T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE FONKSİYONLARINI ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ: İMMÜN KONTROL NOKTALARI, LOKAL İMMÜN SUPRESYON VE BİYOLOJİK TEDAVİLERİN ETKİLERİ

FEHİM ESEN

DANIŞMAN
PROF.DR. ESİN ÇETİN

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2026

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 olmadığı beyan ederim.

Fehim Esen

İTHAF

Bu tez, gelecekte hastalıkları için kalıcı tedavilerin geliştirileceğine inandığım Behçet hastalığı ve tüm üveit hastalarına ithaf edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana sabır ve anlayışla rehberlik eden, beni birçok nitelikli bilimsel çalışmaya dâhil ederek deneysel yayınlar ile TÜBİTAK proje başvuru süreçlerinde bilgi ve deneyimimi geliştirmeme katkı sağlayan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Esin Çetin'e, sağladığı eğitim ve araştırma imkânları ile alanında ulusal ve uluslararası düzeyde lider çalışmalarıyla bilimsel rehberlik sunan İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Günnur Deniz'e, tez projemde bilimsel katkıları ve alanlarında ulusal ve uluslararası düzeyde öncü çalışmalarıyla yol gösteren Prof. Dr. Ahmet Gül, Prof. Dr. İlknur Tuğal Tutkun ve Prof. Dr. Haner Direskeneli hocalarıma içten teşekkür ederim.

İmmünoloji doktora eğitimim sürecinde her aşamada desteklerini hissettiğim Prof. Dr. Umut Can Küçüksezer, Prof. Dr. Güher Saruhan Direskeneli, Prof. Dr. Ali Osman Gürol, Prof. Dr. Suzan Çınar, Prof. Dr. Sema Bilgiç Gazioğlu, Doç. Dr. Metin Yusuf Gelmez, Dr. Öğr. Üyesi Nilgün Akdeniz'e teşekkür ederim.

İmmünoloji doktorası sürecinde hem tez projelerim hem de araştırma projelerimizin deneysel aşamalarında desteklerini esirgemeyen Ayşenur Kökoğlu, Ayşe Engin ve Abdullah Yılmaz'a teşekkür ederim.

Bu çalışmada bilime ve insanlığın yararında hizmet etmek gibi kutsal bir amaç için katkı veren tüm gönüllülere teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ilgi ve desteklerini her an hisettiğim, eğitimimde çok büyük emekleri olan anne ve babama teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince anlayışı, sabrı ve sürekli desteğiyle yanımda olan can yoldaşım, bir tanecik eşim Müberra'ya içten teşekkür ederim. Özellikle yoğun çalışma dönemlerinde gösterdiği fedakârlık ve sağladığı manevi destek, bu tezin tamamlanmasında önemli katkı sağlamıştır.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TSA-2020-35128 ve TDK-2021-37285) ve TÜBİTAK (Proje No: 120Z958) tarafından desteklenmiştir.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, Doktora Programında Doktora öğrencisi Fehim Esen tarafından Prof. Dr. Esin Aktaş Çetin'in danışmanlığında hazırlanan "Doğal Öldürücü Hücre Fonksiyonlarını Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi: İmmün Kontrol Noktaları, Lokal İmmün Supresyon Ve Biyolojik Tedavilerin Etkileri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 23/09/2025 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Günnur Deniz

İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel tıp Araştırma Enstitüsü

İmmünoloji Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Umut Can Küçüksezer

İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

İmmünoloji Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr. Sevcan Balcı

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi

Göz Hastalıkları A.D.

Jüri

Prof. Dr. Semra Akkaya Turhan

Acıbadem Üniversitesi TF

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Jüri

Prof.Dr. Haner Direskeneli

SBÜ Hamidiye TF

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

Jüri-(Danışman)

Prof. Dr. Esin Aktaş Çetin

İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

İmmünoloji A.D.

İÇİNDEKİLER

BEYAN....2
İTHAF....3
TEŞEKKÜR....4
İÇİNDEKİLER....6
TABLOLAR LİSTESİ....10
ŞEKİLLER LİSTESİ....11
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ....13
ÖZET....15
ABSTRACT....16
1. GİRİŞ VE AMAÇ....17
2. GENEL BİLGİLER....19
2.1. Doğal Öldürücü Hücreler....19
2.2. NK Hücre Aktivitesinin Düzenlenmesi....21
2.3. NK Hücre Alt Grupları....23
2.3.1. NK Hücrelerinin CD16 ve CD56 Ekspresyon Düzeyine Göre Sınıflandırılması....23
2.3.2. NK Hücrelerinin Sitokin Salınımlarına Göre Fonksiyonel Sınıflandırılması....24
2.3.3. NK Hücrelerinin Transkriptomik Özellikleri....25
2.3.4. NK Hücrelerinin CD8 Ekspresyonuna Göre Sınıflandırılması....27
2.4. İmmün Kontrol Noktası Reseptörleri ve NK Hücreleri....27
2.5. Behçet Hastalığı....29
2.5.1. Klinik Özellikleri....29
2.5.2. Behçet Hastalığı Sınıflandırma Kriterleri....30
2.6. Üveit Tanımı....31
2.6.1. Genel Tanım....31
2.6.2. Oküler İmmün Ayrıcalık Mekanizmaları....31
2.6.3. Üveit İmmünopatogenezi....32
2.6.4. Behçet Üveitinin Klinik Özellikleri....33
2.6.5. Behçet Üveitinde Tedavi....37
2.7. Behçet Hastalığı Patogenezi....39
2.7.1. Behçet Hastalığının Genetik ve İmmünolojik Özellikleri....39

2.7.2. Behçet Hastalığında NK Hücre Yanıtları....39
2.7.3. Behçet Hastalığında Anti-tümör Nekrozis Faktör-α Tedavileri....40
2.8. Anti-tümör Nekrozis Faktör-α Tedavilerinin Etki Mekanizmaları....41
3. GEREÇ VE YÖNTEM....43
3.1. İMMÜN KONTROL NOKTASI RESEPTÖRLERİNİN NK HÜCRE FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ....44
3.1.1. Gönüllülerin Seçimi....44
3.1.2. Periferik kan mononükleer hücrelerinin izolasyonu....44
3.1.3. NK hücre alt gruplarının karakterizasyonu ve immün kontrol noktası reseptör ekspresyonlarının değerlendirilmesi....46
3.1.4. NK hücre alt gruplarının sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi....47
3.1.5. NK hücre alt gruplarında sitokin düzeylerinin ve immün kontrol noktası reseptör ekspresyonlarının belirlenmesi....47
3.1.6. İstatistiksel analiz....48
3.2. Adalimumab Tedavisinin Behçet Hastalarında NK Hücre Fonksiyonları Üzerine Etkileri....50
3.2.1. Çalışma popülasyonu ve tedavi protokolü....50
3.2.2. Periferik kan mononükleer hücrelerinin izolasyonu....51
3.2.3. Aktivatör ve inhibitör NK hücre reseptörlerinin belirlenmesi....54
3.2.4. NK hücrelerinin hücre içi proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin salınımlarının analizi....54
3.2.5. NK hücre sitotoksisitesinin değerlendirilmesi....55
3.2.6. NK hücre kaynaklı plazma çözünür sitokin ve reseptör profilinin multiplex boncuk dizisi teknolojisi ile analizi....57
3.2.7. İstatistiksel analiz....57
3.3. Adalimumab Tedavisinin Sağlıklı İnsan NK Hücre Fonksiyonları Üzerine *in vitro* Etkileri....59
3.3.1. Çalışma Grubu....59
3.3.2. Periferik kan mononükleer hücrelerinin izolasyonu....60
3.3.3. NK Hücre İzolasyonu....61
3.3.4. NK ve PKMH hücre kültürü....62
3.3.5. Adalimumabın NK hücrelerinde apoptoz ve hücre canlılığına etkilerinin değerlendirilmesi....63
3.3.6. NK Hücrelerinde Inflamatuvar ve Anti-inflamatuvar Sitokin Salınım Tayini .64

3.3.7. NK Hücre Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi....65
3.3.8. NK Hücre Kültürü Üst Sıvılarında Sitokin ve Sitotoksik Mediatörlerin LEGENDplex™ Yöntemi ile Analizi....68
3.3.9. İstatistiksel Analiz....69
4. BULGULAR....70
4.1. İMMÜN KONTROL NOKTASI RESEPTÖRLERİNİN NK HÜCRE YANITLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ....70
4.1.1. Periferik Kanda NK Hücre Alt Gruplarının Dağılımı....70
4.1.2. NK Hücre Alt Gruplarında İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Ekspresyonları....71
4.1.3. İmmün kontrol noktası reseptörü pozitif NK hücre popülasyonlarında NK hücre alt gruplarının dağılımı....76
4.1.4. PD-1, CTLA-4 ve LAG-3 Ekspresyonu ile Sitokin Espresyonu Arasındaki İlişki....79
4.1.5. PD-1$^+$, CTLA-4$^+$ Ve LAG-3$^+$ NK Hücrelerinde Sitotoksik Granül Ekspresyonları....81
4.1.6. PD-1$^+$, CTLA-4$^+$ ve LAG-3$^+$ NK hücrelerinde K562 hücre stimülasyonuna sitotoksik yanıt bozulmuştur....84
4.2. BEHÇET ÜVEİTİ HASTALARINDA ADALİMUMAB TEDAVİSİNİN NK HÜCRE YANITLARI ÜZERINDEKI ETKİLERİ....86
4.2.1. Adalimumab Tedavisinin NK Hücre Alt Grupları Üzerine Etkileri....86
4.2.2. Adalimumab tedavisinin NK hücreleri üzerindeki aktivatör ve inhibitör reseptörlere etkileri....90
4.2.3. Adalimumab tedavisinin NK hücrelerinin sitokin salınımlarına etkileri....93
4.2.4. Adalimumab tedavisinin NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları üzerine etkileri....96
4.2.5. Boncuk bazlı akan hücre ölçer yöntem ile plazma örneklerinde NK hücre sitokin ve solubil reseptör panelinin belirlenmesi....101
4.3. Adalimumab Tedavisinin Sağlıklı İnsan NK Hücre Fonksiyonları Üzerine İn Vitro Etkileri....105
4.3.1. Adalimumab uygulamasının *in vitro* şartlarda NK hücre alt grup oranlarına etkisi....105
4.3.2. *In vitro* adalimumab uygulamasının NK hücre apoptotik indeksi ve proliferasyonu üzerine etkisi....107
4.3.3. NK Hücrelerinde Inflamatuvar ve Antiinflamatuvar Sitokin Salınımı....109

4.3.4. Adalimumabın NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesine etkisi 111
4.3.5. NK hücre kültür ortamında adalimumab uygulamasının kültür üst sıvısındaki sitokin ve sitotoksik molekül seviyelerine etkisi 113
4.3.6. PKMH hücre kültür ortamında adalimumab uygulamasının kültür üst sıvısındaki sitokin ve sitotoksik molekül seviyelerine etkisi 116
5. TARTIŞMA 119
5.1. İmmün kontrol noktası reseptörlerinin NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi üzerindeki etkileri 119
5.2. Behçet üveiti hastalarında Adalimumab tedavisi ile remisyon sağlanması sonrasında oluşan NK hücre fenotipi ve yanıtlarının incelenmesi.....124
5.3. NK hücre kültüründe adalimumab uygulanmasının NK hücre yanıtları ve sağ kalımı üzerine etkileri 126
5.4. Özet ve Sonuç 130
KAYNAKLAR 132
FORMLAR 139
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....158

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. İmmün Kontrol Noktası Reseptörlerinin NK Hücre Fonksiyonları Üzerine Etkilerinin İncelendiği Gönüllülerin Demografik Özellikleri ve Dahil Edilme Kriterleri 45
Tablo 2. Deneysel aşamalarada kullanılan cihazların listesi 46
Tablo 3. Kullanılan Monoklonal Antikolar ve Deney Malzemeleri 49
Tablo 4. Çalışma Gruplarının Dahil Edilme Kriterleri 53
Tablo 5. Kullanılan Monoklonal Antikolar ve Deney Malzemeleri 56
Tablo 6. LEGENDplex™ Multiplex Boncuk Dizisi Teknolojisi ile Minimum Saptanabilir Konsantrasyonlar 58
Tablo 7. Çalışmaya Dahil Edilen Gönüllülerin Demografik Özellikleri ve Dahil edilme Kriterleri 60
Tablo 8. Kullanılan Monoklonal Antikorlar ve Deney Malzemeleri 67
Tablo 9. LEGENDplex™ Multiplex Boncuk Dizisi Teknolojisi ile Minimum Saptanabilir Konsantrasyonlar 69
Tablo 10. NK hücre kültürü ortamında üst sıvıdaki sitokin ve sistotoksik molekül düzeyleri 115
Tablo 11. PKMH hücre kültür ortamında üst sıvıdaki sitokin ve sistotoksik molekül düzeyleri 117

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. ILC hücre alt gruplarının gelişimleri ve fonksiyonları 21
Şekil 2. NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi 23
Şekil 3. NK hücrelerinin CD16 ve CD56 ekspresyon düzeyine göre güncellenmiş sınıflaması 24
Şekil 4. Behçet üveiti hastasında ön kamarada seçilen inflamatuvar hücreler ve hipopiyon 34
Şekil 5. Behçet üveitine bağlı arka segment buguları 36
Şekil 6. Behçet hastalığına bağlı nöroretinit 37
Şekil 7. Fundus florescein anjiyografisi ile Behçet üveitinin değerlendirilmesi 38
Şekil 8. NK hücre alt gruplarının tanımlanmasına yönelik temsilî kapılama stratejisi . 70
Şekil 9. Sağlıklı popülasyonda NK hücre alt gruplarının dağılımı 71
Şekil 10. NK Hücre Alt Gruplarında İmmün Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarının Analizinde Kapılama Stratejisi 73
Şekil 11. NK hücre alt gruplarında immün kontrol noktası reseptörü ekspresyonları... 74
Şekil 12. NK Hücre Alt Gruplarında İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Ekspresyonlarını Gösteren Isı Haritası 75
Şekil 13. İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Taşıyan NK Hücrelerinin İçerisinde NK Hücre Alt Gruplarının Kapılanma Stratejisi 76
Şekil 14. İmmün kontrol noktası reseptörü taşıyan NK hücreleri arasında NK hücre alt gruplarının dağılımı 78
Şekil 15. İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Taşıyan NK Hücrelerinde Sitokin Salınımı Analizi İçin Kapılama Stratejisi 79
Şekil 16. NK hücrelerinde immün kontrol noktası reseptörü ekspresyonu ile sitokin salınım profili arasındaki ilişki 80
Şekil 17. İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Taşıyan Hücrelerde Sitotoksisite Analizinin Kapılama Stratejisi 82
Şekil 18. İmmün kontrol noktası reseptörü ekspresyonu ile NK hücre sitotoksisitesi İlişkisi 83
Şekil 19. İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Taşıyan NK Hücrelerinin K652 Stimülasyonuna Yanıtları 85
Şekil 20. Behçet üveiti hastaları, ankilozan spondilit hastaları ve sağlıklı bireylerde NK hücre kapılama stratejisi ve NK hücre alt grup değişimlerini gösteren akan hücre ölçer görüntüleri 87
Şekil 21. Adalimumab Tedavisinin Behçet Üveiti ve Ankilozan Spondilit Hastalarında NK Hücre Alt Gruplarının Dağılımı Üzerine Etkileri 88
Şekil 22. Tedavi Öncesi ve Sonrası Behçet Üveiti ile Ankilozan Spondilit Hastalarında NK Hücre Alt Gruplarının Oranlarındaki Değişimler 89
Şekil 23. Behçet üveiti, ankilozan spondilit hastaları ve sağlıklı bireylerde NK hücre aktivatör ve inhibitör reseptör oran değişimleri 91
Şekil 24. Tedavi öncesi ve sonrası Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarında NK hücre aktivatör ve inhibitör reseptör oranlarının karşılaştırılması 92
Şekil 25. Adalimumab tedavisinin Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarında NK hücre alt gruplarının sitokin salınımı üzerine etkisi 94
Şekil 26. Behçet üveiti ile ankilozan spondilit hastalarında aktif dönemde ve adalimumab tedavisi sonrasında sitokin ekspresyon paternlerinin karşılaştırılması 95

Şekil 27. Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarında NK hücre sitotoksik aktivitesinin Adalimumab tedavisi süresince gruplar arasındaki değişimleri..... 97
Şekil 28. Behçet ve ankilozan spondilit hastalarında adalimumab tedavisi öncesi ve sonrası NK hücre alt gruplarında sitotoksik aktivite arasındaki değişimleri 98
Şekil 29. Hasta gruplarında NK hücre CD107a, perforin ve granzim A ekspresyonunun stimulasyonsuz ve K562 hücre stimülasyonu sonrası karşılaştırması 100
Şekil 30. Adalimumab tedavisinin Behçet üveiti hastalarının plazma sitokin düzeyleri üzerine etkileri 102
Şekil 31. Adalimumab tedavisinin ankilozan spondilit hastalarının plazma sitokin düzeylerine etkileri 103
Şekil 32. Aktif dönemde ve adalimumab tedavisi ile remisyon elde edildiği dönemde Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının serum sitokin düzeylerinin karşılaştırmalı incelemesi 104
Şekil 33. Stimülasyonsuz ve adalimumab stimülasyonu sonrası saflaştırılmış NK hücre kültürlerinde NK hücre alt grup oranları 106
Şekil 34. Adalimumab stimülasyonu ve stimülasyonsuz şartlerda periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde NK hücre alt grup oranları 107
Şekil 35. PKMH ve saf NK hücre kültürlerinde adalimumabın hücre canlılığı ve apoptotik indekse etkisi 108
Şekil 36. Adalimumabın *in vitro* NK hücre proliferasyonuna etkisi 109
Şekil 37. Adalimumabın saf NK hücre kültürlerinde NK hücre sitokin salınımına etkisi 110
Şekil 38. Adalimumabın PKMH hücre kültürlerinde NK hücre sitokin salınımına etkisi 110
Şekil 39. Adalimumabın hücre kültüründe NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesine etkisi 112
Şekil 40. NK hücrelerinin hedef hücreyi öldürme kapasitesinin belirlenmesi 113

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Akir: İmmünoglobulin-Benzeri Aktivatör Reseptörü

BASDAI: Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksi

CCL: Kemokin Ligandı

CTLA-4: Sitotoksik T Lenfosit Antijeni 4

DNAM1: DNAX Aksesuar Molekül 1

EULAR: Avrupa Romatoloji Derneği

FasL: Fas Ligandı

FCS: Fetal Dana Serumu

FMO: Fluorescence Minus One

GM-CSF: Granülosit-Makrofaj Koloni-Stimüle Edici Faktör

HLA: İnsan Lökosit Antijeni

IFN: İnterferon

ISG: Uluslararası Çalışma Grubu

ITIM: İmmün Reseptör Tirozin Bazlı İnhibitor Motifi

iKIR: Öldürücü İmmünglobulin-Benzeri İnhibitör Reseptörü

IL: Interlökin

LAG-3: Lenfosit Aktivasyon Geni-3

LFA: Lenfosit Fonksiyonu İle İlişkili Antijen

KAR: Öldürücü Hücre İmmünoglobulin Benzer Aktive Edici Reseptörü

MHC: Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi

MICA/B: MHC Sınıf I İlişkili Molekül A/B

NK: Doğal Öldürücü Hücre

OCT: Optik Korerens Tomografi

PKMH: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PD-1: Programlı Ölüm Reseptörü-1

PD-L1: PD-1 Ligandı

PI: Propidyum İyodid

RAET1E: Retinoik Asit Erken Transkript 1E Proteini

Th: Yardımcı T Hücre

TIGIT: T-Hücre İmmünoglobulin ve ITIM Domeni

TIM-3: T Hücre İmmünoglobulin ve Müsin Domeni İçeren Molekül-3

TNF: Tümor Nekrozis Faktör

Treg: Regülatör T Hücre

VKH: Vogt Koyanaghi Harada Hastalığı

ÖZET

Esen F. Doğal Öldürücü Hücre Fonksiyonlarını Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi: İmmün Kontrol Noktaları, Lokal İmmün Supresyon Ve Biyolojik Tedavilerin Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2006.

Doğal öldürücü (NK) hücre fonksiyonlarının immün kontrol noktası reseptörleri, mikro çevre sinyalleri ve biyolojik tedaviler tarafından nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Öncelikle 30 sağlıklı bireyde immün kontrol noktası reseptörlerinin NK hücre alt grupları ve fonksiyonları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca Adalimumab tedavisinin NK hücrelerindeki etkileri 14 aktif Behçet üveiti hastası , 13 ankilozan spondilitli hasta ve 23 sağlıklı kontrol üzerinde incelenmiştir. Bunlara ek olarak, saf NK ve PKMH *in vitro* kültürlerinde Adalimumab'ın NK hücrelerine etkisi incelendi, tüm basamaklarda NK hücre fenotipleri, fonksiyon ve sağkalımları akan hücre ölçer ile analiz edilmiştir.

PD-1, CTLA-4 ve LAG-3 ekspresyonun, en yüksek $CD56^{dim}CD16^{-}$ alt grubunda saptandığı ve düzenleyici fenotip ile (IL-10 artışı, IFN-γ/TNF-α ve sitotoksisitede azalma) ilişkili olduğu gösterildi. TIGIT ekspresyonu $CD56^{dim}CD16^{dim}$ NK hücre alt grubunda yüksek düzeyde olduğu saptandı. Behçet üveitinde toplam NK hücre oranı ve $CD56^{dim}CD16^{bright}$ efektör NK hücre oranı azalırken, adalimumab ile remisyon sonrasında NKG2A ekspresyonu ve regülatör NK hücre alt gruplarında artış saptandı. *İn vitro* saf NK kültürlerinde adalimumab uygulamasının apoptozu artırdığı, canlılığı azalttığı, buna karşın NK hücre proliferasyonunu arttırdığı ve sitotoksik aktiviteyi azalttığı belirlendi. PKMH kültürlerinde ise apoptoz ve canlılık oranları açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Aktif Behçet üveitinde tedavi öncesi ve sonrasının karşılaştırılmasında NKG2D ekspresyonunun, NK17 ve regülatör NK oranlarında anlamlı derecede artış saptanmıştır.

Bulgularımız immün kontrol noktası reseptörlerinin özellikle $CD56^{dim}CD16^{-}$ NK hücre alt gruplarında disfonksiyona yol açtığını göstermektedir. Adalimumab tedavisinin klinikte NK hücrelerini regülatör fenotipe yönlendirirken, *in vitro* hücre kültüründe ise NK hücre alt gruplarında apoptoz ve proliferatif yanıtları tetikleyerek immatür NK hücre fenotipini arttırdığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Doğal öldürücü hücreler, immün kontrol noktası, adalimumab, Behçet, üveit (Beş Kelime)

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TSA-2020-35128 ve TDK-2021-37285) ve TÜBİTAK (Proje No: 120Z958) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Esen F. Investigation of Factors Influencing Natural Killer Cell Functions: Immune Checkpoints, Local Immune Suppression, and the Effects of Biological Therapies. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. PhD Thesis. İstanbul. 2006.

Natural killer (NK) cell functions and how they are shaped by immune checkpoint receptors, microenvironmental cues, and biological therapies were investigated. First, the effects of immune checkpoint receptors on NK-cell subsets and functions were evaluated in 30 healthy individuals. In addition, the impact of adalimumab on NK cells was examined in 14 patients with active Behçet uveitis, 23 healthy controls, and 13 diseased controls with ankylosing spondylitis. Moreover, the effects of adalimumab on NK cells were studied in vitro using purified NK-cell and PBMC cultures. Across all stages, NK-cell phenotypes, functions, and survival were analyzed by flow cytometry.

PD-1, CTLA-4, and LAG-3 expression was highest in the $CD56^{dim}CD16^{-}$ subset and was associated with a regulatory phenotype (increased IL-10, decreased IFN-γ/TNF-α expression and cytotoxicity). TIGIT expression was high in the $CD56^{dim}CD16^{dim}$ NK-cell subset. In Behçet uveitis, the overall NK-cell proportion and the $CD56^{dim}CD16^{bright}$ effector NK-cell fraction were reduced, whereas NKG2A expression and regulatory NK-cell subsets increased after remission induced by adalimumab. *In vitro*, adalimumab increased apoptosis and reduced viability in purified NK-cell cultures, while enhancing NK-cell proliferation and decreasing cytotoxic activity. In PBMC cultures, no significant differences were observed in apoptosis or viability. In active Behçet uveitis, increased NKG2D expression as well as elevated NK17 and regulatory NK-cell proportions were detected both before and after treatment.

Our findings indicate that immune checkpoint receptors contribute to dysfunction particularly within the $CD56^{dim}CD16^{-}$ NK-cell subset. While adalimumab therapy *in vivo* was associated with a shift of NK cells toward a more regulatory phenotype, *in vitro* exposure appeared to trigger apoptotic and proliferative responses and increased an immature NK-cell phenotype.

Key Words: Natural killer cells, immune checkpoint, adalimumab, Behçet, uveitis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: TSA-2020-35128 and TDK-2021-37285) ve TÜBİTAK (Project No: 120Z958)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi birçok faktörün aynı anda etki ettiği ve aralarındaki dengenin hücre fonksiyonları hakkında belirleyici olduğu oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu düzenleme, NK hücreleri üzerinde eksprese edilen aktivatör ve inhibitör reseptörler arasındaki hassas denge ile sağlanmaktadır. Klasik NK hücre reseptörleri ve bu reseptörlerin sitotoksisite ile sitokin üretimi üzerindeki etkileri uzun yıllardır bilinmekte ve ayrıntılı biçimde tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda tanımlanan immün kontrol noktası reseptörlerinin NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesindeki rolleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle bu reseptörleri eksprese eden NK hücre alt gruplarının hangi fenotipik ve fonksiyonel özellikleri kazandığı ve bu değişikliklerin immün yanıtın yönlendirilmesindeki önemi, hâlen yanıtlanması gereken önemli sorular arasında yer almaktadır.

NK hücrelerinin otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogenezindeki rolleri üzerine çok sayıda deneysel ve klinik çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, NK hücrelerinin yalnızca sitotoksik efektör hücreler olmadığını, aynı zamanda immün yanıtın düzenlenmesinde önemli görevler üstlenen fonksiyonel bir hücre grubu olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, mevcut bilgi birikimine rağmen biyolojik tedavilerin etki mekanizmaları araştırılırken NK hücreleri üzerindeki etkilerinin çoğu zaman ikincil planda kaldığı ve bu alanda sınırlı verinin varlığı dikkat çekmektedir. Özellikle immün kontrol noktası hedefli ya da sitokin baskılayıcı biyolojik ajanların NK hücre fenotipi ve fonksiyonları üzerindeki doğrudan ve dolaylı etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında, literatürde NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi bağlamında etkileri ayrıntılı olarak tanımlanmamış üç farklı mekanizma sistematik bir yaklaşımla incelenmiştir. İlk olarak, NK hücreleri üzerinde eksprese edilen immün kontrol noktası reseptörlerinin, NK hücrelerinde yol açtığı fenotipik ve fonksiyonel değişiklikler ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, farklı immün kontrol noktası reseptörlerini taşıyan NK hücre alt gruplarının sitokin üretimi, sitotoksik kapasitesi ve düzenleyici özellikleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

İkinci olarak, immün ayrıcalıklı bir organ olan gözde fizyolojik olarak var olan lokal immün supresyon ortamının NK hücre fonksiyonları üzerindeki etkileri dikkate alınmıştır. Bu lokal immün düzenleyici mekanizmaların bozulması sonucunda üveit gibi inflamatuvar hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Üveit tedavisinde yaygın olarak kullanılan

ve anti-TNF etkili bir biyolojik ajan olan Adalimumabın, Behçet üveiti hastalarında klinik etkinliğinin yüksek olduğu bilinmektedir. Ancak adalimumab tedavisinin, bu hasta grubunda NK hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel özelliklerini nasıl düzenlediği yeterince aydınlatılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, adalimumab tedavisinin Behçet üveiti hastalarında NK hücreleri üzerindeki etkileri ikinci temel mekanizma olarak ele alınmıştır.

Son olarak, adalimumab tedavisi ile *in vivo* ortamda gözlenen NK hücre değişikliklerinin hangi hücresel ve moleküler mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıktığını daha iyi anlayabilmek amacıyla *in vitro* NK hücre kültür modelleri oluşturulmuştur. Bu deneysel yaklaşım ile adalimumab'ın NK hücre fenotipi, fonksiyonları, sitokin üretimi ve apoptoz süreçleri üzerindeki doğrudan etkilerinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Böylece, klinik gözlemlerle deneysel veriler arasında nedensel bir bağ kurulması amaçlanmıştır.

Yukarıda tanımlanan her bir mekanizmanın ayrıntılı biçimde incelenebilmesi için, bu tez içerisinde birbirinden bağımsız ancak birbiriyle ilişkili ayrı deneysel dizaynlar oluşturulmuştur. Bu deney dizaynlarının her biri, ilgili mekanizmayı aydınlatmaya yönelik olarak planlanmış ve aşağıda alt başlıklar halinde sırasıyla ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Bu çalışmanın amacı,

(i) NK hücreleri üzerinde eksprese edilen immün kontrol noktası reseptörlerinin NK hücre fenotipi ve fonksiyonları üzerindeki etkilerinin ortaya konulması

(ii) Adalimumab tedavisinin Behçet üveiti hastalarında NK hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkilerinin değerlendirmesi

(iii) Adalimumab tedavisi ile gözlenen *in vivo* NK hücre değişikliklerinin, *in vitro* NK hücre kültür modelleri kullanılarak altta yatan hücresel mekanizmalarının aydınlatılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doğal Öldürücü Hücreler

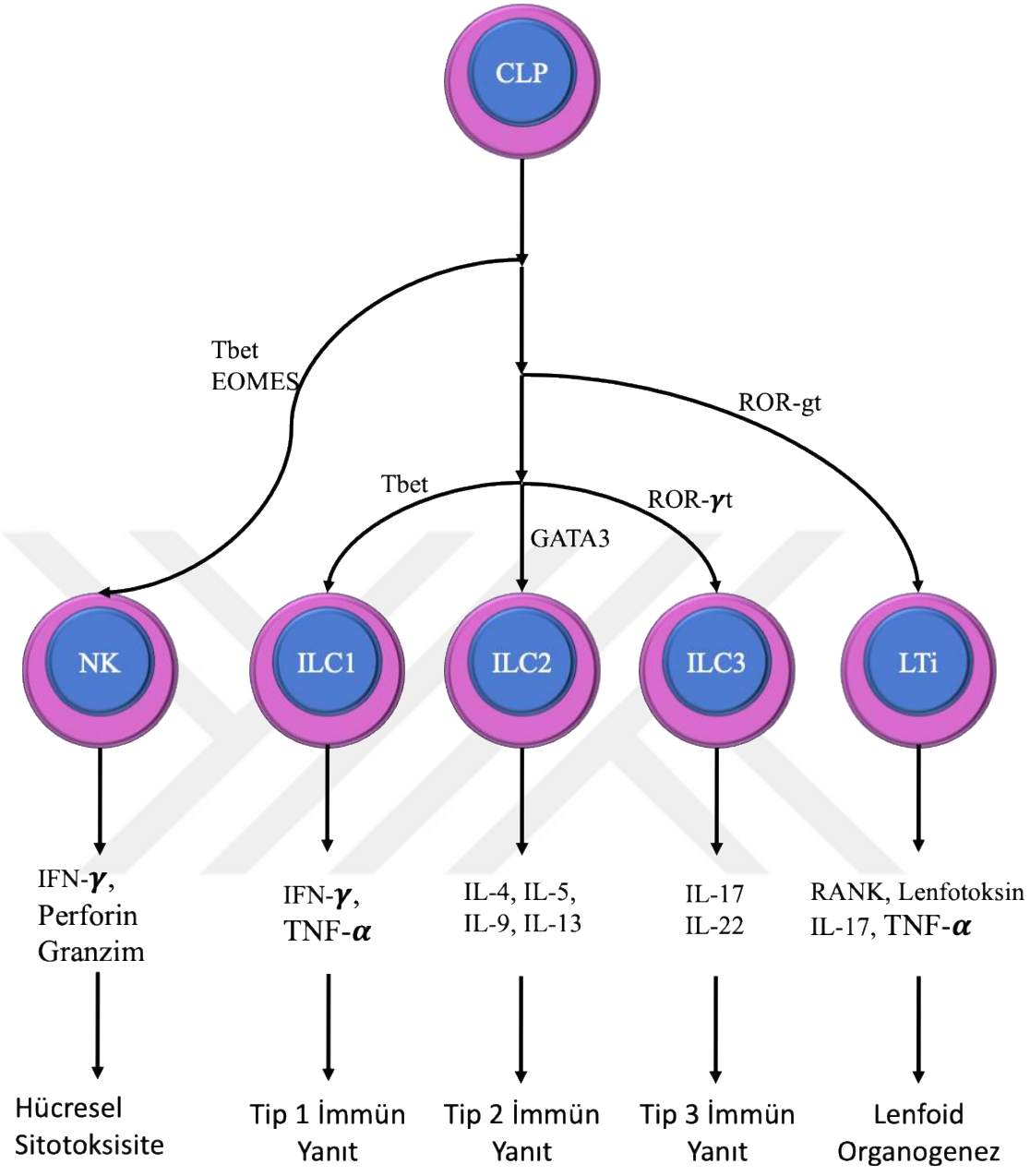
Doğal öldürücü hücreler (NK) doğuştan gelen (innate) lenfoid hücreler (ILC) olarak adlandırılan doğal bağışıklık yanıtlarından sorumlu bir lenfosit grubudur. ILC hücreleri salgıladıkları sitokinler ve immün yanıtı yönlendirme biçimleri açısından T hücre yanıtlarına benzer 3 grup içerisinde sınıflandırılırlar. Grup 1 ILC hücreleri NK hücreleri ve ILC1 hücrelerini içermektedir. Bunlar fonksiyon olarak sitotoksik T hücreleri ve Th1 hücrelerine benzerler. Grup 2 ILC hücreleri ILC2 hücrelerini içerirler ve bunlar da fonksiyon olarak Th2 hücrelerine benzerler. ILC3 hücreleri ise fonksiyon olarak IL-17 ve IL-22 salgılayan yardımcı T hücreleri ile hayatın erken dönemlerinde yoğun bulunan lenfoid doku uyarıcı T hücrelerine (TLi) 'ne benzerler. ILC hücreleri arasında ilk keşfedilenler NK hücreleri olup, diğer alt gruplardan yaklaşık 50 yıl önce keşfedilmişlerdir [1].

ILC hücreleri diğer lenfositler gibi ortak lenfoid öncül hücrelerden farklılaşarak gelişirler. Gelişimsel süreç içerisinde Tbet transkripsiyon faktörünün ekspresyonu bu hücreleri Grup 1 ILC hücrelerine farklılaştırır. Grup 1 ILC hücreleri içerisindeki NK hücreler Interferon-γ (IFN-γ) sitokini salgılarlar ve hücre içerisinde bulunan perforin ile granzim içerikli granüller aracılığı ile hücresel sitotoksisite yaparlar. Aynı grupta yer alan ILC1 hücreleri de tip 1 immün yanıta ait IFN-γ ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α) sitokinleri salgılayarak hücre içi antijenlere karşı immün yanıtı yönetirler. Farklılaşma esnasında GATA3 transkripsiyon faktörü üreten hücreler ise grup 2 ILC hücrelerine yani ILC2 hücrelerine farklılaşır. ILC2 hücreleri de salgıladıkları, IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 sitokinleri ile parazitlere karşı immün yanıtları ve alerjik reaksiyonları etkilerler. Farklılaşma sürecinde ROR-γt transkripsiyon faktörünü üreten ILC hücreleri ise ya ILC3 hücrelerine farklılaşıp IL-17 ve IL-22 yanıtlarını yönetirler[1]. ILC alt gruplarının farklılaşma mekanizmaları ve fonksiyonel özellikleri Şekil 1'de özetlenmiştir.

