

284050

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SJÖGREN SENDROMUNUN PERİODONTOLOJİK VE İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİ İLE  
DİŞETİ, MİNÖR TÜKÜRÜK BEZİ VE PERİFERİK KAN HÜCRELERİNİN  
MONOKLONAL ANTİKORLARLA İNCELENMESİ

PERİODONTOLOJİ (DİŞ) PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ

Dr. HAVİYE ÇELENLİGİL

ANKARA — 1986

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SJÖGREN SENDROMUNUN PERİDONTOLOJİK VE İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİ İLE  
DİŞETİ, MİNÖR TÖKÖRÖK BEZİ VE PERİFERİK KAN HÜCRELERİNİN  
MONOKLONAL ANTİKORLARLA İNCELENMESİ

PERİDONTOLOJİ (DİŞ) PROGRAMI  
D O K T O R A     T E Z İ

Dt. HAVİYE ÇELENLİGİL

Rehber Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Y. KENAN ERATALAY

ANKARA - 1986

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
Giriş ve Amaç . . . . .	1
Genel Bilgiler . . . . .	4
Materyal ve Metod . . . . .	34
Bulgular . . . . .	54
Tartışma . . . . .	91
Sonuçlar . . . . .	107
Özet . . . . .	111
Kaynaklar . . . . .	112

## G İ R İ Ş v e A M A Ç

Ağız boşluğu, çok sayıda mikroorganizmanın da dahil olduğu çeşitli antijenlerin, sindirim ve solunum sistemine kolaylıkla geçebilecekleri bir giriş yolu olarak kabul edilir<sup>(75)</sup>. Normalde bu antijenler hastalığa neden olmazlar ve yutkunma sırasında tükürükle birlikte sindirim kanalının son kısmına ulaşırlar. Ağız epitelinin sürekli deskuamasyonu, diş fırçalama ve diğer ağız hijyeni metodları da mekanik olarak ağızdaki bakteriyel florayı kontrol ederler ve ağız dokularını korurlar. İmmünolojik savunma mekanizmaları ise, mikroorganizmaların mukozal membranlar ve diş yüzeyleri üzerinde koloni oluşturmalarını engellerler<sup>(9,71,75)</sup>.

Ağız hastalıklarının en büyük bölümünü, oral mikroorganizmalarla konakçı savunma mekanizması arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan ve Dünya Sağlık Teşkilâtı'nın verilerine göre günümüzde en yaygın epidemilerin başında gelen "periodontal hastalık" oluşturur<sup>(57,80)</sup>.

Periodontal hastalıkla ilgili son yıllarda yapılan araştırmalar, iltihabi değişikliklerin oluşması ve ilerlemesine neden olan immünopatolojik mekanizmaların incelenmesine yönelmiştir<sup>(57)</sup>. Daha önce yapılan çalışmalarda, periodontal hastalık; tabiatı ve şiddeti açısından bireysel konakçı savunma mekanizmaları ile özgül etyolojik ve hazırlayıcı faktörlerin etkilediği bir hastalık olarak kabul edilmişti. Günümüzde, periodontal hastalık terimi, gerçekte herbiri spesifik, klinik, mikrobiyolojik, patolojik, biyokimyasal ve immünolojik özellikler gösteren hastalıklar grubunu yansıtmaktadır. Birçok bireyde konakçı savunma mekanizmaları, spesifik mikroorga-

nizmalar ile onların belirli toksik ve antijenik ürünleri ile etkileşim halinde. Periodontal hastalıkların patogenezindeki yapısal özellikler ve doku yıkımının hızı, özgül mikroorganizmalara bağlı olabileceği gibi, beyaz küre defektleri, mekanik ve travmatik kuvvetler, ilaç alınımı, beslenme bozuklukları, sistemik hastalıklar ve yaş gibi faktörlerle de yönlendirilebilir<sup>(9,57,75)</sup>.

Gingivitis ve periodontitisin histopatolojik bulguları, bu hastalıkların patogenezinde immünojenik mekanizmaların rolünü kuvvetle düşündürmektedir. Periodontal dokularda inflamasyon, sürekli bakteriyel antijenik uyarıya ve diş plağına ait bakteriyel ürünlerin immünojenik olmayan direkt etkilerine bağlı olarak gelişir. Hastalıkta, periodontal dokular, immün cevabın oluşmasını sağlayacak hücresel elemanlar tarafından infiltre edilmiştir. İltihap, konakçının yabancı materyali lokalize edip, etkisiz hale getiren bir savunma mekanizması olmakla beraber, bu işlem sırasında konakçının kendi dokuları da yıkıma uğrar. Böylece inflamasyon, periodontal hastalık da destek dokuların kaybına neden olur<sup>(9,57)</sup>.

İmmünojenik faktörlerin etkili olduğu diğer bir grup ağız hastalıkları da oral dokuların hedef olduğu otoimmün reaksiyonlardır<sup>(75)</sup>. Bu hastalıklardaki bulgular ağıza yönelik olabileceği gibi oral mukoza sistemik hastalığın bir parçası olarak da etkilenebilir. Ağız dokularına ait otoimmün tutulumlara örnek olarak, Sjögren sendromunda (S.S.) tükürük bezlerini, romatoid artritde kemik ve eklemleri, lupus eritematozus ve pemfigusda mukozayı, myasthenia gravisde ise kasları verebiliriz<sup>(7)</sup>. Sjögren sendromu, azalmış gözyaşı ve tükürük bezi sekresyonu ile karakterize olan, kronik inflamatuvar ve otoimmün bir hastalıktır<sup>(22)</sup>. Ayrıca, son yıllarda yapılan immünojenik ve immünojenik çalışmalar otoimmün mekanizmanın açıklanması yönünden bu hastalıkların spektrumu içinde S.S.'nin yerini önemle vurgulamaktadır<sup>(24)</sup>.

Ağız kuruluşunun, hastalığın önemli bir komponentini oluşturduğu bu sendromda, sekresyonun azalmasına bağlı olarak tükürüğün koruyucu fonksiyonu oluşmadığı ve ağız mukozasına yönelik yanma ve ağrı şikayetleri nedeniyle hastalar iyi bir ağız hijyeni gerçekleştiremedikleri için, periodontal problemler ile hızlı ilerleyen diş çürükleri sıklıkla görülen ağız bulgularıdır<sup>(22,82,84)</sup>.

Bu klinik tabloya ilave olarak, bugüne kadar, otoimmün bir hastalıkta vücutta değişen immün cevabın, periodontal hastalıkların etyopatogenezinde rol oynayan doku yıkım mekanizmalarını ne yönde etkileyebileceği bilinmemektedir. Bu konuyla ilgili olarak, S.S.'nda günümüze kadar periodontal yapıyı değerlendiren bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma, S.S. tanısı konulan hastalarda ;

- 1- Periodontal yönden S.S.'nin klinik özelliklerini belirlemek,
- 2- Parotis salyası akış hızını, sekretuar immünglobulinleri ve sekretuar sistemi incelemek,
- 3- Hücre sel immünite yönünden, periferik kan lenfosit gruplarını monoklonal antikorlar ile değerlendirmek,
- 4- Humoral immünite açısından, serum immünglobulin ve kompleman düzeylerini ölçmek, ve
- 5- Tükürük bezi ve diş eti örneklerinde doku düzeyindeki immünolojik değişiklikleri histopatolojik ve immünohistolojik yöntemlerle değerlendirerek, bulguları normal ve hastalıklı kontrollerle karşılaştırmak amacıyla planlanmıştır.

Çalışmamızın sonunda Sjögren sendromlu hastalarda hedef doku olan tükürük bezi iltihabı ve yıkımı ile periodontitisli hastalardaki doku yıkımının immünolojik mekanizmaları arasındaki benzerlik ve ayrıcalıklar irdelenerek periodontal hastalığın patogenezinine açıklık getirmeyi amaçladık.

## G E N E L B İ L G İ L E R

### İLTİHABİ PERİODONTAL HASTALIĞIN PATOGENEZİ :

İltihabi periodontal hastalık insanlarda ve hayvanlarda her zaman, bakteriler tarafından oluşturulur. Ancak, son yıllardaki çalışmalar, spesifik patojen olsa bile sadece bakterilerin varlığının hastalığın patogenezi- ni açıklamada yetersiz kaldığını, hastalığın yerleşebilmesi ve ilerleyebil- mesi için bakteri ve konakçı savunma sistemleri arasında çok önemli etkile- şimlerin olduğunu göstermektedir<sup>(57)</sup>. Bu etkileşimler çeşitli yollarla oluş- maktadır ;

a) Bazı bakteri ekzotoksinleri normal savunma mekanizmasının fonksi- yon görmesini engellemektedirler,

b) Bakteri komponentleri konakçının çeşitli hücreleri ve sistemleriyle etkileşime girerek akut inflamasyonu ve bir dizi immunopatolojik olayı başlatmakta ve bazı patolojik doku değişikliklerinin oluşmasına neden ol- maktadırlar ayrıca,

c) Endotoksin gibi bazı bakteri komponentleri direkt olarak kemik hü- crelerini etkileyerek rezorpsiyonun oluşmasına yol açmaktadırlar.

Konakçı savunma sistemi bir yönden mikrobiyal plağa karşı periodontal dokuları korurken, diğer bir yönden de kronik iltihabi olayda oluşan doku yıkımında aktif rol almaktadır. Hem doku yıkıcı hem de koruyucu mekanizma- lar aynı zamanda aktive olmaktadır. Konakçının iltihabi cevabının yarat- tığı yıkım, savunma mekanizmaları ile kazanılandan fazla olduğunda, doku kaybı meydana gelmektedir<sup>(9,57)</sup>.

Klinik olarak sağlıklı dişetin histolojik incelemesi yapıldığında birleşim epitelinde ve altındaki bağ dokusunda çok az sayıda lökosit izlenmesine karşın, iltihabi infiltrasyon görülmez<sup>(9,58)</sup>. Bakteriye plak birikimine bağlı olarak dişeti iltihabı artar ve plağın uzaklaştırılmasıyla dişeti normal histolojik görünümünü tekrar kazanır. Bu bulguları temel alarak yapılan çalışmalarda, plak birikimini izleyen 2-4 gün içinde akut eksudatif iltihabi bir cevabın oluşturduğu "başlangıç lezyonu" gözlenmiştir<sup>(56,58,69)</sup>. Olayın birleşim epiteli altında lokalize olduğu bu devrede gingival pleksus damarları genişlemiş ve çok sayıda polimorfonükleer (PMN) lökosit birleşim epiteli ve dişeti cebine göç etmiştir. Ayrıca aynı sahada çok az sayıda makrofaj ve antijenle uyarılarak blastik transformasyon gösteren lenfositler izlenebilir. Perivasküler kollajenin bir kısmı kaybolmuştur ve onun yerini serum proteinleri ile iltihabi hücreler almıştır. İltihabi periodontal hastalığın başlangıç lezyonunun dişeti cebi sahasında açığa çıkan kemotaktik faktörlere ve değişik antijenik uyarılara karşı bir cevap olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Deneysel olarak, dişeti bölgesine plak orijinli kemotaktik ürünlerin uygulanmasıyla, akut iltihabi olayın oluşturulabileceği gösterilmiştir<sup>(56)</sup>.

İnsanlarda "erken lezyon", başlangıç lezyonu sahasında ve plak birikimini takip eden 4-7 gün içinde, bağ dokusundaki yoğun bir lenfosit infiltrasyonu sonucu ortaya çıkar<sup>(58)</sup>. İltihabi hücre popülasyonunun % 75'ini bu lenfositler oluşturmaktadır. İmmünoblastlar tüm reaksiyon sahasında önemli sayıda bulunurken, plazma hücreleri sadece lezyonun çevresinde toplanmaktadır. Reaksiyon alanında, % 60-70 oranında kollajen kaybı olmaktadır. Bu safhadaki hücresel infiltrasyonun karakteri ve görülen doku değişiklikleri, erken lezyonun patogeneğinde hücresel immün yanıtın rol oynadığını göstermektedir<sup>(31,56,57,58)</sup>.

Plak birikimi başladıktan 2-3 hafta sonra bağ dokusunda plazma hücre-



lerinin hakim olduğu "yerleşmiş lezyon" meydana gelmektedir. Bu lezyon, o devrede dişeti cebi tabanında kalır ve dişeti bağ dokusunun sadece bir kısmını kapsar. Plazma hücreleri, derin bağ dokusu içinde damarların çevresinde ve kollajen lif demetlerinin arasında bulunurlar. Bu plazma hücrelerinin çoğunluğunun IgG, bir kısmının IgA ve çok azının da IgM içerdikleri gösterilmiştir. Kompleman - antijen - antikor kompleksleri de genellikle kan damarları çevresinde gözlenirler. Birleşim epiteli veya sulkus epiteli proliferasyon olarak kök yüzeyi boyunca migrasyona uğrayabilir. Bu aşamada cep formasyonu da görülebilir. Kemik kaybı henüz yoktur fakat kollajen kaybı devam etmektedir. PMN lökositler, makrofajlar ve diğer dişeti hücreleri tarafından salgılanan hidrolitik enzimler kollajen yıkımına neden olurlar. Bundan sonraki devrede kollajen sentezinin inhibisyonu da olaya katılır<sup>(45,56)</sup>.

Başlangıç, erken ve yerleşmiş lezyonlar stabildir ve fonksiyonel bir bozukluğa neden olmadan uzun süre aynı şekilde kalabilirler. Bu lezyonlarda doku harabiyeti ve kollajen kaybı olmakla beraber, olay serbest dişetin belli bir bölgesindedir ve sığ cep formasyonu bazı şartlarda görülebilir. Bu değişikliklere rağmen dişeti, altındaki bağ dokusunu ağız çevresinden ayıran bir engel gibi fonksiyon görmeye devam eder. Bu durum biyolojik açıdan başarılı bir konakçı savunma mekanizmasına örnek olarak gösterilebilir. Bazı vakalarda yerleşmiş lezyon, "ilerlemiş lezyon" haline dönüşebilir. Bu aşamada kronik fibrotik inflamasyonda akut eksudatif vaskülit belirtileri mevcuttur, ayrıca bu tabloya yoğun plazma hücresi, lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu eklenmiştir. İlerlemiş lezyonun klasik bulguları; patolojik cep formasyonu, cep epitelinde ülserasyon, eksüdasyon, alveoler kemikte harabiyet, periodontal ligament yıkımı, diş mobilitesi ve giderek gelişen diş kaybıdır. Bu tablo yerleşmiş ve klinik periodontitis tablosunu temsil etmektedir<sup>(25,56)</sup>.

Günümüzde, yerleşmiş lezyonun aktif hale geçerek, ilerlemiş lezyon

haline dönüşmesinin nedenleri bilinmemektedir. Bu iki lezyon hücresele birleşimleri, yapıları, boyutları ve lokalizasyonları açısından benzerlik göstermelerine rağmen, biyolojik etkinlikleri önemli derecede farklıdır. Stabil bir lezyonun aktif hale geçmesi immünopatolojik yıkım mekanizmalarının olaya karışması ile konakçının iltihabi cevabının yarattığı yıkım, savunma ile kazanılan dokudan fazla olmasına bağlanabilir<sup>(25,31)</sup>.

Periodontal hastalıkta immün sistemin doku seviyesinde yaptığı yıkımla ilgili üç esas mekanizmaları sürülmüştür;

(1) Plağa ait bakteriyel antijenlere özgül T-lenfosit cevabının oluşması ve dişeti dokusu içinde gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun meydana gelmesi,

(2) B-lenfositlerinin antijenik uyarımı sonucu çoğalması ve oluşturdukları özgül antikorlarla meydana gelen immün kompleksler (Ag-Ab) aracılığı ile kompleman sistemini aktivasyonu, ve

(3) Aktive olan T ve B hücreleri tarafından lenfokinlerin salınımı.

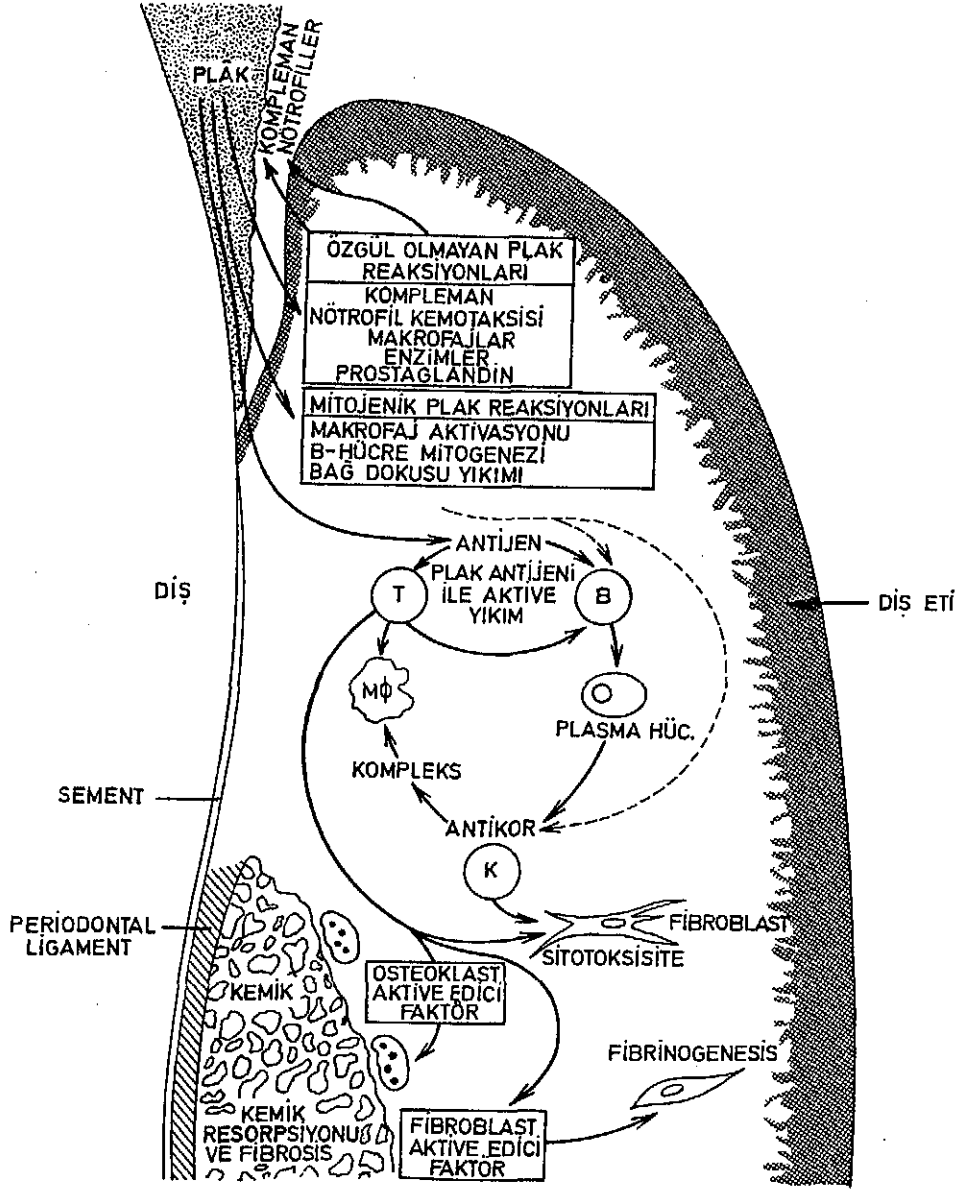
Lenfosit transformasyonu ile değerlendirilen gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları, periodontal hastalıkların patogeneğinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Orta derecede periodontal sorunu olan hastaların periferik kan lenfositleri, periodontal hastalığı bulunmayan veya minimal düzeyde periodontal problemi olan hastaların periferik kan lenfositlerine kıyasla, belli bir uyarıya karşı daha fazla reaksiyon göstermektedirler. Şiddetli periodontal harabiyeti olan hastalarda yapılan çalışmalarda ise, bu cevabın azaldığı görülmüştür. Bu gözlemler, şiddetli periodontal yıkımda hastalığı sınırlandıran bloke edici bazı faktörlerin varlığını göstermektedir<sup>(9,57,75)</sup>.

Deneyssel olarak oluşturulan gingivitis modellerinde de sağlıklı diş-

etinden gingival inflamasyonun erken safhalarına geçişte hücre sel immüni-  
tenin rolü gözlenmiştir. Plak birikimini takiben birçok bakteriye karşı blas-  
tojenik cevap artmış ancak, iyi bir ağız hijyeni sağlandıktan sonra bu ce-  
vabın azaldığı görülmüştür.<sup>(31,57)</sup>

İltihabi periodontal hastalıkta, yerleşmiş ve ilerlemiş lezyonlarda  
görülen iltihabi hücre popülasyonunun büyük bir kısmını B-lenfositleri ve  
plazma hücreleri oluştururlar. İlerlemiş lezyonda görülen lenfositlerin  
% 6'sından azı T-lenfositleridir ve reaksiyon sahasında çok az sayıda mak-  
rofaj görülür. Periodontal patojenlerin büyük kısmı, B-hücreleri üzerinde  
aktif mitojenik etki gösterebilen antijenik bölgeler taşımaktadırlar. Perio-  
dental hastalıklarda, lenfosit hücre aktivasyonu temelde poliklonal bir ce-  
vaptır ve lokal olarak oluşan immünglobulinler, aktive edici bakteriyel aja-  
nın antijenik determinantlarına çok az özgüllük gösterebilecekleri gibi hiç  
bir bölgeyi tanımayabilirler. Sonuçta bakteriyel ürünlerin hastalıklı doku-  
ya girebilmelerine rağmen, doku düzeyinde immünkomplekse ait kalıntılara  
nadiren rastlanır. Buna rağmen, kompleman sistemi iltihabın başlamasında  
ve ilerlemesinde önemli rol oynar, çünkü, PMN lökosit ve makrofajlardan salı-  
nan bazı enzimler ile bakteriyel ürünler direkt olarak alternatif yoldan  
kompleman aktivasyonunu başlatabilirler. Antijenler ile aktive olan T- ve B-  
lenfositlerinden değişik lenfokinlerin salınımının periodontal hastalığın  
patogenezinde oynadığı rol çok büyüktür.<sup>(26,56,57)</sup> (Şekil 1).

1972 yılında Gery ve ark. tarafından tanımlanan<sup>(54)</sup> ve son yıllarda  
biyolojik mediyatör olarak büyük önem kazanan, Interlökin-1 (IL-1) organiz-  
mada monosit ve makrofaj sistemi hücreleri başta olmak üzere, nötrofiller,  
fibroblastlar, epitel ve endotel hücreleri ile dendritik, mezenşimal ve  
glial hücrelerden salınmaktadır. IL-1'in periferik doku ve hücreler üzerine  
değişik etkileri mevcut olup, bugün açıklık kazanmış olan temel etkileri



Şekil 1. Periodontal Hastalığın Patogenezi.

arasında, kemikte osteoklast aktivitesinde artış, T-hücrelerinin blastojenik cevabında yükselme, endotel, epitel ve fibroblast hücrelerinde proliferasyon, kas ve kıkırdak dokusunda yıkım ve ateşin yükselmesine neden olması sayılabilir. Günümüzde özellikle ateş yapıcı madde (pyrogen) ve osteoklast aktive - edici (OAF) faktörler, yeni adıyla "IL-1" olarak ifade edilmektedir.

Daha önceleri, T-hücre orijinli mitojenik faktörler olarak bilinen timosit mitojenik faktör (TMF), timosit aktivatör faktör (TAF), Killer-helper faktör (KHF), timosit uyarıcı faktör (TSF) veya lenfosit mitojenik faktör (LMF), 1979 yılındaki ikinci uluslararası Lenfokin toplantısında değiştirilerek lenfositten oluşan bu mitojenik faktörlere Interlökin-2 (IL-2) adı verilmiştir. IL-2, lenfositlerden spontan olarak veya lektin ile antijenlerin uyarımı sonucu salgılanmaktadır<sup>(17)</sup>.

T-hücre proliferasyonu ile monosit-makrofaj tipi hücre artımının belirgin olduğu periodontal hastalıklı dokularda, değindiğimiz immünolojik mekanizmalar sonucu özellikle endotel hücreleri ve makrofaj sistem hücreleri tarafından lokal IL-1 salgılanması, doku düzeyinde belirgin olarak arttığı kuvvetle düşünülmektedir. Çünkü, daha önceleri OAF olarak bilinen, IL-1'in lokal inflamasyon ve immünolojik olaylarda arttığı gösterilmiş olup ayrıca, bu biyolojik mediyatörün osteoklast hücreleri üzerine olan etkileri dolayısıyla, alveoler kemik harabiyetinin gelişiminde primer rol oynadığına işaret eden birçok çalışma yayınlanmıştır<sup>(26,88)</sup>.

Son yıllarda T-hücreleri, B-hücreleri ve monosit-makrofaj sistemi arasındaki hücresel iletişimlerde yer alan IL-1 ve IL-2 gibi yeni tanımlanan ve büyük biyolojik öneme sahip mediyatörlerin inflamatuvar olaylardaki yerinin gösterilmesi, bu konuda bir prototip teşkil eden iltihabi periodontal hastalığın immunopatogenezini anlamamıza yardım edecektir.

## İMMÜNOREGULATUVAR SİSTEM

İmmün sistem, mikroorganizmalara, malign hücrelere veya uygun olmayan otoimmün bir fenomene karşı organizmanın savunma mekanizmalarını içeren kompleks bir sistemdir. Embriyolojik, anatomik, fenotipik özellikleri ve fonksiyonları yönünden immün sistemi oluşturan hücreler üç temel grupta incelenebilir :

1. T veya timustan köken alan lenfositlerin oluşturduğu hücre sel immün sistem,

2. B veya kuşlarda 'Bursa of Fabricius', memelilerde ise buna eşdeğer olan organlardan (kemik iliği) köken alan B-lenfositleri ve B-lenfositlerinin oluşturduğu humoral immün sistem,

3. Fagositik monosit / makrofaj sistemi (dolaşımdaki monositler ve sabit doku histiyositleri).

Bu hücrelerin hepsi ortak bir ana hücreden, yani kemik iliği hematopoietik stem hücrelerinden köken alırlar. Stem hücreleri, ilk olarak sarı kesenin kan adalarından gelişerek, gebelik süresince karaciğer, dalak ve kemik iliğine göç ederek bu organlardaki spesifik fonksiyonel farklılaşma ve matürasyon gösterip yüzey antijen değişimine uğrarlar.

İnsan lenfositlerinin ve monositlerinin farklılaşmasındaki ayrı safhalar hücre yüzey işaretleri ve intrasellüler enzimler kullanılarak belirlenebilir.

Bütün bu hücre sistemleri birbirlerine son derece bağlı olmalarına rağmen fonksiyonları farklıdır.

T-hücreleri immün sistemin hücre sel kolunu oluştururlar.

B-hücreleri humoral immün sistemi oluşturur, antikor salgılayan plazma hücreleri haline dönüşürler.

Bu iki hücre sistemine ek olarak "aksesuar hücreler" immün cevabın oluşumunda önemli bir yer almaktadır.

Bir antijene karşı immün cevap oluşabilmesi T ve B lenfositleri, monositler ve MHC (major histocompatibility complex) ürünleri arasındaki kompleks bir reaksiyon serisinin gerçekleşmesine bağlıdır. Bunlardan başka hücre tipleri de, immün cevabın oluşumuna katılabilmektedir. Bu hücreler arasında dendritik hücreler, NK (Natural killer) hücreleri, Langerhans hücreleri ve endotelial hücreler bulunmaktadır<sup>(38)</sup>.

#### T - l e n f o s i t l e r i :

T lenfositleri kemik iliğinden köken alarak, farklılaşma ve olgunlaşmalarını timusta geçirirler. Pre-timik (T-hücreleri öncülleri) hücreler hakkında bilinenler çok azdır. Çok potansiyelli (multipotent) hematopoietik stem hücreleri ve lenfoid stem hücrelerinin T-hücresi öncülleri olabilecekleri ileri sürülmüştür<sup>(32)</sup>.

Timus gelişimi fetal hayatın 8.haftasında olmaktadır. Bundan sonra fetal karaciğer ve kemik iliğinden öncül (prekürsör) hücreleri toplamağa başlar. Bu hücreler, timositlere ait olan bazı yüzey antijenlerini ve tüm T-hücrelerinde bulunan diğer antijenleri kazanmak üzere süratle teşvik edilirler<sup>(38)</sup>.

T-hücrelerinin timusta geçirdikleri farklılaşma safhaları iki ayrı bölge ile ilişkilidir. Korteks ve medulla bölgelerinin her ikisinden de periferik kana geçiş olduğu düşünülmektedir<sup>(63)</sup>.

Timik epitelyumla direkt kontakt ve muhtemelen bazı timik hormonların etkisiyle (thymosin ve thymopoietin) farklılaşma ilerler, bu arada Ia antijeni (immun associated antigen), TdT (terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi), peanut agglütinin, Fc reseptörleri (immünglobulin molekülünün Fc kısmına karşı olan reseptör) ve T-hücrelerine spesifik bir seri yüzey işaretlerini kazanırlar<sup>(38)</sup> (Tablo 1).

Tablo 1 : T lenfositleri farklılaşması ve olgunlaşması sırasındaki antijen, enzim ve reseptör değişiklikleri.

Yerleşim Bölgesi	Gelişim Evresi	İşaret
Sarı kese ve fetal karaciğer	Stem hücresi	Koloni oluşturan ünite
Kemik iliği, kortikal timus	Protimosit	Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) <sup>+</sup> Ia <sup>+</sup> Peanut agglütinin <sup>+</sup>
Medüller timus	Timosit	TdT <sup>+</sup> Peanut agglütinin <sup>+</sup> E rozet <sup>+</sup> C3 +/- Phytohemagglutinine mitojenik cevap <sup>+</sup>
Lenfoid dokular, periferel kan	Olgun T hücresi	E <sup>+</sup> -rozet Concanavalin A'ya mitojenik cevap <sup>+</sup> Fc reseptör <sup>+</sup> Baskılayıcı ve yardımcı yüzey antijen fenotipleri

T-hücrelerinin gelişimi dalak ve periferel lenf düğümlerini içeren diğer organlara yerleşmeleriyle, fetal hayatın 16-18. haftalarına doğru tamamlanır<sup>(38)</sup>.



T-lenfositleri bu organlarda T-hücrelerine bağımlı bölgelere yerleşme gösterirler (lenf nodu parakorteksi gibi). Bu bölgelerde uzun yaşam süresine sahip bir populasyon oluşturarak, yeniden dolaşıma katılırlar<sup>(32)</sup>.

T-lenfositleri in vitro şartlarda koyun eritrositleriyle rozet oluşturma yetenekleri ile belirlenebilmektedirler (E<sup>+</sup>-Rozet testi). T-lenfositlerinin klasik işareti olan koyun eritrosit reseptörü, T hücre gelişiminin timus içindeki safhasının erken dönemlerinde gösterilebilir<sup>(14)</sup>.

Bu testten başka T-lenfositlerini tanımlamada T-hücrelerine özgül anti-serumlar ve anti-T monoklonal antikorları da kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar kullanılarak, hücre yüzey antijenlerindeki değişikliklere göre T-hücre gelişiminin 3 ayrı safhası belirlenmiştir<sup>(63)</sup>.

EVRE I : Erken timositler, timik T hücrelerinin % 10'unu oluşturur. Koyun eritrosit reseptörü ve T1, T9, T10 monoklonal antikorları tarafından tanınan antijenleri vardır. Bu işaretlerin hiçbiri T hücre serisine özgül değildir.

EVRE II : Ara (intermediate) timositler, timositlerin büyük bir kısmını içerir. Yardımcı/indükleyici T-lenfosit (T4) ve baskılayıcı/sitotoksik T-lenfosit (T8) fenotiplerinin her ikisini birden gösteren lenfositler bu gruptadır. Bu hücrelerin daha ileri farklılaşmalarıyla olgun timositler (EVRE III) gelişme gösterirler. Farklı alt grupları içerirler. Diğer antijenlere ek olarak Pan-T antijenini kazanırlar. Erken dönemde görülen bazı antijenleri de kaybederler.

Birçok hastalıklarda yardımcı T-lenfositlerinin, baskılayıcı T-lenfositlere oranında değişiklikler olmaktadır.

T-lenfositlerinin fonksiyonları olarak gecikmiş tip hipersensitivite

reaksiyonları, virus ve mantar enfeksiyonlarına karşı direnç kazanılması, tümör hücrelerine karşı olan bağışık cevabın regülasyonu, greftlere karşı organizmanın reaksiyonu ve graft-versus-host reaksiyonları (GVH) sayılabilir<sup>(35)</sup>.

#### B - l e n f o s i t l e r i :

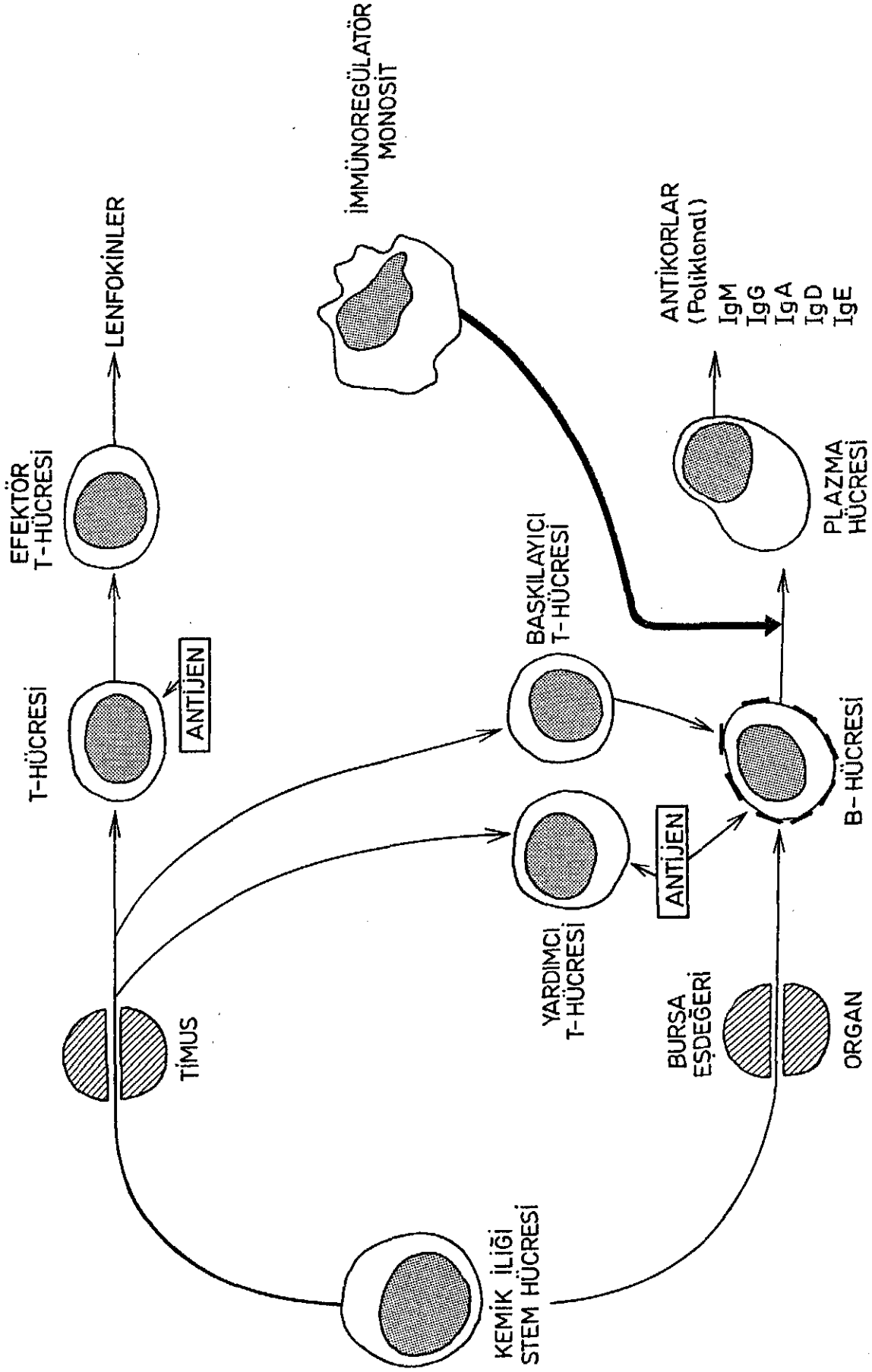
Humoral immün sistemin temel hücresini oluşturan B-lenfositleri, antikor sentezleyen olgun plazma hücrelerinin öncüleri olarak kabul edilmektedir<sup>(35,38)</sup>.

