

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALERJİ - İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI**

KRONİK ÜRTİKERDE T LENFOSİT ALT GRUPLARI

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uz.Dr. Papatya BAYRAK DEĞİRMENCİ

**Tez Danışmanı
Doç.Dr. Cengiz KIRMAZ**

Manisa 2011

ÖNSÖZ

Alerji-İmmünoloji ailesine girişime olanak sağlayan, bilimsel ve sosyal alanda yol gösterici olan, yan dal uzmanlık eğitiminin her aşamasında ve tezimin hazırlanmasında bana destek olan değerli hocam İç Hastalıkları Alerji-İmmünoloji Bilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Cengiz KIRMAZ' a çok teşekkür ederim.

İç Hastalıkları Anabilim Dalı' nın tüm saygı değer öğretim üyelerine, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı' ndan Doç. Dr. Seda Vatansever' e, Biokimya Anabilim Dalı' ndan Doç.Dr. Ece Onur' a, Halk Sağlığı Anabilim Dalı' ndan Uz. Dr. Beyhan Cengiz Özyurt' a çok teşekkür ederim

Uzmanlık eğitim sürecinde bir çok güzelliği paylaştığım uzman arkadaşlarıma, asistan arkadaşlarıma ve hemşirelerimize çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
I. GİRİŞ	1
II GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 KRONİK ÜRTİKER	2
2.1.1 Tanım.....	2
2.1.2 Sınıflama ve patogenez	2
2.1.3 İmmünopatogenez	3
2.1.4 Helicobacter pylori enfeksiyonu kronik ürtiker ilişkisi.....	6
2.2 OTOİMMÜN ÜRTİKER	6
2.2.1 Tiroid otoimmünitesi ve kronik otoimmün ürtiker	6
2.2.2 Otoantikorlar	7
2.2.3 Plazmada histamin salgılatıcı faktörler.....	10
2.2.4 Hücresel defekt teorisi	11
2.2.5 Kompleman sisteminin rolü.....	11
2.2.6 Histolojik bulgular.....	12
2.2.7 Otoantikorların belirlenmesi	13
2.2.6.1 İn vivo testler: Otolog serum deri testi (OSDT).....	13
2.2.6.2 İn vitro testler	13
2.3 T LENFOSİT ALT GRUPLARI	15
2.3.1 T yardımcı hücre farklılaşmasının antijen ile modülasyonu.....	18
2.3.2 Sitokinlerle modülasyon	18

2.3.3 Dendritik hücrelerle modülasyon.....	20
2.3.4 T regülatuvar hücreler ile modülasyon.....	21
III. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1 Otolog serum deri testinin yapılışı.....	24
3.2 Periferik kan mononükleer hücre kültürü.....	25
3.3 Biokimyasal analizler	26
3.3.1 IL-4 ölçümü	26
3.3.2 IL-10 ölçümü	26
3.3.3 IL-23 ölçümü	26
3.3.4 TGF- β 1 ölçümü	26
3.3.5 IL-17 ölçümü	27
3.3.6 IFN- γ ölçümü.....	27
3.4 Kontrol grubu	27
IV. BULGULAR	28
V. TARTIŞMA	39
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	46
VII. ÖZET	47
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	49
IX. KAYNAKLAR	51

I. GİRİŞ

Ürtiker; vazodilatasyon ve permeabilite artışı nedeniyle gelişen deriden kabarık, kırmızı ve kaşıntılı deri lezyonudur. Altı haftadan daha uzun süredir devam eden ve haftada en az 2 gün tekrarlayan ürtiker, kronik ürtiker olarak değerlendirilir.

Kronik ürtiker tanısında öncelikle fiziksel, alerjik, psödoalerjik ve enfeksiyöz nedenler dışlanır. Nedeni bulunamayan olgular ise kronik idiyopatik ürtiker (KİÜ) olarak adlandırılır ve kronik ürtikerli olguların %70'den fazlası bu grup içinde yer almaktadır.

Son yıllarda KİÜ' li olguların bir kısmında mast hücrelerinin ve bazofillerin yüksek afiniteli IgE reseptörünün alfa altbirimine (FcεR1α) ya da IgE'ye karşı IgG tipi otoantikolar tespit edilmiştir. Bu otoantikolar fonksiyonel olarak aktiftir ve sağlıklı donörlerin bazofillerinden ve derideki mast hücrelerinden in vitro olarak histamin salınımına neden olmaktadır. Serumda var olan bu antikoları saptamak için kullanılan özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek güvenilir bir yöntem olarak otolog serum deri testi (OSDT) kullanılmaktadır.

Yapılan tüm bu çalışmalar KİÜ' de birbiriyle bağlantılı çok çeşitli olayların rol oynadığı komplike bir patogenez olduğunu göstermektedir. KİÜ etiyolojisi ve patogenezi ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olmakla birlikte, kesin olarak ispatlanmış bir neden ve mekanizma halen bilinmemektedir. Bu nedenle KİÜ etiyolojisi ve patogenezinin yönelik araştırmalar önemini korumaktadır.

Bu tez çalışmasında OSDT ve lenfosit hücre kültürü yöntemlerini kullanarak, KİÜ' in otoimmünite ve yardımcı T lenfosit alt grupları ve sitokinleri ile ilişkisini belirleyerek KİÜ patogenezinde bir ilerleme sağlamayı amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

2.1 KRONİK ÜRTİKER

2.1.1 Tanım

Ürtiker yüzeysel dermis tabakalarını tutan, deriden kabarık, eritemli, basmakla solan kaşıntılı deri lezyonudur. Ürtiker lezyonu 24-48 saat içinde deri üzerinde iz bırakmadan solar. Ürtiker hastalığının gelişim sürecine bağlı olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Şikayetler 6 haftadan kısa bir süredir devam ediyorsa akut ürtiker (AÜ), haftada en az 2 kez tekrarlayıp 6 haftadan daha uzun bir seyir gösteriyorsa kronik ürtiker (KÜ) olarak incelenmektedir. Bazı olgularda kronik zeminde tekrarlayan ataklar olmaktadır bu durumda da kronik intermittan ürtiker olarak değerlendirilir (1-2).

2.1.2 Sınıflama ve patogenezi

Tablo 1. Ürtiker Sınıflandırması

Grup	Subgrup	Özellik
Spontan ürtiker	Akut ürtiker	6haftadan kısa süreli
	Kronik ürtiker	6 haftadan uzun süreli
Fiziksel ürtiker	Soğuk	Soğuk hava/su/rüzgar
	Geçikmiş basınç	Vertikal basınç sonrası 3-8 saat içinde gelişir
	Solar	UV
	Isı	Lokal ısı
	Dermografizm	Mekanik uyarı
	Vibratuvar ürtiker	Mekanik vibrasyon
	Akuajenik ürtiker	Su
	Kolinerjik	Vücut ısısının artması
	Kontakt	Kontakt
	Egzersiz nedenli	Egzersiz

Tablo 2. Kronik ürtikerin basit sınıflaması

Fiziksel ürtiker (%35)
Dermografizm
Soğuk ürtiker
Kolinerjik ürtiker
Geç basınç ürtikeri
Otoimmün ürtiker (%25)
Kronik idiyopatik ürtiker (%35)

Ürtikerin patofizyolojik mekanizmalar açısından sınıflandırılması IgE-bağımlı veya kompleman aracılı immunolojik durumlar, direkt mast hücre degranülasyonu veya araşidonik asit metabolizmasını etkileyen nonimmünolojik mekanizmalar ve idiyopatik durumlar olarak yapılabilir (3). İmmünolojik olmayan KÜ, morfin, kodein gibi maddelerin direk histamin salgılatıcı etkileri ile gelişmektedir.

İmmünolojik mekanizma ise 2 şekilde gelişmektedir:

- 1- Tip 1 Anafilaktik ürtiker: IgE aracılı erken tip aşırı duyarlılık sözkonusudur. Mast hücrelerinin antijenle karşılaşması sonrası mediatör salınımı, deride ürtiker plakları ve mukozal ödem gelişir.
- 2- Tip 3 İmmün kompleks aracılı, vaskülitik ürtiker: Burada antikor antijen kompleksi gelişimi ile kompleman aktivasyonu sözkonusudur. Vaskülitik ürtikerde lezyonlar 24 saatten daha uzun sürer ve pigmentasyon bırakarak iyileşir. Eklem ve karın ağrısı, lenfadenopati olabilir. Malignite ve bağdoku hastalıkları ile birliktelik görülebilir.

Kronik ürtiker toplumda %0.1 oranında rastlanan bir hastalıktır. Olguların %20' si başlangıçtan 20 yıl sonra bile devam edebilmektedir (4).

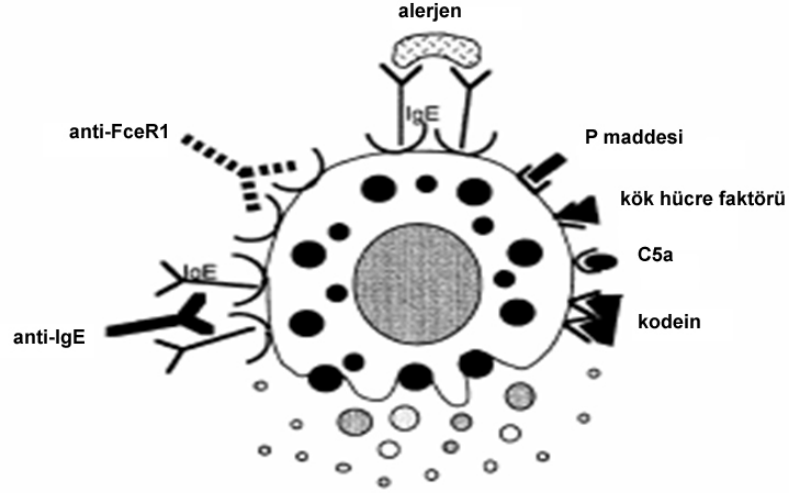
Klinik özellikler açısından diğer gruplara benzerlik göstermekle birlikte, kronik idiopatik ürtiker olguları genellikle atopik yapılı değildir, serum IgE düzeyleri normal sınırlardadır (5). Fiziksel ürtiker olguları ile karşılaştırıldığında, lezyonlar en az 8-12 saat sürmektedir ve rezidüel pigmentasyon görülmemektedir. Larinks ödemi nadiren görülmekle birlikte hayatı tehdit edici değildir. Kaşıntı hemen her zaman görülen bir belirtidir. Kronik ürtikerde gelişen deri lezyonları, deriden kabarık şekli değişken ancak genelde dairesel lezyonlardır. Tipik biyopsi örneği nekrotizan olmayan perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonudur (6, 7).

2.1.3 İmmünopatogenez

Kronik ürtikerde hastaların %80-90' ında eksternal bir neden saptanamaz. Kronik ürtiker patogenezini açıklamak için çeşitli teoriler vardır ancak hiçbirisi kesinlik kazanmamıştır. Deri biopsisinde degranüle olmuş mast hücreleri, eozinofil, T yardımcı hücre 1 (Th1), T yardımcı hücre 2 (Th2), lenfosit, nötrofil ve bazofiller saptanır. Bu bulgular alerjik reaksiyonun geç fazına benzemektedir. KIÜ patogenezi ile ilgili çalışmalar daha çok mast hücreleri, IgE aracılı bazofil aktivasyonu üzerine yoğunlaşmıştır (8). KIÜ hastalarında mast hücrelerinin mediyatör içeriğinin daha kolay salındığı, intradermal kodein ve 48/80 maddesi ile gösterilmiştir (9-10). Mediyatör salınımı eğilimindeki bu artışın nedeni henüz tam olarak bilinmemektedir. Mast hücrelerinden mediyatör salınımına neden olan immünolojik ve immünolojik olmayan bir çok faktör gösterilmiştir. İmmünolojik olmayan faktörlerin rolü net değildir (11).

Tip I hipersensitivite reaksiyonları spesifik IgE' ye antijenin bağlanması ile oluşan kronik ürtikerden çok akut ürtiker olguları için geçerli bir nedendir. Periferik kandaki bazofiller erken fazda değil, geç faz reaksiyonlarında olduğu

gibi dolaşımdan lezyonun olduğu yere göç ederek lezyonların devamının sağlanmasında rol oynamaktadırlar (12).



Şekil 1. Mast hücresinden mediyatör salınımına neden olan faktörler

Besinlerin neden olduğu IgE' ye bağlı alerjik reaksiyonların tek başına ürtikeriyel döküntüye yol açması nadir bir durumdur. Genellikle orofarengeal kaşıntı, kusma ve karın ağrısı gibi diğer semptomların eşlik etmesi beklenir (5).

Gıda katkı maddelerine ve diyetdeki salisilatlarla karşı gelişen psödoalerjik reaksiyonlar halen tartışmalıdır . Psödoalerjik reaksiyonların mekanizması tam olarak bilinmemekte, prostaglandin yerine artmış lökotrien sentezi suçlanmaktadır (13).

Fiziksel ürtikerli hastalardaki mast hücre degranülasyonunun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Bazı dermografizm, kolinerjik, soğuk ve solar ürtiker olgularında immünglobülin serum faktörü tespit edilse de semptomatik dermografizm ve kolinerjik ürtiker hastalarında histamin salınımına neden olan bir otoantikor gösterilememiştir (14).

Psikolojik stresin ürtiker ve anjioödem tetiklediği bilinmektedir. Kronik ürtikerli hastalarda kortikotropin salıcı hormonun (CRH) CRH-R1

reseptörlerinde up-regulasyon olduğu bunun da CRH' a bağlı deride mast hücre degranulasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (15).

Hepatit C, hepatit B, EBV enfeksiyonlarında olduğu gibi immün kompleks yoluyla aktive olan kompleman sistemi anafatoksin C5a yolu ile mast hücrelerinden histamin salınımına yol açabilmektedir (16,17,18).

2.1.4 Helicobacter pylori enfeksiyonu kronik ürtiker ilişkisi

Kronik ürtikerde H.pylori enfeksiyonunun rolü henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. KÜ olan hastalarda H.pylori eradikasyonu sonrası klinik bulguların gerilediği bir çok çalışmada bildirilmiştir (19, 20).

2.2 OTOİMMÜN ÜRTİKER

Daha önceleri kronik idiyopatik ürtiker olarak tanımlanan olgular günümüzde iki grupta incelenmektedirler: Kronik otoimmün ürtiker (KOÜ) ve kronik idiyopatik ürtiker (KİÜ). Ürtiker olgularının %80' den fazlasında bir neden saptanamamaktadır ve idiyopatik olarak kabul edilmektedir. Ancak son yıllarda KÜ otoimmün bir hastalık olarak kabul edilmektedir. KOÜ olguların %40-50' sini oluşturmaktadır (2).

2.2.1 Tiroid otoimmünitesi ve kronik otoimmün ürtiker

Kronik ürtiker hastalarında antitiroid antikorlarının yüksek saptanması patogeneizde bu antikorların etkili olabileceği düşüncesini doğurmuştur (21). **Leznoff ve Susman** KİÜ' li 624 olgunun %14' ünde antimikrozomal ve anti-tiroglobulin antikorlarının yüksek olduğunu göstermişlerdir (22). Ayrıca tiroid antikor pozitifliği olan 46 kronik ürtiker hastasına L-tiroksin vermişler ve 8' inde

4 haftada remisyon sağlamışlardır. **Rumbryt** çalışmasında kronik ürtikeri olan ötiroid ancak antikor pozitif vakalarda L-tiroksin tedavisi ile yanıt almıştır (23).

Kronik ürtikerli hastalarda tiroid otoantikor pozitifliği insidansı %15 ile %24 arasında bildirilmiştir (24, 25).

Kikuchi ise KOÜ' li hastalarda (%27), KİÜ' li hastalara göre (%11) antitiroid antikorlarını daha yüksek oranda pozitif bulmuştur (24). Otoimmün hastalıklar (tiroid hastalığı, vitiligo, tip 1 DM, romatoid artrit ve penisiyöz anemi) fonksiyonel otoantikorları bulunan hastalarda bulunmayanlara göre daha yüksek oranda saptanmıştır (26).

Otoimmün tiroid hastalığı ile KÜ arasındaki ilişkinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak spontan ya da enfeksiyon sonrası gelişen tiroid dokusundaki inflamasyona bağlı salınan antijenlerin immün yanıtı tetiklediği düşünülmektedir. Tiroid bezindeki inflamasyonun ve antijen salınımının azaltılması ile (cerrahi, antitiroid tedavi ya da tiroid hormon replasmanı) ürtiker semptomları azalabilmektedir. Ancak tiroid süpresif tedavinin ötiroid ve antitiroid antikor pozitif hastalarda kronik ürtiker seyrini değiştirip değiştirmeyeceği henüz tam olarak bilinmemektedir (27).

OSDT pozitif olan KÜ' li olgularda HLA-DR4 ve DQ8 aleli ile in vitro bazofil histamin salınım aktivitesi arasında güçlü bir ilişki tespit edilmiştir (28).