NK hücreleri antijene özgül T veya B hücre reseptörleri taşımayan, çeşitli tümörleri ve virüsle enfekte olmuş hücreleri öldürme yeteneğine sahip olan ve sitoplazmalarında sitotoksik granüller içeren doğal lenfoid hücrelerdir [2]. Kan mononükleer hücrelerinin yaklaşık olarak %5-20'sini oluşturan NK hücreleri, doğal immünitede rol oynayan en önemli hücrelerden biridir. NK hücrelerinin en önemli fonksiyonları anti-viral ve anti-tümöral immün yanıtlarda sitotoksik etki göstermeleridir, ki bu etkilerini $CD8^+$ T

hücrelerinden farklı olarak MHC'den bağımsız gerçekleştirirler. Sitotoksik özelliklerinden ayrı olarak NK hücreleri salgıladıkları sitokinler IFN-γ, TNF-α, IL-10 gibi sitokinler ve granulosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) aracılığı ile immün yanıtın şekillenmesinde etkili olurlar. Buna ilave olarak salgıladıkları kemokin ligandı 3 (CCL3), CCL4, CCL5 gibi kemokinler ile immün hücre göçünü de etkileyebilmektedirler.

NK hücrelerinin kendi dokularımıza karşı immün yanıt geliştirmemeleri veya patojenlere karşı kontrolsüz bir cevap ile normal dokularda hasar oluşturmalarının engellenmesi için NK hücre fonksiyonu birçok mekanizma tarafından denetlenmektedir. Bu denetim mekanizmasının en önemli basamağı NK hücreleri üzerinde MHC sınıf I moleküllerini algılayan inhibitör reseptörlerin bulunması, ki bu reseptörler MHC sınıf I taşıyan sağlıklı hücrelere NK hücrelerinin saldırmasını engellemektedir. NK hücrelerinin yanıt oluşturmaları için tek bir aktivatör sinyal çoğu zaman yeterli değildir. Etkin bir aktivasyon için genellikle birden fazla aktivatör reseptörün uyarılması ve bunlardan gelen sinyallerin birbirini güçlendirmesi ve eşlik eden uygun bir sitokin uyarısının da eklenmesi ile kritik sinyal eşiğinin aşılması gerekir. Aktivasyon eşiği kavramı ile aktivatör reseptörlerin birlikte uyarılması ve uygun sitokin uyarımın eşlik etmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır. [3-5]. NK hücrelerinin hedef hücreye karşı sitotoksik aktiviteleri salgıladıkları perforin ve granzim gibi sitolitik proteinler ile IFN-γ ve TNF-α gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve antikora bağımlı hücresel sitotoksisite mekanizmalar aracılığı ile oluşmaktadır [6]. NK hücre–hedef hücre etkileşimi başladıktan sonra, sitotoksik granüller immün sinaps bölgesine yönlendirilir ve granüllerin hedefe bakan kutupta birikimi sağlanır. Ardından granül membranlarının plazma membranı ile füzyonu gerçekleşir ve perforin, granzim gibi litik enzimler, iki hücre arasındaki sinaptik boşluğa kontrollü biçimde bırakılır. Bu ekzositoz sırasında lizozom ile ilişkili membran proteini-1 (LAMP-1, CD107a) granül membranı üzerinden hücre yüzeyine taşındığından, CD107a yüzey ekspresyonu degranülasyonun güvenilir bir dolaylı göstergesi olarak kullanılmaktadır [7].



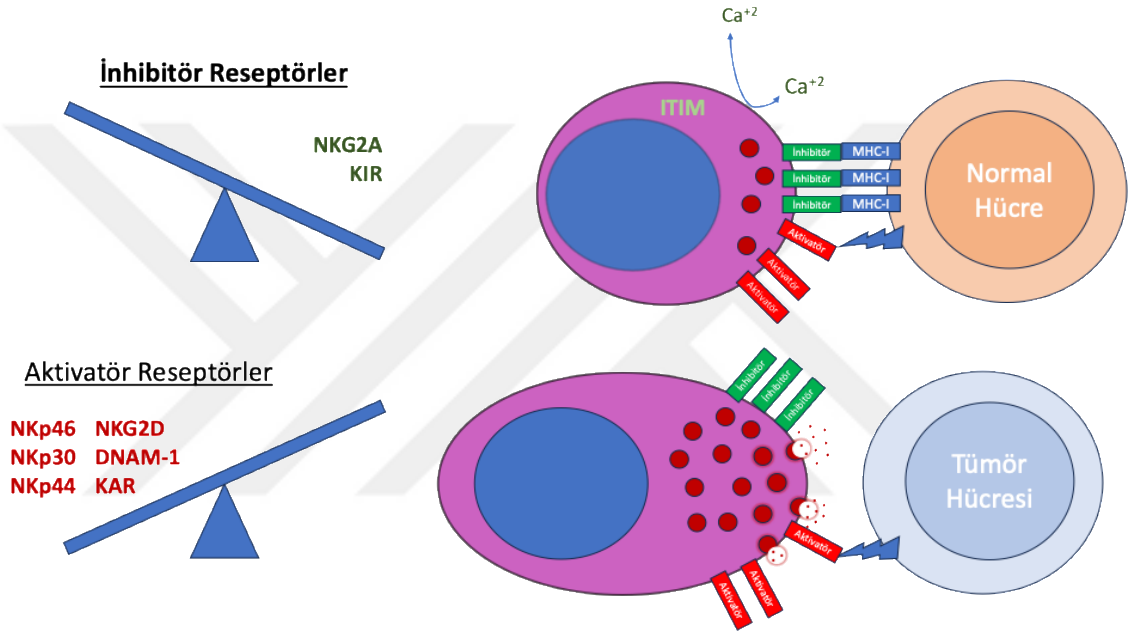
Şekil 1. ILC hücre alt gruplarının gelişimleri ve fonksiyonları

2.2. NK Hücre Aktivitesinin Düzenlenmesi

NK hücre aktivasyonu hassas bir sinyal dengesi sayesinde belirlenmektedir. NK hücresi yüzeyinde aktivatör ve inhibitör reseptörler bulunur. Hedef hücrelerin üzerinde bu reseptörlere karşılık gelen ligandların miktarları aktivatör yada inhibitör sinyallerin hangisinin baskın olacağını ve immün yanıtın hangi yönde devam edeceğini belirler [8]. İnhibitör sinyallerin fazla olduğu durumda NK hücrelerinin hedef hücreyi öldürmesi

engellenir ve benzer şekilde, kendi hücrelerimize karşı immün yanıt oluşturmamız engellenir. Bu inhibitör reseptörler çoğunlukla HLA sınıf I antijenlerini eksprese eden hücreleri tanır. İnhibitör reseptörlerin temel ligandları MHC-sınıf I ve MHC-sınıf I benzeri moleküllerdir [9]. İnhibitör reseptörlerin sitoplazmik bölgelerinde immün reseptör tirozin-bazlı inhibitör motif (ITIM) bulunur. Ligandın inhibitör reseptöre bağlanması sonrasında ITIM motifi fosforile olur ve bu yolaklar kalsiyum (Ca^{++}) girişini baskılayarak NK hücre efektör fonksiyonlarını inhibe ederler. En önemli inhibitör NK hücre reseptörü NKG2/C lektin ailesine ait CD94/NKG2A'dır. Aktivatör sinyaller galip geldiğinde ise NK hücre degranülasyonu, immün sinapsa salgılanan perforin ve granzim enzimlerinin aracılığı ile hedef hücrenin öldürülmesi gerçekleşir. En önemli aktive edici reseptörler doğal sitotoksisite reseptör ailesinden NKp46, NKp30 ve NKp44, NKG2C lektin ailesine ait NKG2D, DNAM1 (DNAX aksesuar molekül1) ve öldürücü hücre immünoglobulin benzer aktive edici reseptörü (KAR) ailesidir. Hem aktivatör hem de inhibitör reseptörleri içeren C tip lektin ailesinde CD94-NKG2-A/C/E/F/H heterodimer NKG2D ise homodimer olarak NK hücre yüzeyinde eksprese edilmektedir [10]. NKG2D NK hücreleri ile birlikte $CD8^+$ T hücre ve γδ T hücreleri tarafından eksprese edilen ve önemli fonksiyonlara sahip bir moleküldür. NKG2D reseptörünün ligandı sağlıklı hücre yüzeyinde bulunmazken, enfekte hücre ya da tümör hücresi gibi hasarlı hücrelerin yüzeyinde hızlı bir biçimde eksprese olmaktadır. İnsanlarda MHC sınıf I polipeptid ile ilişkili sekans A (MICA), MICB, retinoik asit erken transkript 1E proteini (RAET1E), RAET1G, RAET1H, RAET1I, RAET1L ve RAET1N (ULBP1–ULBP6) NKG2D ligandlarıdır. Aktive edici reseptörlerden en iyi çalışılanlardan biri DNAM-1'dir. DNAM-1 hem NK hücreleri hem T hücrelerinin bir alt grubunda hem de myeloid hücrelerde eksprese olan bir aktive edici reseptördür. DNAM-1, lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen (LFA)-1'e bağlanarak T hücre ko-stimülasyonunu kolaylaştırmakta ve melanom gibi bazı tümör tiplerinde NK aracılı tümör öldürmesinde önemli rol oynamaktadır. DNAM-1'in ligandları olan CD112 (nektin 2) ve CD155 (PVR) nektin ailesine aittir ve çok çeşitli hematopoetik ve çok çeşitli tümör hücrelerini içeren nonhematopoetik hücrelerde eksprese olmaktadır. DNAM-1 NK hücre aktivasyonunu arttırmakta ve adezyon reseptörü gibi iş görerek NK ve hedef hücre etkileşiminde önemli rol oynamaktadır [11]. Doğal sitotoksisite reseptörleri NKp30 (CD337, NCR3), NKp44 (NCR2, CD336) ve NKp46 (NCR1 ve CD335) olmak üzere 3 grupta incelenmektedir. NKp30 ve NKp46 hem aktive hem de aktive olmamış NK hücrelerinde eksprese edilirken

NKp44 ekspresyonu sadece aktive NK hücre yüzeyinde eksprese edilmektedir [12]. NKp30, dendritik hücreler (DH) ile NK hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşimde önemli bir aracıdır. Enfeksiyonla değişime uğrayan DH'lerin NK hücreleri tarafından tanınmasında NKp30 üzerinden iletilen sinyaller rol oynar. Bu etkileşim sonucunda NK hücreleri, anormal özellikler gösteren veya yeterince olgunlaşmamış DH'leri lizise uğratabilir; böylece DH havuzunun kalite kontrolü sağlanarak uygun olgunlaşma sürecine katkıda bulunulur [13].



Şekil 2. NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi

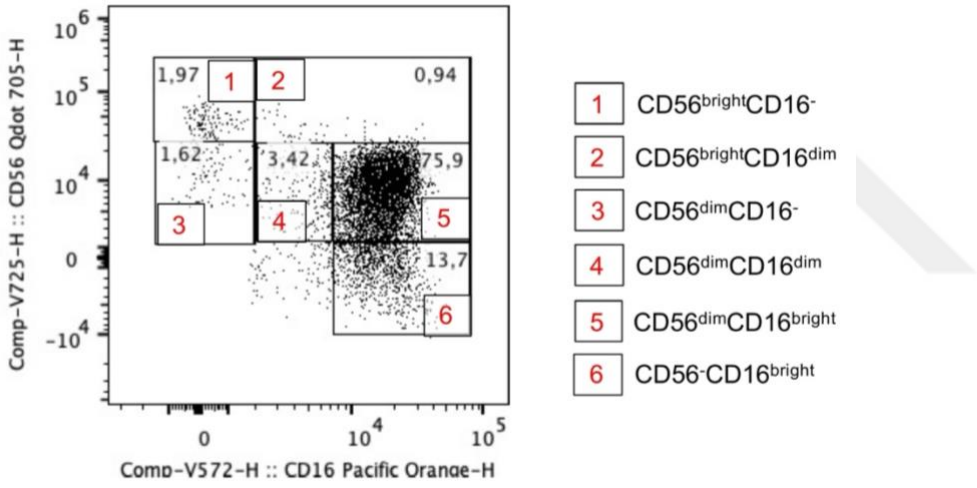
2.3. NK Hücre Alt Grupları

2.3.1. NK Hücrelerinin CD16 ve CD56 Ekspresyon Düzeyine Göre Sınıflandırılması

Bu hücreler CD16 ve CD56 yüzey antijenlerinin ekspresyonlarına göre $CD16^{+}CD56^{dim}$ ve $CD16^{-}CD56^{bright}$ hücreler olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir. $CD16^{+}CD56^{dim}$ NK hücrelerinin sitotoksik aktiviteleri yüksek iken, $CD16^{-}CD56^{bright}$ NK hücreler salgıladıkları sitokinler aracılığıyla inflamatuvar yanıtlarda rol oynamakta ve salgıladıkları sitokin ve çözünebilir medyatörler aracılığıyla etkili bir kazanılmış immün yanıtın oluşmasına da katkıda bulunabilmekte, kanser hücrelerine karşı kazanılmış

immün yanıtı teşvik edebilmektedir [14]. NK hücrelerinin hedef hücreye yönelmiş sitotoksik aktiviteleri, salgıladıkları perforin ve granzim gibi sitolitik proteinler ile IFN-γ ve TNF-α gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve antikora bağımlı hücresel sitotoksisite mekanizmalar aracılığı ile oluşmaktadır.

NK hücre alt grupları, CD16 ve CD56 ekspresyon düzeylerine göre altı farklı kategoriye ayrılmıştır. Her bir NK hücre alt grubu, kendine özgü fenotipik ve fonksiyonel özellikler sergilemektedir. Fonksiyonel açıdan değerlendirildiğinde, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücreleri belirgin sitotoksik aktivite ile karakterize edilirken, $CD56^{bright}CD16^{dim}$ NK hücre alt grubu ağırlıklı olarak sitokin salınım profili ile öne çıkmaktadır. Buna karşılık, $CD56^{dim}CD16^{-}$ NK hücreleri, fonksiyonel olarak yetersiz, tükenmiş (exhausted) fenotipe sahip NK hücre alt grubu olarak tanımlanmaktadır [15].



Şekil 3. NK hücrelerinin CD16 ve CD56 ekspresyon düzeyine göre güncellenmiş sınıflaması

2.3.2. NK Hücrelerinin Sitokin Salınımlarına Göre Fonksiyonel Sınıflandırılması

NK hücreleri başta IFN-γ olmak üzere çeşitli sitokinlerin önemli bir kaynağıdır. NK hücreleri sitotoksik rollerinin dışında aynı zamanda immün yanıtın yönlendirilmesinde de önemli düzenleyici roller üstlenirler. *İn vitro* çalışmalarda insan NK hücrelerinin, T yardımcı hücre alt gruplarına benzer şekilde, fonksiyonel olarak farklı iki alt gruba polarize olabildiği gösterilmiştir: NK1 ve NK2 [16, 17]. IL-12 varlığında farklılaşan NK1 hücreleri ağırlıklı olarak IFN-γ üretirken, IL-4 varlığında gelişen NK2 hücreleri IL-5 ve IL-13 gibi tip 2 sitokinleri salgılamaktadır. Her iki alt grubun sitotoksik kapasiteleri benzer olmakla birlikte, NK1 hücrelerinde CD95 ekspresyonunun daha

yüksek olduğu ve bu hücrelerin apoptoza daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. NK1 hücre farklılaşmasında T-bet (TBX21) transkripsiyon faktörü ve monositlerin IL-15Rα aracılı etkileri kritik öneme sahiptir [18].

Klinik olarak, astımlı hastaların periferik kanında IFN-γ üreten NK1 hücrelerinin azaldığı, buna karşılık IL-4 üreten NK2 hücrelerinin arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, NK2 tipi sitokin yanıtlarının astım ve bazı tümör mikroçevrelerinde patogeneze katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir [18]. NK hücreleri aynı zamanda düzenleyici fonksiyonlara sahip alt gruplar da içermektedir. IL-10 ve TGF-β salgılayan düzenleyici NK hücreleri, viral enfeksiyonlarda, transplantasyon toleransında ve gebelikte immün yanıtın baskılanmasında önemli rol oynamaktadır. IL-10 salgılayan NK hücrelerinin, T hücre proliferasyonunu baskıladığı ve bu özellikleriyle gerçek bir düzenleyici NK hücre alt grubunu temsil ettiği gösterilmiştir [18].

Buna ek olarak, NK hücreleri arasında IL-17 üreten NK17 hücreleri tanımlanmıştır. Bu hücreler IL-17 ve IFN-γ salgılayabilmekte ve özellikle Th17 aracılı otoimmün hastalık modellerinde önemli rol oynamaktadır. Bazı artrit modellerinde artmış IL-17 üretimi hastalığı ağırlaştırırken, NK hücre aktivasyonunun IFN-γ aracılığıyla Th17 yanıtlarını baskılayabildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, NK hücrelerinin otoimmün hastalıklarda koruyucu olabileceğini düşündürmektedir [18].

Bağırsak mukozasında tanımlanan NK22 hücreleri ise RORγt ekspresyonu ve IL-22 üretimi ile karakterizedir. NK22 hücreleri, epitel hücrelerini uyararak doku bütünlüğünün korunmasına, yara iyileşmesine ve mukozal bariyerin sürdürülmesine katkı sağlamaktadır. Bununla birlikte, romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda NK22 hücrelerinin artışı hastalık aktivitesi ile ilişkili bulunmuş ve bu hücrelerin patogenezde rol oynayabileceği öne sürülmüştür.[18]

2.3.3. NK Hücrelerinin Transkriptomik Özellikleri

NK hücrelerinin tek hücre transkriptomik analizi yapılarak, NK hücre alt gruplarında aktif olan genlerin değerlendirildiğinde, NK hücreleri gen ekspresyonlarına göre NK1 hücreleri, NK2 hücreleri ve NK3 hücrelerinden oluşmak üzere 3 grupta incelenmiştir. Her bir NK hücre alt grubunun transkriptomik özellikleri farklılık göstermek ile birlikte, bu hücre grupları kendi içlerinde de 6 alt gruba ayrılmaktadır. Burada üç ana grubun özellikleri anlatılmıştır.

NK1 hücreleri, CD16, CX3CR1, CD161, β7-integrin ve CD38 proteinlerinin yüksek düzeyde ekspresyonu ile karakterizedir. Bu gruba ait transkripsiyonel profil, söz konusu proteinlerle ilişkili genlerin yanı sıra sitotoksik molekülleri kodlayan genlerin (GZMB ve PRF1) ve NK hücre olgunluğunu yansıtan belirteçlerin yüksek ekspresyonunu ortaya koymaktadır. Bu belirteçler arasında CD160, CD247, ADGRG1, NKG7, FCER1G, LAIR2, SPON2, CLIC3 ve CHST2 yer almaktadır. NK1 kümesindeki hücrelerin CD56 ekspresyon düzeyleri NK2 kümesine kıyasla daha düşük, CD57 ekspresyon düzeyleri ise NK3 kümesine kıyasla daha düşüktür.

NK2 hücreleri, CD56, CD27, CD44, CD54, CD45RB, CD314 (NKG2D) ve CD335 (NKp46) proteinlerinin yüksek ekspresyonu ve granzim H (GZMH) ekspresyonunun çok düşük olması ile tanımlanmaktadır. NK2 hücrelerinde protein düzeyinde CD16 ve CD57 ekspresyonunun çok düşük olduğu ya da tamamen bulunmadığı saptanmıştır. Transkriptom düzeyinde ise NK2 hücreleri, ribozomal genlerin (RPL ve RPS gen aileleri) ve protein sentezi ile yapısal bütünlükte görev alan proteinleri kodlayan genlerin (EEF1A1, TPT1) belirgin ekspresyonu ile karakterizedir. Bu bulgular, NK2 hücrelerinin artmış protein sentez kapasitesine ve proliferatif potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca bu alt grup; sitokin reseptörlerini kodlayan genleri (IL2RB, IL7R), membran reseptörlerini (KLRC1; NKG2A), transkripsiyon faktörlerini (TCF7), immün yanıtları modüle eden çözünebilir faktörleri (XCL1, XCL2, AREG), hücre göçü ve dokuya yerleşmesi ile ilişkili molekülleri (CD44, GPR183, SELL) ve granzim K'yı yüksek düzeyde eksprese etmektedir. Klasik NK hücre belirteçleri olan CD57 ve CD16'nın ekspresyonu, NK2 hücrelerinde NK1 ve NK3 hücrelerine kıyasla belirgin şekilde azalmış ya da tamamen kaybolmuştur. Bu durum, NK2 popülasyonunun ağırlıklı olarak $CD56^{bright}$ ve erken evre $CD56^{dim}$ NK hücrelerinden oluştuğunu göstermektedir.

Protein ve transkripsiyonel imzaların birlikte değerlendirilmesi, NK3 kümesinin adaptif NK hücrelerine oldukça benzeyen bir profil sergilediğini göstermektedir. Bu kümede CD57 ve PRDM1 ekspresyonunun baskın olması, NK3 kümesinin HCMV'ye bağlı olarak oluşmayan, ancak olgun $CD57^{+}CD56^{dim}$ NK hücrelerini de içerdiğini düşündürmektedir. NK3 kümesinde protein ekspresyon profili; CD16, CD57, CD271 (NGFR), CD2, CD18, CD49d ve inhibitör killer hücre immünoglobulin benzeri reseptörleri (KIR'ler; CD158e ve CD158b) içermektedir. Buna karşılık CD56, NKp30, NKp46, CD161 ve CD122 ekspresyon düzeyleri daha düşüktür. Transkripsiyonel olarak

NK3 hücreleri; transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin (PRDM1 [BLIMP1'i kodlar] ve ZBTB38), yüzey molekülleri ve reseptörlerin (CD2 ve KLRC2 [NKG2C'yi kodlar]), CD3 zincirine ait transkriptlerin (CD3D, CD3E ve CD3G) ve salgılanan sitokin ile kemokinlerin (IL32 ve CCL5) tercihli ekspresyonu ile karakterizedir.[19]

2.3.4. NK Hücrelerinin CD8 Ekspresyonuna Göre Sınıflandırılması

NK hücreleri CD8 antijen ekspresyonlarına göre CD8 negatif ve CD8+ NK hücreleri olarak 2 alt gruba ayrılmaktadır. NK hücreleri CD8αβ heterodimeri eksprese eden sitotoksik T lenfositlerinden farklı olarak CD8αα homodimeri eksprese etmektedir. $CD56^{+}CD3^{-}CD8^{+}$ NK hücre alt grubunun $CD8^{-}$ NK hücrelerine göre daha sitotoksik olduğu gösterilmiştir. CD8 etkileşimi $CD8^{+}$ NK hücrelerde sitotoksik aktivitenin aktivatör ligandı olan CD69 ekspresyonunu ve NK hücrelerinin hedef hücreyi öldürmesini arttırmaktadır [20, 21]. Anti-TNF-α tedavilerinden Adalimumab (TNF nötralizasyonu) ve etanersept (Solubl TNF reseptör) tedavisi alan ankilozan spondilit hastalarında yapılan çok parametreli akan hücre ölçer analizleri sonucunda özellikle CD8 eksprese eden NK hücre alt grup oranlarının ankilozan spondilit hastalarında terapötik bir belirteç olabileceği düşünülmüştür. $CD8^{+}$ NK hücre alt grup oranları ile hastalık aktivitesinin gerilemesi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Başlangıçta tedaviye yanıt veren hastalarda yanıt vermeyenlere kıyasla $CD8^{+}$ NK hücre oranlarında önemli ölçüde artış görülmüştür [22].

2.4. İmmün Kontrol Noktası Reseptörleri ve NK Hücreleri

İmmün sistem aktive olduktan sonra, yanıtın aşırı güçlenerek doku hasarı ve otoimmün reaksiyonlara yol açmasını engellemek amacıyla immün yanıtı frenleyen "immün kontrol noktası" mekanizmaları devreye girer. Buradaki en kritik yolaklarından biri programlı hücre ölümü reseptörü-1 (PD-1) immün kontrol noktası yolağıdır. CD279 olarak da bilinen PD-1, kronik uyarı alan lenfositlerde aktivasyon sonrası artan ve immün aktivasyonu baskılayan bir immün kontrol noktası molekülüdür. PD-1 reseptörü $CD4^{+}$ ve $CD8^{+}$ T hücreleri, monositler ve NK hücreleri üzerinde eksprese edilir. Bu reseptör, ligandı olan PD-L1 (B7-H1; CD274) ve PD-L2 (B7-DC; CD273) ile etkileşime girerek hücresel immün yanıtı inhibe eder. Kanser hücreleri immün kontrol noktalarını da

içereren birçok farklı immün supresif mekanizma ile immün sistemden kaçmaktadır [23, 24]. Günümüzde kanserde immün kontrol noktalarını hedef alan CTLA-4 ve PD-1'e karşı monoklonal antikor tedavileri kullanılarak yürümekte olan klinik tedaviler bulunmaktadır [25]. Son yıllarda NK hücrelerinin de immün kontrol noktası reseptörleri eksprese ettikleri gösterilmiş olmasına karşılık, bu reseptörlerin NK hücre fonksiyonları üzerindeki detaylı etkileri hala tam olarak aydınlatılmamıştır [26].

Önemli bir immün kontrol noktası inhibitör reseptörü olan CTLA-4 T hücre aktivasyonuna arttıran CD28 molekülü ile homoloji göstermekte ve ligandları olan CD80 ve CD86'ya bağlanarak T hücre fonksiyonlarını inhibe etmektedir. CTLA-4 reseptörü aktive T hücre alt grupları, regülatör T hücreleri, tümör dokusundaki NK hücreleri, tümör taşıyan farelerde dalak $Kit^{+}CD11b^{-}$ NK hücrelerinin üzerinde gösterilmiştir [27]. Anti-tümöral immün yanıtların regülasyonunda sitotoksik T hücre yanıtlarını inhibe ettiği bilinmekle birlikte NK hücreleri ile ilgili bu konu ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır.

ITIM inhibitör motif domeni içeren T hücre immünoreseptörü (TIGIT) sitotoksik, hafıza ve regülatör T hücrelerinde ve NK hücrelerinde eksprese olan bir immün kontrol noktası reseptörüdür. TIGIT'in tümörlerde T hücre fonksiyon yetmezliğinde rolü olduğu bilinmekle birlikte NK hücre fonksiyonları üzerindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. CD155 and CD112 (Nektin2) olmak üzere iki ligandı bulunmaktadır. TIGIT sitotoksik T hücre aktivitesini direkt olarak inhibe etmesinin yanı sıra diğer immün hücreler üzerine olan etkileri ile tümör mikro çevresindeki immün supresyonu kuvvetlendirmektedir. Sitotoksik T ve NK hücreleri üzerindeki TIGIT reseptörünün dokudaki ligandlarıyla etkileşiminin immün aktivasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Benzer şekilde TIGIT'in Treg hücrelerinde ekspresyonu immün yanıtın baskılanmasını arttırmaktadır [28]. TIGIT, birçok kanser türünde PD-1 ekspresyonu ile korele şekilde tümörü infiltre eden lenfositlerde bulunmaktadır. Yapılan fare deneylerinde sadece TIGIT'i bloke eden antikor kullanılarak tümör yükünün azalmadığı, anti-PD-L1 veya anti-PD-1 tedavisiyle kombine kullanıldığında ise anti-tümöral yanıtta iyileşme olduğu görülmüştür [15].

Lenfosit-aktivasyon geni-3 (LAG-3/ CD223), üçlü Ig ekstraselüler domain içeren bir transmembran proteinidir. LAG-3 T hücreleri, regülatör T hücreleri, NK hücreleri, dendritik hücreler ve B hücrelerinde eksprese edilir. MHC Sınıf II, LAG-3'ün bilinen ligandıdır. $LAG\text{-}3^{-/-}$ knockout farelerde ve LAG-3'ün monoklonal antikor ile bloke edilmesi sonucunda T hücre proliferasyonunun *in vitro* olarak bloke edildiği

gösterilmiştir [29, 30]. LAG-3'ün NK hücre fonksiyonlarını nasıl regüle ettiği tam olarak bilinmemektedir. LAG-3 bulunmayan farelerden izole edilen NK hücrelerinin hedef tümör hücrelerini öldüremediği gösterilmiştir [31].

2.5. Behçet Hastalığı

Behçet hastalığı tekrarlayan oral aftlar ve genital ülserler, cilt lezyonları, oküler, artiküler, vasküler, nörolojik ve gastrointestinal inflamasyon bulguları ile seyredebilen, etiyolojisi tam olarak ortaya konulamamış sistemik bir vaskülittir [32].

Behçet Hastalığı birçok sistemde bir çok farklı lezyonlara yol açabilmektedir, ayrıca hem otoimmün hem de otoinflamatuvar özellikte immün yanıtlar içermesi nedeniyle patogenezindeki immün yanıtlar birden fazla mekanizmaya işaret etmekte olup tam olarak anlaşılamamıştır [33]. Behçet hastalığı aktif (atak) ve inaktif (remisyon) dönemleriyle seyreden bir klinik gidişata sahiptir. Bu dönemlerin ne kadar süreceği, hangi sıklıkla tekrarlayacağı hastalar arasında farklılık gösterir ve çoğu zaman öngörülemez. Hatta bir hastanın ardışık atakları arasında geçen süreler de çoğu zaman farklı olmaktadır [34]. İzole mukokutanöz tutulum çoğu hastada yaşam konforunu ciddi şekilde bozmakla birlikte ciddi hayati risk oluşturmamaktadır. Ancak organ tutulumu olan hastalarda (göz tutulumu, nörolojik tutulum veya damar tutulumu gibi) ise morbidite ve mortalite riski belirgin olarak artmaktadır [35]. Behçet hastalığı için tanıyı doğrulayan özgül bir laboratuvar testi bulunmamaktadır [36]. Bununla birlikte, hastalığın aktif fazında C-reaktif protein, eritrosit sedimentasyon hızı ile periferik kanda lökosit ve trombosit sayısı gibi inflamasyon göstergelerinde artış izlenebildiği bildirilmiştir [37]. Behçet hastalığı prevalansının dünyada en yüksek olduğu ülke Türkiye'dir (80–370/100.000) [38]. Hastalık sıklıkla hayatın 2. veya 3. Dekadında ortaya çıkmaktadır. Hastalık özellikle genç ve erkek hastalarda ağır seyretmektedir. Pediyatrik hastalarda da yine atak şiddeti daha yüksek olmaktadır. Hasta yaşının ilerlemesi ve kadın cinsiyet atak şiddetini azaltmaktadır [39].

2.5.1. Klinik Özellikleri

Behçet hastalığı ilk defa tekrarlayan oral aftlar, genital ülserler ve hipopiyonlu üveit tablosunun birlikte gözlendiği bir klinik tablo olarak Prof.Dr. Hulusi Behçet

tarafından yeni bir hastalık olarak tanımlanmıştır [40]. Sonrasında yapılan araştırmalarda Behçet hastalığı tüm damar çeşitlerini etkileyebilen bir vaskülit olarak tanımlanmıştır. Behçet hastalığında en sık tutulumlar oral aft, genital ülserler, cilt lezyonları (ankneiform lezyonlar, psödofolikülit, eritema nodozum ve süperfisyal trombofilebit) ve göz tutulumudur. Göz tutulumu en sık üveit şeklinde gerçekleşmekle birlikte daha nadir olarak hastalarda konjonktival ülserler de gözlenebilmektedir. Behçet hastalığında en sık damar tutulumu derin ven trombozu olmakla birlikte diğer pulmoner arter anevrizmaları, vena cava inferior tıkanıklıları, serebral ven trombozu gibi daha ciddi ve hayatı tehdit eden vasküler tutulumlar da gerçekleşebilemektedir. Behçet hastalarında yine bir diğer önemli sistemik etkilenme nörolojik tutulumdur. Parenkimal nörolojik tutulumda doğrudan beyin parankiminde inflmatuvar lezyonlar oluşmakta, özellikle beyin sapı tutulumu ciddi lokalizasyonların etkilenmesi hayati risk oluşturabilmektedir. Beyini etkileyen bir diğer tutulum ise serebral ven trombozu olup, kafa içi basınç artışı ve papilödem gelişimine neden olabilmektedir. Serebral ven trombozları her ne kadar bir beyin etkilenmesi olsa da patogenetik açıdan bir damar tutulumudur ve diğer damar tutulumları ile daha sık birliktelik gösterir. Behçet hastalığında morbiditenin en sık nedeni göz tutulumuyken, mortalitenin en sık nedenleri vasküler tutulum ve nörolojik tutulumdur [41, 42].

2.5.2. Behçet Hastalığı Sınıflandırma Kriterleri

Behçet hastalığı tanısı klinik olarak konulmakta olup, Behçet hastalığı tanısında doğrudan kullanılabilecek laboratuvar belirteci bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırmalarda tanı konulan hastaların standardize edilmeleri için belli sınıflandırma kriterlerinden faydalanılmaktadır. Behçet hastalığı sınıflandırılmasında sensitivite ve spesifisitesi en yüksek olan sınıflandırma kriteleri 1990 yılında uluslarası çalışma grubu (ISG) tarafından tanımlanan ISG kriterleridir [43]. Behçet hastalığı bir klinik tanıdır ve tüm Behçet hastalarının klinik araştırmalar için oluşturulmuş olan sınıflandırma kriterlerini karşılaması mümkün olmayabilmektedir. Özellikle majör organ tutulumu ile prezente olan hastalarda modern tedavilerin uygulanması ile diğer organ veya dokuların etkilenmesi engellenebilmekte ve bu hastaların ISG kriterlerini doldurması mümkün olamamaktadır. Bu nedenle organ tutulumlarının spesifik özelliklerine yönelik, oftalmoloji gibi branşlar için spesifik tanı kriterlerine ihityaç duyulmaktadır. ISG kriterleri ile yaşanmakta olan bu zorlukları aşmak amacıylar 2014 yılında Uluslararası

Behçet hastalığı Kriterleri (ICBD) tanımlanmıştır [44]. Ancak bu kriterlerin sensitivitesi yüksek olmak ile birlikte spesifisitesi oldukça düşüktür ve o nedenle bu kriterlerle Behçet hastası olmayan birçok diğer romatolojik hastalığa veya sistemik enfeksiyona sahip birey Behçet hastası gibi sınıflandırılabilmektedir. Spesifisite problemleri nedeniyle birçok araştırmacı hala Behçet hastalığı araştırmalarında daha eski ama spesifisitesi daha iyi olan ISG kriterlerini kullanmayı tercih etmektedir.

2.6. Üveit Tanımı

2.6.1. Genel Tanım

Üveit gözün vasküler dokularından (üvea; iris, siliyer cisim, koroid) intraoküler inflamasyonu tanımlamak için kullanılan bir şemsiye terimdir. Üveit terimi insanda 30'dan fazla klinik olarak farklı tipte intraoküler inflamasyonun eşlik ettiği heterojen bir hastalık grubunu tarif eder. Bu hastalıkların belli fenotipik özellikleri paylaşılmakta olup neredeyse tüm üveitlerde ortak olarak gözlenebilmektedir (ön kamara veya vitreusta inflamatuvar hücre varlığı gibi) Ancak bazı özgün tutulum veya lezyonlar (retinit, koroidit gibi) ise hastalağı spesifik olup ayırıcı tanıda yardımcı olmaktadır [45].

