T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

BEHÇET HASTALARINDA DENTRİTİK HÜCRE VE DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE ETKİLEŞİMİ

AYDIN KARABULUT

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜNNUR DENİZ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı Doktora Programında Aydın KARABULUT tarafından hazırlanan Behçet Hastalarında Dentritik Hücre ve Doğal Öldürücü Hücre Etkileşimi" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

10 / 02 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)		İmzası
1.Prof. Dr. Günnur DENİZ	DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı	Raporlu
2.Prof. Dr. Ahmet GÜL	İst. Tıp. Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Işıl BARLAN	Marmara Üniversitesi Çocuk Sağ. ve Hast. A.D	
4.Prof. Dr. Erdem TÜZÜN	DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı	
5.Doç. Dr. Esin AKTAŞ	DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı	

Doç.Dr.Gaye ERTEN DETAE İmmünoloji

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Aydın Karabulut



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin danışmanlığı süresince her türlü desteğini esirgemeyen, çalışmamın her aşamasında bana yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e, tez çalışmam için hasta kaynaklarını sağlayan ve tezimin kurgulanmasında çok büyük desteği olan değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Gül'e, tezimin başlangıcından en son haline gelinceye karşılaştığım her problemde fikirlerinden faydalandığım Doç. Dr. Suzan Çınar, Doç. Dr Esin Aktaş, Doç. Dr. Umut Can Küçüksezer'e, deney çalışmalarım sırasında üstün Flow sitometri bilgisiyle her an yanımda olan arkadaşım Abdullah Yılmaz'a, hasta örneklerini beraber topladığımız arkadaşım Vusale Abbasovaya, tez yazım çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Pınar Kasapoğlu, Yusuf Metin Gelmez, İlhan Tahralı'ya, doktoraya başladığım ilk günden bitirme noktasına gelinceye kadar arkadaşım, kardeşim, ağbim olan sevgili Murat Koşer'e, doktora eğitimimi yaptığım İmmünoloji Anabilim Dalındaki tüm hoca ve arkadaşlarıma ve son olarak tüm hayatım boyunca beni koşulsuz destekleyen hayat ve enerji kaynağım aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:15205

İÇİNDEKİLER

AYDIN KARABULUT i
TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİ
ABSTRACT ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Behçet Hastalığı 3
2.2. Behçet Hastalığının Epidemiyolojisi 3
2.3. Behçet Hastalığının Patogenezi 4
2.3.1. Genetik Bulgular 4
2.3.2. Çevresel Ajanlar 4
2.3.2.1. T Hücrelerinin Rolü 6
2.3.2.2. Nötrofillerin Rolü 6
2.3.2.3. Sitokinlerin Rolü 7
2.3.2.4. B Hücreleri ve Otoantijenlerin Rolleri 7
2.3.2.5. NK Hücrelerinin Rolü 7
2.3.3. NK Hücrelerinin Özellikleri 7
2.3.4. Dentritik Hücrelerin Özellikleri 11
2.3.5. Dentritik - NK Hücre Etkileşimleri 11
3. GEREÇ VE YÖNTEM 13
3.1. Olgular 13
3.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler 13
3.3. Hazır Kitler 13

3.4. Antikorlar 14
3.5. Rekombinant Sitokinler ve Farklılaşma Faktörleri 14
3.6. Kullanılan Yöntemler 14
3.6.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu 14
3.6.2. Hücre Sayımı 15
3.6.3. NK Hücre ve Monosit izolasyonu 15
3.6.4. Monosit Dentritik Hücre Farklılaşması 16
3.6.5. NK - Dendritik Hücre Kültürü 17
3.6.6. Akan Hücre Ölçer ile NK Yüzey Belirteçlerinin Analizi 17
3.6.7. Akan Hücre Ölçer ile NK Hücre İçi Sitokin Tayini 18
3.6.8. Dentritik Hücre Farklılaşma Parametrelerinin Değerlendirilmesi 18
3.7. İstatistiksel Değerlendirme 20
4. BULGULAR 21
4.1. NK Hücre Yüzey Reseptör Ekspresyonu 21
4.2. NK Hücre İçi Sitokin Değerleri 23
4.3. Behçet NK Hücrelerinin Yalnız ve mDH'lerle Birlikte Kültürü Sonrası Yüzey Molekül Ekspresyonları 23
4.4. Behçet NK Hücre ve NK + mDH Kültürü Sonrası Hücre İçi Sitokin Değerleri ... 24
4.5. Behçet Hastaları ve Sağlıklı Bireylerin NK Hücre Kültürleri Sonucu Yüzey Ekspresyon Değerleri 24
4.6. Behçet Hastaları ve Sağlıklı Kontrol NK Hücre İçi Sitokin Profillerinin Karşılaştırılması 25
4.7. Behçet Hastaları ve Sağlıklı Kontroll NK + mDH Kültürleri Sonucu Yüzey Belirteç Ekspresyonları 25
4.8. Behçet Hastaları ve Sağlıklı Kontrol NK Hücrelerinin mDH lerle Beraber Kültürleri Sonucu Hücreiçi Sitokin Profilleri 26
4.9. Monositlerin Dentritik Hücreye Farklılaşması 26
5. TARTIŞMA 30
KAYNAKLAR 33
ETİK KURUL KARARI 41
ÖZGEÇMİŞ 42

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: NK hücre reseptör, ligand ve fonksiyonları 10
Tablo 3-1: Hücre ayırımı ve kültür için kullanılan malzemeler 13
Tablo 3-2: Kullanılan ticari kitler 13
Tablo 3-3: Kullanılan antikorlar 14
Tablo 3-4: Kültürde uyarı için kullanılan malzemeler..... 14

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: NK hücre aktive edici ve baskılayıcı reseptörler [53] 9
Şekil 3-1: FACSAria II cihazı ile NK hücre izolasyonu sonucu saf NK hücre populasyonu 16
Şekil 3-2: Monosit kökenli Dendritik hücre farklılaşması 19
Şekil 4-1: Kültür sonrası (5. gün) FS/SS histogramında (A) lenfosit (R1) kapısı içinde CD56 pozitif NK hücreleri (B) 21
Şekil 4-2: $CD56^+$ NK hücrelerinde NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonu 22
Şekil 4-3: NK ve DH kültürü sonrası NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonu 22
Şekil 4-4: NK hücresi (A) ve NK + DH (B) kültürü sonrası IFN-γ ekspresyonu 23
Şekil 4-5: Behçet hasta NK hücreleri ve NK + mDH kültürleri sonucunda NKp30 ve KIR3DL ekspresyonları 23
Şekil 4-6: Behçet NK hücrelerinin yalnız ve mDH lerle kültürü sonrası IL-10, IFN-γ hücre içi sitokin seviyeleri 24
Şekil 4-7: NK hücrelerinde NKp30 ve KIR3DL1 Ekspresyonu 24
Şekil 4-8: NK Hücre içi IL-10 ve IFN-γ seviyeleri 25
Şekil 4-9: Behçet Hastası ve Sağlıklı Kontrol Grubu NK + mDH Kültürleri Sonucu NKp30 ve KIR3DL1 değerleri 25
Şekil 4-10: NK +mDH kültürü sonrası hücre içi IL-10 ve IFNγ seviyeleri 26
Şekil 4-11: Sağlıklı kontrol monosit kökenli dendritik hücre kapılaması 27
Şekil 4-12: Sağlıklı bireylerde mDH farklılaşması sürecinde CD14, CD83, CD209 ekspresyonları 27
Şekil 4-13 : Behçet hastalarında monosit kökenli dentritik hücrelerin kapılanması 28
Şekil 4-14 : Behçet hastaların monositt kökenli dentritik hücre farklılaşmasında yüzey belirteçlerinin (CD14, CD209, CD83) ekspresyonları 28
Şekil 4-15 : Behçet hasta ve sağlıklı control gruplarında monosit kökenli dendritic hücre farklılaşma yüzey belirteçlerinin (CD83, CD209) karşılaştırılması 29

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AECE	Anti-endotel hücre antikorları
ASCA	Anti-saccharomyces cervisiae antikorları
DH	Dentritik hücre
FasL	Fas ligandı
GWAS	Genome Wide Assosiation
HLA-B51	İnsan lökosit antijeni – B51
HSP	Isı şok proteinleri
HSV	*Herpes Simplex* virüsü
IFN-γ	İnterferon-gamma
IL-6	İnterlökin-6
iDH	İmmatür-olgunlaşmamış DH
LPS	Lipopolisakkarit
NK	Doğal öldürücü hücreler
PINK1	Anti PTEN-indüklenmiş putative kinaz 1 antikorları
PKMH	Periferik Kan Mononükleer Hücreler
TNF-α	Tümör nekroze edici faktör-alfa
TRAIL	TNF ilişkili apoptoz uyarıcı ligand

ÖZET

Karabulut, A. (2015). Behçet Hastalarında Dentritik Hücre ve Doğal Öldürücü Hücre Etkileşimi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Behçet hastalığı tekrarlayan ağız ve genital bölge yaraları, üveit, eklemler, deri, merkezi sinir sistemi ve gastrointestinal sistemi tutan multisitemik otoenflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalığının etyolojisi tam olarak aydınlatılamamasına rağmen genetik yatkınlığı olan insanlarda mikrobiyal bir ajanın veya çevresel faktörlerin bir takım immünolojik bozukluklar oluşturarak hastalığı tetiklediği en kabul gören hipotezdir. Dentritik hücreler (DH) ve doğal öldürücü (NK) hücreler doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli efektör hücreleridir. Erken faz bağışıklık cevabında bu iki hücrenin karşılıklı etkileşimi birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bu karşılıklı etkileşimde DH ler NK hücre fonksiyonlarını etkilerken, NK hücreleri de DH ler üzerine düzenleyici etkiler göstermektedirler. Aynı zamanda NK hücreleri DH lerin olgunlaşmasını etkilemektedir. Bu çalışmada Behçet hasta kan örneklerinden elde edilen monosit kökenli dentritik hücrelerle NK hücreleri arasındaki etkileşim incelenmiş ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmıştır. Behçet hasta ve sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örneklerinden elde edilen monositler IL-4, GM-CSF farklılaşma faktörleriyle monosit kökenli dentritik hücrelere dönüştürülmüş, yine Behçet hastası ve sağlıklı kontrollerin periferik kanlarından ayrılan NK hücreleri farklılaştırılan dentritik hücrelerle ortak kültüre alınmıştır. Kültür sonucunda NK yüzey belirteçleri KIR3DL1 ve NKp30, hücre içi IFN-γ ve IL-10 düzeyleri saptanmıştır. NK hücrelerinin dentritik hücre farklılaşmasına etkisi, monosit kökenli dentritik hücre farklılaşma belirteçleri olan CD14, CD209 ve CD83 düzeyleri ile belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerde ölçülen parametreler açısından bir farklılık saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Behçet Hastalığı, NK hücresi, monosit kökenli dentritik hücre, CD209, CD83

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:15205

ABSTRACT

Karabulut, A. (2015). Interaction of Dentritic cell and Naturel Killer Cells in Behcet's Patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. PhD Thesis. Istanbul.

Behcet's disease is a multisystemic autoinflammatory disorder characterized mainly by recurrent oral and genital ulcers, uveitis and frequently involves the joints, skin, central nervous system (CNS) and gastrointestinal tract. The etiology of Behcet's disease is not definitely known, but the most widely suggested hypothesis for its pathogenesis is that microbial agents or other environmental factors triggering various immunological abnormalities in genetically susceptible people. Dendritic cells (DCs) and natural killer (NK) cells are important effector cells of the innate immune system. During the early stages of innate immune responses NK and DCs interact reciprocally and this important interaction was underlined by many reports. During this interaction, DCs induce NK cell functions and NK cells in turn induce modulatory effects on DCs. On the other hand this reciprocal interaction between NK and DCs could regulate DC maturation process. In this study, crosstalk between NK and mDC (monocyte derived dendritic cell) were investigated in Behcet's patients and compared with healthy subjects. Monocyte seperated from healthy and Behcets patients, differentiated to the mDC presence of IL-4 and GM-CSF and cocultured these cells with those NK cells seperated from Behcest patient and healthy control. After the cell culture NK surface markers KIR3DL1 and NKp30, intracellular cytokines IFN-γ and IL-10 were measured. The effect of NK cells on the monocytes differentiation were determined by measuring mDC differentiation parameters CD14, CD209 and CD83. In the statistical anlysis there is no significant differences was obtained between the parameters.

Key Words: Behcets Disease, NK cells, Monocyte Derived Dentritic Cells, CD209, CD83

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 15205

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Behçet hastalığı deriyi ve gözleri, eklemleri, merkezi sinir sistemini, gastrointestinal sistemi, akciğerleri, her çesit ve büyüklükteki damarları da etkileyebilen sistemik bir vaskülittir. Behçet hastalığı, en sık görüldüğü ve en şiddetli seyrettiği Akdeniz ülkelerinden Japonya'ya kadar uzanan ve "İpek Yolu" olarak tarif edilen bölgenin hastalığı olarak Ohno tarafından 1982 yılında tanımlanmıştır. Behçet hastalığının patogenezini açıklamak için yapılan immünolojik ve genetik çalışmalar hastalık patogenezini tam olarak aydınlatamamıştır. Behçet hastalığının coğrafi dağılımı, hastalığın genetik temellere dayandığını düşündürtmektedir. Bugüne kadar hastalık patogeneziyle ilgili en güçlü genetik ilişki HLA-B51 (insan lökosit antijeni – B51) ile gösterilmiştir. Behçet hastalığının ortaya çıkmasında ve gelişmesinde bir takım çevresel faktörlerin ve mikroorganizmaların tetikleyici rol oynadığı düşünülmektedir. *Herpes Simplex* virüsü (HSV) Behçet hastalığı ile ilişkilendirilen tek virüs türüdür, bununla birlikte hastalık etkeni olarak bakterilerin de rolü vurgulanmaktadr. Bir *Streptokok sanguinis* ekstraktı olan SSH-83 KTH-1 serotipi Behçet hastalarında T hücrelerinden interlökin (IL)-6 ve interferon-gamma (IFN-γ) üretiminde artışa neden olmaktadır. KTH-1 aynı zamanda Behçet hastalarında, T hücre kültürlerinde $\gamma\delta$ T hücre sayısını arttırırken KTH-1'e spesifik $\gamma\delta$ T hücrelerinden IL-6, IL-8, tümör nekroze edici faktör-alfa (TNF-α) gibi proenflamatuvar sitokinlerin salgılamasına neden olmaktadır.

Yardımcı T (Th)1 ve Th2 hücre oranlarının korunması immünolojik denge açısından önemlidir. Otoimmün hastalıklarda Th1 tipi sitokinlerin aşırı salgılanması sonucu bu dengenin bozulduğu mevcut araştırmalarda vurgulanmıştır. Çalışmalar Behçet hastalarında güçlü bir Th1 polarizasyonunun varlığını göstermektedir. Behçet hasta çalışmaları paterji reaksiyonları, göz bulguları ve pustil foliküllerinde yüksek miktarda nötrofil infiltrasyonu ve aşırı nötrofil aktivasyonu göstermektedir. Farklı çalışmalarda proenflamatuvar sitokinlerden IL-6 düzeyi ile hastalık aktivitesi arasında bağlantı olduğu saptanmıştır.