2.2.2 Otoantikorlar

1986 yılında Grattan ve arkadaşları KİÜ' li hastaların otolog serumlarının intradermal enjeksiyonu ile deride papül ve eritemin oluştuğunu saptamışlardır. Böylece serumda histamin salgılatıcı faktörlerin bulunduğu gösterilmiştir (29). 1993 yılında Greaves ve arkadaşları bu hastaların serumunda mast hücrelerinin ve bazofillerin yüksek afiniteli IgE reseptörünün alfa altbirimine (FcεR1α) karşı gelişen IgG yapısında fonksiyonel otoantikorlar tespit etmiştir (30). Bu antikorların reseptöre bağlanmak için IgE ile

yarıştıkları gösterilmiştir. Daha büyük sayıda hasta serumları ile yapılan çalışmada ise IgE varlığında bile antikorların reseptörlere bağlandığı gösterilmiştir. Bu antikora yarışmasız adı verilmiştir (31).

Bir başka çalışma bu antikorun KlÜ' li hastaların %25' inde etiyolojik faktör olduğunu göstermiştir. Ayrıca hastaların %5' nin IgE' ye karşı fonksiyonel otoantikora sahip olduğunu bildirmişlerdir (32).

IgE' ye karşı gelişen otoantikora (anti-IgE) alerjik olmayan sağlıklı bireylerde, atopik hastalığı olan hastalarda ve hiper IgE sendromlu hastalarda da saptanmıştır (33).

Gruber ve arkadaşları soğuk ürtikerli bir hastanın serumunda fonksiyonel IgM yapısında anti-IgE antikorları saptamışlardır (34).

Sabroe ve arkadaşları 107 kronik ürtiker hastasının %31' inde fonksiyonel otoantikora bulmuştur (26).

Zweimann ve arkadaşları; 70 kronik ürtiker hastasının 30' unda,

Tong ve arkadaşları ise 50 hastanın %52'inde bazofil histamin salınım aktivitesini göstermişlerdir (35, 36).

Ferrer, Kinet ve Kaplan 68 hastanın %48' inde bazofillerden histamin salınımı saptamışlardır (37).

Yine **Sabroe** ve arkadaşları 78 kronik idiyopatik ürtikerli hastanın %26' sında fonksiyonel histamin salınımına neden olan anti- FcεRIα- antikorları; %15' inde fonksiyonel olmayan anti- FcεRIα- antikorları; %9' unda mast hücresine özgül histamin saldıracı faktör ve %9' unda anti-IgE antikorunu saptamışlardır. Hastaların %41' inde ise herhangi bir faktör bulmamışlardır (38).

ELISA yöntemi serumdaki fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan total antikorları ölçerken, hedef hücreyi etkileme (bazofillerden histamin salınımı) yeteneği hakkında fikir vermemektedir (39). **Ferrer, Kinet ve Kaplan** kronik

ürtiker hastalarında Western Blot yöntemi ile anti- FcεR1α antikorlar saptamışlardır (37).

Fiebiger ve arkadaşları da 281 kronik ürtikerli olgunun %38' inde; pemfigus vulgarisli olguların %39' unda; dermatomyozitlilerin %36' sında; sistemik lupus eritematozus hastalarının %20' sinde ve büllöz pemfigoidli olguların %13' ünde ELISA yöntemi ile anti-FcεR1α antikorlar bulmuşlardır (40).

Sadece antikor pozitif hastaların serumunda bazofillerden histamin salınımını gözlemlemişlerdir. Salınımın gözlemlendiği serumlardaki antikorların %91' i kompleman fikse edebilen IgG1 ve IgG3 tipinde iken; salınımın gözlenmediği serumlardaki antikorların çoğu IgG2 ve IgG4 tipindedir.

Otoantikorlar dışında dolaşımdaki bazı mediyatörlerin de histamin salınımına yol açtığı görülmüştür. Kronik ürtikerli hastaların %5-10' unun serumlarının bazofillerden değil, mast hücrelerinden histamin salınımına neden olduğu ispatlanmış ; IgG yapısında olmayan mast hücrelerine özgül histamin saldırgan faktör tanımlanmıştır (31, 41).

Ayrıca periferik kandaki mononükleer hücreler tarafından yapılan sitokin yapısında bir faktörün bazofillerden histamin salınımına ve bazofil, T hücresi ve eozinofillerden sitokin sekresyonuna yol açtığı bildirilmiştir (42, 43, 44).

OSDT' ni pozitif yapan nedenler:

1-IgE reseptörünün α subünitine karşı oluşmuş IgG (anti- FcεR1α)

2-IgE' nin Fc bölgesine karşı oluşmuş IgG (anti IgE)

3-Serumda saptanan düşük molekül ağırlıklı bir bileşik (10-15 Kd).

Bu otoantikorların varlığı KIÜ hastalarının %30-50' sinde gösterilmiştir (2).

Bu IgG molekülleri normal bazofillerle inkübe edildiklerinde histamin salınımını tetikleyebilir, kompleman aracılığı ile mast hücrelerini aktive edebilir (34, 46).

Bu bilgilere rağmen *invivo* bu otoantikörlerin etkisi kesinleşmemiştir. IgG içermeyen serum bile pozitif OSDT' ne neden olabilir. Günümüzde hem immünglobülin hem de düşük molekül ağırlıklı moleküller olarak çeşitli histamin salgılatıcı faktörler tanımlanmıştır. Fakat OSDT pozitifliğine neden olan temel bir neden tanımlanamamıştır (47).

2.2.3 Plazmada histamin salgılatıcı faktörler

Bazı KİÜ hastalarında trombin gibi trombosit kaynaklı pıhtılaşma faktörlerinin yüksek düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada 28 KİÜ' li hastanın serumunda kontrollerden daha yüksek düzeyde polipeptid F1+2 saptanmıştır. Bu peptid protrombinin trombine dönüşümü sırasında üretilir ve düzeyi ürtikerin kliniği ile uyumludur (48, 49).

Trombin, mast hücreleri ve bazofilleri aktive edebilir, permeabilityyi artırır, C5a üretimini artırır (50, 51, 52)). KİÜ hastalarında IgG bağımlı mast hücrelerinin histamin salınımında artış gösterilmiştir (46).

Pıhtılaşma faktörlerindeki anormalliklerin saptanması KİÜ de otolog plazma deri testi (OPDT) kullanımına yol açmıştır. OPDT; OSDT' nin Nasitrat antikoagülan içeren plazmanın intradermal enjeksiyonu ile uygulanan bir varyantıdır. Bir çalışmada KİÜ hastalarında; OSDT %53 pozitif, OPDT ise %86 pozitif saptanmıştır. Ancak bu testin henüz geçerlilik ve güvenilirliği netleşmemiştir (48). KİÜ, klinik olarak remisyonda bile olsa OSDT(+) liği sürmektedir (53). OSDT' ne benzer şekilde, ürtiker olmasa bile anti-FcεRI antikörler; pemfigus, SLE, dermatomyozit gibi otoimmün hastalıklarda da saptanabilir (54).

2.2.4 Hücresel defekt teorisi

KİÜ de mast hücre ve bazofillerde sinyal veya fonksiyonlarında bozukluk olduğu gösterilmiştir. KİÜ de mast hücre sayısı deride normaldir ancak sağlıklı kontrollere göre immünolojik olmayan şekilde mast hücre degranülasyonu (48/80 maddesi veya kodein sülfat ile) daha kolay histamin salınımı olur (55, 56). KİÜ hastalarında serum bazofil sayısı ürtikerin klinik şiddetiyle uyumlu olarak, deriye bazofil migrasyonu olmasından dolayı normallere göre düşüktür (57, 58).

KİÜ hastalarında fonksiyonel farklılıklarına göre 2 bazofil fenotipi tanımlanmıştır;

- 1- IgE reseptör aktivasyonuna normal yanıt veren bazofiller (responder)
- 2- IgE aracılı aktivasyona yanıt vermeyen yanıtız tip (nonresponder) (59).

Her iki bazofil alt grubu yaklaşık aynı sayıdadır. Yanıtız alt grupta IgE reseptör aracılı sinyalleri normalde inhibe eden regülatuar proteinlerin hücre içi düzeyi yüksektir. Çalışmalarda otoantikör düzeyinden veya OSDT' inden farklı olarak bazofil yanıtındaki normalizasyon ile semptomların düzeldiği gösterilmiştir (60, 61).

Sonuç olarak bazı KÜ hastalarındaki birincil bozukluğun humoral değil selüler ya da subselüler olabileceği söylenebilir (62).

KİÜ olgularında periferik kandaki mononükleer hücrelerde p21 Ras yolunda regülasyon bozukluğu gösterilmiştir (63)

2.2.5 Kompleman sisteminin rolü

Kronik otoimmün ürtikerli hastaların serumlarından elde edilen IgG' nin kompleman eklenmeden deri mast hücrelerinden histamin salınımı yapamadığı; C2 ve C5 içermeyen serumların böyle bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (64). Ayrıca KÜ'li hastaların serumundan elde edilen IgG' nin bazofillerden histamin salınımını sağlamak için kompleman kullandıkları da

gösterilmiştir. C5a reseptörleri sadece derideki mast hücrelerinde bulunur; akciğer ve barsak mukozasında bulunmaz. Fonksiyonel otoantikörlerin neden sadece deri bulgularına yol açtığı bu şekilde açıklanabilir (65).

2.2.6 Histolojik bulgular

Kronik ürtikerli hastalarda dolaşımdaki bazofil sayısının azaldığı bilinmektedir. Ayrıca bazofil sayısı ile ürtiker şiddeti arasında negatif bir korelasyon olması da dolaşımdaki bazofillerin lezyon bölgesine migrasyonundan kaynaklandığı düşünülmüştür (66). **Claveau** ve arkadaşları histamin salınımının deride arttığını, periferik kanda ise azaldığını saptayarak benzer bulgular elde etmişlerdi (67).

Yeni çalışmalarda kronik ürtikerli hastaların serumları diğer kronik ürtikerli olguların serumları ile inkübe edildiğinde sağlıklı kontrol grubuna göre bazofillerden daha fazla histamin salınımına yol açtığı gösterilmiş; immünolojik uyarılara olan yanıtızsızlıktan farklı olarak bilinmeyen bir serum faktörünün aşırı bir yanıtı yol açtığı düşünülmüştür (33). Antikor pozitif ve negatif olguların biyopsi bulguları karşılaştırıldığında önemli bir fark saptanmamıştır. KİÜ ve KOÜ hastalarının biyopsilerinde CD4+ lenfosit, monosit ve granülosit ağırlıklı perivasküler infiltrasyon saptanmıştır. **Sabroe** ve arkadaşları ise otoimmün ve idiyopatik ürtikerlilerin biyopsi bulgularını karşılaştırdığında otoimmün grupta granülositlerin daha fazla bulunduğunu, diğer hücreler açısından bir fark olmadığını; sitokin düzeylerinin (IL-4, IL-5, IFN-gamma) otoimmün grupta daha yüksek bulunduğunu göstermişlerdir (68). **Caprioni** ve arkadaşları OSDT yapılan yerden aldıkları biyopsi örneklerinde Th1/Th2 lenfositler ve nötrofillerden zengin hücreler ile kemokin aktivitesinde artış saptamışlardır. Ayrıca döküntü olmayan deriden alınan biyopsilerde de benzer bulguların gösterilmesi, yaygın bir immün aşırı yanıtının varlığını göstermişlerdir (69).

2.2.7 Otoantikörlerin belirlenmesi

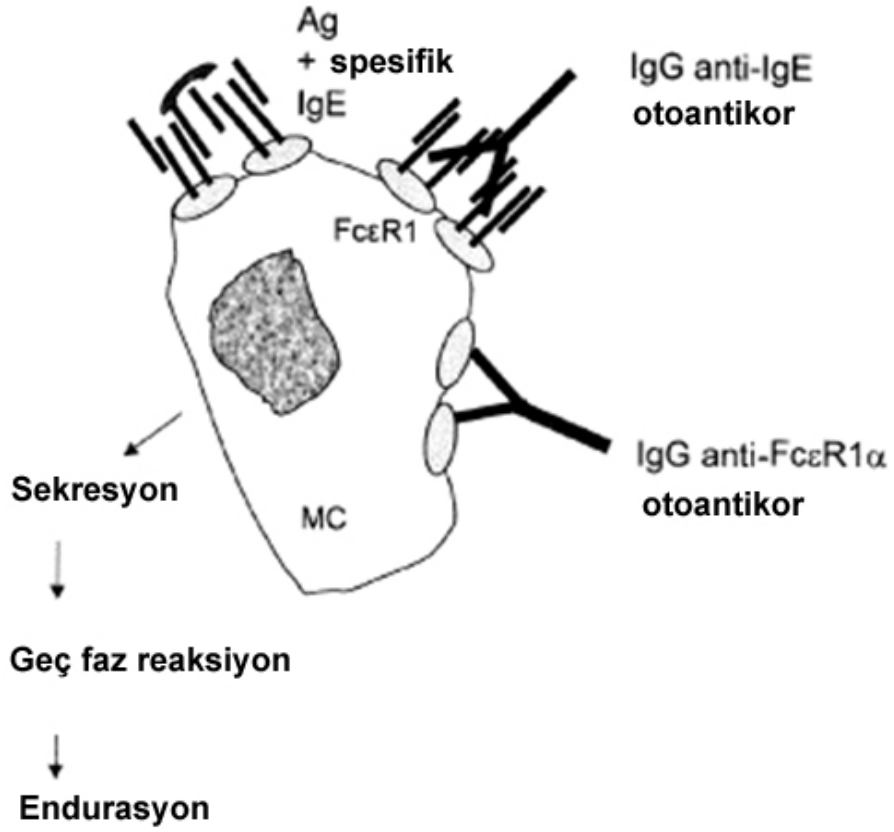
2.2.7.1 İn vivo testler: Otolog serum deri testi (OSDT)

1946 yılında **Malmros** kronik ürtikerli bazı hastaların serumları kendi derilerine enjekte edildiğinde ani bir kızarıklık ve kabartı oluştuğunu bildirmiştir (70). 1986 yılında **Grattan** ürtiker hastalarının bazılarında remisyonda olmadıkları dönemde intradermal otolog serum enjeksiyonu sonrası ürtikeriyel döküntülere benzeyen lezyonların geliştiğini göstermiştir (29). Bu gözlem günümüzde otolog serum deri testi olarak kullanılmaktadır. OSDT aktif kronik idiyopatik ürtikerli hastaların %50-60' ında pozitif saptanmış, fiziksel ürtiker ya da sağlıklı olgularda gösterilmemiştir (38). Tam olarak önemi ve klinik pratiğe katkısı bilinmese de akut ürtiker ile başvuran NSAİ duyarlılığı olan olgularda da yüksek pozitiflik gösterilmiştir (71, 72).

OSDT in vitro bazofil histamin salınım aktivitesini en iyi gösteren in vivo test yöntemidir (1). Hasta serumunun enjeksiyonundan otuz dakika sonra değerlendirildiğinde normal salın enjeksiyonuna göre 1.5 mm ve daha fazla oluşan pembe renkli kabartı pozitif kabul edildiğinde testin %70 duyarlılığının, %80 özgüllüğünün olduğu gösterilmiştir (26). OSDT pozitifliğinin IgE' yi inaktive etmek için serum 30 dakika süre ile 56C' de ısıtıldığında ve heparinize plazma kullanıldığında da devam ettiği bildirilmiştir. Ancak bir başka çalışmada heparinize plazma ile yapılan testte pozitiflik daha düşük bulunmuştur (73, 74).

Kronik ürtikerli OSDT pozitif bulunan hastaların küçük bir kısmında düşük molekül ağırlıklı bir faktörün bazofillerden değil mast hücrelerinden histamin salınımına neden olduğu düşünülmektedir (38).

Pıhtılaşma esnasında oluşan vazoaktif faktörlerin OSDT pozitifliğine katkıda bulunduğu söylenebilir bu yüzden OSDT kronik otoimmün ürtiker tanısında spesifik bir test olarak kabul edilmemektedir (33).



Şekil 2. Otolog serum deri testinde pozitifliğe neden olan otoantikorlar

2.2.7.2 In vitro testler

ELISA ya da Western Blot yöntemleri ile serumdaki fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan total antikorlar ölçülebilmektedir. Bazı otoimmün bağdoku hastalıklarında ve diğer kronik ürtiker tiplerinde de bu antikorlar var olduğu için bu testlerin özgüllüğü oldukça düşüktür (62). Bugün için en yararlı in vitro test otoantikora bağlı bazofil ve deri mast hücrelerinden histamin salınımının gösterilmesidir (39). Anti- FcεR1α antikorların saptanması için donör bazofilleri laktik asit ile karşılaştırılır IgE' lerinden ayrılması sağlanır. Ayrıca bazofiller IgE ile duyarlılaştırılarak anti-IgE antikorları saptanmaya çalışılır. İnkübasyon ortamına IL-3 eklenerek ölçüm daha duyarlı hale getirilir. Bazı araştırmacılara göre test için mast hücreleri bazofillere göre daha çok

tercih edilmelidir (75, 76). OSDT (+) KİÜ' li hastaların serumları atopik donörün bazofilleri ile inkübe edildiğinde hedef bazofillerde CD63 ekspresyonuna neden olmaktadır (77). Benzer şekilde donör bazofillerinde CD203c ekspresyonunun OSDT pozitifliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (78). Bazofil aktivasyon göstergelerinin ekspresyonu akım sitometrisi kullanılarak saptanabilir. Bu testin ileride otoimmün kronik ürtiker için bir tarama testi olabileceğini söylemek mümkündür (62).