B-lenfositleri yüzey membranlarındaki immünoglobulin molekülünün varlığıyla belirlenirler, bu molekül antijen reseptörü olarak görev yapmaktadır ve fetal karaciğer ve kemik iliğindeki antijenden bağımsız farklılaşma işleminin sonunda kazanılır<sup>(14,38)</sup>. Yüzey membran immünoglobulini (SmIg) çeşitli immüoglobulin (Ig) sınıflarına karşı olan polivalan ve monovalan antiserumlar kullanılarak gösterilebilir.

SmIg molekülünün B-lenfositleri yüzeyinde gösterilmesi, B-hücresinin antijenle karşılaştığını, yani olgunlaşmasının ikinci safhasını (antijene bağımlı) gösterir. Pre-B hücreleri hafif zincir oluşumu ve plazma membranlarında IgM molekülünün ortaya çıkmasıyla B hücrelerine dönüşürler<sup>(14)</sup> (Şekil 2).

Pre-B ve B-hücreleri komplemanın C3 komponenti ve immünoglobulin molekülünün Fc parçasına karşı reseptörler içerirler, ayrıca B-hücre yüzeyinde Epstein-Barr virusu, fare eritrositleri, insülin hormonu için reseptörler ve monoklonal antikorlar ile tanıyan B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> ve B<sub>4</sub> antijenleri de bulunmaktadır<sup>(38)</sup>.

Yüzey Ig molekülünün ortaya çıkmasını takiben ve antijenik stimülasyondan önce B-hücreleri diğer SmIg izotipler üretmek üzere Ig sınıfı yönünden



Şekil 2. İmmünoregülatuar Sistem.

değişiklik gösterebilir. B-hücreleri uygun antijenle karşıladıktan sonra T-lenfositlerinin yardımıyla klonal bir gelişme göstererek, yüzey Ig molekülü ile aynı özgüllükte Ig molekülleri sentez etmeye başlar. Bu işlem aktif olarak sekretuar plazma hücrelerinin farklılaşmalarına yol açar, bu hücreler ortalama 2-3 günlük bir yaşam süresine sahiptirler. Fakat bu klondaki bazı hücreler "hafıza hücreleri" denilen oldukça uzun yaşam süreli olan lenfositlere dönüşürler ve lenfoid dokuların germinal merkezlerinde yerleşirler(14,49).

İnsan B-lenfositlerinin yüzeyinde Ia antijeni denilen, immünite ile ilişkili antijenlerin bulunduğu belirlenmiştir. Yalnız B hücrelerine özgül değildir. Ia antijenleri ve HLA-D lokusu gen ürünleri arasında yakın bir ilişki olduğu saptanmıştır. HLA-D ile ilişkili veya HLA-DR terimi bazen insan hücreleri arasındaki Ia antijenin varlığını göstermek için kullanılmaktadır(4,60).

Son yıllarda hibridoma teknolojisinin geliştirilmesi ile B-hücrelerine spesifik monoklonal antikorlar üretilebilmektedir(20,38) (Tablo 2).

Tablo 2 : B-lenfositlerinin farklı gelişim evrelerinde kazandıkları işaretler.

B-lenfosit Gelişim Evreleri	Klasik işaretler				Monoklonal Antikorlar			
	SmIg	cIg	tdT	Ia	cALLA	B1	B2	B4
Lenfosit stem hücresi	-	-	+	+	-	-	-	+
Pre-pre-B hücresi	-	-	+	+	+	-	-	+
Pre-B hücresi	-	+μ	+	+	+	+	-	+
Erken B hücresi	+	-	-	+	+	+	-	+
Ara B hücresi	+	-	-	+	-	+	+	+
Olgun B hücresi	+	-	-	+	-	+	+/-	+
Plazmasitoid	+	-	-	+	-	+	-	+
Plazma hücresi	+/-	+	-	+/-	-	+	-	-

SmIg : Yüzey membran immünoglobulini  
cIg : Sitoplazmik immünoglobulin  
TdT : Terminal deoksiniükleotidil transferaz enzimi  
cALLA : Common akut lenfoblastik lösemi antijeni

B-lenfositleri, T-lenfositlerine göre daha fazla miktarda yüzey uzantılarına sahiptirler. Ayrıca T-lenfositlerinden farklı bir doku ve organ dağılımı gösterirler<sup>(38)</sup> (Tablo 3).

Tablo 3 : İnsan dokularındaki lenfosit dağılımı.

Dokular	(~ %)	
	T-lenfosit	B-lenfosit
Periferik kan	55-75	15-30
Kemik iliği	<25	>75
Lenf	>75	<25
Lenf düğümü	75	25
Dalak	50	50
Bademcik	50	50
Timus	>75	<25

#### Üçüncü Popülasyon Hücreleri :

Lenfositlerin üçüncü popülasyonunu oluşturan bu hücreler yüzeylerinde T ve B-lenfositlerine özgül olan işaretleri taşımazlar ve periferik kan mononükleer hücrelerinin % 5-20 kadarını oluştururlar. Fagositik ve adherent değildirler, morfolojik olarak lenfoid hücre özelliği taşırlar<sup>(19)</sup>.

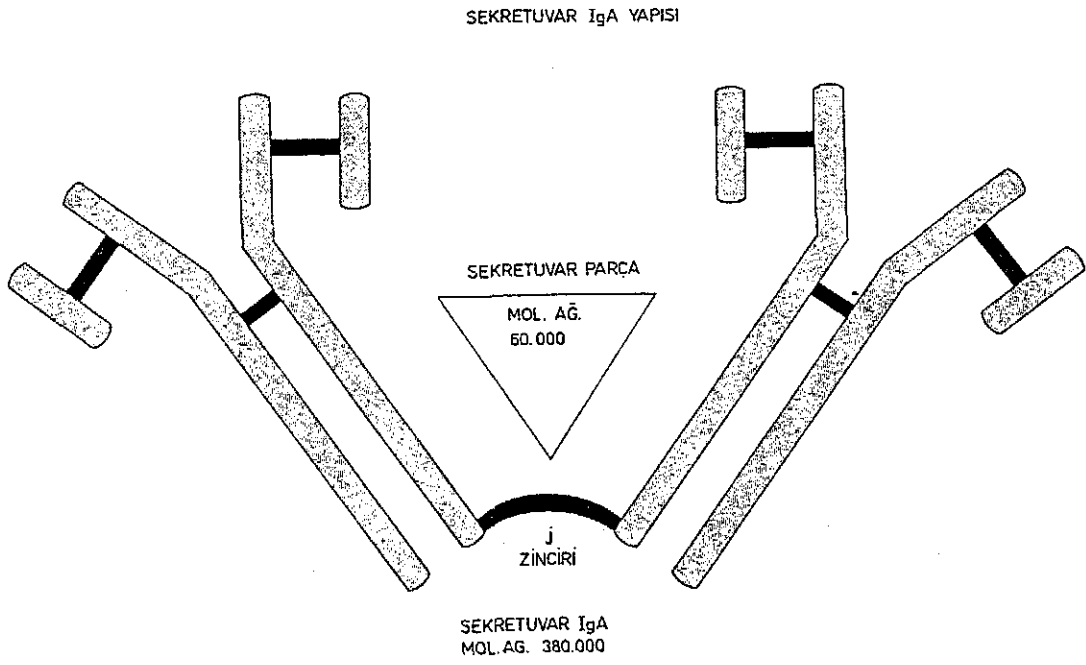
## SEKRETUVAR IMMUNGLOBULİN A

İnsanda immünglobulin A üç şekilde bulunmaktadır : 1- Monomer immünglobulin A (M.A.: 160.000 dalton); plazma IgA düzeyinin büyük bir kısmı bu şekile aittir. 2- Polimerik şekil : İki molekül IgA'nın "j" (M.A.: 20.000 dalton) zinciri ile birleşmesinden oluşur ve plazma hücreleri tarafından yapılır. 3- Sekretuar IgA (M.A.: 390.000 dalton); tükürük, gözyaşı, kollos-turum ve respiratuvar, intestinal, genitoüriner sekresyonlardaki immünglobulinlerin en belirgin olanıdır. Polimer şeklin sekretuar komponent ile birleşmesinden oluşur<sup>(73)</sup> (Şekil 3).

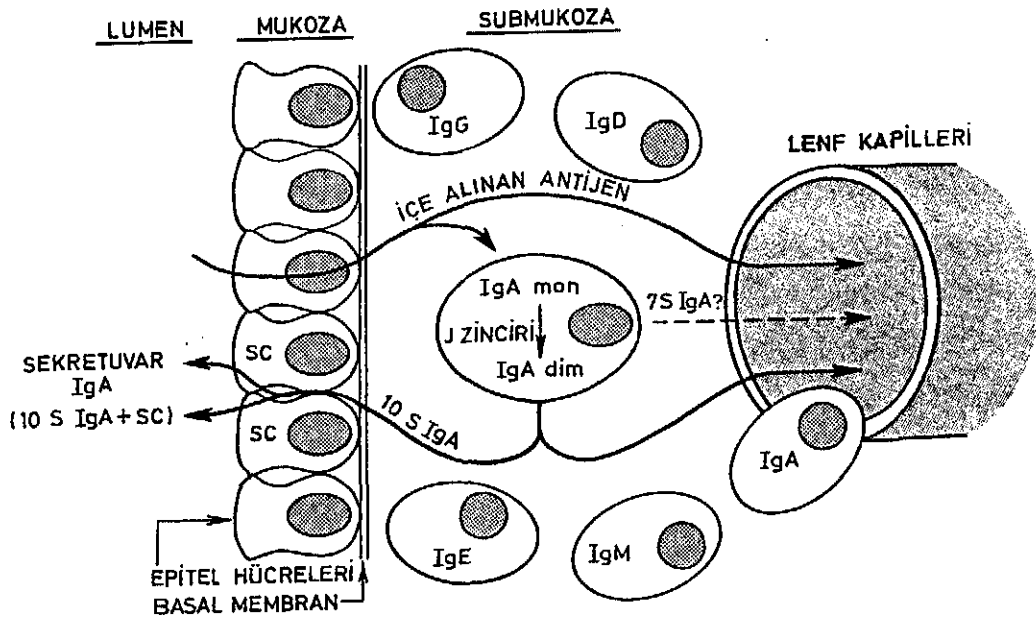
Sekresyonlardaki IgA antikorları başlıca subepitelyal mukozada veya dış salgı bezlerindeki plazma hücrelerinde yapılır. Bu hücrelere sentezlenen polimer şekil buradan epitelyal dokuya diffüzyon yolu ile geçer ve sekretuar komponent (Sc, M.Ag.: 71.000 dalton) ile birleşerek, sekretuar immünglobulin-A yapısını aldıktan sonra lümeneye salgılanır. Sekretuar komponentin sIgA'nın salgılanmasındaki rolü yanında, sIgA'nın barsak lümeninde bulunan pankreatik proteaz enzimine karşı dayanıklılığını da artırdığı sanılmaktadır (Şekil 4).

Solunum sistemi ve gastrointestinal sistemdeki IgA yapımından sorumlu olan hücreler, antijenik bir uyarı ile uyarıldıklarında lokal olarak proliferasyona uğrarlar ve koruyucu IgA antikorları salgırlar. sIgA'nın virusu nötralize ettiği ve virusun mukozal dokuya geçişini önlediği gösterilmiştir. sIgA antikor düzeyleri; polio, influenza, mikrovirus, rinovirus enfeksiyonlarına karşı klinik direnci serum IgA düzeylerine göre daha iyi sağlamaktadır<sup>(71,75)</sup>.

Salyadaki IgA'nın oral immünolojik savunma mekanizmasındaki rolünün büyük olması, antikorun ağız boşluğundaki predominansına, antibakteriyel etkisine, proteolizise olan direncine ve diş yüzeylerini bakteriyel plaktan koruyucu etkisine bağlıdır<sup>(9,71,75)</sup>.



Şekil 3. Sekretuvar IgA'nın Moleküler Yapısı.



Şekil 4. Sekretuvar IgA'nın Sentezi.

Yapılan çalışmalarda, lokal olarak sentezlenen ve salgılanan IgA antikorlarının, mikroorganizmaların muköz membranlara ve diş yüzeylerine yapışmasını, onların agregasyonunu sağlayarak engellediği ve fagositoz için elverişli hale getirdiği gösterilmiştir. Bu nedenle sIgA "bloke edici antikor" olarak kabul edilir. sIgA dental plak formasyonunu bozarak, antijenik yükü azaltır ve aynı zamanda bakteriyel ürünler ile antijenlerin mukozal yüzeylere tutunmalarını bloke ederek, dişeti dokusuna penetrasyonlarını ve ardından T ve B hücrelerinin sensitizasyonunu engellemektedir<sup>(71)</sup>.

Periodontal hastalığın şiddeti ile stimüle edilmiş ve edilmemiş total salya IgA düzeyleri arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir<sup>(29,40)</sup>. Bu olayda, periodontitisli hastaların tükürük bezlerindeki IgA salgılayan immün sistem hücrelerinin stimülasyonu, hastalığa bağlı olarak artmış olan plak antijenitesi ile veya salya akış hızındaki farklılıkla açıklanır<sup>(29,40,71)</sup>. Total salyadaki yükselmiş olan IgA düzeyi periodontal inflamasyona bağlı olarak artış gösteren dişeti cebi sıvısından da ileri gelebilir<sup>(71,87)</sup>.

Stimüle edilmemiş parotis salya IgA konsantrasyonu ve sekresyon düzeyi ile periodontal inflamasyonun şiddeti arasındaki ilişki halen tartışmalıdır. Chandler ve arkadaşları bu antikorun sekresyonunun, periodontal hastalıktan bağımsız olduğunu savunurken, Ørstavik ve arkadaşları ise, aksine, periodontal indeks skorlarının, parotis IgA sekresyon düzeyi ve konsantrasyonu ile pozitif olarak bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir<sup>(10,55)</sup>.



## MONOKLONAL ANTİKORLAR

Organizma, antijen özelliği taşıyan yabancı bir madde ile karşılaştığı zaman, plazma hücreleri tarafından antijenin üzerindeki bölgelere özgül bağlanma gösterebilen immünglobulin tabiatında antikorlar sentezleyerek humoral immün cevabı oluşturur. Antikorlar antijenlere belirli bölgelerden bağlanarak bir düzen içerisinde yabancı maddelerin eliminasyonunu sağlamaktadırlar.

Antijene karşı oluşan antikor cevabı genelde heterojendir. İnsan ve fare türlerinde dalaktaki milyonlarca plazma öncül hücreleri, B-lenfosit klonları, aynı stem hücreden kaynaklanmalarına rağmen değişik antijenik bölgelere (determinantlara) karşı ayrı özelliklerde antikorlar sentezleyebilmektedir. Bu nedenlerle, immünize edilmiş bir deney hayvanının serumunda değişik tipte ve çok sayıda antikor birarada bulunabilmektedir (Bu sentezlenen antikorların karışıklığı, miktarı ve özgüllüğü immünize edilen hayvanlar arasında farklılık gösterebilmektedir). Tek tip özgüllük gösteren antikor yapıcı hücrelerin, diğer antikor yapıcı hücrelerden ayrılması ve kültürde üretilmesi ile sadece belirli bir antijenik bölgeyi tanıyan antikorların in vitro şartlarda elde edilmesi uzun yıllar mümkün olamamıştır. B-lenfositlerinden dönüşen plazma hücrelerinin ise kültür şartlarında uzun süre devam ettirilmesi sağlanamamıştır<sup>(34)</sup>.

1973 yılında Cesar Milstein, Cotton ve Secher ile çalışırken ilk defa in vitro şartlarda fare myeloma hücre kültürlerinden spontan mutasyon yapmayı başarmıştır. Daha sonra 1975 yılında Cesar Milstein'in Cambridge Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda George Köhler ilk kez, antijen ile immünize edilmiş farelerden elde edilen dalak hücreleri ile mutant fare miyeloma hücrelerini birleştirerek (füzyon) monoklonal antikor sentezleyen "Hybridoma-Hybrid-Miyeloma" tekniğini tanımlamıştır<sup>(37)</sup>. Böylece B-lenfosit-

lerinin özgül antikor yapıcı özelliklerini, miyeloma hücrelerinin ise ölümsüz olma özelliğini kazanan "hibrid-melezlerin" özel şartlarda üretildikleri takdirde tek bir antijenik determinanta karşı çok yüksek özgüllükte ve sonsuz miktarlarda monoklonal tipte antikor sentezleyebilecekleri gösterilmiştir. Hibridoma teknolojisinin ortaya konulması poliklonal antikorların yarattığı problemleri azalttığı gibi, miktar ve duyarlılık yönünden çok daha verimli olduğu için immünoloji ve biyoloji sahalarındaki araştırmalara yeni bir boyut kazandırmıştır<sup>(34)</sup>.

#### M o n o k l o n a l A n t i k o r l a r ı n Ü r e t i l m e s i :

Hibrid hücre kültürlerinin oluşturulmasında temel olarak iki hücre çok yakın temas haline getirilir ve membranlarının füzyonu sağlanacak olursa, füzyondan sonra oluşacak melez hücrenin ilk devresinde her iki çekirdek de bulunmaktadır. Bu çekirdeklerin füzyona uğramasıyla her iki hücreden gelen genetik bilgileri taşıyan tek bir çekirdek ortaya çıkmaktadır. Hibridoma teknolojisinde, antikor salan fare dalak hücrelerinin, mutant fare miyeloma hücreleriyle birleşmesinden fare dalak hücreleriyle antikor özgüllüğü, miyeloma hücreleri ile de sonsuz miktarlarda üretim sağlanmaktadır<sup>(34)</sup>.

Monoklonal antikorların hibridoma teknolojisiyle üretilmesinde ilk olarak, fare (genellikle BALB-C); antikor üretilecek antijenle, enjeksiyon yoluya immünize edilir. Daha sonra bu farenin dalağı çıkarılarak hücre süspansiyonu hazırlanır. Burada, antijene cevap olarak proliferen olan B-hücreleri ve plazma hücreleri bulunmaktadır ki füzyonda görev alacak temel hücre grubunu oluştururlar. Mutant fare miyeloma hücreleri genellikle sekresyon yapmayan tipte uzun süreli in vitro hücre kültürlerinden elde edilmektedir. İmmünize fare dalak hücreleri ile mutant miyeloma hücreleri polyethylene glycol (PEG) veya Sendai virusu kullanılarak füzyona sokulduktan sonra "microtiter" tipinde hücre kültür plaklarına ekim yapılır. Hücreler HAT adı

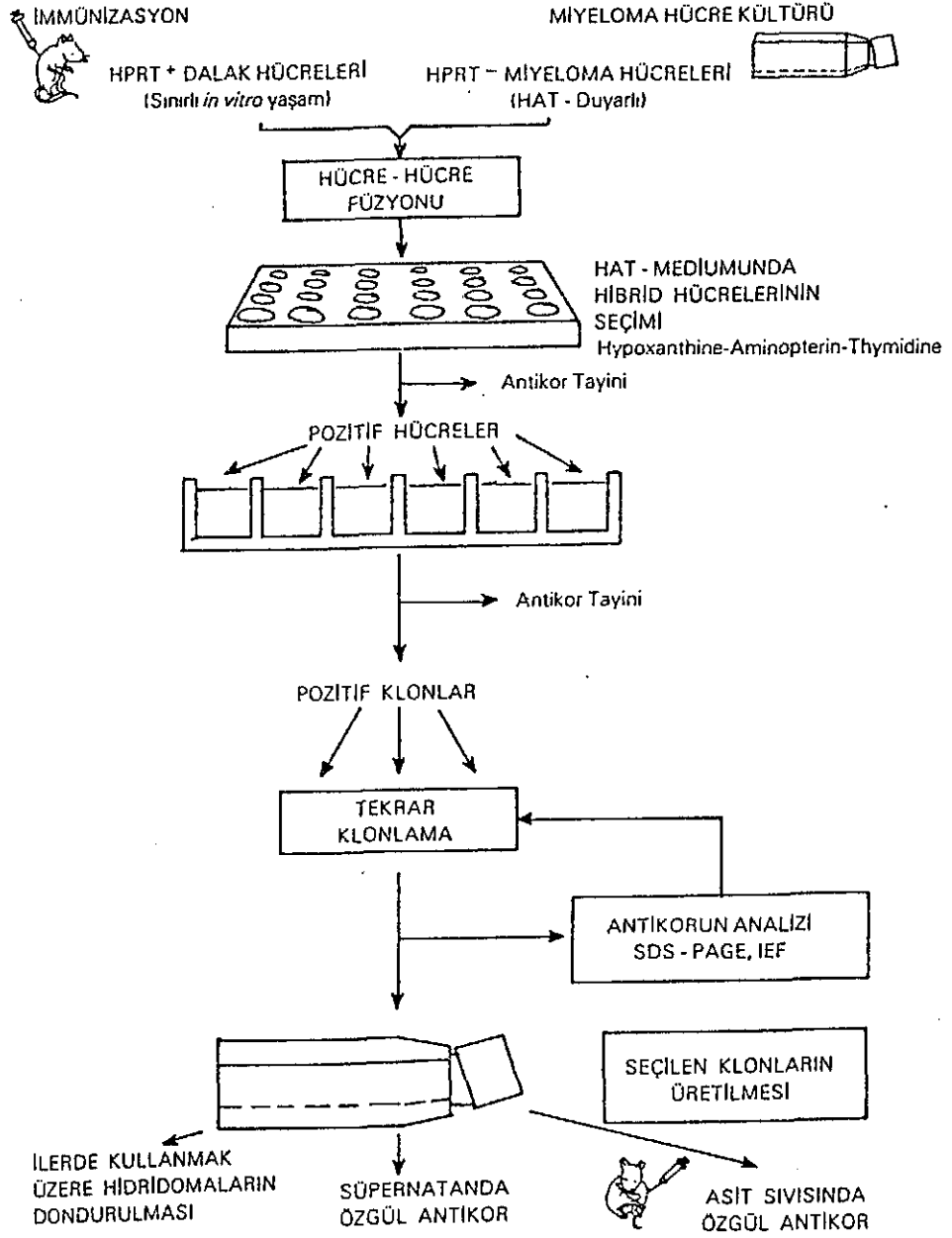
verilen (hypoxantine, aminopterin ve thymidine) özel seçici bir ortam içinde saklanır. Bu ortamda HPRT (hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase) enzimi taşımayan (HPRT negatif) hibridleşmemiş mutant miyeloma hücreleri ve HPRT pozitif olan füzyona girmemiş B-lenfositleri kısa sürede ölürlür. Normal HPRT pozitif dalak B-lenfositleri ve hibridler ise üreyebilmektedir. HAT ortamında iki üç hafta içerisinde başarılı füzyon gösteren hücreler kültür plaklarının kuyucuklarında makroskopik olarak da görülebilen hibridleri oluştururlar. Daha sonra bu kuyudaki süpernatantlar antikor aktivitesi yönünden değerlendirilirler. Değerlendirmede solid faz radioimmunoassay veya ELISA yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(34)</sup>.

Istenen özgüllükte monoklonal antikor sentezlediği tarama yöntemi ile belirlenen hibridler, birçok pasaj yapılarak, değişik plaklarda daha geniş hacimlerde üretimi yapılır. Monoklonal antikorlar bundan başka peritonlarına hibridoma enjekte edilmiş BALB/C farelerinin asit oluşumundan veya deri altına hibridoma yerleştirilmiş farelerin serumundan elde edilebilir (Şekil 5).

#### Monoklonal Antikorların Uygulama Alanları :

Monoklonal antikorlar günümüzde biyolojik bilimlerin çeşitli sahalarında kullanılmaktadır. Çok geniş uygulama sahası bulan bu teknolojinin özellikle hastalıkların tanı, patogenez ve tedavilerinde büyük yararlar sağlayacağına inanılmaktadır<sup>(34)</sup>.

Bütün T-lenfositlerini tanıyan "Pan-T" monoklonal antikorları için (OKT1, OKT3, Leu-1, T101, Leu-4, A50 gibi), T-lenfositleri üzerindeki E-reseptörü için (OKT11), yardımcı T-lenfositleri için (OKT4, Leu-3a), baskılayıcı T-lenfositleri için (OKT8, OKT5, Leu-2), B-lenfositleri için



Şekil 5 : Monoklonal antikor elde edilmesinde kullanılan standart tekniğin şematik görünümü.

(B1-BA-1) ve insan monositleri için (OKM1, D5, D6) üretilmiş olan monoklonal antikolar yaygın bir kullanım alanı bulmuştur<sup>(20)</sup>. Birçok ticari firma tarafından bu amaçla üretilen monoklonal antikolar, bilhassa normal ve malign neoplastik lenfositlerin hücre yüzey özelliklerinin tanınmasında, T ve B-lenfositlerine ait farklılaşma antijenlerinin belirlenmesinde büyük kolaylıklar sağlamıştır. Ayrıca akut lösemi, lenfoma ve diğer tip lenfoproliferatif hastalıklarda hücre fenotipi tayininde de monoklonal antikolar-  
dan yararlanılmaktadır<sup>(3,70)</sup> (Tablo 4).

Monoklonal antikoların diğer kullanım alanları tümörlerin serolojik taraması, immünohistolojik tanısı, in vivo yerleşimlerinin gösterilmesi, tümör immünoterapisi ve değişik serolojik tekniklerdir<sup>(27)</sup>.

Tablo 4 : Mononükleer hücrelere karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar.

Ortho <sup>*</sup>	Coulter <sup>†</sup>	Becton Dickinson <sup>‡</sup>	Antijen	Reaktiviteleri
OKT1	T1 <sub>A</sub>	Leu 1	T1	Timus ve periferik T hücreleri
OKT <sub>3</sub>	T3 <sub>A</sub>	Leu 4	T3	Periferik T hücreleri
OKT11	T11	Leu 5	T11	Timus ve periferik T hücreleri (koyun eritrosit reseptörü)
OKT4	T4 <sub>A</sub>	Leu 3a,b	T4	Yardımcı-indükleyici T hücreleri
OKT8	T8 <sub>A</sub>	Leu 2a,b	T8	Sitotoksik-baskılayıcı T hücreleri
OKT5				T hücreleri
OKT9		Transferrin	T9	Erken timositler
OKT6		Leu 6	T6	Common timositler
OKT10			T10	Pan-timositler, erken hematopoietik stem hücreleri, aktive olmuş T ve B hücreleri
OKB7	B1	Leu 14	B1	B hücreleri ve öncülleri
	B2	Leu 12	B2	B hücreleri ve öncülleri
	B4		B4	B hücreleri ve öncülleri
	J5	cALLA	J5 (cALLA)	Pre-B hücreleri
	PCA-1		PCA-1	Plazma hücreleri
		Leu 7	HNK	Null hücreler
		Leu 11a,b		Null hücreler
OKM1	M01	Leu 15	Mo1	Monositler, null hücreler
	M02	Leu M1, Leu M2, Mo2 Leu M3		Monositler
OKT1a1	I2	HLA-DR	Ia-benzeri	B hücreleri, aktive edilmiş T hücreleri, monositler, null hücreler

\* Ortho Diagnostic Systems, Inc, Roritan, NJ

† Coulter Immunology, Hialeah, FL

‡ Becton-Dickinson Monoclonal Center, Inc., Mountainview, CA

## SJÖGREN SENDROMU

İlk defa İsveçli bir oftalmolog olan Henrik Sjögren tarafından 1933 yılında tanımlanan Sjögren sendromu (S.S.), kronik, inflamatuvar otoimmün bir hastalık olup, ekzokrin bezlerin inflamasyonu, hipergammaglobulinemi, serumda yüksek titrede çeşitli otoantikörlerin varlığı, immünregülasyona ait bozukluklar ve lenfoproliferatif hastalara yatkınlıkla karakterizedir (22,48,72).

Bu sendromun üç esas belirtisi; keratokonjunktivitis sikka, xerostomia ve sıklıkla romatoid artrit olmak üzere iltihabi bir bağ dokusu hastalığının varlığıdır. Bu üç klinik bulgudan ikisinin varlığı tanı için yeterlidir. Sjögren sendromu klinik özellikleri yönünden primer ve sekonder tip olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Primer S.S. olarak sınıflandırılan hastalarda, ağız ve göz kuruluğuna ilave olarak, bir kısmında tiroidit, pnömonit veya intersitisyel nefrit gibi ekstraplandüler belirtiler görülebilmektedir. Sekonder S.S. tanısı konulan hastalarda, Primer S.S.'da görülen sikka kompleksine ilaveten romatoid artrit, sistemik lupus eritematosus, progresif sistemik sklerozis, polimiyozit ve sarkoidoz gibi çeşitli kronik iltihabi bağ dokusu hastalıkları izlenmektedir (22,82,83,84).

S.S.'una göz hastalığı olan her 2000 kişiden birinde rastlanır ve hastalığın görülme sıklığı kadınlarda erkeklere kıyasla dokuz kat daha fazladır<sup>(72)</sup>. Bu sendrom en çok 40-60 yaşları arasında gözlenmesine rağmen, çocuklarda ve ileri yaşlılarda da rapor edilmiştir<sup>(12,72)</sup>.

Keratokonjunktivitis sikka, subkonjunktival bez sekresyonundaki azalmanın etkisiyle korneal ve bulbar konjunktival epitelin destrüksiyonuna bağlı olarak gelişir. Gözlerde yanma, batma, kaşıntı, yabancı cisim hassasiyeti ve fotosensitivite gibi belirtiler vardır. Hastalık, gözyaşı miktarında

azalma, korneal ve konjunktival erozyonlar ve filamenter keratit gibi klinik bulguların gözlenmesi ile teşhis edilir. Bu amaçla Schirmer testi, rose-bengal ve floresan boyama ile slit lamp muayene gibi metodlar kullanılır (22,48,82,84).

Xerostomia, S.S.'da görülen genel bir belirtidir. Hastaların tümünde, ağız mukozasında yanma, kuru yiyeceklerin çiğnenmesinde ve yutulmasında güçlük ile tad alma hassasiyetinin azalmasına yönelik şikayetler vardır<sup>(22,82,84)</sup>.

Normalde tükürük sekresyonu, yapısal olarak ağız dokularının fizyolojik devamlılığını koruyucu bir fonksiyona sahiptir. Esas etkisini bakteriyel plak üzerinde sürdürerek, ağız boşluğuna açılan yüzeylerin mekanik olarak temizlenmesi sağlar ve ayrıca, bakteriler tarafından oluşturulan asit sekresyonu üzerinde tampon rolü oynayarak bakteriyel aktiviteyi kontrol altında tutar. Tükürük salınımı bakteriyel plağın oluşumunu ve metabolizmasını etkileyerek, periodontal hastalıkların etyopatogenezinde önemli rol oynar. Ayrıca kalkülüs ve diş çürüklerinin oluşumu da tükürük akış hızı ve kompozisyonu ile yakından ilgilidir<sup>(9,71)</sup>. S.S. olan hastalarda ise normal seröz sekresyonun yerini, kalın, yapışkan, floküllü mukoid tarzda bir materyal almıştır. Bunun sonucu olarak, ağız mukozasında atrofi ve ülserasyon vardır. Dil yüzeyi kuru, fissürlü ve atrofik filiform papillaları nedeniyle kırmızı görünümündedir. Dudaklarda da kuruluk barizdir, bazen candida enfeksiyonunun olaya katılmasıyla angular chelitis olduğu görülür<sup>(22,82,84)</sup>.

Tükürük bezleri çıkarılmış deney hayvanlarında çürük ile periodontal hastalık sıklığının arttığı ve gingivektomi yapılan sahalarda iyileşmenin geciktiği gösterilmiştir<sup>(9)</sup>. İnsanlarda tükürük sekresyonunun azalmasına bağlı olarak ağızdan solunum gingivitisinde olduğu gibi iltihabi gingival hastalıklar ve hızlı ilerleyen diş çürükleri görülür<sup>(9)</sup>. Aynı tablo, Sjögren sendromunun oral komponentini kapsayan hastalarda da izlenir<sup>(82,84)</sup>.



Primer S.S. olan hastaların % 20'sinde zaman zaman oluşan, unilaterale veya bilateral majör tükürük bezi büyümeleri görülebilir. Palpasyonda parotis bezleri serttir, fakat hassasiyet ve fluktuasyon izlenmez<sup>(22)</sup>.

#### Ekstraglandüler belirtiler :

S.S. da kronik bronşit, lenfositik intersitisyel pnömonit, pulmoner hipertansiyon ve plevral effüzyon gibi solunum sistemine ait belirtiler, disfaji, atrofik gastrit, siroz gibi gastrointestinal sistem bulguları ve Raynaud fenomeni, vaskulit, hiperglobulinemik purpura gibi deri belirtileri görülebilmektedir. Ayrıca, intersitisyel nefrit ve glomerulonefrit şeklinde böbrek tutulumu; tiroidit, periferale nöropati ve miyalji gibi endokrin nörolojik ve kas-iskelet sistemine ait belirtilere rastlanmaktadır. Bazı hastalarda lenfopeni, nütropeni, aplastik anemi ve pseudolenfoma veya lenfomaya ait klinik bulgular görülmektedir<sup>(22,48,83,84)</sup>.

#### Histopatoloji :

Majör ve minör tükürük bezlerindeki en erken histolojik bulgu periduktale lenfositik infiltrasyondur. Sahaya küçük lenfositler hakim olmakla beraber, büyük çaplı lenfositler ve plazma hücreleri ile germinal merkez içeren lenfoid folliküller de izlenebilir. Kanallarda epitel hücrelerinin hiperplazisi sonucu tıkanıklık görülebilir. Daha sonra bez dokusunda atrofi, fibrozis ve hiyalinizasyon gelişir, olayın daha da ilerlemesiyle parankima tamamen atrofiye uğrar ve yağ dokusu ile yer değiştirir. Bazı vakalarda lenfositik infiltrasyon bir malign lenfomayı andıracak kadar yoğun olabilir<sup>(11,28,64)</sup>.

### Sjögren Sendromunun İmmüno­lojik Özellikleri :

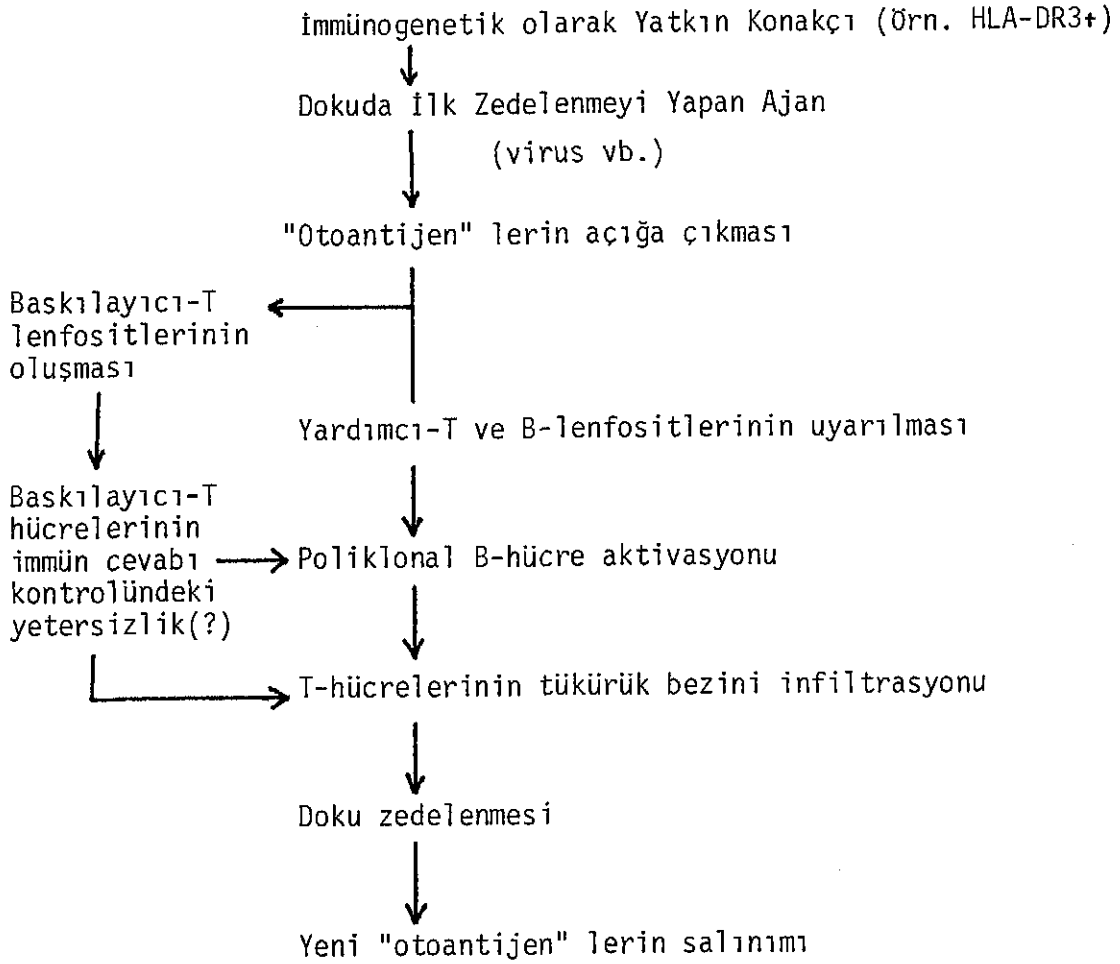
Sjögren sendromunda temel patolojiyi başlatan faktör henüz tarif edilmemiştir. Tükürük bezlerinden izole edilebilen Epstein-Barr virusunun (EBV) veya cytomegalovirusun doku zedelenmesinde ilk sorumlu ajan olabileceği düşünülmektedir. Yang ve ark. S.S. olan hasta serumlarında EBV'unun kodladığı RNA'ya yakın ve selektif olarak ilgili olan ribonükleer proteine yönelik sentezlenmiş antikolar göstermişlerdir<sup>(22)</sup>. Diğer bazı çalışmalarda da EBV'unun S.S.'daki rolü üzerinde durulmakta ise de hücre içinde viral genom'lar ve gen ürünleri henüz gösterilememiştir. İlk ajanın yaptığı zedelenme açısından, hastalığa olan genetik yatkınlığı inceleyen birçok araştırmacı HLA-DR3 doku grubu antijenini normal popülasyona kıyasla daha sık oranda bulmuşlardır<sup>(22,47,85)</sup>. HLA-DR doku grubu antijenlerinin "otoimmün" hadiseyi geliştiren lenfositler için hedef olabileceği düşünüldüğü gibi, HLA-DR3 antijeni taşıyanlarda serumda dolaşan immunkomplekslerin (Antijen - Antikor Kompleksleri) retikuloendotelial sistem tarafından daha geç ve defektif temizlenmesi nedeniyle doku düzeyinde otoimmün hastalığın geliştiği de ileri sürülmektedir<sup>(22)</sup>.

