomlu) hidroksi yağ asitleri veya dikarboksilik asitlerdir. Bu yağ asitleri arı sütünün biyolojik özelliklerinden sorumludur. Başlıca bulunan asid, 10-hidroksi-2-dekenoik asittir. Bunu onun satüre eşdeğeri olan 10-hidroksidekenoik asit takip eder. Yapısında bulunan esansiyel yağ asitleri (özellikle  $\omega$ -3) kanda kolesterol seviyesini düşüren bileşenlerdir. FFA’lara ilaveten lipid fraksiyonunda bazı nötral lipidler, steroller (kolesterol dahil) ve arı balmumu ekstraktlarına benzer hidrokarbonların sabunlaşamayan bir fraksiyonu da saptanmıştır (19).

Arı sütünün total kül içeriği taze ağırlığın yaklaşık % 1’i veya kuru ağırlığının yaklaşık % 2-3’üdür. Temel mineral tuzları, K, Ca, Na, Zn, Fe, Cu ve Mn’dır. Arı sütü vitaminlerden oldukça zengindir. Taze ağırlığının gramı başına pantotenik asid 159-265 mcg, niacin 48-88  $\mu$ g, thiamin 1.44-6.7  $\mu$ g, riboflavin 5-24  $\mu$ g, pridoksin 1-48  $\mu$ g, folik asid 0.13-0.53  $\mu$ g, inozitol 80-350  $\mu$ g ve biotin 1.1-19.8  $\mu$ g bulunmaktadır. C vitamini ise eser miktarda bulunur. Arı sütünde A, D, E ve K vitaminleri ise bulunmaz. Arı sütünde insan üreme hormonlarının varlığı gösterilememiştir. Ancak son zamanlarda çok duyarlı radyoimmünojenik metodlarla çok küçük miktarlarda testosteron saptanmıştır (0.012 g/g taze ağırlık). Bu küçük miktarın da biyolojik etkisi gösterilememiştir (19).

Arı sütünde saptanan diğer bileşikler; iki heterosiklik madde (biopterin ve neopterin), serbest baz şeklinde bazı nükleotidler, adenzin, üridin, guanozin, üridin ve sitidin, AMP, ADP ve ATP, asetil kolin (1 mg/g kuru ağırlık) ve glukonik asid (taze

ağırlığın % 0.6'sı) de bulunmaktadır. Bu saptanan fraksiyonlar dışında henüz bilinmeyen ve izole edilemeyen fraksiyonlar da vardır (19).

**Tablo 3.** Arı Sütünün Bileşimi (19,80)

	Minimum	Maksimum
Su	% 57	% 70
Proteinler (N × 6.25)	Kuru ağırlığın % 17'si	Kuru ağırlığın % 45'i
Şekerler	Kuru ağırlığın % 18'si	Kuru ağırlığın % 52'si
Lipidler	Kuru ağırlığın % 3.5'i	Kuru ağırlığın % 19'u
Mineraller	Kuru ağırlığın % 2'si	Kuru ağırlığın % 3'ü

### 2.2.3. Arı Sütünün Fizyolojik Etkileri

İlk kez 1950'nin başlarında özellikle Fransız arı yetiştiricileri tarafından arı sütünün yararlarını öven makaleler yayınlanmaya başlamıştır. Günümüzde geniş ölçüde bilinmekte ve tüketilmektedir. Ancak arı sütünün klinik etkileri ile ilgili bilimsel bilgiler ciddi derecede eksiktir.

### 2.2.4. Doğrulanmamış Bulgular

Arı sütünün gençleştirici etkileri olduğu (200-500 mg/gün oral veya dil altı, 1-2 ay süreyle alındığında), yorgunluğa karşı direnci ve entelektüel performansı (yüksek öğrenme kapasitesi ve daha iyi hafıza) artırdığı, mental durumu (kendine güven, iyi hissetme ve öfori) düzelttiği ve genel olarak kişinin kendini iyi hissetmesine neden olduğu ileri sürülmüştür. İmmün cevabı ve genel vücut fonksiyonlarını düzelden genel bir uyarıcı olarak etki etmektedir. Kişisel gözlem ve bilimsel olmayan literatürde arı sütünün tonik



etkili (zindelik ve kuvvet ilacı) olduğu, iştahı ve kan basıncını düzenlediği, dolayısıyla hipertansiyon ve hipotansiyonda kullanılabileceği, anemiyi (kansızlık) düzelttiği, kan lipidlerini düşürdüğü, arterosklerozu azalttığı, cinsel istek ve gücü artırdığı, grip hastalığına karşı iyi geldiği, cilt sağlığı açısından cilt kırıksıklıklarını önlediği ve yağ bezleri salgısını normale döndürdüğüne dair bulgular mevcuttur (22,23,26,32,33,81). Fakat tüm bu yararlı etkiler yeterli sayıda bilimsel çalışmalarla henüz yeterli ölçüde desteklenmemiştir.

### 2.2.5. Bilimsel Bazı Deliller

Arı sütü ile ilgili olarak bilimsel literatürde yaklaşık 200 civarında makale yayınlanmış olup bunun yaklaşık %40'ı son 10 yıldaki çalışmalara aittir. Bu çalışmaların çoğu Japon, Çin, Alman ve Çekoslovak kaynaklıdır.

Arı sütü farelere 3 g/kg/gün gibi yüksek dozlarda enjekte edilğinde bile toksik değildir. Mutajenik de değildir. Önceki yıllarda cilde uygulandığında allerjik kontakt dermatit vakaları bildirilmesine rağmen, intramusküler ve intraperitoneal enjeksiyonları ciddi allerjik reaksiyonlar nedeniyle terkedilmiştir (82). Günümüzde en sıklıkla oral ve eksternal olarak (kozmetiklerde) kullanılır. 10-hidroksi dekenoik asid insan vücudu dışında ve deney ortamında (in vitro) antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Antibakteryal, fungisidal ve antiviral etkisi vardır. Bakterilerden *E.Coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Basillus Subtilis* ve *S. Aureus*'a karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Arı sütündeki güçlü antibakteryel proteine royalisin adı verilmiştir. Ağızdan ya da parenteral (kas içi veya damardan) yoldan kullanılabilir. Cilde de uygulanabilir (Şekil 9). Koyu Renkli cam şişede 10-15-20 g'lık paketler halinde spatülle (1 spatül: 250-500 mg) ağızdan kullanılabilir. 2400 mg'lık kapsülleri de mevcuttur.





**Şekil 9.** Arı sütü içeren çeşitli ürünler (19). Vial, sıvı şekilleri, yoğurt, sabun, şampuan, gece ve gündüz kremlerine katkı maddesi olarak kullanılabilir.

#### a) Ağızdan kullanılması

Tavuk, bıldırcın ve tavşanlarda üreme üzerinde pozitif etkiler bildirilmiştir. Tavşanlar 100-200 mg/kg arı sütü ile takviye edilmiş normal bir diyetle fertilité ve embriyonik gelişmede artma ile cevap vermişlerdir. Diyetin yüksek dozlarda (0.2 g) liyofilize (dondurularak kurutulmuş) arı sütü ile takviyesinden sonra Japon bıldırcınları daha erken seksüel olgunluğa ulaşmışlar ve daha fazla yumurta yumurtlamışlardır. 5 mg arı sütü/kg gıda kullanılarak yumurta üretimi, fertilité ve kuluçkadan çıkan civciv sayısı artmıştır. Fakat diğer bir araştırmada 10-40 mg/gün gibi yüksek dozlarda arı sütü ile erkek veya dişi üreme organlarında histolojik değişiklikler ve kilo alma gözlenmemiştir (83).

Farelerin büyüme hızları 1 g/kg gıda arı sütü ile hafifçe artmıştır, fakat daha yüksek dozlarda azalmıştır. 1 kg gıdaya 5 mg arı sütü takviyesi ile tavuk, keklik ve sülünlerde ağırlık artışları bildirilmiş, ratlarda mide içine doğrudan 10, 20 veya 40 mg arı sütü enjekte edildiğinde ağırlık artışı gözlenmiştir (84).

7 günlükten daha küçük olan buzağıllara 0.02 g arı sütü verilmesi kontrol grubuna göre 6 ay sonra % 11-13 daha fazla ağırlık kazancı sağlamıştır. Tedavi edilen buzağıllarda mortalitenin daha düşük olduğu ve enfeksiyonlara daha dirençli olduğu gösterilmiştir (85).

### **b) Enjeksiyon şeklinde kullanım**

i.v. enjeksiyonlar arı sütündeki asetilkoline bağlı olarak hafif vazodilatasyon ve sonuç olarak hipotansiyona neden olurlar. Arı sütü solüsyonlarının enjeksiyonları oral kullanıma göre daha yüksek kan şeker seviyelerine yol açar. Ratlarda insülin benzeri hipoglisemik etki gösterilememiştir. Kobaylarda 100-300 mg/kg vücut ağırlığı arı sütü ile kilo artışları bildirilmiştir. Kedilere enjekte edilen küçük dozlar Hb konsantrasyonu ve eritrosit sayısını artırmış, farelerde 10 mg/kg'lık tekrarlanan dozlar motor aktivite ve kilo kazancını uyarmıştır. Bununla birlikte farelerde 100 mg/kg'lık tekrarlanan dozlar kilo kaybına ve serebrokortikal hücre metabolizmasında bozulmaya yol açmıştır. Yapılan bir çalışmada dişi koyunlarda arı sütü (kapsül ve enj.)+progesteron tedavisi ile ovulasyon hızı ve fertilitenin (doğurganlığın) kontrol grubuna göre arttığı bulunmuştur (30).

### **2.2.6. Hayvan alışmaları**

Arı sütü deneysel olarak ateroskleroz oluşturulmuş tavşanlarda plazma kolesterol ve TG seviyelerini, arteriyel kolesterol depozitlerini azaltır. Normal tavşanlarda ise plazma lipid seviyelerine etkisi yoktur. Yüksek kolesterollü diyetle beslenen hayvanlarda kan kolesterol içeriğini azaltabilir. Tavşanlarda kemik iyileşmesini hızlandırır. Cilt lezyonlarının iyileşmesi hızlanır ve farelerde antiinflamatuvar etki gösterilmiştir. Streptozotosinle diyabetes mellitus oluşturulmuş ratlarda yara iyileşmesini hızlandırır. Akut fazda kapiller geçirgenliği inhibe eder ve inflamasyonun kronik fazında granülasyon dokusu oluşumunu azaltır (34). Tümör hücre kltrlerinde 10-hidroksidekenoik asid ve bazı dikarboksilik asidlerin inhibitör etkisi gözlenmiştir. Profilaktik ve terapötik olarak farelerde tümör büyümesinde inhibisyona (yavaş büyüyen ve solid tümörler) yol açmaktadır (19).

Sıçanlarda büyük dozlarda arı sütü kullanıldığında ölüm oranı yüksektir. Daha küçük dozlarda strese neden olur, fakat öldürücü değildir. Adrenal bezlerde büyüme, gastrointestinal ülserler ve lenfatik dokularda hipertrofiye neden olabilirler (19).

Arı sütünün ışınlanmış farelerde makrofajları ve hemopoetik (kan yapıcı) kök hücrelerinin aktivasyonu yoluyla hemopoetik fonksiyon bozukluğuna karşı ve endojen sepsise karşı koruyucu aktiviteye sahip olduğu da gösterilmiştir (31).

### 2.2.7. İnsan Çalışmaları

İnsanda yapılan ilk çalışmaların (1959-1962) bilimsel kıymetini değerlendirmek çok zordur. Test yöntemlerinin ayrıntıları, tedavinin etkinliğini değerlendirmede kullanılan parametreler ve yan etkiler eksiktir. Arı sütünün tesir mekanizmaları kesin olarak bilinmiyor.

Arı sütünün aterosklerozlu insanlarda serum lipidleri seviyesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca insanlarda cinsel istekte artmaya yol açar. Ülkemizde Çukurova Üniversitesi Ziraat ve Tıp Fakültesinde Kaftanoğlu ve Tanyeli tarafından yapılan bir araştırmada lösemi, lenf bezi kanseri ve karaciğer kanseri olan ve 4-7 yaşları arasında olan 8 çocukta 1 g/gün olarak kahvaltıda önce ağızdan kullanılan arı sütü tedavisi ile kanda lökosit (beyaz küre), parçalı lökosit (nötrofil) ve lenfositlerin anlamlı olarak arttığı, çocukların genel durumlarının düzeldiği ve kilo aldığı bildirilmiştir (86). Yamada ve ark.ları arı sütünün insan lenfositlerindeki immünglobülin yapımını uyardığını ve meme kanserli hastalarda IgM ve IgG'yi artırdığını göstermişlerdir (87). Japonya'da National Fisheries Üniversitesinden Nagai ve ark.ları bal arısı ürünlerinden bal, arı sütü ve propolis'in deneysel ortamda antioksidan etkisini araştırmışlar ve bu etkinin saf bal ve propolisde arı sütüne göre daha fazla olduğunu, hücre için toksik olan serbest radikallerin (super oksit radikali gibi) uzaklaştırılmasında ise propolis ile arı sütünün en etkili olduğunu göstermişlerdir (24). İmmünmodülatör (bağışıklık sistemi fonksiyonlarını düzenleyici) tesirleri ile ilgili olarak yakın zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalardan biraz daha ayrıntılı bahsetmek yararlı olacaktır.

### 2.2.8. Arı Sütü, Otoimmünite ve İnflamasyon

Fizyolojik koşullarda makrofajlardan salgılanan IL-12, Th0 hücrelerinin Th1 hücrelerine dönüşümünü hızlandırır, Th2 hücrelerine farklılaşmasını ise suprese eder, dolayısıyla IL-4 yapımını baskılar. Düşük glutatyon (GSH) seviyelerine sahip

makrofajlarda IL-12 yapımı azalır. PGE<sub>2</sub>, Th1 cevabını baskılar, antijen-spesifik Ig E yapımını artırır Mast hücrelerinden çeşitli inflamatuvar aracılardan (histamin gibi) salınımı Ig E'nin hücre yüzeyindeki yüksek affiniteli Ig E reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. Mast hücre granüllerinden salınan histamin damar geçirgenliğini artırır ve sonuçta allerjik reaksiyonlar alevlenir. Mast hücre degranülasyonu makrofajlarda yapılan ve bir damar genişletici olan nitrik oksit (NO) ile baskılanır.

Otoimmün hastalıklarda Ts (CD8+, T supresör-sitotoksik) lenfositlerdeki defekt nedeniyle Th (T<sub>4</sub>, CD4+), B lenfositlerini otoantikör sentezi yapmak üzere uyarır. T<sub>8</sub> hücreleri azalır, T<sub>4</sub> hücreleri artar. Th1/Th2 oranı Th2 lehine bozularak azalır. IFN- $\gamma$  seviyesi azalır, IL-4 seviyesi artar. Makrofaj fonksiyonları bozulur, IL-12 yapımı azalır ve GSH seviyeleri düşer (88).

Sver ve ark. ları 7 gün aralıklarla 1 ya da 2 kez i.m. 0.4 ml veya i.v. 0.025 ml arı sütünü ratlara (sıçanlara) verdiklerinde serum total protein ve Ig seviyelerinin kontrol grubuna göre azaldığını (immünsupresif etki), immünizasyondan 7 gün önce ve hemen sonra s.c. 0.1 ml arı sütü verilen farelerde ise plak oluşturan splenosit sayısının tedavi verilmeyen kontrol grubuna göre immünizasyondan 7 gün önce arı sütü verilen farelerde arttığını (immünstimülasyon) ve immünizasyondan hemen sonra arı sütü verilen farelerde azalmakla birlikte kontrol grubuna göre yüksek kaldığını bildirmişlerdir (20). Aynı çalışmada 0.1 ml s.c. arı sütü enjeksiyonu yapılan farelerde lenf nodu ağırlığı artarken (immünstimülasyon) dalak ağırlığı değişmemiş, periferik kan lenfosit sayısı artarken nötrofil sayısı azalmıştır. Sonuç olarak arı sütünün farelerde antikor yapımını ve immünkompetan hücre proliferasyonunu uyararak veya ratlarda humoral immün fonksiyonları deprese ederek bu immünmodülatör özellikleri gösterdiğini, farklı sonuçların hayvan modellerinin türü ile ilişkili olmasına rağmen muhtemelen arı sütünün dozunu ve uygulama yolunu değiştirerek sonuçların tersine döndürülebileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca arı sütünün ratlarda Ig seviyelerini düşürme mekanizmasını açıklamak üzere arı sütündeki 10-HDA başta olmak üzere muhtemelen diğer serbest yağ asitlerinin B lenfosit hücre membranına selektif şekilde bağlanarak bu hücrelerden antikor sekresyonunu engelleyebileceğini belirtmişlerdir.