Doğal öldürücü (natural killer-NK) hücreler kemik iliğinden köken alan ve doğal bağışıklıkta rol oynayan büyük granüllü hücrelerdir. Hem doğal hem de edinsel immün sitemin bir kolu olan NK hücrelerinin, immün cevabı etkileyerek otoimmün

hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olabilecekleri ileri sürülmektedir. Naif T hücrelerini uyarabilme yeteneklerinin yanında dendritik hücre (DH) lerin otolog NK hücreleriyle etkileşebilme yetenekleri de vardır. DH'lerin aktivasyonu, IL-12 ve IL-15 gibi sitokinlerin salınımında artışa, buda NK hücre aktivasyonu ve sitotoksik aktivitenin artmasına neden olmaktadır.

İmmün yanıtlarda NK ve DH etkileşimi üzerine yapılan araştırmalar artmaktadır. Bu etkileşim çift taraflıdır ve Th1 gelişmesine ve sitotoksik cevabın gelişmesiyle sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda aktive olan NK hücreleri salgıladıkları IFN-γ ve TNF-α ve/veya direk hücre teması ile DH olgunlaşmasını uyarırlar.

Çalışmamızda Behçet hasta kan örneklerinden elde edilen NK hücrelerinin yine Behçet periferik kan monositlerinin farklılaşması sonucu elde edilen Dendritik hücrelerle *in vitro* koşullarda etkileşimi araştırılarak bu hücrelerin Behçet hastalık patogenezindeki rolleri araştırılmıştır. Bu amaçla, DH olgunlaşma belirteçleri olan DC-SIGN (CD209) ve CD83, NK hücre yüzey belirteçlerinden NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonları, NK hücre içi IFN-γ ve IL-10 sitokin içeriği saptanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Behçet Hastalığı

Milattan önceki dönemlerde Hipokrat zamanından beri bilinen Behçet Hastalığı, ilk kez 1937 yılında Türk dermatolog Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral ve genital ülserler ve hipopyonlu üveitten oluşan üçlü semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır. Hastalık Behçet Hastalığı, Behçet sendromu ve Morbus Behçet olarak tıp literatürüne geçmiş, başlangıçta sadece bu üçlü semptomla tanımlanan hastalığın zamanla tüm sistemleri tutabilen sistemik bir hastalık olduğu anlaşılmıştır. Behçet hastalığı tekrarlayan oral aftlar, genital ülserler, üveit ve deri lezyonları ile karakterize enflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalığı deri-mukoza ve gözler dışında eklemleri, merkezi sinir sistemini, gastrointestinal sistemi, akciğerleri, her çesit ve büyüklükteki damarları da etkileyebilen sistemik bir vaskülit olarak kabul edilmektedir [1]. Kadın ve erkeklerde yaklaşık eşit oranda görülebilen ve 20-30 lu yaşlarda başlayan Behçet hastalığı kronik bir seyir izleyen akut alevlenme ve iyileşme dönemleri gösteren enflamatuvar bir hastalıktır. Behçet hastalığının erkeklerde daha sert seyrettiği ve organ lezyonlarının erkelerde daha sık rastlandığı bildirilmiştir [2]. Büyük damar tutulumları, akciğer tutulumu ve merkezi sinir sistemi tutulumları en önemli mortalite nedenleridir ve hastalığın mortalistesi %0-6,3 arasında değişkenlik göstermektedir [3]. Klinik bulgular açısından oldukça çeşitlilik gösteren Behçet hastalığının tedavisi yine klinik bulgulara göre değişkenlik göstermektedir.

2.2. Behçet Hastalığının Epidemiyolojisi

Behçet hastalığı, en sık görüldüğü ve en şiddetli seyrettiği [4] Akdeniz ülkelerinden Japonya'ya kadar uzanan ve "İpek Yolu" olarak tarif edilen bölgenin hastalığı olarak Ohno tarafından 1982 yılında tanımlanmıştır [5]. Bu hastalığın bu yol üzerinde ticaret yapan veya göç eden kavimler tarafından tüm dünyaya yayıldığı düşünülmektedir [6]. Görülme sıklığının Türkiye'de 8 - 42 / 10.000, Japonya'da 15 / 100.000, Kuzey Amerika ve Avrupa'da ise 1 / 500.000 olduğu rapor edilmiş [7] olup aynı etnik kökene sahip ve farklı coğrafyada yaşayan insanlar arasında da değişebildiği bilinmektedir. Kuzey Anadolu'da sıklığı 370 / 100.000 iken Almanya'nın Berlin şehrinde yaşayan Türkler arasında görülme sıklığının ise 21 / 100.000 olduğu

bildirilmiştir [8]. Bu farklılıklar, hastalık başlangıcında veya ilerlemesinde çevresel faktörlerin en az genetik faktörler kadar önemli rol oynayabileceği yönündedir [8].

Behçet hastalığı ikinci ve üçüncü dekatlarda başlamakla beraber ülkemizde çocukluk çağında görülme oranı %6,1 civarındadır. Hastalık her iki cinste yaklaşık olarak aynı sıklıkta görülmekte fakat erkeklerde görülme sıklığı Türkiye'de ve Ortadoğu'da, kadınlarda ise Uzak Doğu ve Japonya'da biraz daha fazladır [9]. Erkek hastalarda hastalık seyrinin daha şiddetli seyrettiği ve sistemik tutulum ile organ lezyonlarının daha fazla görüldüğü bildirilmiştir [9].

2.3. Behçet Hastalığının Patogenezi

2.3.1. Genetik Bulgular

Behçet hastalığının coğrafi dağılımı, hastalığın genetik temelleri olduğunu düşündürtmektedir. Hastalık her ne kadar Mendel Kanunları'na göre değil, sporadik vakalar olarak ortaya çıkmaktaysa da Gül ve arkadaşlarının 2000 yılında Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada bir ailedeki kardeşler arasında hastalığın görülme riskinin yüksek saptanmasının (λs=11.4-52.5) hastalığın geçişinde genetik temellerin de bulunduğunu göstermektedir [10].

Bugüne kadar hastalığın patogeneziyle ilgili bulunan en güçlü genetik ilişki HLA-B51 (insan lökosit antijeni-B51) ile gösterilmiştir [11]. Bu genetik ilişkinin varlığı farklı etnik gruplarda da doğrulanmıştır. Bu gen direkt olarak hastalık patogenezine katılabileceği gibi HLA-B bölgesine komşu olan başka bir yatkınlık geni de bağlantı dengesizliği gösterebilme olasılığı vardır [11].

Bir çok polimorfizm çalışmasında Behçet hastalığının patogenezine yatkınlık oluşturan genlerin varlığı araştırılmış, bazı çalışmalarda istatistiksel anlamlılık saptanırken bazı çalışmalarda bir ilişki kurulamamıştır[12, 13].

Son yıllarda, GWAS (Genome Wide Assosiation) çalışmalarında HLA-B51'in hastalık patogenezindeki rölü bir kez daha vurgulanırken, IL-10, IL-23R, CCR1, STAT4, KLRC4, GIMAP2/GIMAP4 ve UBAC2 genleri de farklı etnik gruplarda Behçet hastalığıyla ilişkilendirilmiştir [14, 15].

2.3.2. Çevresel Ajanlar

Behçet hastalığının ortaya çıkmasında ve gelişmesinde bir takım çevresel faktörlerin ve mikroorganizmaların tetikleyici rol oynadığı düşünülmektedir. Viral bir

etkenin hastalığa neden olduğu ilk defa 1937 yılında Dr. Hulusi Behçet tarafından bildirmiştir. Daha sonra hastalara ait vücut sıvılarından virüs parçacıklarının izole edildiği iddia edilmiştir [16].

Herpes Simplex virüsü (HSV) Behçet hastalığı ile ilişkilendirilen tek virüs türüdür [17]. Çalışmalar kontrol gruplarına göre hasta serumlarında yüksek oranda anti-HSV-1 antijeninin bulunduğunu göstermektedir [18]. Kanda HSV-1 antijeni taşıyan dolaşan immün kompleksler mevcuttur. Behçet hastalarının genital ve intestinal ülserlerinde HSV-1 DNA'sı saptanmasına rağmen ağız yaralarında bu virüs saptanmamıştır [18, 19]. HSV-1 antijeni verilen farelerin %30'unda gözlerde, deride ve genital bölgede Behçet hastalığındakilere benzer lezyonlar gözlenmiştir [20].

Bir *Streptokok sanguinis* ekstraktı olan SSH-83 KTH-1 serotipi Behçet hastalarının T- hücrelerinden IL-6 ve interferon-gamma (IFN-γ) üretiminde artışa neden olmaktadır [21], KTH-1 Behçet hasta T hücre kültürlerinde γδ T hücre sayısını arttırırken, KTH-1'e spesifik γδ T hücrelerinin de IL-6, IL-8, TNF-α gibi proenflamatuvar sitokinlerin salgılamasına neden olmaktadır [22].

Behçet hastalarının oral floralarında ve serumlarında *Streptokokus Sanguis'a* ve bu bakteriye karşı gelişen antikorlara rastlandığı için *Streptokokus Sanguis'un* tetikleyici bir ajan olduğu düşünülmektedir [23].

Isı şok proteinleri Hsp 60 ve Hsp 65 Behçet hastalığında aday antijenlerdir. Isı şok proteinleri çeşitli fonksiyonları olan bir protein ailesi olup, ortak özellikleri hücrelerin ani sıcaklık değişiklikleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri ve glukoz düzeylerinde değişiklik gibi çevresel faktörlere maruz kaldıkları zaman üretilmeleridir. Isı şok proteinlerinin enfeksiyöz ve otoimmün hastalıklardaki etkilerinin immün mekanizması bir çok çalışmada vurgulanmıştır [24].

Memeli Hsp 60 ve Hsp 65 ile mikrobiyal (mikobakteriyel) Hsp 60/65 arasında %50'nin üzerinde bir benzerliğin olması, bakteri Hsp'lerine karşı olan T hücre cevabı ile çapraz reaksiyonun gelişerek otoreaktif T hücre cevabının geliştiğini göstermektedir [18]. Hsp 65 eritema nodozum ve mukokutanöz ülserler gibi aktif deri lezyonlarında epidermal bölgede yüksek oranda eksprese edilebilir [25]. Lehner ve arkadaşları ilk kez anti - Hsp antikorlarının oral streptokoklara ve mukozal homojenizatlara cevap vermesi üzerine Hsp 65'in Behçet hastalığında patojenik antijen olduğu hipotezini ortaya atmıştır [26]. Mikobakteriyel Hsp 65'e ait amino asit dizilimi (111-25, 154-72, 219-33, ve 311-26) T ve B hücre cevabını uyarmaktadır. Bakteri Hsp 65'den elde edilen ve

insan Hsp'leriyle %50-80 homoloji gösteren peptitlere karşı T hücre cevapları hastalarda kontrollere göre önemli derecede yüksektir. T hücre çalışmalarına benzer şekilde anti - Hsp 60 antikorlarıyla da çapraz reaksiyon gösterilmiştir [27].

2.3.2.1. T Hücrelerinin Rolü

Yardımcı T (Th)1 ve Th2 hücre oranlarının korunması immünolojik denge açısından önemlidir. Th1 tipi sitokinlerin aşırı salgılanması ile bu dengenin bozulduğu otoimmün hastalıklarda yapılan araştırmalarda vurgulanmıştır [28]. Çalışmalar Behçet hastalarında güçlü bir Th1 polarizasyonunun varlığını göstermektedir. Li ve arkadaşları, hücre içi sitokin çalışmalarında naif T hücrelerinin Th1 hücrelerine yönelmesini sağlayan T-bet transkripsiyon faktörünün diğer transkripsiyon faktörlerinden daha yüksek olduğunu saptamışlar ve Behçet hastalarında Th1 polarizasyonunu göstermişlerdir [29].

Yeni bir T hücre alt grubu olan Th17 hücrelerinin Behçet hastalığının patogenezinde rolleri olduğunu gösteren bulgular elde edilmiştir. Na ve arkadaşları, Behçet hastalarının kanlarında hastalığın aktif dönemlerinde IL-17 ve IFN-γ üreten $CD4^+$ T hücrelerinde ve hasta serum örneklerinde ise IL-17, IL-23 ve IFN-γ düzeylerinde artış saptamışlardır. Yüksek IL-17 seviyesi hastalığın klinik aktivitesiyle paralellik gösterebilmektedir [30].

Hem γδ T hücresi hem de $CD8^+$ T hücrelerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında Behçet hastalarında daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir [31]. αβ ve γδ T hücre reseptörüne sahip T hücrelerinde de hem fonksiyonel hem de fenotipik anomaliler gözlemlenmektedir.

2.3.2.2. Nötrofillerin Rolü

Nötrofiller kanda en yüksek oranda (%40-70) bulunan lökosit alt grubudur. Başlıca görevi fagositoz olan bu hücreler, bakteri enfeksiyonu, çevresel stresler sonucunda oluşan akut faz enflamasyonu sırasında ilk cevabı vererek enflamasyon bölgesine göç ederler. Behçet hasta çalışmaları paterji reaksiyonlarında, göz bulgularında ve pustil foliküllerinde yüksek miktarda nötrofil infiltrasyonu ve aşırı nötrofil aktivasyonunu göstermektedir [32].

2.3.2.3. Sitokinlerin Rolü

Çeşitli çalışmalarda proenflamatuvar sitokinlerden IL-6 düzeyi ile hastalık aktivitesi arasında bağlantılar saptanmıştır [33]. Özellikle merkezi sinir sitemi tutulumu gözlenen nörobehçet hastalarında hastalık aktivitesi ile IL-6 düzeyi önemli ölçüde paralellik göstermektedir [34, 35]. IL-1 ile Behçet hastalığı arasında bağlantı gösteren mevcut çalışmalarda IL-1β altbirimi hasta serumlarında yüksek saptanmış [36], ayrıca IL-1'de bulunan SNP'lerle hastalık arasında da istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur. IL-1α-889C and IL-1β+5887T polimorfizmleri Behçet hastalarında kontrol grubuna göre oldukça yüksektir. Th1 sitokinlerinden IL-12 ve IFN-γ da Behçet hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. Japonya'da ve Türkiye'de birbirinden bağımsız yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında IL-12R-IL-23RB2 bölgelerinin Behçet hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [15].

2.3.2.4. B Hücreleri ve Otoantijenlerin Rolleri

Behçet hastalığında bir çok otoantijen araştırılmasına rağmen kesin ve tutarlı sonuçlara ulaşılamamıştır. Şimdiye kadar Behçet hastalığı patogenezinde rol oynadığı iddiasıyla incelenen otoantijenler arasında anti-endotel hücre antikorları (AECE), α-enolaz, anti-saccharomyces cervisiae antikorları (ASCA) [37], anti-kardiolipin antikorlar [38], anti-heparin sülfat antikorları [39], anti-kinektin antikorları [40], anti α-tropomiyozin antikorları [41], anti-SIP1 antikorları [42], anti-anneksin-V antikorları [43], anti PTEN-indüklenmiş putative kinaz 1 antikorları (PINK1) ve anti-switch associated protein 70 antikorları bulunmaktadır [44].

2.3.2.5. NK Hücrelerinin Rolü

Behçet hastalarında NK hücrelerinin sayıca arttığı, ancak bu hücrelerin sitotoksik aktivitelerinin düşük olduğu gözlenmiştir [45]. Başka bir çalışmada da sadece $CD4^+CD56^+$ ve $CD4^+CD16^+$ T hücre alt gruplarının sayısının arttığı, NK hücrelerinin sayısının ise sağlıklı kontrollere göre aynı kaldığı gösterilmiştir [46].