Bugün için S.S.'nin immunopatogenezini açıklamaya yönelik çalışmalar, virus veya başka bir ajanın özellikle tükürük bezlerine ilk zedelenmeyi yaptığını ve tükürük bezi dokusundan "otoantijenlerin" salınımına neden olarak immün sistemi uyardığına işaret etmektedir<sup>(22,48)</sup>.

Otoantijen ile karşılaşınca öncelikle hücre­sel immün sistem hücreleri, Yardımcı-T ve Baskılayıcı-T lenfositleri proliferasyon göstermekte ve sonuçta poliklonal tipte B-lenfosit aktivasyonu olmaktadır.

S.S. olan hastaların tükürük bezlerinde lezyonun başlangıcından itibaren gittikçe ilerleyen lenfosit infiltrasyonu görülmektedir. Bu lenfositlerin

büyük bir kısmını B-lenfositleri ile yardımcı T-lenfositlerinin oluşturduğu, ayrıca baskılayıcı T-lenfositleri ile aktive olmuş (DR +) mononükleer hücrelerin de lenfoid infiltrasyon içinde bulunduğu, kısa bir süre önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir<sup>(1,21,22,77)</sup>. Majör ve minör tükürük bezleri içindeki bu lenfositlerin dağılımı, lenf bezindeki antikor sentezleyen germinal merkezler ile büyük bir benzerlik göstermektedir (Şekil 6).



Şekil 6 : Sjögren sendromunda immünolojik değişikliklerin gelişmesi.

Talal ve arkadaşları tarafından 1970 yılında yapılan bir çalışmada S.S.'nda minör tükürük bezlerinde IgG, IgM ve IgA sentezinin olabildiği, ayrıca görülen lenfosit infiltrasyonu ile antikor sentezinin bağlantılı olduğu gösterilmiştir<sup>(76)</sup>. Hastaların tükürük bezlerinde aktif olarak sentezlenen immünglobulinlerin bir kısmı da romatoid faktör (% 90 vakada pozitif) ve antinükleer antikor (% 70 vakada pozitif) gibi "otoantikor" özelliği taşımaktadır. Bazı çalışmalarda, sentezlenen bu immünglobulin moleküllerinin Fc-kısımlarının feed-back olarak immunoreglatuvar rol oynadığı; B-lenfositlerinden antikor yapımını uyararak fazla miktarda immünkompleks oluşumuna ve sonuçta kompleman sistemi ile lenfositlerin aktivasyonuna yol açtığı ileri sürülmüştür<sup>(2,16)</sup>. Aktive olan ve dokuyu infiltre eden T-lenfositlerinin artımı, doku harabiyetini daha da hızlandırmaktadır. Böylece gittikçe artan lenfosit infiltrasyonu bez dokusu ile yer değiştirerek tükürük bezleri ve lakrimal bezlerde fonksiyon kaybı olmakta, hastalık yavaş bir seyirle ilerlemektedir<sup>(22)</sup>.

Tedavi :

Sjögren sendromunun tedavisi hastanın semptomatik iyileşmesi ve kronik göz ve ağız kuruluğunun yaratmış olduğu lokal etkileri azaltmaya yöneliktir. Ağız kuruluğunun tedavisi güçlük arz etmekle birlikte ilk planda sigara, stress ve ilaçlar gibi faktörlerin kaldırılması gerekmektedir. Parotis akış hızını artıran bazı yapay preparatlar ile parasempatometik ajanlar ile potasyum iodyür solüsyonları kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemleri erken veya hafif ağız kuruluklarına yararlı olmakla beraber, ileri vakalarda olumlu sonuç vermez. Göz kuruluğunun tedavisinde metil-sellüloz kapsayan yapay gözyaşı preparatları kullanılabilir. Hastalıkta sistemik immunosupresif ajanlar ile kortikosteroidlerin kullanılması yalnızca pnömoni, nefrit ve merkezi sinir sistemi hastalıkları gibi ağır sistemik belirtilerin varlığında gerekmektedir<sup>(22,36,81)</sup>.

## M A T E R Y A L v e M E T O D

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı ile Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Onkoloji - İmmünoloji Araştırma Laboratuvarlarında Ocak-1985 ile Mart-1986 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışmada incelemeye alınan hasta grupları, kontroller ve uygulanan metodlar aşağıdaki şekilde sunulacaktır.

- I. Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımı
- II. Periodontal Yapının Değerlendirilmesi
- III. Parotis Salyasının İncelenmesi
  - a. Akış hızının saptanması
  - b. Sekretuar IgA, IgG ve IgM ile salya total proteini tayini
  - c. Sekretuar komponentin (Sc) değerlendirilmesi
- IV. Periferik Kan Lenfosit Gruplarının Tayini
- V. Çalışmada Kullanılan Monoklonal Antikorlar
- VI. Serum İmmünglobulin Düzeylerinin Ölçümü
- VII. Serum Kompleman (C3c ve C4) Düzeylerinin Ölçümü
- VIII. Dişeti ve Dudak Minör Tükürük Bezi Biyopsi Tekniği
- IX. Dişeti ve Tükürük Bezi Dokularının Histopatolojik İncelenmesi
- X. Dişeti ve Tükürük Bezi Dokularının İmmünohistolojik İncelenmesi
  - a. Polivalan antikorlar ile doku lenfositlerinin değerlendirilmesi
  - b. Monoklonal antikorlar ile doku lenfositlerinin incelenmesi
- XI. İstatistiksel Yöntemler.

## I. Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımı :

a. Sjögren Sendromu grubu : Bu gruba Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İç Hastalıkları Anabilim Dalı - İmmünoloji ve Romatoloji Üniteleri ile Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalında gerekli muayene ve tetkikleri yapılarak Sjögren Sendromu (S.S.) tanısı konulan 21 hasta alınmıştır. Bu hastaların 14'ü primer, 7'si ise sekonder tipte idi. Sekonder Sjögren sendromu olarak tanımlanan hastaların 6'sına sikka semptomlarına ilave olarak romatoid artrit, 1 vakaya ise sarkoidoz tanısı konulmuştu. Hastaların hiçbirinde sitotoksik ilaç, steroid veya diğer immünosupresif ajan kullanımı ile ilgili hikaye yoktu.

b. Periodontitis grubu : Bu grubu Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalında, erişkin periodontitis tanısı konulan ve sistemik olarak tamamen sağlıklı 10 hasta oluşturmuştur.

c. Sağlıklı kontrol grubu : Bu grupta Hacettepe Üniversitesi Tıp ve Dişhekimliği Fakülteleri mensupları ile sistemik ve periodontal yönden sağlıklı 13'ü kadın 17'si erkek olan toplam 30 birey çalışmaya alınmıştır. Bu grubun yaş ortalaması 29.9 olup, yaş sınırları 23 ile 44 arasında değişme göstermekteydi.

## II. Periodontal Yapının Değerlendirilmesi :

S.S. olan hastaların tümünde, tükürük bezleri ile kanal ağızlarının detaylı muayenesi yapılarak, dudak, ağız mukozası, dil ve damak kuruluk açısından incelendi. Deney ve kontrol grubunu oluşturan bireylere fırçalama sıklığı, metodu ile fırça tipi ve daha önce periodontal tedavi görüp görmedikleri soruldu. Ardından Williams periodontal sondu kullanılarak cep derinlikleri ölçümü yapıldı. Ölçüm sırasında sondun basınç uygulamaksızın kendi

ağırlığı ile dişlerin uzun eksenine paralel olarak uygulanmasına özen gösterildi. Tüm dişlerin distobukkal, bukkal, mesiobukkal, distolingual, lingual ve mezolingualden cep ölçümleri belirlendi. Her diş için alınan 6 değer aritmetik ortalaması o dişin cep derinliği olarak alındı. Ağızdaki tüm dişlerin cep derinlikleri toplamı diş sayısına bölünerek o hasta için ortalama cep derinliği bulundu. Daha sonra hasta ve kontrol gruplarını oluşturan kişileri, periodontal açıdan değerlendirmek için tüm ağız paralel teknikle periapikal radyografları alınarak, Russell periodontal indeks değerleri saptandı<sup>(67)</sup>. Bu indekste hastalığın şiddeti 0 dan 8'e kadar giden sayılarla her diş için ayrı olarak belirlendi.

indeksde;

- 0 - Sağlıklı periodontal dokuları,
- 1 - Dişi çevrelemeyen hafif dişeti iltihabını,
- 2 - Dişi çevreleyen hafif dişeti iltihabını,
- 4 - Radyografide çentik şeklinde görülen alveoler kemikteki erimeyi
- 6 - Dişeti iltihabı ve cep oluşumu ile beraber röntgende horizontal kemik kaybını,
- 8 - İlerlemiş harabiyet, çiğneme fonksiyonunda kayıp, mobilite ve röntgende aşırı kemik kaybını göstermektedir.

$$\text{Her hasta için periodontal İndeks değeri (PI)} = \frac{\text{Tüm dişlerdeki değerlerin toplamı}}{\text{Ağızda mevcut olan diş sayısı}}$$

formülünden faydalanılarak hesaplandı.

Yapılan bu değerlendirme sonucu, ağızın genel durumu ve periodontal indeksi ortaya çıkmaktadır. Bu değerlendirmenin ağıza yansımaları ise şu şekilde olmaktadır :

- 0.0 - 0.2 Destek dokular klinik olarak normaldirler.
- 0.3 - 0.9 Basit dişeti iltihabı mevcuttur.
- 0.7 - 1.9 Başlangıç periodontitis oluşmuştur.
- 1.6 - 5.0 Yerleşmiş yıkıcı periodontitis vardır.
- 3.8 - 8.0 Ümitsiz prognozlu periodontitis mevcuttur.

Bu değerlendirmelerden sonra ortaya çıkan sonuçlar, hastanın klinik ağız bulguları ile uyum göstermiyorsa yukarıdaki değerlerin alt veya üst sınırları arasında bir tercih yapıldı.

Ayrıca, deney ve kontrol grubu bireylerinde dişeti iltihabının ölçülmesi için Mühlemann ve Son tarafından geliştirilen dişeti oluğu kanama indeksi kullanıldı<sup>(79)</sup>. Bir periodontal sondla dişeti oluğu içinde dikkatle dolaşıldı ve kanama oluşumu ile dişetin durumuna göre her dişin vestibul ve lingual yüzleri için 3'er tane olmak üzere toplam 6 tane değer aşağıdaki indeks derecelerine göre verildi.

0- Papiller (P) ve Marginal (M) dişetlerinde gözle bakıldığında değişiklik yok, dişeti oluğu sond ile kontrol edildiğinde kanama yok.

1- P ve M dişetlerinde gözle bakıldığında renk değişmesi ve ödem yok, dişeti oluğu sond ile kontrol edildiğinde kanama oluyor.

2- P ve M dişetlerinde ödem yok, dişeti rengi değişmiş ve dişeti oluğu sond ile kontrolde kanıyor.

3- Dişeti oluğu kanaması, renk değişikliği ve hafif ödematöz değişiklik var.

4- Dişeti oluğu kanaması, renk değişikliği ve belirgin ödematöz değişiklik var.

5- Belirgin dişeti oluğu kanaması (spontan), ileri derecede renk değişikliği ve ödematöz değişiklik (ülserli-ülsersiz) var.



$$\text{Her hasta için dişeti oluşu kanama indeksi değeri (SBI)} = \frac{\text{Verilen indeks dereceleri toplamı}}{\text{Değerlendirilen ünite sayısı}}$$

formülü kullanılarak hesaplandı.

Deney ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin ağız hijyenini değerlendirmek için O'Leary ve arkadaşları tarafından geliştirilen plak indeksi kullanıldı<sup>(52)</sup>. Placı gözle görülür hale getirmek için Oral-B firmasının Eritrosin tabletleri kullanıldı. Bu indeks yönteminde her diş dört yüzeye bölünerek var yok esasına göre plak değerlendirildi. Her hasta için elde edilen sonuç yüzey sayısı, mevcut dişlerin adedinin dörtle çarpılması ile elde edilen toplam yüzeye bölünerek plak yüzdesi hesaplandı.

Bütün klinik indekslerde 20 yaş dişleri, uygulama dışı bırakıldı.

### III. Parotis Salyasının İncelenmesi :

Parotis salyası toplanmadan önce hasta ve kontrol grubundaki bireylerin ağızları musluk suyu ile iyice çalkalatılarak yiyecek artıkları ve yüzeydeki dökülmüş epitel hücre kontaminasyon olasılığı minimale indirildi. Daha sonra hasta, başı sagittal plan yere dik olacak şekilde rahat bir koltuğa oturtuldu. Sağ ve sol parotis kanalı ağızına su trombu ile vakum sağlanarak modifiye Carlsson-Crittenden tip parotis salyası toplama cihazı yerleştirildi<sup>(71)</sup>. Ardından her 30 saniyede bir 5 saniye sürecek şekilde dil köküne % 10'luk sitrik asit damlatılarak parotis bezi uyarıldı. Sjögren sendromlu hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda, saf parotis salyası, ilk 5 damla dışarı alındıktan sonra, 10 dakika süreyle steril cam tüpler içine toplandı<sup>(74)</sup>.

Tüplerin ağızları Parafilm ile kapatılıp, değerlendirme zamanına kadar -70°C'da saklandı.

a. Akış hızının saptanması :

Cam tüplerde toplanan tükürük miktarı steril pipetler kullanılarak ölçüldü. Her hastanın tükürük akış hızı (ml/dak) her bir bez için, ayrı ayrı toplanan tükürük miktarı (ml) / toplama süresi (dak) formülüyle belirlenen akış hızlarının ortalaması alınarak hesaplandı.

b. Sekretuar IgA, IgG, IgM ve Salya Total Protein Tayini :

Daha önceden  $-70^{\circ}\text{C}$  da saklanan salya örnekleri deney yapılacağı gün çözünmeye bırakıldı. Hazırlanan örnekler Behring Werke (W.Germany) tarafından imal edilen LC-Partigen IgA, IgG ve IgM plaklarının 20  $\mu\text{l}$ . hacmindeki kuyularına özel Hamilton pipetleri ile konuldu. Her plakta bulunan 12 kuyudan ilk üç kuyuya standart insan serumunun değişen dilüsyonlarından 20  $\mu\text{l}$ , geriye kalan dokuz hazneye de parotis salya örnekleri yine aynı hacimde konuldu. 60 saat bekledikten sonra kuyuların çevresinde oluşan halkaların çapları (mm) Millipore firması tarafından yapılan ve alttan aydınlatmalı özel bir cihaz ile ölçüldü. İlk üç kuyudaki standart serumların gösterdikleri difüzyon çapları ( $\text{mm}^2$  olarak) ve mg % olarak içerdikleri IgA, IgG ve IgM miktarları bir milimetrik kağıtta X ve Y eksenleri üzerine yerleştirilerek elde edilen üç nokta düz bir çizgi ile birleştirilerek standart eğri elde edildi. Örneklerden elde edilen difüzyon değerlerinin bu çizgi üzerindeki izdüşümlerinden içerdikleri IgA, IgG ve IgM düzeyleri hesaplandı ve % mg olarak ifade edildi<sup>(46)</sup>.

Parotis salyasındaki total protein konsantrasyonu, Biyokimya Anabilim Dalında Lowry ve arkadaşları tarafından geliştirilen teknik ile tayin edildi<sup>(42)</sup>.

c) Parotis salyasında sekretuvar komponentin varlığı :

Ouchterlony immünodiffüzyon tekniği ile test edildi. İmmünodiffüzyon plaklarına açılan kuyulardan ortada kalanına özgül anti-sekretuvar komponent antiserumu (Behring Werke, W.Germany) etrafındaki kuyulara hasta örnekleri konuldu ve oda ısısında 24 saat bırakıldı. Antiserum ile örnek arasında oluşan presipitin bandı kaydedildi ve spesifik antiserumla reaksiyon veren ve presipitin bandı oluşturan örneklerde sekretuvar komponentin var olduğu kabul edildi<sup>(75)</sup>.

IV. Periferik Kan Lenfosit Gruplarının Tayini :

Bunun için önce periferik kandan lenfosit ayrımı yapılmış, sonra da üç farklı metotla yüzey antijenleri incelenmiştir. T-lenfositleri için E-rozet testi, B-lenfositleri için yüzey immünglobulin testi ve ayrıca monoklonal antikolar kullanılmıştır. Çalışmada, popülasyon değişikliklerini daha güvenilir değerlendirmek amacıyla hücre sayıları mutlak değerler üzerinden verilmiştir.

A. Lenfosit ayrımı<sup>(8)</sup>

Gerekli malzeme :

1. Heparin : Liquemine<sup>R</sup> Roche-Flacon 5 ml.
2. Ficoll-hypaque : Isopaque<sup>R</sup>, Uppsala, Sweden
3. PBS (10x) : Phosphate-buffered-saline (pH 7.2)

$KH_2PO_4$	2 gr
KCl	2 gr
NaCl	80 gr
$Na_2HPO_4$	17.8 gr

Bu karışım 1 lt distile suda eritilip, % 0.1 gr  $NaN_3$  (sodyum azide) ilave edildi. Bu stoktan 1:10 oranında serum fizyolojik ile sulandırılarak kullanıldı.

4. Lökosit solusyonu : 97 ml distile su + 3 ml glasial asetik asit
5. Pastör pipetleri
6. Steril disposable enjektör ve iğne
7. 40 cc hacimli yuvarlak dipli cam tüpler
8. 50 cc hacimli konik dipli plastik tüpler
9. 12 cc hacimli plastik tüpler
10. Cam pipetler
11. Lökosit pipeti
12. Hemositometre
13. Alkollü pamuk ve turnike.

Metod :

- a) Enjektöre 0.1 cc heparin çekilerek üzerine 10 cc kan alındı.
- b) Alınan kan plastik tüpe boşaltılarak 1:3 oranında PBS ile sulandırıldı.
- c) Enjektöre 3 ml Ficoll alınarak cam bir tüpe boşaltıldı.
- d) Sulandırılmış olan kan, pastör pipeti ile yavaşça Ficoll üzerine yayıldı. Bu işlem için önce bir damla kan, pastör pipeti ile tüpün kenarından bırakıldı. Bu bir damla kanın açtığı yol kullanılarak kalan kan Ficoll'ün üzerine yayıldı.
- e) 1350 rpm de 35 dk 22<sup>0</sup>C de santrifüj edildi.
- f) Santrifüj sonunda lenfositler ince bir tabaka olarak interfazda Ficoll'ün üzerinde kalır. Ficoll'ün altında eritrositler ve diğer parçalı elemanlar toplanmıştır. Pastör pipeti ile çok dikkatli olarak Ficoll'süz lenfositler alındı.
- g) Alınan lenfositler plastik bir tüpe konularak, üzerine PBS eklendi. 4<sup>0</sup>C de 20 dakika 1350 rpm de santrifüj edildi.
- h) Santrifüj sonunda süpernatant atılarak, tekrar PBS eklendi, 10 dakika 4<sup>0</sup>C de 1350 rpm de santrifüj edildi. Aynı işlem bir kez daha yinelenildi.

- ı) Süpernatant atılıp, dipteki hücrelere 1 ml PBS eklendi. Pastör pipeti ile tam homojen bir karışım sağlandıktan sonra hücre sayımına geçildi.
- i) Sayım için, hemositometrenin pipetine 0.5 işaretine kadar lenfosit süspansiyonundan, 1.1 işaretine kadar da lökosit solüsyonundan çekildi. Pipetin iki ucundan baş ve orta parmaklarla tutularak karıştırıldı. İlk iki üç damla dışarı atıldı.
- j) Hemositometrenin her iki alanına birer damla lenfosit süspansiyonundan damlatıldı.
- k) Dört köşedeki lenfositler sayılarak 0.05 ile çarpıldı. Böylece lenfosit sayısı  $\times 10^6/\text{ml}$  olarak bulundu.
- l) 1 ml de elde edilen hücre sayısını ml de 2 milyon olacak şekilde ayarlamak gerektiğinde elde edilen sayı ikiye bölünerek kaç cc hacim sağlanması gerektiği hesaplandı.  
Örneğin 14 milyon/ml hücre elde edilmişse  $14 \times 10^6 : 2 = 7$  ml total hacim sağlanmalıdır. Bunun için tüpe 6 ml daha PBS eklenmesi gerekir.

#### B. E-rozet testi<sup>(33)</sup>

Gerekli malzeme :

Lenfosit ayırımı için gerekli olanlara ek olarak :

1) Fetal buzağı serumu (Fetal calf serum - FCS Gibco, Europe Ltd) :  
56°C de 30 dakika su banyosunda tutularak komplemanın inaktivasyonu sağlandı.  
Kullanılana kadar -24°C de saklandı.

2) Koyun eritrositleri (Sheep red blood cells - SRBC) : 10 cc heparinli koyun kanı alınarak 20 cc Alsever içinde muhafaza edildi. Her 15 günde bir yeniden kan alınarak tazeliği korundu. Çalışma günü, bu stoktan alınan örnek, Alsever'den arındırmak için PBS ile yıkandı. Üstteki kısım atılarak, yeniden PBS eklendi. Buradan alınan örneklerden PBS ile önce % 5 lik SRBC süspansiyonu, daha sonra % 0.5 lik SRBC süspansiyonu hazırlandı. E-rozet testinde % 0.5 lik SRBC süspansiyonundan kullanıldı.

Metod :

- a)  $2 \times 10^6$ /ml olarak hazırlanan lenfositlerden küçük plastik bir tüpe 0.5 cc konulup, üzerine % 0.5'lik koyun eritrositleri süspansiyonundan 0.5 cc eklendi.
- b) Bu karışım üzerine 0.1 cc FCS ilave edilerek, hafifçe karışması sağlandı.  $37^{\circ}\text{C}$  de 15 dakika su banyosunda inkübe edildi.
- c) İnkübasyon sonunda,  $22^{\circ}\text{C}$  de 850 rpm'de 5-10 dk santrifüj edildi.
- d)  $4^{\circ}\text{C}$  de 1 saat inkübe edildi. Tüp, yavaşça bir kaç defa eğilerek süspansiyon haline getirildi.
- e) Bu süspansiyondan pastör pipeti ile hemositometrenin her iki alanına birer damla damlatılarak, sayım işlemine geçildi.
- f) Toplam olarak 200 hücre sayıldı (Serbest lenfositler ve rozet oluşturmuş lenfositler). Rozetler % olarak ifade edildi.

C. B-Lenfositlerinin Değerlendirilmesi :

B-lenfositlerinin incelenmesinde, B-lenfosit yüzey membranında bulunan immünglobulinlerin FITC-işaretli tavşanda hazırlanmış insan immünglobulinlerine karşı (G + A + M) antiserum kullanılarak gösterilmesini esas alan yöntem (SmIg +) kullanılmıştır<sup>(86)</sup>. Elde edilen periferik kan lenfositlerinden  $1 \times 10^6$  hücre üzerine 0.1 ml FITC- anti insan Ig (G + A + M) (Behring - Werke, W.Germany) konulmuş ve  $+4^{\circ}\text{C}$  de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda % 20 FCS ihtiva eden Medium 199 (1x) ile 1000 devirde 10 dk. sürelerle 3 kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra süpernatant atılarak 0.1 cc medium içinde süspansiyon haline getirilmiş ve karışım üzerine 20 mikrolitre % 4'lük Formol-PBS, pH 7.2 fiksatif konularak epifloresan mikroskopta incelenmiştir (Carl Zeiss), 200 hücre sayılarak yüzey floresanı pozitif olanlar (SmIg+) yüzde olarak ifade edilmiştir.

D. Monoklonal antikorlarla hücre yüzey antijenlerinin belirlenmesi<sup>(59)</sup> :

Kullanılan malzeme;

1) Monoklonal antikorlar (MoAb) :

Bütün MoAb'lar stoktan 1:10 dilüe edilerek kullanıldı. Dilüsyon için % 1 sığır serum albümini (BSA), % 5 tavşan serumu (NRS), % 0.1  $\text{NaN}_3$  (Sodyumazide) ve Dulbecco-PBS içeren bir medium kullanıldı. 0.1 ml stok MoAb 0.9 ml mediumla dilüe edildi.

Tablo 5 de çalışmada kullanılan MoAb'lar ve özellikleri belirtilmektedir.

2) Dulbecco PBS -- FCS (% 10 FCS)

Dulbecco PBS :	8 gr	NaCl
	370 mgr	KCl
	1150 mgr	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	200 mgr	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

Bu karışım 1000 cc distile suda eritilerek 1 mgr  $\text{NaN}_3$  ilave edildi. % 10 FCS eklenerek % 10 FCS - Dulbecco PBS hazırlanmış oldu.

3) Florescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli anti-mouse Ig serumu (G x M IgG - FITC). Kallestead Laboratories<sup>R</sup>, Incorporated, Austin, Texas, USA.

10x şeklinde konsantre edilen antiserum  $+4^{\circ}\text{C}$  de ve koyu renkli bir şişede ışıktan muhafaza edilerek saklanmıştır. Deneyin yapılacağı gün 10 kez (1:10) Dulbecco-PBS ile dilüe edilerek kullanılmıştır.

Metod :

1) Daha önce anlatılan yöntemle elde edilen lenfositlerden sayım yapıldıktan sonra 1 cc de  $1 \times 10^6$  lenfosit olacak şekilde süspansiyon hazırlandı.

- 2) Kullanılacak monoklonal antikor sayısı kadar, küçük plastik tüplere hücre süspansiyonundan 0.05 ml (50 µl) otomatik pipetle dağıtıldı. Herbirine fare asit sıvısı ve serumundan elde edilmiş bulunan anti-Pan-T, anti-yardımcı T-lenfosit ve anti baskılayıcı T-lenfosit monoklonal antikorlarından 0.05 ml (50 µl) ilave edildi.
- 3) Bu karışım +4°C da 10 dakika olmak üzere ara sıra sallayıp karıştırılarak inkübe edildi.
- 4) İki defa 10 dakika olmak üzere 2000 rpm'de +4°C da % 10 FCS içeren Dulbecco PBS ile yıkandı.
- 5) Son yıkamadan sonra hücrelerin üzerine 0.05 ml Dulbecco PBS - % 10 FCS ilave edildi.
- 6) Karışım homojen hale getirildikten sonra, tüplerin üzerine 0.05 ml (50 µl) 1:10 dilue edilmiş Goat-antimouse Ig-FITC (Kallstead Inc. USA) eklendi.
- 7) Tüpler sallanarak karıştırıldı ve +4°C de 10 dak. inkübe edildi ve tüpler inkübasyon sırasında ara sıra sallanarak karıştırıldı.
- 8) Son inkübasyondan sonra hücre süspansiyonu Dulbecco PBS + % 10 FCS ile 2 defa 10 dakika olmak üzere +4°C de 2000 rpm'de yıkandı.
- 9) Son yıkamadan sonra, tüp içindeki 0.1 ml hacimli hücre süspansiyonu üzerine 0.02 ml fixatif % 4'lük formal PBS solusyonu konarak, en geç 24 saat içerisinde Carl Zeiss (W.Germany) epifloresan mikroskopla 200'er hücre sayılarak, pozitif immunfloresan veren hücrelerin sayıları tespit edildi, oranları yüzde olarak ifade edildi.
- 10) HLA-DR antijeni taşıyan lenfositlerin değerlendirilmesi :  
T-lenfosit subpopulasyonlarının incelenmesi için kullanılan yöntem aynen tekrar edildi. Sadece, monoklonal antikor olarak, anti-DR monoklonal antikorunu kullanıldı.

#### V. Çalışmada Kullanılan Monoklonal Antikorlar :

- (i) Pan-T Monoklonal Antikoru (VIII-I, Pan-T MoAb, Kallstead Labs. USA) : IgG<sub>1</sub>-kappa tipinde ve asit sıvısından elde edilen bir monoklonal antikordur. Bütün periferel T-lenfositleri, timositler ve insan T-hücre klonları ile pozitif reaksiyon vermektedir. Çalışmada optimal 1:10 dilüsyonda kullanılmıştır.



Tablo 5 : Çalışmada kullanılan monoklonal antikorlar hakkında bilgiler.

Monoklonal Antikor <sup>†</sup>	Antikorun özelliği ve nereden alındığı	Pozitif reaksiyon verdiği hücreler
MoAb VIII-1 (PAN-T)	$\gamma_1$ , kappa tipi Asit sıvısı	- Bütün periferel T-lenfositleri - Timositler
Ticari Karşılığı : Leu-1, OKT1	(BALB/c fare)	- insan T-hücre kolonileri
MoAb XXXIV-54 (YARDIMCI-T) (Helper/Inducer-T)	$\gamma_1$ , kappa tipi Kültür sıvısı	- Periferel kan lenfositlerinin % 40'ı ile, - Bazı insan T-hücre kolonileri ile
Ticari Karşılığı : Leu-3a, OKT4		
MoAb XLII-16 (SUPRESÖR-T) (Suppressor/Cytotoxic-T)	$\gamma_{2b}$ , kappa tipi Kültür sıvısı	- Periferel kan lenfositlerinin % 22'si ile, - Bazı insan T-hücre kolonileri ile
Ticari Karşılığı : Leu-2a, OKT8		
cALLA † RFAL-1,2 Antibody to Common ALL Antigen (p 100)	IgG <sub>1</sub> Kültür süpernatanı	- Lenfoblastik lösemi hücrelerin % 70'i ile - TdT (+) hücrelerin hepsi - pre-B lenfositleri ile
J5, BA-3		
HLA-DR † RFDR-1 Antibody to HLA-DR Common Determinants	IgM Kültür süpernatanı	- Class-II antijen spesifik - Makrofajlar, lenf bezi ve barsak aktive T-lenfositleri ve - B-lenfositleri ile - TdT-hücreleri ile pozitif reaksiyon verir

† Bu monoklonal antikorlar Minnesota Üniversitesi (ABD) ve Kallstead Laboratories, Incorporated Texas, ABD'de üretilmiş ve Hacettepe Tıp Fakültesi Onkoloji-İmmünoloji Araştırma Laboratuvarına gönderilmiştir.

‡ Bu MoAb'lar Royal Free Hospital, Londra'dan gönderilmiştir (Prof. G.Janossy).

- (ii) Yardımcı-T lenfosit (Helper/Inducer-T) Monoklonal Antikoru (XXXIV-54, T-Helper, Kallstead Labs. USA) : Periferel kan lenfositlerinin % 40'ı ve bazı insan T-hücre kolonileri ile reaksiyon vermekte ve yardımcı T-lenfositlerini belirlemektedir. IgG<sub>1</sub>-kappa yapısındadır ve kültür sıvısından elde edilmektedir. Optimal dilüsyon olarak 1:10 kullanılmıştır.
- (iii) Baskılayıcı-T lenfosit (Suppressor/Cytotoxic-T) Monoklonal Antikoru (RFT-8, Anti-T<sub>8</sub> Monoclonal Antibody) Londra Üniversitesi Royal Free Hospital İmmünoloji Departmanı Başkanı Prof. G.Janossy tarafından gönderilmiştir. Timus korteksindeki lenfositlerin % 80'i, periferik kan ve lenf bezi lenfositlerinin % 20 - ilâ % 40'ı ile pozitif reaksiyon vermektedir. Baskılayıcı T-lenfositlerini belirlemektedir. IgG<sub>1</sub> yapısındadır ve kültür sıvısından elde edilmiştir. Optimal dilüsyonu olarak 1:20 seçilmiştir.
- (iv) HLA-DR, Class-II Antijeni Monoklonal Antikoru (RFLDR-2, Anti-HLA DR Monoclonal Antibody) yine Royal Free Hospital'dan Prof. G. Janossy tarafından gönderilmiştir. IgG<sub>2</sub> tipinde monoklonal antikor olup kültür sıvısından elde edilmiştir ve B-hücreleri, "aktive" T-hücreleri ile aktive-makrofajlar ve Terminal d-Transferase (TdT) pozitif hücreler ile kuvvetli reaksiyon vermektedir. Optimal dilüsyon olarak 1:20 kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan monoklonal antikorların özellikleri Tablo 5 de gösterilmektedir.

#### VI. Serum İmmünglobulin Düzeylerinin Ölçümü :

Bütün örneklerde IgG, IgA ve IgM düzeyleri radial immunodiffüzyon yöntemi ile ölçüldü<sup>(46)</sup>.

Çalışmalar, hastalardan alınan kanların hemen 1500 rpm'de 15 dk santirifüj edilerek ayrılıp -35<sup>0</sup>C de saklanan serum örneklerinde yapıldı.

##### (1) İmmünglobulin G ölçümü :

- (a) Nor-partigen-IgG (Behring Werke, Hoechst Pharmaceuticals) plak haznelerine IgG düzeyi ölçülerek serum örneklerinden 5'er mikrolitre konuldu.

- (b) Plak kapatıldıktan sonra 50 saat oda ısısında inkübe edildi.
- (c) Süre sonunda oluşan diffüzyon halkalarının çapı ölçüldü.
- (d) Özel hazırlanmış cetvellerden her bir diffüzyon halkasının çapına göre örneklerin IgG düzeyleri hesaplandı.

(2) İmmünglobulin A ölçümü :

Nor-partigen IgA plaklarında (Behringwerke, Hoechst Pharmaceuticals) IgG için uygulanan yöntem aynen tekrar edildi.

(3) İmmünglobulin M ölçümü :

İmmünglobulin M ölçümü için de yukarıda tariflenen yöntem aynen uygulandı. Yanlız Nor-partigen-IgM plakları (Behringwerke, Hoechst Pharmaceuticals) 80 saat inkübe edildi.

VII. Serum Kompleman (C3c ve C4) Düzeylerinin Ölçümü :

1. C3c ölçümü :

- (a) Serum örnekleri serum fizyolojik ile 1/2 oranında dilue edildikten sonra M-Partigen Immunodiffüzyon Plaklarının (Behringwerke, Hoechst Pharmaceuticals) ilk 3 haznesine standart serum, 4-12 numaralı haznelere de ölçülecek serumlardan 5'er mikrolitre konuldu<sup>(46)</sup>.
- (b) Plaklar kapatıldıktan sonra 48 saat oda ısısında inkübe edildi.
- (c) Süre sonunda oluşan presipitasyon halkalarının çapları ölçülüp alanları hesaplandı.
- (d) Standart serum değerlerinden yararlanılarak çizilen grafikten bu alanlara göre her bir örneğin C3c değerleri hesaplandı.

2. C4 ölçümü :

C3c ölçümü için uygulanan tüm işlemler aynen tekrar edildi.