Japon araştırmacı Oka ve ark.ları bağışıklık sistemi uyarılmış farelerde 1 g/kg dozda ve ağızdan verilen arı sütünün immünmodülatör etkilerini incelemişler, sonuçta arı sütünün antijene spesifik IgE yapımını ve mast hücrelerinden histamin serbestleşmesini

baskıladığını dolayısıyla allerjik reaksiyonların engellendiğini, makrofaj fonksiyonlarının düzeldiğini (IL-12, GSH, ve NO yapımında artma, PGE<sub>2</sub> yapımında azalma), ve Th1/Th2 hücre cevabının da Th1 lehine düzeldiğini, dolayısıyla otoimmüitenin iyileştiğini göstermişlerdir (21). Kataoka ve ark. ları da benzer sonuçlar elde etmişlerdir (28). Bu çalışmada aynı zamanda ovalbümin(OVA)/Alum-immünize fareye intraperitoneal arı sütü verilmesi hem OVA-spesifik IgG ve IgE yapımında ve hem de OVA ile uyarılmış dalak hücreleri tarafından IL-4, IL-5 ve IL-10 yapımının inhibisyonuyla sonuçlanmıştır. İlginç olarak OVA-spesifik IL-2 yapımı arı sütü ile değişmemesine rağmen OVA-stimüle dalak hücreleri tarafından IFN- $\gamma$  yapımının inhibe olduğu görülmüş sonuçta arı sütü verilmesinin hem Th1 ve hem de Th2 cevaplarında down regülasyona yol açabileceği ileri sürülmüştür.

Taniguchi ve ark. atopik dermatit benzeri cilt lezyonları oluşturulmuş deneysel fare modelinde arı sütünün bu tip cilt lezyonlarının gelişmesini suprese ettiğini ve bunun mekanizmasının muhtemelen dalak hücrelerinden IFN- $\gamma$  yapımında azalma ve dorsal cilt lezyonlarında indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonundaki artmaya bağlı olduğunu bildirmişlerdir (89). Aynı araştırmacı grubu (Okamoto ve ark.) aynı yıl yaptıkları bir başka çalışmada ise arı sütünün antiallerjik aktivitesinin hangi komponentine bağlı olduğunu bir seri kolon kromatografisi kullanarak araştırmışlar ve IL-4 yapımını suprese eden 70 kDa'luk bir glikoproteini saflaştırmışlardır. Bu proteine majör royal jell protein-3 (MRJP3) adını vermişlerdir. Aynı çalışmada bu proteinin, T hücre proliferasyonunda inhibisyonla birlikte bu hücrelerden IL-4 yanında IL-2 ve IFN- $\gamma$  yapımını da suprese ettiğini, MRJP3'ün kendisinin yabancı bir protein olarak antijen özelliği olmasına rağmen intraperitoneal verilmesinin immünize farelerde serum anti-OVA IgE ve IgG1 seviyelerini inhibe ettiğini ve sonuç olarak MRJP3'ün in vitro ve in vivo güçlü immün cevapları düzenleyici (immün modülatör ve immün regülatör) etkilere sahip olabileceğini göstermişlerdir (41).

Simuth ve ark. arı sütünün majör proteinlerinden apalbümin-1 (özellikle 55 kDa'luk monomerik formunun) ve apalbümin-2'nin hücre kültür ortamında fare makrofajlarından TNF- $\alpha$  salınımını uyardığını bildirmişler ve arı balındaki fizyolojik aktif proteinlerin biyolojik yararlanma amacıyla kullanılabileceğini ileri sürmüşleridir (39). Bilindiği gibi TNF- $\alpha$ , immün cevapta önemli olan sitokin aracılıklı gen aktivasyonunda rol oynayabilir. Ayrıca hücre proliferasyonu ve inflamasyon gibi önemli hücresel olayların regülasyonunda başlatıcı bir faktör olarak temel bir role sahiptir.



Kohno ve arkadaşları sitokin seviyesinde arı sütünün antiinflamatuvar etkilerini incelemek amacıyla lipopolisakkarid ve IFN- $\gamma$  ile uyarılmış fare peritoneal makrofaj kültür ortamına arı sütü süspansiyonlarının süpernatantlarını ilave etmişler ve sonuçta doza bağımlı olarak aktive makrofajlarda TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokin yapımının inhibe olduğunu gözlemişler ve arı sütünün antiinflamatuvar etkilere sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir (38). Bu antiinflamatuvar faktörü “bal arısı royal jelly-kaynaklı antiinflamatuvar faktör” (HBRJ-AIF) olarak adlandırmışlar ve kromatografik analizde bu madde için önemli bir adayın MRJP3 olabileceğini ifade etmişlerdir

Literatürde Graves hastalığı dahil otoimmün tiroid hastalıklarında arı sütünün etkinliğinin değerlendirilmesine ait deneysel ya da klinik bir çalışma bulunmamaktadır.

### 2.2.9. Arı Sütünün Yan Etkileri

İnsanda yapılan bilimsel çalışmalarda nadir de olsa arı sütüne bağlı astma, anafilaksi ve ölüm, eozinofilik gastroenterit, hemorajik kolit ve kontakt dermatit vakaları bildirilmiştir. Burada en önemli faktör muhtemelen kullanılan arı sütü dozu ve kullanılan preparatın şeklidir (82).

Görüldüğü üzere bal arısının önemli ürünlerinden biri olan arı sütü ile ilgili bilgiler son 10 yılda yapılan ciddi çalışmalara rağmen son derece eksiktir. İnsan üzerindeki etkiler ve yan etkiler yeterince araştırılmamıştır. Bu konuda bilimsel zemini iyi hazırlanmış geniş kapsamlı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

### 2.2.10. Arı Sütünün Depolanması

Arı sütünün kısıtlı bir raf ömrü vardır. Arı sütünün aktivite şekli ve gerçek etkileri bilinmediğinden uzun süreli depolanma sonrası biyolojik etkinliğindeki değişikliklere ait bilgiler mevcut değildir. Bununla birlikte uzun süreli depolamaya bağlı olarak daha yüksek asit titresi, daha büyük insolübil fraksiyonu, daha az serbest amino asit ve daha az glukoz oksidaz gibi yapısal değişiklikler meydana gelir (90). Soğutma ve dondurma kimyasal değişiklikleri geciktirir ve azaltır. Kurutup dondurulmuş arı sütü en dayanıklı şekil olmasına rağmen yine de bazı değişiklikler meydana gelir. Yukardaki bilgilerin ışığı altında arı sütü için minimum tedbir 0 ila 5°C arasında soğutarak saklamaktır. Halen en iyi

yöntem mümkünse pek çok ev tipi dondurucularında olan  $-17^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki bir sıcaklıkta depolamaktır (19).

Arı sütü emülsifiye bir ürün olduğundan ve hücresel bir doku içermediğinden dondurma özel bir sorun oluşturmaz ve yaygın olarak ev tipi dondurucular kullanılabilir. Ürün aktivitesine ait emniyet sınırlarını tayin eden kriterler olmamasına rağmen depolama ve raf ömrü mümkünse özel olarak muhafaza edilmelidir. Avrupada satılan ürünler için üretimden sonra önerilen depolama süresi buzdolabında ortalama olarak 18 aydır.  $-170^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan ürünlerde depolama 24 ay'a uzatılabilir. Ürün eritildikten ve pakatlendikten sonra bir soğutucuda 12 aydan daha uzun süre depolanmamalıdır (19).

Kurutulmuş dondurulmuş arı sütü ve arı sütü içeren ürünler genellikle oda sıcaklığında bazen birkaç yıl süreyle saklanabilir. Kurutulmuş dondurulmuş arı sütü taze ürüne göre bariz bir şekilde daha dayanıklıdır. İlk 2 aylık sürede oda sıcaklığında depolama esnasında herhangi bir bozulma olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle bu gibi durumlarda değişiklikleri en aza indirmek için soğuk depolama tavsiye edilir ve ürünler rafta mümkünse kısa süreli olarak saklanmalıdır (19).

#### **2.2.11. Arı sütü solüsyonunun görünümü ve larval deri fragmanları**

1 g arı sütü yaklaşık 20 ml distile su içinde seyreltilir. Solüsyon berrak oluncaya kadar damla damla konsantre sodyum hidroksit solüsyonu ilave edilir. Böylece koyu sarı, yeşil daha nadir olarak sarımsı pembe veya pembe renkli alkalın bir solüsyon elde edilir. Fragmanlar sıvı içinde erimeden kalır. Sulu kısım tortusundan ayırmak için dikkatlice dökülür ve filtre edilir. Filtre edilen kalıntılar mikroskop altında larval deri fragmanları olarak gözlenebilir.



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj (Suprafuge 22, Heraeus)  
Mikrosantrifüj (Microfuge 18, Beckman-Coulter)  
Terazi (Oertling, NA164)  
Derin dondurucu (Nuair)  
Semi otomatik pipetler (Biohit, Genex, Htl)  
CO<sub>2</sub>'li etüv (Binder)  
pH metre (Hanna)  
Laminar airflow (Holten)  
İnvert mikroskop (Nikon)  
ELISA okuyucusu (Anthos Labtec Instruments)  
Flow sitometre (Coulter)  
Kan sayımı cihazı (GenS, Beckman-Coulter)

#### 3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

RPMI, HBSS, PBS, Ficoll paque (d= 1.077g/ml), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromür (MTT), izopropanol, fetal calf serum, L-glutamin SIGMA; dipotasyumhidrojen fosfat, potasyumdihidrojen fosfat ve sodyum klorür MERCK firmalarından temin edildi.

### 3.3. Çalışmanın Planlanması

**3.3.1. Arı sütü (Royal Jelly) temini:** Çalışmada kullandığımız arı sütü örnekleri mevsiminde taze olarak (Haziran 2004) S.S. Trabzon Merkez Tarımsal Kalkınma Kooperatifinden temin edildi. Arı sütü alikotlanarak  $-85^{\circ}\text{C}$ 'deki derin dondurucuda çalışılincaya kadar saklandı.

**3.3.2. Arı sütünün immünite üzerindeki etkisinin (stimülasyon, inhibisyon ya da immünmodülasyon) ölçülmesinde etkin konsantrasyonunun saptanması.**

#### 3.3.2.1. Sağlıklı bireylerden kan örneklerinin alınması

Bu amaçla K.T.Ü. Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Check-up polikliniğine başvuran ve yapılan klinik ve laboratuvar değerlendirmede herhangi bir hastalığı saptanmayan 4 adet normal sağlıklı birey alındı.

#### 3.3.2.2. Lenfosit izolasyonu (91)

Aseptik steril çalışma ortamında steril konik santrifüj tüpüne 3 ml saf ficoll eklendi. Dört sağlıklı bireyden 9 ml'lik EDTA'lı vakumlanmış kan tüplerine konulmak üzere holder sistemi ile koldan periferik venden 9 ml kan alındı. Yapısında tüpteki EDTA'yı da barındıran 9 ml periferik kan enjektör yardımıyla tüpün cidarlarından aşağıya doğru yavaşça akıtıldı. İşlem tamamlandıktan sonra 800 g'de  $18^{\circ}\text{C}$ 'de 25 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj tüplerinde yoğunluk gradientine göre ayrılan kan elemanları yukarıdan aşağıya doğru plazma, lenfosit+monosit, ficol, granüositler ve eritrositler olmak üzere ayrıldı. Pipet yardımıyla plazma uzaklaştırıldıktan sonra ayrı bir konik santrifüj tüpüne 5 ml besi yeri (RPMI) konuldu. Besi yerinin bulunduğu konik santrifüj tüpüne lenfosit ve monosit hücre karışımı eklenip 800 g'de  $18^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpteki süpernatant atılarak ficol uzaklaştırıldı. Ficol'ün hücreye zararını iyice önlemek için bu yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi. Sonuçta tüpteki pelette yıkanmış lenfosit ve monosit karışımı elde edildi. Lenfosit ve monositler 4 saat uygun besi yeri (RPMI) ile doku kültürü şişesinde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Plastik adezyon gösteren monositler

lenfositlerden kolayca ayrıldı. Doku kültürü şişesi hafifçe çalkalanıp steril pipetlerle sıvı ayrıldı. Sonuçta %99 saflıkta lenfositler elde edildi.

Lenfosit izolasyonundan sonra Coulter GenS cihazında hücre sayımı yapılarak, hücre sayısı  $10^3/\mu\text{l}$ 'ye ayarlandı.

### 3.3.2.3. Arı sütü örneklerinin hazırlanması (38)

Dondurulmuş arı sütü örneği derin dondurucudan alınıp oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra 4 g tartılıp hacmi PBS ile 8 ml'ye tamamlandı (500 mg/ml). 10.000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Bu örnekten 500, 400, 200, 100, 50, 25, 10, 5 ve 2.5 mg/ml'lik dilüsyonlar PBS ile hazırlandı. 0 (sıfır) konsantrasyon için PBS çözeltisi kullanıldı.

### 3.3.2.4. Arı sütü ile lenfosit hücre kültürü

Arı sütü örnekleri laminar airflow'da  $0.2 \mu\text{l}$ 'luk poru olan membran filtrelerinden süzülerek sterilize edildi. Hücre kültürü şişelerine 240  $\mu\text{l}$  her bir sağlıklı bireyin lenfositlerini içeren izolasyon örneği ve 60'ar  $\mu\text{l}$  çeşitli konsantrasyonlardaki arı sütü örnekleri ilave edildi (1:5 dilüsyon). Şişelerin hacmi RPMI 1640 ile 3 ml'ye tamamlandı. Hücre kültürü şişeleri invert mikroskopta kontrol edilerek %5  $\text{CO}_2$ , %95 su buharı sağlayan  $\text{CO}_2$  inkübatörüne yerleştirildi ve 72 saat süre ile inkübe edildi.

### 3.3.2.5. MTT Testi

MTT testi, mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin sayısını ve proliferasyon yeteneğini tanımlamak için kullanılır (92). MTT stok çözeltisi 5 mg/ml konsantrasyonunda HBSS içinde çözüldü, birkaç dakika vortekslendi ve steril filtrasyon ile bir şişeye transfer edildi. 3.3.2.4. kesiminden elde edilen hücre kültürü şişelerinden hücreler ELISA kuyucuklarına 100'er  $\mu\text{l}$  ilave edildi. Üzerlerine 10'ar  $\mu\text{l}$  MTT çözeltileri konuldu. Kuyucuklar  $37^\circ\text{C}$ 'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklar aspire edildi. Kuyucuklara 200'er  $\mu\text{l}$  izopropanol ilave edildi. Karıştırıcı üzerinde 10 ila 20 dakika ajite edildi. Kuyucuklardaki absorbanlar ELISA okuyucusunda 620 nm'lik

referans filtreye karşılık 540 nm'lik dalga boylarında okundu. 0 konsantrasyon dahil bütün konsantrasyonlar için en az 5 deneyin ortalama ve standart sapması hesaplanarak MTT testi sonucu hastalarda kullanılabilir optimum arı sütü konsantrasyonları saptandı.

### **3.3.3. Graves'li hastalarda arı sütünün otoimmünite üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar**

#### **3.3.3.1. Graves'li hastaların seçimi**

K.T.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı Polikliniğine başvuran, yeni tanı konmuş ve hiç tedavi almamış Basedow-Graves'li 6 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların demografik verileri ve laboratuvar özellikleri Tablo 4'de verilmiştir. Graves hastalığı tanısı hipertiroidi semptomları (çarpıntı, terleme, ellerde ince tremor, sinirlilik, sıcağa tahammülsüzlük ve zayıflama gibi), fizik muayene bulguları (diffüz guatr, endokrin oftalmopati gibi) ve tipik laboratuvar bulguları (serum serbest T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> artışı ve düşük TSH, Anti TPO ve/veya Anti Tg ve/veya TSH-R otoantikörleri pozitifliği, tiroid sintigrafisinde radyoaktif maddenin diffüz artmış tutulumu) ile kondu. (Şekil 10 ve 11).

Rutin laboratuvar analizleri K.T.Ü. Farabi hastanesi Klinik Biyokimya laboratuvarında kemilüminesans immunoassay yöntemi ile Roche E-170 (TT<sub>3</sub>, TT<sub>4</sub>, ST<sub>3</sub>, ST<sub>4</sub>), DPC Immulite 1000 (Anti TPO ve anti Tg) kullanılarak, radyoreseptör assay yöntemi ile Brahms kiti kullanılarak (TSH R Ab) yapıldı.

#### **3.3.3.2. Graves'li hastalardan kan örneklerinin alınması ve lenfosit izolasyonu**

Graves'li hastalardan kan örneklerinin alınması ve lenfosit izolasyonu 3.3.2.1 ve 3.3.2.2 kesimlerinde açıklandığı şekilde yapılmıştır.

**Tablo 4.** Graves'li hastaların demografik verileri ve laboratuvar bulguları

Hasta No	1	2	3	4	5	6
Adı Soyadı	C.K	S.T	S.H	E.T	S.K	Y.A
Yaş	26	31	26	40	45	51
Cinsiyet	E	E	K	K	K	E
TT3 (N: 0.8-2.0 ng/ml)	6.5	6.4	4.1	6.5	5.4	4.7
TT4 (N: 5.1-14.1 µg/dl)	22.8	18.6	17.5	24.9	16.9	21.2
ST3 (N: 1.8-4.6 pg/ml)	23.1	21.2	13.7	32.6	24.5	22.6
ST4 (N: 0.9-1.7 ng/dl)	7.8	4.3	4.3	6.4	4.1	5.4
TSH (N: 0.27-4.2 µU/ml)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Anti TPO (N: <34 IU/ml)	643	235	864	16.0	16	44.1
Anti Tg (N: <115 IU/ml)	41.8	238	46.1	294	<20	938
TSH R Ab (N: 0-10 U/L)	25.5	8.8	9.30	14.0	58	2.5



**Şekil 10.** 1 no.lu hastada Graves oftalmopatisi. Periorbital ödem, üst göz kapağında retraksiyon ve egzoftalmi izleniyor.