2.6.2. Oküler İmmün Ayrıcalık Mekanizmaları

Göz immünolojik olarak diğer organlarda bulunmayan önemli immün ayrıcalık mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar temel olarak 3 başlık altında listelenebilir:

1. Göz içi dokularının lenfatik drenajının olmaması
2. Kan göz bariyeri
3. Ön kamara ile ilişkili immün deviasyon

Göz içi dokularının lenfatik drenajı yoktur ve göz içi antijenlerine karşı lenf nodlarında doğrudan bir immün yanıt geliştirilmesi mümkün değildir. Göz içerisindeki dendirtik hücreler kana geçerek göz içerisindeki antijenlerin sunumunu dalakta gerçekleştirirler. Göz içerisindeki aköz humor sıvısındaki antijenler trabeküler ağ aracılığı ile Schlemm kanalına, oradan da episkleral venlere ve sistemik dolaşıma katılır [46].

Kandaki immün sistem hücrelerinin de kan-göz bariyeri nedeniyle intraoküler dokulara immünolojik olarak erişimi kısıtlanmıştır. Kan göz bariyerleri temel olarak ön kan göz bariyeri (kan aköz bariyeri) ve arka kan aköz bariyeri (kan iç retina bariyeri, kan dış retina bariyeri) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kan iç retina bariyeri retina damarları etrafındaki sıkı bağlantılardan oluşmakta ve kan beyin bariyeri gibi sadece immün sistem hücrelerinin geçişini engellemek üzere gerçek bir fiziksel bariyer özelliği göstermektedir. Kan iç retina bariyerini endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ve retinadaki Müller hücrelerinin ayaksı çıkıntıları oluşturmaktadır. Kan aköz bariyeri ve kan dış retina bariyeri ise eğitici kapı özelliği barındırmaktadır. Kan aköz bariyeri; siliyer cisim epiteli arasında sıkı bağlantılar, damar endotelindeki fenestrasyonları ve epitel ile damar endoteli arasınki immünmodalütuvar ortamı (TGF-β, IDO, TSP1 gibi sitokiner ve CTLA-4 gibi immün kontrol noktası reseptörü ligandları) içerir. Dış kan retina bariyeri ise; retina pigment epiteli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, koriyokapillariste fenestrasyonlar ve immünmodalütuvar özellikler (IL-10, TGF-β, TSP1 gibi sitokinler ve PD-1 gibi immün kontrol noktası reseptörleri) içerir [47].

Göz içerisindeki 3. ve en önemli immün ayrıcalık mekanizması ise ön kamara ile ilişkili immün deviasyon olarak adlandırılan bir mekanizmadır. Göz içerisindeki antijenler göz içerisinde $F40/80^{+}$ tolerejenik dendritik hücreler tarafından dalağa taşınır. Dalakta splenik marjinal bölgede tolerejenik dendritik hücreler tarafından naif T hücrelerine sunularak, regülatör T hücre farklılaşması sağlanır. Bu şekilde göz içerisindeki antijenlere yönelik, antijen spesifik regülatör T hücre yanıtı gelişmesi ile göze özel bir periferik tolerans mekanizması aktifleşir [48].

2.6.3. Üveit İmmünopatogenezi

İntraoküler inflamasyonun daha iyi anlaşılabilmesi için hayvan modelleri geliştirilmiş ve bu modeller üzerinden patogenez anlaşılmaya çalışılmıştır. Klasik model eksperimental otoimmün üveit modeli olup, retinal antijenler ve Freud adjuvanının hayvana (fare, sıçan veya tavşan) uygulanması ile oluşturulmaktadır. Bu modelde Freud adjuvanı kullanımı ile de ilişkilendirilebilecek şekilde Th1 yanıtı baskındır. Endotoksin ile uyarılmış üveit modelinde ise LPS'in lokal veya sistemik enjeksiyon ile kan aköz bariyerinin açılması ve akut iris/siliyer cisim inflamasyonu oluşması sağlanmaktadır. Bu

modelde akut tablo ile ilişkli olarak nötrofilik inflamasyon ön plandadır. Enfeksiyöz üveitlerin modellemesi için ise ilgili deney hayvanında hedeflenen patojen mikroorganizma (*Micobacterium tuberculosis*, *Herpes simplex* virus gibi) hastalık oluşturulmaktadır. Unutmamak gerekir ki tüm hayvan modellerinde doğal hastalıktan farklı olarak bir immünolojik müdahale yapılmakta ve immün yanıtlar bizim etkilediğimiz yolak üzerinden aktifleşmektedir. Dolayısı ile hastalığın doğal seyrini ve immünolojik özelliklerini kusursuz olarak yansıtması mümkün olmamaktadır. Ancak etik bariyerler nedeniyle insanda uygulanamayacak bir çok detaylı analizin yapılabilmesi sayesinde (bu bilerek çarpıtılan veri ile de olsa) doku yanıtlarının daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır [49].

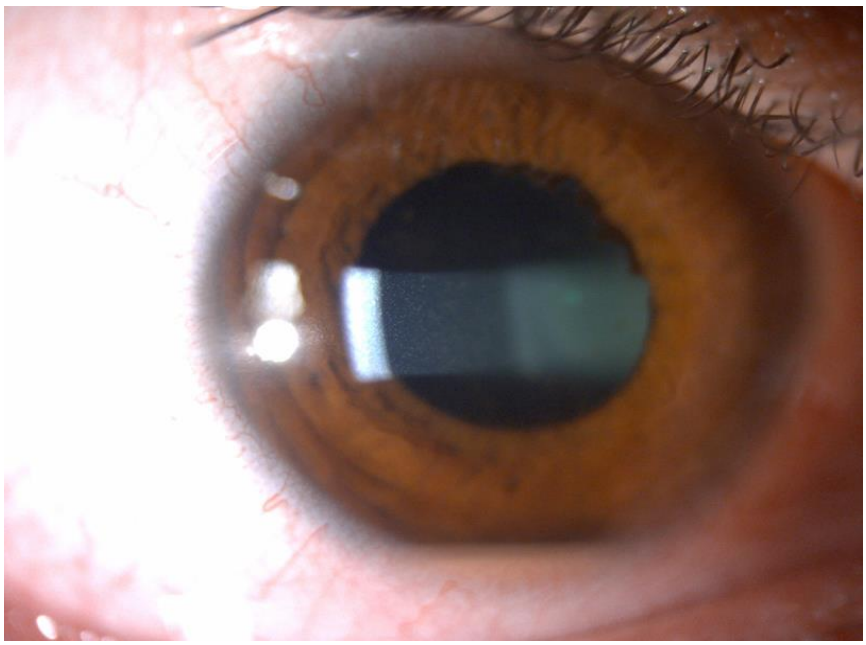
İnsan dokularında incelemeye yönelik örnek alınabilmesi için, göz gibi hassas bir organ açısından oldukça zorlu etik bariyerler bulundurmaktadır. Buna rağmen klinik olarak uygun seneryolarda yapılan akan hücre ölçer incelemelerinde göz içindeki immün hücrelerin hastalık çeşidine göre farklılık göstermekte olduğu bilinmektedir. Genel olarak akut retinal nekroz (Herpes simpleks arka üveiti), sarkoidoz, tüberküloz gibi hastalıklardan elde edilen veriler Th1 ve Th17 hücrelerinin patogenezdeki rollerine işaret etmektedir. NK hücreleri ile ilgili ise göz materyalinden elde edilmiş veri oldukça kısıtlıdır. Vogt Koyanaghi Harada (VKH) hastalığında doğal bağışıklık sistemi hücrelerinden monositlerin transkriptomik özelliklerinde değişimler, ankilozan spondilit hastalarında ise plazmositoid dendritik hücrelerde transkriptomik değişimler tanımlanmıştır. Yine VKH hastalığında Th1 yanıtının Behçet ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu, Behçette ise $CD8^+$ T hücre yanıtının VKH'den daha fazla etkilendiği gösterilmiştir. Ancak bu kısıtlı veriler patogenezin tüm süreçlerini ve yolaklarını değerlendirmek için oldukça yetersiz olup, tüm patogenetik yolakların ve etkileşimlerinin daha iyi analiz edilip, anlaşılacağı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [49].

2.6.4. Behçet Üveitinin Klinik Özellikleri

Behçet hastalığında en sık majör organ tutulumu gözde gerçeklemekte olup, gözdeki en sık etkilenme üveit şeklinde ortaya çıkmaktadır. Behçet hastalığı ayrıca ülkemizde non-enfeksiyöz üveit neden olan hastalıklar arasında en sık olanıdır (%24.9)

[50]. Ülkemizde Behçet hastalığı çocukluk çağı üveitlerinin de en sık nedenleri arasında yer almaktadır (%9.3) [50]. En sık ve şiddetli göz tutulumu panüveit şeklinde olup, bu hastalık genç erkeklerde daha şiddetli seyretmektedir ve prognozu daha kötüdür [51]. Behçet üveinde en sık etkilenmeler bilateral, tekrarlayıcı, non-granülomatöz panüveit ve retinal vaskülit şeklindedir. Behçet hastalarının %50-70'inde üveit izlenmiştir [52]. Behçet hastalarının %20'sinde göz şikayetleri hastanın tedavi arayışı ile doktora başvurmasını ve Behçet hastalığı tanısı konulmasını sağlamaktadır [35].

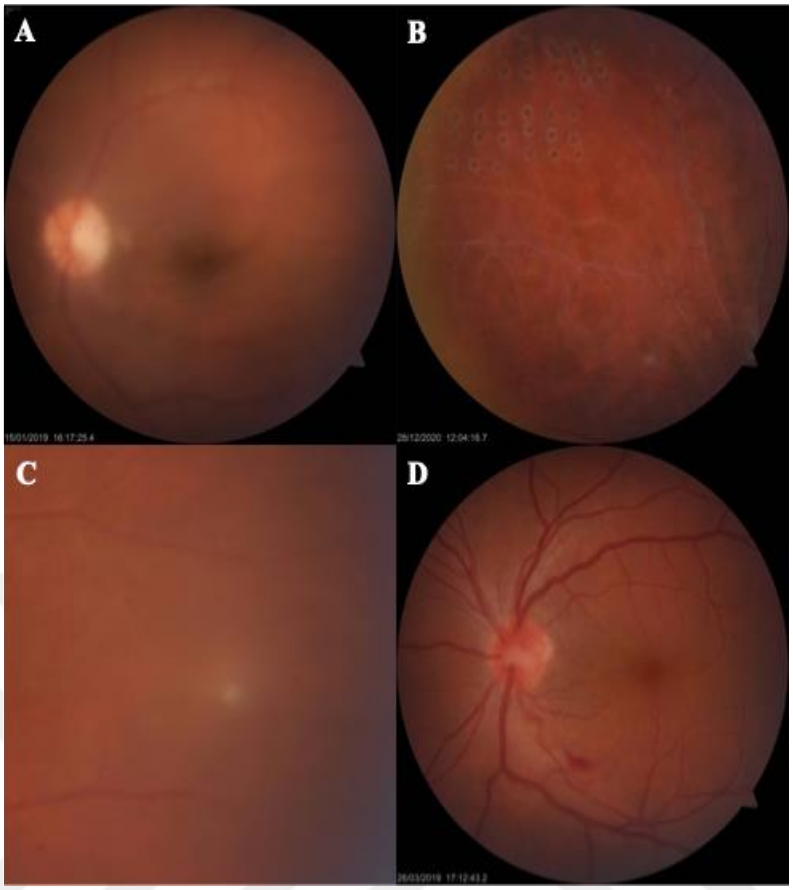
Behçet üveitinde ön segment muayenesi yapıldığında korneada ince non-granülmatöz keratik presipitatlar, ön kamarada inflamatuvar hücreler izlenmektedir. Şiddetli ön segment inflamasyonu tedavisiz kaldığında bu reaksiyon ilerlemekte ve ön kamarada yer çekimi etkisi ile inferirörde bir hücre birikimine neden olmaktadır ki bu hücre birikimi hipopiyon olarak adlandırılmaktadır. Behçet hastalığında hastalık şiddeti yüksek olduğu durumlarda daki fibrinöz eksüda kliniği ön planda değildir ve bu nedenle Behçet hastalığında hastanın baş poziyonu değiştiğinde fibrinöz eksüdanın yer değiştirdiği görülmektedir. Ankilozan spondilit gibi fibrinöz eksüda gelişiminin ön planda olduğu inflamatuvar hastalıklarda ise eksüda varlığına bağlı olarak inferiordaki hipopiyon hücreleri yapışıktır ve baş poziyonu değişimi ile yer değiştirmezler [53].



Şekil 4. Behçet üveiti hastasında ön kamarada seçilen inflamatuvar hücreler ve hipopiyon

Fotoğrafta aktif Behçet üveiti hastasına ait ön segment bulguları görülmektedir. Konjonkitva damarlarında siliyer enjeksiyon olarak adlandırılan sirküler damar dilatasyonuna bağlı olarak hastanın kırmızı gözü vardır. Ön kamarada ışık huzmesinin içerisinde inflamatuvar hücreler ve ışık huzmesinde aköz flare olarak adlandırılan protein sızıntısına bağlı sarı renk değişikliği seçilmektedir. Ön kamaradaki hücrelerin inferiorde çökerek hipopiyon oluşturmuştur. Göz bebeğinin sağ üst köşede lens ile yapışıklık oluşturduğu yani iris ve lens arasında posterior sineşi geliştiği görülmektedir.

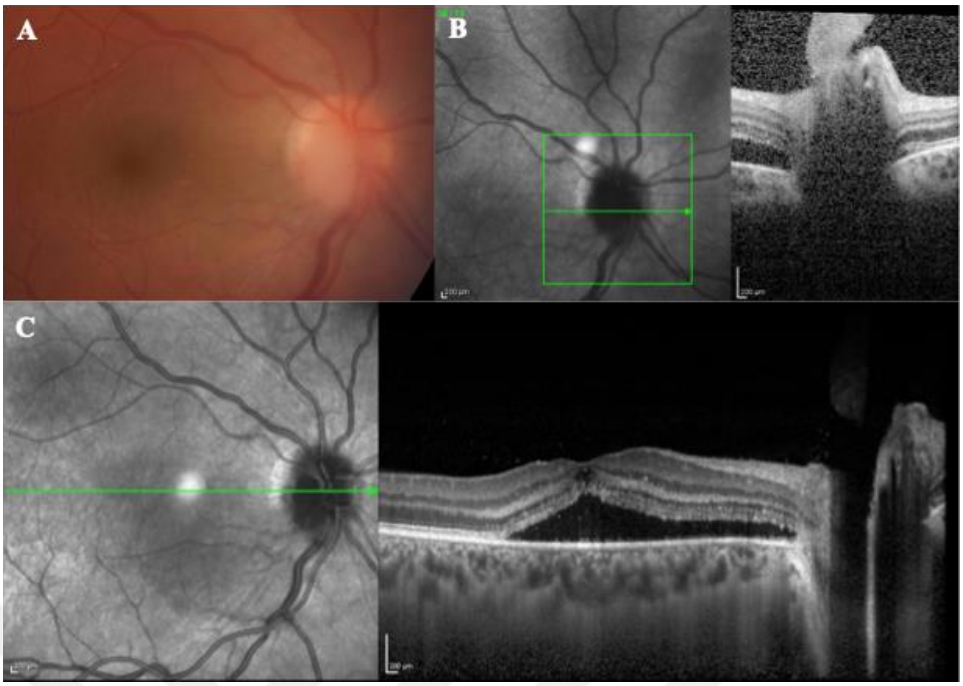
Behçet hastalığında arka segment tutulumuna ait bulgular hem hastalığın spesifik tanısının konulabilmesi için hem de kalıcı görme azalmasına neden olabilecek sekel riski nedeniyle daha önemlidir. Vitreus bulanıklığı ve vitreusta inflamatuvar hücre varlığı Behçet üveitinde sık izlenen bir bulgudur. Retinada retinal vaskülit alanları, perivaskülar kılıflanmalar, retinit odakları izlenmektedir. Şiddetli intraoküler inflamasyon ile birlikte bu hastalarda kistoid maküla ödemi ve optik disk inflamasyonu da izelenebilmektedir. Retinal vaskülit nedeniyle retinal iskemi alanlarının oluşması, buna bağlı optik disk neovaskülarizasyonu ve retinal neovaskülarizasyon gibi komplikasyonlara neden olabilmektedir. Behçet üveiti hastalarında fundus fluorescein anjiyografisi (FFA) ile yapılan görüntülemeler hastalığın arka segmentteki inflamatuvar yükünün değerlendirilmesi ve subklinik inflamatuvar aktivitenin takibi açısında oldukça önemlidir. Bu hastalarda en spesifik FFA bulgusu periferik retinal damarlarda eğrelti otu şeklinde periferik vasküler kaçaklardır. Hastalığın aktif döneminde bazı hastalarda ayrıca inferiorde periferik vitreusta kolye gibi yan yana dizilmiş beyaz inflamatuvar vitreus kondansasyonu alanları görülebilmektedir, ki bu bulgular vitreus incileri olarak adlandırılmaktadır. Behçet üveitinde retinadaki sarı beyaz retinit alanları fundus muayenesinde gözle görünür sekeller bırakmamak ile birlikte optik korerens tomografi (OCT) çihazı ile görüntülemelerde bu bölgede retina sinir lifi kaybı oluştuğu ve retina tabakalarındaki hücre hasarına bağlı olarak bu bölgede retinada çimdiklenmiş gibi bir görüntüye neden olacak şekilde dokunun incelmektedir [53].



Şekil 5. Behçet üveitine bağlı arka segment bulguları

Şiddetli ataklarda vitreus bulanıklığı retina detaylarının seçilmesini zorlaştırabilmektedir (A). Retinal vaskülit geçirmiş bir hastada hayalet damarlar ve iskemi alanına yapılmış olan lazer tedavisi dikkat çekmektedir (B). Behçet hastalığında en sık izlenilen retina bulguları arasında yer alan sarı beyaz renkli retinit odağı seçilmektedir (C). Şiddetli arka segment enflmasyonuna bağlı retinal vaskülite bağlı retinal hemoraji alanı ve optik disk inflamastonuna bağlı optik disk hiperemisi seçilmektedir (D).

Behçet hastalığında yukarıda bahsedilen üveit tutulumlarından farklı olarak nöroretinit tablosu da oluşabilmektedir. Behçet hastalığına bağlı nöroretinite optik sinir başı üzerinde vitreus kondansasyonu sıklıkla eşlik etmektedir. Bu klinik görüntü nöroretinitin en sık sebebi olarak bilinen bakteriyel enfeksiyonlarda (Batronella hanselae, Brucella melitensis, Borrelia burgdorferi gibi) ise çok nadirdir. Bu bulgu bu nedenle Behçet hastalığı nöroretinitinin tanınması için değerlidir.



Şekil 6. Behçet hastalığına bağlı nöroretinit

Renkli fundus fotoğrafında optik sinirin enflame olduğu, sınırlarının silik olduğu ve optik sinir üzerinde vitreus kondansasyonu izlenmektedir (A). Optik sinir başına yönelik optik koherens tomografi görüntülemesinde optik sinir üzerinde vitreus kondansasyonu ve optik sinir ödemi seçilmektedir (B).

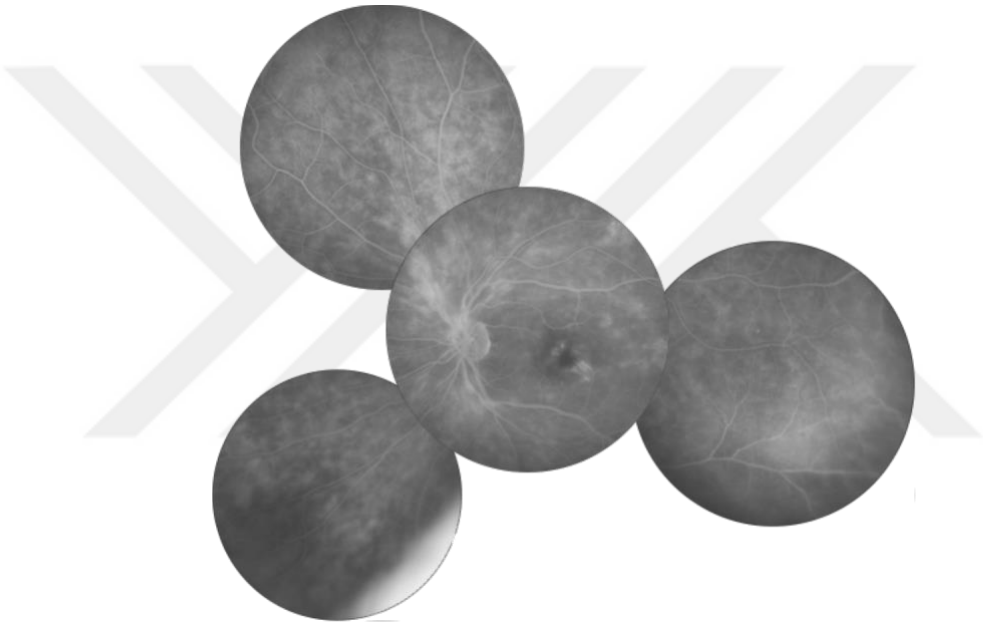
2.6.5. Behçet Üveitinde Tedavi

Behçet üveitinin tedavisinde klinik bulguların doğru tanımlanması, klinik remisyon oluşturulması ve remisyonun korunması önemlidir. Uzun süreli tekrarlayan hasarlar kalıcı görme azalması veya görme kaybına neden olabilmektedir [53].

Behçet üveitinde atak tedavisinde yüksek doz kortikosteroidler (topikal damlalar, oral steroid tabletleri, intravenöz pulse steroid tedavileri, lokal steroid enjeksiyonları veya intravitreal deksametazon implant şeklinde), infliximab veya interferon-alfa tedavisi kullanılarak klinik remisyon elde edilebilmektedir. Atak tedavisinin amacı görmeyi geri kazanmak ve doku hasarını engellemektir[54].

Arka segmenti etkileyen inflamasyonu olan tüm Behçet üveiti hastalarının tedavisine azatiyopurin, siklosporin, interferon alfa veya monoklonal anti-TNF (adalimumab, infliksimab) ilaçlarının kullanılması önerilmektedir. Sistemik immunosupresiflerin özellikle genç yaş, erkek cinsiyet ve erken yaşta hastalığın başlamış

olması gibi kötü prognoz faktörleri olan hastalarda kullanılması düşünülmelidir. Kronik subklinik inflamasyonu kontrol altına almak nükslerin engellenmesi ve remisyon sağlanması ile görmeyi korumaktır. Konvasiyonel immunosupresifler (azatiyopurin, siklosporin) ile atak gelişmesi engellenemeyen veya steroid bağımlılığı oluşan hastalarda bir sonraki basamakta arak üveitte klinik kullanım için onayı olan tek biyolojik ajan adalimumab'dır. Adalimumab tedavisi yanıtsızlığında ilaç uygulama sıklığı arttırılabilemkte veya endikasyon dışı olarak tanımlı ancak tedavi rehberlerinde (EULAR) belirtilmiş olan interferon-alfa veya infliksimab gibi ilaçlar kullanılmaktadır [55].



Şekil 7. Fundus florescein anjiyografisi ile Behçet üveitinin değerlendirilmesi

Klinik atak bulguları olmayan hastanın tedavisinin düzenlenmesi için çekilen fundus florescein anjiyografisinde yaygın periferik vasküler kaçak varlığı, optik disk hiperfloresansı ve makülada inflamatuvar vasküler sızıntılar izlenmektedir. Bu görüntüleme sonrasında subklinik aktivasyonun ve dolayısı ile doku hasarının devam ettiği anlaşılan hastanın anti-TNF (adalimumab) tedavi sıklığı arttırılmıştır.

2.7. Behçet Hastalığı Patogenezi

2.7.1. Behçet Hastalığının Genetik ve İmmünolojik Özellikleri

Behçet hastalığının etyolojisi tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte, genel olarak kabul gören görüş; genetik yatkınlığı bulunan bireylerde mikrobiyal bir etkenin ve/veya çevresel faktörlerin belirli immünolojik bozuklukları tetikleyerek hastalığın ortaya çıkmasına neden olduğu yönündedir. Hastalık patogenezi ile ilişkili olarak bugüne dek gösterilmiş en güçlü genetik bağlantı HLA-B51 (insan lökosit antijeni-B51) ile saptanmıştır. Bu ilişkinin varlığı farklı etnik popülasyonlarda da doğrulanmıştır. HLA-B51'in hastalık mekanizmalarında doğrudan rol alması olası olmakla birlikte, HLA-B bölgesine komşu başka bir yatkınlık geninin bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) nedeniyle bu ilişkiye eşlik ediyor olması da ihtimal dahilindedir. [56]. Bununla birlikte, HLA-B51 en iyi bilinen genetik risk faktörü olmasına rağmen, toplam genetik riskin %20'den daha azını açıklamaktadır. Tüm genom ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS) HLA-B51'in Behçet hastalığının patogenezindeki belirgin konumunu yeniden teyit etmiştir. Bununla birlikte IL-10, IL-23R, CCR1, STAT4, KLRC4, GIMAP2/GIMAP4 ve UBAC2 gibi çeşitli gen bölgelerinin de farklı etnik popülasyonlarda Behçet hastalığı ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir [57]. HLA-B*51'i kodlayan insan lökosit antijen genine ilave olarak yapılan GWAS çalışmaları ile Türk ve Japon populasyonunda MHC sınıf I genleri, IL-10 ve IL-23R-IL12RB2'i genlerinin bulunduğu bölgelerde Behçet hastalığı ile ilişkili ortak varyantlar tespit edilmiştir [58]. Bu çalışmalardan başka GWAS çalışmaları C-C kemokin reseptör-1 (CCR1) geni, STAT4, öldürücü hücre lektin benzeri reseptör gen kompleksi (KLRK1, KLRC1, KLRC2, KLRC3 ve KLRC4) ve endoplazmik retikulum aminopeptidaz geni (ERAP-1) ile Behçet hastalığı arasında ilişki tanımlamıştır [59].

2.7.2. Behçet Hastalığında NK Hücre Yanıtları

Otoimmün hastalıklarda NK hücre oranın ve sitotoksik aktivitelerinin azaldığı gösterilmiş ve NK hücrelerinin otoimmünitenin kontrolünde koruyucu rol oynayabileceği düşünülmüştür [60, 61]. Hasan ve arkadaşları tarafından Behçet hastalığı periferik kanında NK hücrelerinin azaldığı ve bu azalmanın hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak Behçet hastalığında $CD56^{bright}CD16^{-}$ ve $CD56^{dim}CD16^{+}$

NK hücrelerinin periferik kanda sağlıklı kontrole göre azaldığı bulunmuştur [62]. NK1 hücre oranlarında artışla birlikte Behçet hastalarında NK2, NK17 ve IL-10-salgılayan hücrelerde sağlıklı gruba göre azalma olduğu ve benzer sitokin profillerinin mukozal deri tutulumu olan Behçet hastalarında gözlemlendiği tarafımızca gösterilmiştir. $CD16^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ NK1 hücre alt grubu ve NK1/NK2 oranındaki artış muko-kutanöz deri tutulumu olan Behçet hastalığı patogenezinde IFN-γ dominant immün yanıtı destekler niteliktedir. Aynı çalışmada NK hücre sitotoksik aktivitesi, aktivatör reseptör ekspresyonu ve degranülasyon oranlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır [63]. NK1 hücreleri tarafından artmış IFN-γ salınımı ile birlikte NK2, NK17 ve NK regülatör hücreler inhibe olabilir. NK1/NK2 paradigmasının patojenik Th1 veya Th2 yanıtlarını kontrol edebilir. Diğer bir çalışmada Behçet hastalığında remisyonunda NK2 polarizasyonuna kayarak aktif rol oynadığını göstermiştir. NK hücrelerindeki Th1 benzeri immün yanıtların NK2 hücre fenotipine kayması Behçet hastalarında hastalık remisyonunu sağlıyor olabilir [64]. Üveit tutulumu olan Behçet hastalarında yapılan diğer bir çalışmada hastalığın relaps döneminde NK1 hücre, remisyon döneminde ise NK2 hücre alt grubunun arttığı gösterildi. Remisyon döneminde IL-10 salgılayan regülatör NK hücrelerindeki artış inflamatuvar süreçlerin kontrolünde rol oynayabilir [65].

2.7.3. Behçet Hastalığında Anti-tümör Nekrozis Faktör-α Tedavileri

Anti-TNF tedaviler, konvansiyonel immünosupresif tedavilere yeterli yanıt alınamayan olgularda tercih edilmektedir. Behçet hastalığında TNF-α ile ilişkili yolakların patogenezde önemli olabileceğine işaret eden bazı bulgular vardır: Behçet hastalarında serum ve aköz hümorde TNF-α düzeylerinin artmış bulunması, çözünebilir TNF reseptör düzeylerinin yüksek seyretmesi ve hastalık aktivitesi ile paralellik göstermesi, TNF-α üreten hücre sayısının hastalığın aktif dönemlerinde artması, ayrıca deneysel modellerde TNF-α'nın üveit gelişiminde rol oynadığının gösterilmesi bunlar arasında sayılabilir. Bu veriler anti-TNF ajanlarının Behçet hastalığının tedavisinde kullanımına yönelik güçlü bir gerekçe oluşturmuştur [66]. TNF-α inhibitörleri genel olarak TNF-α reseptör füzyon proteinleri (etanersept), kimerik monoklonal antikorlar (infliksimab), tamamen humanize monoklonal antikorlar (adalimumab) ve PEGlenmiş monklonal antikorlar (certolizumab pegol) şeklinde sınıflandırılabilir. Adalimumab hem

serbest hem de membrana bağlı TNF-α'ya bağlanarak TNF-α–reseptör etkileşimini ve buna bağlı sinyal iletimini engelleyen, insan kaynaklı (humanize) monoklonal IgG1 antikorudur. İnfliksimab tedavisine dirençli olgularda adalimumabın etkinliğini gösteren olgu serileri bulunmakta olup bu hastalarda adalimumab kullanımı ile kortikosteroid ve diğer immünsupresif ajan ihtiyacının azaldığı da gösterilmiştir [67]. Behçet üveitli 40 hastada yapılan bir çalışmada; Adalimumab tedavisinin atak sayısını azalttığı, FFA bulgularında iyileşme sağladığı, kortikosteroid dozunu azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir [68]. TNF-α T hücreleri, makrofajlar, NK ve NKT hücreleri başta olmak üzere çeşitli immün hücreler tarafından üretilen bir sitokindir. TNF-α üretiminin artması, hem insan çalışmalarında hem de deneysel hayvan modellerinde çok sayıda hastalıkta doğal immün yanıtın şekillenmesinde önemli rol oynayarak inflamatuvar süreçlerin devamı önemli rol oynar [69]. TNF-α'nın biyolojik olarak 2 aktif formu bulunur. Transmembran TNF-α (tmTNF) bir metalloproteinaz enzimi olan TACE (TNF-α - converting enzyme) tarafından homotrimerik solubil TNF-α'ya dönüştürülür [70]. TNF-α biyolojik etkilerini TNFR1 (CD120a) ve TNFR2'ye (CD120b) bağlanarak göstermektedir [71]. TNFR1 tüm lenfoid ve myeloid immün sistem hücrelerinde eksprese edilirken TNFR2 ekspresyonu T hücre ve NK hücreleri ile sınırlıdır.

2.8. Anti-tümör Nekrozis Faktör-α Tedavilerinin Etki Mekanizmaları

Genel olarak, TNF-α immün sistem üzerindeki etkilerini TNFR1 aracılığıyla göstermekte ve bağlanma sonrası ölüm domeni içeren bir sinyal iletim yolağı başlamaktadır. Dolayısıyla TNFR1 pro-apoptotik süreçlerle ilişkili iken TNFR2'nin immün sistemi üzerinde rol oynadığı düşünülmektedir [69]. İlginç olarak tmTNF iki yolla sinyal iletebilmektedir. tmTNF her iki TNF reseptörü için ligand olarak iş görebilir veya hücre-hücre temasında kendi bir reseptör olarak rol oynayabilir. Böylece tmTNF eksprese eden hücreler TNFR1 veya TNFR2 taşıyan hücrelere sinyal gönderebilmektedir. Bu fenomen 'dıştan-içe' veya 'ters sinyalleşme olarak adlandırılmakta fakat henüz mekanizması tam bilinmemektedir [72]. tmTNF'nin reseptör fonksiyonu insan monosit, makrofaj, NK ve T hücrelerinde gösterilmiştir. TNFR1 hem tmTNF hem de sTNF ile, TNFR2 ise sadece tmTNF ile aktive olmaktadır. Her iki membrana bağlı reseptör TACE'ye duyarlıdır ve böylece solubil TNF reseptörleri (sTNF) oluşmaktadır. Buna karşılık, sTNFR dolaşımdaki TNF'i yakalayıp nötralize ederek hücresel TNF yanıtlarının düzenlenmesine katkıda bulunabilir ve intrinsik bir TNF regülatörü olarak da rol

oynayabilir. Ek olarak, artan reseptör dökülmesinden dolayı fonksiyonel membran TNFR'lerinin sayısı azalmakta ve bu durum geçici bir TNF duyarsızlaşmasına neden olmaktadır [70]. Adalimumab tmTNF ifade eden hücrelere efektör Fc bölgeleri (IgG1) ile bağlandıktan sonra NK hücrelerinde antikora bağımlı sitotoksisite (ADCC), klasik kompleman yolu aktivasyonu ve apoptoza neden olur [72]. Romatoid artrit hastalarında adalimumabın monosit yüzeyinde tmTNF ekspresyonunu arttırdığı, tmTNF ile Treg üzerindeki TNFR2 etkileşime girerek Treg hücrelerinin immünosupresif aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir [73]. TNF-α'nın IL-2 etkisiyle oluşan NK hücre farklılaşması, aktivasyonu ve sitotoksik aktiviteyi *in vitro* olarak arttırdığı gösterilmiştir [74, 75]. Yapılan bir araştırmada insan kanı NK hücrelerinin her iki TNF reseptörü (TNFR2> TNFR1) eksprese ettiği, IL-2-/IL-12-uygulanmış kültürlerde TNFR2 agonisti antikorlara benzer şekilde IFN-γ salınımının arttığı bulunmuştur. Deney sonuçları TNFα-TNFR2 yolağının sitokin ile indüklenen NK hücrelerinde gözlemlenen IFN-γ artışındaki önemini desteklemektedir [76]. Dolayısıyla TNFR2 aracılığıyla *in vivo* ve *in vitro* şartlarda NK hücrelerinde IFN-γ salınımında artış oluşarak adaptif ve doğal immün yanıtlarda bu reseptör önemli rollere sahiptir. TNF-α inhibisyonunun NK hücrelerinde CD69 ekspresyonunu azalttığı yani aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmesine rağmen tam olarak etki mekanizması bilinmemektedir [77]. Hücre içi patojenler ile mücadele ve anti-tümoral yanıtta önemli rolleri olan TNF-α molekülünün adalimumab ile bloke edilmesinin, NK hücre alt grupları üzerine etkileri daha önce gösterilmemiştir. Sadece Ankilozan spondilit hastaları arasında NK hücreleri arasında üzerinde CD8 ekspresyonu yüksek olanların fazla olmasının adalimumab tedavisine iyi yanıt için bir gösterge olduğu bilinmektedir [22].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının amacı, NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinin daha iyi anlaşılmasıdır. NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi üzerinde literatürde etkileri ayrıntılı olarak tanımlanmamış üç farklı mekanizma, klinik ve deneysel yaklaşımların birlikte kullanıldığı bütüncül bir tasarım ile incelenmiştir. Yukarıda tanımlanan her bir mekanizmanın ayrıntılı biçimde incelenebilmesi için, çalışmanın amaçlarına uygun olacak şekilde birbirini tamamlayan ancak metodolojik olarak bağımsız deney tasarımları oluşturulmuştur. Bu kapsamda her bir deney tasarımında farklı bir denek grubu yer almış, farklı immünolojik etkiler bağımsız olarak incelenmiştir. Bu deneysel yaklaşımlar, aşağıda üç ayrı alt başlık halinde sırasıyla ayrıntılı olarak sunulmuştur.