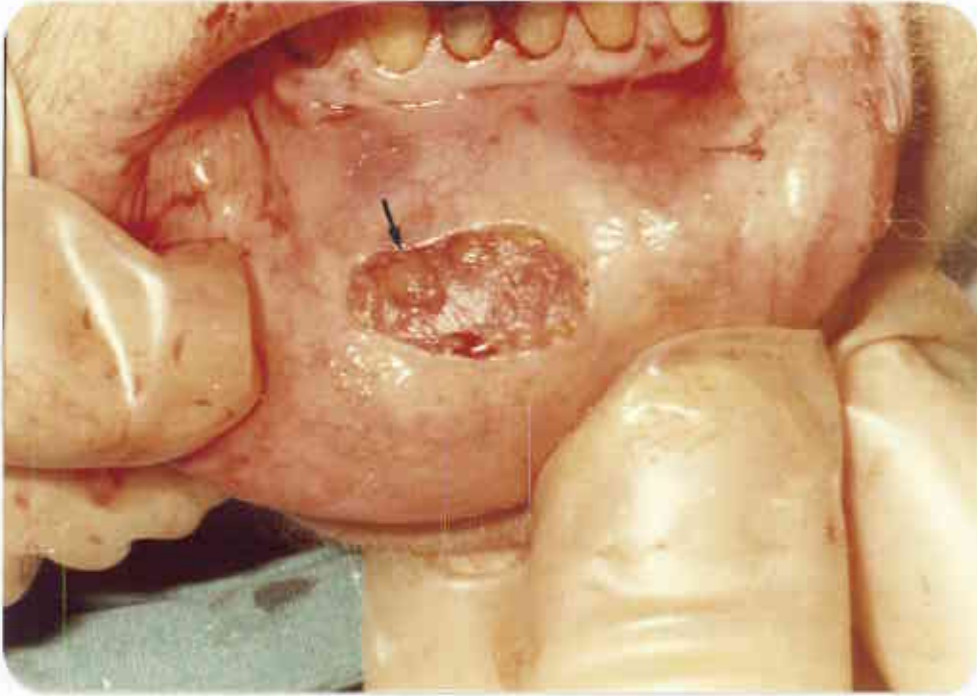
## VIII. Dişeti ve Dudak Minör Tükürük Bezi Biyopsi Tekniği :

### a. Dişeti Biyopsisi :

Hostacain Forte-S ile yapılan lokal anesteziyi takiben hastaların üst sağ birinci ve ikinci premolarlar dişlerinin arasındaki dişeti papilinin vestibülünden üçgen şeklinde doku çıkarıldı. Bu işlem esnasında lokal anestetik solüsyonun alınacak parça içine verilmemesine özen gösterildi. Alınan dişeti örnekleri mezial ve distal olmak üzere ikiye kesilerek yarısı histopatolojik değerlendirmeler diğer yarısı ise immunohistolojik incelemeler için kullanıldı. Kadın hastalarımızda doku örneklerinin menstruasyondan sonraki ilk hafta içinde alınmasına özen gösterildi.

### b. Minör Tükürük Bezi Biyopsisi :

Alt dudağın derin glandüler dokuları içine Hostacain Forte-S ile yapılan lokal anesteziden sonra mukoza üzerinde, vermilion hattına paralel ve lateralden mediana doğru 1.5-2 santimetrelilik bir insizyon yapıldı. Kenarların künt diseksiyonla serbestleştirilmesinden sonra tükürük bezleri, toplam sayıları 5-6 tane olacak şekilde, birer birer çıkarıldı. Biyopsi alanı 4-0 siyah ipek suturele kapatıldı. Hastalar bir hafta sonra dikişleri alınmak üzere çağırıldı. Alınan tükürük bezi örneklerinin yarısı histopatolojik değerlendirmeler diğer yarısı ise immunohistolojik incelemeler için kullanıldı<sup>(11)</sup> (Resim 1).



Resim 1 : Dudak minör tükürük bezi biyopsi tekniği.

#### IX. Dişeti ve Tükürük Bezi Dokularının Histopatolojik İncelenmesi :

Tamponlanmış % 10'luk formalin içinde 6-12 saat tespit edilen dişeti ve tükürük bezi dokuları, rutin yöntemlerle parafine gömüldü. Yumuşak doku mikrotomuyla 6 mikron kalınlığında kesilen örnekler, Mayer'ın Hematoksilen-Eosin boyası ile boyandıktan sonra American Optical ışık mikroskopunda histopatolojik açıdan değerlendirildi.

Dişetine ait doku kesitleri; epitelin durumu, bağ dokusundaki iltihabi infiltrasyonun şiddeti ve hücre tipi açısından değerlendirildi. İltihabi infiltrasyonun derecelendirilmesi aşağıdaki kriterler üzerinden yapıldı :

- 1 : Hafif dişeti iltihabı; Ortamda tek tük lenfosit mevcut (+),
- 2 : Orta şiddette dişeti iltihabı; İltihap bölgesinde lenfosit ve plazma hücreleri fokal odaklar şeklinde birikim göstermekte (+ +),
- 3 : Submukozal ve derin bağ dokusunda diffüz mononükleer hücre infiltrasyonu mevcut (+ + +),

4 : İltihabi hücrelerin en az yarısını PMN lökositlerin oluşturduğu örnekler akut tablo olarak değerlendirildi (+ + + +).

Minör tükürük bezine ait doku kesitleri, lenfosit infiltrasyonu, asiner atrofi, yağ infiltrasyonu ve fibrozis açısından değerlendirildi. Tüm kesitlerde, lenfositik odakların varlığı ve diffüz lenfositik infiltrasyon açısından derecelendirme yapıldı. Bir odak, 50 veya daha fazla lenfosit az sayıda histiosit ve periferik olarak yerleşmiş bir kaç tane plazma hücrelerinden oluşuyordu. Her bir bezin alanı milimetrik olarak hesaplandı ve toplam odak sayıları saptanarak, lenfosit infiltrasyonunun derecelendirmesi her 4 mm<sup>2</sup> lik alana düşen odak sayısı hesabıyla yapıldı<sup>(11)</sup>.

<u>Derece</u>	<u>Tükürük bezi dokusunun her 4 mm<sup>2</sup> sinde bulunan lenfositler</u>
0	İnfiltrasyon yok
1	Hafif infiltrasyon
2	Orta derecede infiltrasyon veya bir odakdan az
3	Bir odak
4	Bir odakdan fazla

X. Dişeti ve Tükürük Bezi Dokularının İmmünohistolojik İncelenmesi :

a. Polivalan Antikorlar ile Dokudaki İmmünglobulinlerin Değerlendirilmesi

Dokudaki immünglobulinlerin değerlendirilmesi için, 6 mikron kalınlığındaki parafin kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi. İki defa 5 dk. PBS ile yıkandı. Endojen peroksidazı bloke etmek için % 0.3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren % 80'lik metanolde 10 dk. bekletildi. PBS ile iki defa 5 dk. yıkandı. Tavşanda hazırlanmış poliklonal insan IgG, IgA ve IgM'ye özgül antikorlarla (Behringwerke, W.Germany) 30 dk. inkübe edildi. PBS ile iki defa 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra tavşan immünglobulinlerine karşı domuzda hazırlanmış peroksidazla işaretli antikorla (Dakopatts, Denmark) 30 dk.

nemli ortamda inkübe edildi. İki defa 5 dk. PBS ile yıkandı. Taze hazırlanmış DAB süstratı (Sigma) (3,3'-diaminobenzidine-tetrachlorid : 25 mg DAB, pH = 7.6, 0.05 Molar, 50 ml. Tris tamponu içinde çözülüp, karışıma 25 mikrolitre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek filtre edildi) ile inkübe edildi. Boyanma mikroskop altında kontrol edildi. İki defa PBS ile 5 dakika yıkama yapıldı. Hematoksilen ile 10 ilâ 30 sn. boyama yapılarak kontrast boya oluşması sağlandı. 10 dakika akan su altında bırakıldı. Alkol serilerinden ve ksilolden geçirildi. Lamlar balzam ile kapatılarak ışık mikroskobu altında değerlendirme yapıldı. Kırmızı-kahverengi boyanma gösteren doku komponentlerinde pozitif reaksiyon olduğu kabul edildi<sup>(18)</sup>.

Ayrıca, dokuda dağılım gösteren B-lenfositleri FITC-işaretli polivalan IgG + A + M antiserumu kullanılarak direkt immünfloresan veya immünperoksidaz yöntemi aracılığı ile değerlendirilmiştir.

#### b. Monoklonal Antikorlar ile Doku Lenfositlerinin İncelenmesi :

Alınan doku örneklerinin yarısı, serum fizyolojikle nemlendirilmiş bir gazlı-bez arasına konulup, en kısa sürede laboratuvara ulaştırılarak bir kriostat (American Optical) içinde -18°C de donduruldu ve 6 mikron kalınlığında kesitler elde edildi. Bu kesitler -70°C de çalışma anına kadar saklandı. Çalışma gününde doku kesitleri 20 dakika süreyle soğuk hava akımı ile kurutuldu, daha sonra 10 dakika aseton içinde tespit edildi. Kesitler, incelenecek her bir lenfosit grubu için özgül monoklonal antikorlar ile 60 dk. oda ısısında ve nemli ortamda inkübe edildi. PBS ile iki defa 5 dk. yıkama yapıldıktan sonra, fare serum immunglobulinine karşı domuzda hazırlanmış peroksidaz işaretli antiserum (Dakopatts, Denmark) ile nemli ortamda 30 dakika inkübe edildi. PBS ile iki defa 5 dk. yıkama yapıldı. Kesitler süstrat solüsyonu olan taze hazırlanmış ve filtre edilmiş AEC (2-amino-9 ethyl carbazole, 20 mg + n-n-dimethylformamide, 5 ml + 0.1 M Sodium acetate,

pH = 4.9 , 0.5 ml + % 30  $H_2O_2$  , 0.1 ml) ile nemli ortamda inkübe edildi. Boyama mikroskopda kontrol edildi. PBS ile iki defa 5 dk. yıkama yapıldı. Hematoksilen ile 10 ilâ 30 saniye boyama yapılarak kontrast boya oluşması sağlandı. Kesitler mavi renk alana kadar akan su altında bırakıldı. Gliserin-fosfat tampon karışımı ile kapatılan lamalar, ışık mikroskopunda incelendi. Kırmızı-kahverengi boyanma gösteren doku komponentlerinde pozitif reaksiyon olduğu kabul edildi<sup>(30)</sup>.

#### XI. İstatistiksel Yöntemler :

Bu çalışmada iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi ve Mann-Whitney U-testi kullanılmıştır.

Çalışmanın periferik kan ile ilgili sonuçları % 40 civarında bir varyasyon katsayısına sahip olması nedeniyle, bu yüksek varyasyonu ortadan kaldırmak için bu veriler logaritmik dönüşüme tabi tutularak varyasyon katsayısı % 7'ye indirilmiştir<sup>(13,65,68)</sup>.



## B U L G U L A R

### I. Hasta ve Kontrol Gruplarının Klinik Bulguları :

1. Sjögren sendromu grubu : Primer S.S. tanısı konulan hastaların 11'i kadın, 3'ü erkek ve yaş sınırları 10 ile 71 arasında idi (ort.  $47.1 \pm 4.9$ ). Sekonder S.S. olarak tanımlanan 7 hastanın ise hepsi kadın olup yaş sınırları 25 ile 53 arasındaydı (ort.  $47.4 \pm 4.2$ ). Çalışmaya alınan toplam 21 S.S. olan hastanın, 4 tanesi tam dişsiz olduğu için, periodontolojik incelemeler, 12'si primer, 5'i sekonder tip olan 17 hasta üzerinde yapıldı. Bu hastaların 14'ü kadın, 3'ü erkek ve yaş sınırları 10 ile 60 arasında idi (ort.  $44.12 \pm 3.54$ ). Hastalık süresi 1-6 sene arasında değişmekte idi (ort.  $4.3 \pm 0.4$ ). Tüm hastaların ağızında toplam 302 diş mevcuttu. Hasta başına ortalama  $17.76 \pm 1.68$  diş düşmekte idi.

Ağız bakımı alışkanlıkları açısından hastalar değerlendirildiğinde, dokuz tanesinin günde bir defa dişlerini fırçaladığı, diğerlerinin fırçalama alışkanlığının çok düzensiz olduğu, iki günde bir ile hiç fırçalamama arasında değişmekte olduğu görüldü. O'Leary plak indeksi değerleri % 50 ile % 100 arasında olup ortalama  $\% 86.12 \pm 4.42$  olarak hesaplandı (Tablo 6). Hastaların sadece üç tanesi modifiye Stillman tekniğine yakın bir fırçalama metoduna sahipti ayrıca, bu gruptaki hastaların hiç birisi daha önce periodontal tedavi görmemişti. S.S. olan hastalarda dişeti oluğu kanama indeksi ortalaması,  $3.32 \pm 0.21$  (1.62-5.0), cep derinliği ortalaması,  $3.16 \pm 0.13$  mm (2.34-4.47 mm) ve Russell periodontal indeks ortalaması ise  $4.39 \pm 0.38$  (1.50-8.0) olarak hesaplandı (Tablo 6).

Bu hasta grubunda stimüle edilmiş parotis salyası akış hızı ortalaması,  $0.29 \pm 0.06$  ml/dk (0-0.85 ml/dk) olarak bulundu (Tablo 9,10). S.S. olan hastaların tümünde dudaklarda, dilde ve ağız mukozasında değişen derecelerde kuruluk gözlemlendi. Dudaklarda pullanma, angular chelitis, dilde fissürleşme ve papillalarda atrofi, stomatit ile yaygın diş çürüklerine bu hasta grubunda sıklıkla rastlandı (Resim 2).



Resim 2 : S.S. olan bir hastada dudak kuruluğu ve dişeti iltihabı.

2. Periodontitis grubu : Bu grubu oluşturan 5'i erkek ve 5'i kadın olan toplam 10 hastanın yaşları 30 ile 55 arasında değişiyordu (ort.  $43.7 \pm 3.07$ ). Tüm hastaların ağızında toplam 222 diş mevcuttu ve hasta başına ortalama  $22.2 \pm 1.26$  diş düşüyordu.

Ağız bakımı alışkanlıkları açısından hastalar değerlendirildiğinde, bir tanesinin günde bir defa, diğerlerinin ise çok seyrek aralıklarla dişlerini fırçaladığı görüldü. Plak indeksi ortalaması,  $\% 76.2 \pm 6.45$  ( $\% 39-100$ )

olarak hesaplandı. Hastaların sadece bir tanesi modifiye Stillman tekniğine yakın bir fırçalama metodu tarif etti. Ayrıca, periodontitis grubunu oluşturan bireylerin hiçbirisi daha önce periodontal tedavi görmemişti.

Bu hastalarda dişeti oluşu kanama indeksi ortalaması  $3.53 \pm 0.46$  (0.22-4.60), cep derinliği ortalaması  $3.99 \pm 0.19$  mm (3.23-4.77 mm) ve Russel periodontal indeks ortalaması ise  $5.98 \pm 0.21$  (4.73-7.11) olarak hesaplandı (Tablo 6).

3. Sağlıklı kontrol grubu : Bu grubu yaşları 23 ile 44 arasında değişen (ort.  $29.88 \pm 1.34$ ) 7'si kadın, 10'u erkek olan toplam 17 gönüllü birey oluşturdu. Ağızlarında toplam 453 diş olan bu bireylerin, kişi başına  $26.65 \pm 0.40$  diş düşüyordu.

Bu grubu oluşturan bireylerin diş fırçalama sıklığı günde iki ile dört defa arasında değişiyordu. Plak indeksi ortalaması,  $\% 19.12 \pm 3.50$  (% 5-62) olarak hesaplandı. Bir birey dışında kalanların hepsi modifiye Stillman tekniği ile dişlerini fırçalıyorlardı.

Sağlıklı kontrol bireylerinde dişeti oluşu kanama indeksi ortalaması  $0.18 \pm 0.03$  (0-0.44), cep derinliği ortalaması,  $1.60 \pm 0.06$  mm (1.27-2.05 mm) ve Russel periodontal indeks ortalaması ise  $0.23 \pm 0.06$  (0-0.85) olarak hesaplandı (Tablo 6).

Sağlıklı 20 bireyde stimüle edilerek toplanan parotis salyası akış hızı ortalaması  $0.84 \pm 0.1$  ml/dk (0.28-1.90 ml/dk) olarak bulundu (Tablo 8,10).

S.S. olan hasta grubu ile periodontitisli grup arasında sadece cep derinliği ile Russel periodontal indeks açısından istatistiki olarak önemli fark bulundu ( $p < 0.05$ ). Yaş, diş sayısı, plak indeksi ve dişeti oluşu kanama indeksi açısından bu iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu.

Tablo 6 : Hasta ve kontrol gruplarının klinik bulguları.

PARAMETRELER	SJÖGREN SENDROMU <sup>†</sup> (n:17)	PRİMER S.S. <sup>‡</sup> (n:12)	SEKONDER S.S. <sup>‡</sup> (n:5)	PERİODONTİTİS <sup>‡</sup> (n:10)	NORMAL KONTROL (n:17)
YAŞ	44.12±3.54	43.58±4.55	45.40±5.79	43.70±3.07	29.88±1.34
DİŞ SAYISI	17.76±1.68	17.92±2.06	17.40±3.18	22.20±1.26	26.65±0.40
PLAK (%)	86.12±4.42	83.17±5.87	93.20±4.57	76.2±6.45	19.12 <sup>‡</sup> ±3.50
KANAMA İNDEKSİ (SBI)	3.32±0.21	3.25±0.28	3.51±0.26	3.53±0.46	0.18±0.03
CEP DERİNLİĞİ ORTALAMASI (mm)	3.16±0.13 <sup>†</sup>	3.18±0.15 <sup>†</sup>	3.12±0.29 <sup>†</sup>	3.99±0.19	1.60±0.06
PERİODONTAL İNDEKS (RUSSEL)	4.39±0.38 <sup>†</sup>	4.62±0.50 <sup>†</sup>	3.83±0.50 <sup>†</sup>	5.98±0.21	0.23±0.06

Değerler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir.

<sup>†</sup>Periodontitisli kontrollere kıyasla önemli, p < 0.05

<sup>‡</sup>Normal kontrollere göre bütün parametreler açısından önemli, p < 0.05

S.S. ve periodontitisi olan hasta gruplarının her ikisi de incelenen bütün parametreler açısından sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiki olarak önemli farklılıklar bulundu ( $p < 0.05$ ).

## II. Periferik Kan Hücreleri ve Lenfosit Grupları

### A. Periferik kan mutlak beyaz küre değerleri :

Sağlıklı 30 bireyde beyaz küre ortalama değeri  $6940 \pm 358.1/\text{mm}^3$  olarak bulundu ( $2400-10.200/\text{mm}^3$ ).

Primer S.S. olan 14 hastada beyaz küre sayımı sonuçları  $3600/\text{mm}^3$  ile  $9400/\text{mm}^3$  arasında değişiyordu. Ortalama değer  $5057.1 \pm 401.3/\text{mm}^3$  bulundu.

Sekonder S.S. olan 7 hastada ise ortalama değer  $5942.9 \pm 495.1/\text{mm}^3$  ( $4400-8400/\text{mm}^3$ ) olarak ölçüldü.

Primer S.S. hastaları ile normal kontrollerin beyaz küre sayımı sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasına rağmen ( $p < 0.01$ ), sekonder S.S. hastaları ile normal kontroller arasındaki bu fark anlamsızdı.

Bu sonuçlar Tablo 7'de gösterilmektedir.

### B. Periferik kan mutlak lenfosit değerleri :

Normal 30 bireyde periferik kan lenfosit değerleri  $864/\text{mm}^3$  ile  $4000/\text{mm}^3$  arasında değişiyordu. Ortalama değer,  $2331 \pm 156.5/\text{mm}^3$  olarak bulundu.

Primer S.S. olan 14 hastanın ortalama değeri  $1721.1 \pm 129.4/\text{mm}^3$  ( $936-2914/\text{mm}^3$ ) bulundu.

Sekonder S.S. olan 7 hastada periferik kan lenfosit değerleri,  $960/\text{mm}^3$  ile  $2160/\text{mm}^3$  arasında değişiyordu. Ortalama değer  $1682.9 \pm 154.3$  bulundu.

Primer S.S. olan hastaların periferik kan lenfosit değerleri kontrol grubuna kıyasla  $p < 0.05$ 'de istatistiksel olarak önemli, sekonder S.S. grubunun değerleri ise  $p < 0.01$ 'de önemli bulundu (Tablo 7).

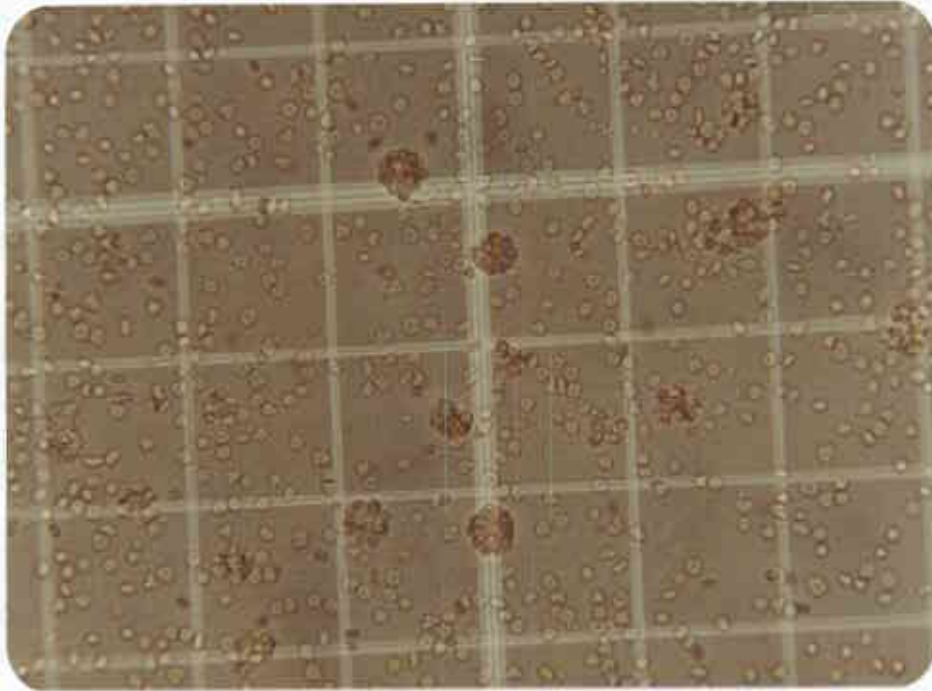
C. Periferik kan T-lenfosit ( $E^+$ -Rozet) mutlak değerleri :

Önce, konvansiyonel  $E^+$ -Rozet yöntemi ile değerlendirilen periferik kan T-lenfositleri normal 30 bireyde ortalama olarak  $1302.7 \pm 93.2/\text{mm}^3$  ( $562-2320/\text{mm}^3$ ) bulundu.

Primer S.S. olan 14 hastada periferik kan T-lenfositlerinin ortalama değeri  $865.8 \pm 80/\text{mm}^3$  bulundu. Değerler  $360/\text{mm}^3$  ile  $1240/\text{mm}^3$  arasında değişmekte idi.

Sekonder S.S. olan 7 hastada bu değer  $820.9 \pm 116.9/\text{mm}^3$  ( $451-1296/\text{mm}^3$ ) olarak bulundu.

Primer ve sekonder S.S. olan hasta gruplarının periferik kan mutlak T-lenfosit sayısında saptanan azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.01$ ) (Resim 3, Tablo 7).



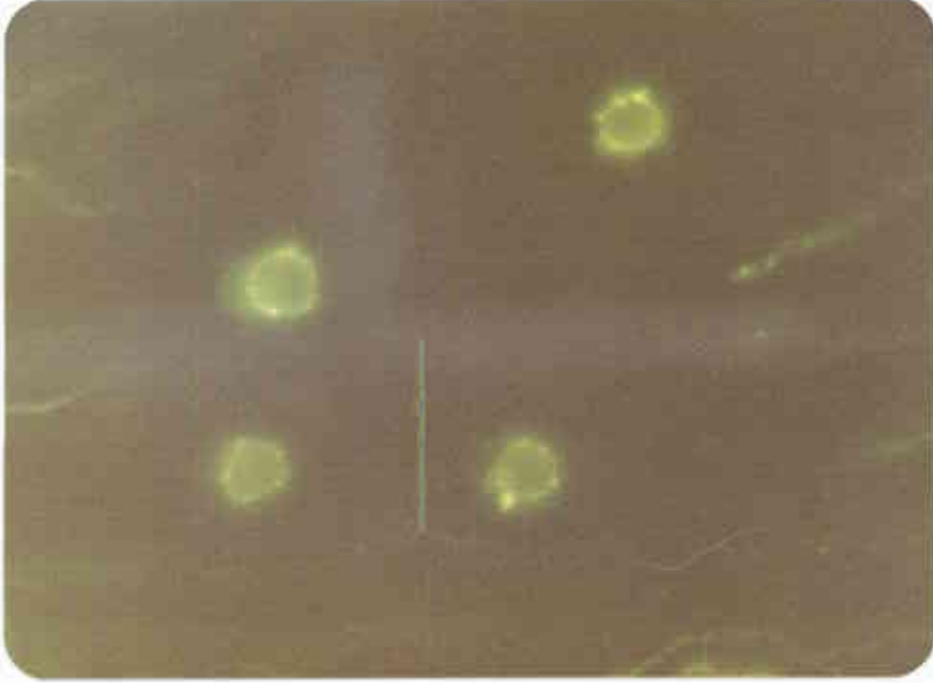
Resim 3 : Periferik kan T-lenfositlerinin  $E^+$ -Rozet yöntemi ile değerlendirilmesi. Lenfosit etrafında rozet oluşturan koyun eritrositleri görülmektedir.

D. Periferik kan B-lenfosit ( $SmIg^+$ ) mutlak değerleri :

Normal 30 bireyde B-lenfosit mutlak değeri  $116/mm^3$  ile  $1010/mm^3$  arasında değişiyordu. Ortalama değer  $490.6 \pm 42.5/mm^3$  olarak bulundu.

Primer S.S. olan hastaların ortalama B-lenfosit değeri  $453.1 \pm 40.9/mm^3$  ( $253-849/mm^3$ ), sekonder S.S. olan grubun ortalama değeri ise  $479.1 \pm 61.2/mm^3$  ( $269-684$ ) olarak belirlendi.

B-lenfositlerinin mutlak değerleri açısından primer ve sekonder S.S. olan grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Resim 4, Tablo 7).



Resim 4 : Periferik kan B-lenfositlerinin yzey immünfloresan yntemiyle değerlendirilmesi. FITC- işaretili polivalan anti-insan Ig (G+A+M) antiserumu ile direkt immünfloresan yntemi kullanılarak yapılan incelemede, yzey immnglobulini taşıyan lenfositler gcrulmektedir (Yağ immersiyonu X1125).

E. Monoklonal antikorlar ile belirlenen periferik kan lenfosit alt-grupları :

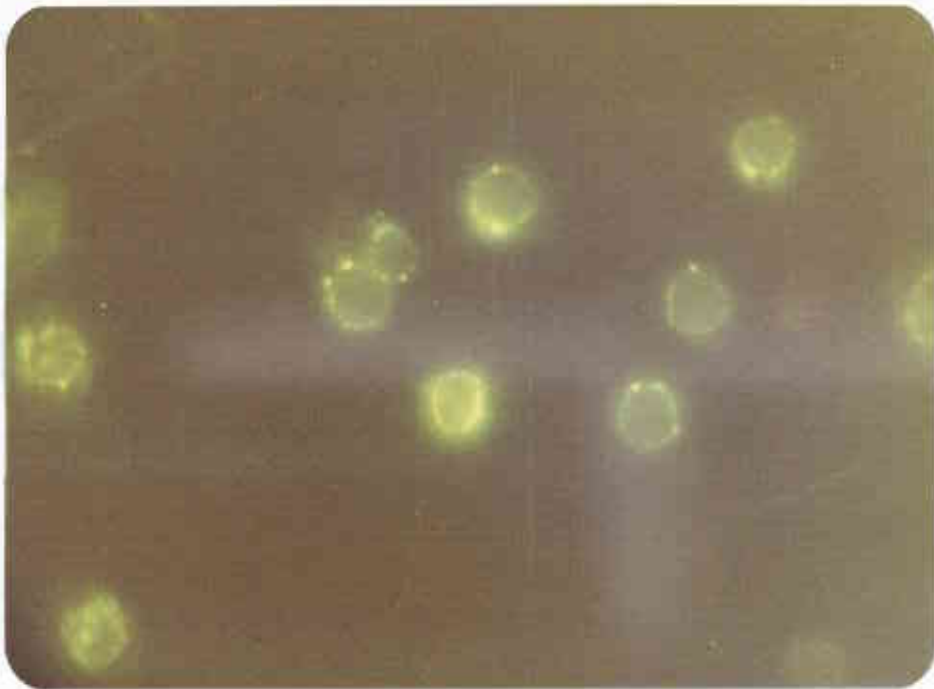
a- T-lenfositleri (Pan-T Pozitif Hücreler) :

Pan-T monoklonal antikorları ile pozitif reaksiyon veren 30 sağlıklı kontrolün periferik kan mutlak T-lenfositleri ortalama değeri  $1025.2 \pm 90/\text{mm}^3$  (285-1864) olarak bulundu.

Primer S.S. olan grupta bu değerler  $225/\text{mm}^3$  ile  $1107/\text{mm}^3$  arasında değişiklik gösterdi. Ortalama değer  $769 \pm 66.2/\text{mm}^3$  idi.

Ortalama değer  $799.4 \pm 137.5/\text{mm}^3$  olarak bulunduğu sekonder S.S. olan grupta değerler,  $403/\text{mm}^3$  ile  $1468/\text{mm}^3$  arasında değişiyordu.

Sonuçlar açısından primer S.S. olan grup, kontrol grubu ile kıyaslandığında aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). Sekonder S.S. olan grup ile kontrol grubu arasında ise fark önemsizdi (Resim 5, Tablo 7). Pan-T monoklonal antikoru ile elde edilen sonuçlar, konvansiyonel E<sup>+</sup>-Rozet yöntemi ile elde edilen sonuçlarla pozitif korrelasyon göstermiştir.



Resim 5 : Periferik kan T-lenfositlerinin, Pan-T monoklonal antikoru ile değerlendirilmesi. İndirekt immünfloresan yöntemi ile yapılan incelemede pozitif reaksiyon veren hücreler görülmektedir (Yağ immersiyonu X1125).



Tablo 7 : Periferik kan lenfosit grupları.

HÜCRELER ( $\text{mm}^{-3}$ )	PRİMER S.S. (n:14)	SEKONDER S.S. (n:7)	KONTROL (n:30)
Total Beyaz Küre	5057.1±401.3 †	5942.9±495.1	6940.0±358.1
Lenfositler	1721.1±129.4 †	1682.9±154.3 †	2331.0±156.5
B-Lenfositleri (SmIg <sup>+</sup> )	453.1±40.9	479.1±61.2	490.6±42.5
T-Lenfositleri E <sup>+</sup> -Rozet	865.8±80.0 †	820.9±116.9 †	1302.7±93.2
<u>MONOKLONAL ANTİKORLAR</u>			
Pan-T	769.0±66.2 †	799.4±137.5	1025.2±90.0
Yardımcı-T (Ty)	541.1±63.5	483.0±140.0	733.7±63.6
Baskılayıcı-T (Ts)	374.6±63.1 †	259.0±55.2 †	565.5±44.8
HLA-DR (+)	488.0±51.9	498.9±67.6	578.3±60.0
Ty / Ts oranı	1.6±0.2	1.8±0.3	1.4±0.1

Değerler mutlak sayılar olarak ortalama ± standart hata şeklinde gösterilmiştir.

† Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli,  $p < 0.05$

‡ Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli,  $p < 0.01$

b- Yardımcı T- (Ty) Lenfositleri :

Yardımcı T-lenfositlerinin mutlak değeri sağlıklı 30 bireyde  $167/\text{mm}^3$  ile  $1787/\text{mm}^3$  arasında değişiyordu. Ortalama değer  $733.7 \pm 63.6/\text{mm}^3$  olarak bulundu.

Primer S.S, olan hastalarda yardımcı T-lenfositlerinin ortalama değeri  $541.1 \pm 63.5/\text{mm}^3$  ( $140-1020/\text{mm}^3$ ), sekonder S.S. olan hastalarda ise,  $483 \pm 140/\text{mm}^3$  ( $90-657/\text{mm}^3$ ) olarak belirlendi.

Primer ve sekonder S.S. olan hastaların yardımcı T-lenfositlerinin mutlak değerleri, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermedi (Tablo 7).

c- Baskılayıcı T- (Ts) Lenfositleri :

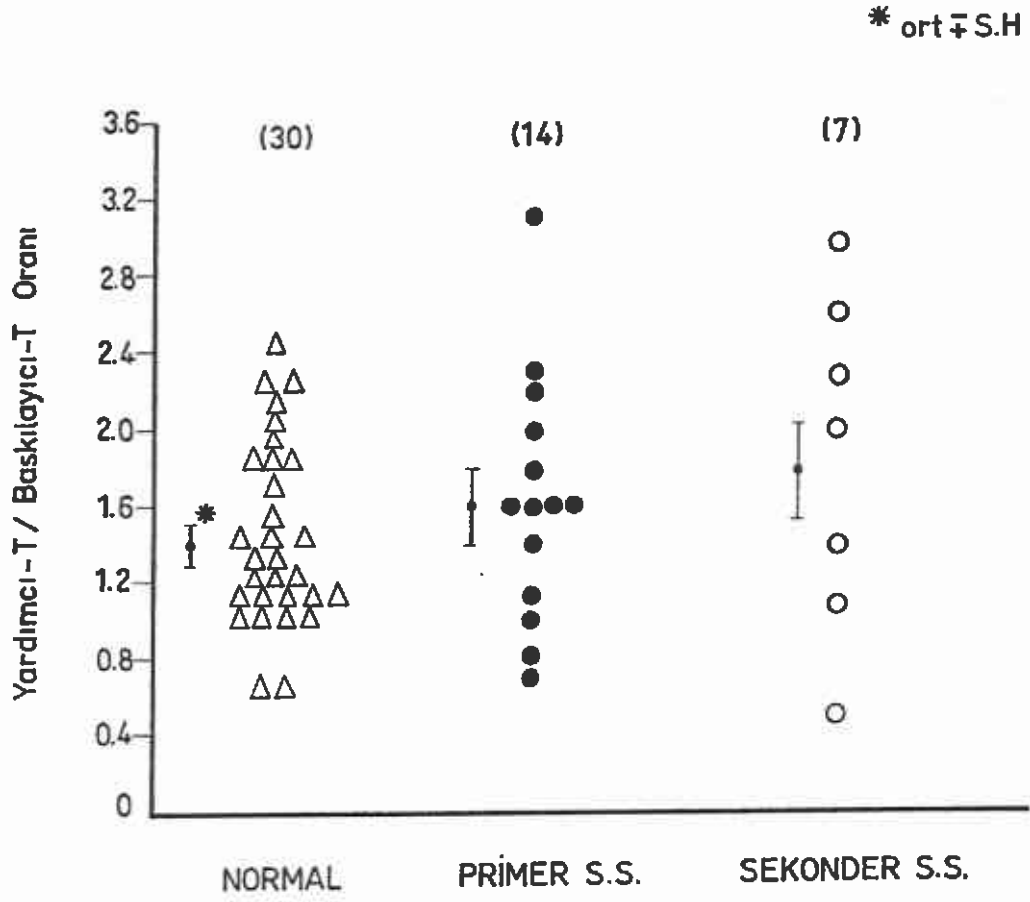
Normal kontrollerde baskılayıcı T-lenfositlerinin ortalama değeri  $565.5 \pm 44.8/\text{mm}^3$  olarak bulundu ( $168/\text{mm}^3 - 978/\text{mm}^3$ ). Primer S.S. olan hastalarda bu değer,  $374.6 \pm 63.1/\text{mm}^3$  ( $104/\text{mm}^3 - 991/\text{mm}^3$ ), sekonder S.S. olan hastalarda ise,  $259 \pm 55.2/\text{mm}^3$  ( $58/\text{mm}^3 - 427/\text{mm}^3$ ) olarak saptandı.

Primer ve sekonder S.S. olan hastalarda, baskılayıcı T-hücrelerinde, normal kontrol grubuna kıyasla, istatistiki olarak önemli farklılık bulundu ( $p < 0.05$ ) (Tablo 7).

d- Yardımcı T / Baskılayıcı-T Lenfositleri Oranı (Ty : Ts) :

30 normal bireyde Ty/Ts oranı  $1.4 \pm 0.1$  ( $0.6-2.4$ ) bulunurken, primer S.S. olan hastalarda,  $1.6 \pm 0.2$  ( $0.7-3.0$ ), sekonder S.S. olan hastalarda ise  $1.8 \pm 0.3$  ( $1.1-2.9$ ) olarak bulundu.

Primer ve sekonder S.S. olan hasta grupları ile normal kontrol grubu arasında Ty/Ts oranında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Şekil 7, Tablo 7).