**Şekil 11.** Şekil 10'daki hastanın tiroid sintigrafisi. Tiroid bezinde bilateral diffüz hiperplazi ve radyoaktif madde tutulumu her 2 lobda artmış olarak izleniyor.

**3.3.3.3. Arı sütü ile Graves'li hastaların lenfosit hücre kültürü.** 0, 25, 400 mg/ml'lik arı sütü örnekleri 3.3.2.4 kesiminde anlatıldığı gibi hastalardan elde edilen lenfositlerle 72 saat süreyle inkübe edildi.



### 3.3.3.4. Hücre kültürü ve süpernatantları ile yapılan testler

#### a. MTT testi

3.3.2.5 kesiminde anlatıldığı gibi yapıldı.

#### b. Sitokin düzeyleri

Th1 markörleri olarak IFN- $\gamma$  (Cat No: KAC1231), TNF- $\alpha$  (Cat No: KAC1751) ve IL-12 (Cat No: KAC1561), Th2 markörleri olarak IL-4 (Cat No: KAC1281) ve IL-10 (Cat No: KAC1321) kitleri Biosource (Belçika) firmasından temin edildi. Sitokin düzeyleri üretici firmanın metod kitapçıklarına göre immunoenzimometrik assay (EASIA) yöntemiyle yapıldı.

#### c. TSH Reseptör antikoru (TSHR Ab)

3.3.3.1 kesiminde verildiği gibi Radyoreseptör yöntemiyle ticari Brahms kiti kullanılarak tayin edildi.

### 3.3.3.5. Hasta serumları ile yapılan testler

Hasta serumlarında yöntemleri 3.3.3.4 kesiminde verilen sitokin düzeyleri çalışıldı.

### 3.3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS-11 ( SPSS Inc. Release 11.0, Chicago,USA) versiyon istatistik paket programı kullanıldı. Gruplar içindeki farklılığı belirlemede nonparametrik varyans analizi (Kruskal-Wallis Test) yapıldı. Sonuçlar tablolarda ki-kare ve  $p$  değeri verilerek gösterildi. Grup içindeki konsantrasyonlar arasındaki farklılığı belirlemede Wilcoxon testi kullanıldı. Sonuçlar tablolarda  $W$  ve  $p$  değeri verilerek gösterildi.  $p < 0.05$  ise anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

#### 4- BULGULAR

##### 4.1. Arı sütünün immünite üzerindeki etkisinin (stimülasyon, inhibisyon ya da immünmodülasyon) ölçülmesinde etkin konsantrasyonunun saptanması.

Deneylelerimizde kullanacağımız etkin arı sütü konsantrasyonunu tesbit etmek amacıyla 3.3.2.3 kesiminde açıklandığı şekilde hazırlanan 0-500 mg/ml'lik arı sütleri ile inkübe edilen sağlıklı bireylere ait lenfosit hücre kültürlerinde yapılan MTT testi sonuçları Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5'de görüldüğü gibi 0, 2.5, 5 ve 100 mg/ml'nin sonuçları birbirine yakındır. 10-50 mg/ml konsantrasyonlar arasında absorbands değerlerinde azalma vardır. 200-500 mg/ml arasında maksimum absorbandslar elde edilmiştir. Ancak 500 mg/ml'lik konsantrasyonda hücre canlılığı kısmen kaybolduğundan, 0, 25 ve 400 mg/ml'lik konsantrasyonların daha sonraki deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir.

**Tablo 5.** Sağlıklı bireylere ait lenfosit hücre kültürlerinde arı sütü ile 72 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen MTT testi sonuçları (absorbans).

Arı sütü konsantrasyonu (mg/ml)	Absorbans [n=4, $\bar{X}(\pm SD)$ ]
0	0.182 (0.05)
2,5	0.177 (0.06)
5	0.170 (0.04)
10	0.164 (0.06)
25	0.166 (0.02)
50	0.162 (0.02)
100	0.188 (0.03)
200	0.215 (0.05)
400	0.270 (0.02)
500	0.300 (0.03)

## 4.2. Hücre kültürü ve süpernatantları ile yapılan testler

### 4.2.1. MTT testi

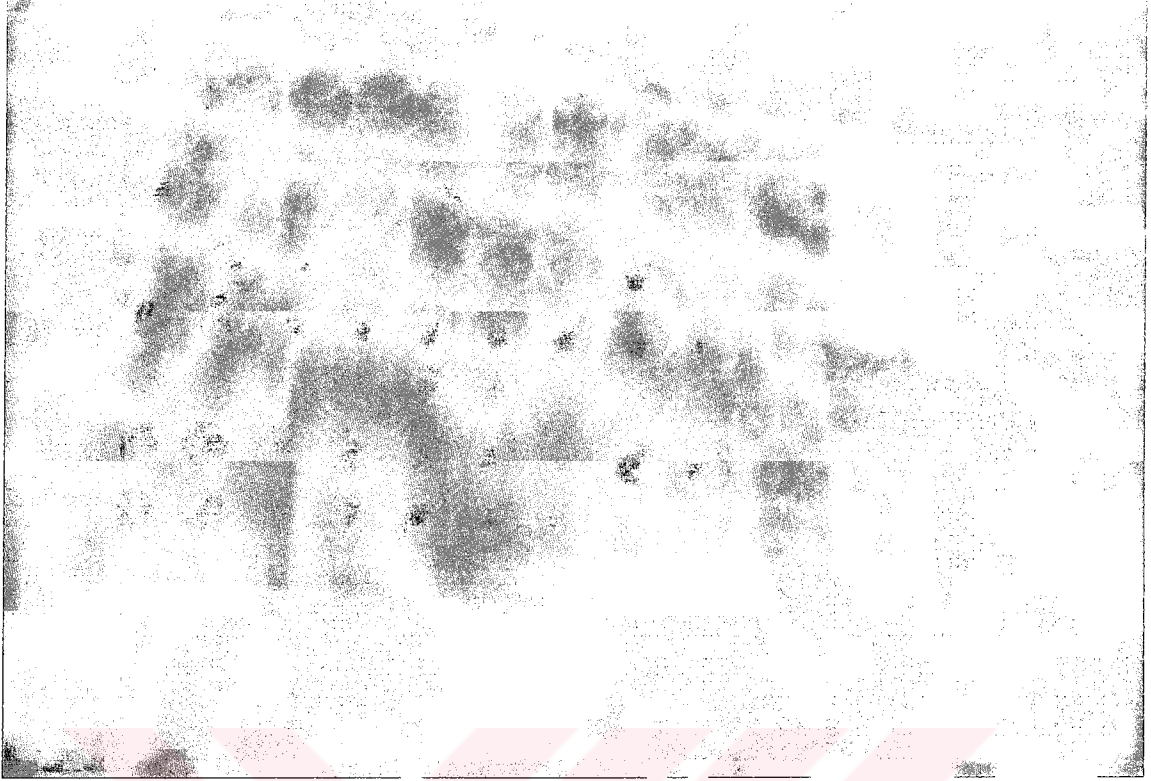
Gravesli hasta örneklerinden izole edilen lenfosit hücre kültüründe 0, 25 ve 400 mg/ml'lik arı sütü ile 72 saat inkübasyon sonucu elde edilen MTT testi sonuçları Tablo 6'da verilmiştir. MTT testine ait kuyucuklardaki görüntü Şekil 12'de verilmiştir.

**Tablo 6.** Graves'li hastalarda MTT testi sonuçları (Absorbans $\times 10^3$ ), [n=10,  $\bar{X}(\pm SD)$ ]

Hasta	Kontrol*	0	25	400
C.K	96.5 (10.6)	114.9 (13.6)	139.1 (12.2)	174.4(9.4)
S.T	119.8 (10.5)	104.1 (9.5)	116.2 (13.2)	222.9(20.2)
S.H	126.5 (16.6)	121.8 (17.0)	137.3 (21.9)	222.8(10.5)
E.T	138.2 (10.6)	106 (12.3)	138.6 (12.5)	170 (17.5)
S.K	89.5 (4.1)	72.1 (8.8)	75.6(12.0)	178.9(11.8)
Y.A	88.7 (6.6)	81.4 (7.6)	89.5 (14.8)	183.2(15.8)
$\bar{X}(\pm SD)$	109.9 (21.1)	100.1 (19.4)	116.1 (27.7)	192.0(24.3)**

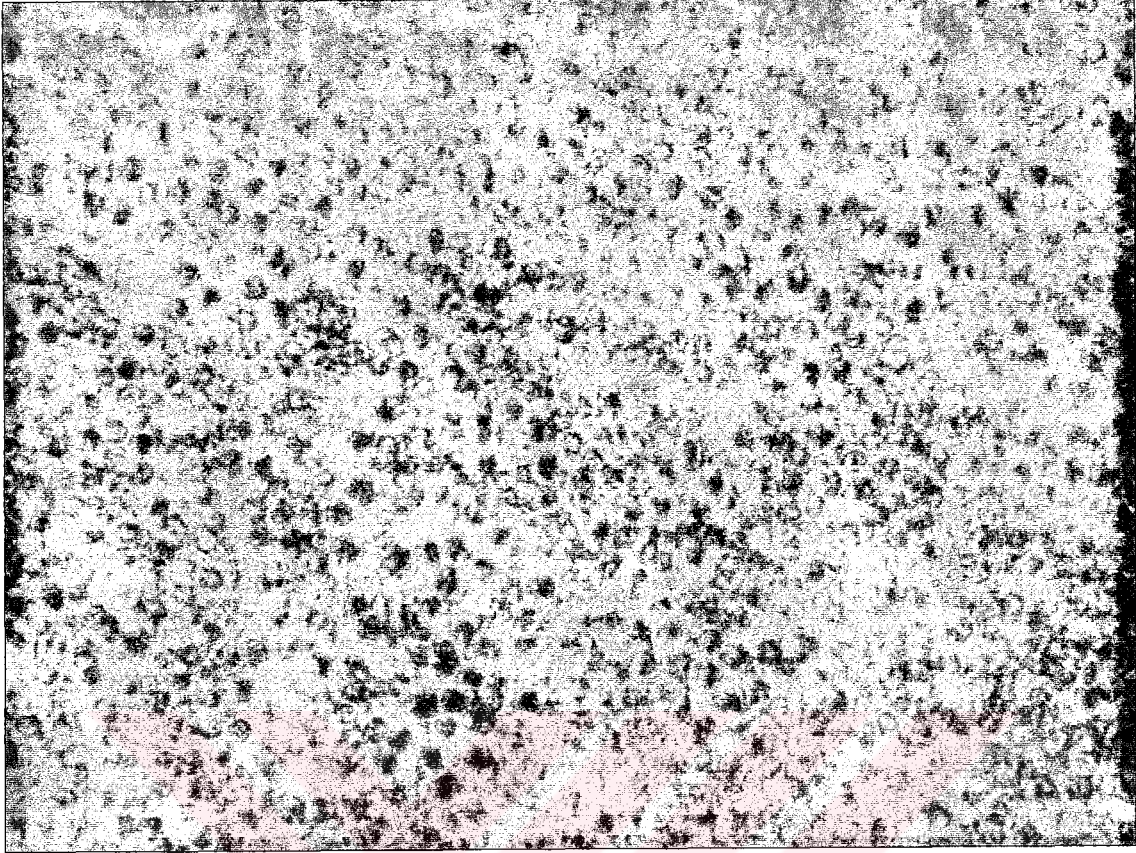
\* Kontrol örneklerinde PBS yerine RPMI kullanılmıştır.

\*\*Kruskal-Wallis ki-kare=13.978,  $p=0.03$



**Şekil 12.** MTT testi

Her bir konsantrasyonda hastalar için elde edilen tablonun altında verilen genel ortalamaların Kruskal-Wallis varyans analizinde anlamlı fark bulunmuştur. Bu farkın hangi konsantrasyondan kaynaklandığı Wilcoxon testi ile incelendiğinde 400 mg/ml'lik konsantrasyonun kontrol, 0 ve 25 mg/ml'lik örneklerden anlamlı farklı olduğu bulunmuştur (her biri için Wilcoxon  $w=21.0$ ,  $p=0.004$ ). Dolayısıyla lenfositleri en fazla etkileyen, proliferasyon yeteneğini en fazla artıran konsantrasyonun 400 mg/ml olduğu anlaşılmaktadır. 400 mg/ml'lik arı sütünün lenfositler ile 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen mikroskopik görüntü Şekil 13'de verilmiştir.



**Şekil 13.** 400 mg/ml konsantrasyonda arı sütü ile muamele edilen lenfositlerin 72 saatlik inkübasyon sonrasındaki mikroskopik görünümü ( $\times 100$ ).

### 4.3. Sitokin düzeyleri

Lenfosit hücre kültürününün arı sütü ile 72 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen supernatantlarda bulunan Th1 markörü sitokinler (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) ile Th2 markörü sitokinler (IL-4, IL-10)'in düzeyleri Tablo 7'de verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve her bir hasta için bulunan Tablo 7'deki veriler grup haline getirildiğinde, elde edilen sonuçlar ve istatistik karşılaştırmaları Tablo 8'de verilmiştir.



**Tablo 7.** Hücre kültürü supernatantlarında elde edilen sitokin düzeyleri [n=2,  $\bar{X}(\pm SD)$ ]

Hasta	Konsant.	IFN- $\gamma$ (IU/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
C.K	0	2.45 (0.44)	40.0 (2.83)	15.8 (0.84)	13.0 (1.02)	10.0 (2.82)
	25	1.17 (0.26)	21.4 (1.67)	14.8 (1.12)	0.12 (0.03)	9.4 (1.44)
	400	2.85 (0.51)	8.84 (2.08)	11.6 (0.36)	0.10 (0.02)	8.5 (1.16)
S.T	0	2.23 (0.65)	9.4 (0.29)	12.7 (0.64)	28.2 (1.08)	15.4 (1.10)
	25	1.69 (0.32)	6.7 (0.55)	22.4 (0.82)	6.3 (1.02)	22.3 (1.86)
	400	3.62 (0.46)	3.2 (0.18)	22.4 (1.02)	0.12 (0.02)	9.5 (0.84)
S.H	0	1.81 (0.50)	10.8 (1.20)	22.6 (0.36)	30.4 (0.84)	9.5 (0.80)
	25	0.91 (0.20)	2.4 (0.16)	19.3 (0.44)	23.0 (0.96)	5.5 (0.66)
	400	2.88 (0.35)	0.10 (0.03)	8.9 (0.22)	14.8 (0.32)	3.7 (0.74)
E.T	0	1.85 (0.34)	31.5 (0.80)	19.3 (0.24)	1.8 (0.16)	12.5 (2.16)
	25	1.69 (0.51)	21.4 (1.30)	18.9 (0.32)	1.4 (0.16)	11.8 (1.24)
	400	2.16 (0.74)	19.4 (0.96)	18.5 (0.21)	0.12 (0.02)	10.4 (1.32)
S.K	0	0.95 (0.13)	26.9 (1.32)	3.16 (0.24)	11.1 (1.20)	5.9 (0.96)
	25	2.24 (0.45)	19.7 (0.84)	1.16 (0.20)	8.3 (1.04)	2.7 (1.04)
	400	5.14 (0.74)	8.3 (0.26)	2.43 (0.33)	2.9 (0.45)	0.7 (0.19)
Y.A	0	2.08 (0.55)	32.2 (0.94)	13.9 (0.66)	13.7 (0.82)	10.2 (2.64)
	25	1.68 (0.60)	21.7 (1.12)	3.16 (0.08)	8.3 (0.26)	8.1 (1.86)
	400	3.85 (0.24)	12.4 (0.38)	2.43 (0.20)	5.6 (0.44)	6.1 (0.94)

**Tablo 8.** Tablo 7'deki sitokin düzeylerinin grup ortalamaları [ $n=6, \bar{X}(\pm SD)$ ]

Parametere	0	25	400	Ki-kare	$p=$
IFN- $\gamma$	1.90 (0.52)	1.56 (0.47)	3.42 (1.04)*	10.62	0.005
TNF- $\alpha$	25.13 (12.39)	15.55 (8.66)	8.70 (6.83)**	6.48	0.039
IL-12	14.58 (6.67)	13.29 (8.97)	11.04 (8.22)	1.06	0.589
IL-4	16.36 (10.92)	7.89 (8.19)	3.89 (5.80)	5.51	0.063
IL-10	10.58 (3.18)	9.96 (6.82)	6.49 (3.74)	2.85	0.241

\* IFN- $\gamma$  için 400-0 arasında Wilcoxon  $w=25, p=0.010$ , 400-25 arasında  $w=22, p=0.006$

\*\* TNF- $\alpha$  için 400-0 arasında  $w=25, p=0.025$

Tablo 8'e göre IFN- $\gamma$  konsantrasyonları 25 mg/ml'lik arı sütü konsantrasyonu hariç artış eğilimi gösterirken, diğer bütün sitokinlerin konsantrasyonları 0-400 mg/ml'lik konsantrasyonlar arasında azalma eğilimi göstermiştir. Bu artma ve azalmalar en fazla 400 mg/ml'lik konsantrasyonda maksimum ya da minimum olmuştur. Sitokinlerden arı sütü konsantrasyonlarına göre anlamlı farklılıklar IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'da bulunmuştur. IL-4 konsantrasyonları da azalmakla birlikte, anlamlılık sınırında ( $p=0.05$ ) kalmıştır. Çalışmamızda Th1/Th2 sitokin düzeylerinin oranı da araştırıldı. Bu oranlar Tablo 9'da verilmiştir.