2.3.3. NK Hücrelerinin Özellikleri

NK hücreleri kemik iliğinden köken alan ve doğal bağışıklıkta rol oynayan büyük granüllü hücrelerdir [47]. Önceden herhangi bir antijen ile uyarılmaya ihtiyaç duymadan germline da kodlanan NK hücreleri reseptörleri yardımıyla effektör fonksiyon gösterebilirler. NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin yaklaşık %5-15'ni oluştururlar

ve karaciğer, periton ve plasenta gibi dokularda bulunurlar. Bu hücrelerin en önemli özelliklerinden biri tümörle veya virüsle enfekte olmuş hücreleri öldürme yetenekleridir. Bunun dışında salgıladıkları sitokinlerle diğer immün sistem hücrelerini de etkilemektedirler [48].

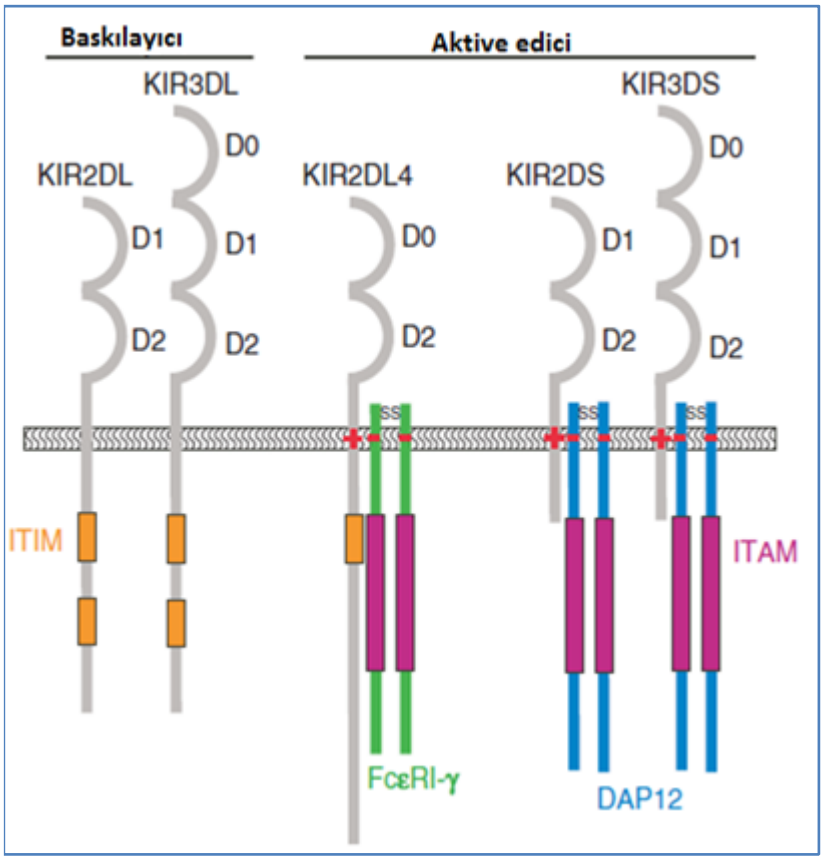
NK hücreleri, T ve B lenfosit yüzey belirteçlerini taşımazlar. Hücre yüzeylerinde taşıdıkları nöral hücre yapışma molekülü-1 (CD56) ile karakterize olup, CD56 ekspresyon yoğunluğuna göre "$CD56^{parlak}$" ve "$CD56^{soluk}$" olmak üzere iki gruba ayrılırlar [49]. Ayrıca yüzeylerinde bulunan IgG antikorlarının Fc kısımlarını bağlayan FcγRIII (CD16) yüzey belirteci ile antikora bağlı hücresel sitotoksitede rol oynarlar. NK hücrelerinin büyük çoğunluğu (≈%90) $CD56^{soluk}$ olup yüksek oranda FcγRIII ($CD16^{parlak}$) eksprese ederken diğer %10'u ise $CD56^{parlak}CD16^{soluk}$ hücrelerdir. $CD56^{parlak}$ hücreler yüksek ve orta affinitede IL-2 reseptörleri eksprese ederek hem *in vitro* hem *in vivo* çok düşük dozlarda IL-2 sitokinine yanıt vererek çoğalmaktadırlar. Bu hücreler aynı zamanda IL- 2 tarafından uyarılmış proliferasyonu artıran c-kit tirozin kinaz reseptörü de taşırlar ve aynı zamanda vasküler endotele ilk etkileşimi sağlayan adezyon molekülü L-selektin (CD62L) eksprese ederler. $CD56^{soluk}$ hücreler ise daha fazla sitotoksik aktivite gösteren NK alt grubunu oluştururlar [50].

NK hücreleri, sitotoksik etkilerini perforin ve granzim adı verilen proteinlerin salınması yolu ile gerçekleştirirler [51]. Ayrıca TNF, TNF ilişkili apoptoz uyarıcı ligand (TRAIL) ve Fas ligandı (FasL) ile hedef hücrelerin apoptoz yolu ile öldürülmesi gerçekleşmektedir. NK hücrelerinin yüzeylerinde tümör hücrelerinin tanınmasında ve öldürülmesinde etkili olan ve doğal sitotoksite reseptörleri (NCR) adı verilen bir reseptör grubu da bulunmaktadır. NKp30, NKp44 ve Nkp46 adı verilen bu reseptörlerin ligandlarının sayısı her geçen gün artmaktadır.

NK hücre fonksiyonlarında, yüzeylerinde bulunan aktivatör ve inhibitör reseptörlerle hedef hücrelerin yüzeylerinde bulunan aktivatör ve inhibitör reseptörlerin ligandları arasında bir denge sağlanmaktadır. Bu süreçte farklı sitokinler NK hücrelerini uyararak aktivasyona yol açmakta, sitokinler NK hücrelerini hem tek başlarına hem de birlikte uyarabilmektedirler. IL-12, IFN-α/β, IL-15, IL-12 ve IL-18 hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak NK aktivasyonunda rol oynamaktadır. IL-12, NK hücrelerinin salgıladığı IFN-γ'yı uyarırken, tip I interferonlar ise viral enfeksiyonlar sırasında NK hücrelerinin

sitotoksik fonksiyonlarda düzenleyici rol oynamaktadır. IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 ise NK hücre proliferasyonunda etkilidir.

NK hücrelerinin aktivasyonu yüzelerinde bulunan aktivatör ve inhibitör reseptörlerle hedef hücrelerin yüzeylerinde bulunan bu aktivatör ve inhibitör reseptörlerin ligandları arasındaki denge ile sağlanmaktadır (Şekil 2.1) [52].



Şekil 2-1: NK hücre aktive edici ve baskılayıcı reseptörler [53]

İnsan doğal öldürücü immünoglobülin benzeri reseptörler (KIR; CD158 da olarak bilinir) NK hücreleri yüzeyinde eksprese olan transmembran glikoproteinlerdir. KIR reseptörleri, NK hücrelerinin aktivasyonunda, gelişiminde ve toleransın korunmasında önemli rol oynamaktadır. İnsanda bulunan hücrelerinin büyük çoğunluğunun yüzeyinde bulunan MHC sınıf I (HLA-A, -B or -C) molekülleri KIR reseptörlerinin ligandı olarak görev yapmaktadır. NK hücrelerinin normal vücut hücrelerine karşı toleransı, bu moleküllerin NK yüzeylerinde bulunan inhibitör KIR reseptörleriyle etkileşimi ile sağlanır. KIR ailesi aktivatör ve inhibitör olarak görev yapan oldukça polimorfik olan 14 gen (2DL1-2DL5, 3DL1-3DL3, 2DS1-2DS5 ve 3DS1) tarafından kodlanır (Tablo 2.1). İsimlendirilmeleri ya hücre dışı bölgedeki C2 tip immünoglobülin benzeri bölge sayısına (2D-iki bölge için, 3D-üç bölge için) veya sitoplazmik bölgenin uzunluğuna (L

long-uzun, S short-kısa) göre olur. İnhibitör olan KIR reseptörleri uzun, aktivatör olanlar ise kısadır.

Tablo 2-1: NK hücre reseptör, ligand ve fonksiyonları [53]

KIR	Farklı isimlendirme	Ligand	Fonksiyonu
2DL1	CD158a	HLA-C2Lys80	İnhibisyon
2DS1	CD158h	HLA-C2Lys80	Aktivasyon
2DL2	CD158b1	HLA-C1Asn80, HLA-B*73, -B*46, some HLA-C2	İnhibisyon
2DL3	CD158b2	HLA-C1Asn80, HLA-B*73, -B*46	İnhibisyon
2DS2	CD158j	HLA-C1Asn80	Aktivasyon
2DL4	CD158d	HLA-G	Aktivasyon
2DL5A/B	KIR2DL5.1/KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4	Bilinmiyor	İnhibasyon
2DS3	NKAT7	Bilinmiyor	Aktivasyon
2DS4	CD158i, cl-39, KKA3, NKAT8	Çeşitli HLA-C1 ve HLA-C2 allelleri, HLA-A*11	Aktivasyon
2DS5	CD158g, nkat9	Bilinmiyor	Aktivasyon
3DL1	CD158e1, cl-2, cl-11, AMB11, NKAT3, NKB1, NKB1B	HLA-Bw4,HLA-B*13:01/02 HLA-A*23,-*24,-*32 HLA-A*25	İnhibisyon
3DS1	CD158e2, NKAT10	HLA-Bw4?	Aktivasyon
3DL2	CD158k, cl-5, NKAT4, NKAT4a, NKAT4b	HLA-A*3, -*11	İnhibisyon
3DL3	CD158z, KIR3DL7, KIR44, KIRC1	Bilinmiyor	İnhibisyon

Son çalışmalar, T hücrelerine benzer şekilde NK hücrelerinin de alt gruplara ayrıldığını *in vivo* ve *in vitro* deneylerle göstermektedir. NK hücre alt grupları, NK1 ve NK2 olarak ikiye ayrılmakta, farklı sitokin profillerine sahip ve farklı enflamatuvar özellik taşıyan efektör hücrelerdir. *In vitro* şartlarda IL-12 ile uyarım sonrasında IFN-γ ve IL-10 üreten hücreler NK1, IL-4 ile uyarım sonrasında IL-5 ve IL-13 üreten hücreler ise NK2 olarak tanımlanmaktadır [54].

2.3.4. Dentritik Hücrelerin Özellikleri

Dentritik hücreler (DH) ilk kez fare dalağından adheran mononükleer hücreler hazırlanırken keşfedilmiştir [55]. Bu hücreler monosit ve makrofaj gibi diğer adheran özelliği olan hücrelerden farklı morfolojik yapılarıyla ayrılırlar [56]. Farklı fonksiyonel yapılarının yanında DH lerin kendilerine has yüzey belirteçleri vardır ve bu belirteçleri ile DH lerin karakterizasyonu yapılabilmektedir [57]. T hücre proliferasyonunu ve mix lenfosit reaksiyonunu uyarabilen DH ler kemik iliğinden köken alan heterojen bir hücre grubudur [58]. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile edinsel bağışlık sisteminin immün cevaplarını düzenler [59]. İmmatür-olgunlaşmamış DH (iDH) ler kandan antijeni alır ve aktivasyondan sonra yüzeylerinde hem kostimülan moleküllerini hem CD83 molekülünü yüksek seviyede eksprese ederek profesyonel antijen sunucu hücrelere dönüşürler. Olgun olan antijen sunucu hücrelerin antijen yükleme kapasitelerinde azalma olurken antijen sunma ve T hücrelerini uyarabilme yetenekleri artmıştır [60]. iDH ler aktive oldukları zaman olgunlaşma süreci başlar. Bu süreçte artık iDH ler T hücresini uyarabilme yeteneği kazanmıştır ve aktive olmuş hücreler lenfatik damarlar aracılığı ile T hücrelerin zengin olduğu bölgelere göçmeye başlarlar [60]. Bu süreç edinilmiş bağışıklık sisteminin uyarılması açısından oldukça önemlidir.

2.3.5. Dentritik - NK Hücre Etkileşimleri

Naif T hücrelerini uyarabilme yeteneklerinin yanında DH'lerin otolog NK hücreleriyle etkileşebilme yetenekleri de vardır. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin iki kolunun fonksiyonel etkileşimi, doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile edinilmiş bağışıklık sistem kordinasyonunun en önemli yapıtaşıdır [61].

DH'lerin aktivasyonu sonucu, IL-12 ve IL-15 gibi sitokinlerin salınımındaki artış NK hücre aktivasyonu ve sitotok aktivitenin artmasına neden olur.

İmmün cevap yanıtlarında NK ve DH etkileşimi üzerine yapılan araştırmalar artmaktadır. Bu etkileşim çift taraflıdır ve Th1 gelişmesine ve sitotoksik cevabın

gelişmesiyle sonuçlanmaktadır. İnsanlarda bu iki hücrenin etkileşimi *in vitro* koşullarda olgunlaşmayan DH'lerin litik olarak yok edilmesi, olgun olanların korunmasıyla sonuçlanan bir süreçtir [62]. Benzer şekilde transplantasyonda alloreaktif NK hücreleri T hücre odaklı graft versus host hastalığını konağın DH'lerini öldürerek gerçekleştirmektedir [63]. Aynı zamanda aktive olan NK hücreleri salgıladıkları IFN-γ ve TNF-α ve/veya direk hücre teması ile DH olgunlaşmasını uyarırlar [64].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışmamızda hasta grubu olarak İstanbul Tıp Fakültesi, İç hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalında izlenmekte olan ve uluslararası Behçet hastalığı sınıflandırma kriterlerine uygun hastalar (n=12, yaş ortalaması 41.083 ± 10.59) seçilmiştir. Kontrol grubu olarak Behçet hastalığı ile ilgili herhangi bir bulgusu olmayan gönüllüler (n=3, yaş ortalaması 42,62 ± 8.02) çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmanın etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesinden alınmıştır (Dosya no: 2013/1084).

3.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

Tablo 3-1: Hücre ayırımı ve kültür için kullanılan malzemeler

PBS	Biochrom, Berlin Almanya
RPMI-1640	Biochrom, Berlin Almanya
Fetal Sığır Serumu	Biochrom, Berlin Almanya
Ficoll- Hypeque	Biochrom, Berlin Almanya
L-Glutamin	Biochrom, Berlin Almanya
Penisilin–Streptomisin	Biochrom, Berlin Almanya
PHA	Sigma, St Louis USA

3.3. Hazır Kitler

Tablo 3-2: Kullanılan ticari kitler

Dentritik Hücre Farklılaşma Kiti	Miltenyl Biotec, Bergish Gladbach GERMANY
Fiksasyon permeabilizasyon Kiti	An Der Grub Bio research, GMBH AUSTRIA

3.4. Antikorlar

Tablo 3-3: Kullanılan antikorlar

Mouse anti human CD56-FITC	Becton Dickinson, San Jose CA USA
CD56/16-PE, CD3-FITC	
Mouse anti human CD158e (KIR3DL1)-Percp	
Mouse anti human IFN-gamma-Percp-Cy5.5	
Rat anti human IL-10-APC	
Mouse anti human CD337 (NKp 30)-Alexa Flour 647	
CD14-Percp	Miltenyl Biotec, Bergish Gladbach Germany
Mouse anti human CD14-PE	

3.5. Rekombinant Sitokinler ve Farklılaşma Faktörleri

Tablo 3-4: Kültürde uyarı için kullanılan malzemeler

Rekombinant human Interlökin-2	AbD Serotec, Oxford UK
Rekombinant human Interlökin-12	
Rekombinant human GM-CSF	
Rekombinant human Interlökin-4	
LPS *E. coli*	Sigma, St Louis USA

3.6. Kullanılan Yöntemler

3.6.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Periferik Kan Mononükleer Hücreler (PKMH) steril koşullarda heparinize kandan Ficoll yoğunluk gradiyent santrifüj yöntemi ile izole edilmiştir. Bu amaçla her bireyden alınan heparinize kan örnekleri, 1:1 oranında PBS ile dilüe edilip, 50 ml lik falkon tüp içerisinde fikol üzerine 1:2 oranında pastör pipet ile yayılmıştır. Bu örnekler 1900 rpm

de 25 dakika santrifüj edildikten sonra PKMH lar steril bir pastör pipet ile toplanarak 15 ml lilk steril falkon tüpe alınmış ve steril PBS eklenerek 1800 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkama işleminin ardından hücreler sayım aşamasına kadar $+4^0$C'de RPMI-1640 medyumu içinde bekletilmiştir.