Şekil 7. Sjögren Sendromu Hastalarında ve Normal Kontrollerde Periferik Kan Yardımcı-T, Baskılayıcı-T Lenfosit Oranları.

e- HLA-DR antijeni taşıyan lenfositler :

Normal kontrollerde periferik kanda DR antijeni pozitif olan lenfositlerin ortalama değeri  $578.3 \pm 60/\text{mm}^3$  ( $253-1087/\text{mm}^3$ ) olarak bulundu.

Primer S.S. olan hastalarda bu değer  $488 \pm 51.9/\text{mm}^3$  ( $187-932/\text{mm}^3$ ), sekonder S.S. olan hastalarda ise,  $498.9 \pm 67.6/\text{mm}^3$  ( $298-811/\text{mm}^3$ ) olarak saptandı.

Primer ve sekonder S.S. olan hasta grupları ile normal kontrol grubu arasında HLA-DR<sup>(+)</sup> lenfositlerde istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 7).

III. Serum İmmüoglobulin Düzeyleri :

a- IgG Düzeyleri :

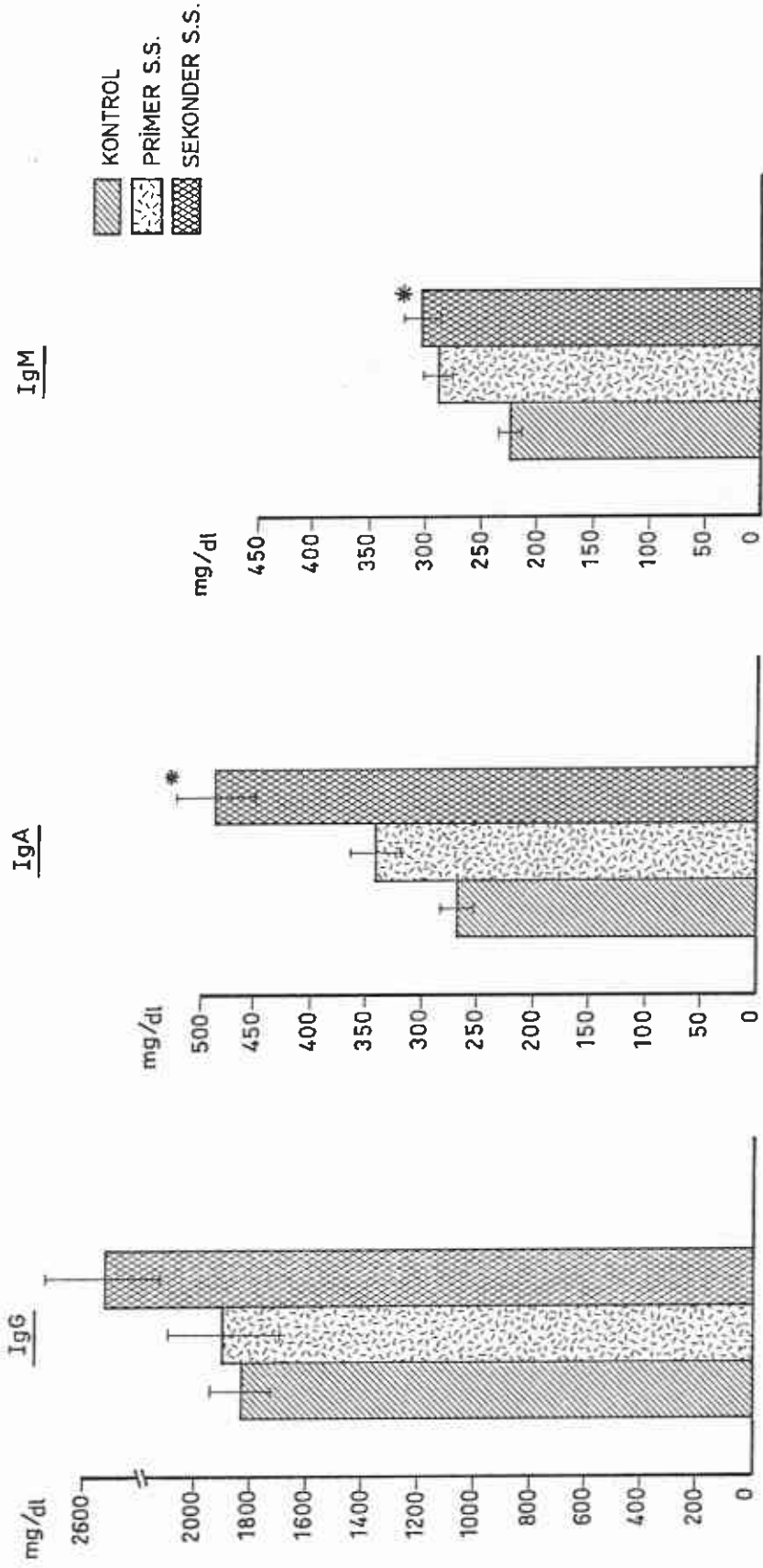
30 sağlıklı kontrolde, ortalama IgG değerleri  $1876 \pm 114$  % mg ( $720-3060$  % mg) olarak belirlenirken, primer S.S. olan hastalarda ortalama değer  $1913 \pm 220.1$  % mg ( $802-3770$  % mg), sekonder S.S. olan hastalarda ise,  $2577.1 \pm 338.3$  mg % ( $1370-3770$  mg %) bulundu.

Primer ve sekonder S.S. olan gruplar ile kontrol grubu serum IgG değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 8).

b- IgA Düzeyleri :

Sağlıklı kontrol grubunda ortalama IgA değeri  $265.5 \pm 19.3$  % mg ( $124 - 538$  % mg) bulunurken, primer S.S. olan grupta  $344.9 \pm 41.8$  % mg ( $181-634$  % mg), sekonder S.S. olan grupta ise  $483.3 \pm 66.3$  % mg ( $252-634$  % mg) olarak belirlendi (Şekil 8).

SERUM İMMÜNGLOBULİN DÜZEYLERİ



\* Kontrollere kıyasla önemli,  $p < 0.05$

Şekil 8. Hasta Gruplarında ve Normal Kontrollerde Serum İmmünglobulin Düzeyleri.

Primer S.S. olan hastalar ile kontrol grubu, IgA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamasına rağmen, sekonder S.S. olan hastalar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ) (Şekil 8).

c. IgM Düzeyleri :

Normal kontrollerde ortalama IgM değeri  $225.5 \pm 20.4$  % mg (116-536 % mg) olarak bulunurken, primer S.S. olan hastalarda bu değer,  $295.4 \pm 36.3$  % mg (103-483 % mg), sekonder S.S. olan grupta ise  $304 \pm 46.4$  % mg (152-471 % mg) olarak ölçüldü.

Primer S.S. hastaları ile kontrol grubu IgM düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Sekonder S.S. olan grup ile kontrol grubu arasındaki fark ise anlamlı idi ( $p < 0.05$ ) (Şekil 8).

IV. Parotis Salyasında Sekretuar İmmüoglobulin Düzeyleri ve Serbest Sekretuar Komponentin (Sc) Değerlendirilmesi :

a. sIgA değerleri ve Tükürük Protein Tayinleri :

Normal kontrollerden steril şartlarda ve stimüle edilerek toplanan parotis salyasında, konsantre edilmeden ölçülen sekretuar IgA ortalama değeri  $2.41 \pm 0.2$  mg/dl olarak bulundu. Bu grupta sekretuar IgA değerleri 0.6 mg/dl ile 4.2 mg/dl arasında değişme gösterdi (Tablo 8,10).

Sjögren Sendromu tanısı konulan 20 hastanın parotis salyası sIgA ortalama düzeyi  $4.59 \pm 0.92$  mg/dl (0.3-14 mg/dl) olarak bulundu (Tablo 9,10).

Bu değerlerdeki artım, normal kontrollere göre istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p < 0.05$ ).

Tablo 8 : Normal kontrollerde parotis salyası akış hızı ve sekretuar sistem.

NORMAL KONTROLLER	Tükürük Akış Hızı (ml/dk)	Tükürük Immüoglobulinleri (mg/dl)			Tükürükte Serbest Sekretuar Komponent
		IgG	IgA	IgM	
1. A.A.	0.30	<0.5	1.6	>13†	+
2. Y.Ü.	0.83	<0.5	1.8	<0.5	+
3. N.Ç.	0.70	<0.5	1.8	<0.5	+
4. E.Y.	0.50	<0.5	0.6	<0.5	+
5. A.T.	0.44	<0.5	3.9	<0.5	+
6. T.A.	0.50	<0.5	1.8	<0.5	+
7. T.K.	1.50	<0.5	2.8	<0.5	+
8. H.C.	1.20	<0.5	1.7	<0.5	+
9. Z.Ç.	0.63	<0.5	3.4	<0.5	+
10. N.Ç.	0.68	<0.5	3.1	<0.5	+
11. M.B.	0.28	<0.5	2.2	<0.5	+
12. S.E.	0.40	<0.5	3.4	<0.5	+
13. H.Ö.	0.66	<0.5	1.8	<0.5	+
14. H.E.	0.83	<0.5	1.3	<0.5	+
15. S.K.	1.50	<0.5	2.2	<0.5	+
16. E.E.	1.40	<0.5	2.8	6.5	+
17. K.Ş.	1.00	<0.5	4.2	<0.5	+
18. A.E.	1.90	<0.5	3.1	<0.5	+
19. S.T.	0.83	<0.5	2.2	<0.5	+
20. Y.K.	0.70	<0.5	2.5	<0.5	+
Ortalama ± S.H. 0.84±0.1		-	2.41±0.2	-	

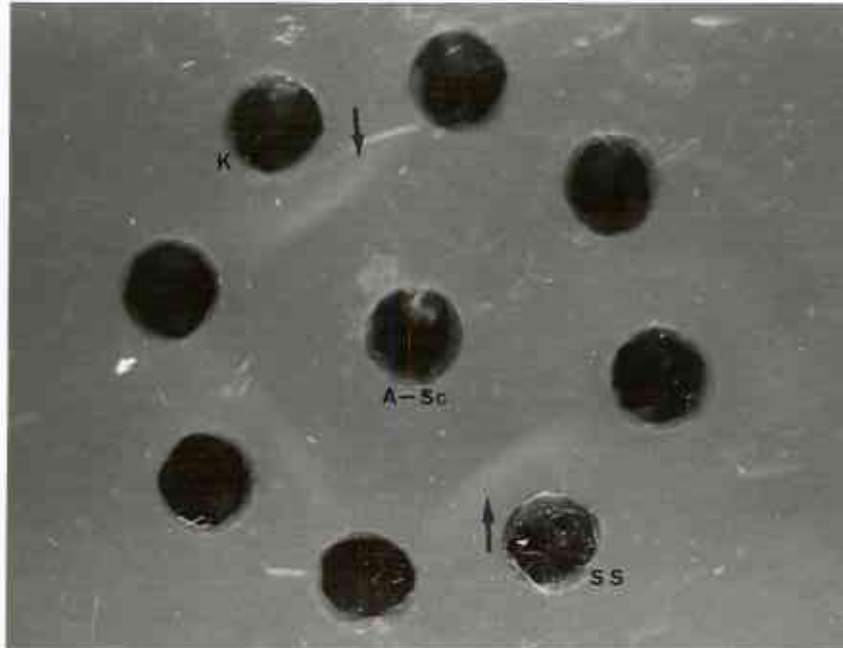
Tablo 9 : Sjögren sendromunda parotis salyası akış hızı ve sekretuar sistem.

HASTA GRUPLARI	Tükürük Akış Hızı (ml/dk)	Tükürük İmmünglobulinleri (mg/dl)			Tükürükte Serbest Sekretuar Komponent
		IgG	IgA	IgM	
<b>I.PRİMER S.S.</b>					
1. H.S.	0.02	1.7	11.6	7.1	+
2. Ş.K.	0.45	<0.5	2.0	<0.5	+
3. M.Ç.	0.40	<0.5	3.3	12.4	-
4. M.Y.	0.85	<0.5	1.7	<0.5	+
5. E.Ö.	0.12	<0.5	6.4	<0.5	+
6. R.B.	0.47	<0.5	1.8	<0.5	-
7. A.T.	0.85	<0.5	0.9	<0.5	-
8. T.U.	0.40	<0.5	0.9	<0.5	-
9. K.T.	0.02	<0.5	4.7	<0.5	-
10. E.E.	0.04	-	2.1	-	-
11. R.A.	0.07	<0.5	1.5	<0.5	+
12. F.P.	0.45	<0.5	1.5	<0.5	-
13. A.A.	0.10	<0.5	5.4	<0.5	+
Ortalama±S.H.	0.33±0.08	-	3.37±0.84	-	
<b>II.SEKONDER S.S.</b>					
1. F.Ç.	0.01	<0.5	9.8	5.8	+
2. F.G.	0.43	<0.5	7.4	<0.5	+
3. L.H.	0.07	<0.5	3.5	<0.5	+
4. S.B.	0.25	<0.5	0.3	<0.5	-
5. G.A.	0.01	2.00	14.0	<0.5	+
6. F.P.	0.73	<0.5	1.8	<0.5	+
7. A.E.	~ 0	5.10	11.2	<0.5	+
Ortalama±S.H.	0.21±0.1	-	6.86±1.9	-	



Deneyin ikinci kısmında parotis salyası akış hızı ve hacimleri yönünden kontrollere göre çok düşüklük gösteren S.S. hastalarının salyadaki total protein miktarı ve sentezlenen sIgA'nın birim mg. protein başına düşen düzeyleri hesaplandı. Bu değerlendirmeler yapıldığında 20 S.S. hastasının total tükürük protein miktarı ort.  $1.90 \pm 0.16$  mg/ml bulundu ve bu değer normal kontrollerde elde edilen ort. değer  $2.47 \pm 0.34$  mg/ml ile istatistiksel olarak bir farklılık göstermedi. Aynı metodla sIgA mg/mg protein olarak hesaplandığında Sjögren sendromu hastalarının ort. değeri  $0.014 \pm 0.04$  bulundu ve bu değer normal kontrol ort. değeri olan  $0.013 \pm 0.003$ 'den istatistiksel olarak bir farklılık göstermedi (Tablo 10).

Konsantre edilmeden çalışılan parotis salyasında serbest sekretuar komponent değerlendirildiğinde 20 hastanın 12'sinde Ouchterlony immüdiffüzyon tekniği ile özgül anti-Sc antikoru ile presipitasyon bandı veren serbest Sc saptanmıştır (Resim 6). Sağlıklı kontrollerin hepsinde parotis salyası Sc varlığı gösterilmiştir.



Resim 6 : Sjögren Sendromu ve sağlıklı kontrol grubuna ait parotis salyası örneklerinde serbest sekretuar parçanın değerlendirilmesi. Ouchterlony immüdiffüzyon tekniği ile yapılan incelemede her iki grupta da aynı presipitasyon bandını veren serbest Sc varlığı görülmektedir (Sc : Sekretuar parça).

Tablo 10 : Parotis salyası akış hızı, sekretuar IgA ve total protein değerleri.

PARAMETRELER	SJÖGREN SENDROMU (n:20)	PRİMER S.S. (n:13)	SEKONDER S.S. (n:7)	KONTROL (n:20)
Akış Hızı (ml/dk)	0.29 ± 0.06 <sup>†</sup>	0.33 ± 0.08 <sup>†</sup>	0.21 ± 0.1 <sup>†</sup>	0.84 ± 0.1
sIgA (mg/dl)	4.59 ± 0.92 <sup>†</sup>	3.37 ± 0.84	6.86 ± 1.9 <sup>†</sup>	2.41 ± 0.2
-----				
Total Tükürük Proteini (mg/ml)	1.90 ± 0.16	-	-	2.47 ± 0.34
Sekretuar IgA (mg/mg. protein)	0.014 ± 0.004	-	-	0.013 ± 0.003

Değerler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir.

<sup>†</sup> Kontrollere kıyasla istatistiksel olarak önemli, p < 0.05

Parotis salyası IgG ve IgM düzeyleri bir hasta dışında 19 hastada 0.5 mg/dl'nin altında bulunduğundan ölçülemeyen bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılamadı.

#### V. Serum Kompleman Düzeyleri

##### a- C3c değerleri :

Normal bireylerde ortalama C3c düzeyi  $109.9 \pm 4.5$  % mg (64-161 % mg) olarak belirlenirken, primer S.S. olan hastalarda bu değer,  $148.8 \pm 11.5$  % mg (30-206 % mg), sekonder S.S. olan grupta ise,  $163 \pm 12.7$  % mg (24-91 % mg) idi.

Primer S.S. grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamsızdı. Fakat, sekonder S.S. olan grup ile kontrol grubu arasında bu fark anlamlıydı ( $p < 0.01$ ) (Şekil 9).

##### b- C4 değerleri :

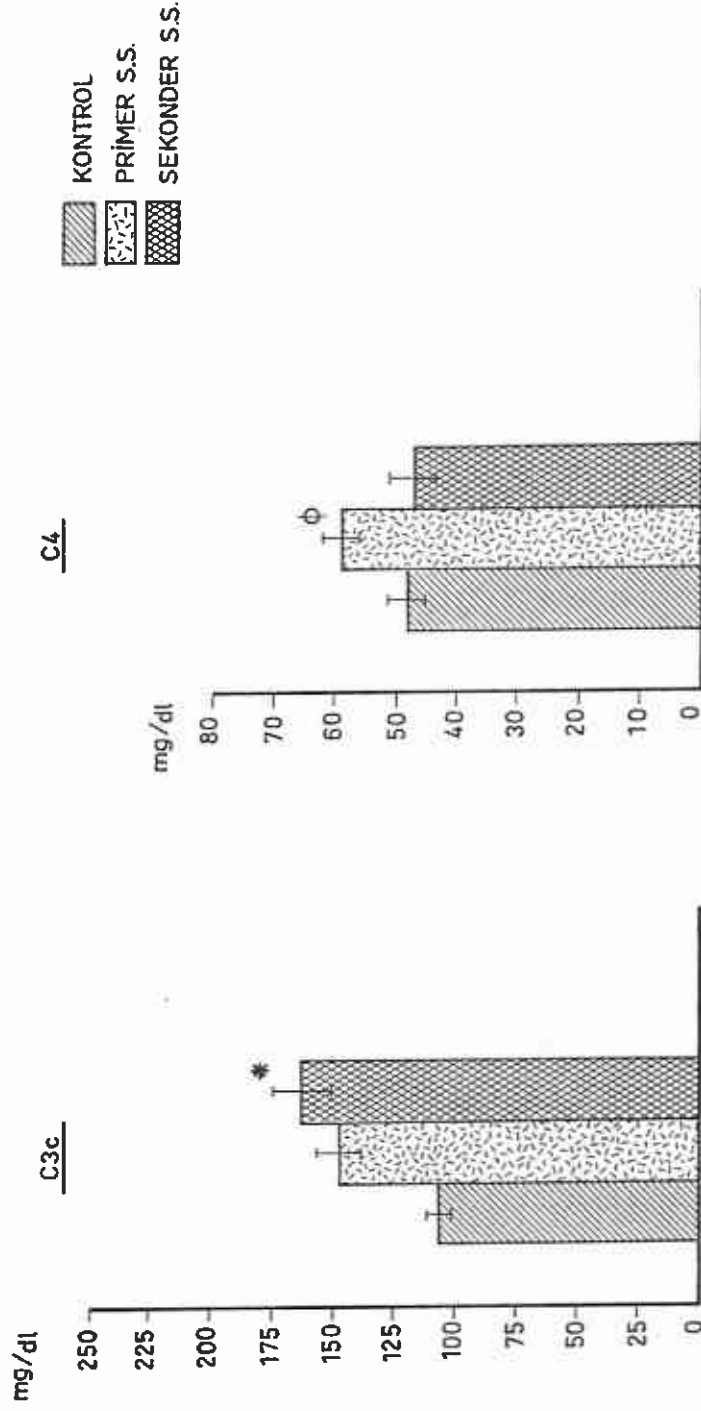
Sağlıklı kontrol grubunda ortalama C4 değeri,  $48.6 \pm 3.5$  % mg (12-100 % mg) bulundu. Primer S.S. olan hastalarda bu değer,  $59.9 \pm 4.8$  %mg (24-91 % mg), sekonder S.S. olan hastalarda ise  $47.4 \pm 6.6$  % mg (25-74 % mg) olarak saptandı.

Primer S.S. grubu ile kontrol grubu C4 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunurken, sekonder S.S. grubu ile kontrol grubu arasında bu fark anlamsızdı (Şekil 9).

#### VI. Tükürük Bezlerinin Histopatolojik İncelenmesi :

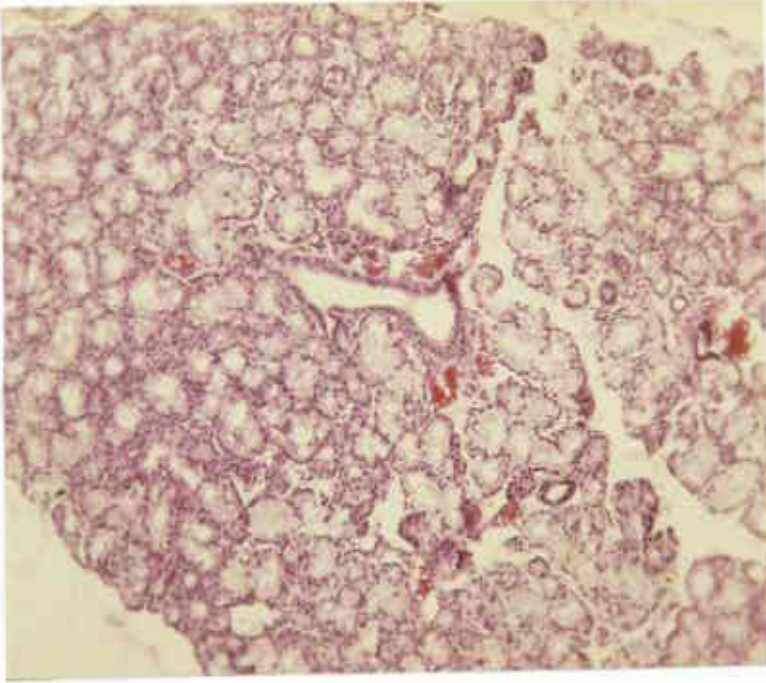
Sağlıklı 3 kişiden alınan minör tükürük bezlerinin incelenmesinde normal serömüköz bez yapısı izlendi (Resim 7). İntersitisyumda çok seyrek lenfosit ve plazma hücresi gözlemlendi.

SERUM KOMPLEMAN DÜZEYLERİ



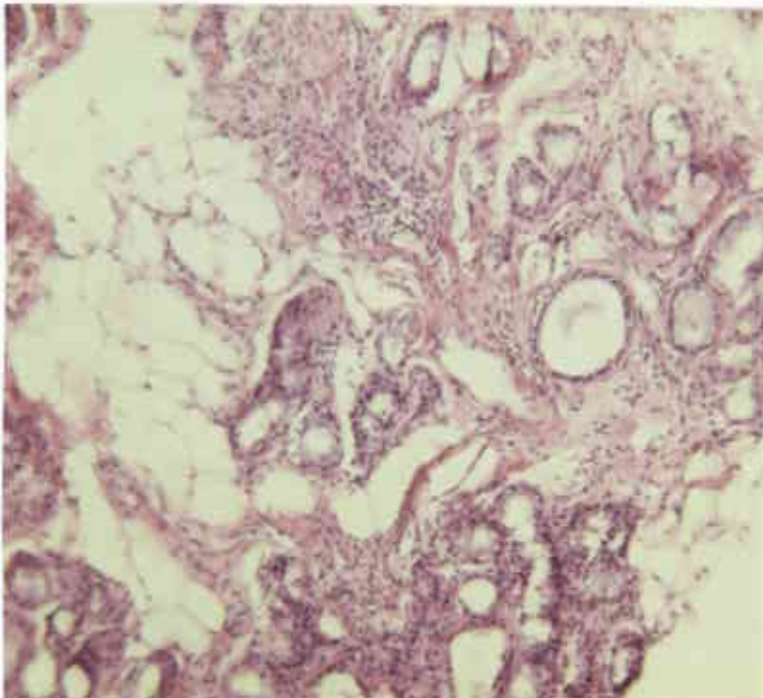
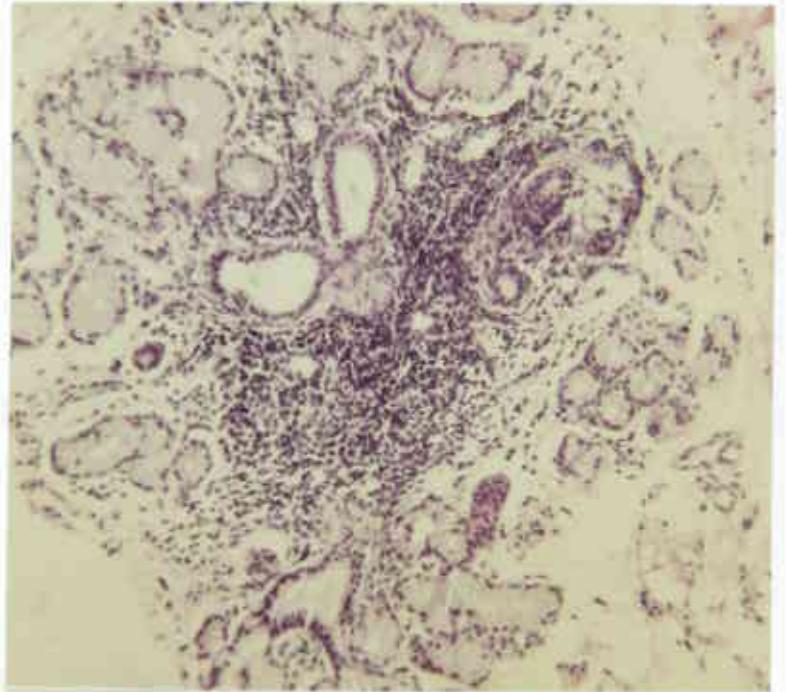
\* Kontrollere kıyasla önemli,  $p < 0.01$   
φ Kontrollere kıyasla önemli,  $p < 0.05$

Şekil 9. Hasta Gruplarında ve Normal Kontrollerde Serum Kompleman Değerleri.



Resim 7 : Normal minör tükürük bezinin histolojik yapısı. (H+E, X150)

Resim 8 : S.S. olan bir hastanın tükürük bezinde asinlarda atrofi ve duktuslarda genişlemeler izleniyor. Periduktal alanda yoğun lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu dikkati çekmektedir. (H+E, X150)



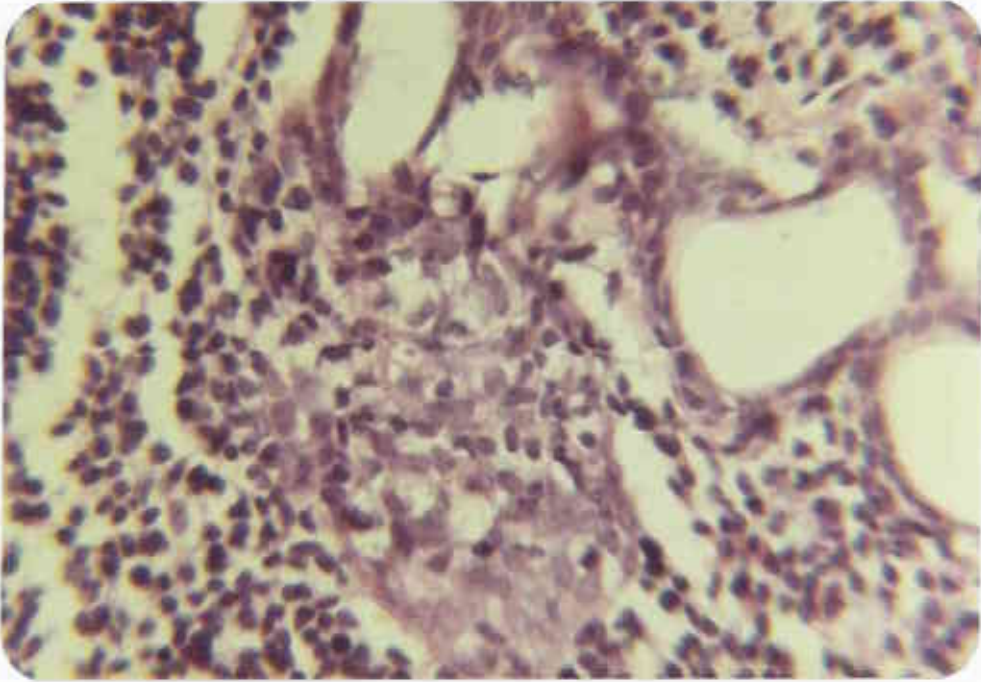
Resim 9 : S.S. olan bir hastanın tükürük bezinde ileri seviyede asiner atrofi, fibrozis ve yağ infiltrasyonu ile minimal düzeyde lenfosit infiltrasyonu izlenmektedir. (H+E, X150)

Tablo 11 : S.S. olan hastalarda minör tükürük bezi biyopsilerinin histopatolojik bulguları.

	Lenfosit infiltrasyonu*	Asiner atrofi ve fibrozis
1. H.S.	IV	Orta
2. Ş.K.	II	Orta
3. M.Ç.	IV	Minimal
4. M.Y.	I	Orta
5. E.Ö.	IV	İleri
6. R.B.	I	İleri
7. A.T.	I	Orta
8. T.U.	I	İleri
9. P.B.	IV	İleri
10. K.T.	I	İleri
11. F.F.	I	Orta
12. R.A.	II	Orta
13. F.P.	III	Orta
14. A.A.	II	Orta
15. F.Ç.	IV	Orta
16. L.H.	I	İleri
17. S.B.	II	Orta
18. G.A.	IV	Orta
19. F.P.	II	Orta
20. A.A.	IV	İleri
21. F.G.	IV	İleri

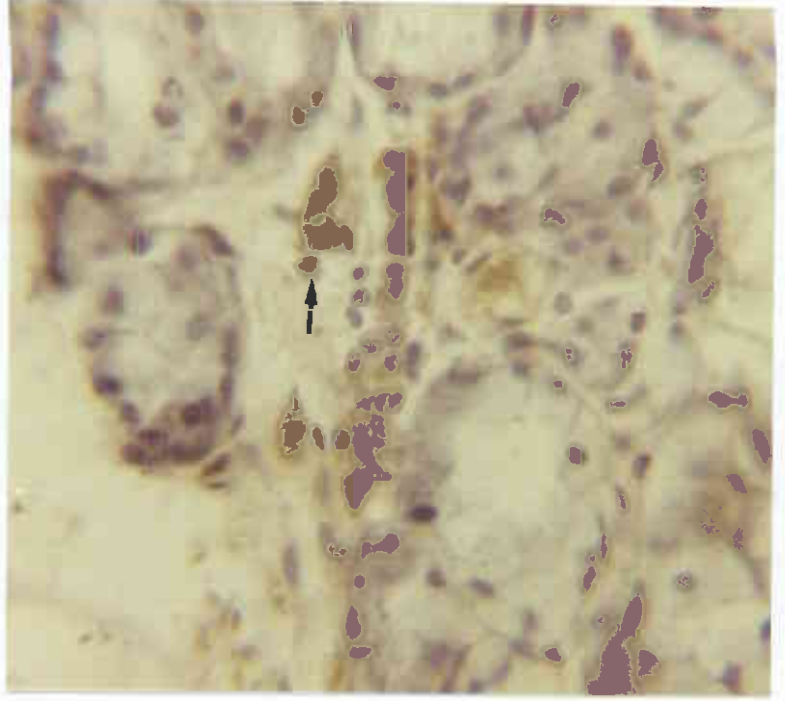
\* Chisholm ve Mason<sup>11</sup> kriterlerine göre derecelendirme yapıldı.

Sjögren sendromu olan 21 hastadan alınan tükürük bezi biyopsilerinde değişen derecelerde lenfosit infiltrasyonu, asiner atrofi, fibrozis, yağ infiltrasyonu, duktuslarda kistik genişlemeler gözlemlendi (Resim 8,9). Chisholm ve Mason kriterlerine göre<sup>(11)</sup> yapılan derecelendirmede tüm tükürük bezlerinde Grade I-IV arasında değişen lenfosit infiltrasyonu vardı (Tablo 11). Bazı dokularda ise atrofi, fibrozis ve yağ infiltrasyonunun ileri derecelere vardığı ve bu dokularda lenfosit infiltrasyonunun minimal düzeyde olduğu dikkati çekti (Resim 9). Bir vakada duktus çevresinde lenfosit infiltrasyonu içinde epimyoeptelyal lezyon saptandı (Resim 10). Sarkoidozlu bir hastadan aralıklı alınan iki biyopsi örneğinde de epitelooid histiositler ve multinükleer dev hücrelerinden oluşan nekroz içermeyen granülomlar bulundu.

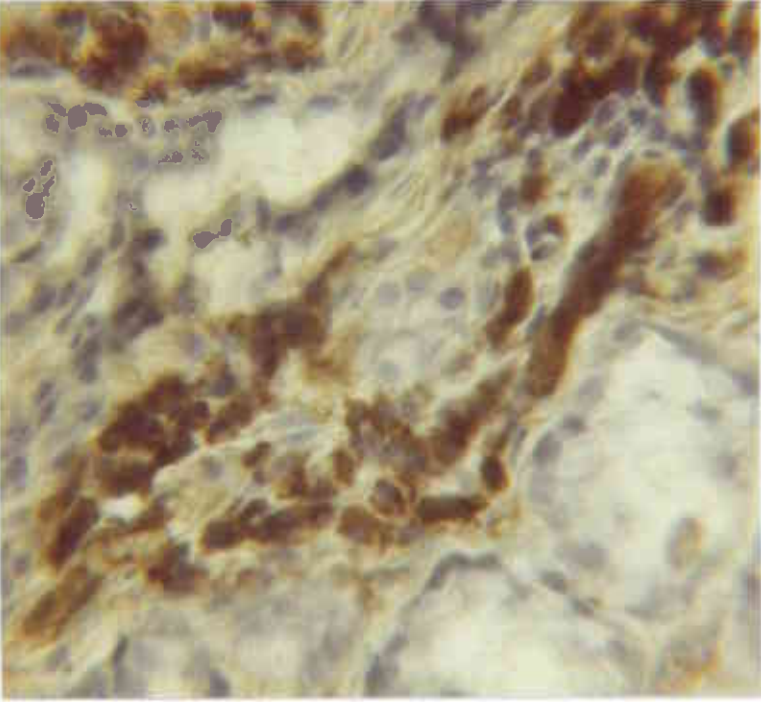


Resim 10 : Sjögren sendromu olan bir hastanın minör tükürük bezinde benign lenfoepitelyal lezyon ve lenfosit infiltrasyonu görülmektedir. (H+E, X450).