**Tablo 9.** Hücre kültür supernatanlarında elde edilen Th2/Th2sitokin oranlarının grup ortalamaları [ $n=6, \bar{X}(\pm SD)$ ]

Parametere	0	25	400	Ki-kare	$p=$
IFN- $\gamma$ / IL-4	0.27 (0.38)	1.96 (03.84)	13.22 (14.15)*	7.33*	0.026
IFN- $\gamma$ / IL-10	0.18 (0.04)	0.26 (0.28)	1.61 (2.82)**	7.67**	0.022
TNF- $\alpha$ /IL-4	4.34 (6.55)	33.29 (71.27)	46.97 (65.48)	0.85	0.650
TNF- $\alpha$ /IL-10	2.67 (1.56)	2.46 (2.57)	2.86 (4.48)	1.45	0.480
IL-12/IL-4	2.40 (4.09)	23.63 (49.11)	76.45 (86.01)	1.29	0.530
IL-12/IL-10	1.37 (0.65)	1.42 (1.15)	1.96 (1.05)	1.38	0.502

\* Fark 0-400 arasındadır ( $w=23.5, p=0.013$ ), \*\* 0-400 arasında  $w=26.5, p=0.045$



Varyans analizinde Th1/Th2 oranlarından IFN- $\gamma$ / IL-4 ve IFN- $\gamma$ / IL-10 için anlamlı grup farklılığı bulunmuştur. Grup içindeki farklılık 400 mg/ml'lik konsantrasyondan kaynaklanmaktadır.

#### 4.4. TSHR Ab sonuçları

Lenfosit hücre kültürünün arı sütü ile 72 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen supernatanlarda ölçülen TSHR Ab düzeyleri Tablo 10'da verilmiştir.

**Tablo 10.** Hücre kültür supernatanlarında elde edilen TSHR Ab düzeyleri\*

Hasta	TSHR Ab (IU/ml)		
	0	25	400
C.K	29	27.5	16
S.T	34	25	19
S.H	28	29	14
E.T	36.5	36	17.5
S.K	31	27	16
Y.A	33	28	15.0
$\bar{X}$ ( $\pm$ SD)	31.9 $\pm$ 3.2	28.8 $\pm$ 3.8	16.6 $\pm$ 1.8

\* Ki-kare= 12.82,  $p=0.002$

Hasta sonuçları tek tek incelendiğinde her bir hasta için 400 mg/ml konsantrasyonda arı sütü ile muamelede en düşük Ab düzeyleri bulunmuştur. Varyans analizinde gruplar arasında belirgin anlamlı farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu farklılık yine 400 mg/ml'lik konsantrasyondan kaynaklanmaktadır (hem 400-0 arasında ve hem de 400-25 arasında  $w=21$ ,  $p=0.004$ ).

#### 4.5. Hasta serumları ile yapılan testler

Hasta serumunda ölçülen sitokin düzeyleri Tablo 11'de verilmiştir.

**Tablo 11.** Hasta serumundaki sitokin düzeyleri

Hasta	IFN- $\gamma$ (IU/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
C.K	2.57	15.60	12.9	1.88	4.97
S.T	0.10	9.96	14.7	8.70	2.90
S.H	0.35	3.52	20.6	78.1	5.90
E.T	1.00	17.50	16.4	39.5	3.50
S.K	0.47	11.30	7.4	8.30	26.70
Y.A	0.10	16.20	9.4	11.0	0.30

## 5- TARTIŞMA

Graves hastalığı; hipertiroidi, diffüz guatr, oftalmopati ve seyrek olarak dermopati ile kendini gösteren otoimmün bir hastalıktır. Bu bulgular, çeşitli kombinasyonlar halinde ve farklı sıklıkta görülürler. Tanı anında hepsinin bir arada olması gerekmez. Tirotoksikoz nedenleri arasında %70-85'lik oranla en sık görülenidir. Bu oran iyot alımı ile ilgili olarak coğrafi değişiklikler gösterir. İyot yetersizliği bölgelerinde, Graves hastalığı yine birinci sırayı korumakla birlikte, toksik multinodüler guatr ve toksik adenomun görülme sıklığı, endemik olmayan bölgelere göre daha fazladır (42). Hastalığın patogenezinde humoral ve hücrel immün cevaplar yer alır. TSHR Ab seviyeleri artmıştır ve tiroid dokusu aktif T ve B hücreleri ile infiltredir (1,5,9). Bazı gözlemlere dayanarak Graves'li hastalarda B hücre aktivasyonu ve humoral immün cevap hakimiyeti olduğu ileri sürülmüştür. Hastaların tiroid bezlerinde ve Graves oftalmopati hastalarının ekstraoküler kaslarında IgE birikir (93-94). Aktif B hücre markörü olan CD23+ hücre sayısı artar. IgE sentezi için bir düzenleyici, B ve T hücreleri promotörü ve kan hücreleri için bir diferansiyasyon faktörü olarak etki eden solubül CD23 (sCD23) bazı Graves hastalarında artar (95). Graves hastalığında periferik kan lenfosit alt tipleri sayısı ile ilgili olarak literatürde çelişkili sonuçlar vardır. Bazı çalışmalarda CD4+ artarken CD8+ hücreler azalmış, dolayısıyla CD4/CD8 oranı artmış (96-98), diğer bazı çalışmalarda ise CD4+ ve CD8+ hücrelerin birlikte arttığı bulunmuştur (99-100). Th alt tipleri ile yapılan çalışmalarda ise Th2 cevabı artarken (11,98) Th1 cevabının azaldığı (11,98), arttığı (101) ya da değişmeden kaldığı (102) bulunmuştur.

ATİ'ler Graves hastalığının başlaması ve sürdürülmesinde önemli olabilen tiroid hücreleri üzerindeki MHC Class II (HLA-DR) ekspresyonunda inhibisyona, supresör T hücre sayısında artmaya (normale gelme), helper T hücre ve NK hücre aktivitesinde azalmaya, tiroid içinde aktif T hücre sayısında azalma ve in vivo TSHR Ab ve anti TPO konsantrasyonlarında azalmaya neden olurlar. Tirositlerden proinflamatuvar moleküllerin

salınımını azaltırlar (14,103). IL-1 $\beta$ , sIL-2 reseptörleri, IL-6 ve solubül IL-6 reseptör (101) dahil bazı sitokinlerin ve solubül sitokin reseptörlerinin serum konsantrasyonları da ATİ tedavisine cevap olarak azalır. Yeni bir çalışmada Diez ve ark. ları Graves'li hastalarda serum TNF- $\alpha$  ve serum TNFR-1 konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre arttığını ve ATİ ile tedaviden sonra serum TNF- $\alpha$  ve serum TNFR-1 konsantrasyonlarının anlamlı olarak azalarak normale döndüğünü bildirmişlerdir (104).

Sitokinler (monokinler, lenfokinler) hücreler arasında soluble sinyaller olarak parakrin ve endokrin bir tarzda etki gösteren küçük, glikoprotein yapısında kimyasal maddelerdir. İmmün savunmada, immün ve inflamatuvar cevapların oluşumu ve devamında temel bir role sahip olduklarından bu polipeptid mediyatörlerin otoimmün hastalıkların gelişmesi ve devamında yer alabileceği ileri sürülmüştür (61). IL-2, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi T hücresi kaynaklı sitokinler, lenfositlerin pek çok fonksiyonlarına aracılık ederler. Bu nedenle onların her biri immün olaylara farklı derecelerde katkıda bulunur. Makrofajlar ve ilgili hücre tipleri TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin önemli kaynaklarıdır (105). Sitokinlere cevapta intrasellüler sinyaller hücre yüzey reseptörleri tarafından sağlanır. Bununla birlikte sitokin reseptörleri hücre yüzey formlarının proteolitik parçalanmasından kaynaklanan solubül formlarda da mevcuttur. Sitokinlerin insan tiroid fizyolojisindeki ve hipertiroidi durumlarındaki rolü yeteri kadar anlaşılammıştır. Graves hastalığında intratiroidal lenfositler ve tiroid folikül hücreleri tarafından yapılan farklı sitokinlerde artma vardır (106-107). Th2 sitokin hakimiyetine yol açan immün regülasyon bozukluğunun hastalığın patogenezinde önemli olduğu ileri sürülmüştür (108). Ayrıca sitokin seviyelerinin endokrin durumla iyi bir korelasyon gösterdiği görülmektedir. Hatta sitokinler Graves hastalığında aktivasyon ve remisyon markörleri olarak fonksiyon görebilirler (109). Diğer yandan hipertiroksinemisinin sitokinler üzerindeki etkisini değerlendirmek zordur. Çünkü ATİ'lar sitokin yapımını değiştirirler (110).

Arı sütü, işçi bal arılarının hipofaringeal bez ve mandibular bezlerinden salgılanır. Kraliçe arı ve larvaları için yegane gıdadır. Kimyasal analizi yapıldığında arı sütünün yapısında başlıca protein, şekerler, lipidler, vitaminler, mineraller ve serbest amino asitler yer alır (35-37). 10-hidroksi-2-dekenoik asit, royalisin ve apisin dahil içindeki bazı maddelerin bu farmakolojik aktiviteleri gösterdiği bulunmuştur. Başlıca 5 tip arı sütü proteini (major royal jelly proteins, MRJPs; MRJP1-5) cDNA klonlama ve sekanslama teknikleri ile karakterize edilmiştir. Arı sütünün antitümör, antibakteriyel, antiallerjik,

antihiperkolesterolemik, insülin benzeri ve yorgunluğa karşı farmakolojik özellikleri olduğu bildirilmiştir (40). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda ise arı sütünün in vitro ve in vivo antiinflamatuvar ve immünmodülatör etkisinin olduğu gösterilmiştir (38-41).

Biz çalışmamızda Basedow-Graves hastalığında arı sütünün otoimmünite üzerindeki etkisini periferik kan lenfosit hücre kültürlerinde sitokinler (lenfokinler) ve tiroid otoantikörleri düzeyinde değerlendirmeyi amaçladık.

Bilindiği gibi MTT testi, mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin sayısını ve proliferasyon yeteneğini tanımlamak için kullanılan bir testtir (92). Biz de Graves'li hasta örneklerinden izole edilen lenfosit hücre kültüründe arı sütü ile 72 saatlik inkübasyon sonucunda tüm hastalarda 400 mg/ml'lik konsantrasyondaki arı sütünün absorbansı anlamlı olarak artırdığını bulduk. Diğer bir ifadeyle 400'lük konsantrasyondaki arı sütü canlı lenfosit sayısını ve proliferasyon yeteneğini artırmaktadır. Kontrol, 0 mg/ml ve 25 mg/ml'lik konsantrasyonları arasında ise bir farklılık saptamadık. Arı sütünün sahip olduğu antijenik özelliği ve dolayısıyla yabancı bir protein olarak lenfosit proliferasyonunu artırması beklenen bir sonuçtur.

IFN- $\gamma$ ; aktif T ve NK hücreleri tarafından üretilen gerçek bir lenfokindir. Yapısal ve fonksiyonel olarak tip 1 (alfa/beta) interferonlardan farklıdır. Bariz antiviral ve hücre büyümesini düzenleyici aktivitelerine rağmen immünmodülatör özelliklerinin en önemli olduğuna inanılmaktadır. Makrofaj fonksiyonunun temel aktivatörüdür (makrofaj aktive edici faktör, MAF). Sitotoksik (ve muhtemelen supresör) T hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasında önemli bir role sahiptir. B hücre matürasyon faktörü olarak da etki eder. Ayrıca Ig izotip yapımını düzenler ve Ig E cevaplarını inhibe eder. Entegre sitokin ağında sitokinlerle ya sinerjistik (TNF- $\alpha$  gibi) ya da antagonistik (IL-4 gibi) yolla etkileşir (111)

Th1 hücreleri başlıca IFN- $\gamma$  salgırlar. Diğer bir ifadeyle IFN- $\gamma$ , ana Th1 sitokinidir. Th2 hücreleri tarafından salgılanmaz. IFN- $\gamma$ ; TSHR gen ekspresyonunu down regüle edebilir. Böylece in vivo tiroid fonksiyonlarında genel bir inhibisyona neden olabilir (112). IFN- $\gamma$  dahil sitokinlerin tiroid hormon sentezinde yer alan tüm moleküller üzerinde etkisi vardır. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1'in her üçü de tiroid folikül hücre kültüründe NIS gen ekspresyonunu ve iyodür tutulumunu inhibe eder (113-114). TPO gen ekspresyonu ve Tg yapımı in vivo iyot organifikasyonunu etkileyebilen, in vitro tiroid foliküler hücrelerin sitokin tedavisi ile azalır (115). Sonuç olarak sitokinler tiroid foliküler hücre

proliferasyonunu etkileyebilirler ve genel olarak tiroid hormon yapımında yer alan moleküllerin ekspresyon ve fonksiyonunu inhibe ederler (9).

Graves hastalarında yapılan değişik çalışmalarda serum IFN- $\gamma$  seviyesinin arttığı (12), azaldığı (61) ve değişmeden kaldığı (11,116) bildirilmiştir. IFN- $\gamma$ , IL-2 ve TNF- $\alpha$  gibi Th1 sitokinler in vitro tiroid B hücreleri tarafından antitiroid antikor yapımını suprese ederler (117). Çelişkili bulgular olmasına rağmen çoğunluğun görüşü; Graves hastalığının Th2 sitokinler tarafından başlatıldığı ve Th1 sitokinler tarafından ise regüle edildiğidir. ATİ veya RAI ile tedaviden sonra serum IFN- $\gamma$  seviyelerinin yüksek kaldığı ancak Th1/Th2 oranının sağlıklı kontrollere göre daha düşük yani Th2 lehine olduğu saptanmıştır (118-119).

Arı sütünün IFN- $\gamma$  üzerindeki etkisini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma vardır. Oka ve arkadaşları immünize farelerde 1g/kg dozda ağızdan verilen arı sütünün immünmodülatör etkilerini araştırmışlardır (21). İmmünize farelerde normal farelere göre CD4+ T hücrelerinden IFN- $\gamma$  yapımının suprese olduğunu ve IL-4 yapımının arttığını, arı sütü verildikten sonra Th1/Th2 hücre cevap dengesinin Th2'den Th1 lehine düzeldiğini (IFN- $\gamma$ 'nın artıp IL-4'ün azaldığını) bildirmişlerdir. Taniguchi ve ark.ları atopik dermatit benzeri cilt lezyonları oluşturulmuş deneysel fare modelinde arı sütünün bu tip cilt lezyonlarının gelişmesini suprese ettiğini ve bunun mekanizmasının muhtemelen dalak hücrelerinden IFN- $\gamma$  yapımında azalma ve dorsal cilt lezyonlarında indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonundaki artmaya bağlı olduğunu bildirmişlerdir (89). Kronik atopik dermatitte IFN- $\gamma$ 'nın patogenetik rolü ile ilgili olarak IFN- $\gamma$ 'nın lezyonlu ciltte inflamatuvar hücrelerin toplanmasında önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada ise arı sütünden saflaştırdıkları MRJP3 proteininin T hücre proliferasyonunda inhibisyon, ve bu hücrelerden IFN- $\gamma$ , IL-2 ve IL-4'ün yapımını suprese ettiğini saptamışlardır (41). IFN- $\gamma$ , ve TNF- $\alpha$ ; tiroid folikül hücresinin büyüme ve proliferasyonunu inhibe eder (120).

Biz çalışmamızda periferik kan lenfosit hücre kültürlerinin arı sütü ile 72 saat inkübasyonundan sonra elde edilen hücre kültürü supernatanlarında ölçtüğümüz IFN- $\gamma$  seviyelerinin 25 mg/ml'lik konsantrasyonda değişmezken 400 mg/ml'lik arı sütü konsantrasyonunda belirgin olarak arttığını bulduk. Bizim IFN- $\gamma$  ile ilgili sonuçlarımız Gravesli hastalarda arı sütünün Th1/Th2 dengesini Th2 sitokinden Th1 sitokin cevabına doğru yer değiştirttiğini göstermektedir. Yukarıdaki olumlu etkileri (supresör T

hücrelerinin büyüme ve farklılaşması, IgE cevabında inhibisyon ve in vitro tiroid B hücreleri tarafından antitiroid Ab yapımında supresyon gibi) dikkate alındığında arı sütünün IFN- $\gamma$  seviyesini artırıcı etkisini yararlı bir etki olarak değerlendirebiliriz.