3.6.2. Hücre Sayımı

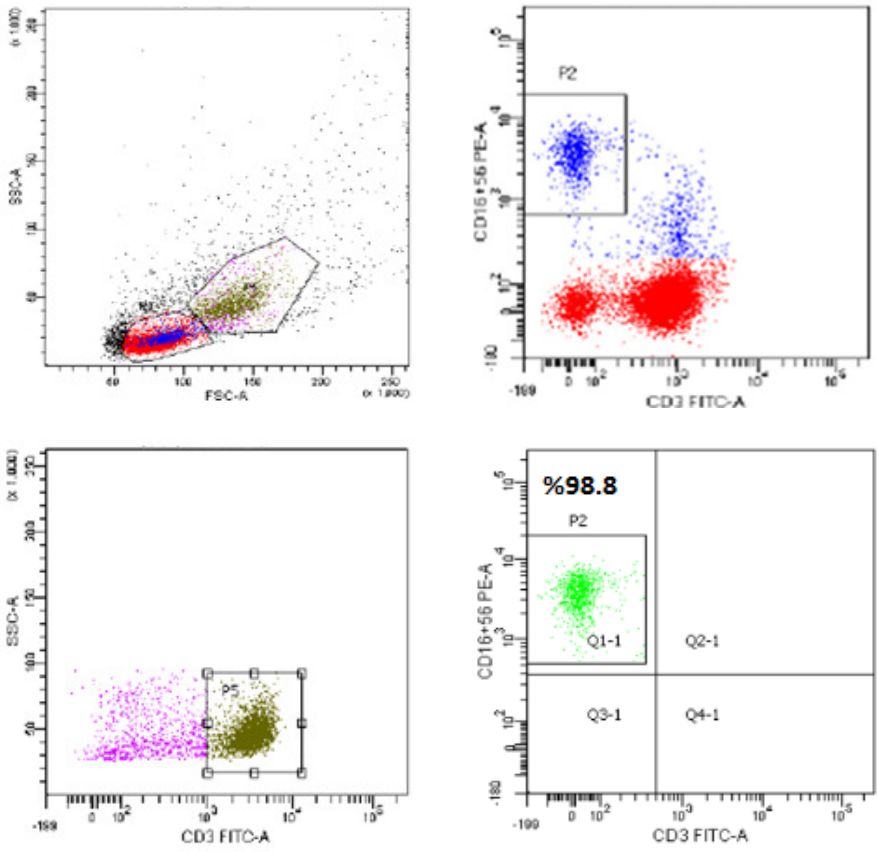
PKMH'ler 2 ml PBS de süspanse edildikten sonra Via-cell hücre sayma küvetinde 900µl PBS üzerine 100µl hücre süpansiyonu eklenmiştir. Hücreler Via-cell hücre sayma cihazında sayılmış ve canlılık oranları ortalama olarak %95'in üzerinde tespit edilmiştir.

3.6.3. NK Hücre ve Monosit izolasyonu

PMKH'lerin (30 - 40 × 10^6 hücre) anti-CD56CD16PE/CD3FITC ve anti-CD14PerCP işaretli antikorlarla oda ısında inkübasyonu takiben (10µl antikor/10×10^6 hücre), hücre süspansiyonu (2 ml medyum içinde) FACSAria II akan hücre ölçer (BD Bioscience) cihazı kullanılarak taşıdıkları yüzey belirteçlerine göre NK hücre ve Monosit hücre grupları olarak saflaştırılmıştır. Şekil 2'de FACSAria II ile NK hücrelerinin saflaştırılması esnasında kullanılan histogram görüntüleri ve izolasyon sonrası NK hücre saflığı gösterilmiştir. İzolasyon sonrası monositler ve NK hücrelerinin saflık oranları %98'in üzerinde tespit edilmiştir.

Akan hücre ölçer cihazında hücre ayırımı yapılmadan önce elde edilen PKMH'ler PBS ile 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek yıkanmış ve 1x10^6 hücreye 3µl anti-CD56CD16PE/CD3FITC ve 3µl anti-CD14PerCP işaretli antikorlar ile boyanarak oda ısında karanlıkta 20 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 2 ml PBS ile 2000 rpm'de 5 dk. yıkanan hücrelerin üzerine 1 ml RPMI eklenerek FACSAria II akan hücre ölçer cihazında değerlendirmeye hazır hale getirilmiştir. FACSAria II akan hücre ölçer cihazında sıvı basıncının etkisi ile lazer ışığının önünden tek tek geçen hücreler yüzeylerinde bulunan florasan işaretlerin aktive olması ile her florasan işaret belli dalga boyunda olmak üzere bir ışıma yaymaktadır. Fiber optik kablolar vasıtası ile bu ışımaları toplayan sistem, ışımaları dedektörlere iletir. Belli dalga boyu aralığındaki ışınları değerlendirme özelliği olan dedektörler sayesinde her boyanın yaydığı ışın kayba uğramadan kendine özgü dedektör tarafından değerlendirilerek sistemin kullandığı yazılım sayesinde (DİVA 6.1.2) görüntü olarak yansıtılır. İlk olarak FSC/SSC parametresinde değerlendirilen hücreler büyüklük ve granülürite farkına göre ayrılarak hücre popülasyonları belirlenir. FCS/SSC parametresinde lenfosit ve monosit

hücre popülasyonlarının etrafı işaretlenerek (kapı içine alınarak) bu hücre populasyonları belirlenir. Kapı içine alınan lenfosit ve monosit popülasyonları, anti-CD56CD16PE/CD3FITC ve SSC/CD14PerCP dot plotlarında değerlendirilmesini takiben $CD56^{+}CD16^{+}$ NK ve $CD14^{+}$ monosit hücre popülasyonu tekrar kapı içine alınarak hem hücre popülasyonlarının oranları saptanmış hem de hücre saflığının artması sağlanmıştır. Kapı içine alınan hücre popülasyonları cihaza tanıtılarak ayrım işlemine geçilmiştir. Cihaz ayırmak istediğimiz hücreleri vibrasyon işlemini takiben damlacık içine alarak pozitif veya negatif yük ile yüklemektedir. Yüklü damlacıklar elektriksel alan oluşturan saptırma plaklarından geçerek belirlenen tüplere NK ve monosit hücre grupları olarak ayrılmıştır. Ayırma işlemi sonrası saflaştırılan hücre gruplarının saflığı akan hücre ölçer cihazında yüzey belirteçleri aracılığı ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3-1: FACSAria II cihazı ile NK hücre izolasyonu sonucu saf NK hücre populasyonu

3.6.4. Monosit Dentritik Hücre Farklılaşması

Monositler ($0.5x10^{6}$/ml) %10 FBS, %1 antibiyotik, %1 L-glutamin, %1 non-esansiyel amino asit içeren 2 ml RPMI-1640 çözeltisi içinde 6 kuyucuklu petri

içerisinde kültüre alınmıştır. Monositlerin 20 ng/ml GM-CSF (AbD Serotec) ve 25 ng/ml IL-4 (AbD Serotec) ile 48 saatlik kültür aşamasını takiben kültür medyumlarının yarısı ortamdan uzaklaştırılarak tekrar aynı konsantrasyonda GM-CSF ve IL-4 eklenmiştir. Beşinci günün sonunda kuyucuklara hücre farklılaşmasını uyaracak *E. coli* orjinli LPS (100 ng/ml) eklenerek 12 saat inkube edilmiş ve 12 saatin sonunda hücreler petri plağından pipetajla kaldırılmıştır. Dentritik hücre farklılaşma kiti (Dentritic cell differentation inspector, Miltenyi Biotek) kullanılarak kültürdeki monositlerin dendritik hücreye dönüşüm oranları araştırılmıştır. Farklılaşma öncesi CD14 monosit yüzey belirteci pozitif, CD83 ve CD209 yüzey belirteçleri ise negatifdir. Monositlerin denritik hücreye farklılaşmasını takiben, CD14 pozitifliği kaybolmakta diğer belirteçler CD83 ve CD209 pozitifliği ise artmaktadır.

3.6.5. NK - Dendritik Hücre Kültürü

NK hücreleri ve monositler iki farklı şekilde külltüre alınmıştır. İlk deneyde, NK hücrelerinin dendritik hücrelerle etkileşimi sonucu NK hücre yüzey belirteçleri ile NK hücre içi sitokin oranları ölçülmüş, ikinci deneyde ise, NK hücrelerinin monositlerle etkileşiminin, NK hücrelerinin dendritik hücreye farklılaşma hızına olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, birinci deney kurulumunda 6 kuyucuklu plaklar kullanılmış, %10 FBS, %1 antibiyotik, %1 L-glutamin, %1 non-esansiyel amino asit içeren RPMI 1640 çözeltisi içerisinde $1x10^5$ NK hücresi yalnız olarak ve ayrıca 2×10^5 monosit ile beraber kültüre edilmiştir. NK hücrelerini uyarmak amacıyla hrIL-2 (500 u/ml), hrIL-12 (40 ng/ml) ve PHA (5 µg/ml) kültür sıvısına eklenmiştir. İkinci deney kurulumunda ise, 6 kuyucuklu plaklarda kuyu başı 2×10^5 monosit hücresi yalnız olarak ve ayrıca 1×10^5 NK hücresi ile birlikte kültüre alınmıştır. Monositlerin dendritik hücreye farklılaşması için monosit içeren kuyucuklara hrIL-4 (25 ng/ml, AbD Serotec), GM-CSF (20 ng/ml, AbD Serotec) ve LPS (100 ng/ml, Sigma) eklenmiştir.

3.6.6. Akan Hücre Ölçer ile NK Yüzey Belirteçlerinin Analizi

Hücre kültürünün ardından, toplanıp santrifuj edilen hücrelerin üst sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra 10^5 hücre üzerine 4µl anti-human-KIR3DL1-PerCp, 10µL anti-human-CD56-FITC, anti-Nkp30-APC işaretli monoklonal antikorlar eklenerek vortekslenmiş ve ardından 20 dakika karanlıkta, oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben üzerlerine 2 ml PBS eklenen tüpler 1800 devirde 5 dakika santrifuj

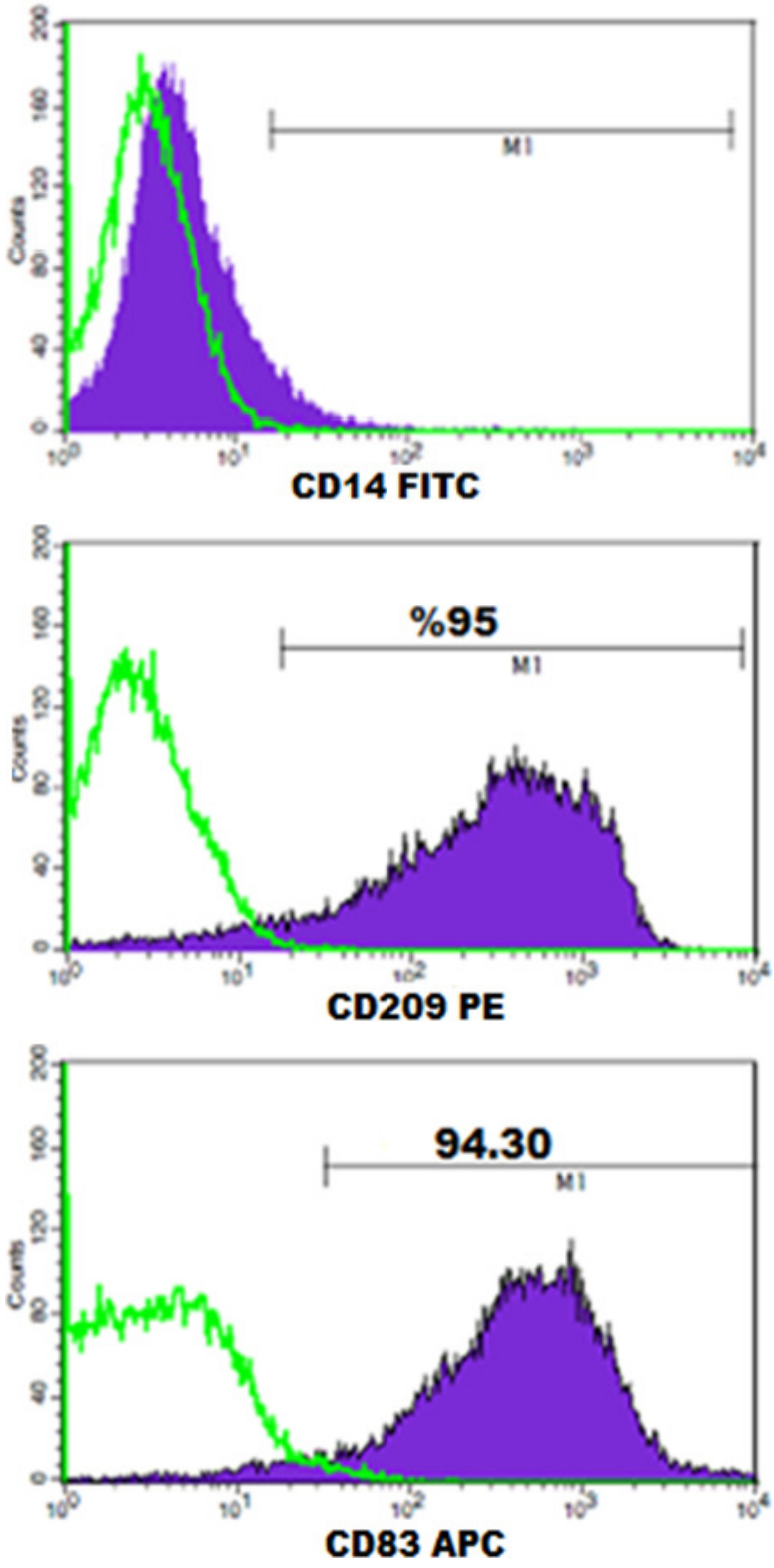
edilmiş üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 300µl FACS flow sheat sıvısı eklenerek tüpler akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir.

3.6.7. Akan Hücre Ölçer ile NK Hücre İçi Sitokin Tayini

Çalışmamızda, hücre içi IFN-γ ve IL-10 sitokin miktarlarını belirlemek için Fiksasyon&Permiabilizasyon kiti (Adg An Der Grub Bio Resarch Gmbh, Austria) kullanılmıştır. Tüplere NK hücreleri pipetlenmiş ve 100µl fiksayon medyumu eklenip sonrasında vortekslenerek oda ısında karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiştir. Fiksasyon işleminin ardından tüplere 5 ml PBS eklenerek 1500 rpm de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 100µl permiabilizasyon sıvısı ve 5µl PerCP işaretli anti-IFN-γ ve APC işaretli anti-IL-10 monoklonal antikorları eklenerek vortkslendikten sonra oda ısında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben tüplere 5 ml PBS eklenerek 1500 rpm de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Tüplerdeki üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 300µl FACS flow sheat sıvısı eklenerek tüpler akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir.