3.1. İMMÜN KONTROL NOKTASI RESEPTÖRLERİNİN NK HÜCRE FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu basamakta NK hücreleri üzerinde eksprese edilen immün kontrol noktası reseptörlerinin, NK hücrelerinde yol açtığı fenotipik ve fonksiyonel değişiklikler değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, farklı immün kontrol noktası reseptörlerini taşıyan NK hücre alt gruplarının sitokin üretim profilleri, sitotoksik aktiviteleri ve düzenleyici özellikleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

3.1.1. Gönüllülerin Seçimi

Bu çalışmaya 30 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Tüm katılımcılardan 10 ml periferik venöz kan örneği heparin kaplı kan alma tüplerine (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) alınmıştır. Katılımcıların demografik özellikleri ve dahil edilme kriterleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

3.1.2. Periferik kan mononükleer hücrelerinin izolasyonu

Periferik kan örnekleri sağlıklı donörlerden alınmış, heparinli tüplerde toplanmıştır. PKMH üretici firmanın protokolüne uygun olarak Ficoll-Hypaque ayırma ortamı (Biochrom AG, Berlin, Almanya) kullanılarak izole edilmiştir. Bu amaçla periferik kan örnekleri 1:1 oranında Ficoll-Hypaque ayırma ortamı üzerine yayılarak 20 dakika boyunca 20°C'de, 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir. İnterfaz tabakasındaki PKMH'ler pastör pipeti yardımıyla ayrılarak, 1x Dulbecco'nun fosfat tampon tuzu (PBS) (Sigma Chem. Co., MO, USA) ile seyreltilmiştir. 5 dakika 1800 rpm'de 4°C'de yeniden santrifüj edilip, 1 ml RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) ortamına aktarılmıştır. Hücre canlılığı, tripan mavisi (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ile boyama yapılarak değerlendirilmiş ve hücre sayımı hemositometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal dana serumu (FCS), %1 penisilin/streptomisin %1 kanamisin %1 L glututimin, %1 MEM non-esantyal amino asit, %1 MEM -vitamin, %1 sodyum purivat (Sigma, St. Louis, MO, USA) içeren RPMI 1640 besiyerinde

(zenginleştirilmiş RPMI-1640) son konsantrasyonları 2 × 10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 1. İmmün Kontrol Noktası Reseptörlerinin NK Hücre Fonksiyonları Üzerine Etkilerinin İncelendiği Gönüllülerin Demografik Özellikleri ve Dahil Edilme Kriterleri

Ortalama Yaş, yıl ± SD:	40,3 ± 7
Cinsiyet:	
- Erkek, n (%):	13 (%)
- Kadın, n (%):	17 (%)
Dahil edilme kriterleri:	- Son 1 ay içerisinde enfeksiyon geçirmemiş olmak - Bilinen immün sistem hastalığı veya bağışıklık sistemini etkileyen kronik hastalık olmaması - 18 yaşından büyük olmak
Hariç tutulma kriterleri:	- Çalışmaya dahil edilmeden önce SARS-CoV-2 enfeksiyonu veya mRNA COVID-19 aşılanma öyküsü bulunması - Çalışma öncesinde immünnosupresif veya biyolojik tedavi alma öyküsü (interferon-alfa, anti-TNF veya anti-IL-6 gibi) - Son 1 ay içerisinde enfeksiyon geçirmemiş olmak - Bilinen immün sistem hastalığı veya bağışıklık sistemini etkileyen kronik hastalık olmaması

Tablo 2. Deneysel aşamalarada kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Üretici
NovoCyte akan hücre ölçer	Acea Biosciences, USA
FACSAria II	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Etüv	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Nüve LN 120 Laminar kabin	Nüve, Ankara, Türkiye
MidiMACS™ separatör	Miltenyi Biotec, Almanya
NF1200R Santrifüj cihazı	Nüve, Ankara, Türkiye
Nüve NF1000R Santrifüj cihazı	Nüve, Ankara, Türkiye
+4 ºC Buzdolabı	Arçelik, İstanbul, Türkiye
-20 ºC Buzdolabı	Arçelik, İstanbul, Türkiye
Bio Vortex V1 Vorteks cihazı	Biosan, Kocaeli, Türkiye
Micro Pipet seti	Gilson-Pipetman, Middleton, WI, USA

3.1.3. NK hücre alt gruplarının karakterizasyonu ve immün kontrol noktası reseptör ekspresyonlarının değerlendirilmesi

Taze izole edilen PKMH'ler, NK hücre alt gruplarındaki inhibitör reseptör ekspresyonlarını değerlendirmek amacıyla florokrom konjuge anti-human CD3–Brilliant Violet 785™, anti-human CD16–Brilliant Violet 570™, anti-human CD56–Brilliant Violet 711™, anti-human CD223 (LAG-3)–FITC, anti-human TIGIT (VSTM3)–PE, anti-human CD152 (CTLA-4)–APC ve anti-human CD279 (PD-1)–APC/Cyanine7 (tamamı BioLegend, San Diego, CA, USA) monoklonal antikorlar ile boyanmıştır. Hücreler, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir. Analizlerde izotipik kontrol olarak fluorescence minus one (FMO) kontrolleri ve otofloresans tüpleri kullanılmıştır. Hücreler PBS ile iki kez yıkandıktan sonra %1 paraformaldehit içeren 300 µL PBS içinde süspanse edilerek Novocyte akan hücre ölçer cihazı (Acea Biosciences, USA) ile analiz edilmiştir. Verilerin analizi FlowJo 10.2 yazılımı (Tree Star Inc., USA) kullanılarak yapılmıştır. NK hücre alt grupları, daha önce tanımlandığı şekilde CD16 ve

CD56 ekspresyon düzeylerine göre altı gruba ayrılmıştır. Bu sınıflandırma; $CD56^{bright}CD16^{-}$, $CD56^{bright}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ NK hücrelerini kapsamaktadır.

3.1.4. NK hücre alt gruplarının sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi

NK hücre sitotoksisitesi, K562 hedef hücre stimülasyonu varlığında ve yokluğunda CD107a, perforin ve granzim A ekspresyonlarının değerlendirilmesi ile analiz edilmiştir. K562 hücre hattı, MHC sınıf I moleküllerini eksprese etmeyen, yüksek derecede farklılaşmamış bir insan eritrolösemi hücre hattı olup NK hücrelerine oldukça duyarlıdır. PKMH'ler, yukarıda tanımlanan tam RPMI-1640 besiyerinde, 10:1 efektör:hedef oranında K562 hedef hücreleri (ATCC CCL-243) ile anti-human CD107a–PE/Cy5 (BioLegend, San Diego, CA, USA) monoklonal antikoru varlığında 37°C'de 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Uyarım sonrasında hücreler anti-human CD3–Brilliant Violet 785™, anti-human CD16–Brilliant Violet 570™, anti-human CD56–Brilliant Violet 711™, anti-human CD223 (LAG-3)–FITC, anti-human TIGIT (VSTM3)–PE, anti-human CD152 (CTLA-4)–APC ve anti-human CD279 (PD-1)–APC/Cyanine7 monoklonal antikorları 20 dk oda ısısında inkübe edilmiştirArdından PBS eklenerek 5 dk 1800 rpm de santrifüj edilerek yıkanmıştır. Hücre içi boyama Cytofix & Cytoperm kiti (Cytofix & Cytoperm kiti, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) kullanılarak yapılmıştır.Hücreler 150 ul fiksasyon tamponu eklenerek 15 dk karanlıkta inkübe edilerek fikse edilmiş ve ardından yıkanarak permeabilizasyon solüsyonu (1x) ve anti-human perforin–PerCP-eFluor 710 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ve anti-human granzim A–Alexa Fluor 700 (BioLegend, San Diego, CA, USA) antikorları eklenerek 30 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 300 ul PBS eklenerek akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir.

3.1.5. NK hücre alt gruplarında sitokin düzeylerinin ve immün kontrol noktası reseptör ekspresyonlarının belirlenmesi

PKMH izolasyonu sonrasında hücre içi ve yüzey boyamaları *ex vivo* olarak gerçekleştirilmiştir. PKMH'ler (10^6 hücre/ml), zenginleştirilmiş RPMI-1640 içerisinde (Phorbol 12-myristate 13-acetate [PMA]; iyonomisin ve brefeldin A içeren hücre

stimülasyon kokteyli eBiosciences, San Diego, CA, USA) eklenerek %5 CO_2 içeren 37°C inkübatörde 4 saat süreyle uyarılmıştır. Uyarım sonrası hücreler PBS ile iki kez yıkanmış ve anti-human CD3–Brilliant Violet 785™, anti-human CD16–Brilliant Violet 570™, anti-human CD56–Brilliant Violet 711™, anti-human CD223 (LAG-3)–FITC, anti-human TIGIT (VSTM3)–PE, anti-human CD152 (CTLA-4)–APC ve anti-human CD279 (PD-1)–APC/Cyanine7 monoklonal antikorları (tamamı BioLegend, San Diego, CA, USA) ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Non-spesifik floresansının ayarlanması için FMO ve otofloresans kontrolleri hazırlanmıştır. Hücreler yüzey boyama sonrası Cytofix & Cytoperm kiti, kullanılarak (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) anti-human TNF-α–Alexa Fluor 700, anti-human IFN-γ–PE/Cyanine7 ve anti-human IL-10–Brilliant Violet 421™ antikorları (tamamı BioLegend, San Diego, CA, USA) ile inkübe edilmiştir. Boyama sonrası hücreler tekrar yıkanmış, %1 paraformaldehit içeren 300 µL PBS içinde süspanse edilerek Novocyte akan hücre ölçer cihazında (Acea Biosciences, USA) NovoExpress yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Veriler FlowJo 10.2 yazılımı (Tree Star Inc., USA) ile değerlendirilmiştir.

3.1.6. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Mac için SPSS 21.0 yazılımı (IBM, Chicago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır. Verilerin dağılımı Shapiro–Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Sürekli değişkenler çalışmada (ortalama ± standart hata) olarak sunulmuştur. Normal dağılım gösteren çoklu grupların karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t testi ve ANOVA testi, gruplar arası karşılaştırmalar için post-hoc Tukey testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen verilerin analizinde Kruskal–Wallis ve Mann–Whitney U testleri uygulanmıştır. Tekrarlayan ölçümlerin analizinde eşleştirilmiş örneklem t testi ve Wilcoxon testi kullanılmıştır. Grafikler GraphPad Prism 9.0.1 yazılımı (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) ile oluşturulmuş olup, çubuk grafikler ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir.

Tablo 3. Kullanılan Monoklonal Antikolar ve Deney Malzemeleri

Kullanılan Monoklonal Antikorlar	**Üretici Bilgisi**
anti-human CD3–Brilliant Violet 785™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD16–Brilliant Violet 570™,	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD56–Brilliant Violet 711™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD223 (LAG-3)–FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human TIGIT (VSTM3)–PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD152 (CTLA-4)–APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD279 (PD-1)–APC/Cyanine7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human TNF-α–Alexa Fluor 700	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human IFN-γ–PE/Cyanine7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human IL-10–Brilliant Violet 421™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD107a–PE/Cy5	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human perforin–PerCP-eFluor 710	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human granzim A–Alexa Fluor 700	BioLegend, San Diego, CA, USA

Kullanılan diğer deneysel malzemeler	
Hücre stimülasyon kokteyli (PMA, iyonomisin ve brefeldin A içeren)	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Fiksasyon tamponu	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Cytofix & Cytoperm kiti	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ficoll-Hypaque ayırma ortamı	Biochrom AG, Berlin, Almanya
Tripan mavisi	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
RPMI-1640 besiyeri	Sigma, St. Louis, MO, USA

3.2. Adalimumab Tedavisinin Behçet Hastalarında NK Hücre Fonksiyonları Üzerine Etkileri

Deney setimizin bu basamağında immün ayrıcalıklı bir organ olan gözde fizyolojik olarak mevcut olan lokal immün supresyon ortamı dikkate alınmıştır. Bu lokal immün düzenleyici mekanizmaların bozulması sonucunda üveit gibi inflamatuvar hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Üveit tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve bir monoklonal anti-TNF molekülü olan adalimumabın, özellikle Behçet üveiti hastalarında yüksek klinik etkinliğe sahip olduğu bilinmektedir. Ancak adalimumab tedavisinin bu hasta grubunda NK hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki daha önce incelenmemiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, adalimumab tedavisinin aktif Behçet üveiti hastalarına verildiğinde klinik remisyon oluşturduğu bilinmektedir. Klinik remisyona neden olan immünolojik değişikliklerin tanımlanması amacıyla hücrelerinin fenotip ve fonksiyonları detaylı olarak incelenmiştir.

3.2.1. Çalışma popülasyonu ve tedavi protokolü

Bu çalışmaya aktif Behçet üveiti olan hastalar (n=14), yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş sağlıklı kontroller (n=23) ve hastalık kontrol grubu olarak aksiyel ankilozan spondilit tanısı almış bireyler (n=13) dahil edilmiştir. Katılımcıların hiçbirinde incelenen hastalıklar dışında diyabet, malignite, romatolojik veya otoimmün hastalıklar ya da immün sistem bozuklukları gibi sistemik hastalık öyküsü bulunmamaktadır. Behçet hastaları, İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dallarında takip edilmiştir. Tüm Behçet hastaları, Behçet hastalığının sınıflandırılması için Uluslararası Çalışma Grubu (International Study Group, ISG) kriterlerini (1990) [43] karşılamakta olup, adalimumab tedavisine başlanmadan önce klinik veya anjiyografik olarak aktif hastalık bulguları göstermekteydi. Tüm hastalara her vizitte en iyi düzeltilmiş görme keskinliği ölçümü, biyomikroskobik ön segment muayenesi, tonometri ve indirekt oftalmoskopiyi içeren kapsamlı oftalmolojik değerlendirme yapılmıştır. Konvansiyonel immünmodülatör tedavilere dirençli akut Behçet üveiti atağı; vitreus bulanıklığında artış veya yeni başlangıç, ön kamarada inflamatuvar hücre varlığı, retinal damarların inflamatuvar

kılıflanması, vasküler oklüzyon, retinal hemorajiler, retinal infiltratlar, maküla ödemi ve/veya papillit bulgularından biri veya birkaçı ile tanımlanmıştır. Behçet hastalarının hiçbirinde daha önce biyolojik tedavi (interferon-α, anti-TNF-α veya anti-human-IL-6 dahil) öyküsü bulunmamaktaydı ve kan örnekleri alınırken prednizolon dozu 20 mg'ın üzerinde değildi. İlk kan örnekleri, hastalığın aktif döneminde; üveit atağı sırasında veya anjiyografik aktivite saptandığında alınmıştır. Behçet üveiti olan hastalara, tedavi değişikliği öncesinde rutin fundus floresein anjiyografi uygulanmıştır ve fundus floresein anjiyografi skorları hesaplanmıştır [78]. Adalimumab tedavisi sırasında üç ay boyunca yeni üveit atağı gelişmeyen ve üçüncü ayda fundus floresein anjiyografi skorunda azalma saptanan hastalar remisyonda kabul edilmiştir. Ön kamara ve vitreus inflamasyonunda artış, yeni retinit veya retinal vaskülit gelişimi ya da fundus floresein anjiyografi skorunda artış gibi yeni atak bulguları saptanan hastalarda tedavinin remisyon sağlamadığı kabul edilmiş ve bu hastalar çalışmadan çıkarılmıştır (n=2).

İkinci kan örnekleri, adalimumab tedavisinin üçüncü ayında (80 mg yükleme dozunu takiben ilk haftadan itibaren iki haftada bir 40 mg adalimumab enjeksiyonu uygulanmıştır) alınmıştır. Bu örnekler, üveit atağının gerilemesi veya FFA skorlarında azalma sonrası elde edilmiştir. Hastaların sistemik azatioprin tedavisi (2–3 mg/kg) alıyor olması durumunda, adalimumab tedavisi süresince bu tedaviye devam edilmiştir. Bu yaklaşım, hastalık süresince immünolojik etkilerin stabil tutulmasını ve adalimumabın spesifik immünolojik etkilerinin değerlendirilmesini amaçlamıştır.

Aksiyel tutulumlu ankilozan spondilit hastaları, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalında takip edilmiş olup, çalışmaya dahil edilmeden önce herhangi bir sistemik immünsüpresif veya steroid tedavi almamışlardır. Bu hastaların klinik aktivitesi Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksi (BASDAI) skorları kullanılarak değerlendirilmiştir. İlk kan örnekleri aksiyel şikâyetlerin aktif olduğu dönemde, ikinci kan örnekleri ise adalimumab tedavisinin üçüncü ayında (iki haftada bir 40 mg subkutan adalimumab) ve BASDAI skorlarında azalma ile klinik düzelme sağlandığında alınmıştır [79].

3.2.2. Periferik kan mononükleer hücrelerinin izolasyonu

Çalışma gruplarından heparinli periferik venöz kan örnekleri alınmış ve PKMH'ler Ficoll-Histopaque yoğunluk gradyan santrifügasyonu yöntemi ile (400 × g, 30

dakika, oda sıcaklığı; Sigma, St. Louis, MO, USA) izole edilmiştir. PKMH'ler, histopaque ve plazma arasındaki ara yüzeyde oluşan PKMH tabakasından dikkatlice aspire edilmiştir. PBS ile iki kez yıkanmıştır (1800 rpm, 5 dakika, oda sıcaklığı). İzole edilen PKMH'lerin canlılığı ve konsantrasyonu, tripan mavisi kullanılarak Neubauer hemositometre ile manuel sayım yöntemiyle belirlenmiştir. Hücreler zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyerinde (tamamı Sigma, St. Louis, MO, USA) 2×10^6 hücre/mL konsantrasyonda süspanse edilmiştir.

Tablo 4. Çalışma Gruplarının Dahil Edilme Kriterleri

Çalışma Grubu	Dahil Edilme Kriterleri
Behçet Üveiti Hastaları (n=14)	1. Behçet üveiti tanısı almak ve International Study Group (ISG) kriterlerini karşılamak 2. 18 yaş ve üzerinde olmak 3. Bilinen ek romatolojik veya bağışıklık sistemi hastalığı bulunmamak
Sağlıklı Kontrol Grubu (n=23)	1. Bilinen immün sistem hastalığı veya bağışıklık sistemini etkileyen kronik hastalığı bulunmamak 2. 18 yaş ve üzerinde olmak 3. Çalışma öncesinde immünosupresif tedavi almamak.
Hastalıklı Kontrol Grubu (Ankilozan Spondilit, n=13)	1. Ankilozan spondilit dışında immün sistem hastalığı veya bağışıklık sistemini etkileyen kronik hastalığı bulunmamak 2. Aksiyel tutulumlu ankilozan spondilit tanısı almak ve adalimumab tedavisi öncesinde sistemik steroid tedavisi almamış olmak 3. 18 yaş ve üzerinde olmak 4. Çalışma öncesinde immünosupresif tedavi almamak.
Tüm gruplar için hariç tutulma kriterleri	1. Tedavi başlangıcı öncesinde ≥20 mg prednizolon veya eşdeğeri sistemik steroid tedavisi altında olmamak 2. Çalışma öncesinde biyolojik tedavi almamış olmak (interferon, anti-TNF veya anti-IL-6 gibi) 3. Araştırılan hastalık dışında immün sistemi etkiyebilecek başka bir kronik sistemik hastalığı olmak (otoimmün hastalıklar, otoinflamatuvar hastalılar, diyabet gibi)

3.2.3. Aktivatör ve inhibitör NK hücre reseptörlerinin belirlenmesi

Katılımcılardan taze izole edilen PKMH'ler anti-human-CD3–Brilliant Violet 785™, anti-human-CD16–Brilliant Violet 570™, anti-human-CD56–Brilliant Violet 711™, anti-human-NKG2D–APC/Cyanine7, anti-human-NKp46–APC, anti-human-NKG2A–PE ve anti-human-CD45–Brilliant Violet 510™ (tamamı BioLegend, San Jose, CA, USA) florokrom konjuge anti-insan monoklonal antikorlar ile boyanmış ve hücreler karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Analizlerde otofloresans ve FMO kontrolleri kullanılmıştır. Boyama sonrasında hücreler, PBS ile iki kez yıkanmış (1800 rpm, 5 dakika, 4 °C) ve %1 paraformaldehit içeren 300 µL PBS içinde süspanse edilmiştir. Yüksek duyarlılıklı çok parametreli akan hücre ölçer analizleri, 15 renkli akan hücre ölçer sistemi kullanılarak Novocyte cihazında (Acea Biosciences, USA) gerçekleştirilmiştir. Verilerin analizi NovoExpress® (Agilent Technologies, USA) ve FlowJo™ 10.2 (BD Biosciences, USA) yazılımları ile yapılmıştır. Periferik kan NK hücre alt grupları, daha önce yukarıda tanımlandığı şekilde CD16 ve CD56 ekspresyon düzeylerine göre altı gruba ayrılmıştır.

3.2.4. NK hücrelerinin hücre içi proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin salınımlarının analizi

Hücre içi sitokin üretiminin değerlendirilmesi amacıyla 1×10^6 PKMH, PMA, iyonomisin ve brefeldin A içeren hücre stimülasyon kokteyli (500X) (BioLegend, San Jose, CA, USA) ile %5 CO_2 içeren 37 °C inkübatörde 4 saat süreyle uyarılmıştır. Ardından hücreler PBS ile iki kez yıkanmış ve anti-human-CD3–Brilliant Violet 785™, anti-human-CD16–Brilliant Violet 570™, anti-human-CD56–Brilliant Violet 711™, anti-human-CD8–FITC ve anti-human-CD45–Brilliant Violet 510™ antikorları (tamamı BioLegend, San Diego, CA, USA) ile oda sıcaklığında 20 dakika, karanlıkta inkübe edilmiştir. Yüzey boyaması sonrasında hücreler PBS ile iki kez yıkanmış, Cytofix/Cytoperm kiti (BD Biosciences, CA, USA) , kullanılarak anti-human-TNF-α–APC-Cy7, anti-human-NK-γ–PE/Cyanine7, anti-human-IL-10–Brilliant Violet 421™, anti-human-IL-4–APC, anti-human-TGF-β–PE ve anti-human-IL-17–Alexa Fluor™ 700 antikorları (tamamı BioLegend, San Diego, CA, USA) ile 20 dk inkübe edilerek hücre içi sitokin boyamaları gerçekleştirilmiştir.. Otofloresans, FMO ve tam panel boyamalar gerçekleştirilmiştir. Boyama sonrası hücreler PBS/%1 paraformaldehit içinde süspanse

edilerek Novocyte akan hücre ölçer (Acea Biosciences, USA) cihazında analiz edilmiştir. Veri analizi FlowJo™ 10.2 yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5. NK hücre sitotoksisitesinin değerlendirilmesi

NK hücre sitotoksisite analizi, daha önce tanımlanmış protokoller temel alınarak ve küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir [24]. CD107a yüzey ekspresyonu ile hücre içi perforin ve granzim A üretimi değerlendirilmiştir. PKMH'ler, 1 ml zenginleştirilmiş RPMI 1640 içerisinde 10:1 (efektör:hedef) oranında, K562 hücreleri varlığında veya yokluğunda 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Anti-human-CD107a-PE monoklonal antikoru (BioLegend, San Jose, CA, USA) inkübasyon öncesi kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler PBS ile yıkanmış ve üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra anti-human-CD3–Brilliant Violet 785™, anti-human-CD16–Brilliant Violet 570™, anti-human-CD56–Brilliant Violet 711™, anti-human-CD8–FITC ve anti-human-CD45–Brilliant Violet 510™ antikorları eklenerek 30 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. Kapılama ve spektral örtüşmenin düzeltilmesi için FMO kontrolleri kullanılmıştır. Yüzey boyamasının ardından hücreler Cytofix & Cytoperm kiti (BD Biosciences, CA, USA) ile sırasıyla fikse ve permeabilize edilmiş, daha sonra anti-granzim A–Alexa Fluor 700™ ve anti-perforin–PE-Cy7 antikorları (BioLegend, San Diego, CA, USA) ile boyanmıştır. Hücreler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra yıkanmış ve PBS/%1 paraformaldehit içinde süspanse edilerek Novocyte akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Veri analizi FlowJo™ 10.2 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan Monoklonal Antikolar ve Deney Malzemeleri

Kullanılan Monoklonal Antikorlar	**Üretici Bilgisi**
anti-human-CD3–Brilliant Violet 785™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-CD16–Brilliant Violet 570™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-CD56–Brilliant Violet 711™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-NKG2D–APC/Cyanine7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-NKp46–APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-NKG2A–PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-CD45–Brilliant Violet 510™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-CD8–FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-TNF-α–APC-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-NK-γ–PE/Cyanine7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-IL-10–Brilliant Violet 421™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-IL-4–APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-TGF-β–PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-IL-17–Alexa Fluor™ 700	BioLegend, San Diego, CA, USA
Kullanılan diğer deneysel malzemeler	
Hücre stimülasyon kokteyli (PMA, iyonomisin ve brefeldin A içeren)	BioLegend, San Jose, CA, USA
Fiksasyon tamponu	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Cytofix & Cytoperm kiti	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ficoll-Hypaque solusyonu	Sigma, St. Louis, MO, USA
Tripan mavisi	Sigma, St. Louis, MO, USA
RPMI-1640 besiyeri	Sigma, St. Louis, MO, USA

3.2.6. NK hücre kaynaklı plazma çözünür sitokin ve reseptör profilinin multiplex boncuk dizisi teknolojisi ile analizi

NK hücre kaynaklı plazma çözünür sitokin ve reseptör profilleri, boncuk temelli çözünür molekül tayin etme yöntemi ile değerlendirilmiştir. İnsan çözünür IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, TNF-α, çözünür Fas (sFas), çözünür Fas ligandı (sFasL), IFN-γ, granzim A, granzim B, perforin ve granülizin düzeyleri, LEGENDplex™ (Human CD8/NK Panel) kiti (BioLegend, San Diego, CA, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde akan hücre ölçer ile ölçülmüştür. Periferik venöz kan örnekleri heparinli tüplerde toplanmış, 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen plazma örnekleri −80 °C'de saklanmıştır. Plazma örnekleri 1:1 oranında seyreltilmiş ve karışık yakalama boncuk setleri ile karanlıkta, 800 rpm çalkalayıcı üzerinde karanlıkta oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler santrifüj edilmiş (1050 rpm, 5 dakika) ve supernatan atılmıştır. Sonrasında 200 µl yıkama solüsyonu eklenip, santrifüj ve süpernatan uzaklaştırma işlemi tekrarlanmıştır. Ardından biyotinlenmiş saptama antikorları eklenmiş (25 µl) ve 800 rpm çalkalayıcı üzerinde karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında yukarıda anlatılan yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Daha sonra streptavidin-PE reaktifi eklenerek her bir yakalama boncuğuna ait PE sinyali akan hücre ölçer ile ölçülmüştür. Sitokin konsantrasyonları, LEGENDplex™ Data Analysis Software sürüm 8 kullanılarak standart eğriler üzerinden hesaplanmıştır. Kullanılan ölçüm kitinin minimum saptanabilir konsantrasyon değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

3.2.7. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Mac için SPSS 21.0 yazılımı (IBM, Chicago, IL, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin dağılımı Shapiro–Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur. Normal dağılım gösteren çoklu grupların karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t testi ve ANOVA testi, gruplar arası karşılaştırmalar için post hoc Tukey testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen verilerde Kruskal–Wallis ve Mann–Whitney U testleri uygulanmıştır. Tekrarlayan ölçümler, eşleştirilmiş örneklem t testi ve Wilcoxon testi ile analiz edilmiştir. Grafikler GraphPad Prism 10.4.1 yazılımı (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) kullanılarak oluşturulmuştur.

Tablo 6. LEGENDplex™ multiplex boncuk dizisi teknolojisi ile minimum saptanabilir konsantrasyonlar

Sitokin / Molekül	Minimum saptama sınırı (pg/ml)
IL-4	0,9
IL-2	1,1
IL-6	1
IL-10	0,7
sFas	3,6
sFasL	1,3
TNF-α	0,6
IFN-γ	1,6
IL-17A	1,1
Granzim A	1,2
Granzim B	5,6
Perforin	2,1
Granülizin	5,2

3.3. Adalimumab Tedavisinin Sağlıklı İnsan NK Hücre Fonksiyonları Üzerine *in vitro* Etkileri

Adalimumab tedavisi ile *in vivo* ortamda gözlenen NK hücre değişikliklerinin hangi hücresel ve moleküler mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıktığını daha iyi anlayabilmek amacıyla *in vitro* NK hücre kültür modelleri oluşturulmuştur. Saflaşıtırılmış NK hücreleri ve PKMH hücreleri adalimumab varlığında ve yokluğunda 48 saat hücre kültüründe tutulumuş ve karşılaştırılmıştır. Bu şekilde hem NK hücrelerinde adalimumab ile oluşan değişimler incelenmiş, hem de PKMH içerisindeki diğer hücrelerin oluşturduğu mikroçevrenin etkisini ayrıca incelenmiştir. Bu deneysel yaklaşım sayesinde, adalimumabın NK hücre fenotipi, fonksiyonları ve apoptoz süreçleri üzerindeki doğrudan etkilerinin ortaya konulması ve klinik gözlemlerle deneysel bulgular arasında nedensel bir ilişki kurulması amaçlanmıştır.

3.3.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya 15 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Dahil edilme kriterleri; bilinen immün sistem hastalığı veya bağışıklık sistemini etkileyen kronik hastalığın olmaması, 18 yaşından büyük olması, çalışma öncesinde immünosupresif veya biyolojik tedavi almamış olması (interferon-alfa, anti-TNF veya anti-IL-6 gibi) olarak belirlendi. Deney öncesi sağlıklı bireylerden 20 cc heparinli tüpe periferik kan alınmıştır.

Tablo 7. Çalışmaya Dahil Edilen Gönüllülerin Demografik Özellikleri ve Dahil edilme Kriterleri

Ortalama Yaş, yıl ± SD:	29.2 ±6.4
Cinsiyet:	
- Erkek, n (%):	7 (46.7)
- Kadın, n (%):	8 (53.3)
Dahil edilme Kriterleri	Son 1 ay içerisinde enfeksiyon geçirmemiş olmak Bilinen immün sistem hastalığı veya bağışıklık sistemini etkileyen kronik hastalık olmaması 18 yaşından büyük olmak
Dışlama Kriterleri	Çalışmaya dahil edilmeden önce SARS-CoV-2 enfeksiyonu veya mRNA COVID-19 aşılanması öyküsü Çalışma öncesinde immünnosupresif veya biyolojik tedavi öyküsü (interferon-alfa, anti-TNF veya anti-IL-6 gibi)

3.3.2. Periferik kan mononükleer hücrelerinin izolasyonu

Gönüllülerden 20ml heparinli periferik venöz kan örnekleri alınmış ve PKMH'ler Ficoll-Histopaque yoğunluk gradyan santrifügasyonu yöntemi ile, 2000rpm 20 dk, oda sıcaklığında (Sigma, St. Louis, MO, USA) izole edilmiştir. PKMH'ler, Histopaque ve besiyeri arasındaki ara yüzeyde oluşan PKMH tabakasından dikkatlice aspire edilmiştir. Hücreler PBS ile iki kez yıkanmıştır (1800rpmı 5 dk dakika, oda sıcaklığı). İzole edilen PKMH'lerin canlılığı ve konsantrasyonu, tripan mavisi kullanılarak Neubauer hemositometre ile manuel sayım yöntemiyle belirlenmiştir. Hücreler; zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyerinde (tamamı Sigma, St. Louis, MO, USA) 2×10^6 hücre/ml konsantrasyonda süspanse edilerek buzda muhafaza edilmiştir.

3.3.3. NK Hücre İzolasyonu

Sağlıklı bireylerden izole edilen PKMH'den NK hücreleri steril koşullar altında manyetik hücre separasyon sistemi kullanılarak izole edilmiştir (MACS, Miltenyi Biotec AG, Bergisch Gladbach, Almanya). NK hücre izolasyonu, üretici firmanın önerileri doğrultusunda negatif seleksiyon prensibine dayanan NK hücre izolasyon kiti (NK cell isolation kit, human, MACS, Miltenyi Biotec AG, Bergisch Gladbach, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde NK hücreleri doğrudan hedeflenmeden; T hücreleri, B hücreleri, monositler, bazofiller, dendritik hücreler ve diğer miyeloid hücreler manyetik olarak işaretlenerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Böylece NK hücreleri aktivasyona uğramadan, fonksiyonel bütünlükleri korunmuş şekilde elde edilmiştir. Manyetik işaretleme ve ayırma işlemleri sırasında hücre canlılığını ve yüzey reseptör bütünlüğünü korumak amacıyla tüm işlemler hızlı şekilde gerçekleştirilmiş, hücreler soğukta tutulmuş ve önceden soğutulmuş tampon çözeltiler (2–8 °C) kullanılmıştır. Manyetik etiketleme öncesinde PKMH'ler tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş ve hücre sayısı belirlenmiştir. Manyetik etiketleme için hücre peleti, her 10^7 toplam hücre için 40 µl ayırma tamponu içerisinde süspanse edilmiştir. Ardından, NK hücre dışı popülasyonları hedefleyen NK Cell Biotin-Antibody Cocktail her 10^7 hücre için 10 µl olacak şekilde eklenmiş, süspansiyon nazikçe karıştırılmış ve 2–8 °C'de buzdolabında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücre süspansiyonuna her 10^7 hücre için 30 µl ayırma tamponu ilave edilmiş ve takiben NK Cell MicroBead Cocktail her 10^7 hücre için 20 µl olacak şekilde eklenmiştir. Hücreler tekrar nazikçe karıştırılmış ve 2–8 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Manyetik hücre separasyonu için MidiMACS™ separatör ve LS MACS (MACS, Miltenyi Biotec AG, Bergisch Gladbach, Almanya) kolonları kullanılmıştır. Kolonlar manyetik alana yerleştirilmeden önce üretici firmanın önerdiği hacimde ayırma tamponu ile dengelenmiştir (LS kolonlar için 3 mL). Hazırlanan hücre süspansiyonu kolona uygulanmış ve manyetik olarak işaretlenmemiş hücreler kolondan geçerek toplanmıştır. Bu fraksiyon, zenginleştirilmiş NK hücre popülasyonunu içermektedir. Kolonlar, yine LS kolonlar için 3 ml ayırma tamponu kullanılarak yıkanmış ve kolondan geçen hücreler önceki akış fraksiyonu ile birleştirilmiştir. Her yıkama adımında kolon rezervuarının tamamen boşalması beklenmiştir. İzolasyon sonrasında elde edilen NK hücrelerinin saflığı ve olası hücresel kontaminasyon, NovoCyte® akan hücre ölçer cihazı (ACEA Biosciences, Inc.) kullanılarak değerlendirilmiştir. NK hücreleri CD56 ve CD16 ekspresyonuna göre tanımlanmış, T hücre kontaminasyonu CD3

ekspresyonu üzerinden analiz edilmiştir. Yapılan tüm izolasyonlarda NK hücre saflığının %98'in üzerinde olduğu ve T hücre kontaminasyonunun %1'in altında kaldığı saptanmıştır. Bu bulgular, MACS tabanlı negatif seleksiyon yönteminin yüksek saflıkta, güvenilir ve fonksiyonel NK hücre izolasyonu sağladığını göstermiştir.