TNF- $\alpha$ ; nötrofiller, makrofajlar, aktif T ve B hücreleri, NK hücreleri, lenfokinle aktive edilen öldürücü hücreler ve düz ve çizgili kas hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir. Septik şok sendromu, kaşeksi, AIDS gibi pek çok hastalığa aracılık eder ve bazı otoimmün hastalıkların patogeneğinde yer alır. TNF- $\alpha$ , antijenle uyarılmış IL-2 ve IL-6 ile birlikte T lenfositlerinin aktivasyon ve proliferasyonunda gerekli olan ikincil sinyalin önemli bir bölümünü oluştururlar. TNF- $\alpha$ , tiroid folikül epitel hücreleri, fibroblastlar ve tiroid içindeki lenfositler tarafından da salgılanabilir (120-121). Pek çok immünolojik aracılı inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde aşırı miktarda TNF- $\alpha$  üretildiği saptanmıştır (104,122). Örneğin TNF- $\alpha$ 'nın romatoid artrit klinik semptomlarının ortaya çıkmasında anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir. Çünkü TNF- $\alpha$ ; proinflamatuvar sitokin kaskadının tepesinde yer alır. Romatoid artritli hastaların anti- TNF- $\alpha$  antikoru ile tedavisi hastalık aktivitesinde dramatik bir azalma ile sonuçlanmıştır (123).

TNF- $\alpha$  sistemi hipofiz-tiroid aksının düzenlenmesinde rol oynayabilir. İnsan tiroid hücreleri üzerinde TNF- $\alpha$  reseptörleri gösterilmiştir (124).

Graves'li hastalarda intratiroideal lenfositler ve tiroid folikül hücreleri tarafından in vivo TNF- $\alpha$  üretimi gösterilmiştir (121,125-126). Yapılan değişik çalışmalarda bu hastalarda serum TNF- $\alpha$  seviyelerinin yüksek (101,104,127) veya normal sınırlarda (102) olduğu bildirilmiştir. ATİ'ler immünsupresif etkilerini TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi bazı inflamatuvar sitokinlerin yapımını engelleyerek gösterirler (9,18). Diez ve ark.ları ATİ, RAI veya cerrahi ile tedaviden sonra ötiroid hale gelen Graves'li hastalarda serum TNF- $\alpha$  seviyelerinin azalarak sağlıklı kontrollerdeki seviyelere geldiğini göstermişlerdir (104). Ancak plazma TNF- $\alpha$ 'nın yarı ömrü kısadır ve bu sitokinin doku seviyeleri patofizyolojik durumlarla daha yakından ilişkilidir (128).

Arı sütünün TNF- $\alpha$  üzerindeki etkisini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Daha önce Tonks ve ark.ları tarafından yapılan bir çalışmada %1'lik arı balının insan monosit hücre dizilerinde TNF- $\alpha$  salınımını uyardığı, suni balın ise (doğal balda bulunana benzer glukoz ve fruktoz karışımı) TNF- $\alpha$  salınımını sağlamada yetersiz olduğu bildirilmiştir (129). Kohno ve ark.ları lipopolisakarid ve IFN- $\gamma$  ile uyarılmış fare peritoneal



makrofaj kültür ortamına arı sütü süspansiyonlarının supernatanlarını ilave ettiklerinde doza bağlı olarak aktive makrofajlarda TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-11'in yapımının inhibe olduğunu göstermişler ve böylece arı sütünün otoimmün hastalıkların yaşam kalitesinin düzelmesinde etkili bir diyet supplementi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (38). Simuth ve ark.ları ise arı sütünün majör proteinden apalbümin-1 (özellikle 55 kDa'lık monomerik formunun) ve apalbümin-2'nin hücre kültür ortamında fare makrofajlarından TNF- $\alpha$  salınımını uyardığını bildirmişler ve bal arıları ve insanlarda immün cevap için gerekli genlerin sitokin aracılı aktivasyonunda TNF- $\alpha$ 'nın önemli bir rol oynayabileceğini, ayrıca TNF- $\alpha$ 'nın hücre proliferasyonu ve inflamasyon gibi önemli hücresel olayların düzenlenmesine iştirak eden bir faktör olarak temel bir role sahip olabileceğini belirtmişlerdir (39).

Biz çalışmamızda periferik kan lenfosit hücre kültürlerinin arı sütü ile 72 saat inkübasyonundan sonra elde edilen hücre kültürü supernatanlarında ölçtüğümüz TNF- $\alpha$  seviyelerinin arı sütü konsantrasyonu arttıkça giderek azaldığını bulduk. Bu azalma 400 mg/ml'lik konsantrasyonda en belirgin olup istatistiki anlamlılık bu konsantrasyondan kaynaklanmaktadır. Graves hastalarında TNF- $\alpha$ 'nın azalması hastalık remisyonuna ya da yukarıda ifade ettiğimiz gibi hastalık aktivitesinde bir azalmayı gösterebilir. Bu nedenle arı sütünün bizim hastalarımızda periferik kan lenfosit hücre kültüründeki bu etkisi tedavi edici ve remisyonu sağlayıcı bir etki olarak düşünülebilir.

IL-12; başlıca B lenfositleri, monosit, makrofaj ve dendritik hücrelerde üretilir. İn vivo, otoimmün hastalıklarda, bakteriyel ve paraziter hastalıklara dirençte, HIV dahil antiviral cevaplarda, tümöre karşı immünitinin başlamasında majör bir rol oynar. NK hücreleri ve T hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini artırır. IL-12; IFN- $\gamma$  yapımı ve Th1 sitokin cevabının güçlü bir nedenidir (130). IL-12'nin otoimmün hastalıklardaki rolü belirsizdir. Bununla birlikte IL-12; IL2R ekspresyonunda ve Th1 proliferasyonunda önemli bir role sahiptir (131). Nakamishi ve ark. ları Gravesli hastalarda hipertiroidi durumunda serum sIL2R seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir (132). Bazı araştırmacılar da tip 1 diyabetes mellitus, romatoid artrit ve inflamatuvar barsak hastalığı gibi Th1- aracılıklı otoimmün hastalıkların kemirgen modellerinin patogeneğinde IL-12'nin önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir (133-135).

Yapılan diğer bazı çalışmalarda Graves'li hastalarda serum IL-12 seviyelerinin arttığı (13,66) ve değişmeden kaldığı (116) bulunmuştur. Kocjan ve ark. ları ise yeni tanı

konan Graves'li hastalarda mononükleer hücre kültür supernatanlarında sağlıklı kontrollere göre IL-12 seviyesinin daha düşük, Th2 sitokinleri IL-4 ve IL-10'un yüksek olduğunu ve dolayısıyla Th1/Th2 oranının düşük olduğunu bildirmişler, sonuç olarak Graves'li hastalarda sitokin yapımının Th2 sitokin cevabına doğru sistemik bir kayma gösterdiğini, dolayısıyla hastalığın patogeneğinde TSHR Ab'ları ve humoral immünitinin anahtar bir rol oynadığını belirtmişlerdir (11). Jones ve ark. ları Graves'li hastalara tedavi amacıyla verdikleri RAİ tedavisinden 55 gün sonra serum IFN- $\gamma$  ve IL-4 seviyelerinin arttığını, IL-12 seviyesinin ise değişmeden kaldığını bildirmişlerdir (119). Ajjan ve ark. ları Graves hastalığı ve Hashimoto tiroditli tiroid bezinde IL-12p40 ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir (136). Tamaru ve ark. ları Graves'li hastalarda hipertiroidi durumunda serum IL-12 seviyesinin arttığını ve hastaların 5 tanesinde MMİ ve PTU ile tedavisinden sonra ötiroid döneme doğru geçilirken IL-12 seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir (65).

Literatürde arı sütünün IL-12 üzerindeki etkisini değerlendiren sadece bir çalışmaya rastladık. Daha önce bahsettiğimiz ve Oka ve arkadaşları tarafından arı sütünün immünmodülatör etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan bu çalışmada immünize farelerde arı sütünün antijene spesifik İg E ve mast hücrelerinden histamin serbestleşmesini baskıladığı, dolayısıyla allerjik reaksiyonların engellendiği, makrofaj fonksiyonlarının düzeldiği (IL-12, GSH ve NO yapımında artma, PGE<sub>2</sub> yapımında azalma) bulunmuştur (21). Ancak bu çalışmada lenfositlerde Th1 sitokini olarak IL-12 yapımı araştırılmamıştır.

Biz çalışmamızda periferik kan lenfosit hücre kültürlerinin arı sütü ile 72 saat inkübasyonundan sonra elde edilen hücre kültürü supernatanlarında ölçtüğümüz IL-12 seviyelerinin arı sütü konsantrasyonu arttıkça giderek azaldığını, fakat bu azalmanın istatistiki olarak anlamlı olmadığını bulduk.

IL-4; Th2 lenfositleri ve mast hücre prekürsörlerinde üretilir. Başlıca Th2 sitokinidir. Th1 hücreleri IL-4 üretmezler. IL-4; Th1 lenfositlerindeki IFN- $\gamma$  yapımını düzenler, timositlerin ve olgun lenfositlerin proliferasyonunu uyarır. Fakat IL-2 ile indüklenmiş periferik T lenfositleri proliferasyonunu engeller. IL-4; B hücreleri üzerinde solubül CD-23 yapımı vasıtasıyla büyüme faktör aktivitesine ve IgE, IgM ve IgG1 yapımına yol açan diferansiyasyon aktivitesine sahiptir. IL-4; TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub>, G-CSF yapımını engeller. Sitokin ağında anahtar bir sitokin olup antiinflamatuvar özellikler gösterir ve muhtemelen allerji mekanizmalarında yer alır. Astmatik hastaların akciğerlerindeki IL-4 ve IL-13; IgE, IgG ve IgM sekresyonunu uyarır (137-138).

Graves hastalarında yapılan değişik çalışmalarda serum IL-4 seviyesinin arttığı bulunmuştur (12,118,119). Kocjan ve ark.ları Graves'li hastalarda periferik kan lenfositleri kültür supernatanında IL-4 seviyelerini sağlıklı kontrollere göre yüksek bulmuşlardır (11). Mysliwiec ve ark.ları Graves'li hastalarda Th2 sitokinlerinden IL-4 ve IL-10'un arttığını, aktif Graves oftalmopati hastalarda steroid tedavisinden sonra da IL-4/IFN- $\gamma$ , IL-4/TNF- $\alpha$ , IL-10/IFN- $\gamma$ , ve IL-10/TNF- $\alpha$  oranında artma olduğunu, dolayısıyla bu sitokinlerin hastalık remilyonunda bir rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (70). Komiya ve ark.ları ise Graves'li hastalarda MMİ ile tedavi sırasında ve tedaviden 18 ay sonra remilyon ve rekürrens dönemlerinde serum IL-4 seviyelerinde bir farklılık saptamamışlardır (67). Aynı çalışmada IL-6 ve IL-10 ile hastalığın remilyon ve rekürrensi arasında bir korelasyon gözlenmemştir.

Arı sütünün Th1/Th2 hücre cevapları üzerindeki etkisi ilk kez 2001 yılında Oka ve ark.ları tarafından araştırılmıştır (21). Bu araştırmacılar immünize farelerde 1g/kg dozda ağızdan verilen arı sütünün immünmodülatör etkilerini araştırmışlardır (21). İmmünize farelerde normal farelere göre CD4+ T hücrelerinden IFN- $\gamma$  yapımının suprese olduğunu ve IL-4 yapımının arttığını, arı sütü verildikten sonra Th1/Th2 hücre cevap dengesinin Th2'den Th1 lehine düzeldiğini (IFN- $\gamma$ 'nın artıp IL-4'ün azaldığını), dolayısıyla otoimmünitenin iyileştiğini bildirmişlerdir. Aynı yıl yapılan diğer bir çalışmada Kataoka ve ark.ları ise immünize farelere arı sütü verdiklerinde antijene spesifik IgG1 ve IgE yapımının inhibe olduğunu ve antijenle uyarılmış dalak hücreleri tarafından Th2 sitokinleri IL-4, IL-5 ve IL-10 yapımının da inhibe olduğunu saptamışlardır (28). Çok daha yeni olarak Okamoto ve ark.ları arı sütününün antiallerjik aktivitesinin hangi komponentine bağlı olduğunu bir seri kolon kromatografisi kullanarak araştırmışlar ve IL-4 yapımını suprese eden 70 kDa'luk bir glikoproteini saflaştırmışlardır. Bu proteine MRJP3 adını vermişlerdir. Aynı çalışmada bu proteinin, T hücre proliferasyonunda inhibisyonla birlikte bu hücrelerden IL-4 yanında IL-2 ve IFN- $\gamma$  yapımını da suprese ettiğini, MRJP3'ün kendisinin yabancı bir protein olarak antijen özelliği olmasına rağmen intraperitoneal verilmesinin immünize farelerde serum anti-OVA IgE ve IgG1 seviyelerini inhibe ettiğini ve sonuç olarak MRJP3'ün in vitro ve in vivo güçlü immün cevapları düzenleyici (immün modülatör ve immün regülatör) etkilere sahip olabileceğini göstermişlerdir (41).

Biz çalışmamızda periferik kan lenfosit hücre kültürlerinin arı sütü ile 72 saat inkübasyonundan sonra elde edilen hücre kültürü supernatanlarında ölçtüğümüz IL-4

seviyelerinin doza bağılı olarak arı sütü konsantrasyonu arttıkça giderek azaldığını ve bu azalmanın 400 mg/ml'lik konsantrasyonda en belirgin olduğunu bulduk. Fakat bu azalma istatistiki olarak anlamlı olmamakla birlikte anlamlılık sınırına çok yakındı ( $p=0.06$ ). Bu sonuç muhtemelen vaka sayımızın küçük ( $n=6$ ) olmasından kaynaklanmaktadır. Arı sütünün Th2 sitokini IL-4 yapımını lenfositlerden suprese etmesi yararlı ve tedavi edici bir özellik olarak değerlendirilebilir. Çünkü relaps olan Graves hastalarında IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi Th2 sitokinleri hastalığın aktivitesi ile ilişkili olarak artmaktadır (14,63,68,69,101,104).

IL-10; T lenfositleri (başlıca Th2), monositler, makrofajlar ve B hücreleri tarafından üretilen bir lenfokindir. APC ile aktive edilen Th1 hücrelerinin sitokin sentezini inhibe eder. İn vitro aktif monositler ve makrofajlar tarafından yapılan monokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 ve IL-8) çok güçlü bir inhibitörüdür. IL-10; B lenfositlerinin plazma hücrelerine dönüşmesinin bir sonucu olarak B lenfositlerinden çok yüksek Ig G yapımına neden olur. Diğer bir ifadeyle IL-10, B hücreleri için güçlü bir stimülandır (139). IL-10; NK hücrelerinden antijenle indüklenmiş IFN- $\gamma$  yapımını inhibe eder. Bu etkiyi doğrudan ve IFN- $\gamma$  yapımı üzerinde TNF- $\alpha$  ve IL-12'nin uyarıcı etkilerini inhibe ederek yapar.

IL-10; Graves hastalığında otoantikör yapımında muhtemelen majör bir etkiye sahiptir. Bu hastalarda yapılan değişik çalışmalarda serum IL-10 seviyesinin arttığı bulunmuştur (12,63,64,70). Kocjan ve ark.ları Graves'li hastalardan elde edilen mononükleer hücre kültür supernatanlarında sağlıklı kontrollere göre IL-10 seviyesinin yüksek ve IFN- $\gamma$ /IL-10 ile IL-12/IL-10 oranlarının düşük olduğunu bildirmişlerdir (11). Takeoka ve ark.ları tedaviye dirençli Graves hastalığında IL-4 seviyesi yüksek değilken IL-10 seviyesinin yüksek kaldığını göstermişlerdir (62). Mysliwicz ve ark.ları Graves oftalmopatisinde IL-10 seviyelerinin arttığını bulmuşlar ve steroid tedavisinden sonra bu seviyenin daha da arttığını bildirmişlerdir (63). Komiya ve ark.ları ise Graves hastalığında serum IL-10 ve IL-6 ile remisyon ve rekürrens arasında bir korelasyon bulamamışlardır (67). Daha sonra Mysliwicz ve ark.ları tarafından yapılan diğer bir çalışmada steroidle tedavi edilen Graves oftalmopatisinde tedaviden sonra IL-4 ve IL-10'da artma ve IL-18'deki azalmanın bu sitokinlerin hastalık remisyonunda önemli olabileceği ve tedaviye cevabı önceden tahmin etmede yararlı bir markör olabileceğini ileri sürmüşlerdir (64).

Literatürde arı sütünün IL-10 üzerindeki etkisi ile ilgili olarak sadece bir çalışma vardır. Katooka ve ark.ları tarafından yapılan bu çalışmada ovoalbümin(OVA)/Alum-

immünize fareye intraperitoneal yoldan arı sütü verilmesi dalak hücreleri tarafından IL-10, IL-4 ve IL-5 yapımında inhibisyona yol açmıştır (28). Ancak bu çalışmada Th2 sitokini olarak IL-10 yapımı araştırılmamıştır.

Biz çalışmamızda periferik kan lenfosit hücre kültürlerinin arı sütü ile 72 saat inkübasyonundan sonra elde edilen hücre kültürü supernatanlarında ölçtüğümüz IL-10 seviyelerinin doza bağlı olarak arı sütü konsantrasyonu arttıkça giderek azaldığını, fakat bu azalmanın istatistiki olarak anlamlı olmadığını bulduk. Ancak anlamlılık düzeyi IL-4 gibi sınırdadır değil. Yine de bu sonucun vaka sayısındaki azlığa bağlı olduğunu düşünüyoruz.