Bazofil histamin salınımı ölçümleri KOÜ' li hastalarda fonksiyonel antikörlerin tespit edilmesi için "altın standart" testtir. Ancak standardizasyon güçlüğü ve zaman alması nedeni ile bugün daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Western Blot ve ELISA gibi fonksiyonel olmayan, antikörleri da tesbit ettiğinden özgül değildir. OSDT in vitro bazofil histamin salınım aktivitesini en iyi gösteren in vivo test yöntemidir (1).

2.3 T LENFOSİT ALT GRUPLARI

Edinsel immün yanıtı oluşturan T lenfositler; hücre yüzey eş-reseptör ekspresyonu ve farklı MHC molekülleri ile etkileşmeleri sonucu CD4(+) ve CD8(+) olarak 2 alt gruba ayrılmaktadır. Bugün için CD4(+) T lenfositler ise 4 gruba ayrılmaktadır; T helper 1(Th1), T helper 2(Th2), T helper 17(Th17), regülatuar T hücre (T reg) (79).

Th1 hücreler; başlıca IL-2, IFN- γ , TNF- β sekrete eder ve mycobacterium gibi hücre içi organizmalara karşı immünitede görevli hücrelerdir. IFN- γ sekresyonu ile makrofajları aktive ederek hücrel immünite, geçmiş tip IV hipersensitivite, sitotoksik T lenfosit farklılaşmasında rol alır. Ayrıca proinflamatuvar özellikte olan Th1 hücreler bazı otoimmün hastalıklarda da rol alır (80).

Th2 hücreler; IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 sekresyonu yapar. Parazitik enfeksiyonlara karşı gelişen immünitede, IgE sentezi ve alerjik inflamasyonda rol alırlar (81).

Hem Th1 hem de Th2 hücreler naive T hücrelerden gelişir. Antijenle ilk karşılaşma sırasında IL-12 veya IFN- γ ya da IL-4 varlığında naive T hücre Th1 veya Th2'ye polarize olur. Bu fenotip polarizasyonu sırasında IL-4, IFN- γ salınımını inhibe eder veya tam tersi de olabilir.

Infante-Duarte ve ark. tarafından 2000 yılında tanımlanan IL-17 üreten Th17 hücreler farklı bir alt gruptur (82, 83). Th1 hücrelerin IFN- γ sekresyonu ile inflamasyona nasıl aracılık ettiği net değildir. Bu yüzden Th17' lerin keşfi bu sürecin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Th17 hücreler, IL-17, IL-6, TNF- α ve IL-22 ekspres eder (84, 85). Th17 hücreler bakteri, fungus gibi hücre dışı patojenlere karşı gelişen immün yanıtın erken fazında rol alırlar. Ayrıca otoimmünite ve inflamasyonda da önemlidirler. Otoimmün modellerde Th1 hücrelerin genetik delesyonu olmadan IL-17' nin nötralize edilmesi patolojiyi ortadan kaldırmaktadır (86). Anti-IL-17 deneysel artritlerde eklem hasarını azaltmış, astım modellerinde eozinofilik infiltrasyonu arttırmış, nötrofil infiltrasyonunu ise azaltmıştır (87). Dışarıdan uygulanan IL-17' nin pulmoner eozinofili ve bronş aşırı duyarlılığını azalttığı böylece IL-17' nin regülatuar rolü olabileceği düşünülmüştür (88). Th17' nin yönettiği nötrofil infiltrasyonu Th2 aracılı eozinofili ile ters yönlüdür. Tekrar uyarılmadan sonra Th17 hücreler IL-17 ağırlıklı fenotipi kaybetmez. Th17 hücreler Th1 ve Th2 hücreler ile yarışan ayrı bir alt gruptur (89). Çalışmaların çoğu fare modelleri üzerinde olsa da IL-17' nin proinflamatuvar rolü ve Th17 hücrelerin otoimmünitede önemli rol aldığı gösterilmiştir. Th17 hücrelerin en önemli sitokini olan IL-17' nin IL-6, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinleri ve CXCL1, CXCL2, CXCL8 gibi akut inflamasyonda görevli kemokinleri indüklediği bilinmektedir. Bu kemokinler Th17 aracılı enflamasyonun tipik özelliği olan nötrofillerin toplanmasını sağlar (90, 91). Th1 ve Th2 hücrelerden farklı olarak Th17 hücreler nötrofil birikimi ve yaşamlarını sürdürmesini, matriks degradasyonu ve yapısal hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonunu destekleyerek doku enflamasyonuna aracılık eder. Hastalıklardaki bu patolojik süreçlerin yanı sıra sağlıklı kişilerde Th17 hücreler bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı immünitede rol almaktadır (92).

T hücre alt gruplarını belirlemekte mantıklı olan yaklaşım hücrelerin sitokin reseptör ekspresyonlarını saptamaktır. Th1 hücreler, IL-12 reseptör zincirlerinin her ikisini de eksprese eder (IL-12R β 1 ve IL-12R β 2), Th2 ve Th17 hücreler yalnızca IL-12R β 1 eksprese eder. Th2' ler aynı zamanda IL-4 reseptörleri eksprese ederken Th17, IL-23 reseptörü (IL-23 reseptörü; IL-12R β 1 ve IL-23R zincirinden oluşmuş bir heterodimerdir), TGF- β , IL-6, IL-21 reseptörleri de eksprese eder (93, 94).

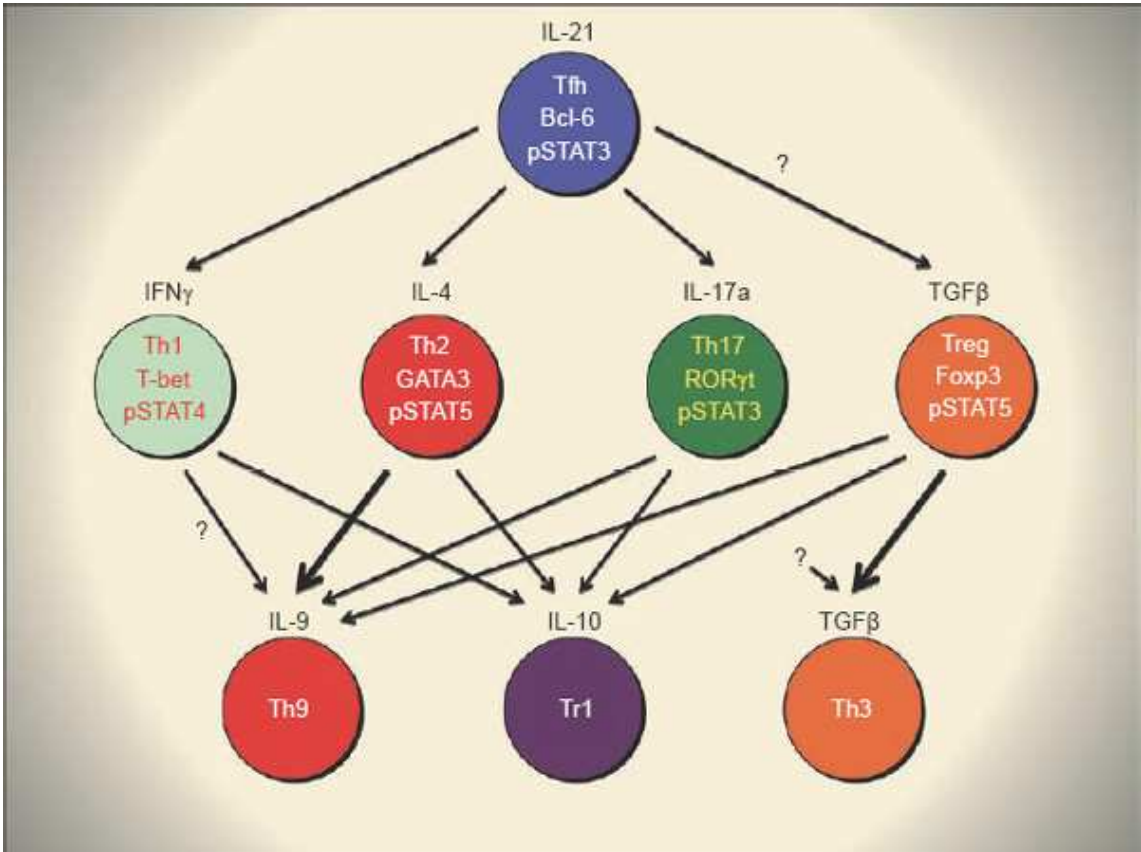
T helper hücreler kemokin reseptörlerine göre de sınıflandırılabilirler.

Th1: CXCR3, CCR5

Th2: CCR3, CCR8, CCR10

Th17: CCR2, CCR6 sekrete eder.

Bu reseptörlerin sekresyonu özel ve sürekli değildir (95, 96, 97).



Şekil 3. T helper alt grupları, sitokinleri ve transkripsiyon faktörleri.

2.3.1 T yardımcı hücre farklılaşmasının antijen ile modülasyonu

Fare modellerinde genellikle antijenin düşük dozları ve alum gibi adjuvanlar Th2 yanıtı uyarır. Antijenin yüksek dozları ve mikobakteriyel adjuvanlar (Freud's adjuvan) Th1 yanıtı uyarır. Ancak insanda bu farklılaşma net gösterilememiştir (98, 99). Mikobakteriyel DNA fragmanlarından elde edilen CpG oligodeoksinükleotid (TLR9 ile bağlı) insanda Th1 yanıtı uyarılmaktadır. HPV aşısı gibi monofosfolipid A içeren adjuvan olarak da TLR4 ligand kullanan aşuların T hücre polarizasyonunda etkileri net değildir (100, 101, 102, 103).

2.3.2 Sitokinlerle modülasyon

Her Th alt tipi için dominant olan sitokin, transkripsiyon faktörü ve sinyal molekülleri vardır. Karakteristik transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile polarizasyon başlar. Bu başlangıç polarizasyonu dominant sitokin ve transkripsiyon faktörünün amplifikasyonu izler (104). IL-12; Th1 farklılaşması için başlangıç sitokindir. Dendritik hücrelerden salınan IL-12, naive CD4+ T hücreler üzerindeki IL-12R (IL-12R β 2)' ünü bağlar sonuçta STAT4 aktive olur. STAT4, Tbet transkripsiyon faktörünü aktive eder ve IFN- γ salınımı indüklenir. IFN- γ ' nın Th1 hücreler üzerindeki reseptörüne bağlanması STAT-1' i aktive eder ve sonrasında Tbet çalışır. IL-12 aynı zamanda NK hücrelerin IFN- γ salınımını indükler böylece Th1 gelişimi sağlanır (105, 106, 107, 108). IL-18, Th1 yanıtı ilerletmede IL-12 ile birlikte çalışır. Dendritik hücrelerden salınan tip1 interferonlar aynı zamanda Th1 yolağının matürasyonunu uyarır (109, 110, 111).

IL-4 Th2 gelişiminde en önemli sitokindir. NK, T, mast ve eozinofil gibi pek çok hücreden salgınır. Ancak rolü IL-12 kadar net bilinmemektedir. IL-4 kendi amplifikasyonunu etkiler. STAT6' yı aktive eder, ardından da transkripsiyon faktörü GATA3 aktive olur ve IL-4 sekresyonu indüklenir.

Epitelyal hücre sitokini olan timik stromal lenfopoetin (TSLP) Th2 hücreye doğru gelişimi sağlar (114, 115, 116).

Th17 hücreler bakteri, fungus gibi hücre dışı patojenlere karşı gelişen immün yanıtın erken fazında görev alırlar. Proinflamatuvar sitokin ve kemokin salınımını indükler, nötrofillerin toplanmasını sağlarlar bu yüzden otoimmünite ve doku inflamasyonunda önemlidirler. Daha önce Th1 aracılı olduğu düşünülen inflamatuvar hastalıklarda bugün için Th17' lerin önemli rolü anlaşılmıştır. Th17 hücreler karakteristik olarak; IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, IL-6 ve TNF- α sekrete eder. Ayrıca Th17 farklılaşmasında IL-23 ve TGF- β önemli rol almaktadır. IL-23 heterodimerik bir sitokindir; IL-23p40 ve p19 subünitlerinden oluşur. IL-23 p40 subünitini IL-12 ile paylaşır. IL-12 ve IL-23 ortak yapıları olmasına rağmen çok farklı etkileri vardır. IL-23; dendritik hücre ve makrofaj gibi aktive olmuş antijen sunan hücrelerce salınır (117, 118). IL-23 hem exvivo izole edilmiş memory Th17 hücrelerin hem de in vitro üretilmiş Th17 lerin IL-17 üretimini artırır. Ayrıca Th1 hücrelerin IL-12 yoluyla IFN- γ üretmelerini baskılar. Th1 hücrelerin IL-17 üreten Th17 hücrelere farklılaşmasını sağlar. IL-23 Th17 alt tipinin yaşamı, stabilizasyonu ve devamı için önemli rol alır. Th17 farklılaşması için IL-1 β ve IL-6 veya IL-1 β ve IL-21 olması gereklidir. Ancak IL-6 stimülasyonu dominant yolaktır. IL-1, IL-6, IL-21 STAT3' ü aktive eder ve ardından transkripsiyon faktörü ROR γ t aktive olur. IL-17a, IL-17f ve IL-21 sekrete edilir. IL-21 Th17 farklılaşmasını amplifiye eder. Farede Th17 farklılaşmasında önemli olan IL-23 ve TGF- β insanda halen tartışmalıdır (119).

T hücre polarizasyonunda transkripsiyon faktörleri önemlidir. Th1 farklılaşması için Tbet (TBX21 veya T-box 21), Th2 farklılaşması için GATA3, Th17 farklılaşması için ROR γ t önemli rol alır (120, 121).

Tbet; IFN- γ ve IL-12R β 2 gen transkripsiyon indüksiyonu ile Th1 gelişimini sağlar. IL-4, IL-5 ve IL-17 sekresyonunu inhibe eder. Aynı zamanda GATA3' ün hedef DNA ile etkileşimini önleyerek Th2 farklılaşmasını inhibe eder.

GATA3; farelerde Th1 farklılaşmasını inhibe etmiştir.

ROR γ t ekspresyonu, Th1 ve Th2 farklılaşmasını farede bloke etmiştir (122, 123).

2.3.3 Dendritik hücrelerle modülasyon

En güçlü antijen sunan hücre olan dendritik hücreler (DC)' in en az 5 alt tipi vardır ancak fonksiyonel olan DC1 ve DC2 alt tipleridir.

DC1: CD11(+), CD123(zayıf +) \Rightarrow IL-12 ve tip1 IFN sekrete eder Th1 farklılaşmasını sağlar.

DC2: CD11(-), CD123(+) \Rightarrow Th2' ye kayışı sağlar.

DC1 ve DC2 plazmositoid veya myeloid prekürsörlerden gelişebilir. Bu farklılaşma karşılaşılan antijenin yapısı ile ilgili olabilir. DC' ler toll-like reseptörler (TLRs) olarak bilinen moleküller eksprese ederler. TLRs farklı mikroorganizmalar üzerinde eksprese olan farklı patojen ilişkili moleküler patern (PAMP)' leri tanır (124, 125, 126, 127).

Myeloid DC2' ler ; TLR3, TLR4, TLR8 eksprese eder.

Plazmositoid DC1' ler ise ; TLR7, TLR9 eksprese eder.

TLR' lerin ligasyonu DC' leri aktive eder ve sitokin üretimi artar. Bakteriyal DNA da bulunan CpG motifleri tanıyan TLR9' un ligasyonu; IL-12 ve IFN- γ sekresyonu ile Th1' e farklılaşmayı sağlar. TLR' lerin parazitler ile ligasyonu DC' leri indükler, TLR2 ve TLR4' ün ligasyonu Th2' ye yönlenmeyi sağlar.

Hayvan modellerinde TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 ligasyonu Th17 polarizasyonunu sağlamıştır. DC' ler üzerindeki TLR' lerin ligasyonu DC matürasyonunu başlatır, MHC2 ekspresyonu, CD80/86 ekspresyonu artar,

sitokinlerin translasyon ve transkripsiyonu artar sonuç olarak DC' ler T hücre polarizasyonunu etkilerler (127, 128, 129, 130, 131).

2.3.4 T regülatuvar hücreler ile modülasyon

Fare çalışmalarında regülatuvar T hücreler (Treg) timik(naturel-(nTreg)), periferal (indükte(iTreg)) olarak ayrılır. nTreg ; CD4+CD25+ ve Foxp3 eksprese ederler. Ayrıca etkilerinin ilgili sitokin ve hücre-hücre teması ile geliştiği gösterilmiştir. iTreg hücreler antijen sunan hücrelerin aktivasyonu sonucu üretilir. Eski literatüre göre bu hücreler Tr1(IL-10 sekrete eder), Th3 (TGF- β sekrete eder)'dür (132, 133).

İnsanda Treg hücreler en iyi helmantik enfeksiyonlarda çalışılmıştır. Parazitik enfestasyonların yoğun olduğu bölgelerde atopi insidansı azalmıştır. Bu durum parazitik enfestasyonların Treg matürasyonunu indüklediğini düşündürmektedir. Parazitik enfestasyonu olan hastalarda Treg' lerin yüksek düzeyde IL-10 ve/veya TGF- β sekrete ettiği görülmüştür (134).