3.3.4. NK ve PKMH hücre kültürü

Adalimumab'ın hem saflaştırılmış NK hücreleri üzerindeki doğrudan etkilerini hem de PKMH ortamında NK hücre fonksiyonları üzerindeki dolaylı etkilerini değerlendirmek amacıyla, sağlıklı bireylerden izole edilen NK hücreleri ve total PKMH kullanılarak hücre kültürleri oluşturulmuştur. Bu iki farklı kültür sistemi sayesinde, adalimumabın NK hücre fonksiyonları üzerindeki etkilerinin hücre–hücre etkileşimlerinden bağımsız ve bağımlı mekanizmalar üzerinden ayrı ayrı incelenmesi amaçlanmıştır. NK hücre izolasyonu ve PKMH elde edilmesini takiben, hücrelerin canlılığı ve konsantrasyonu tripan mavisi ile manuel sayım yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler, uyarımsız koşullarda ve adalimumab varlığında kültüre edilmek üzere deney gruplarına ayrılmıştır. Adalimumab, hücre kültürlerine son konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde eklenmiştir (Abbott Laboratories, Chicago, USA). Bu konsantrasyon, literatürde bildirilen *in vitro* çalışmalarla uyumlu olup biyolojik etkinin gözlemlenmesine olanak sağlayacak düzeyde seçilmiştir. Hücre kültürleri, 24 kuyulu kültür plaklarında $1x10^6$ hücre/kuyu olacak şekilde hazırlanmış ve hücreler 48 saat süreyle 37 °C'de, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde inkübe edilmiştir. NK hücre kültürleri için özel olarak optimize edilmiş kültür ortamı kullanılmıştır. Bu ortam, 20 ng/ml IL-2 içeren zenginleştirilmiş RPMI-1640 bazlı mediumdan oluşmakta olup IL-2 eklenmesi ile kültür süresince NK hücre canlılığının ve bazal fonksiyonel kapasitesinin korunması hedeflenmiştir. PKMH kültürleri de benzer inkübasyon koşulları altında hazırlanmış ve bu kültürlerde NK hücreleri, diğer lenfosit popülasyonları ve monositlerle birlikte fizyolojik hücresel mikroçevre içerisinde değerlendirilmiştir. Böylece adalimumabın NK hücre fonksiyonları üzerindeki etkilerinin sitokin ağı ve hücreler arası etkileşimler aracılığıyla nasıl modüle edildiği analiz edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler kültür ortamından toplanmış, santrifüj ile yıkanmış ve ileri analizler için hazırlanmıştır. Toplanan hücreler üzerinde sitokin salınım analizleri ve sitotoksisiteye yönelik fonksiyonel değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler,

adalimumabın NK hücrelerinin immün düzenleyici ve sitotoksik fonksiyonları üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

3.3.5. Adalimumabın NK hücrelerinde apoptoz ve hücre canlılığına etkilerinin değerlendirilmesi

Adalimumab'ın NK hücrelerinde apoptoz ve hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, hücre kültürü deneylerini takiben apoptotik indeks analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde, hücre ölümünün erken ve geç evrelerinin yanı sıra nekrotik hücre popülasyonlarının ayırt edilmesine olanak sağlayan FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Diego, USA) kullanılmıştır. Analizler, üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda uygulanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamından toplanan NK hücreleri, PBS eklenerek santrifüj ile yıkanmış ve Annexin V bağlanma tamponu içerisinde uygun hücre yoğunluğunda süspanse edilmiştir. Hücreler üzerine, FITC ile işaretli Annexin V ve propidyum iyodid (PI) uygun miktarlarda eklenerek oda sıcaklığında, ışıktan korunmuş koşullarda 15 dk inkübe edilmiştir. Bu çift boyama yöntemi sayesinde hücre canlılığı ve apoptoz evreleri eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir. Analiz sırasında, yalnızca Annexin V ile boyanan hücreler fosfatidilserinin hücre membranının dış yüzeyine translokasyonu ile karakterize erken apoptotik NK hücrelerini temsil etmiştir. Hem Annexin V hem de PI ile boyanan hücreler, hücre membran bütünlüğünün bozulduğu geç apoptotik NK hücreleri olarak tanımlanmıştır. Sadece PI ile boyanan hücreler ise membran bütünlüğünü kaybetmiş, nekroza giden ölü NK hücreleri olarak değerlendirilmiştir. Annexin V ve PI ile boyanmayan hücreler canlı hücre popülasyonunu temsil etmiştir. Boyama işlemlerinin ardından hücreler, akan hücre ölçer kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sırasında hücreler öncelikle ileri ve yan saçılım parametrelerine göre kapılanmış, debris ve hücresel agregatlar dışlanmıştır. NK hücre popülasyonu tanımlandıktan sonra, Annexin V ve PI dağılımlarına göre apoptoz ve hücre canlılığı alt popülasyonları kantitatif olarak hesaplanmıştır. Elde edilen verilerin analizi FlowJo™ 10.2 yazılımı (Tree Star Inc., USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her örnek için erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları yüzde (%) olarak hesaplanmış ve adalimumab varlığı ile stimülasyonsuz koşullar arasında karşılaştırmalı değerlendirme yapılmıştır. Bu analizler

ile adalimumabın NK hücrelerinin yaşam döngüsü ve hücre ölümü mekanizmaları üzerindeki olası etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

3.3.6. NK Hücrelerinde Inflamatuvar ve Anti-inflamatuvar Sitokin Salınım Tayini

Adalimumabın NK hücrelerinde inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin salınımı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, adalimumab varlığında ve yokluğunda 48 saatlik hücre kültürü aşamasını takiben sitokin analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde hem hücre dışına salınan sitokinlerin dolaylı olarak değerlendirilmesi hem de sitokinlerin hücre içinde birikiminin saptanması hedeflenmiştir. Bu amaçla, kültür süresi sonunda NK hücreleri, protein sekresyonunu hücre içinde bloke ederek sitokinlerin hücre içi tespitine olanak sağlayan brefeldin A (içeren hücre stimülasyon kokteyli (BioLegend, San Jose, CA, USA) ile 4 saat süreyle uyarılmıştır. Bu stimülasyon basamağı, sitokinlerin endoplazmik retikulumdan hücre dışına taşınmasını engelleyerek hücre içinde birikmesini sağlamış ve böylece hücre içi sitokin boyamasına uygun bir ortam oluşturmuştur. Uyarım işlemi 37 °C'de, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Stimülasyon sonrası hücreler kültür plaklarından toplanmış, santrifüj ile yıkanmış ve yüzey antijenlerinin boyanması amacıyla PBS içerisinde süspanse edilmiştir. Yüzey boyamalarının ardından hücreler, üretici firmanın önerdiği protokoller doğrultusunda fikse edilmiş ve permeabilize edilmiştir (Cytofix & Cytoperm kiti BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Bunu takiben hücreler, proliferatif aktivitenin değerlendirilmesi için anti-human Ki-67-FITC, inflamatuvar sitokinleri değerlendirmek amacıyla anti-human-IFN-γ-PE-Cy-7 ve anti-human-TNF-α-APC/Cy7, anti-inflamatuvar ve düzenleyici sitokinleri değerlendirmek amacıyla anti-human-IL-10-Brilliant Violet 421™, ayrıca Th17 ve Th2 benzeri yanıtlarla ilişkili sitokinlerin analizi için anti-human IL-17a-Alexa Flour 700 ve anti-human-IL-4-APC monoklonal antikorları (tamamı BioLegend, San Diego, CA, USA) ile 20 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Boyama işlemlerinin ardından ardından hücreler, NovoCyte® akan hücre ölçer cihazı (ACEA Biosciences, Inc.) kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sırasında hücreler öncelikle önden (FSC) ve yandan (SSC) saçılım parametrelerine göre kapılanmış, debris ve hücresel agregatlar dışlanmıştır. NK hücre popülasyonu tanımlandıktan sonra sitokin pozitif hücre oranları ve Ki-67 ekspresyonu kantitatif olarak değerlendirilmiştir.Elde edilen verilerin analizi FlowJo™ 10.2 yazılımı (Tree Star Inc., USA) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Her bir sitokin için pozitif hücre oranları yüzde (%) olarak hesaplanmış ve adalimumab varlığı ile stimülasyonsuz koşullar arasında karşılaştırmalı analizler yapılmıştır. Bu yaklaşım ile adalimumabın NK hücrelerinin sitokin üretim profili ve proliferatif aktivitesi üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

3.3.7. NK Hücre Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi

Adalimumabın NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, 48 saatlik kültürün ardından. NK hücrelerinin hedef tümör hücrelerine karşı sitotoksik yanıtlarının değerlendirilmesi için klasik NK hücre hedefi olan K562 eritro-lösemi hücre hattı kullanılmıştır. Kültür süresi sonunda NK hücreleri, stimülasyonsuz koşul ve K562 hücreleri ile stimülasyon koşulu olmak üzere iki ayrı deney grubuna ayrılmıştır. K562 hücreleri ile yapılan eş kültür deneylerinde, NK hücreleri efektör hücre, K562 hücreleri ise hedef hücre olarak kabul edilmiş ve efektör:hedef hücre oranı (10:1) olacak şekilde 1ml zenginleştirilmiş RPMI-1640 içerisinde kültüre alınmıştır . Hücreler, 37 °C'de, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde 4 saat süreyle birlikte inkübe edilmiştir. Stimülasyonsuz gruplar, NK hücrelerinin bazal sitotoksik aktivitesini değerlendirmek amacıyla K562 hücreleri eklenmeden aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince NK hücrelerinin degranülasyon kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla kültür ortamına **anti-human-CD**107a-PeCY5 **(**BioLegend, San Diego, CA, USA) monoklonal antikoru eklenmiştir. CD107a (LAMP-1) ekspresyonu, NK hücrelerinin sitotoksik granüllerini hücre yüzeyine taşıma ve hedef hücreye yönlendirme kapasitesinin fonksiyonel bir göstergesi olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından hücreler kültür ortamından toplanmış, PBS eklenerek santrifüj ile yıkanmış ve yüzey antijenlerinin anti-human CD16-Brilliant Violet 570™, anti-human CD56-Brilliant Violet 711™, anti-human CD3-Brilliant Violet 785™ (BioLegend, San Diego, CA, USA) antikorları boyanması gerçekleştirilmiştir. Yüzey boyamalarını takiben hücreler fikse ve permeabilize edilmiş (Cytofix & Cytoperm kiti BD Bioscience, San Jose, CA, USA) ardından NK hücrelerinin sitotoksik granül içeriğini değerlendirmek amacıyla granzim A ve perforin için spesifik monoklonal antikorlarla **(**anti-human/mouse Granzyme B-Alexa Fluor® 700**,** anti-human Perforin-PE/Cyanine7, tamamı BioLegend, San Diego, CA,

USA) hücre içi boyama yapılmıştır. Böylece hem degranülasyon kapasitesi (CD107a ekspresyonu) hem de sitotoksik granül içeriği eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir. Boyama işlemlerinin tamamlanmasının ardından hücreler, NovoCyte® akan hücre ölçer cihazı (ACEA Biosciences, Inc.) kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sırasında hücreler ileri ve yan saçılım parametrelerine göre kapılanmış, debris ve hücresel agregatlar dışlanmıştır. NK hücre popülasyonu tanımlandıktan sonra CD107a, granzim A ve perforin ekspresyon düzeyleri kantitatif olarak analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin analizi FlowJo™ 10.2 yazılımı (Tree Star Inc., USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $CD107a^+$ NK hücre oranları, degranülasyon kapasitesinin göstergesi olarak; granzim A ve perforin ekspresyon düzeyleri ise sitotoksik granül içeriğinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Bu parametreler, adalimumab varlığında ve yokluğunda, ayrıca K562 stimülasyonu ile stimülasyonsuz koşullar arasında karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Bu yaklaşım ile adalimumabın NK hücrelerinin hedef tümör hücrelerine karşı sitotoksik yanıtları üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

Tablo 8. Kullanılan Monoklonal Antikorlar ve Deney Malzemeleri

Kullanılan Monoklonal Antikorlar	**Üretici Bilgisi**
anti-human IL-17a-Alexa Flour 700	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human TNF-alfa-APC/Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human IL-4-APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human-IL-10-Brilliant Violet 421™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti human IFN-gamma-PE-Cy-7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD16-Brilliant Violet 570™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD56-Brilliant Violet 711™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD3-Brilliant Violet 785™	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human IgG Fc-PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human CD107a (LAMP-1)-PeCY5	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
anti-human/mouse Granzyme B-Alexa Fluor® 700	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-human Perforin-PE/Cyanine7	BioLegend, San Diego, CA, USA
anti-mouse/human Ki-67-FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Kullanılan diğer deneysel malzemeler	
Hücre stimülasyon kokteyli (PMA, iyonomisin ve brefeldin A içeren)	BioLegend, San Jose, CA, USA
Fiksasyon tamponu	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Cytofix & Cytoperm kiti	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ficoll-Hypaque ayırma ortamı	Sigma, St. Louis, MO, USA
Tripan mavisi	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
RPMI-1640 besiyeri	Sigma, St. Louis, MO, USA
Human recombinant IL-2	BioLegend, San Diego, CA, USA
NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Germany
LS Columns (25 Columns)	Miltenyi Biotec, Germany

3.3.8. NK Hücre Kültürü Üst Sıvılarında Sitokin ve Sitotoksik Mediatörlerin LEGENDplex™ Yöntemi ile Analizi

Adalimumab varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen 48 saatlik saf NK ve PHMH hücre kültürü aşamasını takiben, NK hücrelerinden salınan sitokinler ve sitotoksik mediatörlerin kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürü üst sıvıları analiz edilmiştir. Kültür sonrası hücre kültürü üst sıvıları dikkatlice mikro pipet yardımıyla 250 ul olacak şekilde toplanarak ependorf tüplere alınmış ve -80C'de çalışma sürecine kadar saklanmıştır. İnsan çözünür IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, TNF-α, çözünür Fas (sFas), çözünür Fas ligandı (sFasL), IFN-γ, granzim A, granzim B, perforin ve granülizin düzeyleri, LEGENDplex™ (Human CD8/NK Panel) kiti (BioLegend, San Diego, CA, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde , NovoCyte® akan hücre ölçer cihazı (ACEA Biosciences, Inc.) ile ölçülmüştür. Periferik venöz kan örnekleri heparinli tüplerde toplanmış, 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen plazma örnekleri −80 °C'de saklanmıştır. Plazma örnekleri 1:1 oranında seyreltilmiş ve karışık yakalama boncuk setleri ile karanlıkta, 800 rpm çalkalayıcı üzerinde karanlıkta oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler santrifüj edilmiş (1050 rpm, 5 dakika) ve supernatan atılmıştır. Sonrasında 200 µl yıkama solüsyonu eklenip, santrifüj ve süpernatan uzaklaştırma işlemi tekrarlanmıştır. Ardından biyotinlenmiş saptama antikorları eklenmiş (25 µl) ve 800 rpm çalkalayıcı üzerinde karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında yukarıda anlatılan yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Daha sonra streptavidin-PE reaktifi eklenerek her bir yakalama boncuğuna ait PE sinyali akan hücre ölçer ile ölçülmüştür. Sitokin konsantrasyonları, LEGENDplex™ Data Analysis Software sürüm 8 kullanılarak standart eğriler üzerinden hesaplanmıştır. Kullanılan ölçüm kitinin minimum saptanabilir konsantrasyon değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. LEGENDplex™ Multiplex Boncuk Dizisi Teknolojisi ile Minimum Saptanabilir Konsantrasyonlar

Sitokin / Molekül	Minimum saptama aralığı (pg/mL)
IL-4	0,9
IL-2	1,1
IL-6	1
IL-10	0,7
sFas	3,6
sFasL	1,3
TNF-α	0,6
IFN-γ	1,6
IL-17A	1,1
Granzim A	1,2
Granzim B	5,6
Perforin	2,1
Granülizin	5,2

Elde edilen verilerin kantitatif analizi LEGENDplex™ Data Analysis Software Version 8 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sitokin ve sitotoksik mediatör konsantrasyonları, standart eğriler üzerinden hesaplanmış ve sonuçlar adalimumab varlığı ile yokluğu arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.3.9. İstatistiksel Analiz

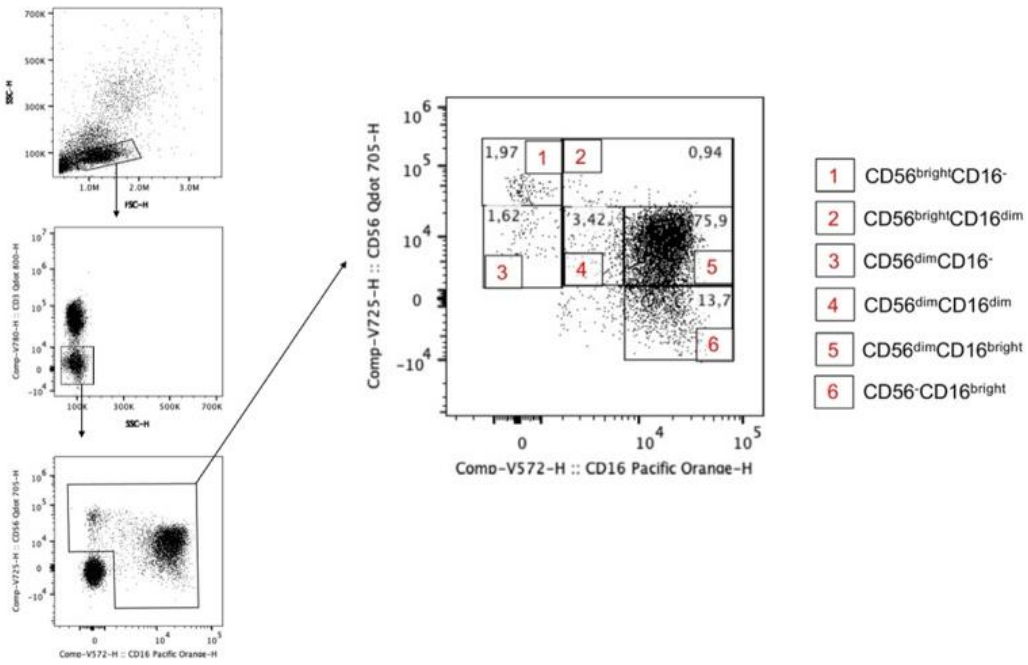
İstatistiksel analiz SPSS 21.0 yazılımı ile yapılmıştır. Verilerin dağılımları Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenlerin değerlendirilmesi için MannWhitney testi, tekrarlayan değişkenlerin değerlendirilmesi için Wilcoxon testi uygulanmıştır. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Deney sonuçlarının grafikleri GraphPad Prism 9.3.1 yazılımı ile hazırlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İMMÜN KONTROL NOKTASI RESEPTÖRLERİNİN NK HÜCRE YANITLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

4.1.1. Periferik Kanda NK Hücre Alt Gruplarının Dağılımı

NK hücreleri CD16 ve CD56 yüzey moleküllerinin ekspresyon düzeyine göre 6 alt grup altında sınıflandırılmaktadır. Bu alt gruplar fonksiyonel fonksiyonel farklılıkları göstermektedir. Bu alt gruplar bu şekilde sınıflandırılmıştır: $CD56^{bright}CD16^{-}$, $CD56^{bright}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ (Şekil 8).

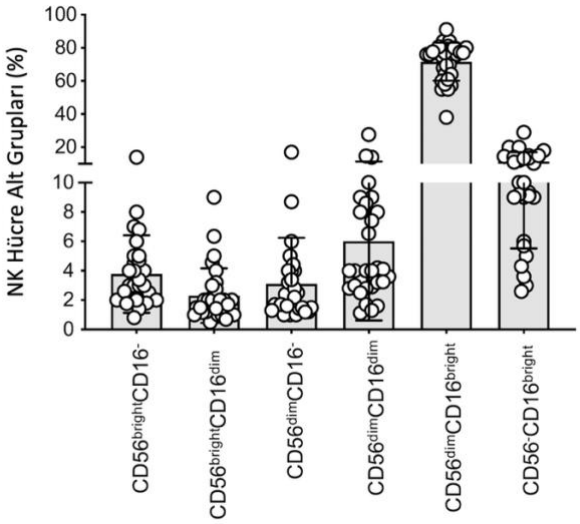


Şekil 8. NK hücre alt gruplarının tanımlanmasına yönelik temsilî kapılama stratejisi

NK hücre alt gruplarının akan hücre ölçer ile tanımlanması ve kapılanan popülasyonların frekansları, bir temsili sağlıklı bireyin PKMH gösterilmiştir. Lenfositler ileri ve yan saçılım (FSC ve SSC) nokta grafiklerine göre kapılanmış, ardından CD16 ve/veya CD56 eksprese eden CD3-negatif hücreler seçilmiştir. NK hücreleri, CD16 ve CD56 ekspresyonuna göre altı alt gruba ayrılmıştır: $CD^{56bright}CD16^{-}$ (1), $CD56^{bright}CD16^{dim}$ (2),

$CD56^{dim}CD16^{-}$ (3), $CD56^{dim}CD16^{dim}$ (4), $CD56^{dim}CD16^{bright}$ (5) ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ (6) (A). Otuz sağlıklı donörden elde edilen taze PKMH'lerde, toplam NK hücre popülasyonu içerisindeki altı farklı NK hücre alt grubunun yüzdelik dağılımları gösterilmiştir (B).

Sağlıklı gönüllülerin periferik kan örneklerinde $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücreleri, %71,6 ± 2,1 oranı ile en baskın NK hücre popülasyonu olarak saptanmıştır. Bu alt grubu sırasıyla $CD56^{-}CD16^{bright}$ (%11,3 ± 1,1), $CD56^{dim}CD16^{dim}$ (%6,0 ± 1,0), $CD56^{bright}CD16^{-}$ (%3,8 ± 0,5), $CD56^{dim}CD16^{-}$ (%3,1 ± 0,6) ve $CD56^{bright}CD16^{dim}$ NK hücreleri (%2,3 ± 0,3) izlemiştir. Sağlıklı popülasyonda NK hücre alt gruplarının dağılımı Şekil 9'da gösterilmiştir



Şekil 9. Sağlıklı popülasyonda NK hücre alt gruplarının dağılımı

Sağlıklı popülasyonda NK hücre alt gruplarının dağılımı incelenmiştir. Grafikte sütunlar NK hücre alt gruplarının yüzdelerinin ortalamalarını, çubuklar ise standart sapmayı temsil etmektedir. Her bir sembol bir sağlıklı bireyi temsil etmektedir (n=30).

4.1.2. NK Hücre Alt Gruplarında İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Ekspresyonları

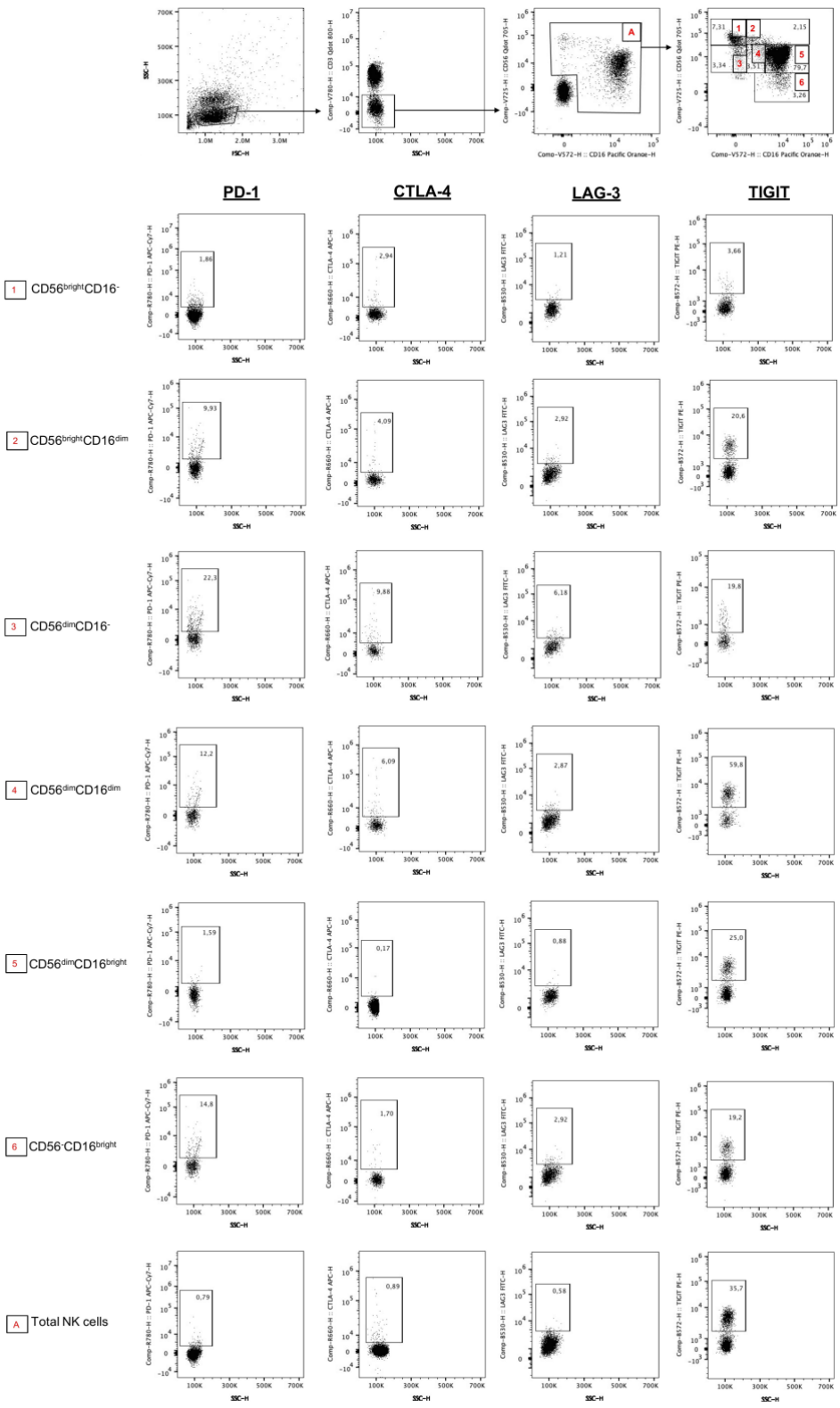
Toplam NK hücre popülasyonunda PD-1 (%0,83 ± 0,10), CTLA-4 (%0,26 ± 0,04) ve LAG-3 (%0,32 ± 0,07) ekspresyon düzeylerinin oldukça düşük olduğu, buna karşın TIGIT ekspresyonunun görece yüksek olduğu (%22,6 ± 2,2) saptanmıştır. Bu reseptörlerin ekspresyon oranları daha sonra yukarıda belirtilen altı farklı NK hücre alt grubu içerisinde ayrı ayrı analiz edilmiştir (Şekil 10). $CD56^{dim}CD16^{-}$ NK hücreleri,

değerlendirilen dört immün kontrol noktası reseptörünün tamamı için en yüksek ekspresyon düzeylerine sahip alt grup olarak belirlenmiştir.

PD-1 ekspresyonunun, genel NK hücre popülasyonu ile karşılaştırıldığında $CD56^{dim}CD16^{-}$ (%9,12 ± 0,96), $CD56^{bright}CD16^{dim}$ (%2,35 ± 0,43), $CD56^{dim}CD16^{dim}$ (%2,34 ± 0,40) ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ (%2,13 ± 0,43) NK hücre alt gruplarında anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (sırasıyla p<0,001; p=0,001; p=0,005 ve p=0,006). Buna karşılık, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücrelerinde PD-1 ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (%0,31 ± 0,032; p<0,001) (Şekil 11).

CTLA-4 ekspresyon dağılımı PD-1 ile benzerlik göstermiş; $CD56^{dim}CD16^{-}$ (%4,67 ± 0,63), $CD56^{dim}CD16^{dim}$ (%1,67 ± 0,29), $CD56^{bright}CD16^{dim}$ (%1,66 ± 0,26), $CD56^{bright}CD16^{-}$ (%1,27 ± 0,21) ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ (%0,76 ± 0,13) NK hücre alt gruplarında genel NK hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı düzeyde artış saptanmıştır (tümü için p<0,001). Buna karşın $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücrelerinde CTLA-4 ekspresyonu görece değişmeden kalmıştır (Şekil 11).

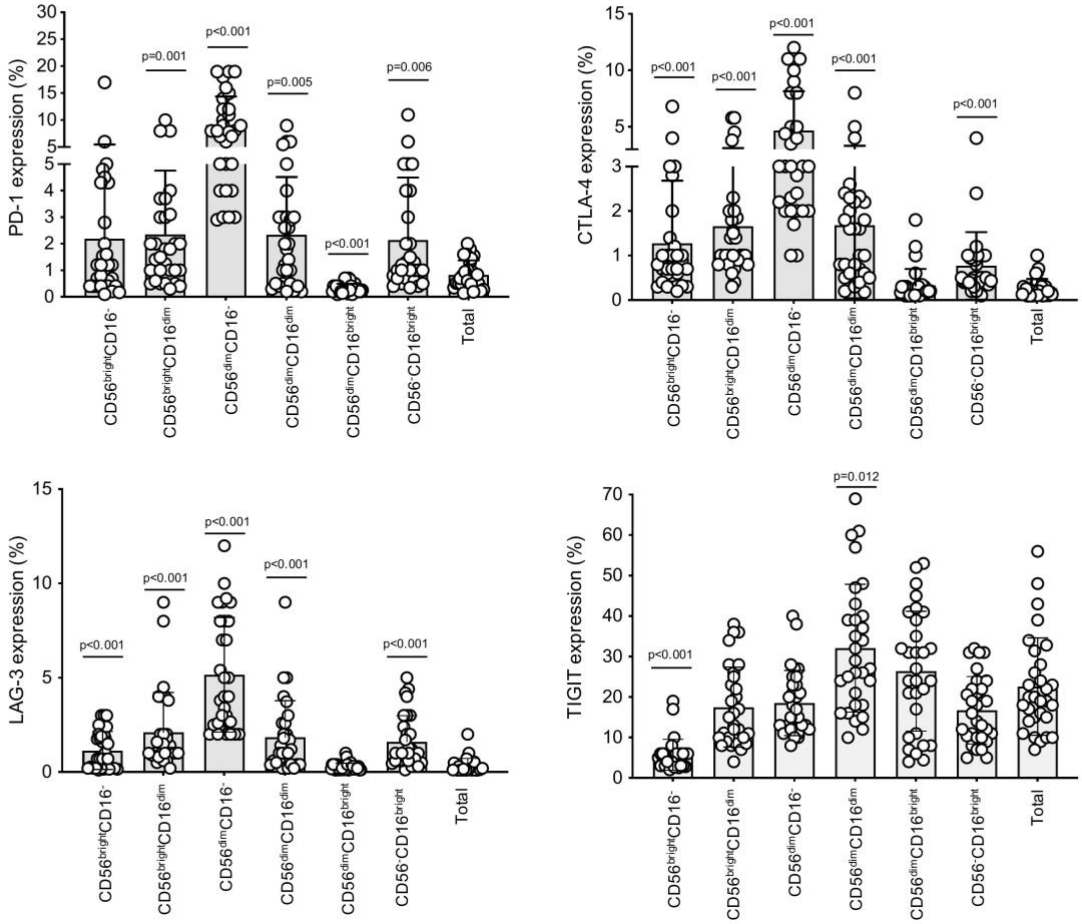
LAG-3 ekspresyonunun dağılımı da CTLA-4 ile benzer özellikler göstermiştir. LAG-3 ekspresyonu, $CD56^{dim}CD16^{-}$ (%5,16 ± 0,55), $CD56^{bright}CD16^{dim}$ (%2,11 ± 0,39), $CD56^{dim}CD16^{dim}$ (%1,84 ± 0,35), $CD56^{-}CD16^{bright}$ (%1,61 ± 0,25) ve $CD56^{bright}CD16^{-}$ (%1,14 ± 0,18) NK hücre alt gruplarında toplam NK hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır (tümü için p<0,001). Buna karşılık $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu belirgin bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 12).



Şekil 10. NK Hücre Alt Gruplarında İmmün Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarının Analizinde Kapılama Stratejisi

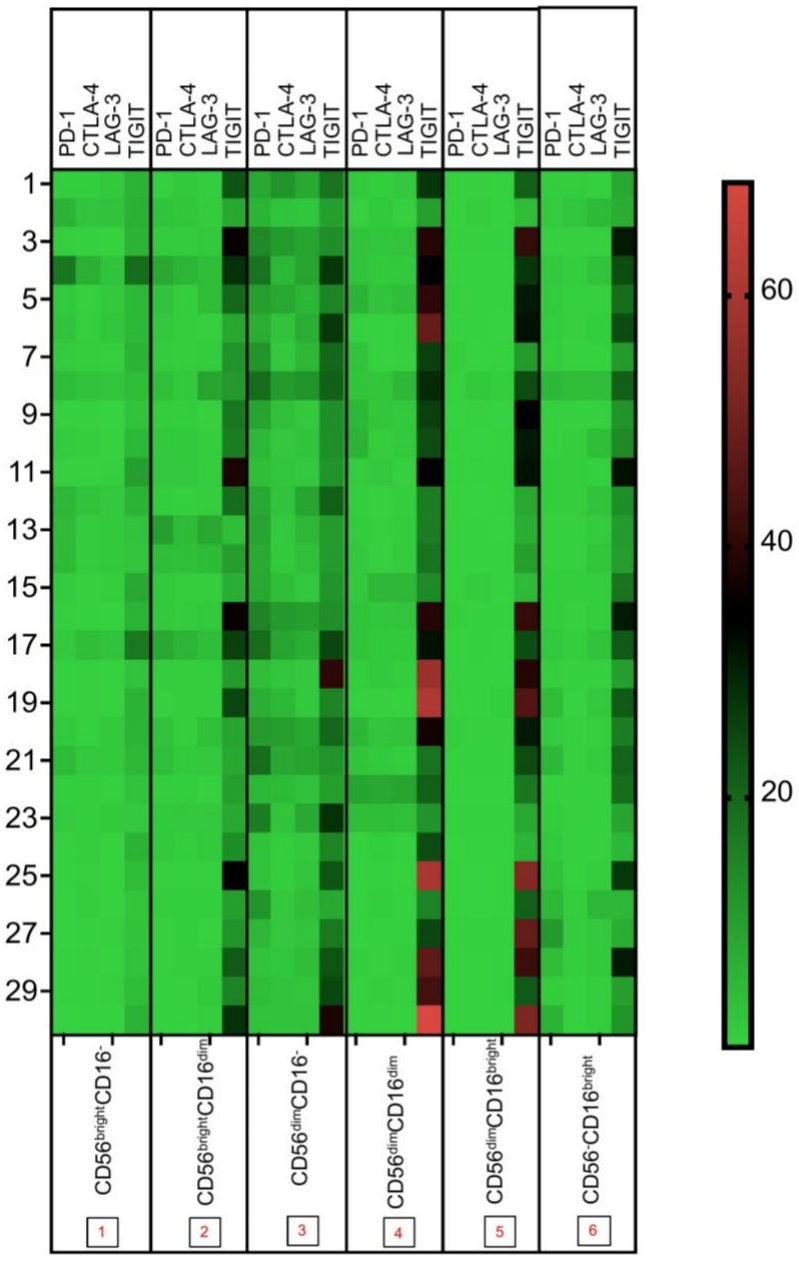
NK hücreleri, CD3, CD16, CD56, PD-1, LAG-3, TIGIT ve CTLA-4'e karşı monoklonal antikorlar kullanılarak boyanmış ve akan hücre ölçer ile analiz edilmiştir. CD3 negatif hücreler kapılanmış ve immün kontrol noktası reseptörü pozitif hücrelerin oranları değerlendirilmiştir.