Daha öncede belirttiğimiz gibi Graves hastalığında Th hücre sitokin cevabı yapılan çalışmalarda farklı bulunmuştur. Bu otoimmün hastalıkta genel olarak Th2 sitokin cevabı artmakta (11,116,118), Th1 sitokin cevabı ise azalma, artma ve değişiklik göstermeden kalma şeklinde olmaktadır. Fakat bu hastalarda genel olarak Th1/Th2 oranının azaldığı (Th2 sitokin tarafına kayma) ve ATİ tedavisinden sonra bu oranın normale döndüğü (14) ya da değişmeden kaldığı (118) kabul edilebilir. Kocjan ve ark.ları tarafından yapılan çok yeni bir çalışmada ise yeni tanı alan Graves'li hastalarda Th1/Th2 sitokin dengesindeki değişikliği değerlendirmek amacıyla tedavi öncesi ve MMİ ile tedaviden 1 yıl sonra ötiroid dönemde periferik kan mononükleer hücre kültürlerinin supernatanlarında IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 ve IL-10 seviyelerini ölçmüşler, tedavi sonrasında IFN- $\gamma$  ve IL-4'ün daha da arttığını fakat her 2 grupta Th1/Th2 oranı arasında fark olmadığını, sağlıklı kontrollere göre tedavi sonrası Graves'li hastalarda hücre kültür supernatanlarında IL-4'ün daha yüksek, IL-12'nin ise daha düşük olduğunu, IL-12/IL-4 oranının da daha düşük olduğunu bulmuşlardır (118). Sonuç olarak Th1/Th2 oranında MMİ ile tedavi sonrası anlamlı bir değişiklik olmadığını ve bu ilacın immünmodülatör etkisine karşı bir fikrin desteklenebileceğini bildirmişlerdir.

Biz de çalışmamızda arı sütünün Th1/Th2 oranı üzerindeki etkisini değerlendirdik. 0 mg/ml'lik konsantrasyondan itibaren 400 mg/ml'lik konsantrasyona doğru gidildikçe Th1/Th2 oranının Th1 lehine değiştiğini gözledik. Bu değişme IFN- $\gamma$ /IL-4 ve IFN- $\gamma$ /IL-10 oranlarında istatistiki olarak anlamlı bulundu. Arı sütü ile bulduğumuz bu sonuç ATİ tedavisine bağlı olarak remisyona giren Graves hastalarındaki sonuç ile uygunluk göstermektedir.

Graves hastalığını patogenezinde Th2 sitokinlerin (özellikle IL-4, IL-10 ve IL-13) B hücrelerini TSHR Ab sentez ve sekresyonuna neden olacak şekilde stimülasyonu son derece önemlidir. TSHR Ab'ları tiroid folikül hücrelerini stimüle ederek guatr ve



hipertiroidi oluşmasına yol açar (67,140). TSHR-stimulan antikorlar, TSH gibi hem adenilat siklaz-cAMP ve hem de protein kinaz C-fosfoinozid sinyal iletim sistemlerini aktive ederler. Sonuçta tiroid hormon sentez ve sekresyonu, Tg salınımı ve tiroid folikül hücresinde iyod tutulması, organifikasyon, protein sentezi ve folikül hücre büyümesi meydana gelir (5). Graves hastalığının aktivitesi ile serum TSHR Ab konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon vardır. Antikor seviyelerinin çok yüksek olduğu hastalarda klinik tablo daha ağır seyretmekte, tedaviye cevap daha geç ve uzun sürede olmakta ve nihayet nüks daha sık olarak görülmektedir (5,141-144). ATİ'lar ile tedaviden sonra serum TSHR Ab seviyeleri azalır. PTU, B lenfositlerinden Ig salınımını azaltır ve supresör T lenfositlerinin sayısını artırır (145). MMI ise RAİ ile tedavi edilen Graves'li hastalarda serum TSHR Ab konsantrasyonlarındaki artmayı engeller (5). Bu etki generalize immüsupresyondan ziyade organa spesifik bir etkidir. Diğer bir çalışmada PTU veya karbimazolle tedavi edilen Graves'li hastalarda serum tiroid hormon konsantrasyonlarında benzer azalmalar gözlenmiş, fakat karbimazolle tedavi edilen hastalarda serum TSHR Ab konsantrasyonlarında daha fazla azalmalar ve supresör T hücre sayısında artmalar saptanmıştır (146). Bu durum immün sistem üzerindeki etkinin indirekt olarak tiroid fonksiyonundan bağımsız olduğunu göstermektedir. Tedavi sonrası antikor seviyelerinin normale döndüğü hastalarda remisyon süresi daha uzun iken TSHR Ab yüksekliğinin devam ettiği hastalarda relaps oranı daha yüksektir (141,142). TSHR Ab'nin kaybolduğu durumlarda bile relaps oranı yaklaşık %30-50'dir (147).

Daha önce de ifade edildiği gibi Graves hastalığında arı sütünün etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma literatürde yoktur. Bu konuda ilk olan mevcut çalışmamızın ilginç ve en önemli sonuçlarından biri de periferik kan lenfosit hücre kültürlerinin arı sütü ile 72 saat inkübasyonundan sonra elde edilen hücre kültürü supernatanlarında ölçtüğümüz TSHR Ab seviyelerinin doza bağlı olarak arı sütü konsantrasyonu arttıkça giderek azalması ve bu azalmanın 400 mg/ml'lik konsantrasyonda en belirgin olmasıdır. Bu durum muhtemelen arı sütünün doğrudan B lenfositlerinde antikor yapımını inhibe etmesine ya da hücre kültür ortamında arı sütünün etkisiyle azalan IL-4 ve IL-10'un B lenfositleri üzerindeki stimulan etkisinin azalmasına bağlıdır. Ayrıca arı sütü etkisiyle artan Th1 sitokini IFN- $\gamma$ 'nın in vitro tiroid B hücreleri tarafından tiroid antikor yapımını suprese ettiği bildirilmiştir (148). Bu sonuç çok önemlidir. Çünkü Th1 /Th2 sitokin oranındaki

dengelesizlik sonuçta humoral immünite üzerinden Graves hastalığında görülen bozukluklara yol açmaktadır. Humoral immünitede en önemli rol TSHR Ab'a aittir.

Çalışmamızın dikkat çekici sonuçlarından birisi de arı sütünün 0 mg/ml'lik konsantrasyonunda ve buna bağlı olarak 25 ve 400 mg/ml'lik konsantrasyonlarında lenfosit hücre kültürlerinden salgılanan sitokin düzeylerinin hastalar arasında geniş bir aralıkta değişkenlik göstermesidir. Bu durum aynı arı sütü konsantrasyonuna sahip hastalar alınarak grup oluşturduğumuzda gruplar arasındaki anlamlılık düzeylerine olumsuz yönde tesir etmiştir. Örneğin, IL-4 seviyesi arı sütü konsantrasyonu arttıkça azalmasına rağmen hastalar arasındaki başlangıç değerleri çok farklı olduğundan (0 konsantrasyonda IL-4 düzeyinin S.H adlı hastada 30,4 pg/ml iken E.T adlı hastada 1.8 pg/ml olması gibi) istatistiksel anlamlılık ancak sınırda kalmıştır ( $p=0.06$ ). Bu durum nasıl açıklanabilir? Bilindiği gibi periferik kan T hücre popülasyonunun analizi tiroid otoantijenlerine spesifik olmayan lenfositlerinin çoğunun dahil edilmesi ile olumsuz etkilenmeye yol açabilir. Hatta intratiroideal popülasyon bu gibi olumsuz etkilenmelerden serbest olmayabilir. Bu nedenle supernatantın içine geçen sitokin salınımının ölçülmesi amacıyla hücrelerin ayrılmasından sonra *in vitro* kültür, sitokinlerin kantitatif olarak ölçülmesinde RT-PCR metoduna göre belirgin avantajlara sahiptir. Fakat CD4+ hücreler gibi hücre topluluklarını arıtmak için büyük miktarda hücre gerekir ve herhangi bir *in vitro* sisteme ait artefaktlardan temizlenmemiş olabilir (8).

Çalışmamızdaki ilginç sonuçlardan birisi de Graves'li hastaların sadece yarısında TSHR Ab artmış olarak bulunurken ve 2, 3, ve 6 no'lu hastada antikor seviyeleri normal iken bu hastaların periferik kan lenfosit hücre kültür supernatantlarında ölçtüğümüz TSHR Ab düzeylerinin yüksek olarak saptanması idi. Bu sonuç Graves hastalığı tanısında serum TSHR Ab seviyelerine göre lenfosit kültür supernatantlarında ölçülen TSHR Ab seviyelerinin çok daha önemli, güvenilir ve değerli olduğunu göstermektedir. Ancak pratikte kullanım kolaylığı dikkate alındığında yine de serum TSHR Ab seviyeleri tercih edilebilir.



## 6- SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1 ) Arı sütünün Graves'li hastaların periferik kan lenfosit hücre kültürlerinde 72 saatlik inkübasyonu sonrasında hücresel toksisiteye neden olmayacak etkin konsantrasyonları MTT testi ile belirlendi.
- 2) Lenfositleri en fazla etkileyen, proliferasyon yeteneğini en fazla artıran konsantrasyonun 400 mg/ml olduğu bulundu.
- 3 ) Arı sütü konsantrasyonu artarken lenfositlerden üretilen ve salgılanan sitokinlerden IFN- $\gamma$  artış gösterirken; TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4 ve IL-10 azalmışlardır. Sitokinlerden arı sütü konsantrasyonuna göre anlamlı farklılıklar IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'da bulunmuştur. IL-4 konsantrasyonları da anlamlılık sınırında kalmıştır.
- 4 ) Graves hastalığının patogeneğinde, aktivasyon ve remisyon dönemlerinde Th1/Th2 sitokin oranları önemli bir göstergedir. İncelenen oranlar içerisinde IFN- $\gamma$ /IL-4 ve IFN- $\gamma$ /IL-10 oranları konsantrasyonlara göre anlamlı farklılıklar göstermiştir.
- 5) Arı sütü Graves'li hastalarda Th1/Th2 sitokin oranını Th1 sitokin yönüne kaydırmaktadır. Dolayısıyla arı sütü kullanımı Graves tedavisinde ve remisyon sağlanmasında etkili olabilir.
- 6 ) Graves hastalığının patogeneğinde en önemli faktör, TSHR Ab düzeylerinin artmasıdır. Arı sütü ile muamele edilen lenfositlerden TSHR Ab düzeyleri arı sütü konsantrasyonu arttıkça beirgin anlamlı azalmalar göstermiştir. Bu sonuç arı sütünün TSHR Ab düzeylerini düşürmede bir ATİ gibi etki edebileceğini göstermektedir.
- 7 ) Gerek sitokin ve gerekse TSHR Ab düzeylerini etkileyen ve farklılık meydana getiren arı sütü konsantrasyonu 400 mg/ml olarak bulunmuştur.

- 8 ) Arı sütünün otoimmün hastalıklarda immünmodölatör etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.
- 9 ) Arı sütünün immünmodölatör etkisinin hangi bileşen/bileşenlerden kaynaklandığını araştırmak amacıyla çeşitli izolasyon yöntemleri kullanılarak etken bileşik/ler ayrılabilir ve hücre költürlerinde denenebilir.
- 10) Hücre költürleriyle arı sütünü ve çeşitli ATİ'lar muamele edilerek etkileri karşılaştırılabilir.



## 7- Ö Z E T

### OTOİMMÜN TİROİD HASTALIKLARINDA ARI SÜTÜ (ROYAL JELLY)'NÜN OTOİMMÜNİTE ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Otoimmün tiroid hastalıkları içinde hipertiroidin en sık görülen nedeni Basedow-Graves hastalığıdır. Graves hastalığı etyolojisi tam olarak bilinmeyen organ spesifik otoimmün bir hastalıktır. Hastalığın patogeneğinde en önemli rolü TSHR Ab oynar. Bu antikorun TSH reseptörlerini aşırı stimüle etmesiyle hipertiroidi ve guatr meydana gelir. Graves hastalığının patogeneğinde sitokinlerin rolü son yıllarda yoğun olarak araştırılmıştır. Arı sütü, genç, işçi bal arılarının (*Apis mellifera*) hipofarengal ve mandibular bezlerinde yapılan ve salgılanan, lapa-jel kıvamında homojen bir maddedir. Arı sütünün antitümör, antibakteryel, antiallerjik, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antihiperkolesterolemik, insülin benzeri ve yorgunluğa karşı farmakolojik özellikleri olduğu bildirilmiştir. Biz bu çalışmamızda Graves hastalığında arı sütünün otoimmünite üzerindeki etkisini periferik kan lenfosit hücre kültür ortamında değerlendirmeyi ve tedavi dozunu belirlemeyi amaçladık.

Çalışmanın ilk aşamasında arı sütünün immünite üzerindeki etkisinin (stimülasyon, inhibisyon ya da immünmodülasyon) ölçülmesinde etkin konsantrasyonu bulmak için 4 normal sağlıklı bireyde periferik kandan lenfosit hücre izolasyonu yapıldı. Arı sütünün 0-500 mg/ml aralıkta dilüsyonları hazırlandı. Her bir sağlıklı bireyin lenfositlerini içeren izolasyon örneğine değişik konsantrasyonlardaki arı sütü örnekleri ilave edildi. 72 saatlik inkübasyon sonrasında MTT testi yapıldı. Çalışmanın ikinci aşamasında K.T.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı Polikliniğine başvuran, klinik ve laboratuvar bulgularıyla yeni tanı konmuş ve hiç

tedavi almamış Graves'li 6 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu hastalarda periferik kan lenfosit izolasyonunu takiben 0, 25 ve 400 mg/ml'lik konsantrasyonlardaki arı sütü örnekleri hastalardan elde edilen lenfositlerle 72 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası lenfosit hücre kültüründe MTT testi, hücre kültür supernatanlarında ise Th1 sitokinlerinden IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve IL-12, Th2 sitokinlerinden IL-4 ve IL-10 düzeyleri EASIA yöntemiyle, TSHR Ab düzeyleri ise radyoreseptör yöntemiyle tayin edildi.

Arı sütünün Graves'li hastaların periferik kan lenfosit hücre kültürlerinde 72 saatlik inkübasyonu sonrasında hücresel toksisiteye neden olmayacak etkin konsantrasyonları MTT testi ile belirlendi ve lenfositleri en fazla etkileyen, proliferasyon yeteneğini en fazla artıran konsantrasyonun 400 mg/ml olduğu bulundu. Arı sütü konsantrasyonu artarken lenfositlerden üretilen ve salgılanan sitokinlerden IFN- $\gamma$  artış gösterirken; TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4 ve IL-10 azaldı. Sitokinlerden arı sütü konsantrasyonuna göre anlamlı farklılıklar IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ 'da bulundu. IL-4 konsantrasyonları da anlamlılık sınırında kaldı. Graves hastalığının patogenezinde, aktivasyon ve remisyon dönemlerinde önemli bir gösterge olan Th1/Th2 sitokin oranları içerisinde IFN- $\gamma$ /IL-4 ve IFN- $\gamma$ /IL-10 oranları da arı sütü konsantrasyonlarına göre anlamlı farklılıklar gösterdi. Arı sütü Graves'li hastalarda Th1/Th2 sitokin oranını Th1 sitokin yönüne kaydırıldı. Dolayısıyla arı sütü kullanımı Graves tedavisinde ve remisyon sağlanmasında ATİ'lara benzer şekilde etkili olabilir. Arı sütü ile muamele edilen lenfositlerden TSHR Ab düzeyleri arı sütü konsantrasyonu arttıkça belirgin anlamlı azalmalar gösterdi. Bu sonuç arı sütünün TSHR Ab düzeylerini düşürmede bir ATİ gibi etki edebileceğini göstermektedir. Gerek sitokin ve gerekse TSHR Ab düzeylerini etkileyen ve farklılık meydana getiren arı sütü konsantrasyonu 400 mg/ml olarak bulundu.

Sonuç olarak, arı sütünün Graves hastalığında immünmodülatör etkili olabileceği sonucuna varıldı.

## 8- SUMMARY

### INVESTIGATION OF EFFECTS OF ROYAL JELLY ON AUTOIMMUNITY IN AUTOIMMUNE THYROID DISEASES

Among autoimmune thyroid diseases, Basedow-Graves' disease is the most frequent cause seen in hyperthyroidism. Graves' disease is an organ-specific autoimmune disease with unknown etiology.

TSHR Ab plays the most important role for the pathogenesis of Graves' disease. Hyperthyroidism and goiter occur when the antibody stimulates excessively for TSH receptor. Recently, role of cytokines for the pathogenesis of Graves' disease has been studied extensively. Royal jelly (RJ) is a creamy product secreted by young nurse worker bees (*Apis mellifera*) and it is synthesized in the hypopharyngeal and mandibular glands. RJ has been reported to have such pharmacological characteristics as anti-tumor, anti-bacterial, anti-hypercholesterolemic, anti-allergic, anti-inflammatory, immunomodulatory, insulin-like, anti-fatigue properties. Major aim of the present study is to evaluate the effect of RJ on autoimmunity in peripheral lymphocyte culture and to establish the therapeutic doses.