Sağlıklı kişilerde çevresel alerjenlere karşı verilen immün yanıtta Treg' ler dominant hücrelerdir. Alerjik yanıtın gelişmesi Treg' lerin baskılanmasına veya Th2' lerin artmasına bağlı olabilir (135).

IL-6; Treg gelişimini inhibe eder

IL-2; Th17 gelişimini engeller

IL-27; Th17 polarizasyonunda rol alır.

Treg' ler Th17 gelişimini inhibe eder

İnsanda Treg gelişimi için TGF- β ve IL-2 indüksiyonu STAT5' i aktive eder ve ardından Foxp3 aktive olur. Treg' ler IL-10, IL-35, TGF- β sekrete eder. TGF- β Treg' ler için amplifiye edici sitokindir (136). Treg' lerin periferal toleransın sağlanması ve sürdürülmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Hem

nTreg hem de iTreg' ler çalışmalarda alerjen spesifik efektör hücreleri inhibe etmiştir. řu yolaklarda rol almaktadırlar:

- Dendritik hücrelerin baskılanması
- Efektör Th1, Th2, Th17'lerin baskılanması
- Alerjen spesifik IgE sentezinin baskılanması
- IgG4 sentezinin uyarılması
- Mast hücre, bazofil ve eozinofillerin baskılanması
- Efektör T hücrelerin dokulara migrasyonunun engellenmesi (137).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Celal Bayar Üniversitesi İç Hastalıkları Erişkin Alerji-İmmünoloji Bilim Dalı, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Biokimya Anabilim Dalı ile birlikte yapılmıştır. Tıp fakültesi etik kurul yönetimi tarafından onaylanmış ve bilimsel araştırmalar projeler komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Ocak 2009-Ocak 2010 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi İç Hastalıkları Erişkin Alerji-İmmünoloji polikliniğine başvuran kronik ürtiker ile uyumlu semptomları olan hastalar değerlendirildi. Olguların öncelikle anamnezi alındı ve fizik muayeneleri yapıldı. Kronik ürtiker nedenlerine yönelik rutin poliklinik tetkikleri yapıldı:

- (1) Tam kan sayımı, eritrosit sedimentasyon hızı, karaciğer fonksiyon testleri, serum serbest T4, T3 ve TSH düzeyleri, antitiroglobulin (anti-TG) ve antimikrozomal antikor (anti-TPO) düzeyleri,
- (2) Otoimmünite paneli (ANA, Anti-DNA, RF)
- (3) Enfeksiyon paneli (HBsAg, antiHBs, antiHCV, dışkıda parazit taraması, tam idrar analizi)
- (4) Gıda alerjenleri ve inhaler alerjenler ile deri prik testleri;
- (5) Fiziksel ürtiker açısından öykü ve/veya provokasyon testleri (soğuk ürtikeri için buz testi, dermatografizm için derinin çizilmesi).

Ürtiker nedeni olabilecek, gaita da parazit saptanan, gıda prik testi pozitif olan, sinüzit, üriner enfeksiyon veya viral hepatit gibi kronik enfeksiyonu olan, tiroid otoantikorları pozitif saptanan hastalara nedene yönelik tedavi başlanarak çalışmaya dahil edilmemişlerdir.

Kronik ürtikeri açıklayacak herhangi bir neden saptanamayan olgulara ürtikerin aktif olduğu dönemde otolog serum deri testi (OSDT) uygulanmıştır. Test öncesinde hastalar bilgilendirilmiş ve onamları yazılı olarak alınmıştır.

3.1 Otolog serum deri testinin yapılışı

Testten 4 hafta önce uzun etkili antihistaminler, 3 gün önce ise kısa etkili antihistaminler kesilmiştir. Hastalardan 10 cc venöz kan steril düz tüplere alınarak 30 dakika süre ile oda ısısında pıhtılaşmaya bırakıldı. Daha sonra kanlar 500g' de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırıldı. Bu hazırlanmış serumdan 50 µL bir insülin enjektörüne alınarak, ön kolun volar yüzüne intradermal olarak enjekte edildi. Otolog serumun enjekte edildiği bölgeden 5' er cm uzağa sırasıyla pozitif kontrol olarak 10 µL' lik histamin (Allergopharma,Germany) ve negatif kontrol olarak 50µ L serum fizyolojik (negative control for intracutaneous test, Allergopharma, Germany) intradermal enjekte edilmiştir. Otuz dakika sonra oluşan eritem ve endurasyon değerlendirildi. Endurasyonun en geniş çapı ve bu çapa dik gelen çapı ölçülmüştür. Eritem ve endurasyon Sabroe ve ark.' ının tanımladığı şekilde derecelendirilmiştir. Buna göre: Derece 0: Derinin serum fizyolojikle oluşan kızarıklığa yakın renkte kızarmasıdır. Hafif pembe ya da deri renginde olması beklenir. Derece 1: Serum fizyolojinin enjekte edildiği bölge deri renginde iken otolog serumun pembe renk oluşturmasıdır. Derece 2: Serum fizyolojinin enjekte edildiği bölge deri renginde iken, otolog serumun histamine eşdeğer kırmızı renk oluşturmasıdır. Pozitif test reaksiyonu: Otolog serumun oluşturduğu eritemin derece 2 olması ve aynı zamanda endurasyon çapının serum fizyolojinin oluşturduğu endurasyon çapından 1.5mm büyük olması olarak değerlendirilmiştir. Bütün otolog serum deri testleri tek bir araştırmacı tarafından yapıldı.

OSDT sonuçları negatif olan 20 hasta ve pozitif olan 20 hastadan periferik kan alınarak, serumlarından sitokin paternlerini saptamak için

periferik kan mononükleer hücre kültürü (PKMHK) yapılmıştır. İşlem öncesinde hastalar bilgilendirilmiş ve onamları alınmıştır.

3.2 Periferik kan mononükleer hücre kültürü

PKMHK uygulaması için hastadan 15cc venöz kan alındı. 50 mL'lik falkon içine heparinize kan boşaltıldıktan sonra , üzerine aynı volümde "phosphate buffer solution (PBS)" eklenir. PBS ile sulandırılan kan pipet ile üç-dört kez karıştırıldıktan sonra üzerine kan ile aynı volümde olmak üzerine ficoll tüpün yan duvarından çok yavaşça sızdırılarak bırakılır. Tüpler hiç karıştırmadan ve sarsmadan 20 dakika, 2300 rpm, 4°C' de santrifüj edildikten sonra en altta eritrositler çöker, eritrositlerin üzerinde yoğunluğu yüksek olan ficoll ve en yukarıda PBS ve plazma olacaktır. Ficoll ve PBS birleşim yerinde bir bulut şeklinde mononükleer hücreler gözlenecektir ve pastör pipeti ile sıvının için girilerek mononükleer hücreler toplanacaktır. Toplanan mononükleer hücreler yeni bir 50 mL' lik falkonda toplanarak üzerine PBS doldurulacak ve 10 dakika 2000 rpm 4-8°C' de santrifüj edilir. Mononükleer hücreler falkonun dibine çökecektir, üzerine PBS eklendikten sonra kalmış olan eritrositleri lizis etmek için 500-1000 µL distile su konarak, otuz saniye distile su ile inkübe edilir. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra 5 dakika 1300 rpm 4-8°C' de santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında hücreler falkonun dibinde çöken PKMHK içerisinde %10 fetal calf serum, %1 L-glutamine, %1 penisilin-streptomycin içeren RPMI-1640 içere kültür vasatı ile hücreler sulandırılır. Elde edilen hücrelerin bir kısmı hücre canlılık oranının hesaplanması amacı ile Trypan blue boyası ile boyanır. Trypan blue boyasını alan hücreler mavi renkte ve ölü hücreler, mikroskopta boya almayan hücrelerde canlı hücreler olarak gözlenerek ölü-canı hücre sayımı yapılır. Geriye kalan hücreler %5 CO₂ ve %95 hava ortamında kültüre edilir.

3.3 Biokimyasal analizler

PKMNH kültüründen elde edilen hücre süpernatantında ELİSA ile IL-4, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ , IL-17, IL-23 düzeyleri ölçülmüştür.

3.3.1 IL-4 ölçümü

Biosource (Nivelles, Belgium) ELISA kit ile çalışıldı. Kitin sensitivitesi 2 pg/ml' dir. İntraassay varyasyon katsayısı %3 için 47.9 pg/ml, %2.9 için 119.3 pg/ml, interassay varyasyon katsayısı %3.9 için 48.8 pg/ml, %4.4 için 119.1 pg/ml' dir.

3.3.2 IL-10 ölçümü

Biosource (Nivelles, Belgium) ELISA kit ile çalışıldı. Kitin sensitivitesi 1 pg/ml' dir. İntraassay varyasyon katsayısı %2.9 için 57.6 pg/ml interassay varyasyon katsayısı %2.9 için 138 pg/ml, %2.9 için 55.7 pg/ml ve %2.8 için 140.3 pg/ml' dir.

3.3.3 IL-23 ölçümü

Bender MedSystems (Vienna, Austria, Europe) ELISA kit ile çalışıldı. Kitin sensitivitesi 10 pg/ml' dir. İntraassay varyasyon katsayısı %3.8 için 414 pg/ml, %3.0 için 690 pg/ml, interassay varyasyon katsayısı %3.7 için 401 pg/ml ve %7.3 için 675 pg/ml' dir.

3.3.4 TGF- β 1 ölçümü

Biosource (Nivelles, Belgium) ELISA kit ile çalışıldı. Testin duyarlılığı 15.6 pg/ml' dir. İntraassay varyasyon katsayısı 183.9 pg/ml için % 5.5, 1537 pg/ml için %6.2, interassay varyasyon katsayısı 181.02 pg/ml için %7.5 ve 1547.9 pg/ml için % 7.9'dir.

3.3.5 IL-17 ölçümü

RayBio (Ray Biotech, Inc, GA, USA) ELISA kit ile çalışıldı. Testin sensitivitesi 10 pg/ml' dir. İntraassay varyasyon katsayısı < %10, interassay varyasyon katsayısı < %12'dir.

3.3.6 IFN- γ ölçümü

Biosource (Nivelles, Belgium) ELISA kit ile çalışıldı. Testin duyarlılığı 4 pg/ml' dir. İntraassay varyasyon katsayısı 203.4 pg/ml için %5.2 ve 381.0 pg/ml için %5.5, interassay varyasyon katsayısı 190.1 pg/ml için % 6.0 ve 398.1 pg/ml için %6.0'dir.

3.4 Kontrol grubu

Ayrıca olgularla benzer yaş ve cinsiyet dağılımı gösteren ürtiker ve herhangi bir alerjik yakınması olmayan tıp fakültesi öğrenci ve çalışanlarından gönüllü olan 20 kişiye kontrol grubu olarak OSDT uygulandı. OSDT sonuçları (-) olanlardan 15cc venöz kan alınarak PKMHK yapılmıştır. Kontrol grubunda OSDT sonuçları (-)' dir.

İstatiksel Analiz

İstatistikler için Statical Package for Social Sciences Version (SPSS) 16.0 programı kullanıldı. OSDT(+), OSDT(-) ve kontrol grubu olarak 3 grubun karşılaştırılmasında Kruskal- Wallis testi, OSDT(-) ve OSDT(+) hasta grupları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasında Mann-Whitney testi, kontrol grubu ile total hasta grubunun karşılaştırılmasında ise Independent Samples test kullanıldı.

IV. BULGULAR

Çalışmaya İç hastalıkları erişkin alerji-immünoloji polikliniğine başvurmuş ve kronik idiopatik ürtiker tanısı almış olan, 29 kadın(%72,5) 11 erkek (%27,5 olan 40 hasta alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması 38,2 yıl (21-64)'dir. OSDT(+) olan 20 hasta, OSDT(-) olan 20 hasta vardır. Kontrol grubu10 erkek (%50), 10 kadın (%50), yaş ortalaması 28,2 yıl olan 20 sağlıklı gönüllüden oluşturulmuştur. Kontrol grubu hastalarında OSDT(-)' dir.

Tablo 3. Demografik veriler.

	Hasta grubu		Kontrol grubu
	OSDT(+)	OSDT(-)	OSDT(-)
Vaka sayısı (n)	20	20	20
erkek	11(%27,5)		10 (%50)
kadın	29 (%72,5)		10 (%50)
Yaş ortalaması	38,25±10,4 yıl		28,5±5,45 yıl

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubu vakalarından periferik kan alınarak öncelikle OSDT uygulanmış ardından PKMHK yapılmıştır. PKMHK süpernatantları ELISA yöntemi ile çalışılarak sitokin düzeyleri ölçülmüştür.

3 grup; OSDT(-), OSDT(+) olan hasta grubu ve kontrol grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında yalnızca IL-4 düzeyinde anlamlı farklılık saptanmıştır (p= 0,00). Kontrol grubunda IL-4 düzeyi anlamlı olarak her iki hasta grubundan daha yüksektir.

OSDT(-) ve OSDT(+) olan iki hasta grubu kendi arasında karşılaştırıldığında yalnızca IL-4 düzeyi anlamlı olarak OSDT(+) olan grupta yüksek, OSDT(-) hasta grubunda düşük saptanmıştır (p=0,04).

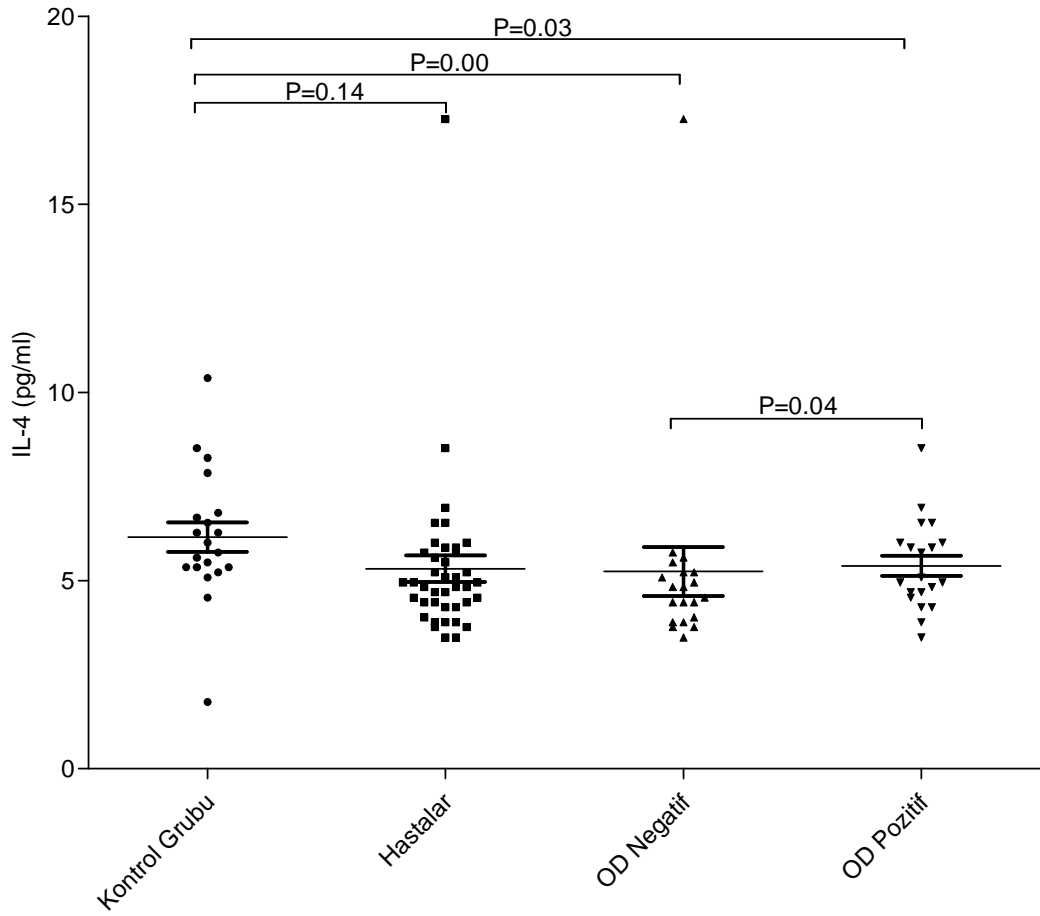
OSDT(-) olan hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-23 (p=0,009), IL-10 (p= 0,009), IL-4 (p=0,00), IL-17 (p=0,05) düzeyleri anlamlı olarak kontrol grubunda yüksek , OSDT(-) olan hastalarda düşük saptanmıştır.

OSDT(+) olan hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-4 (P=0,03), IFN- γ (P=0,05) düzeyleri OSDT(+) olan hasta grubunda kontrollere göre daha düşük saptanmıştır.

OSDT göz önüne alınmadan hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında; IL-23 (p=0,01) ve IL-10 (p=0,04) düzeyleri kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır.