TIGIT ekspresyonunun dağılımı ise diğer immün kontrol noktası reseptörlerinden belirgin şekilde farklı bulunmuştur. TIGIT ekspresyonunun genel olarak diğer reseptörlere kıyasla daha yüksek olduğu ve yalnızca $CD56^{dim}CD16^{dim}$ NK hücrelerinde anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır (%32,07 ± 2,88). Diğer kontrol noktası reseptörlerinin aksine, TIGIT ekspresyonunun $CD56^{bright}$CD16- NK hücrelerinde anlamlı derecede azaldığı belirlenmiş (%5,72 ± 0,69), diğer dört NK hücre alt grubunda ise görece değişmeden kaldığı izlenmiştir (Şekil 11)



Şekil 11. NK hücre alt gruplarında immün kontrol noktası reseptörü ekspresyonları

Saçılım grafikleri, toplam NK hücre popülasyonu ve NK hücre alt gruplarında PD-1, CTLA-4, LAG-3 ve TIGIT ekspresyonları için ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir. Her bir sembol bir sağlıklı bireyi temsil etmektedir (n=30).



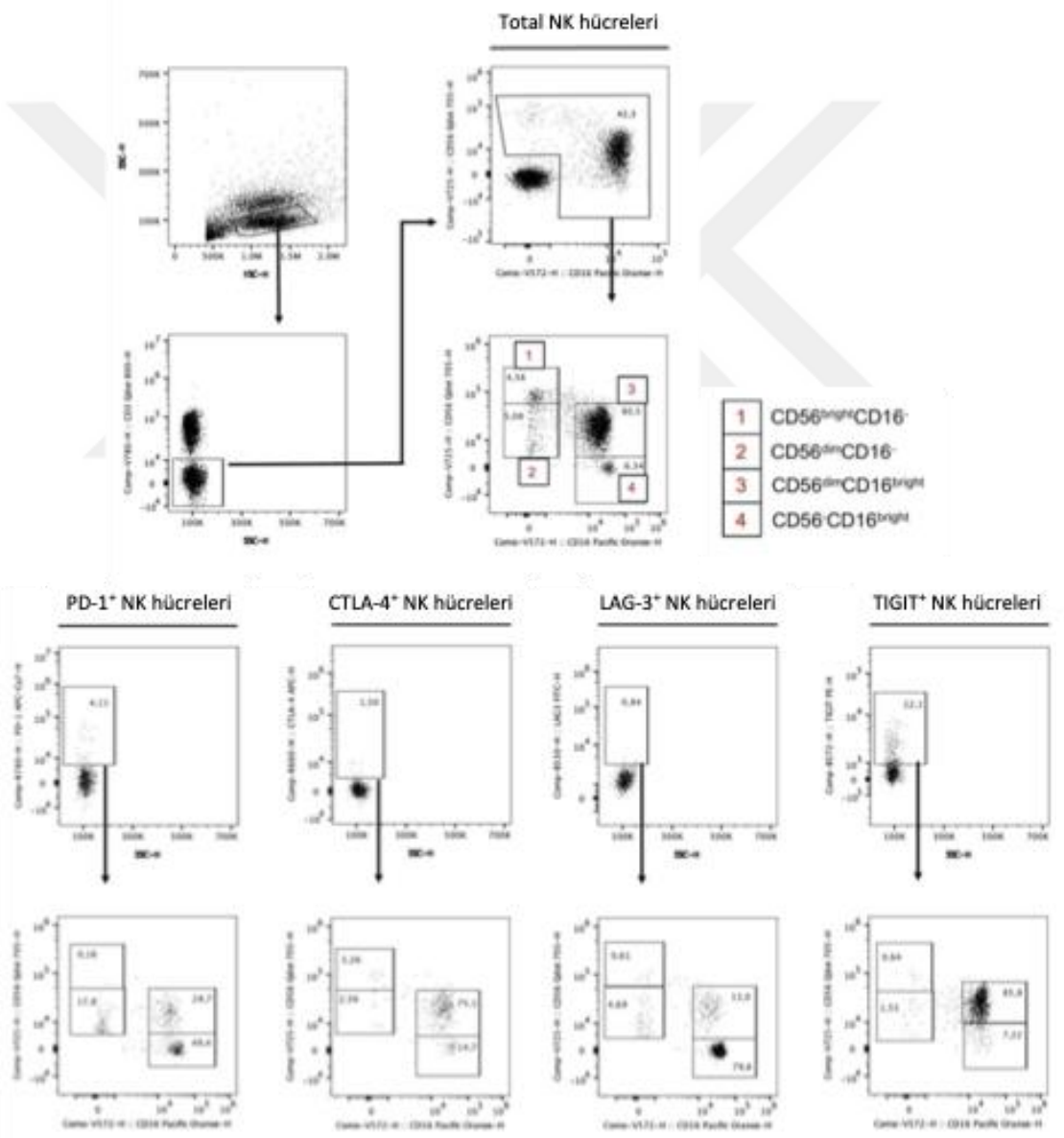
Şekil 12. NK Hücre Alt Gruplarında İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Ekspresyonlarını Gösteren Isı Haritası

Isı haritası, altı farklı NK hücre alt grubunda PD-1, CTLA-4, LAG-3 ve TIGIT ekspresyonlarını göstermektedir. Her sütun bir immün kontrol noktası reseptörünü, her

satır ise bir sağlıklı bireyi temsil etmektedir. Reseptör ekspresyon düzeyleri, oran arttıkça yeşilden kırmızıya doğru değişen renk skalası ile gösterilmiştir.

4.1.3. İmmün kontrol noktası reseptörü pozitif NK hücre popülasyonlarında NK hücre alt gruplarının dağılımı

İmmün kontrol noktası reseptörlerinin NK hücre alt gruplarının dağılımı üzerindeki etkisini daha iyi değerlendirmek amacıyla, PD-1, CTLA-4, LAG-3 ve TIGIT ekspresyonu gösteren NK hücreleri ayrı ayrı kapılanarak analiz edilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Taşıyan NK Hücrelerinin İçerisinde NK Hücre Alt Gruplarının Kapılanma Stratejisi

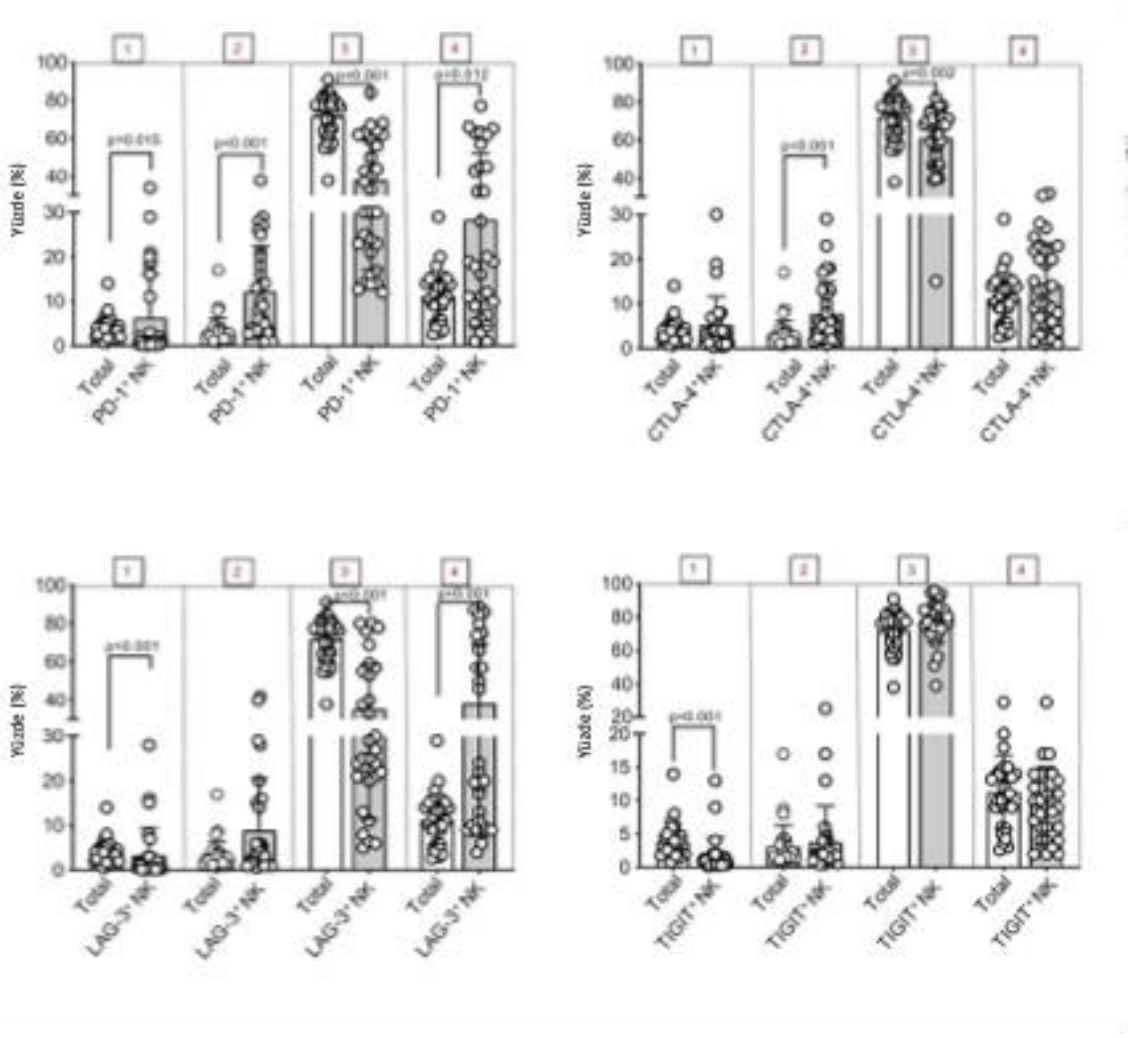
İmmün kontrol noktası reseptörü eksprese eden NK hücreleri içerisinde $CD56^{bright}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ NK hücre alt gruplarının yüzdelik oranları gösterilmiştir. Temsilî nokta grafikleri, belirli immün kontrol noktası reseptörlerini eksprese eden NK hücreleri arasında dört farklı NK hücre alt grubunun karakterizasyonunu göstermektedir. Akan hücre ölçer grafiklerindeki sayılar yüzdelik oranları ifade etmektedir.

$PD\text{-}1^{+}$ NK hücre popülasyonunda $CD56^{bright}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ hücre oranlarının anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (sırasıyla $p=0,015$; $p<0,001$ ve $p=0,012$). Buna karşılık, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücrelerinin oranı toplam NK hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,001$) (Şekil 14).

$CTLA\text{-}4^{+}$ NK hücreleri arasında $CD56^{dim}CD16^{-}$ NK hücrelerinin oranı anlamlı derecede artmış ($p<0,001$), $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücrelerinin oranı ise belirgin şekilde azalmıştır ($p=0,002$) (Şekil 14).

$LAG\text{-}3^{+}$ NK hücre popülasyonunda CD56-CD16bright NK hücrelerinin oranı anlamlı olarak artarken ($p<0,001$), $CD56^{bright}CD16^{-}$ ve $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücrelerinin oranlarında anlamlı azalma saptanmıştır (her ikisi için $p<0,001$) (Şekil 14).

Buna karşılık, $TIGIT^{+}$ NK hücre popülasyonunda bu değişiklikler daha sınırlı düzeyde gözlenmiştir. Yalnızca $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK hücrelerinin oranında anlamlı azalma saptanmış ($p<0,001$), diğer NK hücre alt gruplarının oranları ise görece değişmeden kalmıştır (Şekil 14).

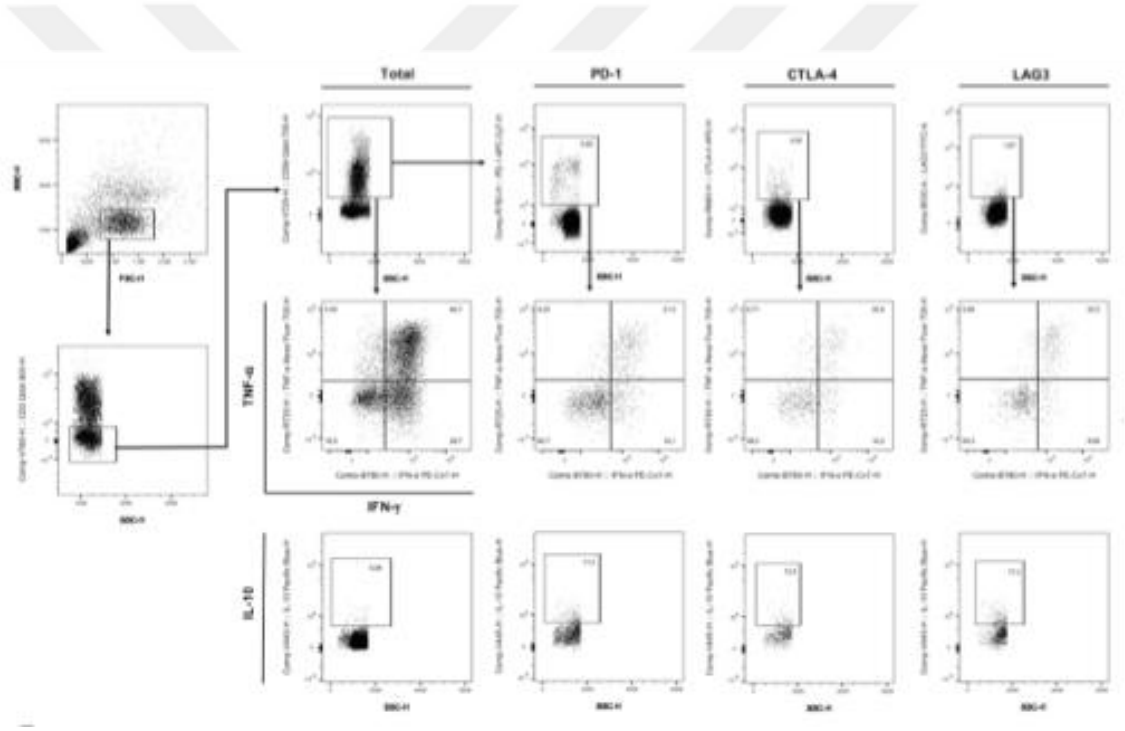


Şekil 14. İmmün kontrol noktası reseptörü taşıyan NK hücreleri arasında NK hücre alt gruplarının dağılımı

Saçılım grafikleri ve çubuk grafikler, 30 sağlıklı bireyde PD-1, CTLA-4, LAG-3 ve TIGIT pozitif NK hücre popülasyonları için ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir. $p<0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir. (1; $CD56^{bright}CD16^{-}$, 2; $CD56^{dim}CD16^{-}$ 3; $CD56^{dim}CD56^{bright}$, 4; $CD56^{-}CD16^{bright}$).

4.1.4. PD-1, CTLA-4 ve LAG-3 Ekspresyonu ile Sitokin Espresyonu Arasındaki İlişki

İmmün kontrol noktası reseptörü ekspresyonunun sitokin salgılayan NK hücrelerinin fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, PD-1^{+}, CTLA-4^{+} ve LAG-3^{+} NK hücreleri ayrı ayrı kapılanmış ve bu üç popülasyonda sitokin salınım profilleri analiz edilmiştir (Şekil 15). Periferik kandaki NK hücrelerinde inflamatuvar sitokinler olan IFN-γ ve TNF-α düzeylerinin yüksek, buna karşın IL-10 düzeylerinin oldukça düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 16).

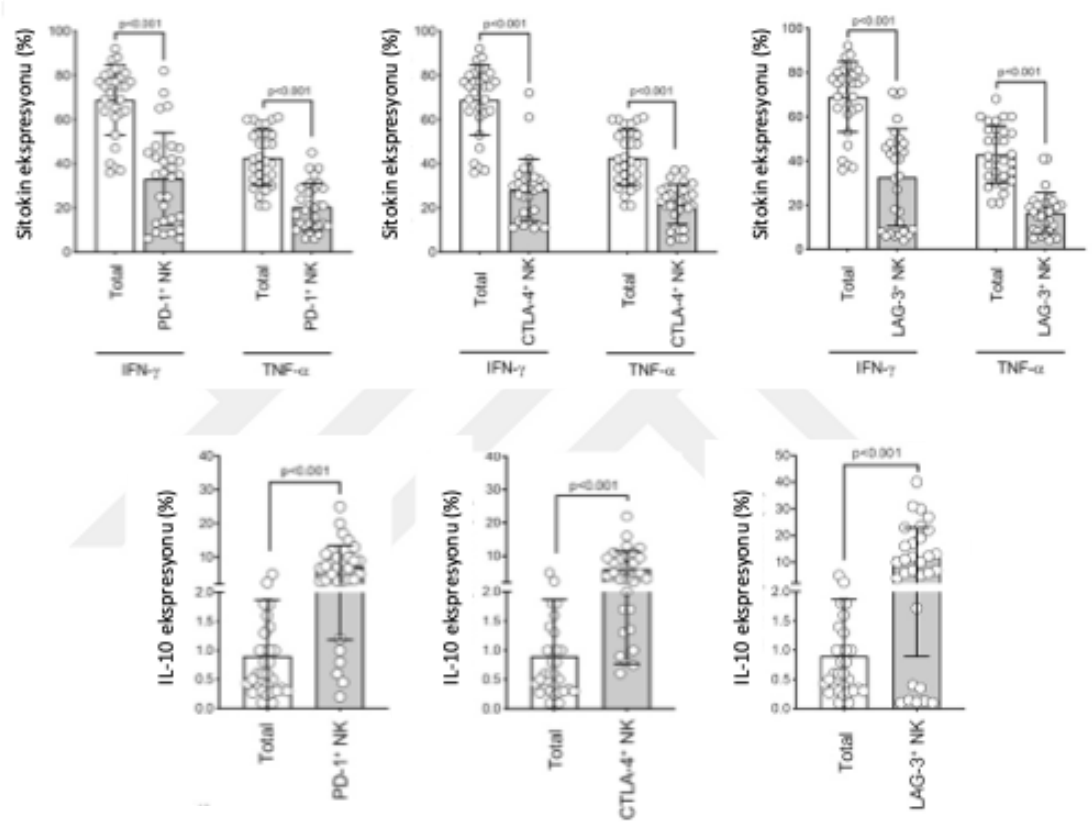


Şekil 15. İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Taşıyan NK Hücrelerinde Sitokin Salınımı Analizi İçin Kapılama Stratejisi

Taze izole edilen periferik kan mononükleer hücreleri, hücre stimülasyon kokteyli ile 4 saat süreyle uyarılmış ve hücre içi sitokin boyamasını takiben TNF-α, IFN-γ ve IL-10 ekspresyonları akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Lenfosit popülasyonu FSC ve SSC parametrelerine göre seçilmiş, ardından CD3-negatif lenfositler kapılanmış ve CD56^{+} NK hücreleri tanımlanmıştır. Nokta grafikleri hem toplam NK hücre popülasyonunda hem de PD-1^{+}, CTLA-4^{+} ve LAG-3^{+} NK hücrelerinde TNF-α, IFN-γ ve IL-10 ekspresyonlarını göstermektedir (A).

İnflamatuvar sitokinler olan IFN-γ ve TNF-α düzeylerinin, PD-1$^+$, CTLA-4$^+$ ve LAG-3$^+$ NK hücrelerinde anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (tümü için IFN-γ ve TNF-α açısından p<0,001) (Şekil 16).

Buna karşılık, düzenleyici sitokin olan IL-10 düzeyinin, PD-1$^+$, CTLA-4$^+$ ve LAG-3$^+$ NK hücrelerinde anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (tümü için p<0,001) (Şekil 16).



Şekil 16. NK hücrelerinde immün kontrol noktası reseptörü ekspresyonu ile sitokin salınım profili arasındaki ilişki

Saçılım grafikleri ve çubuk grafikler, toplam NK hücre popülasyonu ile PD-1$^+$, CTLA-4$^+$ ve LAG-3$^+$ NK hücrelerinde TNF-α, IFN-γ ve IL-10 ekspresyonlarının ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir (B ve C). Bu analiz, 30 sağlıklı gönüllüye ait bireysel verileri içermektedir.

Daha önce yapılan *in vitro* çalışmalarda, NK hücrelerinin uyarılmasının bu hücrelerin yüzeyinde TIGIT ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [80]. Bu çalışmada hücre içi sitokin boyamaları için PMA/iyonomisin uyarımı kullanılmış ve benzer şekilde NK hücrelerinde TIGIT ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle, yukarıda

belirtilen hücre içi sitokin analizleri TIGIT^{+} NK hücre alt grubunda gerçekleştirilmemiştir.

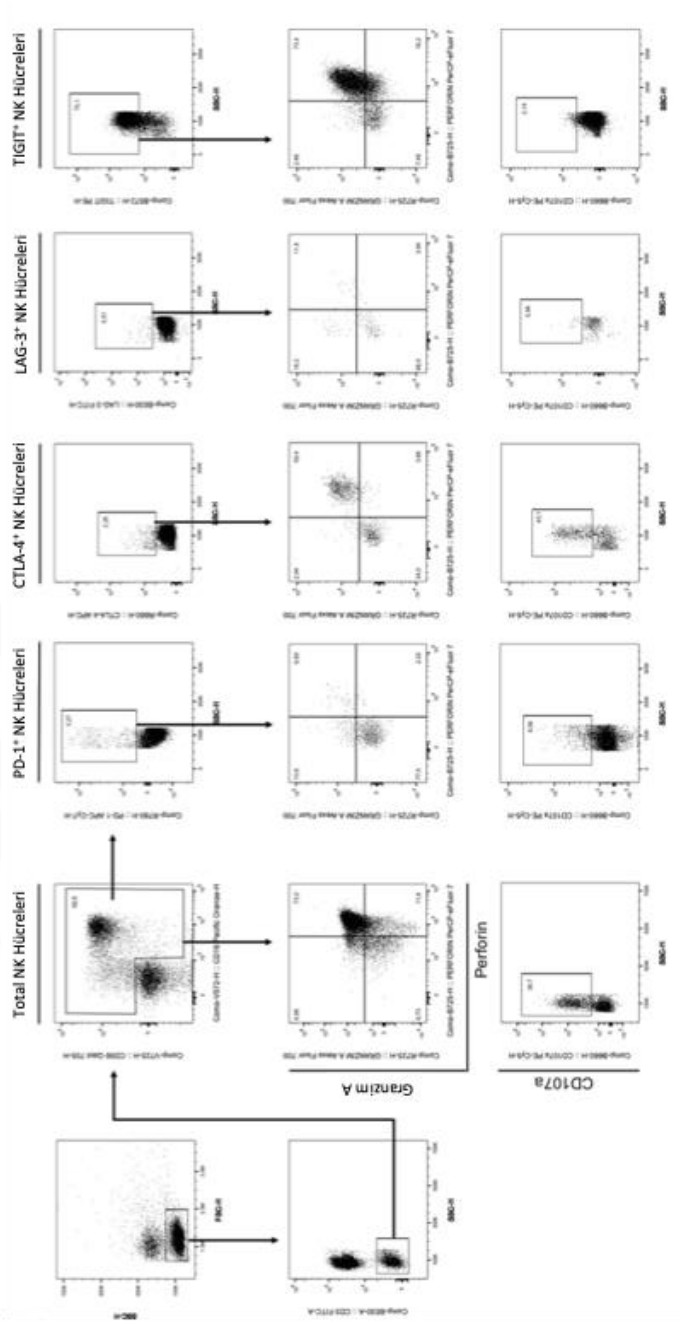
4.1.5. PD-1^{+}, CTLA-4^{+} Ve LAG-3^{+} NK Hücrelerinde Sitotoksik Granül Ekspresyonları

Sitotoksik granül içeriğini değerlendirmek amacıyla perforin ve granzim A ekspresyonları, bu hücrelerin degranülasyon kapasitesini değerlendirmek amacıyla ise CD107a ekspresyonu incelenmiştir (Şekil 17).

Perforin ekspresyonunun PD-1^{+} NK hücrelerinde ($p<0,001$), CTLA-4^{+} NK hücrelerinde ($p<0,001$) ve LAG-3^{+} NK hücrelerinde ($p<0,001$) anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (Şekil 16). Benzer şekilde, granzim A ekspresyonu PD-1^{+} ($p<0,001$) ve LAG-3^{+} NK hücrelerinde ($p<0,001$) anlamlı derecede azalmış, CTLA-4^{+} NK hücrelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma eğilimi gözlenmiştir ($p=0,128$) (Şekil 18).

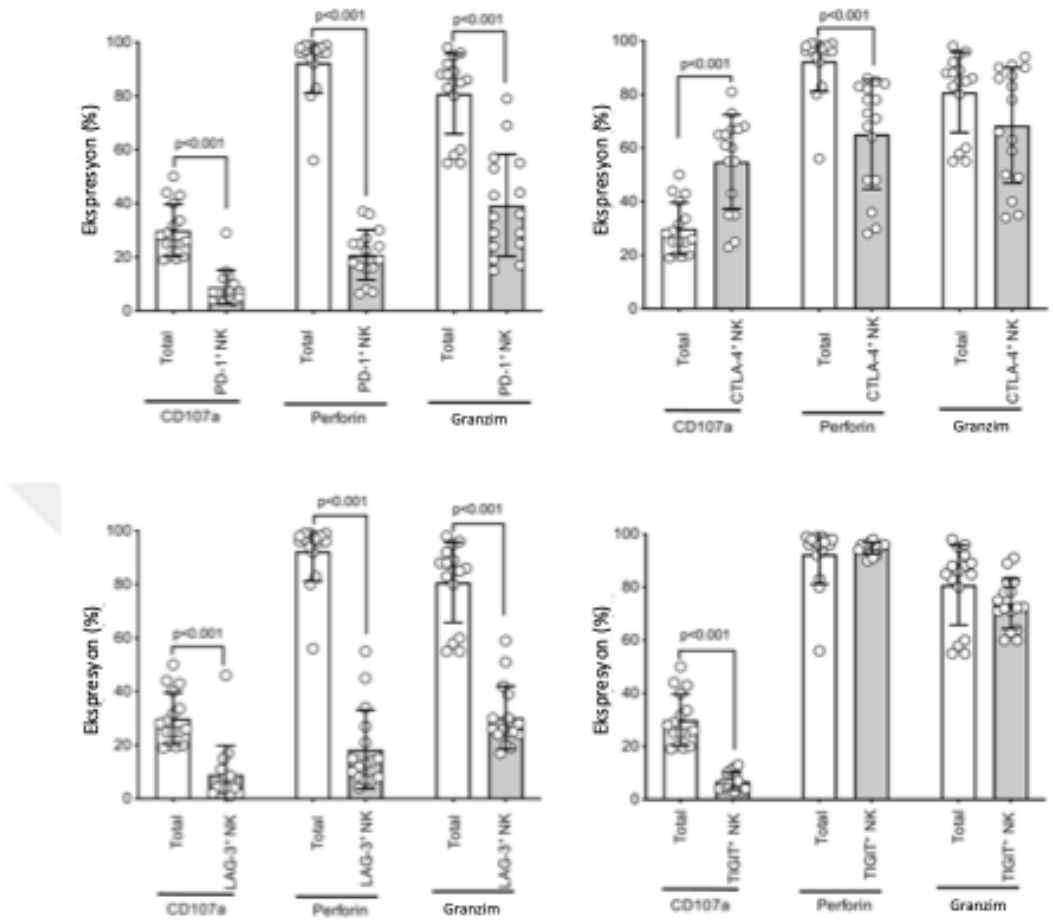
Degranülasyon kapasitesi değerlendirildiğinde, PD-1^{+} ve LAG-3^{+} NK hücrelerinde anlamlı derecede azalma saptanmıştır (her ikisi için $p<0,001$). Buna karşın, CTLA-4^{+} NK hücrelerinde, sitotoksik granül içeriği azalmış olmasına rağmen degranülasyon kapasitesinin anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 18). Bu durumun, IL-10 içeren veziküllerin artmış degranülasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Şekil 18).

TIGIT ekspresyonunun, çalışmada değerlendirilen diğer kontrol noktası reseptörlerinden farklı olarak, CD56$^{-/dim}$CD16^{bright} NK hücrelerinde arttığı saptanmıştır. Periferik kan NK hücrelerinde yaklaşık %20 oranında eksprese edilen TIGIT'in sitotoksik fonksiyonlar üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla sitotoksik granül içerikleri incelenmiştir.



Şekil 17. İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Taşıyan Hücrelerde Sitotoksisite Analizinin Kapılama Stratejisi

İzole edilen periferik kan mononükleer hücreleri, anti-human-CD107a monoklonal antikoru varlığında, 10:1 efektör:hedef oranında K562 hedef hücreleri ile veya hedef hücre olmaksızın 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Fiksasyon ve permeabilizasyon işlemlerinin ardından hücreler perforin ve granzim A için monoklonal antikorlar ile boyanmış ve akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Nokta grafikleri, K562 stimülasyonu sonrasında PD-1$^+$, CTLA-4$^+$, LAG-3$^+$ ve TIGIT$^+$ NK hücrelerinde CD107a, perforin ve granzim A eksprese eden hücrelerin yüzdelik oranlarını göstermektedir.



Şekil 18. İmmün kontrol noktası reseptörü ekspresyonu ile NK hücre sitotoksisitesi İlişkisi

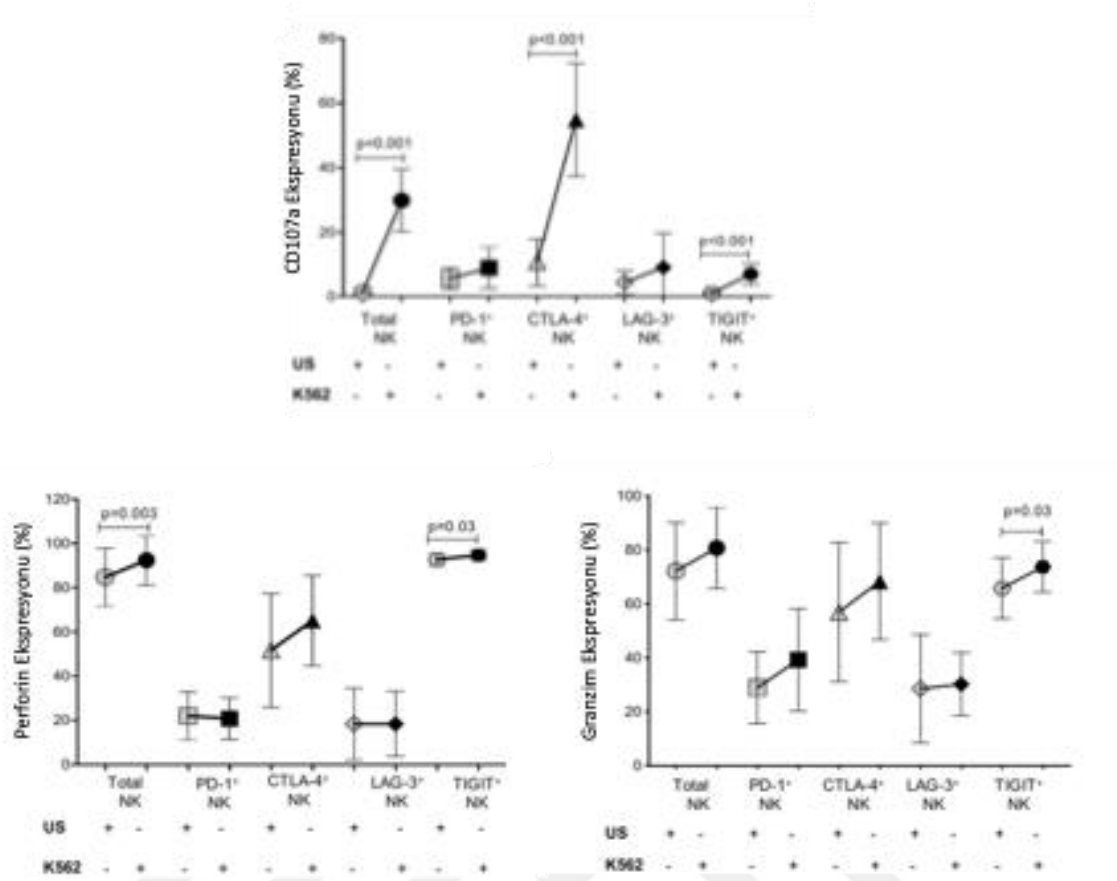
Çubuk grafikler, K562 stimülasyonu sonrası toplam NK hücrelerinde ve immün kontrol noktası reseptörü pozitif NK hücrelerinde CD107a, perforin ve granzim A ekspresyonlarını göstermektedir.

TIGIT^{+} NK hücrelerinde perforin ve granzim A ekspresyonlarının değişmediği saptanmıştır (sırasıyla p=0,171 ve p=0,073). Buna karşın, bu hücrelerin degranülasyon kapasitesinde anlamlı azalma gözlenmiştir (p<0,001) (Şekil 18). Degranülasyon kapasitesindeki bu azalmanın sitotoksik fonksiyonlar mı yoksa sitokin salınımı ile mi ilişkili olduğu net olarak belirlenememiştir.

4.1.6. PD-1$^+$, CTLA-4$^+$ ve LAG-3$^+$ NK hücrelerinde K562 hücre stimülasyonuna sitotoksik yanıt bozulmuştur

Kontrol noktası reseptörü (PD-1, CTLA-4 ve LAG-3) eksprese eden NK hücrelerinin hedef hücre uyarısına verdikleri sitotoksik yanıtlar ayrıca incelenmiştir. Periferik kandan izole edilen periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH), 10:1 efektör:hedef (E:H) oranında K562 hedef hücreleri ile veya hedef hücre olmaksızın birlikte kültüre edilmiştir. Sitotoksik granül ekspresyonundaki (perforin ve granzim A) değişiklikler ve degranülasyon kapasitesi (CD107a ekspresyonu) akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir.

Periferik kan NK hücrelerinin hedef hücre stimülasyonuna belirgin yanıt vermiş, degranülasyon oranında anlamlı artış ($p<0,001$) ve sitotoksik granül içeriğinde artış (perforin için $p=0,003$) gözlendiği saptanmıştır (Şekil 19). Buna karşın, PD-1$^+$ ve LAG-3$^+$ NK hücrelerinde, hedef hücre stimülasyonuna yanıt olarak ne degranülasyon oranında ne de sitotoksik granül içeriğinde anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir (Şekil 19). CTLA-4$^+$ NK hücrelerinde ise hedef hücre stimülasyonuna yanıt olarak degranülasyon artmış ($p<0,001$), ancak sitotoksik granül içeriği değişmeden kalmıştır (Şekil 19). TIGIT$^+$ NK hücrelerinin K562 hedef hücre stimülasyonuna verdikleri yanıt ayrıca incelenmiştir. TIGIT$^+$ NK hücrelerinin hedef hücre stimülasyonuna iyi yanıt verdiği; sitotoksik granül ekspresyonlarında (perforin ve granzim A) (her ikisi için $p=0,03$) ve degranülasyon kapasitesinde ($p<0,001$) anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 19).



Şekil 19. İmmün Kontrol Noktası Reseptörü Taşıyan NK Hücrelerinin K652 Stimülasyonuna Yanıtları

Grafikler, hedef hücre stimülasyonu olmaksızın ve K562 stimülasyonu sonrası toplam NK hücre popülasyonu ile immün kontrol noktası reseptörü pozitif NK hücrelerinde CD107a, perforin ve granzim A ekspresyonlarının ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir. Bu analiz, 16 sağlıklı gönüllüye ait bireysel verileri içermektedir.