In the first phase, lymphocyte cell isolation from 4 voluntary healthy subjects was performed to find effective concentration on immunity (stimulation, inhibition or immunomodulation). Serial dilutions of the RJ were prepared (0-500 mg/ml). Each isolated lymphocyte cells were treated with above diluted samples. MTT test was carried out after incubation of 72 hours. In the second phase, 6 patients with Graves' disease who newly diagnosed by clinical and laboratory methods admitted to Endocrinology and Metabolic Disease Clinic of Medical Faculty, K.T.U and untreated.

RJ samples of 0, 25 and 400 mg/ml were incubated in a culture medium for 72 hours with isolated lymphocytes obtained from the patients. After incubation, MTT test in lymphocyte cell culture, Th1 cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-12, and Th2 cytokines IL-4 and IL-10 levels by EASIA method, TSHR Ab by radioreceptor method were determined.

Concentration affecting lymphocytes to proliferate was found to be 400 mg/ml by MTT test after incubation of 72 hours in cell culture medium. Of cytokines produced and secreted from lymphocytes IFN- $\gamma$  increased, whereas, other cytokines decreased as RJ concentration increases. Significant differences according to RJ concentration were found only for IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . IL-4 concentrations were kept at border of significance. Of Th1/Th2 cytokines ratios which they are important markers for activation and remission periods of Graves' diseases, IFN- $\gamma$ /IL-4 and IFN- $\gamma$ /IL-10 ratios were also exhibited significant differences with various RJ concentrations. RJ treatment in lymphocytes from patients with Graves' disease was shifted the Th1/Th2 cytokine ratio to the side of Th1 cytokine. Therefore, RJ use in the treatment and establishing a remission of Graves' disease may be effective as a manner of antithyroid drug treatment. TSHR Ab levels of lymphocytes cell culture supernatants treated with RJ showed significantly clear decreases as concentration increases. Also, the result may suggest that RJ may exert an effect similar to an antithyroid drug for decreasing TSHR Ab levels. RJ concentration which affects both cytokin and TSHR Ab levels was found to be 400 mg/ml.

It was concluded that RJ may be effective as an immunomodulatory agent in Graves' disease.

## 9- KAYNAKLAR

1. Greenspan, F.S.: The Thyroid Gland. In: Basic and Clinical Endocrinology, Sixth Edition, Edited by Greenspan FS, Gardner DG, The McGraw Hill Companies, New York, 2004, pp: 215-294.
2. Weetman, A.P: Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. Eur. J. Endocrinol.,148: 1-9, 2003.
3. Weetman, A.P: Autoimmune Thyroid Disease. In: Endocrinology, Fourth Edition, Edited by Leslie J. DeGroot and L.Larry Jameson, 2001 by W.B. Saunders Company, Volum 2, pp. 1409-21.
4. Chiovato, L., Barbsino, G., Pinchera, A: Graves Disease. In: Endocrinology, Fourth Edition, Edited by Leslie J. DeGroot and L.Larry Jameson, 2001 by W.B. Saunders Company, Volum 2, pp. 1422-49.
5. Davies, T.F.: Graves' disease. In Werner and Igar's The Thyroid. Editors. Braverman LE, Utiger RD, Eighth edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2000, pp: 518-55.
6. Prabhakar, B.S., Bahn, R.S., Smith, T.J: Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. Endocr. Rev.,24: 802-835, 2003.



7. Rapoport, B., McLachlan, S.M: Thyroid autoimmunity. *J. Clin. Invest.*,108; 1253-1259, 2001.
8. Weetman, A.P.: Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin. Endocrinol.*, 61; 405-413, 2004.
9. Ajan, R.A., Weetman, A.P: Cytokines in thyroid autoimmunity. *Autoimmunity*, 36: 351-359, 2003.
10. Vasu, C., Holterman, M.J., Prabhakar, B.S: Modulation of dendritic cell function and cytokine production to prevent thyroid autoimmunity. *Autoimmunity*, 36: 389-396, 2003.
11. Kocjan, T., Wraber, B., Repnik, U., Hojker, S: Changes in Th1/Th2 cytokine balance in Graves' disease. *Pflugers. Arch.*, 440 (5Suppl): R94-R95., 2000.
12. Al-Humaidi, M.A: Serum cytokines levels in Graves' disease. *Saudi. Med. J.*, 21: 639-44, 2000.
13. Hidaka, Y., Okumura, M., Fukata, S., Shimaoka, Y., Takeoka, K., Tada. H., Kuma, K., Amino, N: Increased serum concentration of interleukin-12 in patients with silent thyroiditis and Graves' disease. *Thyroid*, 9: 149-53, 1999.
14. Bossowski, A., and Urban M: Serum levels of cytokines in children and adolescents with Graves' disease and non-toxic goiter. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 14: 741-47, 2001.
15. McLachlan, S.M., Dickinson, A.M., Malcolm, A., Farndon, J.R., Young, E., Proctor, S.J., Smith B.R: Thyroid autoantibody synthesis by cultures of thyroid and peripheral blood lymphocytes. I. Lymphocyte markers and response to pokeweed mitogen. *Clin. Exp. Immunol.*, 52: 45-53, 1983.

16. McLachlan, S.M., Pegg, C.A.S., Atherton, M.C., Middleton, S.L., Clark, F., Smith, B.R: TSH receptor antibody synthesis by thyroid lymphocytes. *Clin. Endocrinol.*, 24: 223-230, 1986.
17. McLachlan, S.M., Pegg, C.A.S., Atherton, M.C., Middleton, S.L., Young, E.T., Clark, F., Smith, B.R: The effect of carbimazole on thyroid autoantibody synthesis by thyroid lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60: 1237-42, 1985.
18. Cooper, DS: Treatment of Thyrotoxicosis. In: Werner and Igar's *The Thyroid*, Eighth Edition, Edited by Braverman LE, Utiger RD, 2000 by Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2000, pp: 691-715.
19. Piana, L., Manzi, L., Krell, R: Royal Jelly. <http://www.fao.org/docrep/w0076E/w0076e16.htm>.
20. Sver, L., Orsolich, N., Tadic, Z., Nijari, B., Valpotic, I., Basic, I: A royall jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 19: 31-38, 1996.
21. Oka, H., Emori, Y., Kobayashi, N., Hayashi, H., Nomoto, K: Suppression of allergic reactions by royal jelly in associated with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. *Int. Immunopharmacol.*, 1: 521-32, 2001.
22. Tamura, T: *Honeybee Science*, 6: 117-124, 1985.
23. Sauerwald, N., Polster, J., Bengsch, E., Niessen, L., Vogel, RF: Combined antibacterial and antifungal properties of water-soluble fraction of royal jelly. *Adv. Food. Sci.*, 20: 46-52, 1998.

24. Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N: Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food. Chem.*, 75: 237-240, 2001.
25. Okuda, H., Kameda, K., Morimoto, C., Matsuura, Y., Chiaki, M., Jiang, M: Studies on insulin-like substances and inhibitory substances toward angiotensin-converting enzyme in royal jelly. *Honeybee Science*, 19: 9-14, 1998.
26. Tamura, T., Fuji, A., Kuboyama, N: Anti-tumor effects of royal jelly (RJ). *Folia. Pharmacol. Japon. (in Japanese)*., 89: 73-80, 1987.
27. Shinodo, M., Nakajin, S., Oikawa, T., Sato, K., Kamogawa, A., Akiyama, Y: Biochemical studies on vasodilative factor in royal jelly. *Yakugaku Zasshi (in Japanese)*, 98: 139-145, 1978.
28. Kataoka, M., Arai, N., Taniguchi, Y., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M: Analysis of antiallergic function of royal jelly. *Natural Medicines (in Japanese)*, 55: 174-180, 2001.
29. Tokunaga, K.-H., Yoshida, C., Suzuki, K-M., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y., Mishima, S: Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 189-192, 2004.
30. Husein, M.Q., Kridli, R.T: Reproductive responses following royal jelly treatment administered orally or intramuscularly into progesteron-treated Awassi ewes. *Animal Reproduction Science*, 74: 45-53, 2002.
31. Emori, Y., Oka, H., Ohya, O., Tamaki, H., Hayashi, H: The protective effect of royal jelly against the hemopoiesis dysfunction in X-irradiated mice. *Biotherapy (Jpn)*, 12: 313-319, 1998.

32. Vittek, J: Effects of royal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with atherosclerosis. *Experientia*, 51: 927-935, 1995.
33. Nakajin, S., Okiyama, K., Yamashita, S., Akiyama, Y., Shinodo, M: Effect of royal jelly on experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Shoyakugaku. Zasshi* (in Japanese), 26: 65-69, 1982.
34. Fujii, A., Kobayashi, S., Kuboyama, N., Furukawa, Y., Kaneko, Y., Ishihama, S., Yamamoto, H., Tamura, T: Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. *Japan J. Pharmacol.*, 53: 331-337, 1990.
35. Townsend, G.F., Brown, W.H., Felauer, E.E., Hazlett, B: Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids. IV. The esters of acids closely related to 10-hydroxy-2-decenoic acids from royal jelly against transplantable mouse leukemia. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39:1765-70, 1961.
36. Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K: A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.*, 5;265(19):11333-7, 1990.
37. Watanabe, K., Shinmoto, H., Kobori, M., Tsushida, T., Shinohara, K., Kaneada, J., Yonekura, M: Stimulation of cell growth in the U-937 human myeloid cell line by honey royal jelly protein. *Cytotechnology* , 26; 23-27, 1998.
38. Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto M: Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 138-145, 2004.
39. Simuth, J., Bilikova, K., Kovacova, E., Kuzmova, Z., Schroder, W: Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein simulating TNF- $\alpha$  release is a regular component of honey. *J. Agric. Food. Chem.*, 52: 2154-2158, 2004.

40. Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M: Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 767-773, 2004.
41. Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M: Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life. Sci.*, 73: 2029-2045, 2003.
42. Alagöl, M. F: Tiroid hastalıkları. *Endokrinoloji, Metabolizma ve beslenme Hastalıkları Kitabı*. Editör, Ergin Sencer, 2001, Nobel Tıp Kitapevleri, s. 93-159.
43. De Groot, LJ: Thyroid physiology and hypothyroidism. In *Clinical Endocrinology, Second Edition*, Edited by G. Michael Bassar and Michael O. Thorner, by Mosby-Wolfe, An Imprint of Times Mirror International Publishers Limited, 1994, pp. 15.1-15.6.
44. Dere, F: *Anatomi, Okullar Pazarı Kitabevi, Adana, 1994, s. 498-500*
45. Capen, C.C: The Normal Thyroid: Anatomy. In Werner and Igbar's *The Thyroid, Eight Edition*, Edited by Braverman LE, by Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp. 20-51.
46. Carrasco, N: The Normal Thyroid: Thyroid Hormone Synthesis. In Werner and Igbar's *The Thyroid, Eight Edition*, Edited by Braverman LE, by Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp. 52-90.
47. Orhan, Y, Alp, H: Tiroid hastalıkları (tanı ve tedavisinde yeni gelişmeler). *İ.Ü. Tıp Fakültesi Yayın No: 172, İstanbul, 1988, s.1*

48. Koloğlu, S. Endokrinoloji Temel ve Klinik, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 1996, s. 247-272
49. Reed, H.L: Thyroid physiology: synthesis, and release, iodine metabolim, binding and transport. In Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism, Third Edition, Editor Kenneth L. Becker, by Lippincott Williams and Wilkins, 2001, pp.314-321.
50. Smallridge, R.C: Thyroid function tests. In Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Third Edition; Editor Kenneth L. Becker, by Lippincott Williams and Wilkins, 2001, pp.329-335.
51. Akamizu, T: Monoclonal antibodies to thyroid specific autoantigens. Autoimmunity, 36: 361-366, 2003.
52. Kohn, L.D., Harii, N: Thyrotropin receptor autoantibodies (TSHRABs): epitopes, origins and clinical significance. Autoimmunity, 36: 331-337, 2003.
53. Sarkar, S.D., Becker, D.V: Thyroid uptake and imaging. In Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Third Edition; Editor Kenneth L. Becker, by Lippincott Williams and Wilkins, 2001, pp.336-341.
54. Hatemi, H., Kabalak, T., Erdoğan, G: Klinik Tiroid, İstanbul, 2001, s.163-220
55. Tuncel, E: Klinik Radyoloji, Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, 1994, s. 696.
56. Noyek, A.M., Finkelstein, D.M: Diagnostic imaging of the thyroid gland, In: Falk SA, Thyroid Disease: Endocrinology, surgery, nuclear medicine and radiotherapy, New York, Raven Press, 1990, pp. 79.

57. Burman, K.D: Hyperthyroidism. In Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Third Edition, Editor Kenneth L. Becker, by Lippincott Williams and Wilkins, 2001, pp. 407-27.
58. Gough, S.C: The genetics of Graves Disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 29: 255-66, 2000.
59. Özata, M: Tirotoksikoz. *Tiroid hastalıkları Tanı ve Tedavisi Kitabı*. GATA Basımevi, Ankara, 2003, s. 42-77.
60. Özata, M: Tiroid hormonları ve tiroid hastalıklarının fizyopatolojisi. *Tiroid hastalıkları Tanı ve Tedavisi Kitabı*. GATA Basımevi, Ankara, 2003, s. 1-15
61. Ward, L.S., Fernandes, G.A: Serum cytokine levels in autoimmune and non-autoimmune hyperthyroid states. *Braz. J. Med. Res.*, 33: 65-69, 2000.
62. Takeoka, K., Watanabe, M., Matsuzuko, F., Miyauchi, A., Iwatani, Y: Increase of serum interleukin-10 in intractable Graves' disease. *Thyroid*, 14: 201-205, 2004.
63. Mysliwiec, J., Kretowski, A., Szelachowska, M., Mikita, A., Kinalska, I: Serum pro-and anti-inflammatory cytokines in patients with Graves' ophthalmopathy during treatment with glucocorticoids. *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, 44: 160-69, 1999.
64. Mysliwiec, J., Kretowski, A., Stepien, A., Mironczuk, K., Kinalska, I: Interleukin-18 and transforming growth factor-beta1 in the sera of patients with Graves ophthalmopathy treated with corticosteroids. *Int. Immunopharmacol.*, 3: 549-552, 2003.
65. Tamaru, M., Matsuura, B., Onji, M: Increased levels of serum interleukin-12 in Graves' disease. *Eur. J. Endocrinol.*, 141: 111-116, 1999.



66. Miyauchi, S., Matsuura, B., Onji, M: Increased levels of serum interleukin-18 in Graves' disease. *Thyroid*, 10:815-9, 2000.
67. Komiya, I., Yamada, T., Sato, A., Kouki, T., Nishimori, T., Takasu, N: Remission and recurrence of hyperthyroid Graves' disease during and after methimazole treatment when assessed by IgE and Interleukin 13. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 3540-3544, 2001.
68. Molnar, I., Balazs, C: High circulating IL-6 level in Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity*, 25: 91-96, 1997;
69. Salvi, M., Girasole, G., Pedrazzoni, M., Passeri, M., Giuliani, N., Mineli, R., Braverman L.E., Roti, E: Increased serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor in patients with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81:2976-2979, 1996.
70. Mysliwiec, J., Kretowski, A., Topolska, J., Siewko, K., Jakubczyk, D., Szelachowska, M., Mikita, A., Kinalska, I: Serum Th1 and Th2 profile cytokine level changes in patients with Graves' ophthalmopathy treated with corticosteroids. *Horm. Metab. Res.*, 33: 739-743, 2001.
71. Wakelkamp, I.M., Gerding, M.N., Van Der Meer, J.W., Prummel, M.F., Wiersinga, W.M: Both Th1- and Th2-derived cytokines in serum are elevated in Graves' ophthalmopathy. *Clin. Exp. Immunol.*, 121:453-457, 2000.
72. Baykal, Y., Özuslu, B.A., Erten., V: B7 molekülleri ve otoimmün hastalıklar. *T Klin Tıp Bilimleri*. 1999; 19: 48-54.
73. Nunes, J.A., Truneh, A., Olive, D.A: Signal transduction by CD28 costimulatory on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules. *J. Biol. Chem.*, 27: 1591-1598, 1996.

74. Guinan, E.C., Gribben, Ö.G., Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Nadler, L.M: Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood*, 84: 3261-3282., 1994.
75. Reiser, H., Schneeberger, E: Expression and function of B7-1 and B7-2 in hapten-induced contact sensitivity. *Eur. J. Immunol.*, 26: 880-885, 1996.
76. Razi, W.Z., Holander, G.A., Reiser, H: Activation of CD4-T lymphocytes from interleukin 2-deficient mice by costimulatory B7 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 2903-2998, 1996.
77. Lenschow, D.J., Ho, S.C., Satar, H., Rhee, L., Gray, G., Nabavi, N., Herald, K.C., Blustone, J.A: Differential effects of anti B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J. Exp. Med.*, 181: 1145-1155, 1995.
78. Genç, M., Aslan, A: Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. *J. Chromatog.*, 839: 265-268, 1999.
79. Lercker, G., Capella, P., Conte, L.S., Ruinji, F., Giordani, G. Components of royal jelly. I. Identification of organic acids. *Lipids*, 16: 912-919, 1981.
80. Takenaka, T: Chemical composition of royal jelly. *Honeybee Science*, 3: 69-74, 1982.
81. Kamakura, M., Mitani, N., Fukuda, T., Fukushima, M: Anti-fatigue effect of royal jelly in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 47: 394-401, 2001.
82. Leung, R., Thien, F.C., Baldo, B., Czarny, D: Royal jelly-induced asthma and anaphylaxis: clinical characteristics and immunologic correlations. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 96: 1004-1007, 1995.