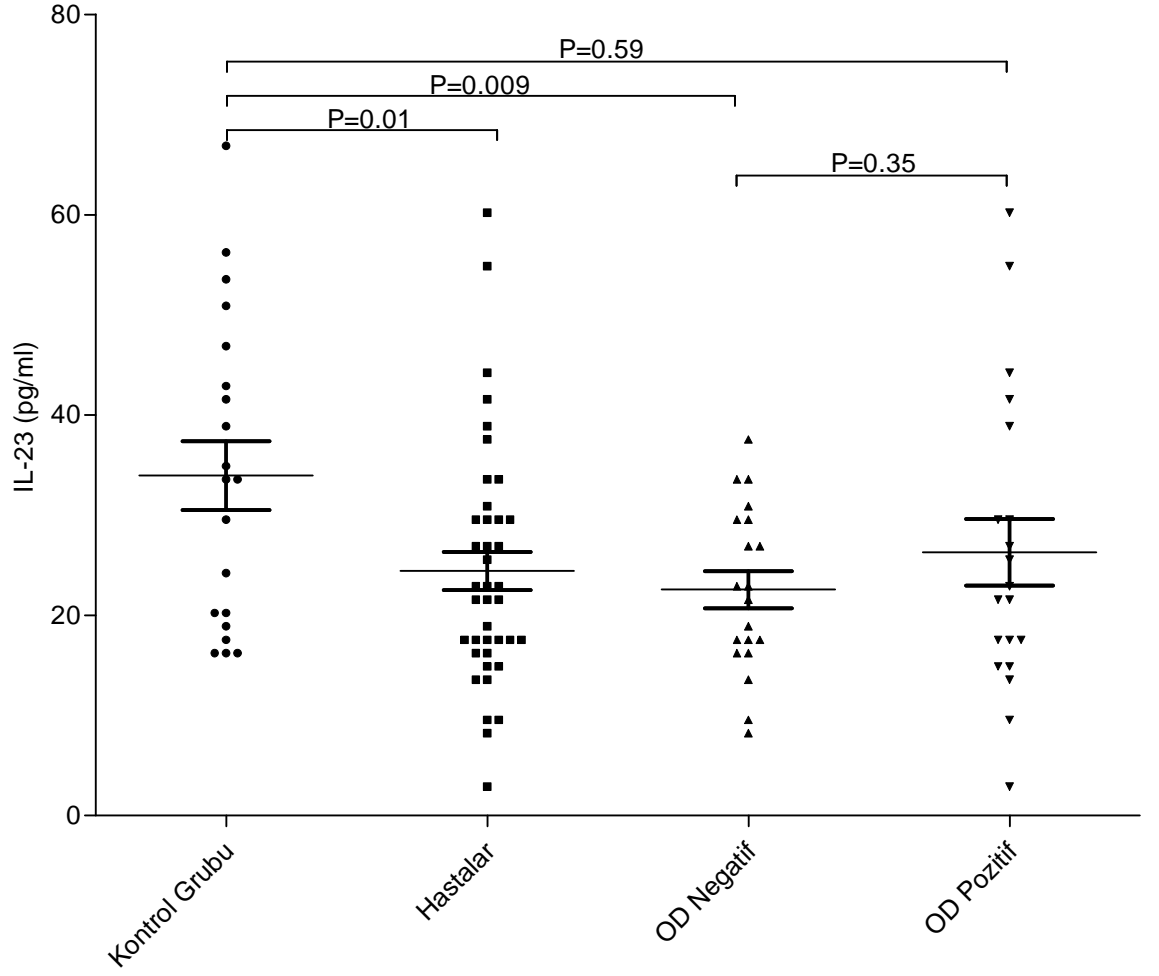
Hastaların yaşı ile sitokin düzeylerinin korelasyon analizi yapıldığında IL-17 ve IFN- γ düzeyleri ile yaş arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır (p=0,05, p=0,00).

Cinsiyet ile sitokin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.



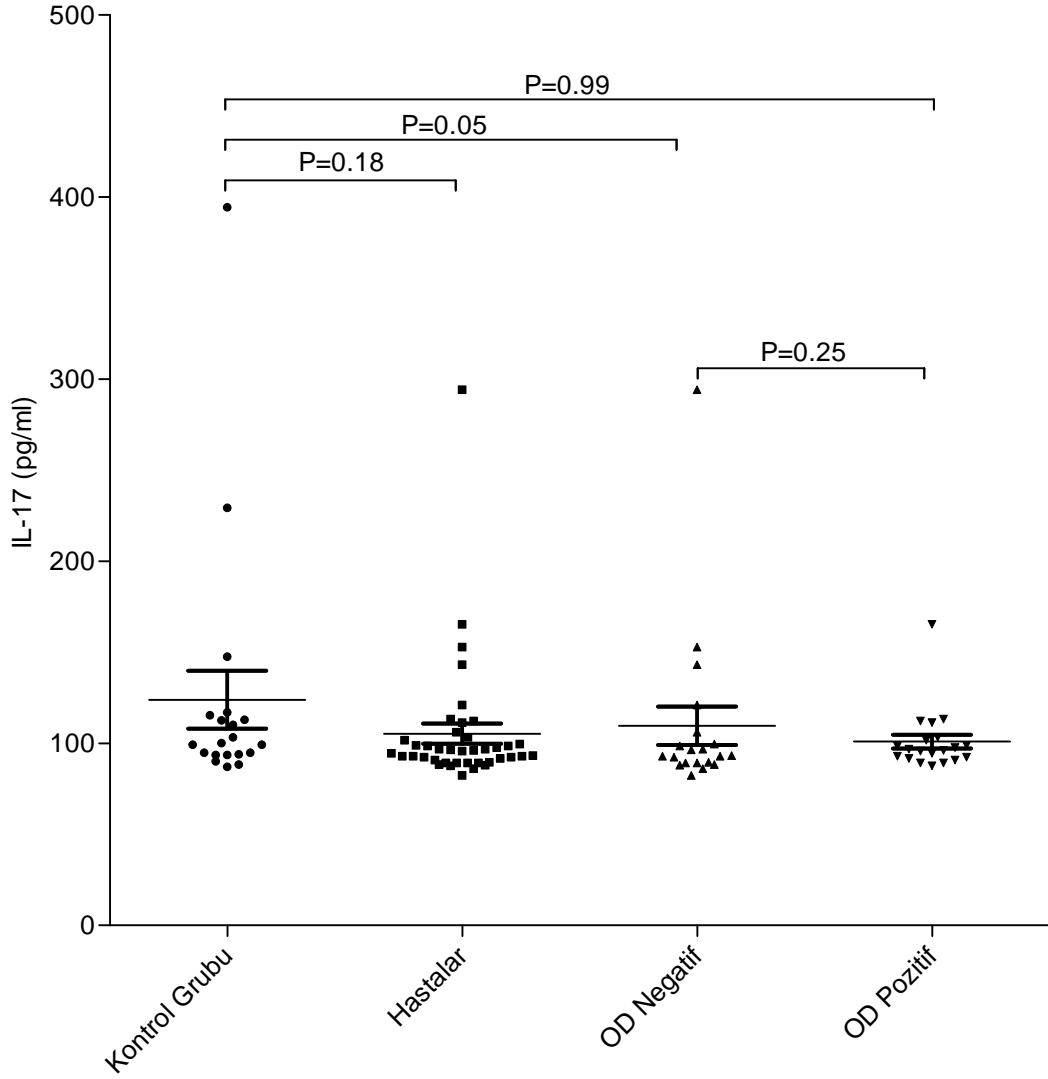
Grafik 1. IL-4 değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması (OD: otolog serum deri testi).

IL-4 düzeyi; hem OSDT(+) hem de OSDT(-) hasta grubunda kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0,03$, $p=0,00$). Hasta grupları kendi arasında karşılaştırıldığında IL-4 düzeyi OSDT(+) olan hasta grubunda anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p=0,04$). Hasta grupları ve kontrol grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında IL-4 düzeyi anlamlı olarak kontrol grubunda yüksek saptanmıştır ($p=0,02$).



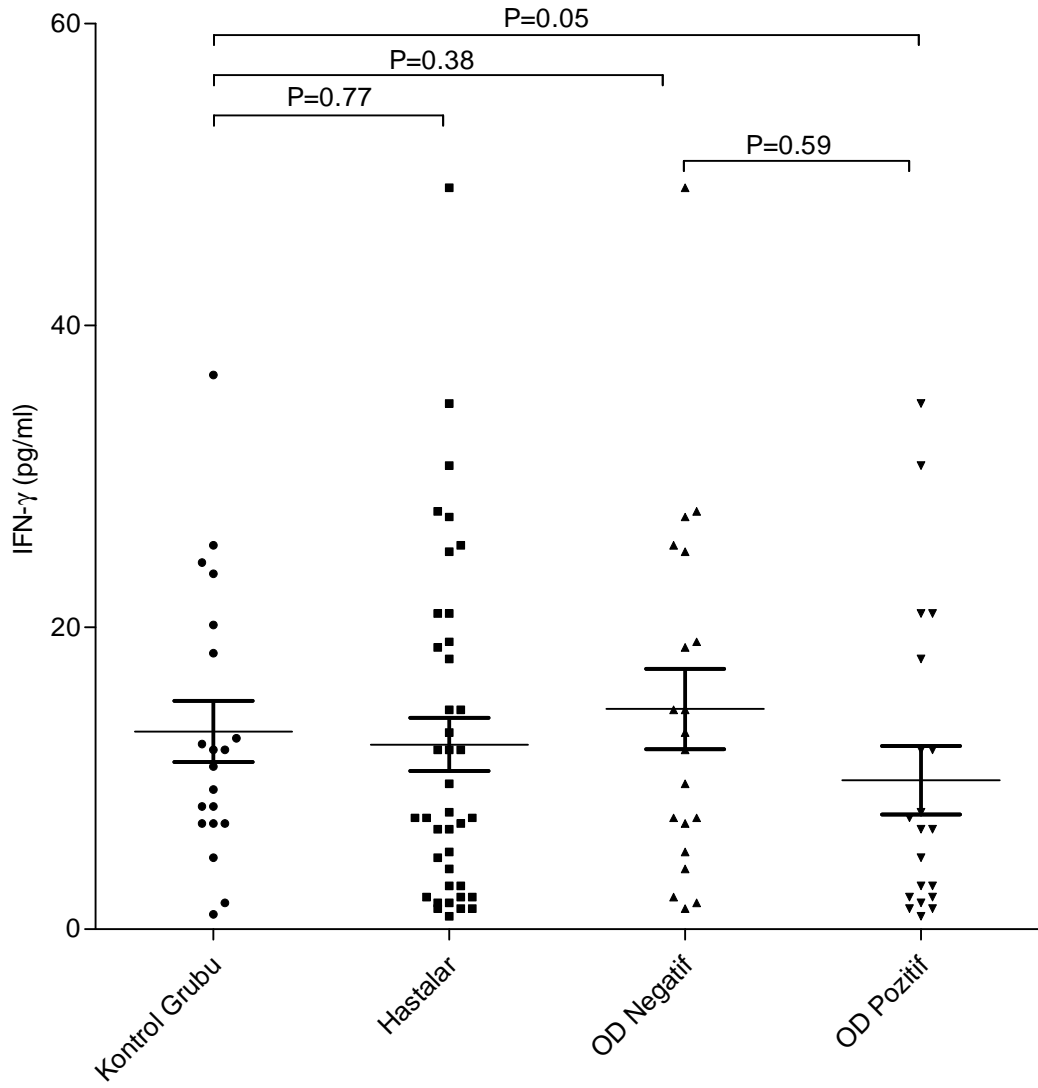
Grafik 2. IL-23 değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

IL-23 düzeyi; OSDT(-) olan hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kontrol grubunda yüksek , OSDT(-) olan hastalarda düşük saptanmıştır ($p=0,009$). OSDT göz önüne alınmadan hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-23 düzeyi kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,01$). IL-23 düzeyi ortalaması hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşüktür. OSDT (-) hastalarda hem OSDT(+) olanlara göre hem de kontrollere göre daha düşüktür.



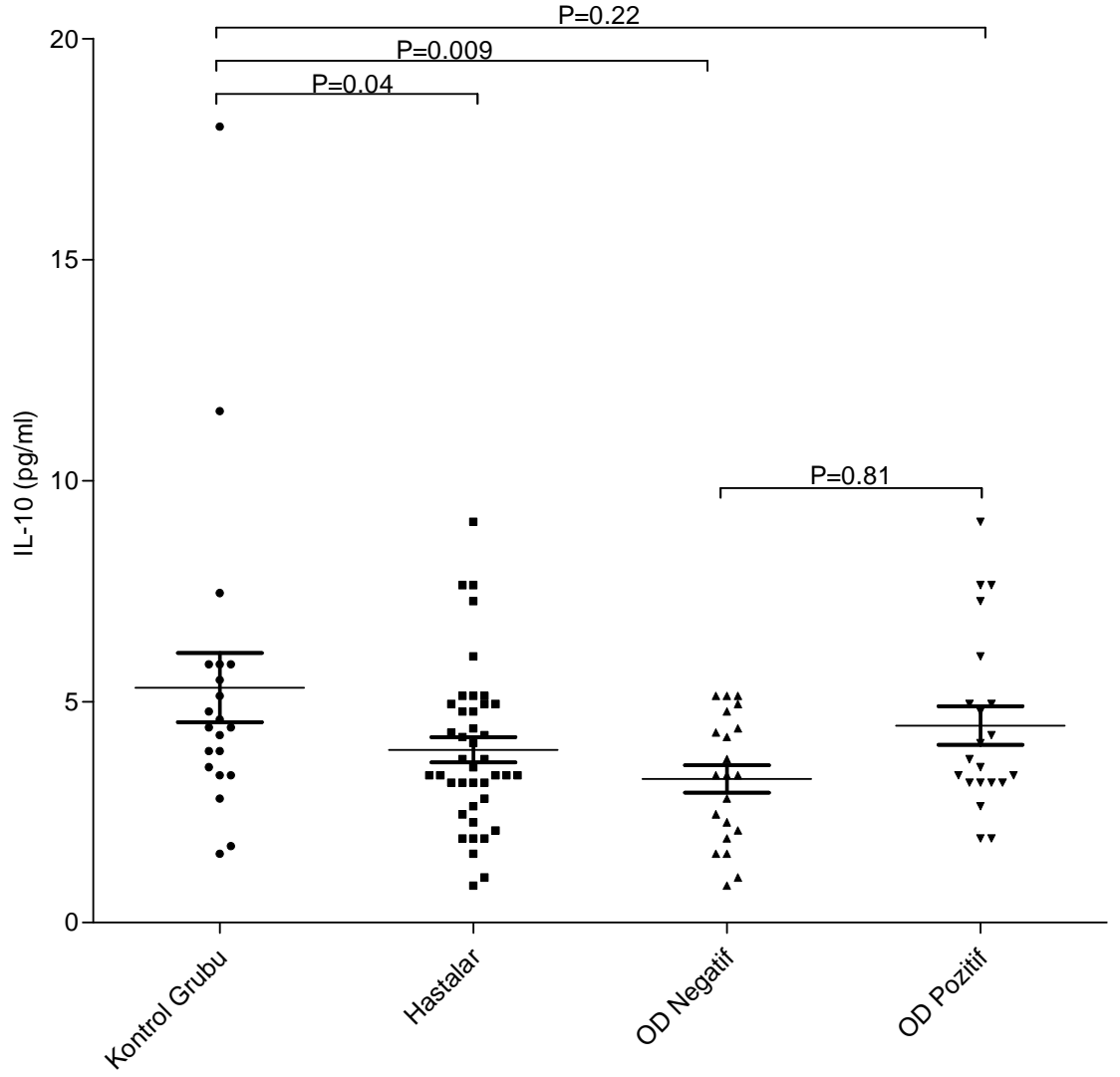
Grafik 3. IL-17 değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

IL-17 düzeyi; OSDT(-) olan hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak kontrol grubunda yüksek , OSDT(-) olan hastalarda düşük saptanmıştır (p=0,05). Hastaların yaşı ile sitokin düzeylerinin korelasyon analizi yapıldığında IL-17 düzeyleri ile yaş arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır (p=0,05). IL-17 düzeyi ortalaması; hasta grubunda, OSDT(-), OSDT(+) olanlarda kontrollere göre daha düşüktür.