3.6.8. Dentritik Hücre Farklılaşma Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Monosit kültürlerinin 6. günü sonunda hücreler pipetaj yoluyla kaldırılmış ve PBS ile 1500 rpm de 10 dakika yıkanmıştır. Hücrelerin dentritik hücreye farklılaşmaları Dentritic cell differentation inspector (Miltenyl Biotek) kiti ile değerlendirilmiştir. Bu kitte olgun dentritik hücre farklılaşma belirteçleri anti human-CD14 (FITC) anti human-CD83 (APC) ve anti human-CD209 (PE) (DC SIGN) antikorları kullanılmış ve hücreler FACSCalibur cihazında değerlendirilmiştir. Farklılaşma başlamadan önce monositlerde CD14 yüzey belirteci pozitif, CD83 ve CD209 yüzey belirteçleri ise negatiftir. Dendritik hücreye farklılaşma sonrası CD14 pozitifliği kaybolurken dendritik hücre belirteçleri olan CD83 ve CD209 ekspresyonları pozitif saptanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3-2: Monosit kökenli Dendritik hücre farklılaşması

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Analizler GraphPad Prism 5 programı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde Mann-Whitney U non-parametrik test kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi ($p<0.05$) olarak kabul edildi.

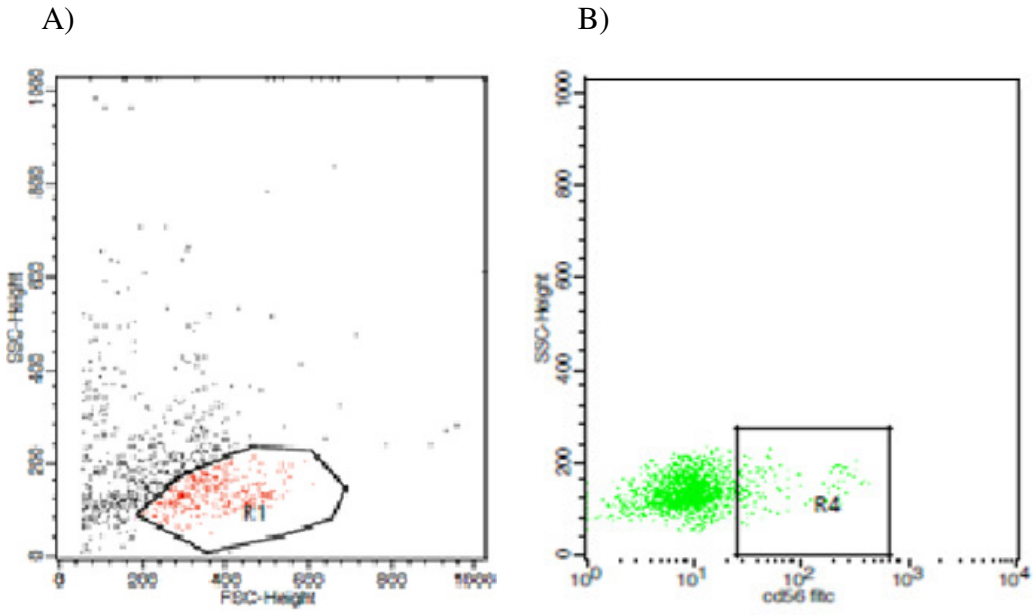
4. BULGULAR

4.1. NK Hücre Yüzey Reseptör Ekspresyonu

Behçet hastaları ve otoimmün hastalık öyküsü olmayan sağlıklı bireylerde NKp30 ve KIR3DL1 yüzey reseptör ekspresyonu 5 günlük kültür sonrasında değerlendirilmiştir. Şekil 4.1 de NK hücre kültüründen sonra CD56 pozitif NK hücrelerinin kapılanması görülmektedir. NK hücreleri parlak ve soluk olarak ayrı ayrı değerlendirilmemiş bütün hücreler tek bir kapı alınarak analizleri yapılmıştır.

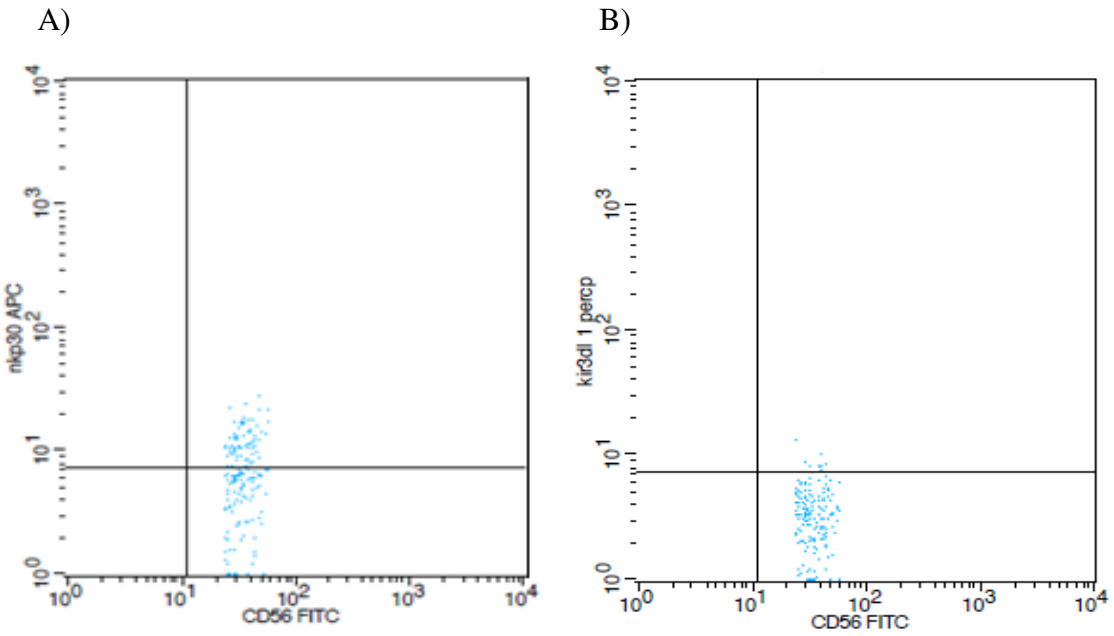
Yalnız NK hücresi ve monositlerle beraber kültüre edilen hücrelerin Behçet hastalarında ve sağlıklı kontrollerde değerlerdirilmesi sonucu elde edilen akan hücre ölçer görüntülerinden birer örnek Şekil 4.2 A, B ve Şekil 4.3 A, B de verilmiştir.

NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde, NK hücrelerinin monositlerle beraber kültürü sonucu elde edilen değerler yalnız başına kültüre edilen NK hücreleri değerlerinden yüksek olmasına karşılık, sağlıklı bireyler ve Behçet hastaları arasında NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.1508, p=1.000, sırasıyla).



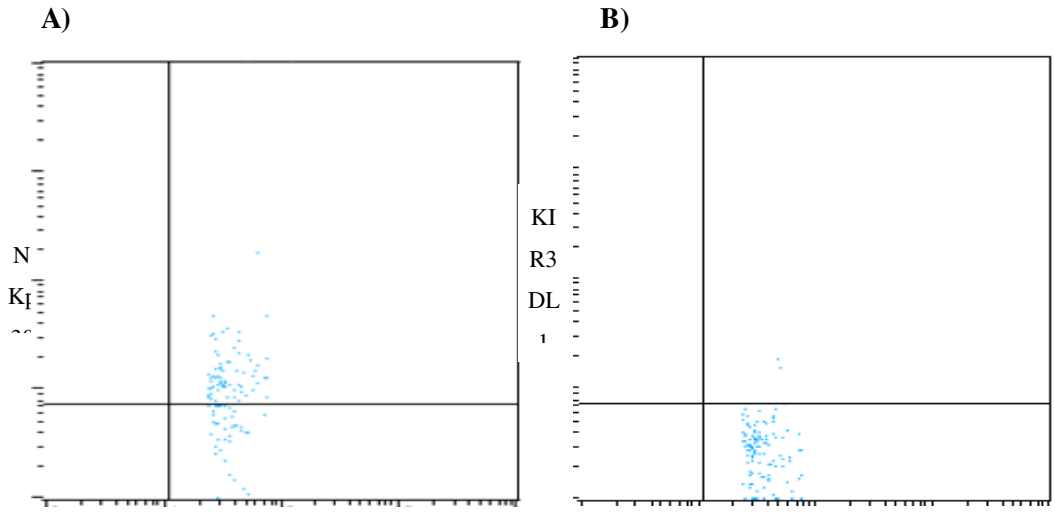
Şekil 4-1: Kültür sonrası (5. gün) FS/SS histogramında (A) lenfosit (R1) kapısı içinde CD56 pozitif NK hücreleri (B)

Kültür plaklarında yalnız NK hücrelerinin kültürü sonucunda CD56 pozitif NK hücreleri kapılandıktan sonra NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonuna örnek görüntü Şekil 4.2 de görülmektedir.



Şekil 4-2: CD56^{+} NK hücrelerinde NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonu

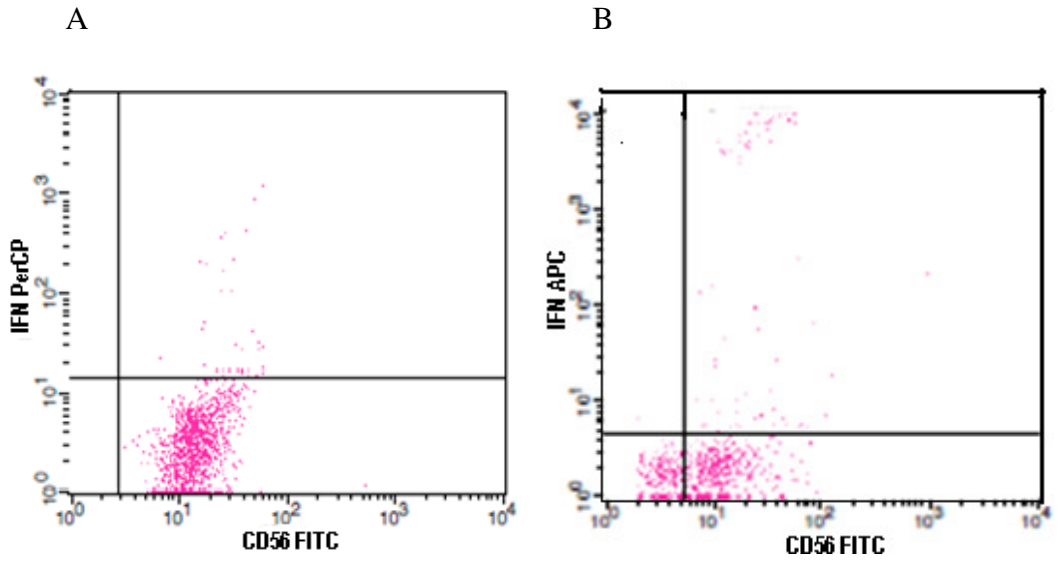
NK hücreleri ve mDH'e farklılaşması için IL-4 ve GM-CSF uyarılan monositlerle ortak kültürleri sonucunda NK yüzey molekülleri olan NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonunu gösteren örnek histogram Şekil 4.3 de verilmiştir**.**



Şekil 4-3: NK ve DH kültürü sonrası NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonu

4.2. NK Hücre İçi Sitokin Değerleri

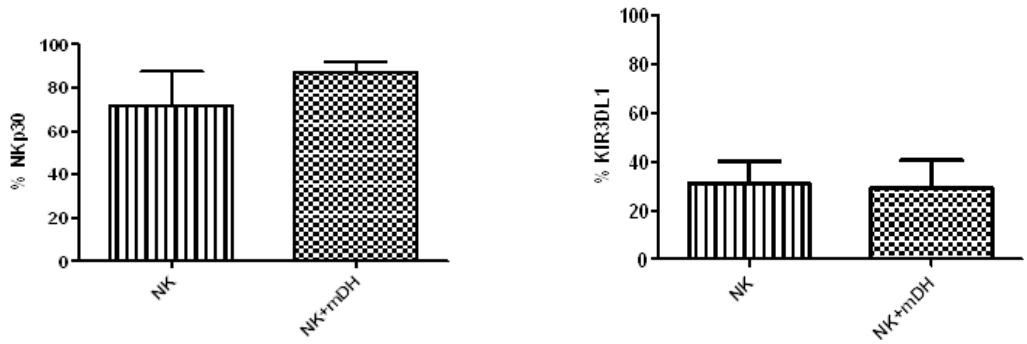
Kültür plaklarında yalnız NK hücrelerinin veya mDH lerle ortak kültürleri sonucunda elde edilen hücre içi IFN-γ ve IL-10 örnek görüntüsü Şekil 4-4 de verilmiştir.



Şekil 4-4: NK hücresi (A) ve NK + DH (B) kültürü sonrası IFN-γ ekspresyonu

4.3. Behçet NK Hücrelerinin Yalnız ve mDH'lerle Birlikte Kültürü Sonrası Yüzey Molekül Ekspresyonları

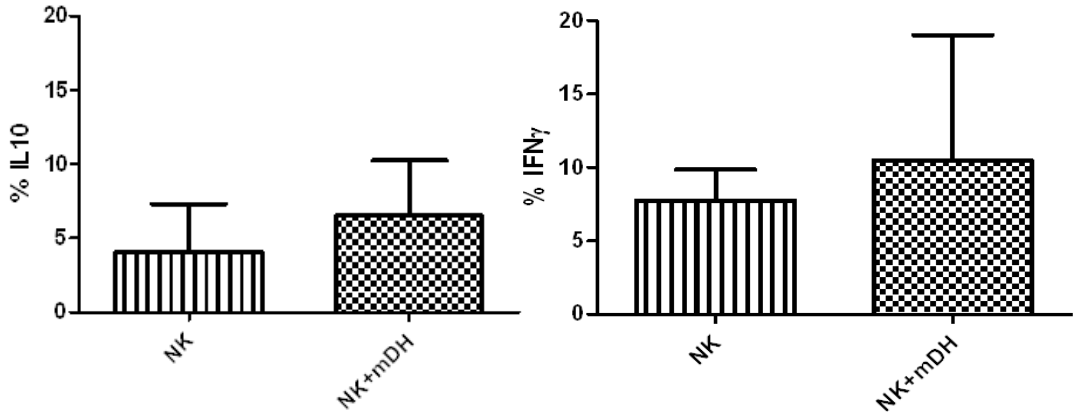
Behçet hastalarından izole edilen NK hücreleri yalnız ve mDH lerle beraber kültüre alınmıştır. Beş günlük kültür sonunda NK hücre yüzeyinde NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonları açısından incelediğinde yalnız NK hücrelerinin kültüre edildiği grupla NK hücrelerinin mDH lerle kültüre edildiği grup arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır (p= 0.1719, 0.5737, sırasıyla) (Şekil 4.5).