83. Giordani, G: [Effect of royal jelly on chickens.] *Avicoltura.*, 30: 114-120, 1961.
84. Salama, A: Mogawer, H.H. and El-Tohamy, M. Royal jelly a revelation or a fable. *Egyp. J. Veter.. Sci.*, 14: 95-102, 1977.
85. Radu-Tudorache, G., Oita, N., Luca, A., Hritcu, V. [Observations concerning the biostimulant effect of royal jelly on young calves.] *Cercetari. Agronomice. in Moldova*, 2:131-133, 1978.
86. Kaptanoglu, O., Tanyeli, A: The use of royal jelly during treatment of childhood malignancies. In *Bee Products: properties, applications, and apitherapy*. Edited by Avshalom Mizrahi and Yaacov Lensky. Plenum Pres New York, 1997, pp.179-184.
87. Yamada, K., Ikeda, I., Maeda, M., Shirahata, S., Murakami, H: Effect of immunoglobulin production stimulating factors in foodstuffs on immunoglobulin production of human lymphocytes. *Agric. Biol. Chem.*, 54:1087-9, 1990.
88. Davidson, A., Diamond, B: Autoimmune diseases. *N. Eng. J. Med.*, 345: 340-50, 2001.
89. Taniguchi, Y., Kohno, K., Inoue, S.I., Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M: Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int. Immunopharmacol.*, 3: 1313-1324, 2003.
90. Karaali, A., Meydanoglu, F., Eke, D: Studies on composition, freeze drying and storage of Turkish royal jelly. *J. Apic. Res.*, 27 (3): 182-185, 1988.
91. Pollard, J.M., Walker, J.M: *Basic cell culture protocols*. Second edition, Humana Press, 1997, Totowa, New Jersey.

92. Carmichael, J, DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Mina, J.D., Mitchel, J.B: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer. Res.*, 47: 936-942 , 1987.
93. Raikow, R.B., Dalbow, M.H., Kennerdell, J.S., Compher, K., Machen, L., Hiller, W., Blendermann, D: Immunohistochemical evidence for IgE involvement in Graves' orbitopathy. *Ophthalmology*, 97(5):629-635, 1990.
94. Werner, S.C., Wegelius, O., Fierer, J.A., Hsu, K.C: Immunoglobulins (E,M,G) and complement in the connective tissues of the thyroid in Graves's disease. *N. Engl. J. Med.*, 31;287:421-425, 1972.
95. Itoh, M., Uchimura, K., Makino, M., Kobayashi, T., Hayashi, R., Nagata, M., Kakizawa, H., Fujiwara, K., Nagasaka, A.: Production of IL-10 and IL-12 in CD40 and interleukin 4-activated mononuclear cells from patients with Graves' disease. *Cytokine.*, 12; 688-693, 2000.
96. Gessl, A., Wilfing, A., Agis, H., Steiner, G., Czernin, S., Boltz-Nitulescu, G., Vierhapper, H., Waldhausl, W: Activated naive CD4+ peripheral blood T cells in autoimmune thyroid disease. *Thyroid*, 5(2):117-215, 1995.
97. Ohashi, H., Okugawa, T., Itoh, M: Circulating activated T cell subsets in autoimmune thyroid diseases: differences between untreated and treated patients. *Acta. Endocrinol (Copenh).*, 125:502-9, 1991.
98. Watanabe, M., Yamamoto, N., Maruoka, H., Matsuzuka, F., Miyauchi, A., Iwatani, Y: Relation of CD30 molecules on T-cell subsets to the severity of autoimmune thyroid disease. *Thyroid*, 13:259-263, 2003.

99. Walfish, P.G., Tseng, K.H: Intrathyroidal activated (Ia+) T-lymphocyte CD+ subsets and B cells in Graves' hyperthyroidism respond rapidly to propylthiouracil therapy: demonstration using fine needle aspirates and two-colour laser flow cytometry. *Autoimmunity*, 13:35-41, 1992.
100. Kretowski, A., Mysliwiec, J., Turowski, D., Wysocka, J., Kinalska, I: Analysis of recently activated, memory and naive lymphocyte T subsets in the peripheral blood of patients with Graves' disease and insulin-dependent diabetes mellitus. *Rocz. Akad. Med. Bialymst.*, 44:226-234, 1999.
101. Çelik, I., Akalin, S., Erbaş, T: Serum levels of interleukin 6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in hyperthyroid patients before and after propylthiuracil treatment. *Eur. J Endocrinol.*, 132: 668-672, 1995.
102. Chopra, I.J., Sakane, S., Chuo Teco, G.N.: A study of the serum concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$  in thyroidal and nonthyroidal illnesses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 72: 1113-1116, 1991.
103. Weetman, A.P., Tandon, N., Morgan, B.P: Antithyroid drugs and release of inflammatory mediators by complement-attacked thyroid cells. *Lancet*, Sep 12;340:633-636, 1992.
104. Diez, J.J., Hernanz, A., Medina, S., Bayon, C., Iglesias, P: Serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and soluble TNF- $\alpha$  receptor p55 in patients with hypothyroidism and hyperthyroidism before and after normalization of thyroid function. *Clin. Endocrinol.*, 57: 515-521, 2002.
105. Durum, S.K., Oppenheim, J.J: In W.E Paul (Ed.), *Fundamental Immunology*, Raven, New York, 1993, pp. 801-836.
106. Burman, K.D., Baker, J.R. Jr: Immune mechanisms in Graves' disease. *Endocr. Rev.* 6:183-232, 1985.

107. Komorowski, J: Increased interleukin-2 level in patients with primary hypothyroidism. *Clin. Immunol. Immunopathol.*,63:200-202, 1992.
108. Pawlikowski, M., Stepien, H., Komorowski, J: Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the immune system. *Neuroimmunomodulation*, 1:149-152, 1994.
109. Mariotti, S., Caturegli, P., Barbesino, G., Marino, M., Del Petre, G.F., Chiovato, L., Tonacchera, M., De Carli, M., Pinchera, A: Thyroid function and thyroid autoimmunity independently modulate serum concentration of soluble interleukin 2 (IL-2) receptor (IL-2R) in thyroid diseases. *Clin. Endocrinol.*, 37: 415-422, 1992.
110. Watson, P.F, Pickerill, A.P., Davies, R., Weetman, A.P: Analysis of cytokine gene expression in Graves' disease and multinodular goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79:355-360, 1994.
111. Landolfo, S., Cofano, F., Giovarelli, M., Prat, M., Cavallo, G., Forni, G: Inhibition of IFN- $\gamma$  may suppress allograft reactivity by T lymphocytes in vitro and in vivo. *Sci.*, 119: 176-179, 1985.
112. Nishikawa, T., Yamashita, S., Namba, H., Usa, T., Taminaga, T., Kimura, H., Izumi, M., Nagataki, S: IFN- $\gamma$  inhibition of human thyrotropin receptor gene expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77: 1084-1089, 1993.
113. Ajan, R.A., Kammarudin, N.A., Crisp, M., Watson, P.F., Ludgate, M., Weetman, A.P: Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide symporter gene. *Clin. Endocrinol.*, 49: 517-523, 1998.
114. Schumm-Draeger, P.M: "Sodium/iodide symporter (NIS) and cytokines". *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, 109: 132-34, 2001.

115. Rasmussen, A.K., Kayser, L., Rasmussen, U.F., Bendtzen, K: Influence of tumor necrosis factor- $\beta$  and IFN- $\gamma$ , separately and added together with interleukin-1 $\beta$ , on the function of cultured human thyroid cells. *J. Endocrinol.*, 143: 359-365, 1994.
116. Phenekos, C., Vryonidou, A., Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N., Goula, M., Papamichail, M: Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*, 11: 209-213, 2004.
117. McLachlan, S.M., Taverne, J., Atherton, M.C., Cooke, A., Middleton, S., Pegg, C.A., Clark, F., Rees, Smith. B: Cytokines thyroid autoantibody synthesis and thyroid cell survival in culture. *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 175-181, 1990.
118. Kocjan, T., Wraber, B., Kocijancic, A., Hojker, S: Methimazole upregulates T-cell-derived cytokines without improving the existing Th1/Th2 imbalance in Graves' disease. *J. Endocrinol. Invest.*, 27: 302-307, 2004.
119. Jones, B.M., Kwok, C.C.H., Kung, A.W.C: Effect of radioactive therapy on cytokine production in Graves' disease: transient increases in interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor- $\alpha$ , with longer term increases in interferon - $\gamma$  production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84: 4106-4110, 1999.
120. Ajan, R.A., Watson, P.F., Weetman, A.P: Cytokines and thyroid function. *Adv. Neuroimmunol.*, 6: 359-386, 1996.
121. Aust, G., Heuer, M., Laue, S., Lehmann, I., Hofmann, A., Heldin, N.E., Scherbaum, W.A: Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) mRNA and protein in pathological thyroid tissue and carcinoma cell lines. *Clin. Exp. Immunol.*, 105: 148-154, 1996.



122. Old, L.J: Tumor necrosis factor (TNF). *Science*, 230: 630-633, 1985.
123. Maini, R.N., Elliott, M.J., Brennan, F.M., Feldmann, M: Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.*, 101:207-212, 1995. Erratum in: *Clin. Exp. Immunol.*, 102:443, 1995.
124. Pang, X.P., Hershman, J.M., Chang, M., Eugene, A: Characterization of tumor necrosis factor- $\alpha$  receptors in human and rat thyroid cells and regulation of the receptors by thyrotropin. *Endocrinology*, 125: 1783-1788, 1989.
125. Zheng, R.Q., Abney, E.R., Chu, C.Q., Field, M., Maini, R.N., Lamb, J.R., Feldmann, M: Detection of *in vivo* production of tumor necrosis factor-alpha by thyroid epithelial cells. *Immunology*, 75: 456-462, 1992.
126. Watson, P.F., Pickerill, A.P., Davies, R., Weetman, A.P: Analysis of cytokine gene expression in Graves' disease and multinodular goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79: 355-360, 1994.
127. Senturk, T., Kocaci, L.D., Kok, F., Kadikoylu, G., Bolaman, Z: Proinflammatory cytokine levels in hyperthyroidism. *Clin. Invest. Med.*, 26: 58-63, 2003.
128. Pang, X.P., Yoshimuro, M., Hershman, J.M: Suppression of rat thyrotroph and thyroid cell function by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Thyroid*, 3: 325-330, 1993.
129. Tonks, A., Cooper, R., Price, P.C., Molan, P.C., Jones, K: Stimulation of TNF- $\alpha$ -release in monocytes by honey. *Cytokine.*, 14: 240-242, 2001.

130. Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagnani, S: Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 (IL-12)) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.*, 177: 1199-1204, 1993.
131. Yanagida, T., Kato, T., Igarashi, O., Inoue, T., Nariuchi, H: Second signal activity of IL-12 on the proliferation and IL-12 R expression of T helper cell-1 clone. *J. Immunol.*, 152: 4919-4928, 1994.
132. Nakanishi, K., Taniguchi, Y., Ohta, Y: Increased soluble interleukin 2 receptor levels in autoimmune thyroid disease. *Acta. Endocrinol.*, 125: 253-258, 1991.
133. Trembleau, S., Germann, T., Gately, M.K., Adorini, L: The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today.*, 181: 381-386, 1995.
134. Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E., Strober, W: Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.*, 182: 1281-1290, 1995.
135. Seder, R.A., Kelsall, B.L., Jankovic, D: Differential roles for IL-12 in the maintenance of immune responses in infectious versus autoimmune disease. *J. Immunology*, 157:2745-2748, 1996.
136. Ajan, R.A., Watson, P.F., Weetman, A.P: Detection of IL-12, IL-13, and IL-15 messenger ribonucleic acid in the thyroid of patients with autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82: 666-669, 1997.
137. Zurofski, G., de Vries, J.E: Interleukin 13, interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol. Today.*, 15: 19-26, 1994.

138. van der Pouw Kraan, T.C.T.M., van der Zee, J.S., Boeijs, L.C.M., DeGroot, E.R., Stapel, S.O., Aarden, L.A: The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 111: 129-135, 1998.
139. Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., et al: Interleukin-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B-lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 1890-1893, 1992.
140. Nagayama, Y., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Niwa, M., McLachlan, S.M., Rapaport, B: Prevention of autoantibody-mediated Graves'-like hyperthyroidism in mice with IL-4, a Th2 cytokine. *J. Immunol.*, 170: 3522-3527, 2003.
141. Davies, T.F., Yeo, P.P., Evered, D.C., Clark, F., Smith, B.R., Hall, R: Value of thyroid-stimulating antibody determinations in predicting short-term thyrotoxic relapse in Graves' disease. *Lancet*, 1: 1181-1182, 1977.
142. Teng, C.S., Yeung, R.T: Changes in thyroid-stimulating antibody activity in Graves' disease treated with antithyroid drug and its relationship to relapse: a prospective study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 144-147, 1980.
143. McGregor, A.M., Petersen, M.M., McLachlan, S.M., Rooke, P., Smith, B.R., Hall, R: Carbimazole and the autoimmune response in Graves' disease. *N. Eng. J. Med.*, 303: 302-307, 1980.
144. Vitti, P., Rago, T., Chiovato, L., Pallini, S., Santini, F., Fiore, E., Rocchi, R., Martino, E., Pinchera, A: Clinical features of patients with Graves' disease undergoing remission after antithyroid drug treatment. *Thyroid*, 7: 369-375, 1997.

145. Wiktorska, J., Lewinski, A., Sewerynem, E: Antyoksydacyjna rola propyltiouracylu. *Endokrynologia Polska.*, 53: 357-363, 2002.
146. Wilson, R., McKillop, J.H., Pearson, C., Burnett, A.K., Thomson, J.A: Differential immunosuppressive action of carbimazole and propylthiouracil. *Clin. Exp. Immunol.*, 73: 312-315, 1988.
147. Michelangeli, V., Poon, C., Taft, J., Newnham, H., Topliss, D., Colman, P: The prognostic value of thyrotropin receptor antibody measurement in the early stages of treatment of Graves' disease with antithyroid drugs. *Thyroid*, 8: 119-124, 1998.
148. McLachlan, S.M., Taverne, J., Atherton, M.C., Cooke, A., Middleton, S., Pegg, C.A., Clark, F., Rees Smith, B: Cytokines, thyroid autoantibody synthesis and thyroid cell survival in culture. *Clin. Exp. Immunol.*, 79:175-81, 1990.

## ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı:** Cihangir EREM
- Doğum Yeri ve tarihi:** Ünye, 01.03.1960
- Halen Çalıştığı Kurum:** Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Öğrenim Durumu (Üniversiteler ve tarihleri):**
- 1978 Ünye Lisesi’ni bitirdi
  - 1985 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’ni bitirdi
  - 1988–1992 KTÜ Tıp Fakültesinde İç Hastalıkları Uzmanı oldu
  - 1998 İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Bilim Dalı’nda yan dal uzmanlık eğitimimi tamamladı.
- Akademik Ünvanlar:**
- 1993–1996 KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda Yardımcı Doçent
  - 1996 İç Hastalıkları Doçenti oldu
  - 14 Mart 2003’de Profesörlüğe Atandı.
- Alanı, Anabilimdalı:** Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, İç Hastalıkları Anabilim Dalı.
- Medeni Durumu:** Evli-4 çocuklu
- Bildiği Yabancı Dil:** İngilizce
- Çalıştığı Kurumlar:**
- 1985-1988 Mecburi Hizmet (Mardin/Mazıdağı Merkez Sağlık Ocağı tabibi ve Mardin Sağlık Müdür Yardımcılığı)
  - 1988-1992 KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Araştırma Görevlisi
  - 1993-1996 KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda Y. Doçent
  - 1996-2002 KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda Doçent
  - 2003- KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda Profesör

**Verdiği Dersler:**

1. Endokrinolojinin Prensipleri, Hormon ve Hormon Etkileri
2. Hipotalamus ve Hipofiz Hastalıkları
3. Tiroid Bezi Hastalıkları
4. Paratitroid Bezi Hastalıkları
5. Adrenal Medülla Hastalıkları ve Feokromositoma
6. Obezite
7. Erkeklerde Hipogonadizm
8. Cilt ve Mukoza Muayenesi

**Bilimsel Yayınlar:** Yayınlanmış ve baskıda olmak üzere toplam 40'ın üzerinde uluslararası makale ve 80 civarında yayınlanmış ulusal makale ve bildiri

**Diğer Faaliyetler:** İbni Sina Tıp Dergisi Editör Yardımcılığı  
Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Derneği Üyeliği  
Obezite Çalışma Grubu Üyeliği