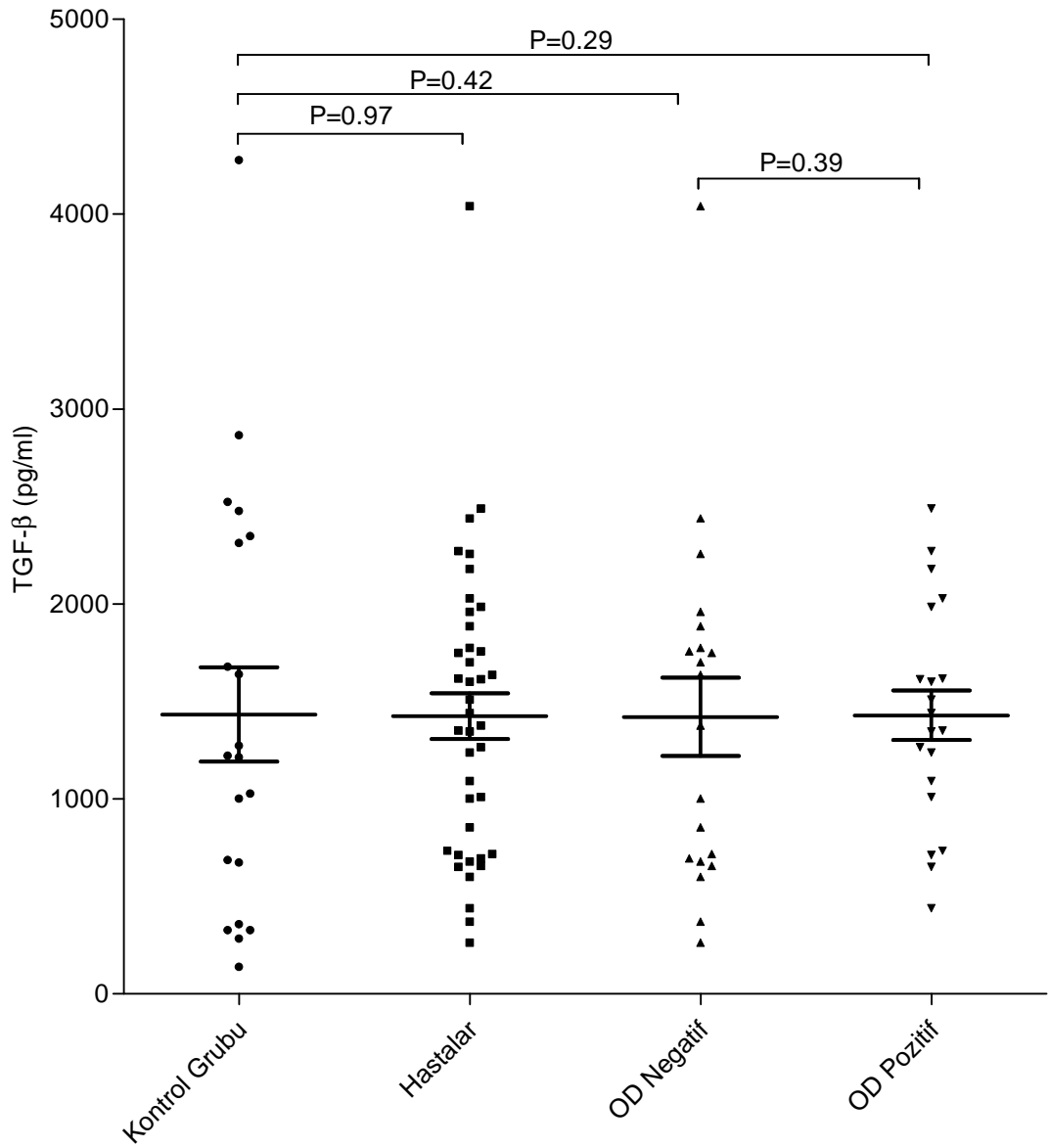
Grafik 4. IFN- γ değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

IFN- γ düzeyi; OSDT(+) olan hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında OSDT(+) olan hasta grubunda kontrollere göre daha düşük saptanmıştır ($p=0,05$). Hastaların yaşı ile sitokin düzeylerinin korelasyon analizi yapıldığında IFN- γ düzeyleri ile yaş arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır ($p=0,00$). IFN- γ düzeyi ortalaması hastalarda kontrollere göre daha düşüktür. OSDT(-) lerde OSDT(+) olanlardan hem de kontrollerden daha yüksektir.



Grafik 5. IL-10 değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

IL-10 düzeyi ortalaması; OSDT(-) olan hasta grubunda kontrollere göre anlamlı düşüktür ($p=0,009$). OSDT göz önüne alınmadan hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında hasta grubunda IL-10 kontrollere göre anlamlı düşük izlenmiştir ($p=0,04$). IL-10 düzeyi ortalaması hasta gruplarında kontrollerden daha düşüktür.



Grafik 6. TGF-β değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

TGF-β düzeyi ortalaması istatistiksel anlamlı fark olmamakla birlikte her iki hasta grubunda kontrol grubundan daha düşüktür. OSDT(+) olan hastalarda OSDT(-) olanlara göre daha yüksektir.

Tablo 3. Kontrol ve OSDT(+) hasta grubunun sitokin düzeyi ortalamaları karşılaştırılması ve p değerleri.

Sitokin	Kontrol	OSDT(+)	P
IL-23	33,95+15,4	26,29+14,9	0,59
IL-10	5,39+3,6	4,51+2,03	0,22
IL-4	6,15+1,75	5,38+1,19	0,03
IL-17	123,9+71,02	100,95+16,94	0,99
TGF- β	1433,37+1084	1429,42+567,55	0,29
IFN- γ	13,09+9,03	9,87+10,11	0,05

Tablo 4. Kontrol ve OSDT(-) hasta grubunun sitokin düzeyi ortalamaları karşılaştırılması ve p değerleri.

Sitokin	Kontrol	OSDT(-)	P
IL-23	33,95+15,4	22,56+8,25	0,009
IL-10	5,39+0,82	3,33+1,41	0,009
IL-4	6,15+1,75	5,24+2,9	0,00
IL-17	123,9+71,02	109,65+47,2	0,05
TGF- β	1433,37+1084	1420,85+898,8	0,42
IFN- γ	13,09+9,03	14,59+11,88	0,38

Tablo 5. Kontrol ve OSDT(-) ve OSDT(+) hasta grubunun sitokin düzeyi ortalamaları karşılaştırılması ve p değerleri.

Sitokin	OSDT(+)	OSDT(-)	P
IL-23	26,29+14,9	22,56+8,25	0,35
IL-10	4,51+2,03	3,33+1,41	0,81
IL-4	5,38+1,19	5,24+2,9	0,04
IL-17	100,95+16,94	109,65+47,2	0,25
TGF- β	1290,91+707,4	1420,85+898,8	0,39
IFN- γ	9,87+10,11	14,59+11,88	0,59

Tablo 6. Kontrol ve hasta grubunun sitokin düzeyleri ortalamaları karşılaştırılması ve p değerleri

Sitokin	Kontrol	Hasta	P
IL-23	33,95+15,4	24,42+12,05	0,01
IL-10	5,39+3,6	3,92+1,82	0,04
IL-4	6,15+1,75	5,31+2,19	0,14
IL-17	123,9+71,02	105,30+35,28	0,18
TGF- β	1433,37+1084	1425,14+742	0,97
IFN- γ	13,09+9,03	12,23+11,15	0,77

Tablo 7. Kontrol, OSDT(+) ve OSDT(-) hasta gruplarının sitokin düzeyleri ortalamaları karşılaştırılması ve p değerleri.

Sitokin	Kontrol	OSDT(+)	OSDT(-)	p
IL-23	33,95+15,4	26,29+14,9	22,56+8,25	0,07
IL-10	5,39+3,6	4,51+2,03	3,33+1,41	0,07
IL-4	6,15+1,75	5,38+1,19	5,24+2,9	0,00
IL-17	123,9+71,02	100,95+16,94	109,65+47,2	0,19
TGF- β	1433,37+1084	1429,42+567,55	1420,85+898,8	0,87
IFN- γ	13,09+9,03	9,87+10,11	14,59+11,88	0,17

V. TARTIŞMA

Haftada en az iki kez tekrarlayan, 6 haftadır devam eden ürtiker “kronik ürtiker” olarak adlandırılır (1, 6). Kronik ürtiker tanısında öncelikle fiziksel, alerjik, psödoalerjik ve enfeksiyöz nedenler dışlanır. Nedeni bulunamayan olgular ise KİÜ olarak adlandırılır. Kronik ürtikerli olguların %50’ den fazlası bu gruba girmektedir (109, 130, 131).

Son yıllarda KİÜ’ li olguların bir kısmında mast hücrelerinin ve bazofillerin yüksek afiniteli IgE reseptörünün α alt birimine karşı (anti-Fc ϵ RI) ya da IgE’ ye karşı IgG otoantikolar tespit edilmiştir. Kronik otoimmün ürtiker olarak adlandırılan bu olgulardaki otoantikolar fonksiyonel olarak aktiftir ve sağlıklı donörlerin bazofillerinden ve derideki mast hücrelerinden in vitro olarak histamin salınımına neden olmaktadır. Bu antikolar otolog serum deri testi ile saptanmaktadır.

Kronik ürtikerle ilgili en büyük gelişme hastaların yaklaşık %30-50’ sinin otoimmüniteyle ilişkili olması ve bu grup hastalığın idiopatik değil OİÜ olarak adlandırılmasıdır.

CD4+ T hücreler farklı diferansiyasyon ve fonksiyonel özelliğe sahip alt gruplara ayrılabilir. Bugün için bilinen Th1, Th2, Treg, Th17 4 major Th lenfosit alt grubudur. Bu alt grupların hepsi birbirlerini aktivasyon veya inhibisyon yönünde etkileyebilmektedir. Her Th alt tipi için dominant olan sitokin, transkripsiyon faktörü ve sinyal molekülleri vardır. Karakteristik transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile polarizasyon başlar. Bu başlangıç polarizasyonu dominant sitokin ve transkripsiyon faktörünün amplifikasyonu izler.

KİÜ hem otoimmün hem de alerjik hastalıkların özelliklerini taşır. Altta yatan kompleks bir immün disfonksiyon olduğu bilinmektedir. KİÜ de hakim olan Th alt grubunu ve sitokin paternini belirlemek hastalığın patofizyolojisini açıklamak açısından önemlidir.

Literatürde KİÜ' in immünopatogenezinde CD4+ Th hücrelerin ve sitokinlerin rolünü inceleyen az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların çoğunda lezyonların aktif olduğu dönemde biopsi materyalleri ile değerlendirme yapılmıştır.

Biz bu çalışmada KİÜ' de rolü olan Th alt gruplarını ve sitokinlerini sağlıklı kontrollerle karşılaştırarak belirlemeyi ve böylece KİÜ immünopatogenezinde yeni bir bakış açısı getirmeyi amaçladık.

Öncelikle KOÜ' li olguların ayrımı için maliyeti yüksek ve uygulanımı zor olan bazofil salınım testi yerine otolog serum deri testini (OSDT) tercih ettik. OSDT bazofil histamin salınım testlerine göre duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, maliyeti düşük ve güvenli bir yöntemdir. OSDT in vitro bazofil histamin salınım aktivitesi ile en iyi paralellik gösteren in vivo test yöntemidir.

20 OSDT(-) ve 20 OSDT(+) olmak üzere toplam 40 KİÜ hastasının alındığı çalışmamızda sitokin paternlerini belirleyebilmek için periferik kan mononükleer hücre kültürü yapıldı. Hücre kültürü süpernatantlarından ELISA yöntemi ile IL-4, IL-17, IL-23, IL-10, TGF- β , IFN- γ çalışıldı.

IL-4 düzeyi; hem OSDT(+) hem de OSDT(-) hasta grubunda kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0,01$, $p=0,00$). Hasta grupları kendi arasında karşılaştırıldığında IL-4 düzeyi; OSDT(+) olan hasta grubunda OSDT(-) olanlara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p=0,04$). Hasta grupları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında IL-4 düzeyi anlamlı olarak kontrol grubunda yüksek saptanmıştır ($p=0,02$).

Literatürde Cohen ve ark. yaptığı çalışmada benzer şekilde KÜ hastalarının PKMHK süpernatantlarında IL-4 düzeyi kontrollere göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır. (63).

Lökosit hücre kültürlerinde uyarılmış IL-4 sekresyonunun çoğundan bazofiller sorumludur (63). KÜ hastalarında bazofillerin IgE aracılı ve IgE aracılıksız uyarılara daha az yanıt verdiği gösterilmiştir (63, 67).

Bu KÜ hastalarında düşük IL-4 düzeyi bazofillerdeki kantitatif veya fonksiyonel defekten kaynaklanabilir. Bu çalışmada hasta ve kontrol grubunun başlangıç bazofil sayıları normaldir. PKMHK sırasında bazofiller yok olmuştur. Ancak yinede uyarı sonrası erken dönemde IL-4 sekresyonunun çoğu bazofil kaynaklıdır ve 48 saat boyunca da hasta grubunda kontrollere göre düşük kalmıştır. Lenfositlerin yanı sıra mast hücreleri ve bazofiller KİÜ hastalarında sitokin dengesini etkileyen IL-4 gibi pek çok sitokin sekrete eder. Sonuç olarak bu çalışmada KİÜ hastalarında azalmış IL-4 sekresyonu bazofillerden ziyade lenfositler ile ilgilidir.

Th2 diferansiyasyonu için major sitokin olan IL-4' ün yokluğunda Th1 aracılı immün yanıtın hakim olması beklenmektedir. Ancak Cohen ve ark. çalışmasında da Th1 kaynaklı sitokinlerin arttığı gösterilmemiştir.

Bizim çalışmamız, W.-C. Chen ve ark. çalışması (138) ve Cohen ve ark. çalışması ile uyumlu olarak KİÜ hastalarında IL-4 düzeyi kontrollerden daha düşük izlenmiştir.

Piconi ve ark. çalışmasında IL-4 düzeyi hasta ve kontrollerde benzer izlenmiştir (139).

Caproni ve ark. çalışmasında OSDT yapılarak oluşturulan deri lezyonlarından punch biyopsi alınmış, sağlıklı kontroller ve hastaların lezyonsuz bölgelerinden alınan biopsi örnekleri ile karşılaştırılmıştır (140). KÜ'li hastaların biopsi örneklerinde ilk 30 dakika içinde IL-4 düzeyi en yüksek saptanmış, daha sonra azaldığı izlenmiştir. Sağlıklı kontrollerden alınan örneklerde IL-4 ekspresyonu izlenmemiştir. KÜ hastalarının normal deri bölgesinden alınan örneklerde de IL-4 düzeyi düşük saptanmıştır.

Ying ve arkadaşlarının çalışmasında (142) KÜ hastalarının deri biopsilerinde IL-4 ve IL-5'in önemli etkilerinin yanı sıra, IFN- γ da artış saptanmıştır. Bu bulgularla ürtikeryal inflamasyonda Th1 ve Th2 kaynaklı sitokinlerin birlikte rol aldığı düşünülmüştür. Erken dönemde Th2, bazofil ve mast hücre kaynaklı sitokinlerin, 24 saati geçen dönemde Th1 kaynaklı sitokinlerin etkin olduğu görülmüştür.

Bu iki çalışma da KÜ' de lokal olarak Th2 aracılı inflamasyonun hakim olduğu gösterilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda; KÜ de lokal inflamasyonda hakim olan Th2 kaynaklı sitokin IL-4, sistemik dolaşımda baskın olarak saptanmamıştır. Alerjik rinit astım gibi hastalıklarda Th2 aracılı inflamasyonun ve sitokinlerin tüm hava yollarında ve sistemik dolaşımda hakim olduğu bilinmektedir. Literatürde otoimmün tiroid hastalarından yapılan tiroid hücre kültürleri ile periferik kan hücre kültürlerinde, Th1 ve Th2 kaynaklı sitokin düzeyleri arasında anlamlı farklılıklar olduğu gösterilmiştir (144).

Literatür bilgileri ve bizim çalışmamız sonuçları ile KÜ patogenezinde IgE aracılı reaksiyonların, Th2 aracılı inflamasyonun ve sitokinlerinin lokal inflamasyonda rol alırken, sistemik olarak çok büyük rol almadığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda IL-10 düzeyi; OSDT(-) hasta grubunda ($p=0,009$) ve OSDT göz önüne alınmadan hasta grubunda kontrollerden daha düşük saptanmıştır ($p=0,04$). Bu sonuçlar Santos ve ark. çalışmasından farklıdır (141). Santos ve ark. çalışmasında IL-10 düzeyi KÜ hastalarının PKMHK süpernatantlarında kontrollerden anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ancak bizim sonuçlarımıza benzer şekilde OSDT(+) olanlarda OSDT(-)' lere göre IL-10 daha yüksektir.

Piconi ve ark. çalışmasında da bizim sonuçlarımızdan farklı olarak IL-10 düzeyi hem OSDT(-) hem de OSDT(+) olan hasta grubunda kontrollerden yüksek bulunmuştur. Hastalarda IL-10 düzeyi yüksekliğine IFN- γ düzeyinde azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca OSDT(+) grupta IL-10 düzeyinin biraz daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu durum OSDT(+) olan hastaların serumlarında bulunan solubl faktörlerden dolayı PKMHK sonuçlarının etkilenmiş olabileceği düşüncesi ile açıklanmıştır. Anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10' un KÜ hastalarında inflamasyonu kontrol altına almak için yükselmiş olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda IL-10 ve IFN- γ ($p=0,05$) düzeyi hasta grubunda kontrollere göre daha düşük saptanmıştır

Cohen ve ark. çalışmasında bizim sonuçlarımıza benzer şekilde IL-10 düzeyi KÜ hastalarında kontrollerden ve akut ürtiker hastalarından daha düşük bulunmuştur. Ancak PHA uyarısı sonrası her 3 grubun IL-10 sitokin paterni benzer izlenmiştir.

W.-C. Chen ve ark. çalışmasında da bizim sonuçlarımız ile kısmen uyumlu olarak tüm Th1 ve Th2 kaynaklı sitokinler gibi IL-10 düzeyi de KÜ hastalarında düşük bulunmuştur.