Şekil 4-5: Behçet hasta NK hücreleri ve NK + mDH kültürleri sonucunda NKp30 ve KIR3DL ekspresyonları

4.4. Behçet NK Hücre ve NK + mDH Kültürü Sonrası Hücre İçi Sitokin Değerleri

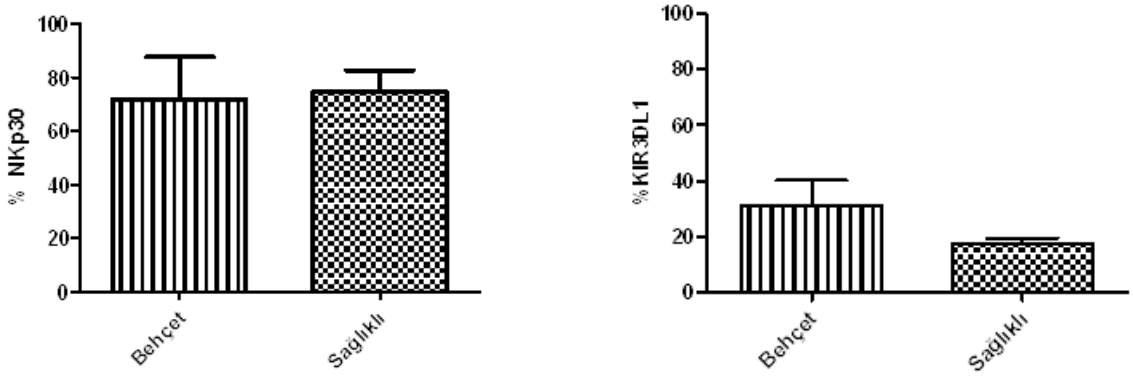
Behçet hasta kan örneklerinden izole edilen NK hücreleri yalnız ve mDH lerle birlikte paralel kültüre alınmıştır. Külturün 5. gününde, NK hücre sitokinlerinden IL-10 ve IFN-γ hücre içi sitokin düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır (p=0.8413, 03939, sırasıyla) (Şekil 4.6).



Şekil 4-6: Behçet NK hücrelerinin yalnız ve mDH lerle kültürü sonrası IL-10, IFN-γ hücre içi sitokin seviyeleri

4.5. Behçet Hastaları ve Sağlıklı Bireylerin NK Hücre Kültürleri Sonucu Yüzey Ekspresyon Değerleri

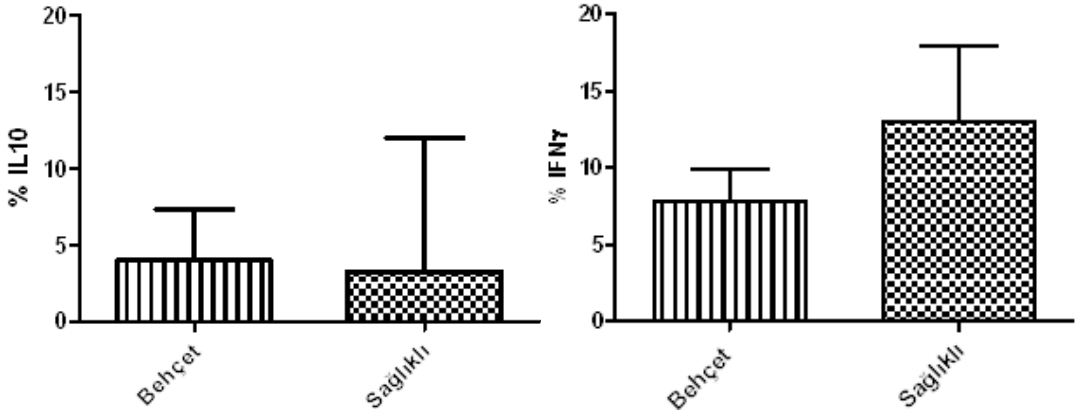
Behçet ve sağlıklı periferik kan örneklerinden izole edilen NK hücreleri 5 gün kültürü takiben aktivatör ve inhibitör reseptörleri açısından değerlendirildiğinde hasta ve sağlıklı grupları arasında istatsitiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=1.000, 0.6303, sırasıyla) (Şekil 4.7).



Şekil 4-7: NK hücrelerinde NKp30 ve KIR3DL1 Ekspresyonu

4.6. Behçet Hastaları ve Sağlıklı Kontrol NK Hücre İçi Sitokin Profillerinin Karşılaştırılması

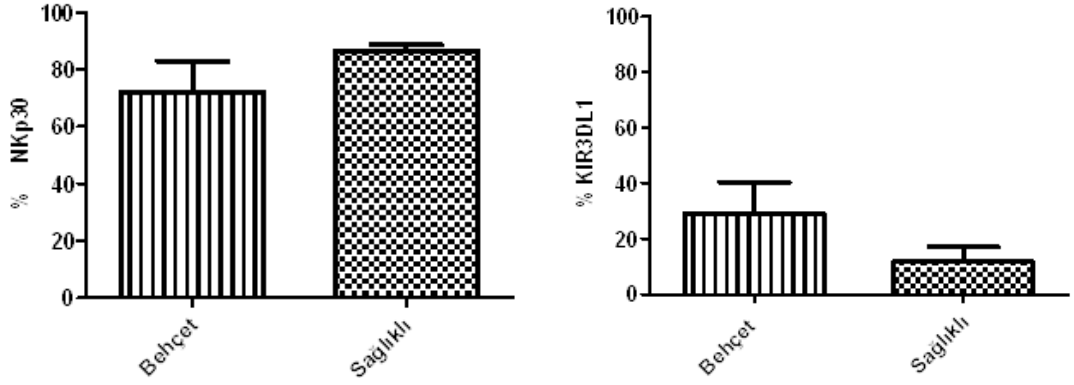
Behçet hastalarından ve sağlıklı kontrollerden elde edilen NK hücreleri 5 gün kültüre edilmiş, kültür sonrası NK hücre içi IL-10 ve IFN-γ seviyeleri ölçülmüştür. Gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.6528, 0.2619, sırasıyla) (Şekil 4.8).



Şekil 4-8: NK Hücre içi IL-10 ve IFN-γ seviyeleri

4.7. Behçet Hastaları ve Sağlıklı Kontroll NK + mDH Kültürleri Sonucu Yüzey Belirteç Ekspresyonları

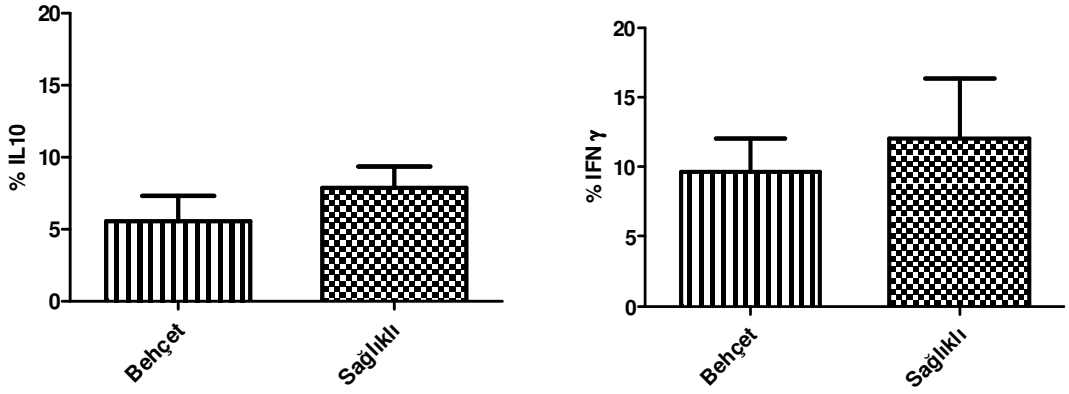
Behçet hastalarında ve sağlıklı kontrol gruplarında NK hücreleri mDH lerle beraber kültüre alınmıştır. Kültür sonrası NK hücre yüze NKp30 ve KIR3DL1 ekspresyonları incelediğinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır (p= 0.7758, 0.7758, sırasıyla) (Şekil 4.9).



Şekil 4-9: Behçet Hastası ve Sağlıklı Kontrol Grubu NK + mDH Kültürleri Sonucu NKp30 ve KIR3DL1 değerleri

4.8. Behçet Hastaları ve Sağlıklı Kontrol NK Hücrelerinin mDH lerle Beraber Kültürleri Sonucu Hücreiçi Sitokin Profilleri

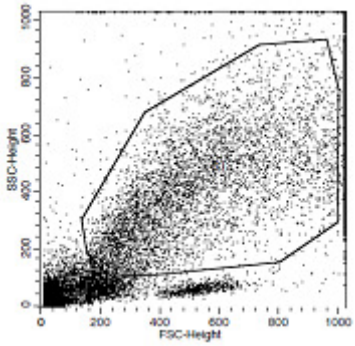
Behçet hastalarından ve sağlıklı kontrollerden elde edilen mDH lerle beraber 5 günlük kültüre alınan NK hücrelerinin hücre içi sitokin profilleri Behçet hastalarında ve sağlıklı kontrol gruplarında saptanmış, istatistiksel karşılaştırmalarda hastalık grubu ve sağlıklı grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p= 0.5714, 0.7143, sırasıyla).



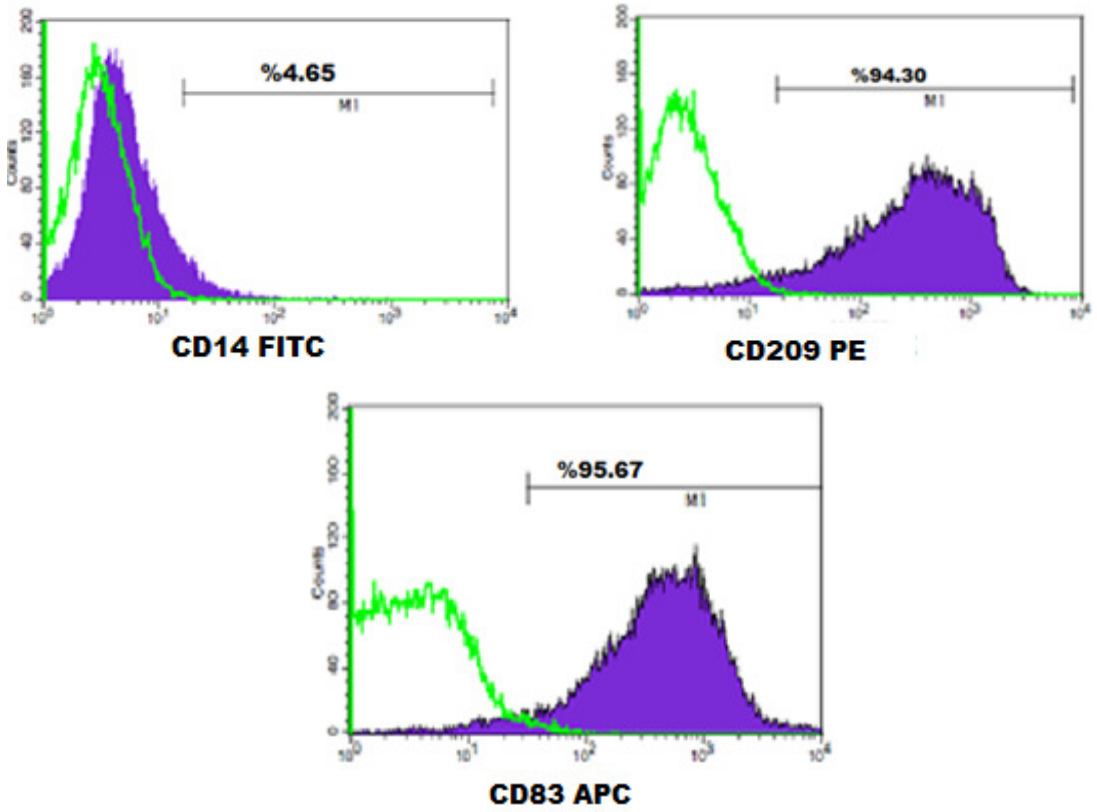
Şekil 4-10: NK +mDH kültürü sonrası hücre içi IL-10 ve IFNγ seviyeleri

4.9. Monositlerin Dentritik Hücreye Farklılaşması

Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol bireylerin kanlarından izole edilen monositler IL-4 ve GM-CSF varlığında dentritik hücre farklılaşması için kültüre alınmıştır. Farklılaşma öncesi yapılan ölçümlerde monositlerde CD14 yüzey belirteci pozitif, CD83 ve CD209 yüzey belirteçleri negatif saptanmıştır. Monositlerin denritik hücreye farklılaşması sonrası sağlıklı kontrol örneğinde kültür sonrası hücrelerin kapılaması Şekil 4-11 de görülmektedir. CD14 pozitifliği kaybolurken, CD83 ve CD209 ekspresyonu gözlenmektedir. Monositlerin, mDH olarak bilinen hücrelere dönüşüm paterni Şekil 4-12 de gösterilmiştir.



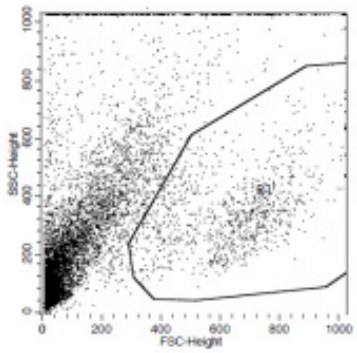
Şekil 4-11: Sağlıklı kontrol monosit kökenli dendritik hücre kapılaması



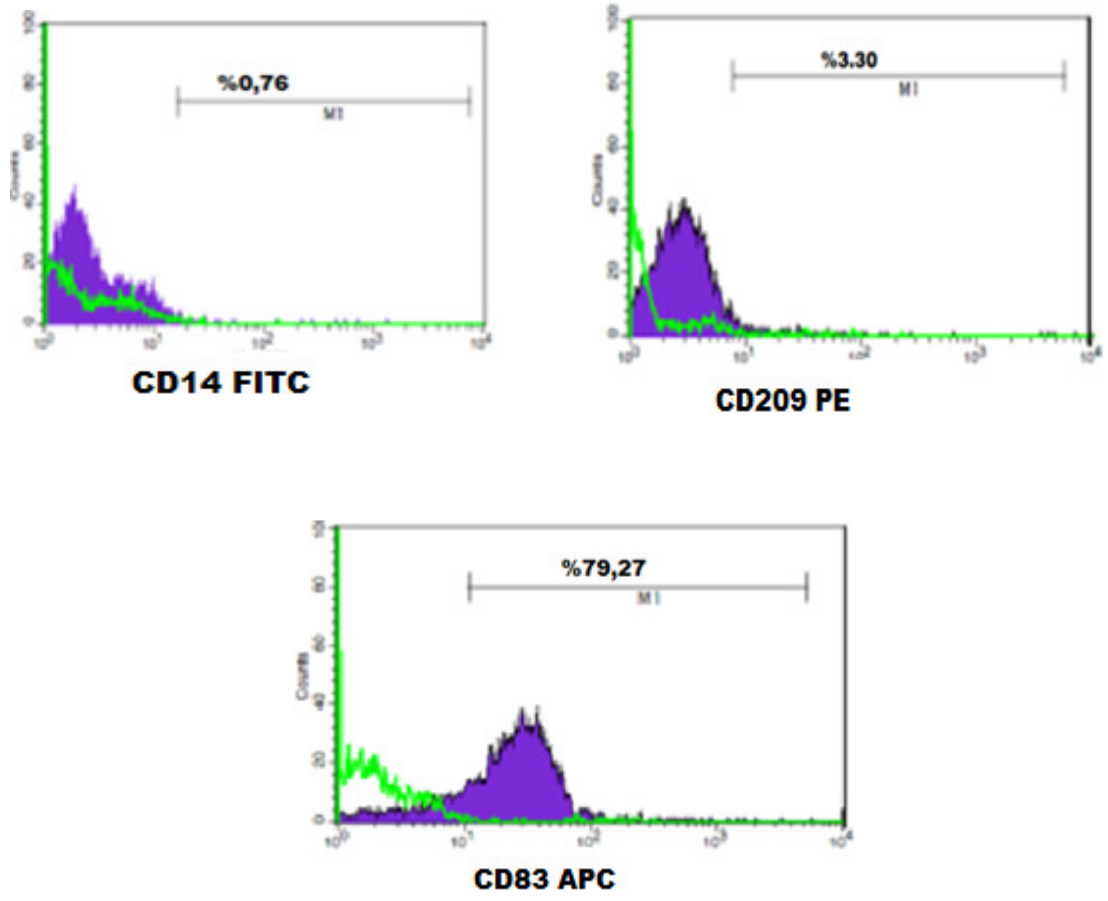
Şekil 4-12: Sağlıklı bireylerde mDH farklılaşması sürecinde CD14, CD83, CD209 ekspresyonları

Behçet hasta kanlarından elde edilen monositlerin dentritik hücrelere dönüşüm sırasında yine benzer bir ekspresyon paterni gözlenmiştir, ancak CD209 yüzey belirteci istatistiksel olarak Behçet ve sağlıklı grupları arasında anlamlı fark göstermemekle birlikte bazı hastalarda düşük CD209 ekspresyonu gözlenmiştir. Behçet hastalarında örnek mDH kapılaması Şekil 4-13 ve CD14, CD83, CD209 yüzey belirteci ekpresyon

paterni ise Şekil 4-14 de verilmiştir. Şekil 4-14 B de düşük CD209 ekpresyonu görülen bir hastanın örnek histogramı verilmiştir.