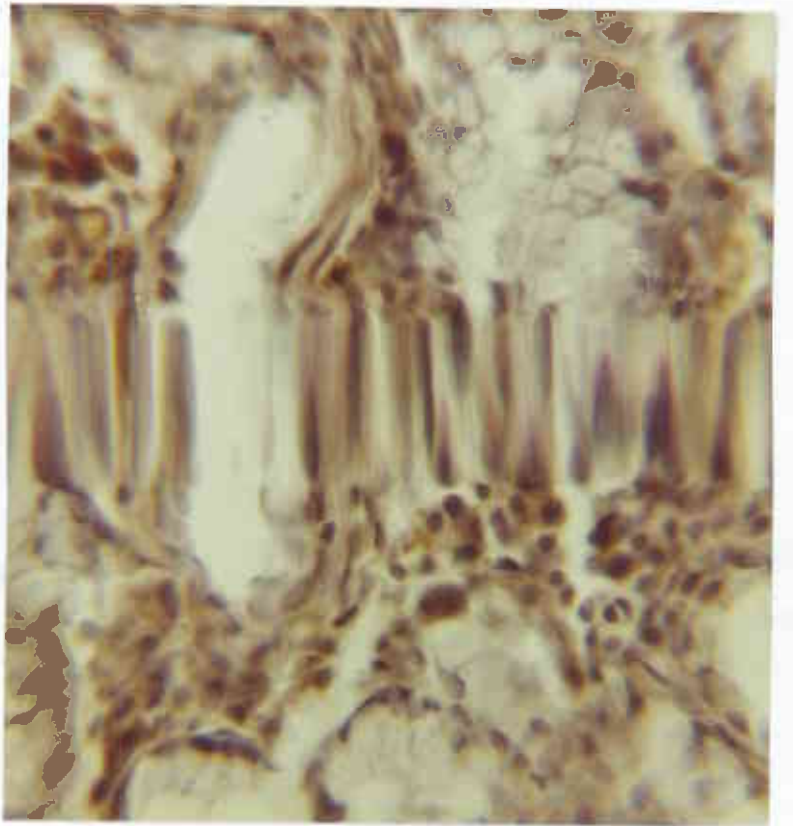
Resim 11 : Normal tükürük bezinde IgA taşıyan plazma hücreleri. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X600)



Resim 12 : Sjögren sendromu olan bir hastanın tükürük bezinde IgA taşıyan plazma hücreleri. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X600)



Resim 13 : Aynı hastanın tükürük bezinde IgG taşıyan plazma hücreleri. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X600)

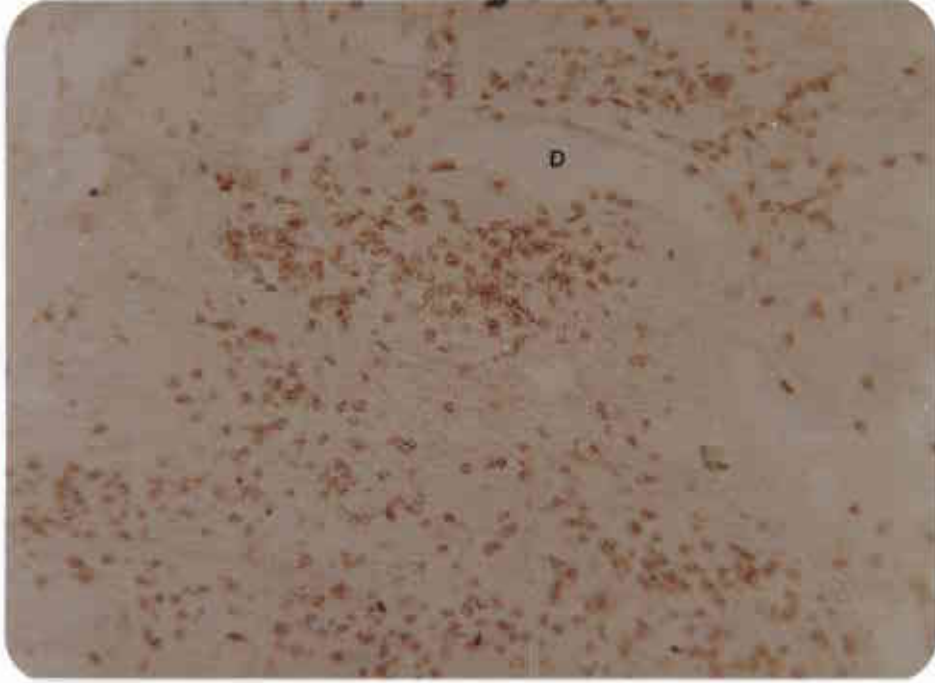




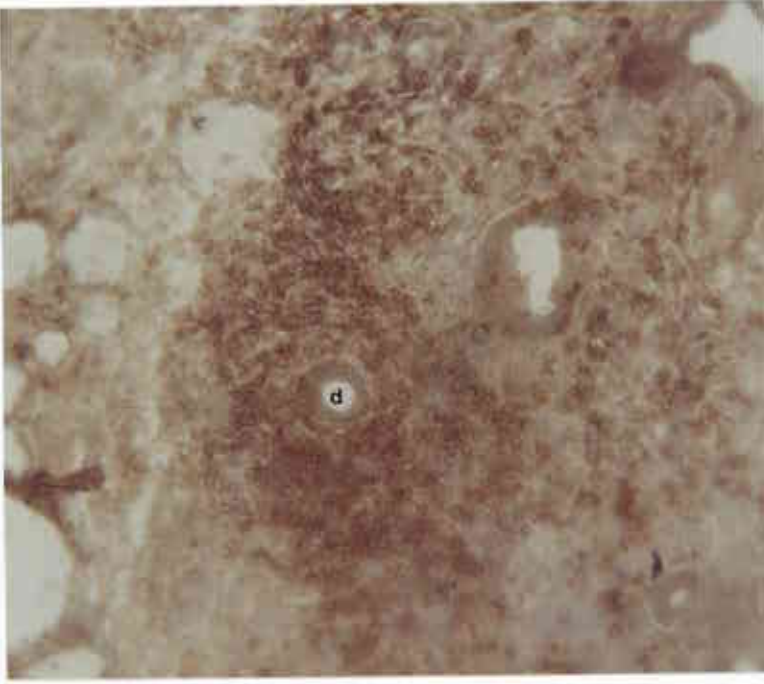
## VII. Tükürük Bezlerinin İmmünohistolojik İncelenmesi :

a- Normal tükürük bezlerinin polivalan antikorlar kullanılarak immün peroksidaz yöntemiyle incelenmesinde çok seyrek lenfoplazmositer hücrelerin daha çok IgG ve IgA taşıdıkları gözlemlendi (Resim 11).

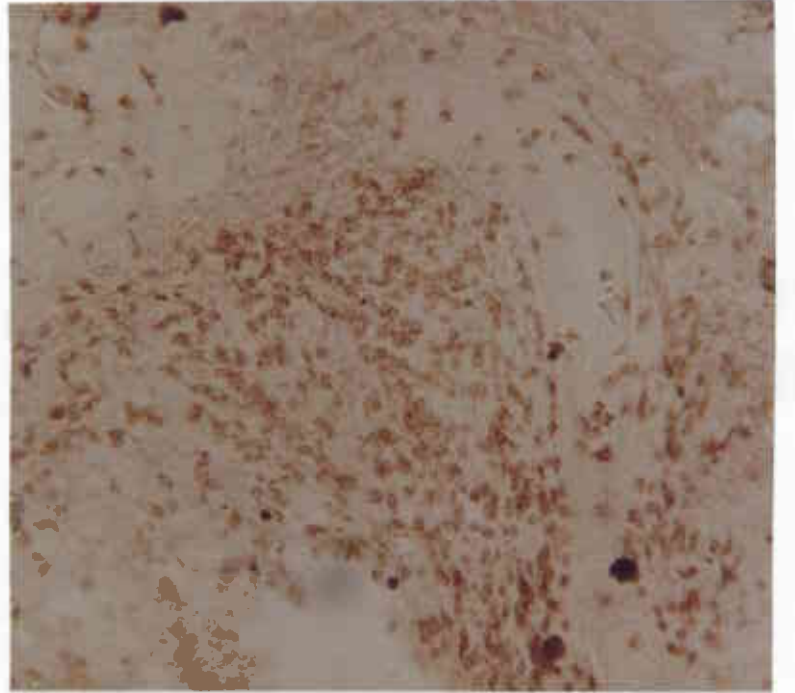
S.S. olan hastaların tükürük bezlerinin tümünde IgG ve IgA taşıyan hücrelerin eşit dağılım gösterdikleri, IgM taşıyan hücrelerin ise daha az sayıda oldukları dikkati çekti (Resim 12,13). Aynı hastaların tükürük bezlerinin polivalan antikor kullanılarak immünperoksidaz metodu ile yapılan incelenmesinde B-lenfositlerinin infiltrasyon içinde yoğun dağılım gösterdikleri görüldü (Resim 14).



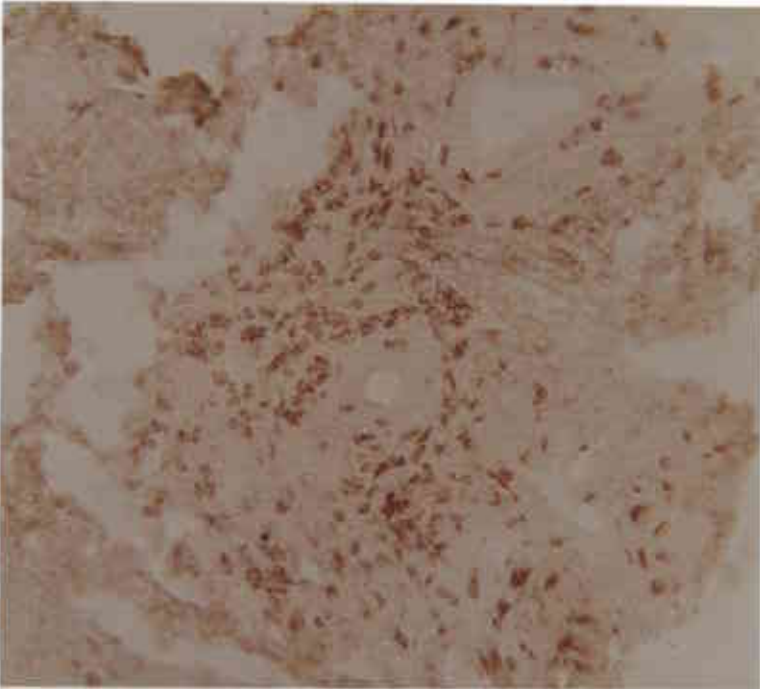
Resim 14 : Sjögren sendromu olan bir hastanın minör tükürük bezinde atrofik lobül içinde daha çok periduktal yerleşimli B-lenfositlerinin boyanması görülmektedir. (İndirekt immünperoksidaz, X112.5)



Resim 15 : Pan-T monoklonal antikor ile Sjögren sendromu olan bir hastanın tükürük bezinde T-lenfositlerinin görünümü. Hücrelerin genellikle duktus çevresinde toplanmış oldukları dikkati çekmektedir. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz, X112.5)



Resim 16 : Özgül monoklonal antikor ile aynı hastanın tükürük bezinde T-lenfositlerinin yerleşimi. Resim-15'deki T-hücrelerinin büyük kısmının yardımcı altgrupta oldukları açıkça görülüyor. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz, X112.5)



Resim 17 : Aynı tükürük bezi dokusunda baskılayıcı T-lenfositlerinin daha az sayıda bulunduğu görülmektedir. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz, X112.5)

b- Monoklonal antikorlar kullanılarak sağlıklı minör tükürük bezlerinin immünperoksidaz yöntemiyle incelenmesinde, T-hücrelerinin bulunmadığı saptandı. Bazı vakalarda asiner epitel hücrelerinde hafif DR + boyanma olduğu izlendi.

S.S. olan hastaların tükürük bezlerinde ise tüm vakalarda infiltrasyonun özellikle T-lenfositlerinden zengin olduğu saptanmış olup, bunların büyük kısmını yardımcı T-hücrelerinin oluşturduğu görüldü (Resim 15). Bu lenfositlerin en çok duktuslar çevresinde yoğunlaştığı bulundu. Yardımcı T-hücrelerinin, baskılayıcı T-hücrelerine oranı belirgin şekilde artmıştı (Resim 16,17).

DR antijeni ise kanal epitelinde ve infiltrasyondaki lenfoid hücrelerde belirgin olarak, asiner epitelde ise daha az yoğunlukta görüldü (Resim 18).



Resim 18 : Sjögren sendromu olan bir hastanın tükürük bezinde duktus çevresinde toplanmış olan lenfositlerin büyük kısmının DR-antijeni taşıdığı görülmektedir (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz, X180).

### VIII. Dişetin Histopatolojik İncelenmesi :

Sağlıklı kontrollerden alınan dişeti örneklerinin kesitlerinde normal ortokeratinize çok katlı yassı epitel altında özellikle submukozada tek tük mononükleer hücreler izlendi (Resim 19).

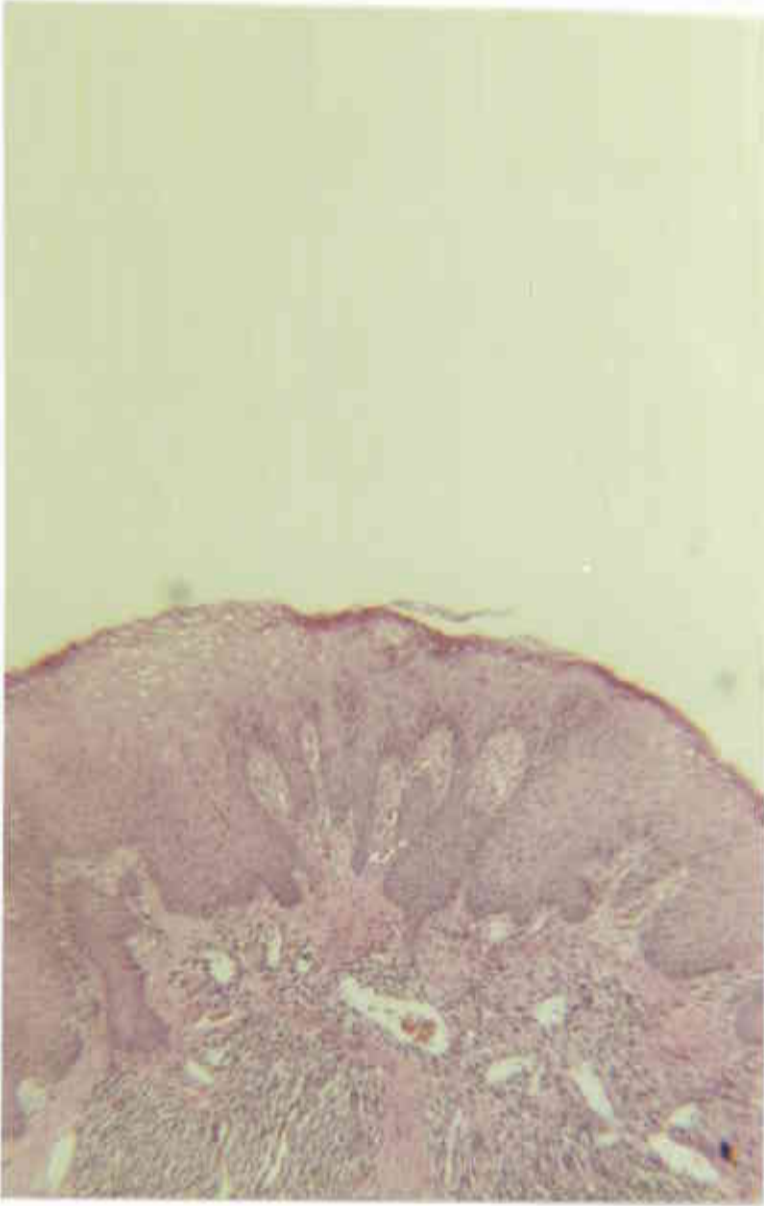
Periodontitisli hastaların dişeti örneklerinde epitelin parakeratinize, akantotik olduğu izlenirken, retepeglerde uzama ve köprülenme gözlemlendi. Epitel hücreleri arasında yer yer yoğunluk gösteren PMN lökosit infiltrasyonu mevcuttu. Bağ dokusundaki iltihabi hücre infiltrasyonu, genellikle mononükleer nitelikte olup, lenfosit ve plazma hücrelerinin birbirine yakın oranlarda dağılım gösterdiği izlendi. Yer yer PMN görülmesine rağmen, örneklerin hemen hepsinde oranları akut tablo tanısı koyduracak kadar fazla değildi (Resim 20).

S.S. olan hastaların dişeti örneklerinin incelenmesinde epitelin parakeratinizasyon gösterdiği ve retepeglerin yer yer bağ dokusu içine doğru uzanıp hiperplazik görünüm kazandığı ve 10 hastada akantotik olduğu izlendi. Bağ dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonunun genellikle fokal odaklar şeklinde ve perivasküler alanda yoğunlaştığı saptandı. Hakim hücre tipi olan lenfosit ve plazma hücreleri benzer dağılım göstermekteydi (Resim 21).

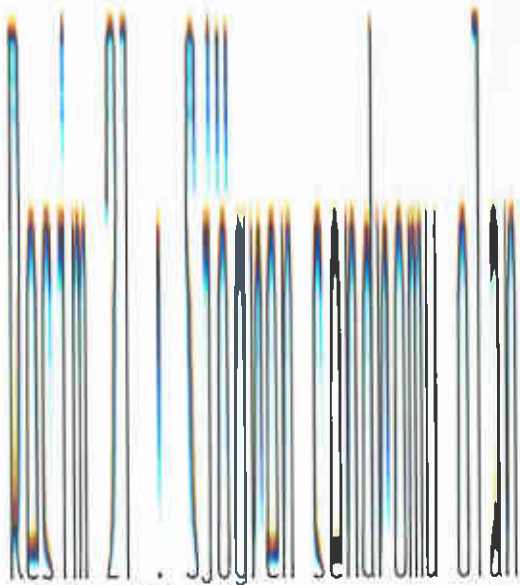
### IX. Dişetin İmmunohistolojik İncelenmesi :

a- Sağlıklı 5 kontrolden alınan dişeti biyopsilerinin polivalan antikorlar kullanılarak immünperoksidaz tekniği ile incelenmesinde damar çevrelerinde seyrek immünglobulin taşıyan plazma hücreleri gözlemlendi. IgA ve IgG taşıyan hücrelerin eşit sayılarda, IgM taşıyan hücrelerin ise çok seyrek olarak bulunduğu dikkati çekti (Resim 22,25).

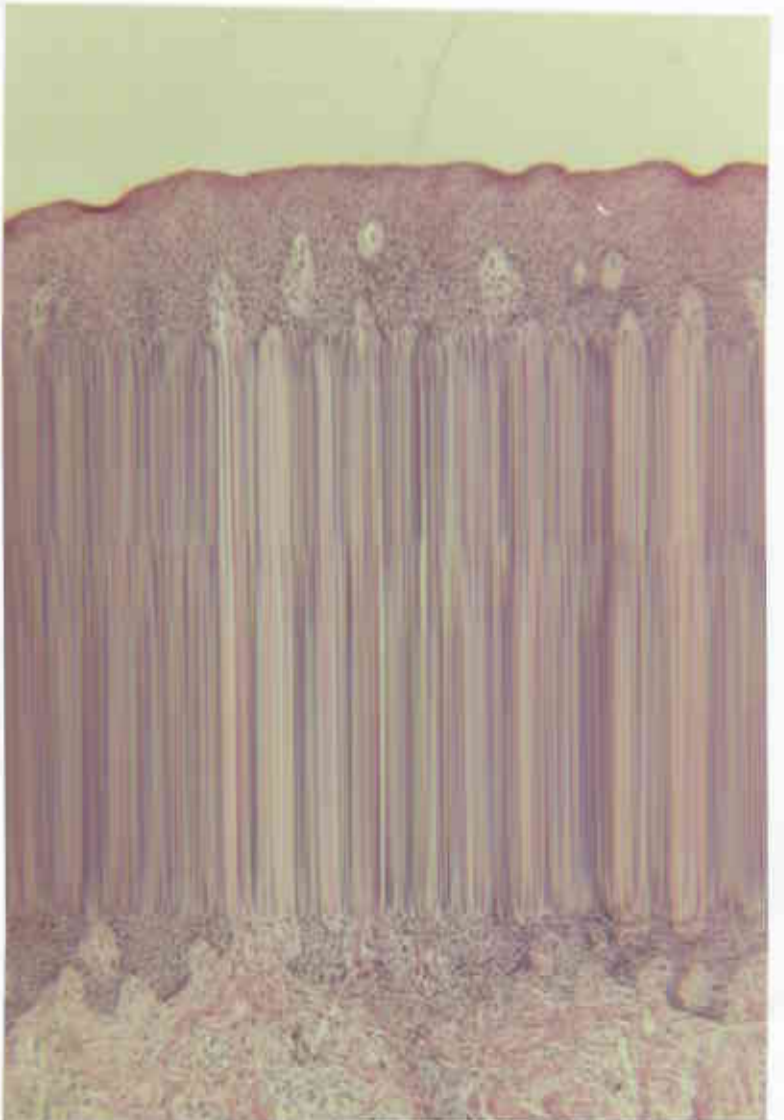
Resim 19 : Normal dişetin histolojik yapısı. (H+E, X60)



Resim 20 : Periodontitisli bir hastanın dişeti örneğinde, epitelde akantoz, stromada yoğun lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu, genişlemiş kapiller ve lenfatikler görülüyor. (H+E, X60)



bir hastanın dişeti biyopsisinde epitelde orta derecede düzensiz akantoz, stromada fokal iltihabi hücre infiltrasyonu izlenmektedir. (H+E, X60)

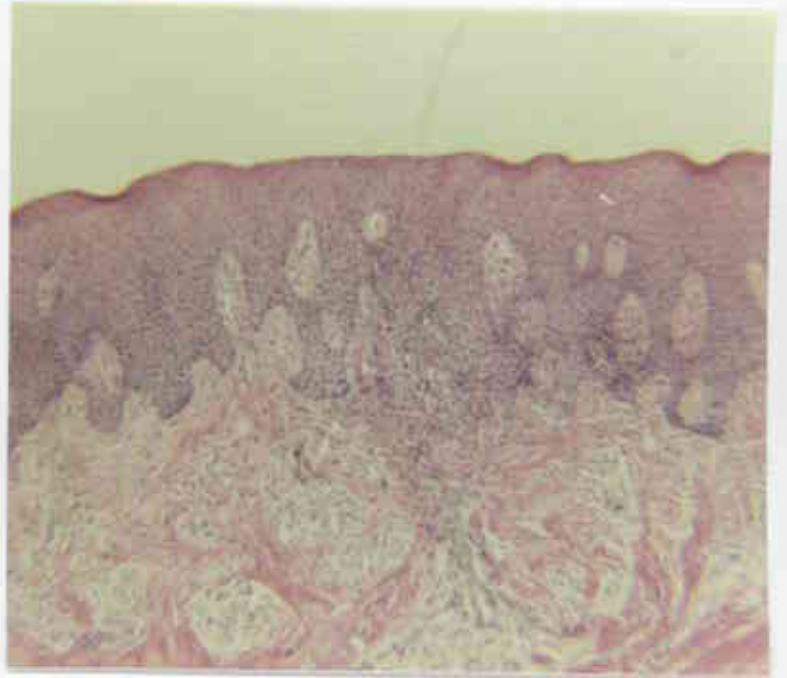


Resim 19 : Normal dişetin histolojik yapısı. (H+E, X60)

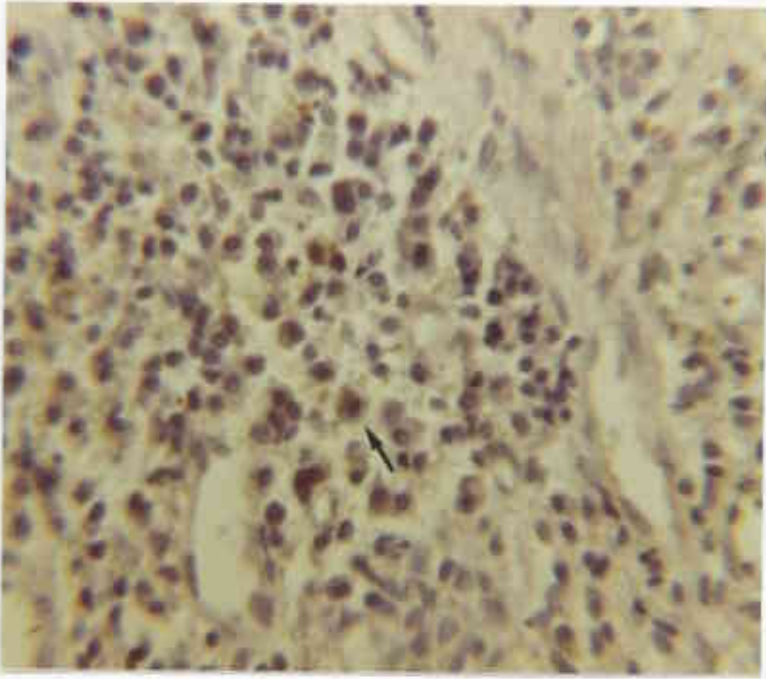
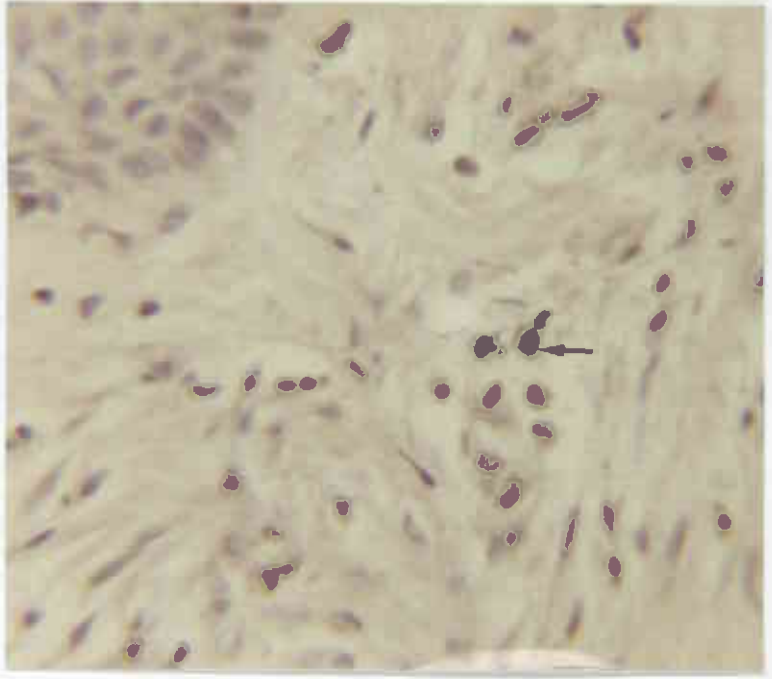


Resim 20 : Periodontitisli bir hastanın dişeti örneğinde, epitelde akantoz, stromada yoğun lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu, genişlemiş kapiller ve lenfatikler görülüyor. (H+E, X60)

Resim 21 : Sjögren sendromu olan bir hastanın dişeti biyopsisinde epitelde orta derecede düzensiz akantoz, stromada fokal iltihabi hücre infiltrasyonu izlenmektedir. (H+E, X60)



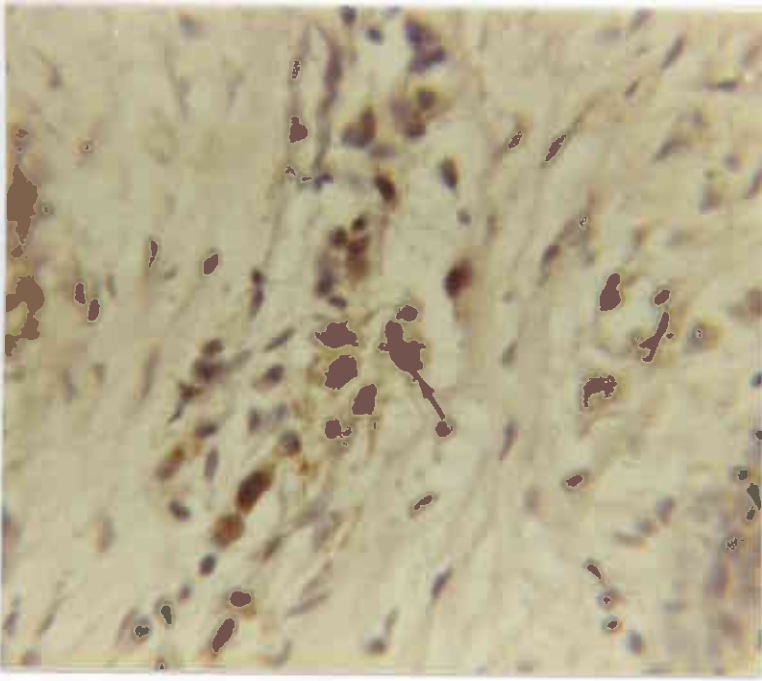
Resim 22 : Sağlıklı dişetinde stromada IgA taşıyan seyrek plazma hücreleri. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz+Hematoksilen, X450)



Resim 24 : Periodontitisli bir hastada dişetinde stromada lenfoplazmositer infiltrasyon içinde IgA taşıyan seyrek plazma hücreleri. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X450)

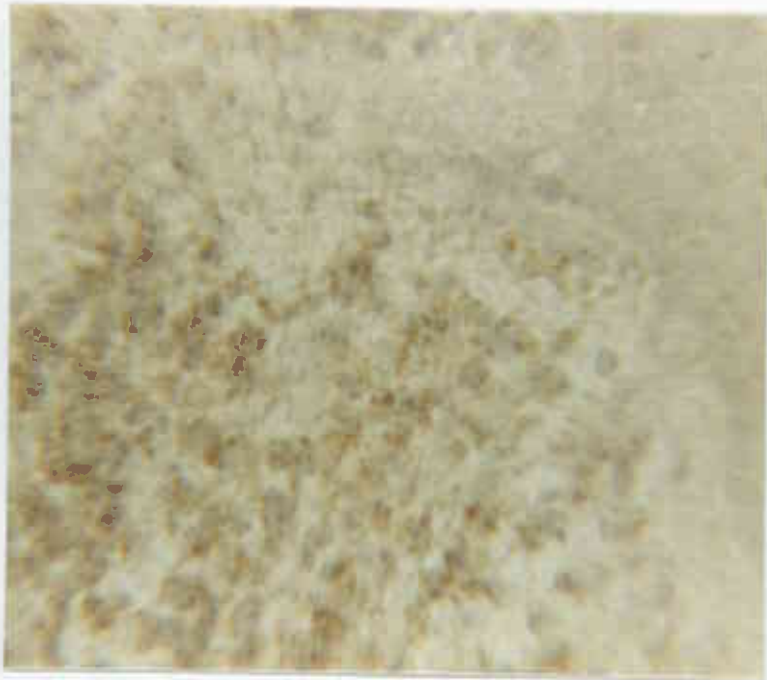
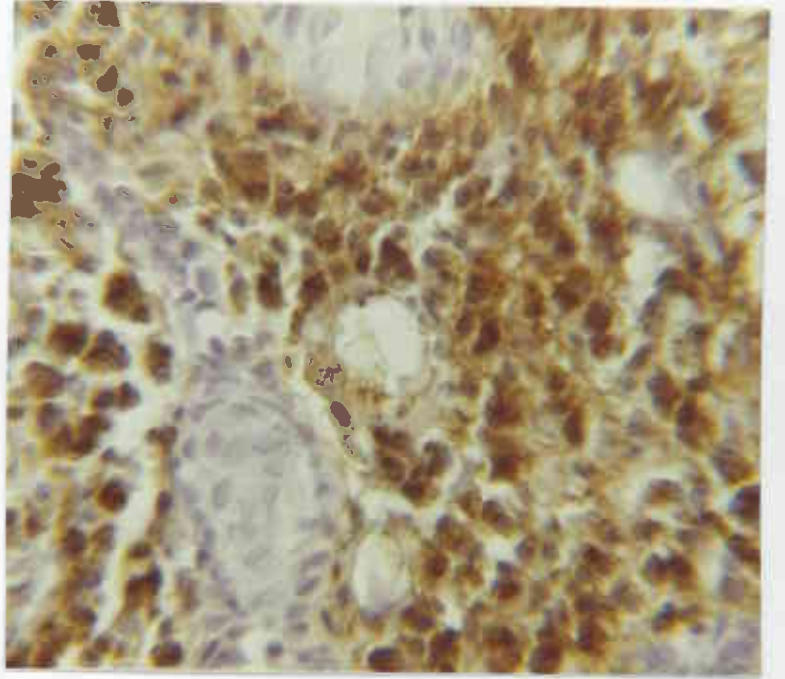
Resim 26 : Sjögren sendromu olan bir hastanın dişeti biyopsisinde IgA içeren plazma hücrelerinin epitel altında birikimi. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X112.5)





Resim 25 : Sağlıklı dişetinde stromada daha çok perivasküler yerleşimli IgG taşıyan plazma hücreleri. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X450)

Resim 23 : Periodontitisli bir hastanın dişeti biyopsisinde stromada epitel altında IgG taşıyan plazma hücrelerinin yoğun infiltrasyonu. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz+Hematoksilen, X600)

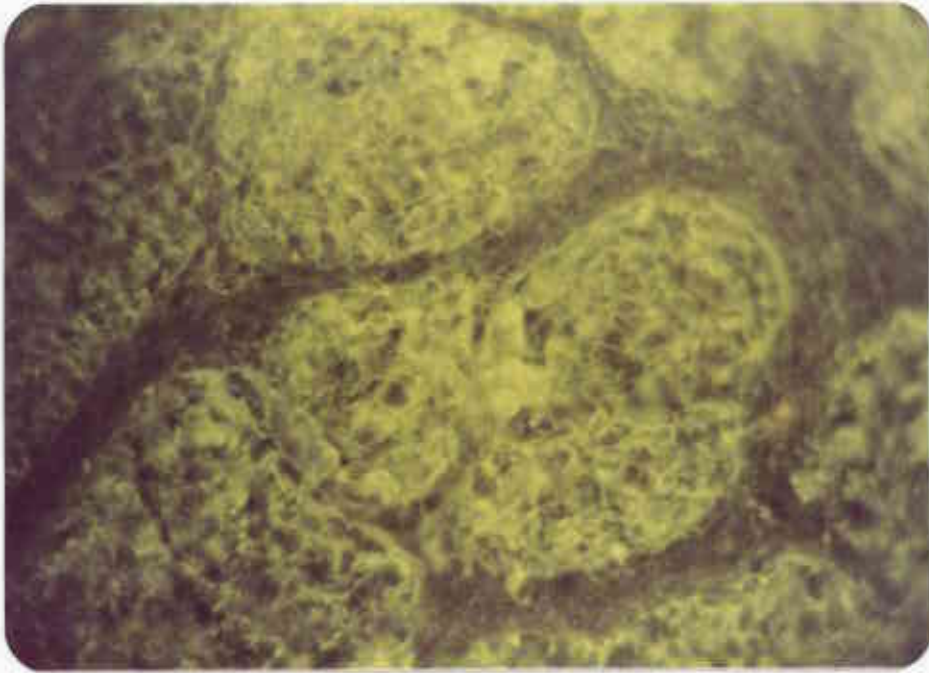


Resim 27 : Aynı hastanın dişetinde epitel altında damar çevresinde yoğunlaşan IgG tipi plazma hücreleri. (Parafin kesitte indirekt immünperoksidaz+Hematoksilen, X180)





Resim 28 : Kronik periodontitisli bir hastanın dişeti dokusunda B-lenfositlerinin FITC-işaretli polivalan anti-insan Ig (G+A+M) antiserumu ile direkt immunfloresan yöntemi kullanılarak boyanması. (X112.5)

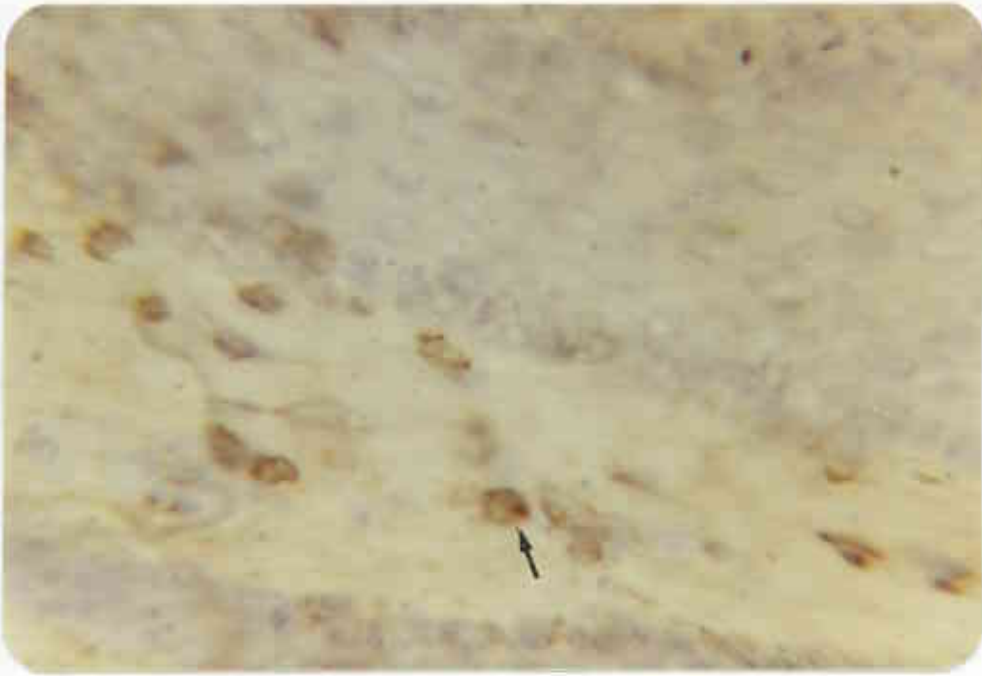


Resim 29 : Daha büyük büyütmede B-lenfositlerinin epitel altında birikimi görülüyor. (X180)

Periodontitisli 10 hastanın dişeti biyopsilerinde özellikle IgG taşıyan hücrelerin sayısında belirgin artım bulundu. Buna karşılık IgA taşıyan hücreler daha az sayıda, IgM taşıyanlar ise seyrek olarak gözlemlendi (Resim 23,24).