Irinyi B. ve arkadaşlarının çalışmasında (144) KÜ hastalarından PKMHK yapılabı flowsitometri ile CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfosit sayısı ile IL-10, IL-13, IL-4 ve IFN- γ düzeyleri ölçülmüştür. KÜ hastaları ile kontrollerin CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfosit sayısı B lenfosit sayılarında fark bulunmamıştır. OSDT(+) ve OSDT(-) olan KÜ hasta grupları arasında CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfosit sayısı ile IL-10, IL-13, IL-4 ve IFN- γ düzeyleri açısından fark saptanmamıştır. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak; IL-10 KÜ hastalarında yüksek saptanırken bizim sonuçlarımızla uyumlu şekilde IL-4 ve IFN- γ düzeyi ise düşük bulunmuştur.

Dendritik hücre, NK, B lenfosit, Th2, Treg tarafından üretilen IL-10 antijen spesifik immün yanıtı baskılar, makrofajları deaktive ederek T lenfositlerin sitokin sentezini azaltır. Th1 ve makrofajların çoğu fonksiyonunu inhibe ederken, Th2 aracılı inflamasyonu da kontrol edebilmektedir. Antijen sunan hücrelerden IL-12 salınımını baskılayarak naive Th hücrelerin Th2' ye diferansiyasyonunu sağlar ancak bazı durumlarda da Th2 yanıtı baskılar. Bu durum proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin baskılanmasıyla sonuçlanır.

IL-10 üretiminin KÜ hastalarında azalmış olması Treg hücre fonksiyonlarında yetersizlik olduğunu düşündürmüştür. Çalışmamızda PKMHK yöntemi kullanılmış olmasından dolayı IL-10 düzeyinin Treg hücreler ile direk ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca IL-4 ve IFN- γ salınımının da azalmış olması Th1 hem de Th2 fonksiyonların KÜ hastalarında yetersiz olduğunu gösterebilir.

Çalışmamızda; IFN- γ düzeyi; OSDT(+) hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük saptanmıştır (p:0,05). İstatiksel anlamlı olmamakla birlikte IFN- γ düzeyi ortalaması hasta grubunda kontrollerden daha düşüktür. Hastalar arasında da OSDT(+) olanlarda OSDT(-)' lere göre daha düşüktür.

W.-C. Chen ve ark. çalışmasında 34 KÜ hastası 17 sağlıklı kontrol ile karşılaştırılmış hasta grubunda IFN- γ düzeyi anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Ancak sadece IFN- γ değil bizim sonuçlarımıza benzer şekilde IL-10, IL-4, IL-12, TNF- α düzeyleri de hastalarda düşük saptanmış ve sonuç olarak KÜ patogenezinde sitokin imbalansına yol açan bir immün disregülasyon vardır denilmiştir.

Szegedi ve ark. çalışmasında ve Cohen ve ark. çalışmasında bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak IFN- γ KÜ hastalarında kontrollerden düşük bulunmuştur. Ayrıca PHA uyarısı sonrasında da benzer patern devam etmiştir.

Santos ve ark. çalışmasında IFN- γ , KÜ ve kontrol grubunda benzer düzeylerde saptanmıştır.

Piconi ve ark. çalışmasında ise KÜ hastalarında IFN- γ düzeyinde azalma olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmamız ile uyumludur.

Çalışmamızda TGF- β değerlendirmesinde kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak TGF- β düzeyi ortalaması hastalarda kontrollerden daha düşüktür.

W.-C. Chen ve ark. çalışmasında TGF- β düzeyi, bizim çalışmamızla uyumlu olarak, hasta ve kontrol grubunda benzer düzeylerde bulunmuştur.

Bu çalışma sonucunda KÜ hastalarında Treg hücre fonksiyonlarında defekt olduğu ve bu fonksiyonel defekti kompanse edebilmek için Treg hücre sayısının artmış olabileceği söylenmiştir. Ancak ilerleyen çalışmalarda KÜ hastalarında lezyon bölgesinde Treg hücre sayı ve fonksiyonlarında defekt olup olmadığının araştırılması gerekliliği belirtilmiştir. Bu çalışmada OSDT ile KÜ hastalarının anormal sitokin paterni arasında bir ilişki saptanmamıştır. KÜ

hastalarında immüdisregülasyon için anormal sitokin sekresyon paterninin OSDT' den daha iyi bir gösterge olduğu söylenmiştir.

Bizim çalışmamız ve yukarıdaki literatür bilgileri eşliğinde KIÜ hastalarında IL-10 ve TGF- β düzeylerinin düşük saptanması IL-10 kaynağının Treg olduğunu düşündürmüştür. Çalışmamızda KIÜ hastalarında IL-10 ve TGF- β ' nın birlikte düşük izlenmesi bu grup hastalarda Treg defekti düşüncesini desteklemektedir.

Çalışmamızda IL-23 hasta grubunda anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (p=0,01). Özellikle de OSDT(-) olan hasta grubunda kontrollerden anlamlı olarak IL-23 daha düşük bulunmuştur (p= 0,009).

IL-17; OSDT(-) hasta grubunda kontrollerden anlamlı olarak düşüktür (p=0,05). IL-17 düzeyi ortalaması; istatiksel anlamlı olmamakla beraber hasta grubunda kontrollere göre daha düşük saptanmıştır.

Literatürde KIÜ hastalarında IL-17 ve IL-23 sitokinleri ile Th17 fonksiyonlarını araştıran, bir çalışma vardır. Santos ve ark. çalışmasında bizim çalışma sonuçlarımıza zıt şekilde IL-17 hasta grubunda kontrollerden yüksek izlenmiştir. Ancak bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak PHA ile nonspesifik T hücre uyarısı sonrası IL-17 düzeyi çalışılmıştır.

Bizim çalışmamızda IL-23 ve IL-17 düzeylerinin hasta grubunda düşük saptanmasına bağlı olarak KIÜ hastalarında Th17 baskın immün yanıtın patogeneizde çok etkili olmadığı söylenebilir.

OSDT açısından bakıldığında özellikle OSDT (-) olan hastalarda IL-4, IL-10, IL-17, IL-23 düzeylerinin anlamlı olarak düşük saptanması bu grup hastalarda Th2, Th17 ve Treg fonksiyonlarının yetersiz veya baskılı olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmamızda IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β , IL-17, IL-23 düzeyleri ortalamaları hastalarda kontrol grubundan daha düşük saptanmıştır. Bu sonuçlar ve literatür bilgileri eşliğinde KIÜ hastalarında Th1, Th2, Th17 ve Treg hücre fonksiyonlarının baskılı veya yetersiz olduğu söylenebilir.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kronik idioptik ürtiker hastalarında Th alt gruplarını belirlemeyi amaçladığımız çalışmamızda hasta grubunda IL-4, IL-23, IFN- γ , IL-17, IL-10 düzeylerinde kontrollere göre anlamlı azalma saptandı. TGF- β düzeyi ortalaması istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte hastalarda daha düşüktü. Bu sonuçlar ışığında KİÜ hastalarımızda Th1, Th2 ve TH17 ve Treg aracılı immün yanıtın baskın olmadığını veya tüm Th alt grup fonksiyonlarında yetersizlik olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda PKMHK süpernatantlarında, lenfositler için nonspesifik veya spesifik bir uyarı yapılmadan ELISA yöntemi ile sitokin düzeyleri değerlendirilmiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda PKMHK' nde T lenfositler için spesifik veya nonspesifik uyarı yapılarak sitokin düzeyleri daha kesin olarak değerlendirilebilir.

VII. ÖZET

Haftada en az iki kez tekrarlayan, 6 haftadır devam eden ürtiker “kronik ürtiker” olarak adlandırılır (1, 6). Kronik ürtiker tanısında öncelikle fiziksel, alerjik, psödoalerjik ve enfeksiyöz nedenler dışlanır. Nedeni bulunamayan olgular ise kronik idiyopatik ürtiker (KİÜ) olarak adlandırılır. Kronik ürtikerli olguların %50’den fazlası bu gruba girmektedir (109, 130, 131).

Son yıllarda KİÜ’ li olguların bir kısmında mast hücrelerinin ve bazofillerin yüksek afiniteli IgE reseptörünün α alt birimine karşı (anti-Fc ϵ RI) ya da IgE’ ye karşı IgG otoantikolar tespit edilmistir. Kronik otoimmün ürtiker (KOÜ) olarak adlandırılan bu olgulardaki otoantikolar fonksiyonel olarak aktiftir ve sağlıklı donörlerin bazofillerinden ve derideki mast hücrelerinden in vitro olarak histamin salınımına neden olmaktadır. Bu antikolar otolog serum deri testi ile saptanmaktadır.

Kronik ürtikerle ilgili en büyük gelişme hastaların yaklaşık %30-50’ sinin otoimmüniteyle ilişkili olması ve bu grup hastalığın idiyopatik değil “otoimmün ürtiker” (OİÜ) olarak adlandırılmasıdır. Otoimmün hastalıkların etiopatogenezinde CD4+ Th alt gruplarının önemli olduğu bilinmektedir. CD4+ Th hücreler farklı diferansiyasyon ve fonksiyonel özelliğe sahip alt gruplara ayrılabilir. Bugün için bilinen Th1, Th2, T reg, Th17 4 major T lenfosit alt grubudur.

Bu tez çalışmasında OSDT ve periferik kan mononükleer hücre kültürü yöntemlerini kullanarak, KİÜ’ in otoimmünite ve yardımcı T lenfosit alt grupları ve sitokinleri ile ilişkisini belirleyerek KİÜ patogenezinde bir ilerleme sağlamayı amaçladık.

20 OSDT(-) ve 20 OSDT(+) olmak üzere toplam 40 KİÜ hastasının alındığı çalışmamızda sitokin paternlerini belirleyebilmek için periferik kan

mononükleer hücre kültürü yapıldı. Hücre kültürü süpernatantlarından ELISA yöntemi ile IL-4, IL-17, IL-23, IL-10, TGF- β , IFN- γ çalışıldı.

Çalışmamızda IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-17, IL-23 düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak hastalarda kontrol grubundan daha düşük saptanmıştır. TGF- β düzeyi ortalaması da istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte hastalarda kontrollerden daha düşüktür.

Bu sonuçlar ve literatür bilgileri eşliğinde KİÜ hastalarında Th1, Th2, Th17 ve Treg hücre fonksiyonlarının baskılı veya yetersiz olduğu söylenebilir.

OSDT açısından bakıldığında özellikle OSDT (-) olan hastalarda IL-4, IL-10, IL-17, IL-23 düzeylerinin anlamlı olarak düşük saptanması bu grup hastalarda Th2, Th17 ve Treg fonksiyonlarının yetersiz veya baskılı olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmamızda PKMHK süpernatantlarında, lenfositler için nonspesifik veya spesifik bir uyarı yapılmadan ELISA yöntemi ile sitokin düzeyleri değerlendirilmiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda PKMHK' nde T lenfositler için spesifik veya nonspesifik uyarı yapılarak sitokin düzeyleri daha kesin olarak değerlendirilebilir.

VIII. SUMMARY

Primarily in the diagnosis of chronic urticaria, physical, allergic, pseudo-allergic and infectious causes are excluded. The unknown facts are called chronic idiopathic urticaria (CIU). More than 50% of patients with chronic urticaria is in this group.

Recently, in some patients with CIU, against high-affinity IgE receptor in mast cells and basophils the α subunit (anti-FcRI) or versus IgE, IgG autoantibodies were detected.

This fact is called chronic autoimmune urticaria. In the patients with CAU autoantibodies are functionally active and lead to the release of histamine in vitro, in healthy donors' basophils and mast cells in the skin. These antibodies are detected by using autologous serum skin test (ASST). The most development about chronic urticaria is that approximately 30-50% of patients are associated with autoimmunity and this type of disease is called autoimmune urticaria (AIU) not as idiopathic. CD4+ T helper subsets are important in pathogenesis of autoimmune diseases. CD4+T cells can be divided into sub groups which have different differentiation and functional features. In present Th1, Th2, T reg, Th17 are known as four major T lymphocyte subsets.

In this study we aimed to provide a progress in the pathogenesis of CIU by using ASST and peripheral blood mononuclear cell culture methods and by determining in CIU, autoimmunity and its relationship with helper T lymphocyte subsets and cytokines. In our study we have done the research on 20 ASST(-) and 20 ASST(+) of 40 patients with CIU. Peripheral blood mononuclear cell culture was performed to determine cytokine patterns. In cell culture supernatants, IL-4, IL-17, IL-23, IL-10, TGF- β , IFN- γ were studied by ELISA method.

In the study, IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-17, IL-23 levels of patients were lower than control group's levels statistically significantly. Although not statistically significant TGF- β average level of patients was lower than control group's levels.

With these results and literature data, it can be said that Th1, Th2, Th17 ve Treg cell function are not enough or they are compulsive in patients with CIU. From the perspective of ASST(-), especially in patients with CIU, IL-4, IL-10, IL-17, IL-23 levels were determined signifacantly low therefore in this type of patients groups,we think that Th2, Th17 ve Treg functions are not enough or they are compulsive.

In this study, in PKMHK supernatants cytokine levels was evaluate by using ELISA method witout specific or non specific stimulus for lymphocytes. In future studies,in PKMHK cytokine levels can be evaluated more clearly by stimulating specifically or non specifically for T lymphocytes.

IX. KAYNAKLAR

- 1- Grattan CEH, Sabroe RA., Greaves MW. Chronic urticaria. J Am Acad Dermatol. 2002;46:645-57.
- 2- Kaplan AP. Chronic urticaria: Pathogenesis and treatment, J Allergy Clin Immunol. 2004; 114:465-74.
- 3- Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2003; 3:363–68.
- 4- Zuberbier T., Bindslev-Jensen C., Canonica W., Grattan CEH., Kapp A., Kozel MMA., Maurer M., Merk HF., Schaefer T., Simon D., Vena GA., Wedi B. EAACI/GA2LEN/EDF guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria, Allergy. 2006; 61; 316-20.
- 5- Powell RJ., Du Toit GL., Siddique N., Leech SC., Dixon TA., Clark AT., Mirakian R., Walker SM., Huber PAJ., Nasser SM. BSAIC guidelines for the management of chronic urticaria and angioedema, Clinical and Experimental Allergy. 2007; 37: 631-50.
- 6- Charlesworth EN. Urticaria and angioedema: clinical spectrum. Annals of Allergy, Asthma and Immunology 1996; 76:484-96.
- 7- Hein R. Chronic urticaria: impact of allergic inflammation. Allergy 2002; 57 suppl 75: 19-24.
- 8- Vonakis, BM, Saini, SS. New concepts in chronic urticaria. Curr Opin Immunol 2008; 20:709. 9- Kaufman A., Rosenstreich DL. Mast cell heterogeneity in chronic idiopathic urticaria. Ann Allergy. 1990; 65: 367-73.

- 10- Be´dard PM., Brunet C., Pelletier G., He´bert J. Increased compound 48/80 induced local histamine release from nonlesional skin of patients with chronic urticaria, *J Allergy Clin Immunol.* 1986; 78: 1121-112.
- 11- Smith CH., Kepley C., Schwartz LB., Lee TH. Mast cell number and phenotype in chronic idiopathic urticaria, *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 96; 360-64.
- 12- Charlesworth EN., Hood AF., Soter N., Kagey-Sobotka A., Norman PS., Lichtenstein LM. Cutaneous late-phase response to allergen mediator release and inflammatory cell infiltration, *J Clin Invest.* 1989; 83: 1519-526.
- 13- Zuberbier T., Chantraine-Hess S., Hartmann K., Czarnetzki BM. Pseudoallergen-free diet in the treatment of chronic urticaria. A prospective study, *Acta Derm Venereol (Stockh).* 1995; 75: 484-87.
- 14- Grattan CEH., Francis DM., Hide M., Greaves MW. Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria, *Clin Exp Allergy.* 1991; 21: 695-704.
- 15- Papadopoulou N., Kalogeromitros D., Staurianean NG., Tiblalex D., Theoharides TC. Corticotropin-releasing hormone receptor-1 and histidine decarboxylase expression in chronic urticaria, *J Invest Dermatol.* 2005; 125: 952–55.
- 16- Reichel M., Mauro TM. Urticaria and hepatitis C, *Lancet.* 1990; 336: 822–23.
- 17- Siddique N., Pereira BN., Hasan AS. Hepatitis C and urticaria: cause and effect?, *Allergy.* 2004; 659:68.
- 18- Vaida GA., Goldman MA., Bloch KJ. Testing for hepatitis B virus in patients with chronic urticaria and angioedema, *J Allergy Clin Immunol.* 1983; 72:193–98.