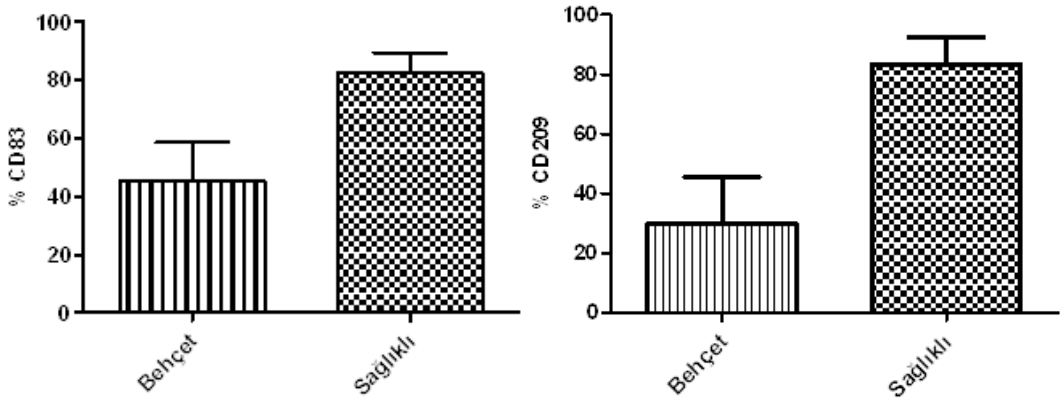


Şekil 4-13 : Behçet hastalarında monosit kökenli dentritik hücrelerin kapılanması



Şekil 4-14 : Behçet hastaların monositt kökenli dentritik hücre farklılaşmasında yüzey belirteçlerinin (CD14, CD209, CD83) ekspresyonları

mDH olgunlaşma belirteci olan CD209 (DC SIGN) ve CD83 ekspresyonunda Behçet hastalığı ve sağlıklı gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (p=0.0571, 0.2286, sırasıyla) (Şekil 4-15).



Şekil 4-15 : Behçet hasta ve sağlıklı control gruplarında monosit kökenli dendritic hücre farklılaşma yüzey belirteçlerinin (CD83, CD209) karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Behçet hastalığının patogenezini açıklamaya yönelik çok sayıdaki immünolojik ve genetik çalışmaların olmasına rağmen hastalığın patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır [15, 65]. HLA-B51 ile Behçet Hastalığı arasındaki ilişki hastalığın patogenezinde genetik faktörlerin yer aldığına dair en güçlü veridir. T hücrelerinin, nötrofillerin, NK ve NKT hücrelerinin hastalığın patogenizinde rol oynadıkları çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur [28, 32, 66]. NK hücreleri doğal immün sistemin bir hücresi olmakla birlikte salgıladıkları sitokinler ve hücresel etkileşimler ile edinsel immün cevabı da etkileyen hücrelerdir. Bu etkileri ile otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynayabilecekleri iddia edilmektedir. Romotoid artrit (RA), tip 1 diyabet, sistemik lupus eratamotus (SLE), multiple sikleroz (MS) gibi hastalıklarda NK hücre sayılarında azalma ve fonksiyonel bozukluk gösterilmiştir [67, 68]. Son çalışmalarda otoimmün tiroid hastalığı ve psiorosiz ile NK hücre eksikliği arasında ilişki gösterilmiştir [69]. NK hücre sayısıdaki azalmanın hastalığın bir yan etkisi olabileceği düşünülmekle birlikte, son çalışmalar hastalığın başında teşhis esnasında ve remsiyondaki hastalarda NK hücre sayılarındaki azalmanın veya fonksiyonel defektlerin kronik enflamasyonun bir sonucu olmadığını ortaya çıkartmıştır [70, 71]. MS ve SLE da NK hücre aktiviteleri ve sayılarının hastalık gelişimi ve remisyon durumuyla korelasyonu yapıldığında elde edilen bulgular NK hücrelerinin bu hastalıkların patogenezinde immünmodülatör etkili olduğunu desteklemektedir.

NK hücrelerin yüzeyinde bulunan KIR reseptörlerinin ekspresyon değişimlerini psiorsiz, tip 1 diyabet ve Behçet hastalığıyla ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur [72], [73]. Takeno ve arkadaşları çalışmalarında şiddetli göz bulguları olan hastalarda KIR ekspresyonda anormallik göstermişlerlerdir [71]. S. Direskeneli ve arkadaşları NK yüzeyinde eksprese olan KIRC-tip lektin reseptörleri üzerine yaptıkları çalışmalarında, CD94 ekspresyonun Behçet hastalarında sağlıklı kontrollere göre artmış olduğunu bildirmişlerdir [74, 75]. Bu bulgular ışığında Behçet hastalığında NK hücrelerinin patojenik veya düzenleyici görevlerinin olabileceğini ve CD94 ekspresyonunun fonksiyonel çalışmalar ile incelenmesi gerektiğini iddia etmişlerdir [74]. Otoimmün hayvan modellerinde de NK hücrelerinin immunmodülatör etkileri olduğu gösterilmiştir [75]. Deneysel otoimmün ensefalit (Experimental Aoutuimmune Encephalomyelitis -

EAE) de NK hücreleri deplete edildiğinde hayvanlarda çok daha şiddetli bir hastalık patogenizi ortaya çıkmıştır [53].

İmmün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynayan Th1/Th2 oranının Th1 yönünde bozulmasının ve sitokin salınımlarındaki bozukluklarında immünpatolojik sonuçlara yol açarak otoimmün hastalık patogenezinde rol oynayabileceği birçok çalışmada iddia edilmektedir [76, 77]. Aktif Behçet hastalarında T lenfositlerle yapılan hücre içi sitokin ölçümlerinde Th1 odaklı güçlü bir immün yanıtın varlığını tesbit eden Frassanito ve arkadaşları IL-12 nin Behçet hastalığı patogenezinde önemli bir rolü olduğunu iddia etmişlerdir [76]. Hastalığın aktif döneminde CD4 ve CD8 T hücrelerinin artış gösterdiği fakat bağışıklık sistemini baskılayıcı tedaviden sonra bu hücrelerin azalarak semptomların azaldığını destekleyen araştırmalar mevcuttur [78]. Bu araştırmalar Behçet hastalığı patogenezinde tip1 sitokin üreten hücrelerin rolü olduğunu düşündürmektedir. Patojenlerin vücuda girmesiyle NK hücreleri ile DH'lerin karşılıklı etkileşimleri hem doğal immün cevapta hem de edinsel immün cevapta önemli rol oynamaktadır. İki hücre grubunun karşılaştıkları ilk yer periferik iltihaplı dokudur. Burada yüzey reseptörleri patojen ilişkili moleküler ürünleri tanıdıktan sonra hücreyi aktive ederler ve doğal bağışıklık hücreleri effektör fonksiyonu ile patojeni engellemeye ve yok etmeye çalışırlar. NK hücreleri ile DH'ler T hücre uyarımının başlatılmasına katkıda bulundukları ikincil lenfoid organlarda etkileşimlerine devam ederler. İmmün cevabı şekillendirmedeki önemli rolleri yüzünden NK hücreleri ile DH ler arasında geçen etkileşim son yıllarda bir çok çalışmada araştırma konusu olmuştur. *Mycobacterium tuberculosis*, IFN-γ ve LPS gibi olgunlaşmalarını sağlayan uyarıcılarla karşılaşan DH'lerle etkileşmeleri sonucu NK hücrelerinin sitolitik aktivitelerinde ciddi bir şekilde artış olduğu bildirilmiştir [79] . Diğer taraftan olgun olmayan iDH'lerinde NK hücreleri ile etkileşimlerinin sonucunda NK hücrelerinin güçlü bir şekilde DH olgunlaşmasını ve sitokin salınımını uyardıkları gözlemlenmiştir. DH-NK etkileşiminin bir diğer sonucu NK hücrelerinin Th1 hücre polarizasyonunu uyarmasıdır. Moretta ve arkadaşları *in vitro* koşullarda IL-18 varlığında kültüre edilen NK hücrelerinin ancak DH ve T hücrelerinin bulunduğu ortamda Th1 polarisazyonunu uyardıklarını bildirmişlerdir [80]. Bu durumda T hücreleri IL-2 salgılamakta, aynı zamanda DH lerden salınan IL-12 ve IFN-γ salınımını uyarmaktadırlar. Genel olarak sınıf I MHC molekülünü eksprese etmeyen hücreler NK hücre kökenli lizise karşı savunmasızdırlar. Normal vücut hücreleri sınıf I MHC molekülü eksprese ettikleri için NK hücrelerinin

sitolitik etkilerinden kendilerini korurlar. iDHler bu kurala uymazlar. Otolog sistemde NK hücrelerinin iDH leri öldürmelerine rağmen olgunlaşma sürecine giren iDH ler NK hücre lizisine karşı oldukça dirençlidirler .

DH monosit etkileşmeleri üzerine yaptığımız deneylerde bazı hastalarda mDH farklılaşma belirteci olan CD209 ekspresyonu düşük saptanmıştır. CD209 c-tip lektindir ve çeşitli mikroorganizmaların yüzeylerinde reseptör olarak görev yapan yüksek mannoz içerikli glikoproteinlerini tanıyarak yapışırlar [81]. Adezyon molekülü olarak görev yapmalarının yanında toll benzeri reseptörleri düzenleyerek doğal bağışıklık sistemini de aktive ederler [82]. Behçet hastalığının etyopatolojisinde mikroorganizmaların rolleri düşünüldüğünde, düşük seviyede eksprese olan CD209'un enflamatuvar yanıtta monositlerin yetersiz immün cevaplara neden olduğunu düşündürmektedir. GWAS çalışmalarında CCR1 geninde bulunan düşük ekspresyonun [83] monosit kemotaksisinde azalmaya, bu azalma sonucunda olası kemotaksi defekti ile CCR1 geni arasındaki fonkisyonel ilişki yeni bir patolojik mekanizmaya işaret etmektedir [14]. Çalışmamızda elde edilen bulgular, behçet hastalığında monositler üzerinden geliştiği iddia edilen patolojik mekanizmayı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda hasta kan örneklerinden elde edilen monosit ve NK hücre oranlarının hastadan hastaya farklılık göstermesi nedeniyle, NK - DH etkileşimlerinin farklı hücre oranlarında farklı sonuçlar verdiği saptanmıştır. Tez çalışması kapsamında NK-DH etkileşimini saptamak için ölçülen parametrelerde Behçet ve sağlıklı bireyler arasında bir fark saptanmamasına karşılık, NK-DH etkileşiminin Behçet hastalarındaki rolünü saptamak için farklı parametrelerin incelenmesi gerekmektedir.

Bulgularımız Behçet hasta NK hücrelerinin monositlerin farklılaşma hızını etkileyebileceğini göstermektedir. Hasta sayılarının arttırılarak, farklı NK hücre yüzey belirteçlerinin de saptanarak NK-DH etkileşiminin daha kapsamlı incelenmesi NK hücrelerinin monosit farklılaşmasındaki rolüne açıklık getirecektir. Behçet hastalarında DH-NK etkileşiminin NK hücre sitotoksik kapasitesine etkisinin incelenmesi de iki hücre arasındaki etkileşime açıklanmasında önemlidir. Çalışmamız bilgimiz dahilinde Behçet hastalığı patogenezinde rolleri olduğu vurgulanan hücre gruplarının etkileşiminin fonksiyonel olrak incelendiği ilk çalışma özelliği taşımaktadır. Behçet hastalığı ile ilşkilendirilen en güçlü bulgu HLA-B51 in de hesaba katılarak bu iki hücre grubunun etkileşimi çalışmaya aydınlatıcı bir boyut daha kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Gul, A., *Behcet's disease: an update on the pathogenesis.* Clin Exp Rheumatol, 2001. **19**(5 Suppl 24): p. S6-12.
2. Yazici, H., et al., *Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behcet's syndrome.* Ann Rheum Dis, 1984. **43**(6): p. 783-9.
3. Kural-Seyahi, E., et al., *The long-term mortality and morbidity of Behcet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center.* Medicine (Baltimore), 2003. **82**(1): p. 60-76.
4. O'Duffy, J.D., *Behcet's syndrome.* N Engl J Med, 1990. **322**(5): p. 326-8.
5. Ohno, S., et al., *Close association of HLA-Bw51 with Behcet's disease.* Arch Ophthalmol, 1982. **100**(9): p. 1455-8.
6. Verity, D.H., et al., *Behcet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives.* Tissue Antigens, 1999. **54**(3): p. 213-20.
7. Azizlerli, G., et al., *Prevalence of Behcet's disease in Istanbul, Turkey.* Int J Dermatol, 2003. **42**(10): p. 803-6.
8. Zouboulis, C.C. and T. May, *Pathogenesis of Adamantiades-Behcet's disease.* Adv Exp Med Biol, 2003. **528**: p. 161-71.
9. Tursen, U., A. Gurler, and A. Boyvat, *Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behcet's disease.* Int J Dermatol, 2003. **42**(5): p. 346-51.
10. Gul, A., et al., *Familial aggregation of Behcet's disease in Turkey.* Ann Rheum Dis, 2000. **59**(8): p. 622-5.
11. Gul, A., et al., *Linkage mapping of a novel susceptibility locus for Behcet's disease to chromosome 6p22-23.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(11): p. 2693-6.
12. Gheita, T.A., et al., *Clinical significance of serum interleukin-23 and A/G gene (rs17375018) polymorphism in Behcets disease: Relation to neuro-Behcet, uveitis and disease activity.* Joint Bone Spine, 2014.
13. Lee, E.B., et al., *TNF and TNF receptor polymorphisms in Korean Behcet's disease patients.* Human Immunology, 2003. **64**(6): p. 614-20.
14. Gul, A., *Genetics of Behcet's disease: lessons learned from genomewide association studies.* Curr Opin Rheumatol, 2014. **26**(1): p. 56-63.
15. Remmers, E.F., et al., *Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behçet's disease.* Nature Genetics, 2010. **42**(8): p. 698-702.
16. Sezer, F., *The isolation of a virus as the cause of Behçet's disease.* Am J Ophthalmol 1953. **36:301–6**.
17. Sakane, T., et al., *Behcet's disease.* N Engl J Med, 1999. **341**(17): p. 1284-91.
18. Lehner, T., *The role of heat shock protein, microbial and autoimmune agents in the aetiology of Behcet's disease.* Int Rev Immunol, 1997. **14**(1): p. 21-32.
19. Lee, E.S., et al., *Detection of Herpes-Simplex Virus-DNA by Polymerase Chain-Reaction in Saliva of Patients with Behcets-Disease.* Behcets Disease, 1993. **1037**: p. 83-86.