S.S. olan 21 hastanın dişeti örneklerinde de aynı şekilde en yoğun olarak IgG, sonra sırasıyla IgA ve IgM taşıyan plazma hücrelerinin stromayı infiltrate ettiği saptandı (Resim 26,27). Hastaların polivalan antikorla ve immünfloresan yöntemle incelenen dişeti dokularında stromada diffüz B-lenfosit birikimi görüldü, bu birikim periodontitisli hastaların dokularında çok daha belirgindi (Resim 28,29).

b- Sağlıklı kişilerden alınan dişeti biyopsilerinin monoklonal antikorlar kullanılarak immünperoksidaz yöntemiyle incelenmesinde daha çok epitel sınırında yerleşmiş seyrek T-lenfositlerinin varlığı görüldü (Resim 30). Yardımcı ve baskılayıcı-T lenfosit dağılımının birbirine yakın olduğu dikkati çekti. Epitel, bağ dokusu sınırında çok seyrek DR (+) boyanma mevcuttu.

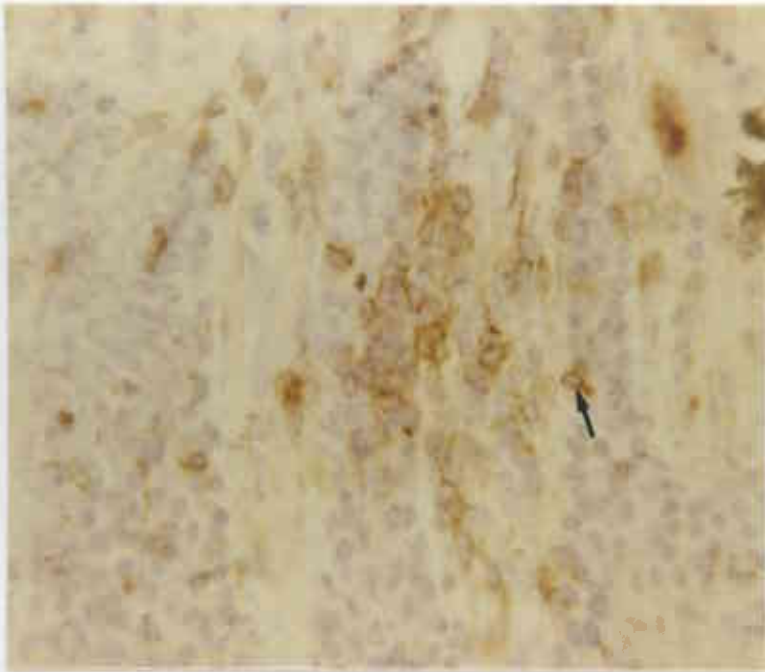
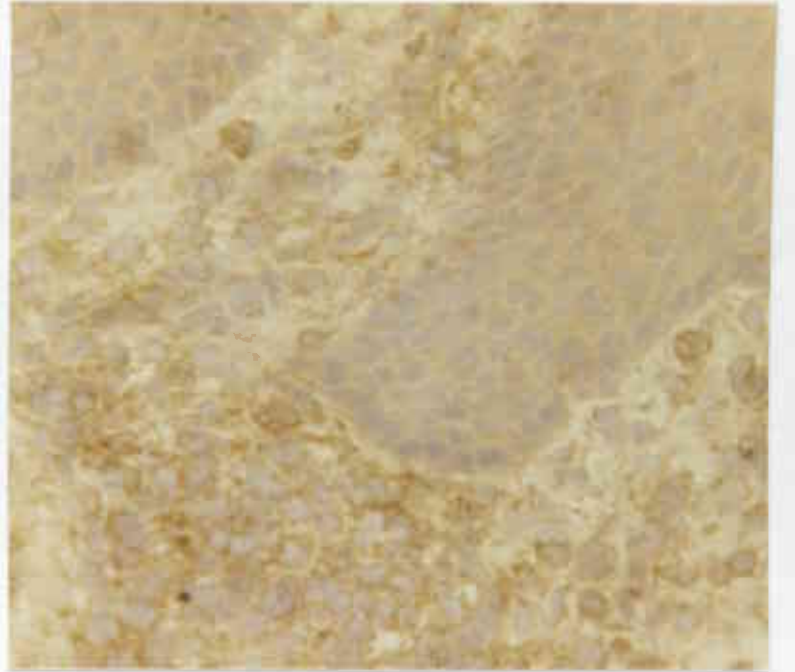


Resim 30 : Sağlıklı dişetinde stromada epitel sınırında yerleşmiş T-lenfositleri. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X600)



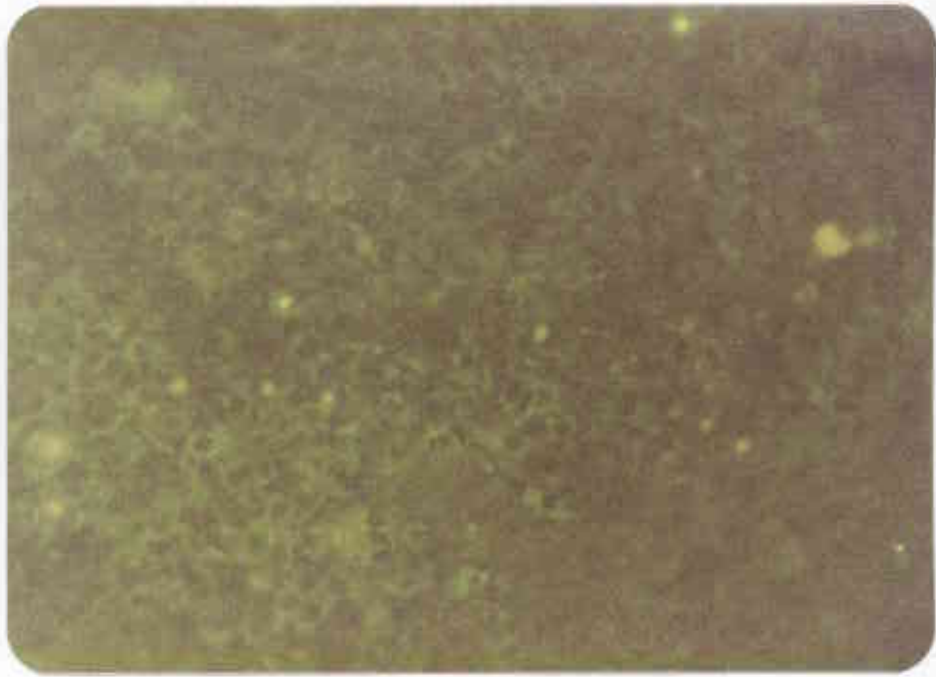
Resim 31 : Periodontitisli bir hastanın dişetinde epitel altında bant şeklinde T-lenfosit infiltrasyonu. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X112.5)

Resim 32 : Aynı hastada subepitelyal T-lenfositlerinin çoğunluğunun, yardımcı T-hücreleri tipinde olduğu izlenmektedir. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X180)



Resim 33 : Aynı dokuda epitel sınırında baskılayıcı T-lenfositleri. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz+Hematoksilen, X180)

Periodontitisli hastaların dişeti biyopsilerinde, özellikle epitel altında yoğunlaşan ve seyrek olarak epitel içine yerleşen T-lenfositleri izlendi. Stromada, T-lenfositleri daha çok damar çevrelerinde yerleşmişlerdi (Resim 31). Bunların büyük bir kısmının yardımcı T-lenfositleri olduğu saptandı (Resim 32). Buna karşın baskılayıcı T-hücrelerinin daha az sayıda olduğu dik-kati çekti (Resim 33). Epitel sınırında toplanan lenfositlerin büyük çoğunluğu DR antijeni taşıymaktaydı (Resim 34).



Resim 34 : Kronik periodontitisli bir hastanın dişeti dokusunda DR-antijeni taşıyan lenfositlerin yerleşimi. (Frozen kesitte indirekt immünfloresan, X180).

S.S. olan hastaların dişeti biyopsilerinde ise özellikle epitel altında yoğunlaşan T-lenfositleri izlendi (Resim 35). Bu hücrelerin büyük bir kısmının yardımcı T-hücreleri olduğu, baskılayıcı-T hücrelerinin ise daha az sayıda bulunduğu gözlendi (Resim 36,37). Bu T-lenfositlerinin büyük bir çoğunluğunda DR antijenlerinin pozitif olduğu saptandı (Resim 38).

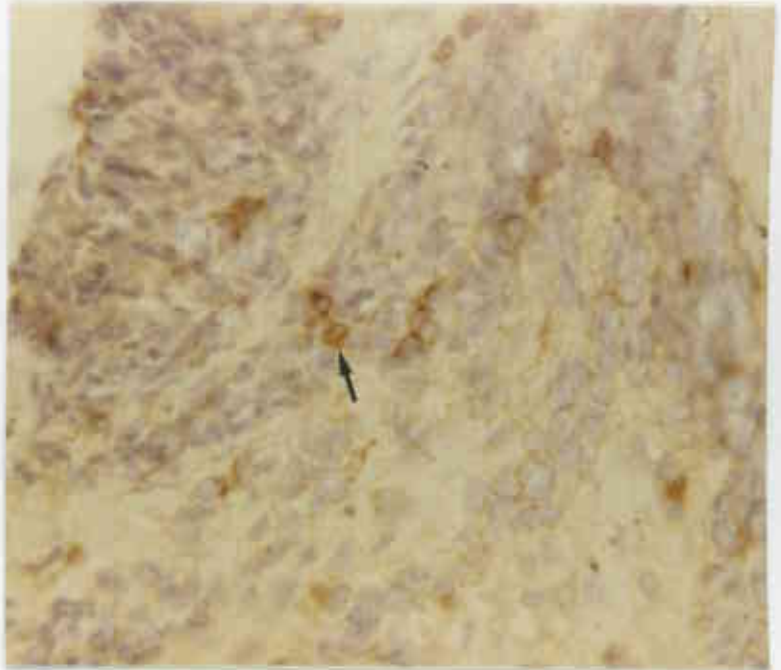
Resim 35 : Sjögren sendromu olan bir hastada dişetinde epitel altında T-lenfositleri. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilin, X600)

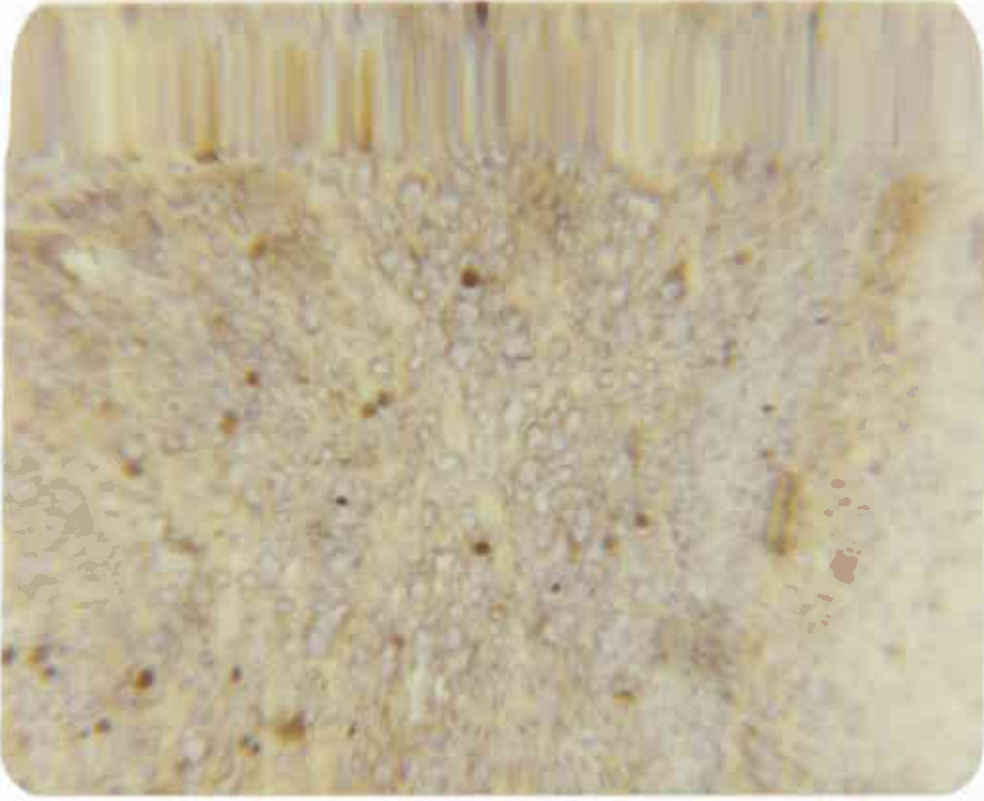


Resim 36 : Aynı hastada dişetinde epitel altında yardımcı T-hücreleri. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilin, X180)



Resim 37 : Aynı dokuda, epitel altında az sayıda baskılayıcı T-lenfositleri izlenmektedir. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz+Hematoksilin, X180)





Resim 38 : Sjögren sendromu olan bir hastanın dişetinde epitel altındaki lenfositlerin büyük kısmının DR antijeni taşıdığı görülmektedir. (Frozen kesitte indirekt immünperoksidaz + Hematoksilen, X180).

## T A R T I Ő M A

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, periodontal hastalıktaki doku yıkımının temelinde yatan immunopatolojik mekanizmalar genellikle deney hayvanlarında yaratılan modellerde incelenmiş ve klinik yorumlar getirilmiştir<sup>(41,57)</sup>. İnsanlarda yapılan çalışmaların süregen nitelik taşımaları mümkün olmadığı için, kan örnekleri ve biyopsi gibi anlık verilerle o andaki tablo yorumlanmış ve tartışılmıştır.

Otoimmün hastalıklar arasında önemli bir yeri olan S.S.; keratokonjunktivitis sikka, xerostomia ve bazı sistemik özelliklerle karakterize bir hastalıktır<sup>(22,82,84)</sup>. Çalışmamızda, S.S. olan hastaların seçilmesinin asıl sebebi, bu hastalıktaki otoimmün karakterin özellikle oral dokuları ilgilendiriyor olması ve sonuçta meydana gelen ağız kuruluşunun, periodontal sağlık ile yakından ilişkili olduğunun bilinmesi idi<sup>(9,15,71)</sup>.

Ayrıca, bu hastaların dudak ve ağız boşluğundaki şikayetleri nedeniyle, diş fırçalamaktan kaçınmaları, periodontal hastalığın primer etyolojik ajanı olan plağın kolayca birikmesini sağlamaktaydı. Bu açıdan bakıldığında, hernekadar, periodontal hastalık patogenezindeki belli yönlerin, bu model üzerinde çalışılabileceği ortaya çıkmaktaysa da, hastalığın toplumdaki görülme sıklığı<sup>(72)</sup> nedeniyle ağızda dişleri olan ve belli yaş grubundaki hastaları toplamak oldukça güçlük göstermektedir. Nitekim, çalışmamız için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi kliniklerinden gönderilen S.S. olan hastaların büyük bir kısmı total protez kullandığı ve bir kısmında da ağız kuruluşu bulguları olmadığı için, sonuçta ancak, 17 hasta periodontal açıdan değerlendirilebilmiştir.

S.S.'nin en sık 40 ile 60 yaşları arasında gözlenmesi<sup>(66,72)</sup> ve çalışmamızda, hastalıklı kontrol olarak alınabilecek erişkin periodontitisin, bu yaş grubunda görülüyor olması, bulguların değerlendirilmesinde sağlıklı bir temel teşkil etmiştir. Kontrol grupları oluşturulurken periodontitisli hasta grubunun aynı yaş ortalamasına sahip kişiler arasından seçilmesine karşın, bu yaş diliminde dişleri bulunan ve periodontal problemi olmayan kişilere toplumumuzda sık rastlanmaması nedeniyle sağlıklı kontrol grubunu daha genç bireyler oluşturdu. Zaten bu grupta incelenen, klinik ve laboratuvar kriterlerinin yaşla çok fazla ilgili olmaması da, çalışmanın sonuçlarının kıyaslanması açısından bir sakınca yaratmamaktadır.

Periodontitisli hastalardan oluşan I. kontrol grubunu seçerken, diş sayısının S.S. olan hasta grubu ile uyum göstermesine ve ayrıca, bu şahısların diabetes mellitus, romatoid artrit ve kollajen doku hastalıkları gibi sistemik sorunları olmamasına özen gösterildi. Başlangıç periodontitisi olan veya prognozu ümitsiz olan şahıslar I. kontrol grubuna dahil edilmedi. Russell periodontal indeksinin 6 civarında olmasıyla, hastaların klinik, immünolojik ve histopatolojik açıdan yerleşmiş periodontitis bulguları vereceği düşünülerek, bu kural da hasta seçiminde uygulandı. Ayrıca, plak indeksi yüksek olan hastalar tercih edildi. Böylece S.S. olan hastaların dişeti bulgularını gerçek periodontitis verileri ile karşılaştırma imkanı doğdu. Amacımız, periodontal doku yıkımını kıyaslamak olduğu için, onun dışında kalan kriterler eşdeğer tutulmaya çalışıldı. II. kontrol grubu olarak, periodontal ve sistemik yönden sağlıklı kişilerin alınmasıyla, otoimmün bir hastalık olan S.S.'nda dişetinde oluşabilecek değişiklikleri incelemek mümkün olmuştur.

Ağız hijyeni açısından kıyaslandığında S.S. olan kişilerle periodontitis grubu arasında istatistikî açıdan önemli bir fark bulunmadı. Böylece hasta seçimindeki kriterlerimizden bir tanesinin yeterli şekilde sağlanmış olduğu belirlendi. S.S. olan grup ile periodontitis grubu ayrı ayrı sağlıklı



kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plak birikimi açısından önemli fark saptandı ( $p < 0.01$ ). Bu bulgular S.S. olan hastalarda tükürük sekresyonunun azalmasına bağlı olarak, mekanik temizlenmenin azalacağı, ağız mukozasındaki yanma ve ağrı şikayetleri nedeniyle fırçalama işlemi aksayabileceği için, kötü ağız hijyenine sahip olacakları şeklindeki başlangıç hipotezimizi destekler niteliktedir. Plağın saptanmasında amaç, miktarı belirlemekten ziyade, ağız bakımının ne derece etkili olduğunun araştırılması idi. Bu nedenle çalışmamızda O'Leary ve arkadaşlarının geliştirdiği, plağın varlığı veya yokluğu esasına dayanan plak indeksi kullanıldı<sup>(52)</sup>. Plağın periodontal hastalığa yol açan kısmı dişeti cebinin içindeki ve serbest dişeti kenarındaki bölümü olduğu için, kronun üst kısmında kalan bakterilerin dişetini direkt olarak etkileyemeyecekleri görüşüyle, çalışmada bu basit, standardizasyonu kolay ve etkili olan plak indeksi seçilmiştir.

Dişeti oluşu kanama indeksi yönünden S.S. olan hasta grubu ile periodontitisli kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmasına rağmen, sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında bu farkın çok önemli olduğu görüldü ( $p < 0.01$ ). Bu sonuçlar S.S. ve periodontitisi olan hasta gruplarında artmış plak miktarı ile klinik olarak mevcut belirgin iltihap arasındaki pozitif ilişkiyi doğrulamaktadır. İki grup arasında dişeti iltihabının etyolojik faktörleri ve klinik belirtileri açısından hiç bir farklılık olmaması, periodontal harabiyetin aynı düzeyde olması gerektiği kanısını uyandırmaktadır.

Ancak, cep derinlikleri ve Russell periodontal indeks değerleri açısından incelendiğinde, periodontitisli hasta grubundaki destek kaybının, S.S. ile normal kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede fazla olduğu belirlendi. S.S. grubunun Russell periodontal indeks ortalaması  $4.39 \pm 0.38$  olarak saptandı. Bu değer klinik gözlemler ile birleştirildiğinde, periodontal hastalığın yerleşmiş lezyon, yani gingivitis ile başlangıç periodontitis

aşamasında olduğunu kanıtlamaktadır. Ancak, deney ve periodontitis grupları arasında yaş, diş sayısı, plak indeksi ve dişeti oluğu kanama indeksi açısından istatistikî olarak önemli bir fark olmamasına rağmen, bu kriterlere doğrudan ilgili olan cep derinliği ve periodontal indeks değerleri, periodontitisli grupta önemli bir artış göstermekteydi.

Bu bulgulara dayanarak, S.S. grubunda periodontal yıkımın daha az olmasının nedeni iki yönde tartışılabilir. Birinci açıdan bakıldığında, bu nedenle muhtemelen, periodontal hastalıkta doku yıkımını sağlayan immünolojik mekanizmalardan bazılarının, S.S. grubunda düzensiz regülasyonu nedeniyle doku yıkımının belli düzeyde kalması olabilir. Diğer yönden bakıldığında ise, S.S. grubunda, ağız kuruluğu nedeniyle bakteriyel florada periodontopatojenik mikroorganizmaların veya antijenlerin gerekli kombinasyon veya konsantrasyonda olmamaları, immünopatolojik mekanizmaların aktive olmasını hazırlayan ortamı oluşturmayabilir<sup>(43)</sup>.

Plağın oluşumu ile bakteriyel popülasyonun, salya (immünglobulinleri, diğer proteinleri, pH'ı, enzimleri) tarafından kontrol edildiği ve bu etkinin akış hızı ile ilgili olduğu çeşitli çalışmalarla vurgulanmıştır<sup>(71)</sup>.

Bu düşünceden yola çıkılarak, S.S. grubunda salya akış hızı incelendiğinde, normal kontrollere göre önemli derecede azalmış bulundu. Bu bulgular hastalığın etyopatogenezinde temel patolojiyi teşkil eden tükürük bezi dokusundaki lenfosit infiltrasyonu ve asiner atrofi gibi patolojik özelliklerin en belirgin sonucunu teşkil etmektedir<sup>(11,28,84)</sup>. Tükürük hacmi ve birim zamandaki akış hızının önemli ölçüde azalması hastalarımızda görülen artmış plak mevcudiyeti ile uyum göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda da akış hızı ile plak formasyonu arasındaki ilişkiye dikkat çekilmiş olması, S.S. grubumuzdaki bu gözlemlere destek olur niteliktedir<sup>(9,71)</sup>.

Sekretuar IgA'nın ağız içi lokal immün cevabın önemli bir parçasını

oluşturduğu ve bakteri kolonizasyonunu engellediği bilinmektedir<sup>(9,71,75)</sup>. Çalışmamızda bu antikorun immünolojik etkilerini yorumlayabilmek amacıyla S.S. olan hastalarda, parotis salyası sIgA düzeyi ile sekretuar komponentin varlığı değerlendirildi ve ayrıca IgA sentezinin olduğu, tükürük bezi duktal epitel altı plazma hücreleri de incelendi. Bugüne kadar konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalarda, S.S. olan hastalarda sIgA düzeyinde artış olduğuna işaret edilmiştir<sup>(5,6)</sup>. Çalışmamızda da başlangıçta, tükürük hacmi ve akış hızına bağlı parotis salyası IgA seviyeleri ölçüldüğünde, literatür ile uyum gösteren yüksek değerler bulunmuştur. Daha sonra salya akış hızı ve hacimlerinin çok az olduğu bu hastalarda, sadece volumetrik sIgA değerinin yanıltıcı olabileceği düşüncesiyle, parotis salyasında sentezlenen total protein üzerinden sIgA değerinin ifade edilmesi gerektiği kanısı uyanmıştır. Sonuçlarımız, salyadaki total proteine oranla hesaplanıp, değerler ifade edildiği zaman, parotis salyası total proteininin ve sIgA sentezinin normallere kıyasla artmadığını göstermektedir. Bu bulgulara destek olmak üzere tükürük bezi dokularında duktus epiteli altı plazma hücreleri incelendiğinde, IgA taşıyan hücrelerin sayıca artmadığı ve IgG taşıyan hücrelerle eşit sayıda yerleşim gösterdiği, IgM dağılımının ise çok seyrek olduğu görülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalarda, sIgA sentez hızı ve tükürükte bulunan düzeyi ile periodontal hastalığın gelişimi arasındaki ilişkiye değinen farklı sonuçlar bulunmuştur. Chandler ve ark. sIgA düzeyinin periodontal hastalıktan bağımsız olduğuna işaret ederken<sup>(10)</sup>, Ørstavik ve grubu bu immünglobulin sentezinin, periodontal hastalığın şiddetine bağlı olarak artabileceğini bulmuşlardır<sup>(55)</sup>. Kliniğimizden daha önce yapılan bir çalışmada da, kronik periodontitisli hastaların parotis salyası IgA düzeyleri ile normal kontrol grubu arasında bir fark gözlenmemiştir. Yine, aynı çalışmada minör tükürük bezi sekresyonu IgA değerinin, parotis salyasına oranla yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur<sup>(87)</sup>. Periodontal hastalıkla sIgA düzeyi arasındaki ilişki

konusunda birbirine zıt düşen görüşler bulunmakla beraber, sIgA'nın bakteriyel kolonizasyonu engellediği bugün yaygın olarak kabul edilmektedir<sup>(9, 71,75)</sup>. Hernekadar, S.S. olan hastalarda sIgA düzeyi normal değerlerde bulunmuşsa da volumetrik olarak düşünüldüğünde, bu hastaların ağız ortamındaki sIgA'nın birim alana düşen miktarının azalmış olması kaçınılmazdır. Nitekim, S.S. grubunda plak indeksinin yüksek oluşunun bir nedeni olarak da bu bulguyu gösterebiliriz. Ancak, sIgA ile periodontal hastalık ilişkisine tek yönlü bakmak hatalı olur kanısındayız. Çünkü, periodontal hastalıkta doku yıkımı, cep içindeki antijen-antikor komplekslerinin başlattığı bir dizi immünopatolojik mekanizmayla açıklanmaktadır<sup>(57)</sup>.

Duktal epitel tarafından sentezlenen sekretuar parçanın varlığını incelemek amacıyla yaptığımız çalışmada, 20 hastanın 14'ünde salyada serbest parçanın varlığı gösterilmiştir. Sekretuar komponent sentezi olmayan hastaların tükürük bezleri histopatolojik yönden incelendiğinde bu eksikliği açıklayacak bir bulgu saptanmamıştır. Bu sonuç, S.S. olan hastaların bazılarında salyada bulunan serbest sekretuar parçanın yetersiz sentezlendiğini veya yapılmış olan komponentin hızlı yıkıma uğramış olabileceğini düşündürmektedir.

Primer ve sekonder S.S.'nda temel patolojiyi teşkil eden lenfositlerin dağılımının ve immünolojik değişikliklerin izahını yapabilmek amacıyla periferik kan lenfosit grupları ile hedef doku düzeyindeki hücrelerin incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda geliştirilmiş yüksek özgüllükte ve duyarlılıkta olan Monoklonal Antikorlar ile lenfosit grupları ve alt gruplarının belirlenmesi kolaylaşmıştır.

Çalışmamızda, gerek E-rozet yöntemi, gerekse özgül Pan-T monoklonal antikorları kullanarak incelenen periferik kan T-lenfositlerinin, primer ve sekonder S.S. hastalarında kontrollere kıyasla azaldığı gözlemlendi. Periferik kanda T-hücrelerinin primer S.S.'nda azalması daha önce de Talaş ve ark.

tarafından bildirilmiştir<sup>(77)</sup>. Ancak, yardımcı-T ve baskılayıcı-T hücrelerinin periferik kandaki dağılımını incelediğimizde, hasta gruplarımızda, yardımcı T-hücrelerinin değişmediği, buna karşın baskılayıcı T-hücrelerinin her iki S.S. grubunda da normallere göre azaldığı bulundu. Bulgularımız Fox ve ark.'nın çalışmalarına paralellik göstermektedir<sup>(21)</sup>. İnceledikleri 15 hastada araştırmacılar, baskılayıcı T-lenfositlerinin periferik kanda azaldığını ve  $T_y : T_s$  oranının primer S.S. olan hastaların % 67'sinde arttığını bildirmişlerdir. Hastalarımızda  $T_y : T_s$  oranı normal kontrollere kıyasla bir farklılık göstermedi.

Daha önce yapılan çalışmalarda da klasik otoimmün bir kollajen doku hastalığı olan sistemik lupus eritematozusda ve multiple sklerozisde baskılayıcı T-lenfositlerinde azalma görülmüştür<sup>(50,61)</sup>. Periferik kandaki baskılayıcı T-hücrelerindeki bu azalma hastalarda  $T_s$ -hücrelerinin az yapılması, periferik lenfoid organlarda artmış yıkımı veya hücrelerin anormal ve değişik oranlarda doku dağılımı göstermeleri ile izah edilebilir. Sjögren sendromu olan hastalarda daha önce yapılan çalışmalarda, sistemik lupus eritematozus'da rapor edildiği gibi<sup>(51)</sup> baskılayıcı T-lenfositlerine karşı serumda otoantikorlar gösterilememiştir. Bu nedenle, S.S. hastalarının periferik kanında bu grup hücrelerde izlediğimiz azalmayı antikor aracılığı ile gelişen bir yıkım artmasına bağlayamayız. Bugünkü immünolojik tekniklerle insanlarda  $T_s$  gibi özel lenfosit altgruplarının yapımı ve sentez hızlarını ölçmek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle hastalarımızda ve benzer otoimmün hastalıklarda izlenen baskılayıcı T-lenfositlerindeki bu azalma periferik kandaki  $T_s$  popülasyonunu normal sayılarda tutamayacak kadar yetersiz yapımı ile izah edilebilir. İmmün cevap mekanizmasının oluşmasında, T-hücre altgruplarının ve dengesinin çok büyük önemi olduğu düşünülürse, baskılayıcı T-hücrelerinde izlenen bu kantitatif popülasyon değişimlerinin bu tip otoimmün hastalıkların patogeneğinde ortak bir mekanizmayı oluşturduğu fikri kuvvet kazanmaktadır<sup>(62)</sup>.

Hastalarımızda, periferik kanda HLA-DR antijeni taşıyan hücrelerin sayılarında belirgin bir değişme olmaması ayrıca periferik kanda "aktive"-T hücreleri sayılarında önemli bir artış olmadığını da göstermektedir.

Çalışmamızda, yüzey immünglobulini pozitif B-hücrelerinin periferik kandaki dağılımı, primer ve sekonder S.S. gruplarında normallerden bir farklılık göstermedi. Adamson ve ark.<sup>(1)</sup> çalışmalarında benzer sonuçlar elde etmişler ancak, Talal ve ark.<sup>(77)</sup> primer S.S. hastalarının periferik kanlarında B-lenfositlerinin normallere kıyasla artmış olduğunu bildirmişler ve serum immünglobulin değerleri ile herhangi bir ilişki bulunmadığına dikkat çekmişlerdir. Hastalarımızda serum IgA ve IgM düzeylerinin sekonder S.S. grubunda normal kontrollere göre artmış olduğu izlendi, buna karşın primer S.S. hastalarının serum immünglobulin düzeyleri normal kontrollere göre bir farklılık göstermedi. Serum C3 düzeylerinin sekonder S.S., C4 düzeylerinin ise, primer S.S. olan hastalarda kontrol grubuna göre yüksek düzeylerde bulunması, akut faz proteinlerinden olan kompleman sistem proteinlerinin S.S. gibi inflamatuvar bir hastalıkta artabileceğini göstermektedir. Serum IgA ve IgM düzeylerinde artış görülen sekonder S.S. hastalarındaki B-lenfosit sayıları ile Ig düzeyleri arasında bir ilişki tespit edilmedi. Ancak, Talal ve ark., B-lenfositlerinin tükürük bezinde fonksiyonel olduğunu ve IgG, M ve A tipi otoantikorlar sentezlediklerini göstermiştir<sup>(76)</sup>.

Çalışmamızda, periferik kan lenfosit altgruplarındaki bu değişikliklerin hedef organ düzeyindeki hücre dağılımını tam anlamıyla yansıtamayacağı görüşünden hareketle, izlenen farklı T-lenfosit subpopulasyonlarının anormal doku dağılımı ile izah edilip, edilemeyeceğini ve en önemlisi hedef dokulardaki lokal immün sistem değişikliklerini incelemek amacıyla, tükürük bezlerinde monoklonal antikorlar ile immünohistolojik incelemeler yapıldı. Pan-T monoklonal antikor ile yapılan indirekt immünperoksidaz boyamalarında minör tükürük bezi dokuları içinde belirgin infiltrasyon gösteren

lenfositlerin büyük bir kısmının T-lenfositleri olduğu ve beraberinde B-lenfositlerinin de bez içinde dağılım gösterdiği görüldü. Bez içinde yoğun infiltrasyon gösteren T-lenfositleri altgruplarının tayini amacıyla her bir hücre yüzeyi için özgül monoklonal antikorlar kullanarak yapılan boyamalarda, özellikle periduktal bölgelerde yardımcı T-lenfositlerinin baskılayıcı T-hücrelerinden daha yoğun bir yerleşim gösterdiği izlendi.

Periferik kanda baskılayıcı T-lenfositlerinde bulunan azalmaya karşılık, tükürük bezi düzeyinde yardımcı T-hücrelerinin sayıca belirgin olduğu görüldü. Periferik kanda izlenen baskılayıcı T-hücrelerinin azalmasını, böylece doku dağılımı veya infiltrasyonun artması ile izah edilemeyeceği anlaşılmaktadır. Yardımcı T-lenfositleri belirgin olmak üzere, lenfosit altgrup hücreleri ve B-lenfositlerinin minör tükürük bezi lenfoid infiltrasyonunu oluşturması, Sjögren sendromunda izlediğimiz bazı immünolojik değişikliklere ve doku düzeyinde görülen bulgulara açıklık kazandırabilir. Daha önceki çalışmalarda<sup>(23,77)</sup> tükürük bezinden otoantikorların ve aktif olarak IgG, A ve M sentezinin yapılabileceğinin gösterilmiş olması, doku düzeyinde immünperoksidaz yöntemi ile yardımcı-T, baskılayıcı-T, B-lenfositleri ile IgA ve IgG taşıyan plazma hücrelerinin normale göre artmış olarak epitel altında izlenmiş olması, tükürük bezi içindeki lenfoid hücre infiltrasyonu gösteren bu bölgelerde "germinal merkeze" benzer bir yapının oluştuğuna kuvvetle işaret etmektedir. Romatoid artrit gibi yine otoimmün özellikteki hastalıkta sinoviyal membranda doku düzeyinde yapılan çalışmalarda da bu görüşe destek olan çok benzer hücre dağılımı izlenmiş ve eklem içi sıvısına Romatoid faktör salınımı izahı daha anlam kazanmıştır<sup>(64,88)</sup>. Çalışmamızda, tükürük bezindeki plazma hücrelerinin dağılım ve tipleri polivalan antikorlar ile yapılan indirekt immünperoksidaz boyamalar ile değerlendirildiğinde, IgG ve IgA sentezleyen matür plazma hücrelerinin, IgM sentezleyenlere kıyasla daha hakim tarzda lenfoid infiltrasyon içinde ve dokuda dağıldıkları görüldü.

Tükürük bezinin monoklonal antikorlar ile olan incelemelerinde özellikle yardımcı T-lenfositlerinin dokuda hakim olması, B-lenfositleri ile bu hücrelerin etkileşimleri sonucu otoantikor yapımını kolaylaştıracağını düşündürmektedir. S.S. grubunda doku düzeyinde HLA-DR (Class-II) antijeni için, özgül monoklonal antikor ile yapılan boyamalarda, HLA-DR antijeni taşıyan hücrelerin de normal tükürük bezi dokusuna kıyasla artmış sayıda bulunduğu görüldü. Bu bulgular periferik kanda izlenmemekle beraber "antijen" ile aktive olmuş immün sistem hücrelerinin<sup>(60)</sup>, proliferasyon göstererek arttığını ve beraberinde T-lenfositlerinin (özellikle T<sub>H</sub>) sahaya hakim olduğunu göstermektedir. Benzer çalışmalarda<sup>(1,23)</sup> primer S.S. hastaları incelendiğinde, minör tükürük bezi içinde yardımcı-T lenfositlerinde artım olduğunu, buna karşın Natural Killer (NK) hücrelerinin azaldığı ve tükürük bezi lenfositlerinin poliklonal B-hücre cevaplarını baskılayamadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz minör tükürük bezi bulguları ve daha önce rapor edilen bütün bu bulgular, hedef doku düzeyinde yardımcı T-hücrelerinin artımını vurgularken, tükürük bezi lenfositlerinin immüno-regulatuvar yönden ve otoantikor yapımını kontrol yönünden defektif olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, hastalarda tükürük bezi epiteline karşı rastlanmasa bile yüksek titrede romatoid faktör ve antinükleer antikor tipi otoantikorların serumda ölçülmesi bu görüşleri desteklemektedir<sup>(22)</sup>.

Çalışmamızda, monoklonal antikorlar ile elde ettiğimiz minör tükürük bezi bulguları, doku düzeyinde yardımcı ve baskılayıcı-T gibi özgül antijen taşıyan lenfosit hücre gruplarının, S.S.'nda periferik kandaki dağılımlarına göre belirgin bir farklılık gösterdiğini bir kez daha vurgulamaktadır. Genetik özellikleri ve immün cevap genleri yönlerinden, batı ülkeleri hastalarından büyük farklılıklar gösteren hastalarımızda, elde ettiğimiz sonuçlar, ülkemizde görülen S.S. hastalarının immün cevaplarında hücre dağılımlarının, farklı genetik yapıdaki çalışma gruplarının sonuçlarından değişik



olmadığını göstermektedir<sup>(22)</sup>. Otoimmün hastalıkların patogenezi ve fenotipik şekillerinin incelenmesi yönünden bu konu büyük bir öneme sahiptir.