- 19- Gaig P., Garcia-Ortega P., Enrique E., Papo M., Quer JC., Richard C. Efficacy of the eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic urticaria. placebo-controlled double blind study, *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2002; 30: 255–58.
- 20- Fukuda S., Shimoyama T., Umegaki N., Mikami T., Nakano H., Munakata A. Effect of *Helicobacter pylori* eradication in the treatment of Japanese patients with chronic idiopathic urticaria, *J Gastroenterol*. 2004; 39: 827–30.
- 21- Leznoff A., Josse RG., Denberg J., Dolovich J. (1983): Association of chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity, *Arch Dermatol*. 1983; 119:636-40.
- 22- Leznoff A., Sussman FL. Syndrome of idiopathic chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity: a study of 90 patients, *J Allergy Clin Immunol*. 1989; 84:66-71.
- 23- Rumbryt JS., Katz JL., Schocket AL. Resolution of chronic urticaria in patients with thyroid autoimmunity: review and therapeutic implications, *J Am Dermatol*. 1990; 40:229-32.
- 24- Kaplan AP., Finn A. Autoimmunity and the etiology of chronic urticaria, *Can J Allergy Clin Immunol*. 1999; 4: 286-92
- 25- Kikuchi Y., Fann T., Kaplan AP. Antithyroid antibodies in chronic urticaria and angioedema, *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112: 218.
- 26- Sabroe RA., Seed PT., Francis DM., Barr RM., Black AK., Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria: comparison of the clinical features of patients with and without anti-FcεRI or anti-IgE autoantibodies, *J Am Acad Dermatol*. 1999; 40: 443–50.
- 27- Rumbryt JS., Schocket AL. Chronic urticaria and thyroid disease, *Immunol Allergy Clin N Am*. 2004; 24: 215-23.

- 28- O'Donnell BF., Neill CM., Francis DM., Niimi N., Barr RM., Barlow RJ., et al. Human leucocyte antigen class II associations in chronic urticaria, *Br J Dermatol.* 1999; 140: 853-58.
- 29- Grattan CEH, Wallington TB, Warin RP, Kennedy CTC: A serological mediator in chronic idiopathic urticaria: a clinical, immunological and histological evaluation. *Br J Dermatol* 1986; 114: 583-590.
- 30- Hide M., Francis DM., Grattan CEH., Hakimi J., Kochan JP., Greaves MW. Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria, *N Engl J Med.* 1993; 328: 1599-1604.
- 31- Niimi N., Francis DM., Kermani F., O'Donnell BF., Hide M., Kobza-Black A., et al. Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria, *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 1001-1006.
- 32- Greaves MW: Chronic urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000; 105: 664-672.
- 33- Grattan CEH. Autoimmune urticaria, *Immunol Allergy Clin N Am.* 2004; 24; 163-181.
- 34- Gruber BL., Baeza ML., Marchese MJ., Agnello V., Kaplan AP. Prevalence and functional role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 213-17.
- 35- Zweiman B., Valenzano M., Atkins PC., Tanus T., Getsy JA. Characteristics of histamine-releasing activity in the sera of patients with chronic idiopathic urticaria, *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 98: 89-98.
- 36- Tong LJ., Balakrishnan G., Kochan JP., Kine't J-P., Kaplan AP. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria, *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 99: 461-65.

- 37- Ferrer M., Kinet JP., Kaplan AP. (1998): Comparative studies of functional and binding assays for IgG anti-FcεRI in chronic urticaria, *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 101:672-76.
- 38- Sabroe RA., Fiebiger E., Francis DM., et al. Classification of anti-FcεRI and anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110: 492–99
- 39- Kikuchi Y., Kaplan AP. Mechanisms of autoimmune activation of basophils in chronic urticaria, *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107: 1056–62.
- 40- Fiebiger E., Hammerschmid F., Stingl G., Maurer D. Anti-FcεRI autoantibodies in autoimmune disorders. Identification of a structure-function Relationship. *J Clin Invest.* 1998; 101: 243-51.
- 41- Kermani F., Niimi N., Francis DM., et al. Characterization of a novel mast cell-specific histamine releasing activity in chronic idiopathic urticaria (CIU). *J Invest Dermatol.* 1995; 105: 452.
- 42- MacDonald SM., Rafnar T., Langdon J., et al. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science.* 1995; 269: 688–90.
- 43- Claveau J., Lavoie A., Brunet C., et al. (1993): Chronic idiopathic urticaria: possible contribution of histamine-releasing factor to pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 1993; 92: 132-37.
- 44- Vonakis BM., Sora R., Langdon JM., et al. (2003): Inhibition of cytokine gene transcription by the human recombinant histamine-releasing factor in human T lymphocytes. *J Immunol.* 2003; 171: 3742–750.
- 45- Fiebiger, E, Hammerschmid, F, Stingl, G, Maurer, D. Anti-FcεRIa antibodies in autoimmune-mediated disorders. *J Clin Invest* 1998; 101:243.

- 46- Kikuchi, Y, Kaplan, AP. A role for C5a in augmenting IgG-dependent histamine release from basophils in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109:114.
- 47- Fagiolo, U, Kricek, F, Ruf, C, et al. Effects of complement inactivation and IgG depletion on skin reactivity to autologous serum in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106:567.
- 48- Asero, R, Tedeschi, A, Riboldi, P, Cugno, M. Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1113.
- 49- Asero, R, Tedeschi, A, Coppola, R, et al. Activation of the tissue factor pathway of blood coagulation in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:705.
- 50- Razin, E, Marx, G. Thrombin-induced degranulation of cultured bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 1984; 133:3282.
- 51- Vliagoftis, H. Thrombin induces mast cell adhesion to fibronectin: evidence for involvement of protease-activated receptor-1. *J Immunol.* 2002; 169:4551.
- 52- Huber-Lang, M, Sarma, JV, Zetoune, FS, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 2006; 12: 682.
- 53- Fusari, A, Colangelo, C, Bonifazi, F, Antonicelli, L. The autologous serum skin test in the follow-up of patients with chronic urticaria. *Allergy* 2005; 60:256.
- 54- Fiebiger, E, Hammerschmid, F, Stingl, G, Maurer, D. Anti-FcepsilonR1alpha autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest* 1998; 101:243.

- 55- Jacques, P, Lavoie, A, Bedard, PM, et al. Chronic idiopathic urticaria: profiles of skin mast cell histamine release during active disease and remission. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:1139.
- 56- Cohen, RW, Rosenstreich, DL. Discrimination between urticaria-prone and other allergic patients by intradermal skin testing with codeine. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:802.
- 57- Grattan, CE, Walpole, D, Francis, DM, et al. Flow cytometric analysis of basophil numbers in chronic urticaria: basopenia is related to serum histamine releasing activity. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:1417.
- 58- Grattan, CE, Dawn, G, Gibbs, S, Francis, DM. Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:337.
- 59- Vonakis, BM, Vasagar, K, Gibbons, SP Jr, et al. Basophil FcεRI histamine release parallels expression of Src-homology 2-containing inositol phosphatases in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:441.
- 60- Eckman, JA, Hamilton, RG, Gober, LM, et al. Basophil phenotypes in chronic idiopathic urticaria in relation to disease activity and autoantibodies. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1956.
- 61- Gober LM, Sterba PM, Baker R, Vasagar K, Vonakis BM, Saini SS Longitudinal examination of basophil functional phenotypes and disease activity in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 119:5312.
- 62- Sabroe RA., Greaves MW. Chronic urticaria with functional autoantibodies: 12 years on, *Br J Dermatol.* 2006; 154: 813-819

- 63- Confino-Cohen R., Aharoni D., Goldberg A., et al. (2002): Evidence for aberrant regulation of the p21Ras pathway in PBMCs of patients with chronic idiopathic urticaria, *J Allergy Clin Immunol*, 109, 349–566.
- 64- Ferrer M., Nakazawa K., Kaplan AP. Complement dependence of histamine release in chronic urticaria, *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 169
- 65- Fiebiger E., Hammerschmid F., Stingl G., Maurer D. Anti-Fcepsilon RI autoantibodies in autoimmune disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest* 1998; 101: 243-51.
- 66- Rorsman H. Basophilic leucopenia in different forms of urticaria, *Acta Allergol* 1961; 16: 185-215.
- 67- Claveau J., Lavoie A., Brunet C., et al. (1996): Comparison of histamine releasing factor recovered from skin and peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 475-79.
- 68- Sabroe RA., Poon EP., Orchard GE., Lane D., Francis DM., Barr RM., et al. Cutaneous inflammatory cell infiltrate in chronic idiopathic urticaria: comparison of patients with and without anti-FcRI or anti-IgE autoantibodies, *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 484-93.
- 69- Caprioni M., Giomi B., Volpi W., et al. Chronic idiopathic urticaria: Infiltrating cells and related cytokines in autologous serum-induced wheals, *Clin Immunol* 2005; 114: 284-92.
- 70- Malmros H. Auto serumtest (AST), *Nordisk Med* 1946; 29: 150-151
- 71- Asero R., Tedeschi A., Lorini M. Autoreactivity is highly prevalent in patients with multiple intolerances to NSAIDs, *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 468–72

- 72- Asero R., Tedeschi A., Lorini M., et al. Sera from patients with multiple drug allergy syndrome contain circulating histamine-releasing factors, *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131: 195–200.
- 73- Grattan CEH., Hamon CGB., Cowan MA., Leeming RJ. Preliminary identification of a low molecular weight serological mediator in chronic idiopathic urticaria, *Br J Dermatol* 1988; 119: 179-184
- 74- Asero R., Tedeschi A., Lorini M., Salimbeni R., Zanoletti T., Miadonna A. Chronic urticaria novel clinical and serologic aspects, *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1105-1110.
- 75- Ferrer M., Luquin E., Kaplan AP. IL3 effect on basophils histamine release upon stimulation with chronic urticaria sera, *Allergy* 2003; 58: 802–807.
- 76- Asero R., Lorini M., Chong SU., Zuberbier T., Tedeschi A. Assessment of histamine-releasing activity of sera from patients with chronic urticaria showing positive autologous skin test on human basophils and mast cells, *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1111-114.
- 77- Gyimesi E., Sipka S., Danko K., et al. Basophil CD63 expression assay on highly sensitized atopic donor leucocytes – a useful method in chronic autoimmune urticaria. *Br J Dermatol* 2004; 151: 388-96.
- 78- Yasnowsky KM., Schoen DJ., Vedanthan PK., et al. (2005): Chronic urticaria sera increase basophil CD203c surface expression. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 179.
- 79- Zhu, J, Paul, WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112:15-57.
- 80- Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348.

- 81- Mosmann, TR, Coffman, RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145.
- 82- Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:227.
- 83- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, et al. Microbial lipopeptides induce T h production of IL-17 in T h cells. *J Immunol* 2000;165:6107-15.
- 84- Bettelli, E, Korn, T, Oukka, M, Kuchroo, VK. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature* 2008; 453:1051.
- 85- Miossec, P, Korn, T, Kuchroo, VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361:888.
- 86- Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, Penninger JM, Eriksson U. *J Exp Med.* 2006; 203(8):2009-2019.
- 87- Kattah, MG, Wong, MT, Yocum, MD, Utz, PJ. Cytokines secreted in response to Toll-like receptor ligand stimulation modulate differentiation of human Th17 cells. *Arthritis Rheum* 2008; 58:1619.
- 88- McKinley, L, Alcorn, JF, Peterson, A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 2008; 181:4089.
- 89- Awasthi, A, Murugaiyan, G, Kuchroo, VK. Interplay Between Effector Th17 and Regulatory T Cells. *J Clin Immunol* 2008; 28:660.
- 90- Korn, T, Bettelli, E, Oukka, M, Kuchroo, VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009;12.
- 91- Burgler, S, Ouaked, N, Bassin, C, et al. Differentiation and functional analysis of human Th17 cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:588.

- 92- Louten, J, Boniface, K, de Waal, Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:1004.
- 93- Zhai, Y, Ghobrial, RM, Busuttill, RW, Kupiec-Weglinski, JW. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost?. *Crit Rev Immunol* 1999; 19:155.
- 94- Nakamura, T, Kamogawa, Y, Bottomly, K, Flavell, RA. Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1997; 158:1085.
- 95- Bonecchi, R, Bianchi, G, Bordignon, PP, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 187:129.
- 96- Jung, S, Littman, DR. Chemokine receptors in lymphoid organ homeostasis. *Curr Opin immunol* 1999; 11:319.
- 97- Sallusto, F, Lenig, D, Mackay, CR, Lanzavecchia, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187:875.
- 98- Constant, SL, Bottomly, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:297.
- 99- Rogers, PR, Croft, M. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol* 1999; 163:1205.
- 100- Klinman, DM. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int Rev Immunol* 2006; 25:135.
- 101- Vicari, AP, Schmalbach, T, Lekstrom-Himes, J, et al. Safety, pharmacokinetics and immune effects in normal volunteers of CPG 10101 (ACTILON), an investigational synthetic toll-like receptor 9 agonist. *Antivir Ther* 2007; 12:741.

- 102- McAleer, JP, Vella, AT. Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity. *Crit Rev Immunol* 2008; 28:281.
- 103- Ingale, S, Wolfert, MA, Buskas, T, Boons, GJ. Increasing the Antigenicity of Synthetic Tumor-Associated Carbohydrate Antigens by Targeting Toll-Like Receptors. *Chembiochem* 2009; 10:455.
- 104- Wilson, CB, Rowell, E, Sekimata, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:91.
- 105- Manetti, R, Parronchi, P, Giudizi, MG, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177:1199.
- 106- Manetti, R, Gerosa, F, Giudizi, MG, et al. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J Exp Med* 1994; 179:1273.
- 107- Seder, RA, Gazzinelli, R, Sher, A, Paul, WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:10188.
- 108- Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:133.
- 109- Barbulescu, K, Becker, C, Schlaak, JF, et al. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1998; 160:3642.
- 110- Kohno, K, Kataoka, J, Ohtsuki, T, et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol* 1997; 158:1541.

- 111- Gracie, JA, Robertson, SE, McInnes, IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003; 73:213.
- 112- MacGlashan, D Jr, White, JM, Huang, SK, et al. Secretion of IL-4 from human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J Immunol* 1994; 152:3006.
- 113- Shinkai, K, Mohrs, M, Locksley, RM. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature* 2002; 420:825.
- 114- Yoshimoto, T, Paul, WE. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994; 179:1285.
- 115- Liu, YJ. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* 2006; 203:269.
- 116- Sokol, CL, Barton, GM, Farr, AG, Medzhitov, R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 2008; 9:310.
- 117- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 950–7.
- 118- Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 221–42.
- 119- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; 204: 1849–61.
- 120- Collins, A, Littman, DR, Taniuchi, I. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:106.

- 121- Ho, IC, Tai, TS, Pai, SY. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:125.
- 122- Hwang, ES, Szabo, SJ, Schwartzberg, PL, Glimcher, LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 2005; 307:430.
- 123- Zhu, J, Min, B, Hu-Li, J, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 2004; 5:1157.
- 124- Shortman, K, Liu, YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151.
- 125- Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:984.
- 126- de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26:289.
- 127- Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004; 5:975.
- 128- Smits HH, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Helminth infections: protection from atopic disorders. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5:42.
- 129- Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol* 2002; 18:272.
- 130- Kattah MG, Wong MT, Yocum MD, Utz PJ. Cytokines secreted in response to Toll-like receptor ligand stimulation modulate differentiation of human Th17 cells. *Arthritis Rheum* 2008; 58:1619.

- 131- Marta M, Andersson A, Isaksson M, et al. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2008; 38:565.
- 132- O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 10:801.
- 133- Robinson DS, Larché M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest* 2004; 114:1389.
- 134- Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:389.
- 135- Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:735.
- 136- Tsuji-Takayama K, Suzuki M, Yamamoto M, et al. The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. *J Immunol* 2008; 181:3897.
- 137- Nakamura S, Suzuki M, Sugimoto A, et al. IL-2-independent generation of FOXP3(+)CD4(+)CD8(+)CD25(+) cytotoxic regulatory T cell lines from human umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2007; 35:287.
- 138- Chen WC, Chiang BL, Eugene HL, Leu SJ, Lee YL. Defective functions of circulating CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells in patients with chronic ordinary urticaria. *Journal of Dermatological Science* (2008) 51, 121-130.
- 139- Piconi S, Trabattoni D, Lemoli E, Fusi ML, Villa ML, Milazzo F, Clerici M. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:59–66.
- 140- Caproni M, Giomi B, Volpi W, Melani L, Schincaglia E, Macchia D, Manfredi M, D'Agata A, Fabbri P. Chronic idiopathic urticaria: infiltrating

cells and related cytokines in autologous serum-induced wheals. *Clinical Immunology* 114 (2005) 284– 292.

- 141- dos Santos JC, Azor MH, Nojima VY, Lourenço FD, Prearo E , Maruta CW , Rivitti EA , Duarte AJS , Sato MN. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria. *International Immunopharmacology* 2008; 8:1433–1440.
- 142- S. Ying, Y. Kikuchi, Q. Meng, Th1/Th2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction, *J. Allergy Clin. Immunol.* 109 (2002) 694– 700.
- 143- Guo J, Rapoport B, McLachlan SM. Balance of Th1/Th2 cytokines in thyroid autoantibody synthesis in vitro. *Autoimmunity* 1999; 30: 1–9.
- 144- Irinyi B, Aleksza M, Antal-Szalma P, Sípka S, Hunyadi J, Szegedi A. Cytokine Production of CD4+ and CD8+ Peripheral T Lymphocytes in Patients with Chronic Idiopathic Urticaria. *Acta Derm Venereol* 2002; 82: 249–253. Investigative report.