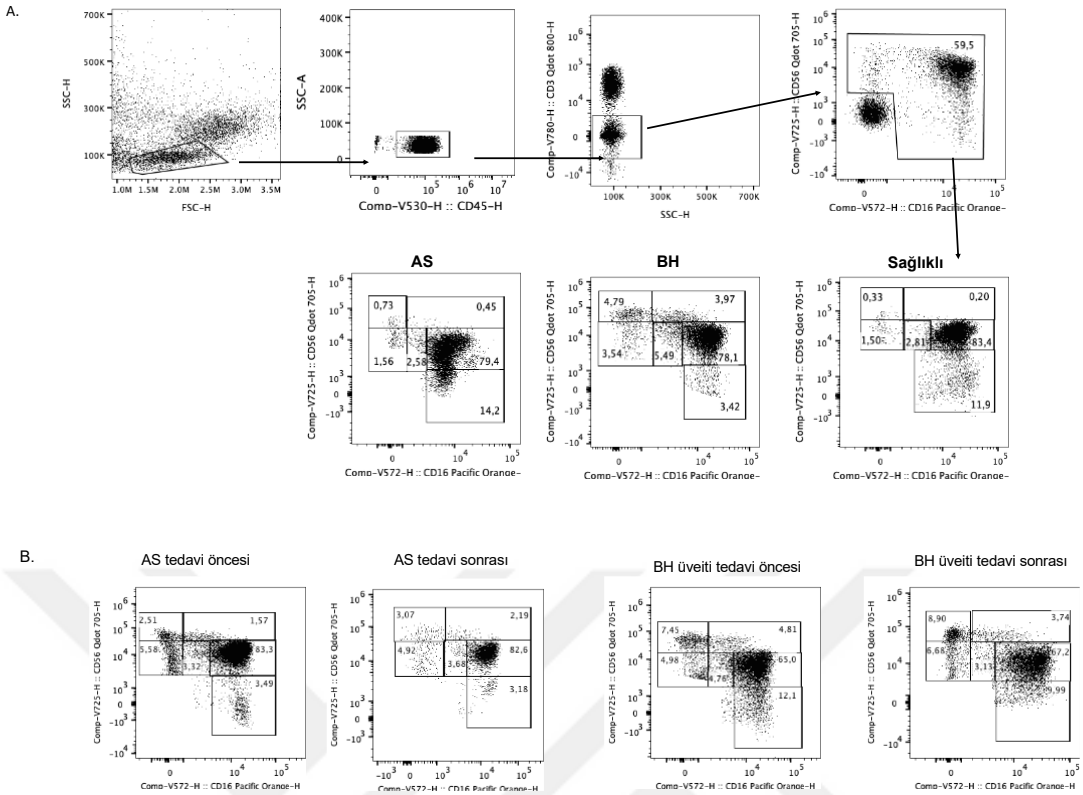
4.2. BEHÇET ÜVEİTİ HASTALARINDA ADALİMUMAB TEDAVİSİNİN NK HÜCRE YANITLARI ÜZERİNDEKI ETKİLERİ

4.2.1. Adalimumab Tedavisinin NK Hücre Alt Grupları Üzerine Etkileri

NK hücreleri üzerlerindeki CD16 ve CD56 ekspresyonuna göre 6 grup halinde incelenmektedir. Bu her bir grup NK hücresi farklı fenotipik ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. Yukarıda immün kontrol noktası reseptörü ekspresyonu ve fonksiyonel özelliklerini tanımlamış olduğumuz bu 6 NK hücre alt grubu; $CD56^{bright}CD16^{-}$, $CD56b^{bright}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ NK hücrelerini içermektedir [77]. Fonksiyonel olarak $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücreleri sitotoksik özellikleriyle ön plana çıkarken, $CD56^{bright}CD16^{dim}$ alt grup sitokin salgılama özellikleriyle ön plana çıkmakta, $CD56^{dim}CD16^{-}$ NK hücreleri ise fonksiyonel olarak eksik kalmış, tükenmişlik fenotipindeki NK hücre alt grubu olarak bilinmektedir.

NK hücre alt gruplarının akan hücre ölçer kapılama ve analiz stratejisi Şekil 20'de gösterilmiştir. CD3 eksprese etmeyen CD16 ve CD56 pozitif NK hücre analizleri; $CD56^{bright}CD16^{-}$, $CD56b^{bright}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ alt gruplarına ayrılarak yapılmıştır.

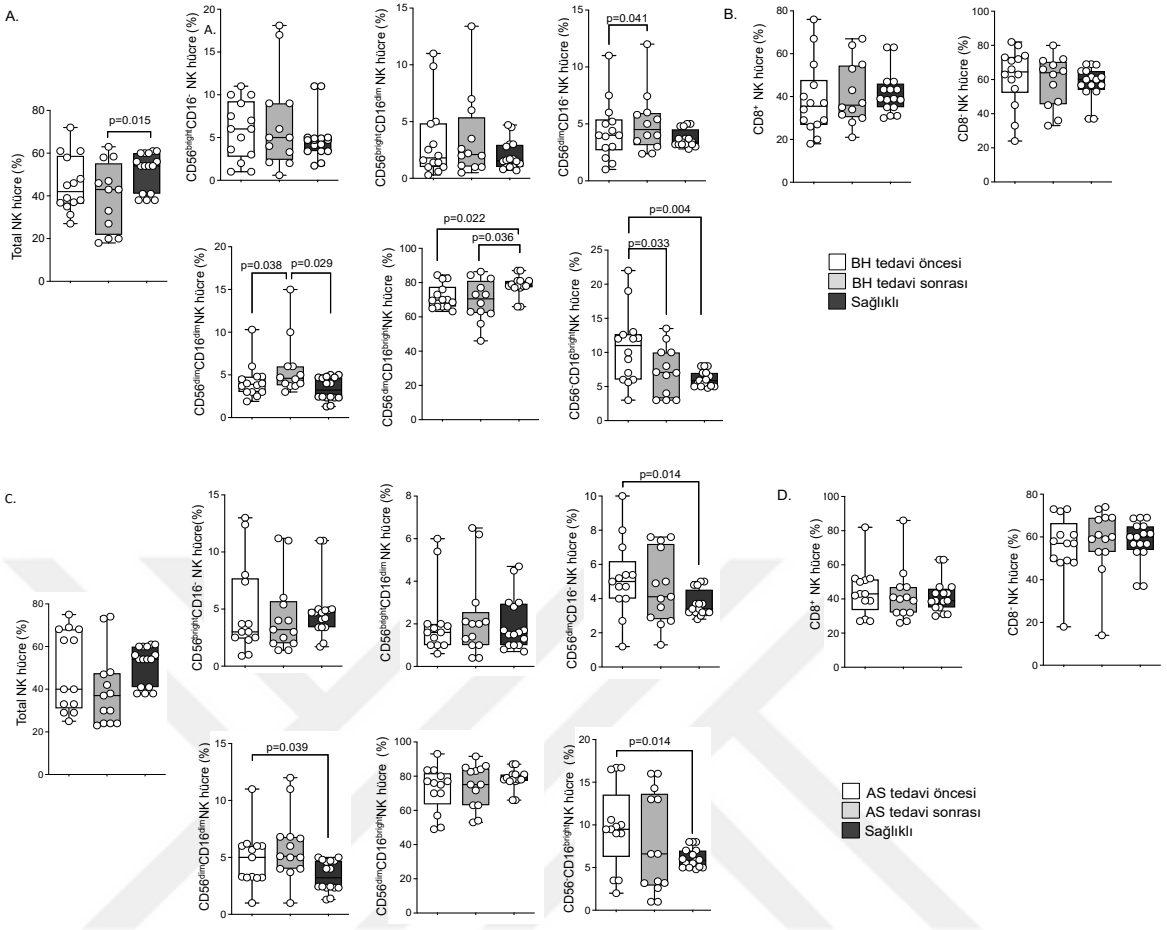
Behçet üveiti hastalarında klinik olarak aktif oldukları dönemde $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücre oranlarının sağlıklı bireylerden daha düşük ($p=0.022$) düzeyde olduğu, $CD56^{-}CD16^{bright}$ NK hücre alt grubunun ise anlamlı olarak arttığı ($p=0.014$) gözlenmiştir. Adalimumab tedavisi sonrasında klinik remisyon sağlanması ardından $CD56^{-}CD16^{bright}$ NK hücre oranı istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmış ($p=0.033$) ve sağlıklı bireyler ile benzer seviyeye gelmiştir. Adalimumab tedavisi ardından $CD56^{dim}CD16^{-}$ (tükenmişlik fenotipi) ($p=0.041$) ve $CD56^{dim}CD16^{dim}$ NK hücre alt gruplarının oranlarında ise istatistiksel anlamlı artış ($p=0.029$) gözlenmiştir. Behçet hastalarındaki NK hücre alt gruplarının dağılımları Şekil 21A' da gösterilmiştir. $CD8^{+}$ NK hücre alt grubunun daha aktif bir NK hücre alt grubunu temsil ettiği ve bu hücre alt grubunun daha önce ankilozan spondilit hastalarında olumlu adalimumab yanıtı ile ilişkilendirildiği bilinmektedir. Ancak bu çalışmada Behçet üveiti hastalarında adalimumab tedavisinin $CD8^{+}$ ve $CD8^{-}$ NK hücre alt grupları üzerine etkisi gözlenmemiştir (Şekil 21B).



Şekil 20. Behçet üveiti hastaları, ankilozan spondilit hastaları ve sağlıklı bireylerde NK hücre kapılama stratejisi ve NK hücre alt grup değişimlerini gösteren akan hücre ölçer görüntüleri

CD3 eksprese etmeyen CD16 ve CD56 pozitif NK hücre analizleri; $CD56^{bright}CD16^{-}$, $CD56b^{bright}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ alt gruplarına ayrılarak yapılmıştır.

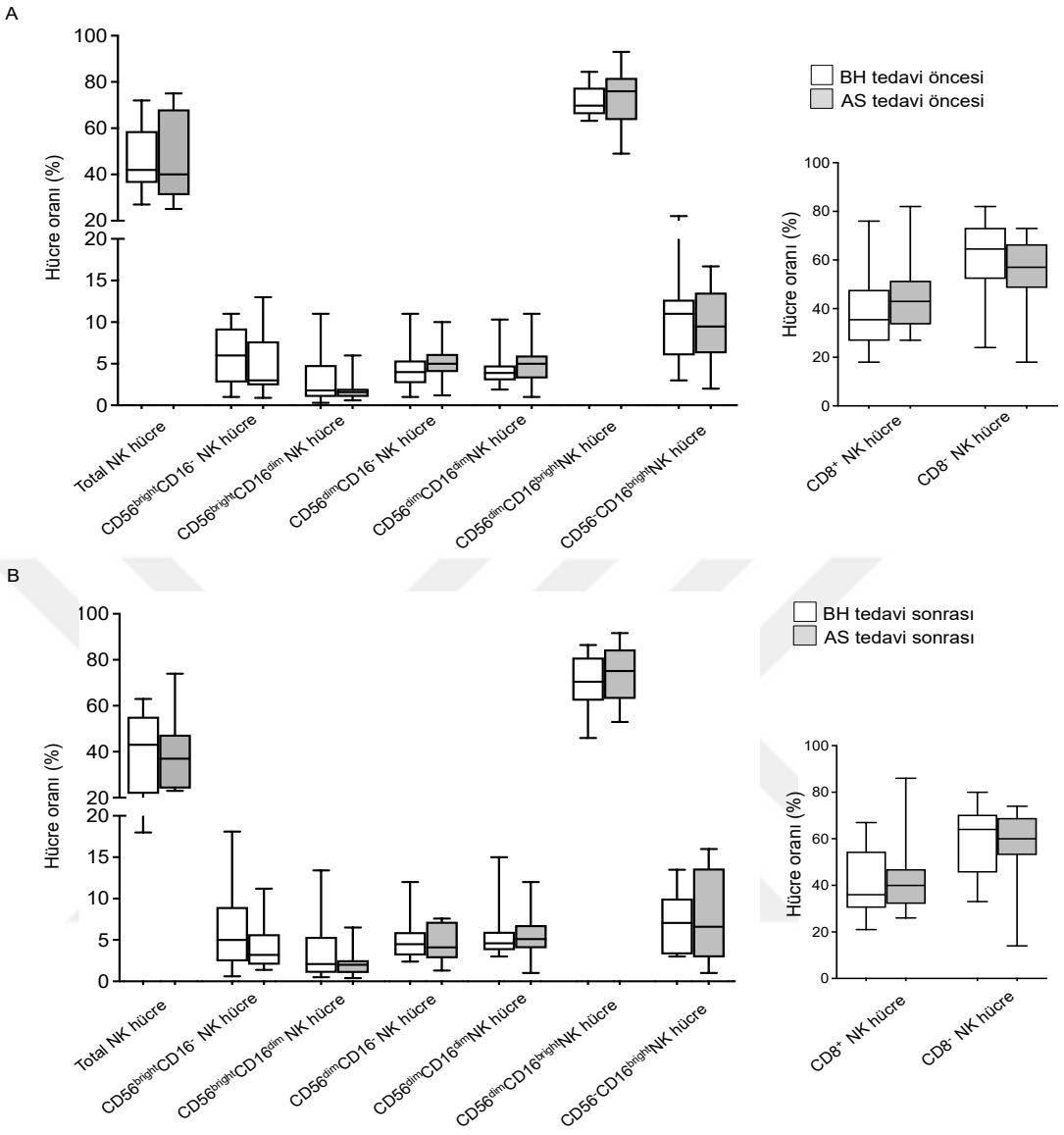
AS grubunda ise hastalığın aktif döneminde $CD56^{dim}CD16^{-}$ (p=0.014), $CD56^{dim}CD16^{dim}$ (p=0.039) ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ (p=0.014) NK hücre alt gruplarının sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. Adalimumab ile olumlu klinik yanıt alınmasının ardından ankilozan spondilit hastalarında $CD56^{dim}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{dim}$ ve $CD56^{-}CD16^{bright}$ hücrelerinin oranlarında azalma eğilimi izlenmiş ve sağlıklı bireyler ile aralarındaki istatistiksel anlamlı fark kaybolmuştur (Şekil 21C). Behçet hastaları ile benzer şekilde ankilozan spondilit hastalarında da adalimumab tedavisi $CD8^{+}$ ve $CD8^{-}$ NK hücre alt gruplarının dağılımları üzerine anlamlı etki göstermemiştir (Şekil 21D).



Şekil 21. Adalimumab Tedavisinin Behçet Üveiti ve Ankilozan Spondilit Hastalarında NK Hücre Alt Gruplarının Dağılımı Üzerine Etkileri

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastaları ve sağlıklı kontrollerden (n=23) periferik venöz kan örnekleri alınmış ve NK hücre alt grupları akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir.

Aktif dönemde Behçet ve ankilozan spondilit hastalarının NK hücre alt gruplarının dağılımları arasında fark olup olmadığı ayrıca detaylı olarak incelenmiş, bu iki hastalığın hem aktif döneminde (Şekil 22A) hem de adalimumab ile klinik remisyon sağlanması ardından (Şekil 22B) NK hücre dağılımlarının benzer olduğu izlenmiştir. Bu bulgular B grubu sınıf 1 MHC genleri ile ilişkili bu iki hastalığın patogenezlerindeki bir başka benzerliği de işaret etmektedir.



Şekil 22. Tedavi Öncesi ve Sonrası Behçet Üveiti ile Ankilozan Spondilit Hastalarında NK Hücre Alt Gruplarının Oranlarındaki Değişimler

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastalarından periferik venöz kan örnekleri alınmış ve NK hücre alt grupları akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir. Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemleri ve remisyondaki dönemlerinde NK hücre alt grupları karşılaştırılarak hastalıkların immünopatogenezlerine yönelik mekanizmaların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

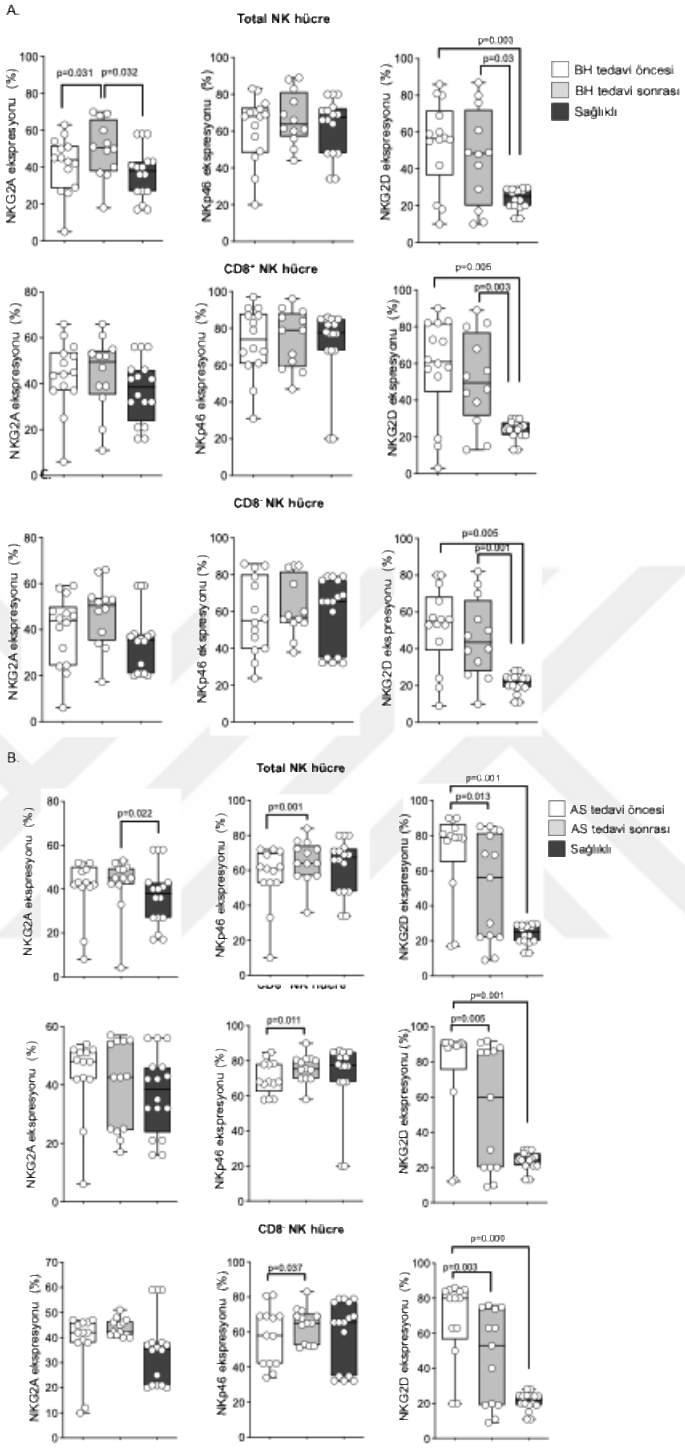
4.2.2. Adalimumab tedavisinin NK hücreleri üzerindeki aktivatör ve inhibitör reseptörlere etkileri

NK hücrelerinin aktivasyonu yüzeylerinde bulunan aktivatör ve inhibitör reseptörlerle hedef hücrelerin yüzeylerinde bulunan bu aktivatör ve inhibitör reseptörlerin ligandları arasındaki denge ile sağlanmaktadır. NK hücre alt gruplarında aktive edici reseptörlerden NKp46 ve NKG2D, inhibitör NK hücre reseptörü olarak NKG2A ekspresyon analizleri yapılmıştır (Şekil 23).

Behçet üveiti hastalarında aktif dönemde aktivatör KIR NKG2D düzeyinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu (hem total NK popülasyonunda hem de $CD8^+$ ve $CD8^-$ NK alt gruplarında) gözlenmiştir. Adalimumab tedavisi ile klinik remisyon elde edilmesi sonrasında inhibitör KIR NKG2A ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı ($p=0.031$) gözlenirken, aktif dönemde arttığı bilinen NKG2D düzeylerinde ise istatistiksel anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir (Şekil 23).

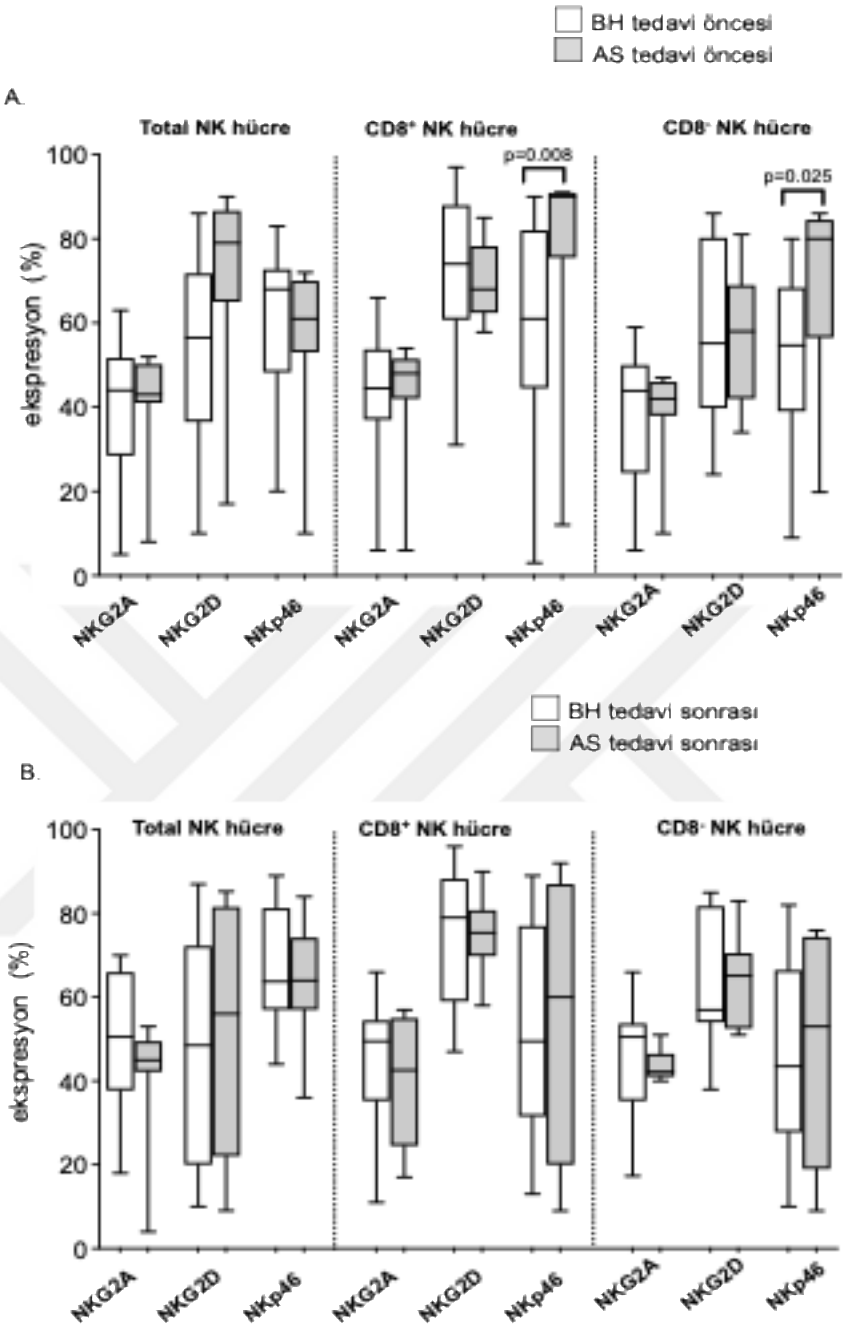
Ankilozan spondilit hastalarında da aktif dönemde aktivatör KIR NKG2D ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak daha yüksek ($p=0.001$) olduğu gözlenmiştir. Adalimumab tedavisi ile klinik remisyon elde edilmesinin ardından NKG2D ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı ($p=0.013$) ama hala sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı yüksek kaldığı dikkat çekmektedir. Tedavi sonrasında inhibitör KIR NKG2A ekspresyonunda ise artış ($p=0.011$) yönünde bir eğilim izlenmiş ve NKG2A eskpresyonu sağlıklı bireylerden anlamlı olarak daha yüksek düzeye çıkmıştır. Enteresan bir şekilde adalimumab tedavisi sonrasında NK hücrelerinin yüzeyindeki aktivatör NKp46 düzeyinde de anlamlı artış ($p=0.001$) izlenmiştir (Şekil 23).

Behçet üveiti ve ankilozan spondilithastalarının NK hücreleri üzerindeki KIR reseptör ekspresyonu paternleri karşılaştırıldığında hem hastalığın aktif döneminde hem de adalimumab tedavisi ile remisyon elde edilmesi sonrasında KIR ekspresyonu paternlerinin benzer olduğu izlendi. Ancak $CD8^+$ NK ($p=0.008$) ve $CD8^-$ NK ($p=0.025$) alt gruplarında ise ankilozan spondilit hastalarında NKp46 ekspresyonlarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu izlenmiştir. Bu fark adalimumab tedavisi ile remisyon sağlanmasının ardından anlamlılığını kaybetmiş, Behçet ve ankilozan spondilit hastaları arasındaki NK hücre alt gruplarındaki KIR ekspresyonu da benzer hale gelmiştir (Şekil 24).



Şekil 23. Behçet üveiti, ankilozan spondilit hastaları ve sağlıklı bireylerde NK hücre aktivatör ve inhibitör reseptör oran değişimleri

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastaları ve sağlıklı kontrollerden (n=23) periferik venöz kan örnekleri alınmış ve NK hücre alt gruplarındaki reseptör ekspresyonları akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir.



Şekil 24. Tedavi öncesi ve sonrası Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarında NK hücre aktivatör ve inhibitör reseptör oranlarının karşılaştırılması

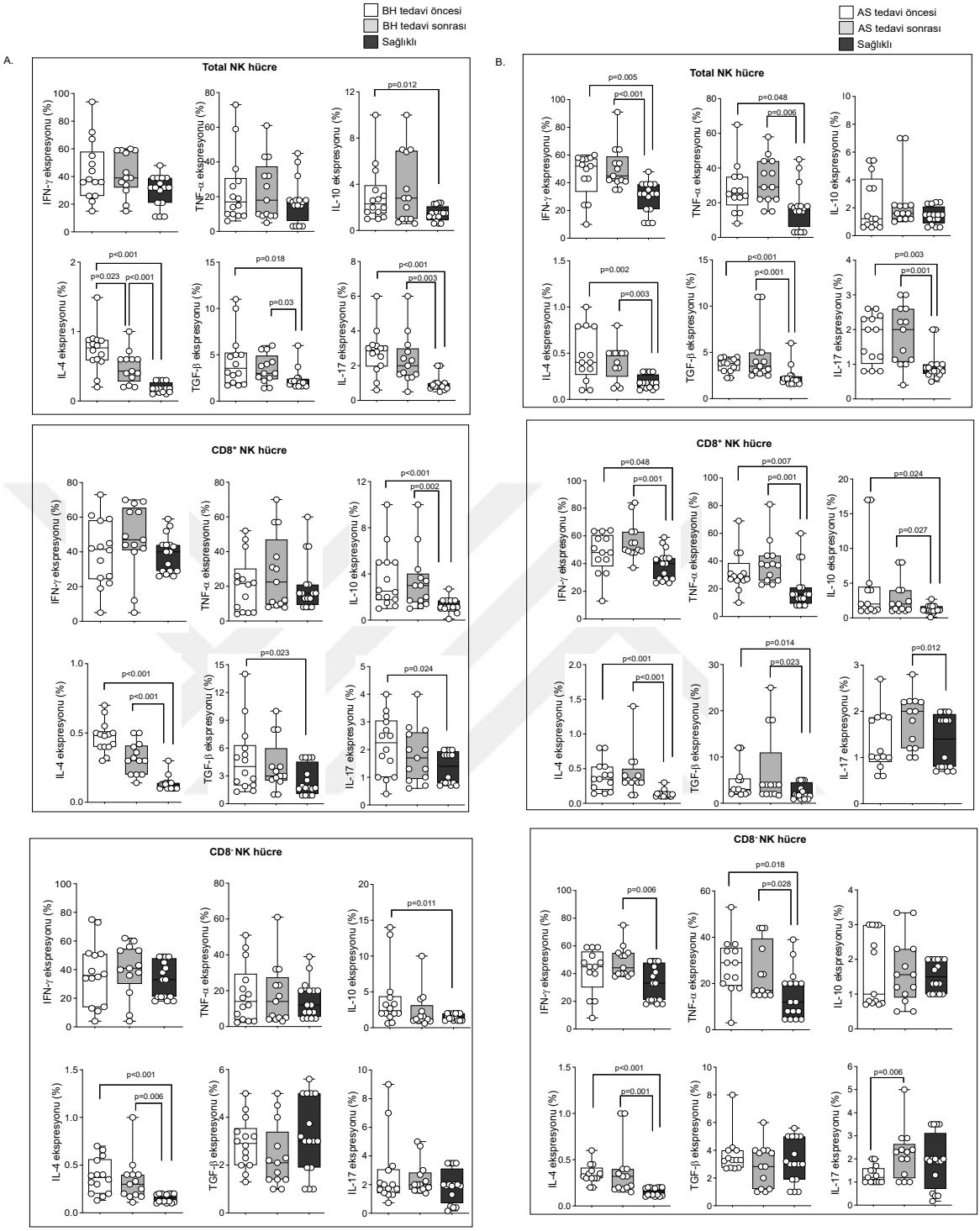
Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastalarından periferik venöz kan örnekleri alınmış ve NK hücre alt gruplarının reseptör ekspresyonları akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir. Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemleri ve remisyondaki dönemleri karşılaştırılmıştır.

4.2.3. Adalimumab tedavisinin NK hücrelerinin sitokin salınımlarına etkileri

NK hücreleri tarafından TNF-α, gibi sitokinler ile birlikte IL-4, IL-17 ve inhibitör sitokinler olan IL-10, TGF-β salgılama yeteneğindedir. Sitokin salınımlarına göre de NK hücreleri mikro çevrenin yardımcı T lenfositleri gibi farklı alt gruplara ayrılabilmektedir.

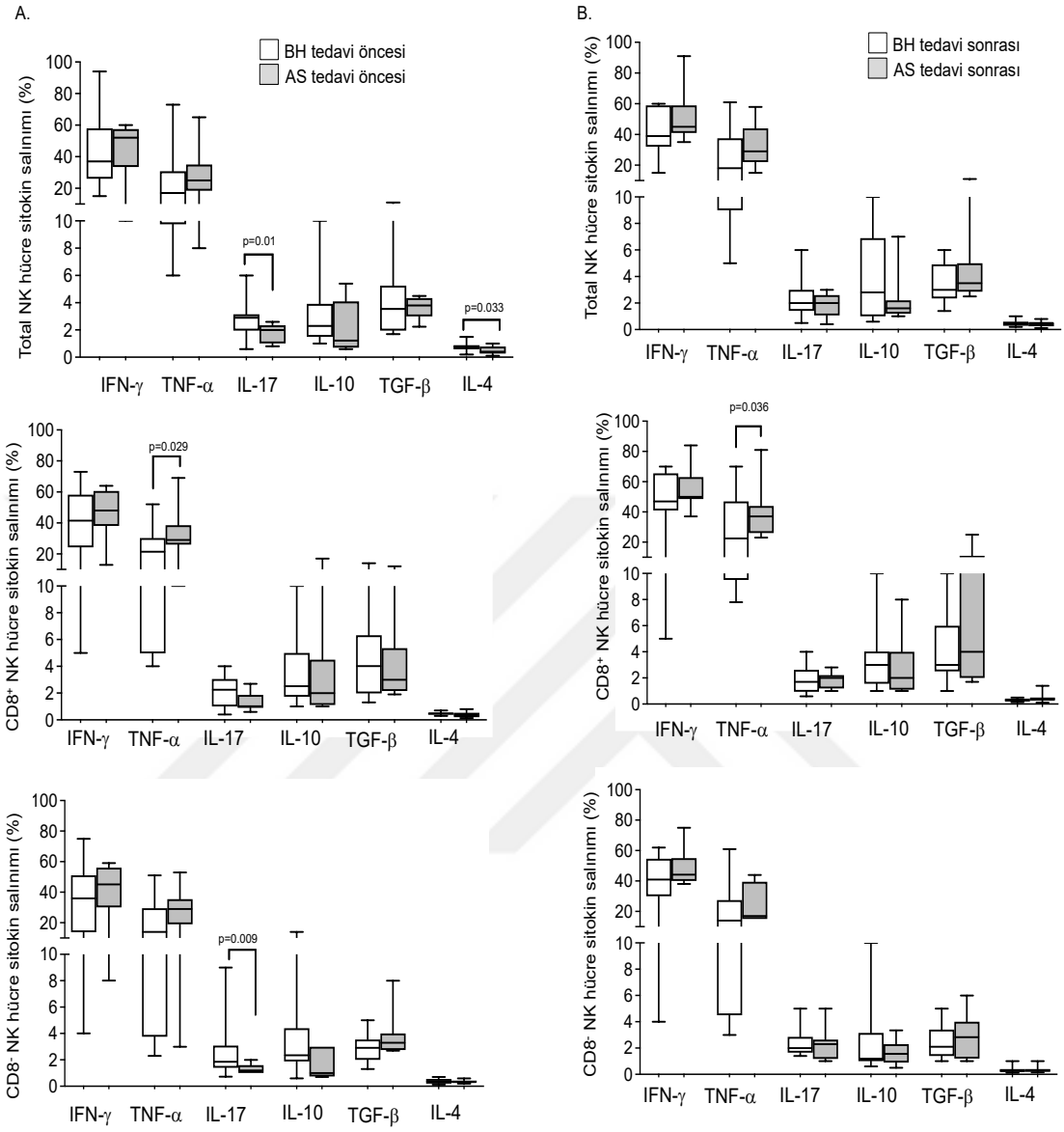
Behçet hastalarında aktif dönemde total NK hücrelerinin IL-10 ($p=0.012$), IL-4 ($p<0.001$), TGF-β ($p=0.018$) ve IL-17 ($p<0.001$) ekspresyonlarının sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Adalimumab tedavisi ile klinik remisyon elde edilmesinin ardından sadece IL-4 ekspresyonunda anlamlı azalma ($p=0.023$) gözlenirken, diğer sitokinlerin ekspresyonlarında anlamlı değişiklik saptanmamıştır (Şekil 25A).ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemlerinde total NK hücrelerinde IFN-γ ($p=0.005$), TNF-α ($p=0.048$), IL-4 ($p=0.002$), TGF-β ($p<0.001$) ve IL-17 ($p=0.003$) ekspresyonunun sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Adalimumab tedavisi ile klinik remisyon elde edildikten sonra bu sitokinlerin hiçbirinin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik oluşmamıştır (Şekil 25B).

Behçet ve ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemlerindeki NK hücrelerinin sitokin ekspresyonu paternleri incelendiğinde Behçet hastalarında hem total NK ($p=0.01$) hem de CD8 eksprese etmeyen NK hücrelerinde IL-17 ekspresyonunun anlamlı olarak artış ($p=0.009$) saptanmıştır. Ayrıca Behçet hastaları $CD8^+$ NK hücrelerinde TNF-α ekspresyonu ankilozan spondilit hasta grubuna kıyasla düşük ($p=0.029$) saptanmıştır, diğer sitokinlerde ise anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (Şekil 26A). Adalimumab ile klinik remisyon sağlandığında Behçet ve ankilozan spondilit hastalarının sitokin ekspresyon paternleri arasında anlamlı bir fark kalmadığı gözlenmiştir (Şekil 26B).



Şekil 25. Adalimumab tedavisinin Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarında NK hücre alt gruplarının sitokin salınımı üzerine etkisi

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastaları ve sağlıklı kontrollerden (n=23) periferik venöz kan örnekleri alınmış ve NK hücre alt gruplarındaki sitokin ekspresyonları akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir.