Böylece mevcut bulgular ışığında Sjögren sendromunda "antijenik" uyarımı takiben bütün T-hücrelerinin, yardımcı T-lenfositleri hakim olmak üzere ve Dr (+) - aktive T-hücrelerinin dokuya dağıldığı, sayıca arttığı ve B-hücrelerinin de sahaya gelerek antikor yapabilen lenfoid "germinal merkez" oluştuğu, sonucunda immünglobulin, otoantikor yapımı ve doku harabiyetinin geliştiği düşünülebilir. Lenfosit popülasyonlarında periferik kan ile farklı sonuçların elde edilmiş olması dokudan salınan "antijenik" yapılara cevap olarak, lenfosit altgruplarının inflamatuvar alanda selektif yerleşmesi ve bazı grupların örneğin, yardımcı T-hücrelerinin klonal artımı ile izah edilebilir. Son yapılan bir çalışmada Fox ve ark. primer S.S. olan hastaların periferik kan lenfositleri ile tükürük bezi lenfositleri arasında IL-2 sentezi açısından farklılıklar bulunduğu ve doku içi lenfositlerinden IL-2 salınımının belirgin derecede arttığına işaret etmişlerdir<sup>(24)</sup>. Periferik kan lenfositleri ile belirgin farklılık gösteren bu çalışma dolayan lenfositler ile hedef dokuda inflamasyon sahasında bulunan hücreler arasında sayısal olduğu kadar fonksiyonel olarak da önemli farklılıkların olabileceğini ortaya koyması bakımından önem taşımaktadır.

Son yıllarda, periodontal hastalıkların etyopatogenezi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar, bilhassa doku düzeyinde oluşan immünoreglatuar değişikliklerin anlaşılmasına yöneliktir<sup>(26,57)</sup>. Periodontal hastalığın bir çok çeşidinde, periferik kan lenfosit altgrupları ile ilgili çalışmalar yapılmış ve elde edilen bulgular, sistemik ve periodontal yönden sağlıklı bireylerle kıyaslandığında önemli bir farklılık bulunmamıştır<sup>(26,53,78)</sup>. Bu sonuçlar, periodontal lezyonların sistemik etkileri olmadığı fikrini destekler niteliktedir. Buna rağmen periodontal hastalıklı dokuda lokal immünoregülasyonu inceleyen bazı araştırmacılar, T-lenfosit altgrupları arasında,

periferik kana kıyasla, anormal bir etkileşim olduğunu ileri sürmüşlerdir<sup>(26)</sup>. T-hücrelerinin reglatuvar etkisi, antijenik veya poliklonal olarak aktive oldukları zaman oluşur. Aktive olmuş T-lenfositleri ortama IL-2 salgılayarak antikor yapımını ve T-hücre proliferasyonunu düzenlerler<sup>(26,53)</sup>.

Okada ve ark. periodontitisli hastalarda, gingival dokuda, periferik kan lenfositlerine kıyasla  $T_y : T_s$  oranında azalma, HLA-DR pozitif olan T-lenfositlerinin sayısında ise önemli derecede artış gözlemişlerdir<sup>(53)</sup>. Taubman ve ark. ise juvenil ve erişkin periodontitisli hastaların dişeti dokularında T-lenfosit altgruplarını incelemişler ve  $T_y : T_s$  oranının, aynı hastaların periferik kan ve kronik gingivitisli olan hastaların dişeti dokularına oranla önemli ölçüde azaldığını ileri sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar periodontal hastalıklı dokulardaki  $T_y : T_s$  oranında oluşabilecek değişiklikleri; gingival doku çevresinde açığa çıkan aşırı derecedeki antijenik yüke ve poliklonal aktivatörlere karşı lokal konakçı cevabını düzenlemek için gerekli olan dengeleyici bir mekanizma olarak kabul etmişlerdir<sup>(78)</sup>.

Çalışmamızda, periodontal yönden sağlıklı bireylerden alınan dişeti biyopsilerinde, bağ dokusu içinde tek tük iltihabi hücre izlenmiş olup, bu mononükleer hücrelerin bazılarının seyrek de olsa IgG ve IgA taşıdıkları saptandı. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin varlığını, dişeti oluşu veya birleşim epiteline penetre olabilen antijenik ürünlerle ilgili olabileceği ileri sürülmüştür<sup>(9)</sup>. Bu bulgular literatürde de vurgulandığı gibi tam anlamıyla sağlıklı dişetin klinik olarak sağlanmasının güçlüğünü göstermektedir. En sağlıklı dişetinde bile zaman zaman başlangıç lezyonu şeklinde dişeti iltihabının gözlenmesi kaçınılmazdır. Lezyonun bu aşamada kalması, yine uyaran ile konakçı arasındaki etkileşimin dengede tutulabilmesi ile izah edilebilir<sup>(9,56,57)</sup>.

Periodontitisi ve Sjögren sendromu olan hastalardan alınan dişeti

örneklerinde ise, iltihabi hücre infiltrasyonu mononükleer tipte olup birbirine benzerlik göstermekteydi. Sadece, periodontitisli hastalarda izlenen iltihap daha şiddetliydi.

Aynı örnekler, immünohistolojik değerlendirme yapabilmek için monoklonal antikolar kullanılarak immunperoksidaz yöntemi ile incelendiğinde, her iki hasta grubunda da, epitel altında, yoğun bir yerleşim gösteren T-lenfositlerinin varlığı görüldü. Bu T-hücrelerinin büyük bir kısmını, yardımcı T-hücreleri oluşturmaktaydı. Ayrıca yine hem S.S.'nda, hem de periodontitiste dişeti bağ dokusunda izlenen bu T-lenfositlerinin büyük bir kısmının DR antijeni taşımakta olduğu saptandı.

Literatürde gingival lenfosit altgruplarını belirlemek için yapılan çalışmalarla<sup>(53,78)</sup>, bizim bulgularımızın  $T_y : T_s$  oranı açısından farklılık göstermesi metodlar ve hastalık dönemlerinin çok farklı olması ile izah edilebilir. Çalışmamızda, lenfosit altgrupları, diğer araştırmalarda olduğu gibi dokudan izole edilen lenfosit süspansiyonlarında değil, direkt olarak doku kesitlerinde incelenmiş ve ayrıca bu işlem için güvenilirliği son derece fazla ve etkisi kalıcı olan immünohistokimya yöntemi kullanılarak, hücrelerin doku içindeki lokalizasyonlarını da tespit etmek mümkün olmuştur.

Daha önce yapılan araştırmalarda, klinik olarak orta derecede gingivitten, periodontitise geçişin, histopatolojik olarak, T-lenfosit predominansı ile karakterize olan infiltrasyondan, önemli sayıda IgG taşıyan lenfosit ve plazma hücrelerinin hakim olduğu patolojik bir tabloya dönüşümle izah edilebileceği gösterilmiştir<sup>(44)</sup>. Çalışmamızda periodontitisi ve S.S. olan hastaların dişeti örneklerinin polivalan antikolar kullanılarak immünohistokimya tekniği ile incelenmesinde en yoğun olarak IgG, sonra sırasıyla IgA ve IgM içeren plazma hücrelerinin stromayı infiltre ettiği saptandı. Bu sonuçlar, literatürde, kronik periodontitiste, plazma hücrelerinin esas olarak

IgG sentezlediklerini gösteren araştırmalarla uyum göstermektedir<sup>(44,45)</sup>. Aynı hasta gruplarında polivalan antikor kullanılarak immünperoksidaz ve immünfloresan teknikleri ile ayrı ayrı yapılan değerlendirmelerde periodontitis grubunda daha bariz olmak üzere yoğun B-lenfosit infiltrasyonunun gözlenmiş olması da her iki grupta dişeti dokusunda izlediğimiz immünglobulin birikimini açıklamaktadır.

Ancak, B-lenfositlerini uyaran ve antikor sentezini stimüle eden yardımcı T-hücrelerinin incelediğimiz dokularda baskılayıcı T-hücrelerine göre artmış olması belki de doku yıkımından sorumlu faktörler arasındadır. Periferik kanda görülen Ty/Ts oranının dişetinde yardımcı T-lenfositleri lehine bozulması, periodontal hastalıkların patogenezinde bu hücrelerin önemini vurgulamaktadır. Bundan sonra patogeneze yönelik çalışmaların yardımcı T-hücre uyaranlarına yönelik olması gerektiği kanısındayız.

Periodontolojik yönden incelemeye alınan S.S. hastalarında öncelikle dikkat çeken hususlardan bir tanesi sekretuar IgA düzeyleri ile bağıntısız gibi görülen periodontal doku yıkımının kontrol grubuna oranla daha az olmasıdır. Yaş ve plak indeksi açısından eşleştirilen periodontitisli kontrol grubundaki doku yıkımı S.S. grubunda gözlenenden çok daha fazlaydı. Daha önce literatürde yayınlanan etyopatolojik çalışmalarda etken bakteri popülasyonunun varlığı hastalığı başlatmakta ortak neden olmakla beraber, hastalığın şiddetini etkileyen faktörün veya faktörlerin doku düzeyindeki etkileşim mekanizmaları ile belirlendiği vurgulanmış<sup>(57)</sup> ve bu fikir çalışmamızın temel tartışmasını oluşturmuştur. Otoimmün bir hastalık modeli olarak incelemeye aldığımız Sjögren sendromunda primer olarak tutulan tükürük bezlerindeki doku harabiyeti ile periodontal hastalığın derecesi çok belirgin paralellik göstermemekte ve bu durum ağız kuruluğuna bağlı olarak artan plak miktarı ile orantılı periodontal yıkımın izlenememesi şeklinde ortaya çıkmaktadır.

Ancak, doku yıkımı açısından bakıldığında, Sjögren sendromu olan ve periodontitisli hastalarda etkilenen dokuların tiplerinin ve harabiyeti yapan etyolojik nedenlerinin farklı olmasına rağmen, kronik iltihabi hücre infiltrasyonundaki hücre tipi olarak yardımcı T-lenfositlerinin baskın olarak gözlenmesi, organizmadaki doku yıkım mekanizmalarında neden ve yıkılan doku ne olursa olsun, T-lenfosit altgrupları arasındaki etkileşimin önemi ortaya çıkmaktadır.

Hastalarımızda tükürük bezi ve dişeti düzeyinde supressor-sitotoksik T-lenfositlerinden ziyade, yardımcı-inducer T-hücrelerinin hakim oluşu, sitotoksik aktivitenin daha az olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca her iki grupta da dokuda DR (+) aktive T-hücrelerinin artmış olması, T-lenfosit uyarımının doku düzeyinde büyük ihtimalle IL-1 aracılığıyla geliştiğine işaret etmektedir.

İnflamatuvar dokularda başta monosit-makrofaj hücreleri olmak üzere birçok hücreden IL-1 salınımının arttığı bilinmektedir. IL-1'in en önemli etkilerinden biri de T-lenfosit proliferasyonu ve aktivasyonunu sağlamasıdır. S.S. ve periodontitisi olan hasta gruplarında incelenen histopatolojik ve immünohistolojik kriterlerin nicelik olarak benzemesine rağmen, periodontitisli hasta grubunda iltihabi hücre infiltrasyonu daha şiddetli ve yaygın olarak görülmektedir. Dolayısıyla alveol kemiği ile ilişkiye geçen bu iltihabi olayın periodontitisli şahıslarda daha fazla kemik rezorpsiyonuna neden olması doğaldır. S.S. olan hasta grubunda dişetindeki iltihabın yerleşmiş lezyon aşamasında sınırlı kalması, IL-1 salınımı üzerine özellikle Sjögren sendromunda inhibitör etki yapabilecek yüksek oranda oluşan immünkompleks<sup>(39)</sup> gibi maddelerin rolü olabileceğini düşündürür.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, daha önce yapılan bazı araştırmalarla kıyaslanarak değerlendirildiğinde lokal faktörler nedeniyle periodon-

tal hastalığın ağır olabileceği düşünölen Sjögren sendromu tipinde otoimmün bir hastalıkta periodontal doku yıkımının beklenenden daha az derecede izlenmiş olmasının, periodontal hastalığın şiddetini etkileyen faktörlerin doku düzeyinde immünoreglatuvar sistem hücreleriyle, bu hücrelerin etkileşiminde rol oynayan bazı önemli mediyatörler tarafından kontrol edildiğine işaret etmektedir.

Bu açılardan ele alındığında, araştırmamız Ülkemizde periodontal hastalıkların patogeneğine açıklık getirmeye yönelik çalışmalara temel teşkil edebilir.

## S O N U Ç L A R

Araştırmamızda, Sjögren sendromlu, periodontitisli ve normal kontrol gruplarından elde edilen klinik, histolojik ve immünojenik bulgular irdelendiğinde şu sonuçlara varılmıştır :

1- Sjögren sendromlu hastalarda yaş ortalaması 44.1 idi. Bu değer periodontitisli hastalarda 43.7, normal kontrol grubunda ise 29.9 olarak saptandı. Çalışmamızda Sjögren sendromunun en sık görüldüğü yaş grubu 40-50 olarak belirlendi.

2- S.S. olan hastalarda plak indeksi ortalaması % 86.12, periodontitisli grupta % 76.2 ve normal kontrollerde ise % 19.12 olarak saptandı. Bu sonuçlar hasta seçimindeki kurallara bağlı olarak ortaya çıkmıştır ve Sjögren sendromlu hastaların çok kötü bir ağız bakımı olduğunu göstermektedir.

3- S.S. olan hastalarda dişeti oluşu kanama indeksi ortalaması 3.32, periodontitisli grupta 3.53, sağlıklı kontrollerde ise 0.18 olarak bulundu. Bu bulgular S.S. hastalarında plak birikimi ile uyum gösteren klinik olarak belirgin dişeti iltihabını göstermektedir.

4- S.S. olan hastalarda ortalama cep derinliği 3.16 mm, periodontitisli grupta 3.99 mm., sağlıklı kontrol grubunda ise 1.60 mm olarak bulundu. Periodontitisli grupta cep derinliği, hasta ve sağlıklı kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artmıştı.

5- Russell periodontal indeksi ortalaması, S.S. olan hastalarda 4.39, periodontitisli grupta 5.98 ve sağlıklı kontrol grubunda ise 0.23 olarak bu-

landı. Periodontitisli grupta bu değer, S.S. olan ve sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdi.

6- S.S. olan grupta stimüle edilmiş parotis salyası akış hızı normal kontrollere kıyasla önemli ölçüde azalmış bulundu. Bu bulgu hastalarımızda klinik olarak ağız kuruluşuna bağlı olarak oral dokularda görülen değişiklikleri ve artmış plak oluşumunu izah etmektedir.

7- Primer S.S. olan hastaların mutlak beyaz küre değerleri, normal kontrollerle uyum göstermesine rağmen, sekonder S.S. olan grupta bu değerde önemli ölçüde azalma saptandı.

8- S.S. olan hastaların her iki grubunda da mutlak lenfosit değerleri ile E<sup>+</sup>-Rozet yöntemi ile saptanan mutlak T-lenfosit değerleri sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde azalmış bulundu. Ayrıca, Pan-T monoklonal antikorunu ile T-lenfositlerinin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar, E<sup>+</sup>-Rozet yöntemi ile elde edilen sonuçlarla pozitif korrelasyon gösterdi.

9- Özgül monoklonal antikorlarla yapılan incelemede, yardımcı T-lenfositlerinin mutlak değerleri, sağlıklı kontroller ile uyum göstermesine rağmen, baskılayıcı T-lenfositlerinde, her iki S.S. grubunda da azalma saptandı. Bu bulgulara karşılık hasta gruplarındaki Ty:Ts oranında izlenen artım istatistiksel açıdan önemli değildi.

10- B-lenfositleri ile HLA-DR antijeni taşıyan lenfositlerde, her iki S.S. grubunda da, normal kontrollere göre bir farklılık bulunmadı.

11- Serum IgA, IgM ve C3c düzeyleri sekonder S.S. grubunda artmış bulunurken, primer S.S. olan hastalarda sadece serum C4 düzeyinde artım olduğu saptandı.

12- S.S. olan hasta grubunda stimüle edilmiş parotis salyası IgA düzeyi



artmış olarak bulunmasına rağmen, salyada sentezlenen total protein üzerinden sIgA değerinin incelenmesi sonucu parotis salyası total proteinin ve sIgA sentezinin normallere kıyasla artmadığı görüldü. Bu bulgulara destek olmak üzere tükürük bezi dokularında duktus epiteli altı plazma hücreleri incelendiğinde, IgA taşıyan hücrelerin de artmamış olduğu ve IgG taşıyan hücrelerle eşit dağılım gösterdiği saptandı.

13- Tükürük bezlerinin histopatolojik incelenmesinde, S.S. olan hastalarda değişen derecelerde lenfosit infiltrasyonu, asiner atrofi, fibrozis ve yağ infiltrasyonu gözlemlendi. Monoklonal antikorlar kullanılarak, infiltrasyonun özellikle T-lenfositlerinden zengin olduğu ve bunların büyük kısmını yardımcı T-hücrelerinin oluşturduğu,  $T_H: T_S$  oranının ise belirgin derecede arttığı saptandı. Polivalan antikor kullanarak yapılan incelemede, B-lenfositlerinin ve HLA-DR antijeni taşıyan hücrelerin de infiltrasyon içinde yoğun olarak yerleşim gösterdiği izlendi.

14- S.S. tanısı konulan hastalarda, yapılan fenotipik değerlendirme periferik kan ve minör tükürük bezi lenfositlerinin sayı ve dağılım bakımından önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca hedef doku düzeyinde Yardımcı T-hücreleri ile B-hücrelerinin belirgin artımı bu hastalıkta defektif immünregülasyon ile otoantikor yapımını açıklamaktadır.

15- Periodontal yönden sağlıklı kabul edilen hastaların dişeti örneklerinde seyrek iltihabi hücreler saptandı ve bu hücrelerin bir kısmının IgG ve IgA taşıdıkları belirlendi. Böylece sağlıklı dişetin klinik olarak sağlanmasının güçlüğü görüldü.

16- Dişeti biyopsilerinin histopatolojik incelemesinde periodontitisi li grupta S.S. olan gruba kıyasla daha diffüz bir lenfoplazmositer infiltrasyon gözlemlendi. Bu bulgu klinik olarak elde edilen verilerle uyum göstermektedir.

17- S.S. ve periodontitisi olan hastaların dişeti örneklerinde en fazla IgG olmak üzere sırasıyla IgA ve IgM taşıyan plazma hücrelerinde artım görüldü. B-lenfositlerinin de her iki grupta dokuda yaygın olarak bulunması bu antikor birikimini açıklamaktadır.

18- Monoklonal antikorlar ile yapılan incelemede S.S. ve periodontitisi olan hastalarda diş etinde hücre tipi olarak benzer dağılım izlendi. Her iki grupta da iltihabi infiltrasyonun T-lenfositlerinden zengin olduğu, bu hücrelerin büyük kısmını yardımcı T-hücrelerinin oluşturduğu ve  $T_H:T_S$  oranının belirgin artış gösterdiği saptandı. Ayrıca, bu T-lenfositlerinin büyük bir çoğunluğunda DR-antijenlerinin pozitif olduğu görüldü.

Bu bulguların ışığı altında Sjögren sendromlu hastaların, ağız kuruluğu ile bağlantılı olarak çok kötü ağız hijyenlerine sahip olmalarına rağmen, aşırı bir periodontal hastalık eğilimi göstermedikleri kanıtlanmıştır. Çalışmamızda, periodontal hastalık patogenezi ve doku yıkımında lokal faktörlerin etkilerinin sınırlı olduğu, hastalığın ileri boyutlara ulaşmasındaki asıl etkenin konakçı immün cevabı ve antijen-antikor etkileşimlerinin olduğu sonucuna varıldı.

## Ö Z E T

Bu araştırma, otoimmün bir hastalık olan Sjögren sendromunda ağız kuruluşuna bağlı olarak artan plak birikimi ile vücutta değişen immün cevabın, periodontal yapıya olan etkilerini incelemek amacıyla planlandı. Çalışmada, 21 S.S. olan hasta ile 10 erişkin periodontitisli ve 30 sağlıklı bireyde, dişeti ve minör tükürük bezleri klinik, histopatolojik ve immünohistolojik açıdan değerlendirildi. Ayrıca, her üç grupta periferik kan, parotis salyası ve serum örneklerinde hücresel ve humoral immünite parametreleri incelendi.

S.S. olan hastalarda ağız kuruluşuna bağlı olarak çok kötü ağız hijyeni olmasına karşın, yaş ve plak indeksi açısından eşleştirilen periodontitisli kontrol grubunda doku yıkımı S.S. olan hasta grubundan çok daha fazla bulundu. Monoklonal antikorlar kullanarak immünperoksidaz yöntemiyle yapılan immünohistolojik incelemelerde her iki grupta da dişetindeki iltihabi infiltrasyonda izlenen mononükleer hücrelerin T-lenfositlerinden zengin olduğu ve bu hücrelerin büyük bir kısmını yardımcı T-hücrelerinin oluşturduğu görüldü. S.S. olan hasta grubunda periferik kanda baskılayıcı T-lenfositlerinin azaldığı, hedef doku olan tükürük bezinde ise özellikle yardımcı T-lenfosit altgruplarının artım gösterdiği, böylece periferik kan ile doku düzeyi arasında immün cevabı oluşturan hücrelerin dağılımında belirgin farklılıklar olduğu gösterildi. Parotis salyası IgA düzeyleri total proteine oranlanarak hesaplandığında normal sınırlar içinde bulundu.

Sonuç olarak, S.S. olan hastaların çok kötü ağız hijyenine sahip olmalarına karşın basit dişeti iltihabı ve başlangıç periodontitisinden daha ileri bir klinik tablo göstermedikleri saptandı. Bu bulgular, periodontal hastalığın patogeneğinde ve doku yıkımında lokal faktörlerin etkilerinin sınırlı olduğunu ve hastalığın ilerleyebilmesi için konakçının lokal ve sistemik immün cevabı ile antijen-antikor arasındaki etkileşimlerin önemli rol oynadığını göstermektedir.

K A Y N A K L A R

1. Adamson, T.C., et al. : Immunohistologic Analysis of Lymphoid Infiltrates in Primary Sjögren's Syndrome Using Monoclonal Antibodies. *J. Immunol.*, 120: 203, 1983.
2. Anderson, L.G., et al. : Salivary Gland Immunoglobulin and Rheumatoid Factor Synthesis in Sjögren's Syndrome. *Am. J. Med.*, 53: 456, 1977.
3. Anderson, K.C., et al. : Expression of Human B-cell-associated Antigens on Leukemias and Lymphomas : A Model of Human B-cell Differentiation. *Blood* 63: 1424, 1984.
4. Beckman, I. : Monoclonal Antibodies to HLA-DR Antigens. *Immunology Today*. 5: 29, 1984.
5. Ben-Aryeh, H., et al. : Sialochemistry for Diagnosis of Sjögren's Syndrome in Xerostomic Patients. *Oral Surg.* 52: 487, 1981.
6. Ben-Aryeh, H., Szargel, R., Gutman, D. : Salivary IgA in Sjögren Patients. *Int. J. Oral Surg.* 12: 120, 1983.
7. Boyes, J. : Autoimmunity in Oral Diseases, with Special Reference to Recurrent Oral Ulceration. *Proc. Roy. Soc. Med.* 61: 515, 1968.
8. Boyum, A. : Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages. *Scand. J. Immunol.* 5 Suppl. S: 9, 1976.
9. Carranza, F.A. : Glickman's Clinical Periodontology, 6<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1984.
10. Chandler, D.C., et al. : Human Parotid IgA and Periodontal Disease. *Archs. Oral Biol.* 19: 733, 1974.

11. Chisholm, D.M., Mason, D.K. : Labial Salivary Gland Biopsy in Sjögren's Disease. *J. Clin. Path.* 21: 656, 1968.
12. Chudwin, D.S. : Spectrum of Sjögren Syndrome in Children. *J. Pediatr.* 98: 213, 1981.
13. Clarke, G.M., Cooke, D.: A Basic Course in Statistics, 2<sup>nd</sup> ed., Edward Arnold, Scotland, 1984.
14. Crist, W.M., et al. : Immunologic Markers in Childhood Acute Lymphocytic Leukemia. *Semin. Oncol.* 12(2): 105, 1985.
15. Daniels, T.E., et al. : The Oral Component of Sjögren's Syndrome. *Oral Surg.* 39: 875, 1975.
16. Elkon, K.B., et al. : IgA and IgM Rheumatoid Factors in Serum, Saliva and Other Secretions : Relationship to Immunoglobulin Ratios in Systemic Sicca Syndrome and Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 52: 75, 1983.
17. Emre, S., Kansu, E. : İnterlökinler. *Hacettepe Tıp Dergisi* 18: 283, 1985.
18. Fallini, B., Taylor, C.R. : New Developments in Immunoperoxidase Techniques and Their Application. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 107: 105, 1983.
19. Ferrarini, M., Grossi, C.E. : Definition of the Cell Types with in So Called "Null Lymphocyte" Population of Human Peripheral Blood. An Analysis of Phenotypes and Functions. *Semin. Hematol.* 21: 270, 1984.
20. Foon, K.A., Schroff, R.W., Gale, R.P. : Surface Markers on Leukemia and Lymphoma Cells : Recent Advances. *Blood* 60: 1, 1982.
21. Fox, R.I., et al. : Use of Monoclonal Antibodies to Analyse Peripheral Blood and Salivary Gland Lymphocyte Subsets in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 25: 419, 1982.
22. Fox, R.I., et al. : Primary Sjögren Syndrome : Clinical and Immunopathologic Features. *Semin. Arthritis Rheum.* XIV: 77, 1984.

23. Fox, R.I., et al. : Salivary Gland Lymphocytes in Primary Sjögren's Syndrome Lack Lymphocyte Subsets Defined By Leu-7 and Leu-11 Antigens. *J. Immunol.* 135: 207, 1985.
24. Fox, R.I., Theofilopoulos, A.N., Altman, A. : Production of Interleukin 2 (IL-2) By Salivary Gland Lymphocytes in Sjögren's Syndrome. Detection of Reactive Cells By Using Antibody Directed to Synthetic Peptides of IL 2. *J. Immunol.* 135: 3109, 1985.
25. Genco. R.J., et al. : Antibody-Mediated Effects on the Periodontium. *J. Periodontol.* 45: 330, 1974.
26. Genco. R.J., Slots, J. : Host Responses. Host Responses in Periodontal Diseases. *J. Dent. Res.* 63: 441, 1984.
27. Ghose, T., Blair, A.H. : Antibody Linked Cytotoxic Agents in the Treatment of Cancer : Current Status and Future Prospects. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 657, 1980.
28. Greenspan, J.S., et al. : The Histopathology of Sjögren's Syndrome in Labial Salivary Gland Biopsies. *Oral Surg.* 37: 217, 1974.
29. Güven, O., De Visscher, J.G.A.M. : Salivary IgA in Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 53: 334, 1981.
30. Harris, N.L., Poppema, S., Data, R.E. : Demonstration of Immunoglobulin in Malignant Lymphomas : Use of An Immunoperoxidase Technique on Frozen Sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 78: 14, 1982.
31. Horton, J.E., Oppenheim, J.J., Mergenhagen, S.E. : A Role for Cell-Mediated Immunity in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 45: 351, 1974.
32. Joferau, F.V., LeDouarin, N.M. : Demonstration of A Cycle Renewal of the Lymphocyte Precursor Cells in Quails Thymus During Embryonic and Perinatal Life. *J. Immunol.* 129: 1869, 1982.
33. Jondal, M., Holm, G., Wigzell, H. : Surface Markers on Human T and B

- Lymphocytes. A Large Population of Lymphocytes Forming Non-Immune Rosettes with Sheep Red Blood Cells. *J. Exp. Med.* 136: 207, 1972.
34. Kansu, E. : Monoklonal Antikorlar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 27: 117, 1984.
35. Katz, D.H. : The Immune System : An Overview. (in) *Basic and Clinical Immunology*. Stites, D.P., et al. 4<sup>th</sup> ed., 13-20., Lange Medical Pub., Los Altos, 1983.
36. Klestov, A.C., et al. : Treatment of Xerostomia : A Double-Blind Trial in 108 Patients with Sjögren's Syndrome. *Oral Surg.* 51: 594, 1981.
37. Köhler, G., Milstein, C. : Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* 256: 495, 1975.
38. Laurence, J. : Lymphocyte Markers in Health and Disease. *Disease-a-Month.* 30: 4, 1984.
39. Lawley, T.J., et al. : Demonstration of Circulating Immune Complexes in Sjögren's Syndrome. *J. Immunol.* 123: 1382, 1979.
40. Lindström, F.D., Folke, L.E.A. : Salivary IgA in Periodontal Disease. *Acta Odont. Scand.* 31: 31, 1973.
41. Listgarten, M.A., Ellegaard, B. : Experimental Gingivitis in the Monkey. *J. Periodont. Res.* 8: 199, 1973.
42. Lowry, O.H., et al. : Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
43. Mac Farlane, T.W., Mason, D.K. : Changes in the Oral Flora in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Path.* 27: 416, 1974.
44. Mackler, B.F., et al. : Immunoglobulin Bearing Lymphocytes and Plasma Cells in Human Periodontal Disease. *J. Periodont. Res.* 12: 37, 1977.
45. Mackler, B.F., et al. : IgG Subclasses in Human Periodontal Disease.

- I. Distribution and Incidence of IgG Subclass Bearing Lymphocytes and Plasma Cells. *J. Periodontal. Res.* 13: 109, 1978.
46. Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. : Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235, 1965.
47. Mann, D.L., Moutsopoulos, H.M. : HLA-DR Alloantigens in Different Subsets of Patients with Sjögren's Syndrome and in Family Members. *Ann. Rheum. Dis.* 42: 533, 1983.
48. Manthorpe, R., et al. : Sjögren's Syndrome. A Review with Emphasis on Immunological Features. *Allergy* 36: 139, 1981.
49. Marcu, K.B., Cooper, M.D. : New Views of the Immunoglobulin Heavy Chain Switch. *Nature* 298: 327, 1982.
50. Morimoto, C., et al. : Alterations in Immunoregulatory T-cell Subsets in Active SLE. *J. Clin. Invest.* 66: 1171, 1980.
51. Morimoto, C., et al. : Characteristics of Anti T-cell Antibodies in Systemic Lupus : Evidence for Reactivity with Normal Suppressor Cells Defined by Monoclonal Antibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 16: 474, 1980.
52. O'Leary, T.J., Drake, R.B., Naylor, J.E. : The Plaque Control Record. *J. Periodontol.* 43: 38, 1972.
53. Okada, H., Kassaï, Y., Kida, T. : T Lymphocyte Subsets in the Inflamed Gingiva of Human Adult Periodontitis. *J. Periodont. Res.* 19: 595, 1984.
54. Oppenheim, J.J., et al. : There is More Than One Interleukin 1. *Immunology Today* 7: 45, 1986.
55. Ørstavik, D., Brandtzaeg, P. : Secretion of Parotid IgA in Relation to Gingival Inflammation and Dental Caries Experience in Man. *Archs. Oral Biol.* 20: 701, 1975.



56. Page, R.C., Schroeder, H.E. : Pathogenesis of Inflammatory Periodontal Disease. A Summary of Current Work. Lab. Invest. 33: 235, 1976.
57. Page, R.C., Schroeder, H.E. : Current Status of the Host Response in Chronic Marginal Periodontitis. J. Periodontol. 52: 477, 1981.
58. Payne, W.A., et al. : Histopathologic Features of the Initial and Early Stages of Experimental Gingivitis in Man. J. Periodont. Res. 10: 51, 1975.
59. Reinherz, E.L., et al. : Separation of Functional Subsets of Human T Cell by A Monoclonal Antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 4061, 1979.
60. Reinherz, E.L., et al. : Ia Determinants On Human T-Cell Subsets Defined by Monoclonal Antibody. Activation Stimuli Required for Expression. J. Exp. Med. 150: 1472, 1979.
61. Reinherz, E.L., et al. : Loss of Suppressor T-cells in Active Multiple Sclerosis : Analysis with Monoclonal Antibodies. N. Eng. J. Med. 303: 125, 1980.
62. Reinherz, E.L., Schlossman, S. : The Differentiation and Function of Human T-lymphocytes. Cell 19: 821, 1980.
63. Reinherz, E.L., et al. : Discrete Stages of Human Intrathymic Differentiation : Analysis of Normal Thymocytes and Leukemic Lymphoblasts of T-cell Lineage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 1588, 1980.
64. Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V. : Pathologic Basis of Disease, 3<sup>rd</sup> ed., 189-190., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1984.
65. Rohlf, F.J., Sokal, R.R. : Statistical Tables. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1969.
66. Rooney, E., Lindsley, H.B. : Current Comment. Sjögren's Syndrome. An Update. J. Kans. Med. Soc. 84: 482, 1983.

67. Russell, A.L. : Epidemiology of Periodontal Disease. *Int. Dent. J.* 17: 282, 1967.
68. Saka, O. : Varyans ve Doğrusal Regresyon Çözümlemelerinde Dönüşüm Teknikleri Üzerine Bir Çalışma. H.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi. Doktora Tezi, Ankara, 1982.
69. Schroeder, H.E., Graf-deBeer, M., Attström, R. : Initial Gingivitis in Dogs. *J. Periodont. Res.* 110: 128, 1975.
70. Schroff, R.W., et al. : Immunologic Classification of Lymphocytic Leukemias Based on Monoclonal Antibody-Defined Cell Surface Antigens. *Blood* 59: 207, 1982.
71. Shaw, J.H., et al. : *Textbook of Oral Biology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1978.
72. Shearn, M. : Sjögren's Syndrome. *Med. Clin. North Am.* 61: 271, 1977.
73. Solari, R., Kraehenbuhl, J.P. : The Biosynthesis of Secretory Component and Its Role in the Transepithelial Transport of IgA Dimer. *Immunology Today* 6: 17, 1985.
74. Stephen, K.W., Speirs, C.F. : Methods for Collecting Individual Components of Mixed Saliva : The Relevance to Clinical Pharmacology. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 3: 315, 1976.
75. Stites, D.P., et al. : *Basic and Clinical Immunology*, 5<sup>th</sup> ed., Lange Med. Pub., Los Altos, 1984.
76. Talal, N., Asofsky, R., Lightbody, P. : Immunoglobulin Synthesis by Salivary Gland Lymphoid Cells in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 49: 49, 1970.
77. Talal, N., et al. : T and B Lymphocytes in Peripheral Blood and Tissue Lesions in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 53: 180, 1974.
78. Taubman, M.A., et al. : Phenotypic Studies of Cells from Periodontal Disease Tissues. *J. Periodont. Res.* 19: 587, 1984.

79. Tuncer, Ö. : Periodontoloji Propedötik. İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Rektörlük Yayın No. 3075. İstanbul, 1984.
80. Uğurlu, M. : Periodontal Cep Epitelinin Eliminasyonunda Tam Kalınlık Flap Operasyonu ve Subgingival Küretajın Başarısının Histopatolojik İncelenmesi. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Ankara, 1983.
81. Weisz, A.S. : The Use of a Saliva Substitute as Treatment for Xerostomia in Sjögren's Syndrome. A Case Report. Oral Surg. 52: 384, 1981.
82. Whaley, K., et al. : Sjögren's Syndrome. 1. Sicca Components. Q. J. Med. 42: 279, 1973.
83. Whaley, K., et al. : Sjögren's Syndrome. 2. Clinical Associations and Immunological Phenomena. Q. J. Med. 42: 513, 1973.
84. Wiesenfeld, D., Ferguson, M.M. : Salivary Inflammatory Exocrinopathy : Diagnosis and Treatment. Aust. Dent. J. 28: 87, 1983.
85. Wilson, R.W., et al. : Sjögren's Syndrome. Influence of Multiple HLA-D Region Alloantigens on Clinical and Serologic Expression. Arthritis Rheum. 27: 1245, 1984.
86. Winchester, R.J., Ross, G. : Methods for Enumerating Lymphocyte Populations in Manual of Clinical Immunology. American Society for Microbiology Washington, D.C. 1976.
87. Yavuzylmaz, E., Eratalay, K. : Periodontitisli Hastalarda Flap Operasyonunun Küçük Tükürük Bezleri ve Parotis Salyası IgA Değerleri Üzerine Etkisi. Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi 1: 51, 1984.
88. Ziff, M. : Production of Interleukin-1 by Human Endothelial Cells. 2<sup>nd</sup> World Conference of Inflammation Antirheumatics, Analgesics, Immunomodulators. Monte Carlo, 1986.