20. Sohn, S., et al., *Behcet's disease-like symptoms induced by the Herpes simplex virus in ICR mice.* European Journal of Dermatology, 1998. **8**(1): p. 21-23.
21. Hirohata, S., H. Oka, and Y. Mizushima, *Streptococcal-Related Antigens Stimulate Production of Il6 and Interferon-Gamma by T-Cells from Patients with Behcets-Disease.* Cellular Immunology, 1992. **140**(2): p. 410-419.
22. Mochizuki, M., et al., *Fine Antigen-Specificity of Human Gamma-Delta T-Cell Lines (V-Gamma-9+) Established by Repetitive Stimulation with a Serotype (Kth-1) of a Gram-Positive Bacterium, Streptococcus-Sanguis.* European Journal of Immunology, 1994. **24**(7): p. 1536-1543.
23. Hirohata, S., H. Oka, and Y. Mizushima, *Streptococcal-related antigens stimulate production of IL6 and interferon-gamma by T cells from patients with Behcet's disease.* Cell Immunol, 1992. **140**(2): p. 410-9.
24. Lamb, J.R. and D.B. Young, *T-Cell Recognition of Stress Proteins - a Link between Infectious and Autoimmune-Disease.* Molecular Biology & Medicine, 1990. **7**(4): p. 311-321.
25. Ergun, T., et al., *HSP 60 expression in mucocutaneous lesions of Behcet's disease.* Journal of the American Academy of Dermatology, 2001. **45**(6): p. 904-909.
26. Lehner, T., et al., *Association between the 65-Kilodalton Heat-Shock Protein, Streptococcus-Sanguis, and the Corresponding Antibodies in Behcets-Syndrome.* Infection and Immunity, 1991. **59**(4): p. 1434-1441.
27. Pervin, K., et al., *T-Cell Epitope Expression of Mycobacterial and Homologous Human 65-Kilodalton Heat-Shock Protein-Peptides in Short-Term Cell-Lines from Patients with Behcets-Disease.* Journal of Immunology, 1993. **151**(4): p. 2273-2282.
28. Ben Ahmed, M., et al., *Involvement of chemokines and Th1 cytokines in the pathogenesis of mucocutaneous lesions of Behcet's disease.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(7): p. 2291-5.
29. Li, B., et al., *T-bet expression is upregulated in active Behcet's disease.* British Journal of Ophthalmology, 2003. **87**(10): p. 1264-1267.
30. Na, S.Y., et al., *Up-regulation of Th17 and related cytokines in Behcet's disease corresponding to disease activity.* Clin Exp Rheumatol, 2013. **31**(3 Suppl 77): p. 32-40.
31. Freysdottir, J., S. Lau, and F. Fortune, *Gammadelta T cells in Behcet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS).* Clin Exp Immunol, 1999. **118**(3): p. 451-7.
32. Eksioglu-Demiralp, E., et al., *Neutrophil activation in Behcet's disease.* Clinical and Experimental Rheumatology, 2001. **19**(5): p. S19-S24.
33. Akdeniz, N., et al., *Serum interleukin-2, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide levels in patients with Behcet's disease.* Ann Acad Med Singapore, 2004. **33**(5): p. 596-9.
34. Akman-Demir, G., et al., *Interleukin-6 in neuro-Behcet's disease: association with disease subsets and long-term outcome.* Cytokine, 2008. **44**(3): p. 373-6.
35. Hirohata, S., *[Central nervous system involvement in Behcet's disease].* Rinsho Shinkeigaku, 2001. **41**(12): p. 1147-9.

36. Pay, S., et al., *Synovial proinflammatory cytokines and their correlation with matrix metalloproteinase-3 expression in Behcet's disease. Does interleukin-1beta play a major role in Behcet's synovitis?* Rheumatol Int, 2006. **26**(7): p. 608-13.
37. Monselise, A., et al., *Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in Behcet's disease--a familial study.* Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(5 Suppl 42): p. S87-90.
38. Musabak, U., et al., *Lipid profile and anticardiolipin antibodies in Behcet's disease.* Archives of Medical Research, 2005. **36**(4): p. 387-92.
39. Briani, C., et al., *Increased titres of IgM anti-heparan sulfate antibody in Behcet's disease.* Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(5 Suppl 42): p. S104-7.
40. Feng, X.G., et al., *Antikinectin autoantibody in Behcet's disease and several other autoimmune connective tissue diseases.* Clinical and Experimental Rheumatology, 2007. **25**(4): p. S80-S85.
41. Mahesh, S.P., et al., *Alpha tropomyosin as a self-antigen in patients with Behcet's disease.* Clinical and Experimental Immunology, 2005. **140**(2): p. 368-375.
42. Delunardo, F., et al., *Identification and characterization of the carboxy-terminal region of Sip-1, a novel autoantigen in Behcet's disease.* Arthritis Res Ther, 2006. **8**(3): p. R71.
43. Aslan, H., et al., *Antiannexin V autoantibody in thrombophilic Behcet's disease.* Rheumatol Int, 2004. **24**(2): p. 77-9.
44. Vural, B., et al., *Seroreactivity against PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) in Turkish patients with Behcet's disease.* Clin Exp Rheumatol, 2009. **27**(2 Suppl 53): p. S67-72.
45. Hamzaoui, K., et al., *Natural killer cell activity, interferon-gamma and antibodies to herpes viruses in patients with Behcet's disease.* Clin Exp Immunol, 1990. **79**(1): p. 28-34.
46. Eksioglu-Demiralp, E., et al., *Increased CD4(+)CD16(+) and CD4(+)CD56(+) T cell subsets in Behcet's disease.* Rheumatology International, 1999. **19**(1-2): p. 23-26.
47. Galy, A., et al., *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset.* Immunity, 1995. **3**(4): p. 459-73.
48. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines.* Annual Review of Immunology, 1999. **17**: p. 189-220.
49. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and Clinical Relevance of Human Natural-Killer-Cells.* Blood, 1990. **76**(12): p. 2421-2438.
50. Caligiuri, M.A., et al., *Functional Consequences of Interleukin-2 Receptor Expression on Resting Human-Lymphocytes - Identification of a Novel Natural-Killer-Cell Subset with High-Affinity Receptors.* Journal of Experimental Medicine, 1990. **171**(5): p. 1509-1526.
51. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity.* Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 501-10.
52. Joncker, N.T. and D.H. Raulet, *Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells.* Immunol Rev, 2008. **224**: p. 85-97.

53. Takeno, M., et al., *Abnormal killer inhibitory receptor expression on natural killer cells in patients with Behcet's disease.* Rheumatol Int, 2004. **24**(4): p. 212-6.

54. Deniz, G., et al., *Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells.* Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 879-84.

55. Mosier, D.E., *A requirement for two cell types for antibody formation in vitro.* Science, 1967. **158**(3808): p. 1573-5.

56. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.* Journal of Experimental Medicine, 1973. **137**(5): p. 1142-62.

57. Dudziak, D., et al., *Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo.* Science, 2007. **315**(5808): p. 107-11.

58. Palucka, K. and J. Banchereau, *How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses.* Current Opinion in Immunology, 2002. **14**(4): p. 420-431.

59. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity.* Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 17-58.

60. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells.* Annual Review of Immunology, 2000. **18**: p. 767-811.

61. Moretta, A., *Natural killer cells and dendritic cells: Rendezvous in abused tissues.* Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(12): p. 957-964.

62. Fernandez, N.C., et al., *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo.* Nat Med, 1999. **5**(4): p. 405-11.

63. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants.* Science, 2002. **295**(5562): p. 2097-100.

64. Vitale, M., et al., *NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor.* Blood, 2005. **106**(2): p. 566-71.

65. Direskeneli, H., et al., *T cell responses to 60/65 kD heat-shock protein derived peptides in Turkish patients with Behcet's disease.* Arthritis and Rheumatism, 1997. **40**(9): p. 212-212.

66. Direskeneli, H., et al., *T cell responses to 60/65 kDa heat shock protein derived peptides in Turkish patients with Behcet's disease.* J Rheumatol, 2000. **27**(3): p. 708-13.

67. Grunebaum, E., E. Malatzky-Goshen, and Y. Shoenfeld, *Natural killer cells and autoimmunity.* Immunologic Research, 1989. **8**(4): p. 292-304.

68. Flodstrom, M., et al., *The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease?* Scandinavian Journal of Immunology, 2002. **55**(5): p. 432-41.

69. Bossowski, A., M. Urban, and A. Stasiak-Barmuta, *Analysis of circulating T gamma/delta lymphocytes and CD16/56 cell populations in children and adolescents with Graves' disease.* Pediatric Research, 2003. **54**(3): p. 425-9.

70. Yabuhara, A., et al., *A killing defect of natural killer cells as an underlying immunologic abnormality in childhood systemic lupus erythematosus.* Journal of Rheumatology, 1996. **23**(1): p. 171-177.

71. Takeno, M., et al., *Abnormal killer inhibitory receptor expression on natural killer cells in patients with Behcet's disease.* Rheumatology International, 2004. **24**(4): p. 212-216.

72. Martin, M.P., et al., *Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles.* J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2818-22.

73. van der Slik, A.R., et al., *KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects.* Diabetes, 2003. **52**(10): p. 2639-42.

74. Saruhan-Direskeneli, G., et al., *Expression of KIR and C-type lectin receptors in Behcet's disease.* Rheumatology (Oxford), 2004. **43**(4): p. 423-7.

75. Fort, M.M., M.W. Leach, and D.M. Rennick, *A role for NK cells as regulators of CD4(+) T cells in a transfer model of colitis.* Journal of Immunology, 1998. **161**(7): p. 3256-3261.

76. Frassanito, M.A., et al., *Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease - A putative pathogenetic role of interleukin-12.* Arthritis and Rheumatism, 1999. **42**(9): p. 1967-1974.

77. Ilhan, F., et al., *Th1 polarization of the immune response in uveitis in Behcet's disease.* Canadian Journal of Ophthalmology-Journal Canadien D Ophtalmologie, 2008. **43**(1): p. 105-108.

78. Sugi-Ikai, N., et al., *Increased frequencies of interleukin-2- and interferon-gamma-producing T cells in patients with active Behcet's disease.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(6): p. 996-1004.

79. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.

80. Agaugue, S., et al., *Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1776-83.

81. Lozach, P.Y., et al., *The C type lectins DC-SIGN and L-SIGN: receptors for viral glycoproteins.* Methods Mol Biol, 2007. **379**: p. 51-68.

82. den Dunnen, J., S.I. Gringhuis, and T.B. Geijtenbeek, *Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses.* Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(7): p. 1149-57.

83. Kirino, Y., et al., *Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1.* Nature Genetics, 2013. **45**(2): p. 202-207.

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi:

Proje Adı: "BEHÇET HASTALARINDA DENTRİTİK HÜCRE VE DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE ETKİLEŞİMİ"

Yapılacak işlemin tanımı: Bu çalışmada, Behçet hastalığı immünopatogenezinde rol oynadığı düşünülen Dentritik Hücre Doğal öldürücü hücre etkileşimi incelenecektir. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Romatoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

Araştırmanın Amacı: Bu çalışmada monosit kökenli dentritik hücrelerle doğal katil hücre etkileşiminde Behçet hastaları ve sağlıklı bireyler arasındaki farklılıkları bulmayı hedeflemektedir. Ayrıca HLA-B51 pozitif ve negatif hastlarda Doğal Katil Hücre Dentritik hücre etkileşiminin , monositlerin olgunlaşma sürecini nasıl etkilediği araştırılacaktır.

Araştırmada Kullanılacak Yöntemler

- Onayınız alındıktan sonra sizden 15cc heparinli tüpe kan alınacaktır.
- Bu işlem sırasında görevli olan kişi oldukça dikkatli ve titiz davranacaktır. Alınan kanınız uygun koşullarda muhafaza edilip bölümümüze ulaştırılacaktır. Bu kandan hücreler elde edilecektir ve bu hücreler, bu çalışma dışında başka bir işlem için kullanılmayacaktır. Araştırma kapsamında yapılacak olan çalışmanın süresi 1 yıldır ve sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilemeyebilir.
- Çalışmada, gönüllü üzerinde başka herhangi bir çalışma yapılmayacaktır.
- Kendisinden izin alınacak gönüllünün uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlık ve riskle karşılaşması söz konusu değildir.
- Bu araştırmaya toplam 20 gönüllü katılacaktır.

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi

- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırıcı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllü arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.

- Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
- Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
- Çalışmaya katılmak zorunluluğunuz bulunmamaktadır, gönüllü istediği takdirde çalışmadan ayrılabilir.
- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkide bulunmayacaktır.
- Gönüllünün çalışmaya katılım süreci sadece gönüllüden kan örneğinin alınması ile sınırlıdır.
- Çalışma kabul kriterlerine ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırıcının isteği ile çıkarılabilirsiniz.
- Araştırma sırasında elde edilen test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
- Araştırmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkmanız ya da çıkarılmanız halinde hastalığınızın tedavisi ile ilgili hiçbir aksama olmayacaktır.
- Kimlik bilgileriniz gizli tutulacak ve sizden alınacak kandan elde edilecek tüm materyaller özel bir kodlama ile kodlanacak ve bu bilgiler üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

Olası riskler ve faydalar:

Yapılacak araştırmanın getirebileceği olası riskler: Yapılacak olan araştırmanın hasta açısından herhangi bir riski yoktur.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır.

Olası yararlar :Bu incelemelerin esas amacı hastalığın oluşumuna yol açan mekanizmaların oluşumunu aydınlatmaktır.

İkinci bölüm: *(Katılımcının/Hastanın Beyanı)*

Sayın Prof. Dr. Günnur Deniz tarafından İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilimdalın'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.
Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.
Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi

durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.
Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.
İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).
Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof.Dr. Günnur Deniz'i 05424258636 ' dan arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir)
Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.
Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.
İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.
Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 1166

Tarih : 28.08.2013

Konu : Prof. Dr. Günnur DENİZ

Sayın Prof. Dr. Günnur DENİZ
DETAE- İmmünoloji Anabilim Dalı

İlgi :DETAE- İmmünoloji Anabilim Dalının 05/08/2013 gün ve 167 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz 2013/1084 dosya numaralı "Behçet Hastalarında Dentritik Hücre ve Doğal Öldürücü Hücre Etkileşimi" başlıklı çalışma kurulumuzun 16/08/2013 gün ve 14 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aydın	**Soyadı**	Karabulut
Doğ.Yeri	Uzunpınar	**Doğ.Tar.**	20.10.1976
Uyruğu	TC	**TC Kim No**	17390432762
Email	aydinkarabulut@gmail.com	**Tel**	505 8888241

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2015
Yük.Lis.	Gaziantep Üniversitesi	2007
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi	2005
Lise	Kayseri Melikgazi Lisesi	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	iyi	Çok iyi	90	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Ofis	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Yüzme