Şekil 26. Behçet üveiti ile ankilozan spondilit hastalarında aktif dönemde ve adalimumab tedavisi sonrasında sitokin ekspresyon paternlerinin karşılaştırılması

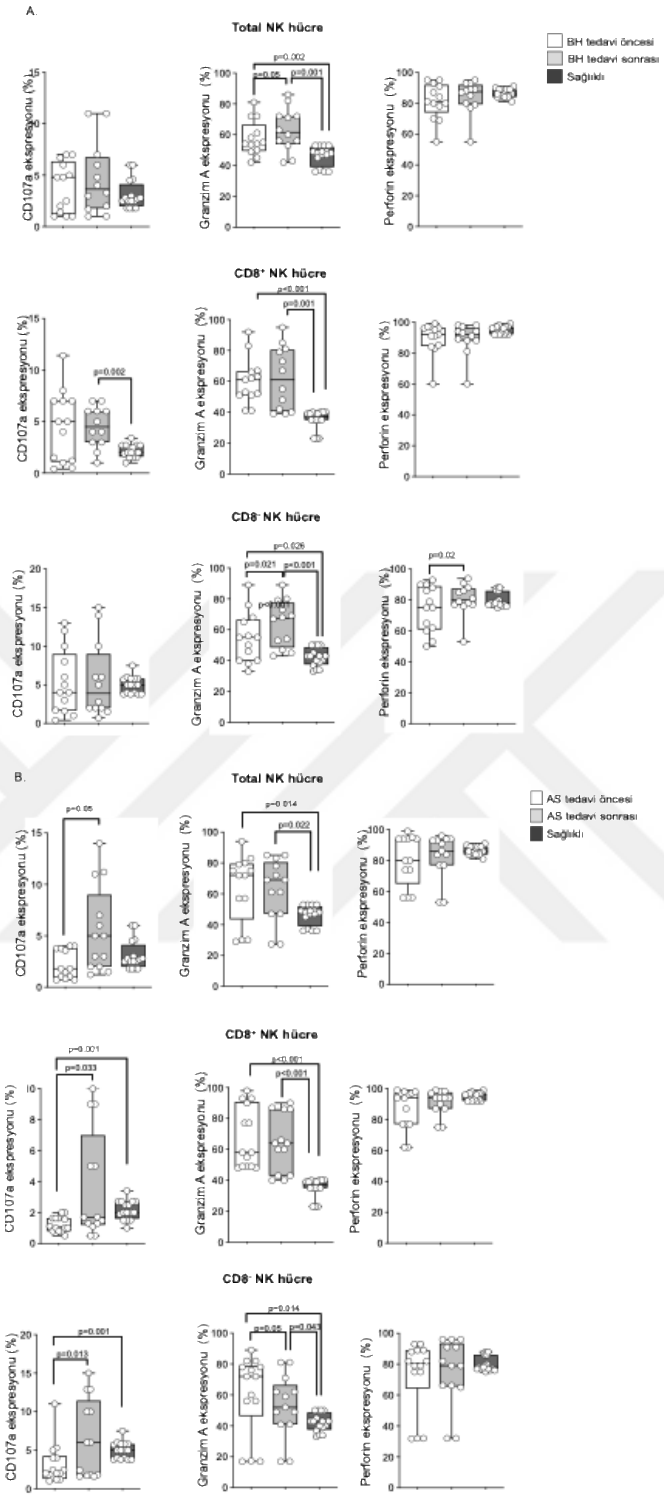
Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastalarından periferik venöz kan örnekleri alınmış ve NK hücre alt gruplarının sitokin ekspresyonları akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir. Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemleri ve remisyondaki dönemleri karşılaştırılmıştır.

4.2.4. Adalimumab tedavisinin NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları üzerine etkileri

NK hücrelerinin anti-viral ve anti-tümöral immünitede hedef hücreye karşı gösterdikleri sitotoksik aktiviteleri salgıladıkları perforin ve granzim gibi sitolitik proteinler, IFN-γ ve TNF-α gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve antikora bağımlı hücresel sitotoksisite mekanizmaları aracılığı ile oluşmaktadır. Projemizde NK hücre sitotoksik fonksiyonlarını perforin, granzim A ve CD107a ekspresyonunun akan hücre ölçer analizleri ile belirlenmiştir.

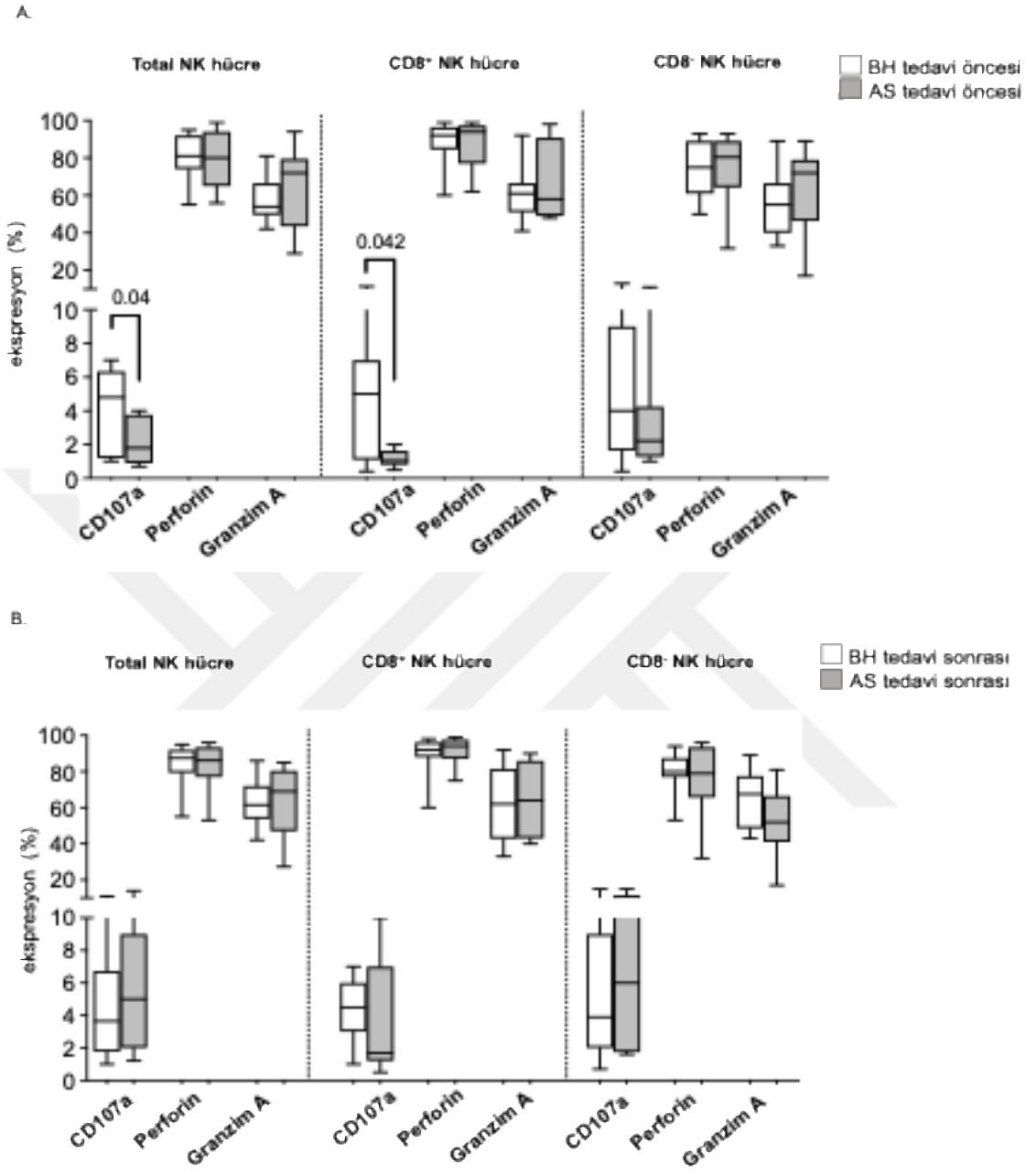
Behçet üveiti hastalarının aktif dönemlerinde NK hücrelerindeki granzim A ekspresyonlarının sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek ($p=0.002$) olduğu saptanmıştır. Adalimumab tedavisi sonrasında ise paradoksal şekilde granzim A ekspresyonunun anlamlı artış ($p=0.05$) gösterdiği bulunmuştur (Şekil 25). Ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemlerinde NK hücrelerindeki granzim A ekspresyonlarının sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek ($p=0.014$) olduğu saptanmıştır. Adalimumab tedavisi sonrasında ise granzim A ekspresyonu yine yüksek kalarak değişmemiş, buna karşılık CD107a ekspresyonunda da anlamlı olarak yükselme ($p=0.05$) saptanmıştır (Şekil 27).

Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemleri karşılaştırıldığında, Behçet hastalarının NK hücrelerinde CD107A ekspresyonunun anlamlı olarak daha yüksek ($p=0.04$) olduğu bulunmuştur (Şekil 28). Adalimumab tedavisi ile klinik remisyon sağlanmasının ardından Behçet hastaları ve ankilozan spondilit hastalarının NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları arasında anlamlı fark kalmamıştır (Şekil 28).



Şekil 27. Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarında NK hücre sitotoksik aktivitesinin Adalimumab tedavisi süresince gruplar arasındaki değişimleri

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastaları ve sağlıklı kontrollerden (n=23) periferik venöz kan örnekleri alınmış ve NK hücre alt gruplarındaki sitotoksik granül ekspresyonları ve degranülasyon oranları akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir.

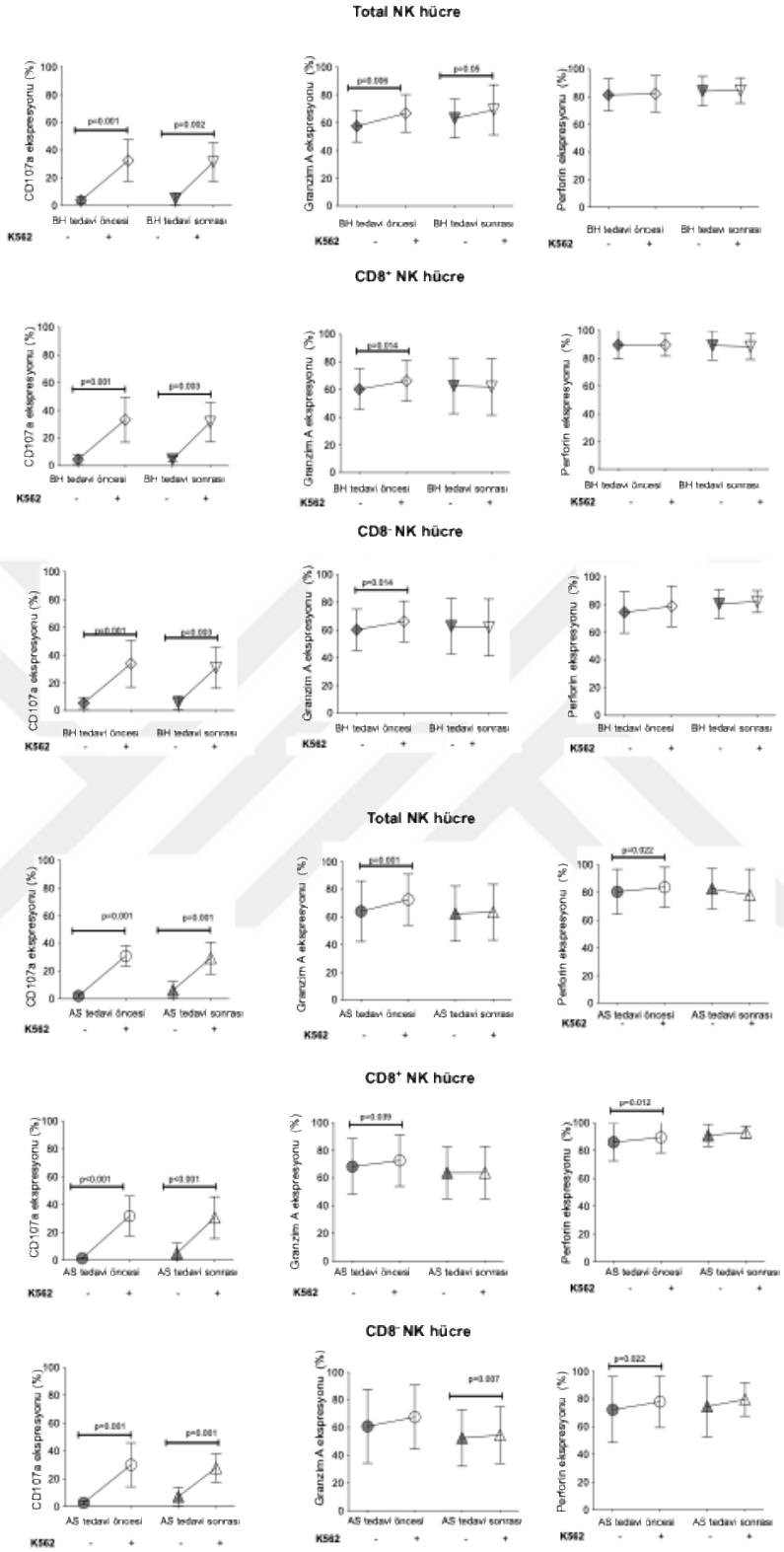


Şekil 28. Behçet ve ankilozan spondilit hastalarında adalimumab tedavisi öncesi ve sonrası NK hücre alt gruplarında sitotoksik aktivite arasındaki değişimleri

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastalarından periferik venöz kan örnekleri alınmış ve NK hücre alt gruplarının sitotoksik granül ekspresyonları ve degranülasyon oranları akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir. Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemleri ve remisyondaki dönemleri karşılaştırılmıştır.

Klinik olarak aktif dönemdeki Behçet üveiti hastalarının total NK hücreleri K562 eritromiyeloid lösemi hücreleri ile stimülasyonu sonrası CD107a (p=0.001) ve granzim A (p=0.006) ekspresyonunda anlamlı artış ile yanıt vermektedirler. Bu yanıt CD8 eksprese eden ve etmeyen NK hücre alt gruplarında da benzer şekildedir. Adalimumab tedavisi sonrasında Behçet üveiti hastalarının K562 stimülasyonuna yanıtlarında değişiklik oluşmamıştır (Şekil 29).

Klinik olarak aktif dönemdeki ankilozan spondilit hastalarının total NK hücre sitotoksik fonksiyonları incelendiğinde K562 hücreleri ile stimülasyon sonucu CD107a (p=0.001), granzim A (p=0.001) ve perforin (p=0.022) ekspresyonuna anlamlı artış ile yanıt vermektedirler. Ancak adalimumab tedavisi sonrasında ankilozan spondilit hastalarının NK hücreleri K562 sitmülasyonuna sadece CD107a artışı (p=0.001) ile yanıt verirken, tedavi sonrasında ankilozan spondilit hastalarının NK hücrelerinde K562 stimülasyonuna karşılık granzim-A ve perforin düzeylerinin artmadığı dikkat çekmektedir. Benzer şekilde yine ankilozan spondilit grubunda tedavi sonrası $CD8^+$ ve $CD8^-$ NK hücreleri K562 stimülasyonuna yanıt vermemiştir. (Şekil 29).



Şekil 29. Hasta gruplarında NK hücre CD107a, perforin ve granzim A ekspresyonunun stimulasyonsuz ve K562 hücre stimülasyonu sonrası karşılaştırması

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastalarından periferik venöz kan örnekleri

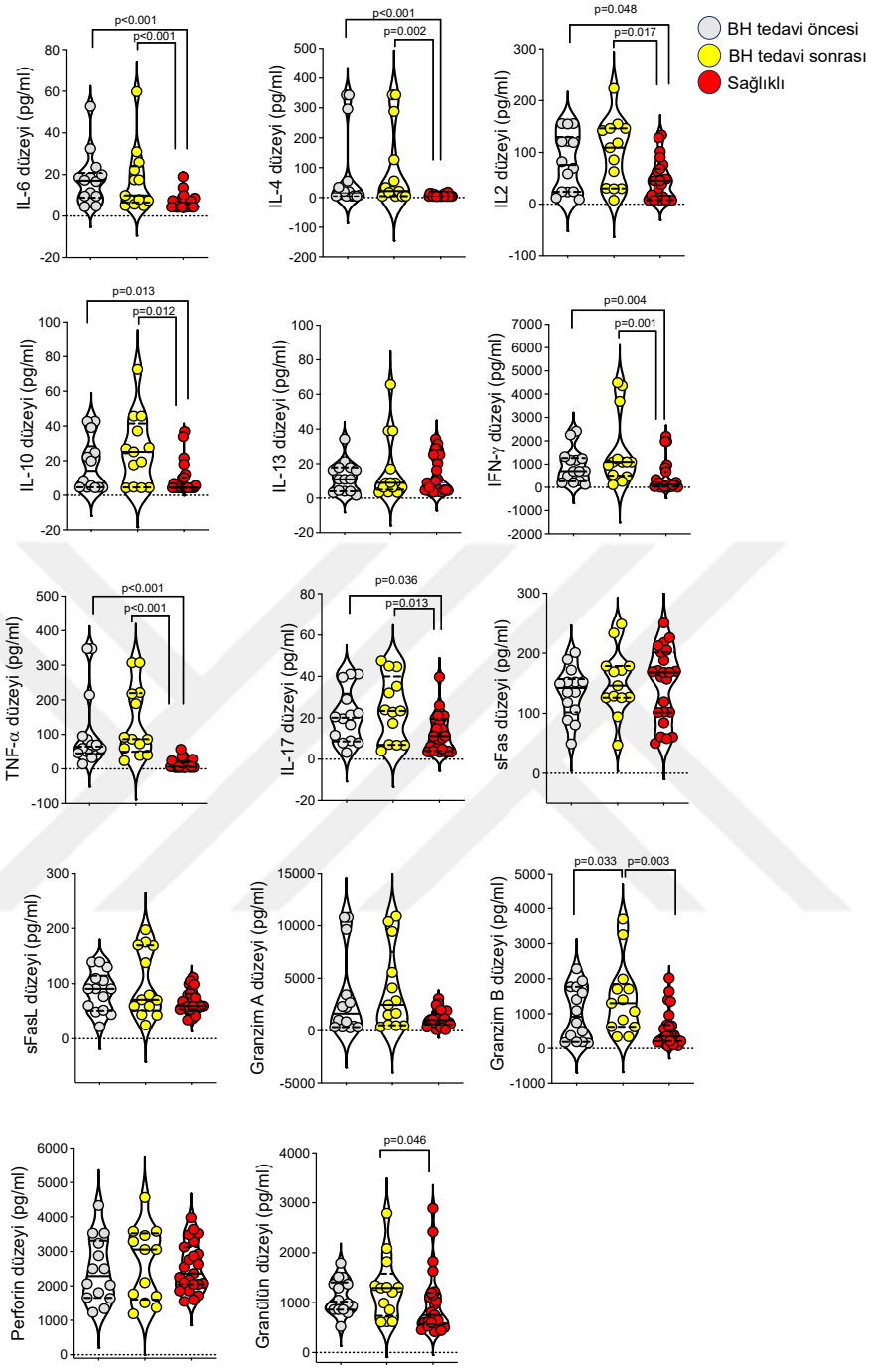
alınmış ve NK hücre alt gruplarının K562 stimülasyonuna verdikleri yanıtlar akan hücre ölçer ile değerlendirilmiştir. Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemleri ve remisyondaki dönemleri karşılaştırılmıştır.

4.2.5. Boncuk bazlı akan hücre ölçer yöntem ile plazma örneklerinde NK hücre sitokin ve solubil reseptör panelinin belirlenmesi

Klinik olarak aktif dönemdeki Behçet üveiti hastalarının plazmalarında IL-6 ($p<0.001$), IL-4 ($p<0.001$), IL-2 ($p=0.048$), IL10 ($p=0.013$), IFN-γ ($p=0.004$), TNF-α ($p=0.048$) ve IL-17 ($p=0.036$) düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Adalimumab tedavisi ile remisyona giren Behçet üveiti hastalarında sadece plazma Granzim B düzeylerinde anlamlı artış saptanmış, diğer plazma sitokin düzeylerinde istatistiksel anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 30).

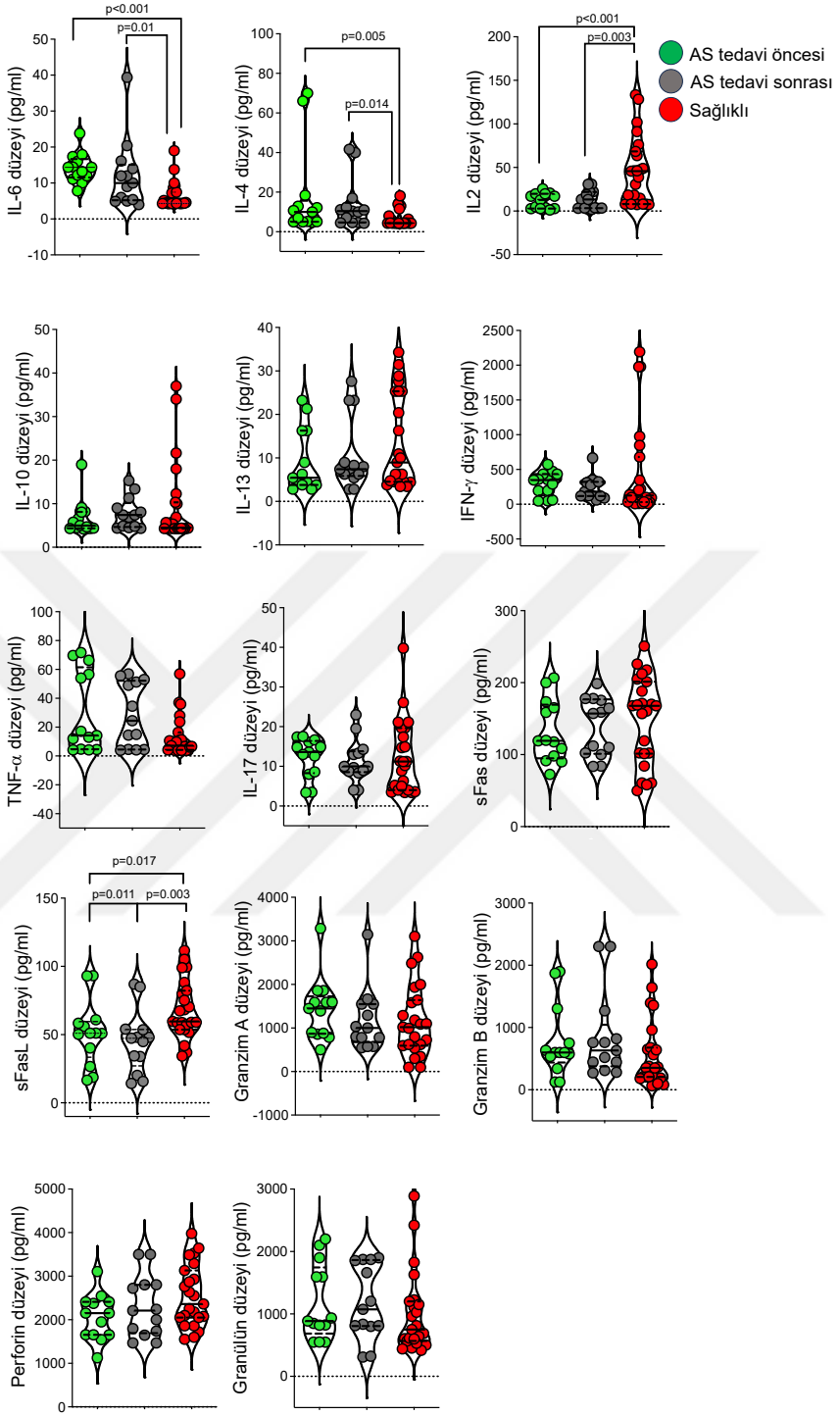
Klinik olarak aktif dönemdeki aksiyel tutulumlu ankilozan spondilit hastalarının plazma sitokin düzeyleri incelendiğinde IL-6 ($p<0.001$), IL-4 ($p=0.005$), IL-2 ($p<0.001$) düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu sFasL ($p=0.017$) düzeyinin ise daha düşük olduğu saptanmıştır. Tedavi sonrasında remisyona giren ankilozan spondilit hastalarının plazmalarında sFasL düzeyinde istatistiksel anlamlı bir azalma izlenmiş ($p<0.011$) ve sFasL düzeyi tedavi sonrasında da sağlıklı bireylere kıyasla azalmıştır ($p=0.003$). Tedavi sonrasında diğer sitokinlerin düzeylerinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır (Şekil 31).

Klinik olarak aktif dönemdeki Behçet üveiti hastaları ile ankilozan spondilit hastalarının plazma sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında Behçet hastalarında özellikle IL-2 ($p<0.001$), IL-10 ($p=0.010$), TNF-α ($p=0.007$), IFN-γ ($p=0.004$), sFasL ($p=0.026$) düzeylerinin Behçet üveiti hastalarında anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 28). Adalimumab tedavisi ile remisyona giren Behçet üveiti hastaları ile ankilozan spondilit hastalarının serum sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında yine IL-2 ($p<0.001$), TNF-α ($p=0.001$), IFN-γ ($p=0.001$), sFasL ($p=0.013$) düzeylerinin Behçet üveiti hastalarında anlamlı olarak daha yüksek olduğu, IL-10 düzeyinin ise biraz daha yüksek kalma eğilimini devam ettirdiği ($p=0.057$) saptanmıştır (Şekil 32).



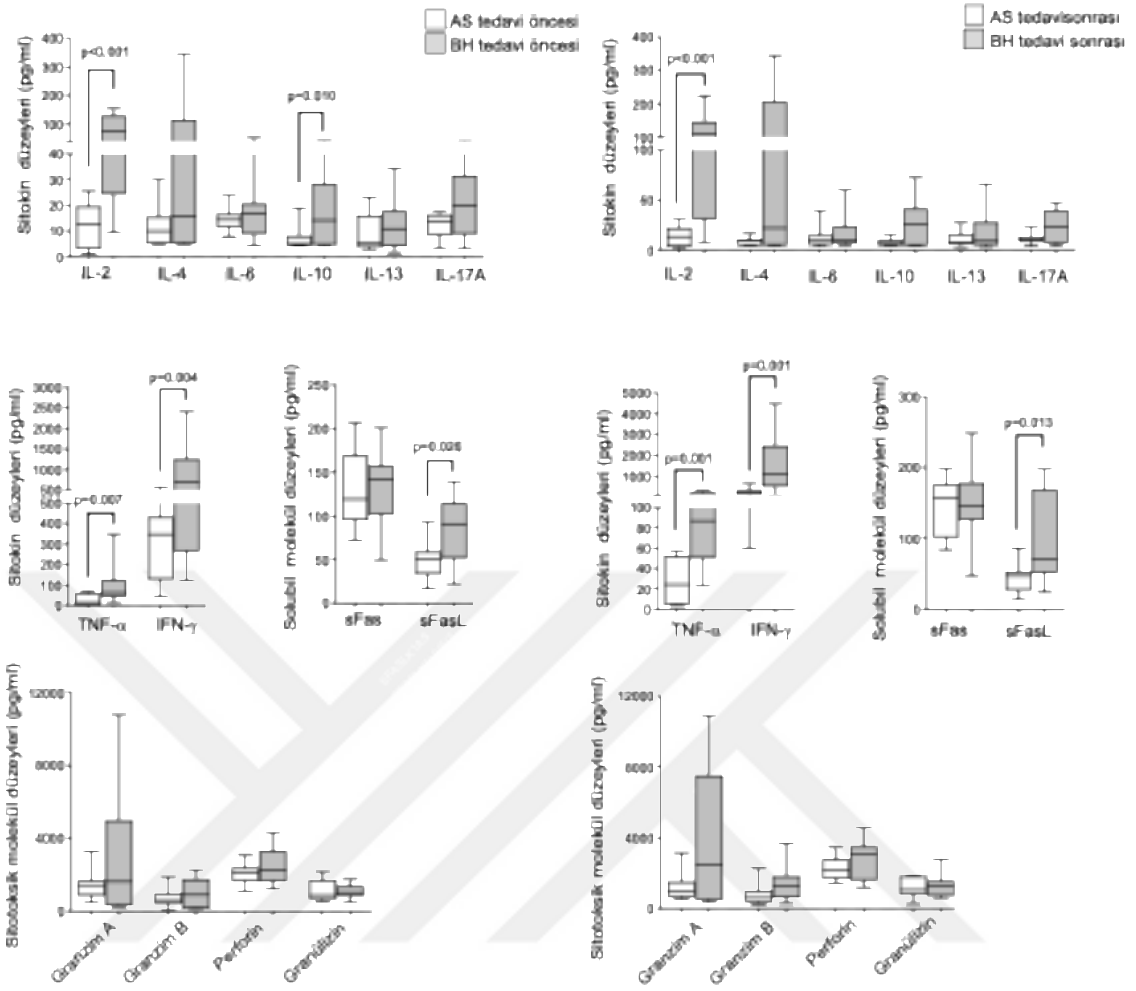
Şekil 30. Adalimumab tedavisinin Behçet üveiti hastalarının plazma sitokin düzeyleri üzerine etkileri

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13) hastaları ve sağlıklı kontrollerden (n=23) periferik venöz kan örnekleri alınmış ve plazma sitokin düzeyleri boncuk bazlı akan hücre ölçer yöntemi ile incelenmiştir.



Şekil 31. Adalimumab tedavisinin ankilozan spondilit hastalarının plazma sitokin düzeylerine etkileri

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra ankilozan spondilit (n=14) hastaları ve sağlıklı kontrollerden (n=23) periferik venöz kan örnekleri alınmış ve plazma sitokin düzeyleri boncuk bazlı akan hücre ölçer yöntemi ile incelenmiştir.



Şekil 32. Aktif dönemde ve adalimumab tedavisi ile remisyon elde edildiği dönemde Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının serum sitokin düzeylerinin karşılaştırmalı incelemesi

Adalimumab tedavisi öncesi ve tedavi sonrasında remisyon elde edildikten sonra Behçet üveti (n=13), ankilozan spondilit (n=14) hastalarından periferik venöz kan örnekleri alınmış ve plazma sitokin düzeyleri boncuk bazlı akan hücre ölçer yöntemi ile incelenmiştir. Behçet üveiti ve ankilozan spondilit hastalarının aktif dönemleri ve remisyondaki dönemleri karşılaştırılmıştır.

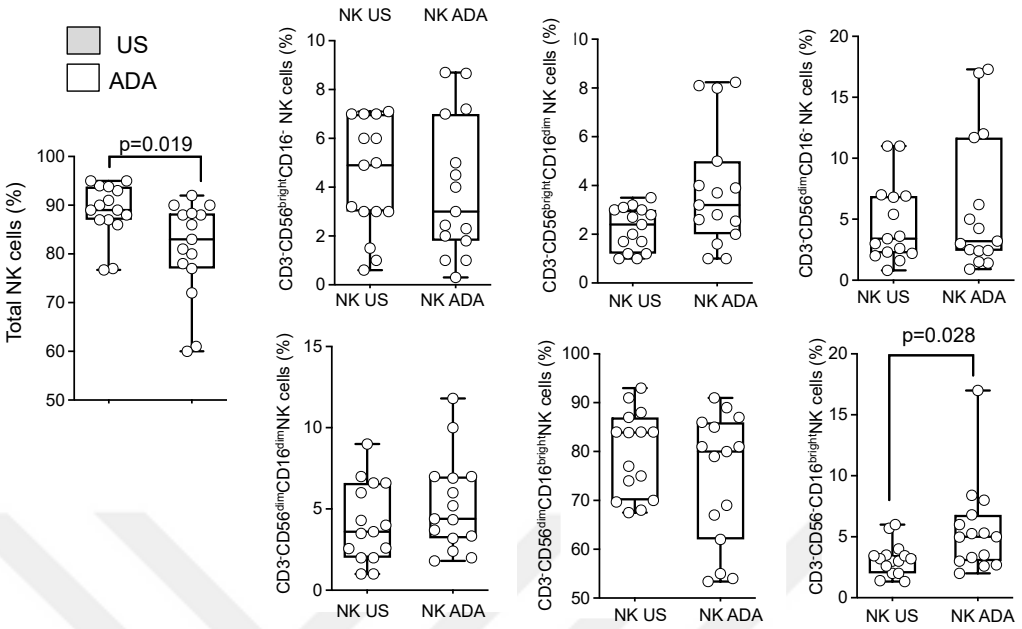
4.3. Adalimumab Tedavisinin Sağlıklı İnsan NK Hücre Fonksiyonları Üzerine İn Vitro Etkileri

4.3.1. Adalimumab uygulamasının *in vitro* şartlarda NK hücre alt grup oranlarına etkisi

Sağlıklı bireylerden izole edilen NK hücreleri ile total PKMH hücreler stimülasyonsuz ve 1 µg/ml adalimumab (ADA, Abbott Laboratories, Chicago, USA) varlığında 48 saat kültürleri yapılmış ve akan hücre ölçer ile NK hücre alt gruplarının ($CD3^{-}CD56^{parlak}CD16^{-}$, $CD56^{parlak}CD16^{soluk}$, $CD56^{soluk}CD16^{-}$, $CD56^{soluk}CD16^{soluk}$, $CD56^{soluk}CD16^{parlak}$, $CD56^{-}CD16^{parlak}$) detaylı analizleri yapılmıştır.

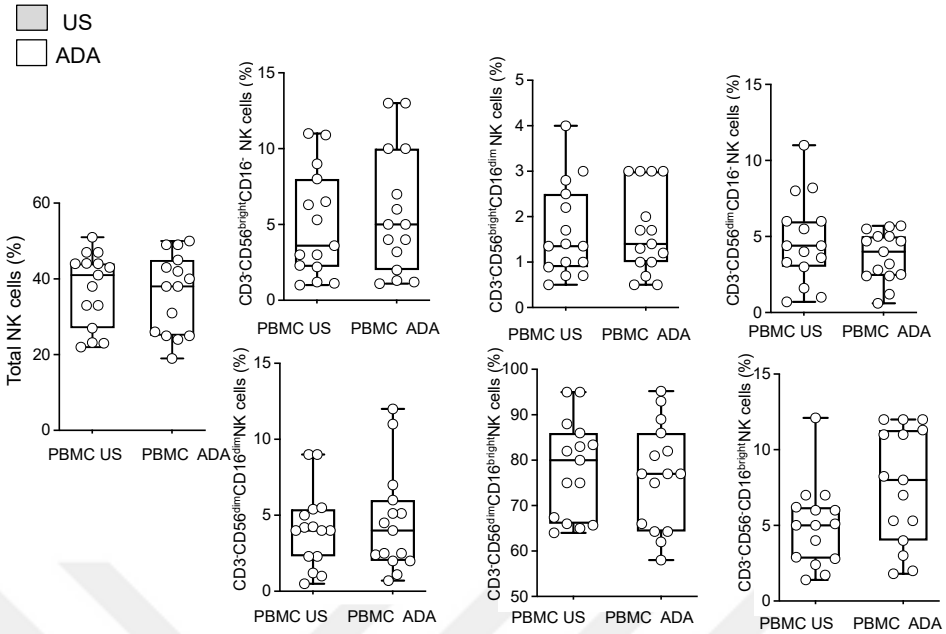
NK hücre kültürü içerisinde $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ total NK hücre belirteci taşıyan hücre oranı apoptotik hücrelerin artmasına bağlı olarak adalimumab uygulanan kültür koşullarında anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.019$). Adalimumab ile kültür uygulandığı durumda canlı NK hücreleri arasında $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{bright}$ NK hücre alt grubu oranının da ayrıca anlamlı olarak arttığı saptanmıştır ($p=0.028$, Şekil 2) Bu tükenmişlik fenotipi gösteren NK alt grubundaki artış, adalimumab ile muamele edilen NK hücrelerinde tükenmişlik tablosu geliştiğini düşündürmektedir. Diğer NK hücre alt grupları arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 33).

PKMH kültürlerinde yapılan deneylerde ise adalimumab ile muamele edildiğinde NK hücrelerinde saf NK hücre kültüründekine benzer değişim eğilimi oluştuğu, ancak bu değişimlerin istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı izlendi (Şekil 34).



Şekil 33. Stimülasyonsuz ve adalimumab stimülasyonu sonrası saflaştırılmış NK hücre kültürlerinde NK hücre alt grup oranları

Sağlıklı bireylerden izole edilen NK hücrelerinin stimülasyonsuz ve 1 µg/ml adalimumab (ADA, Abbott Laboratories, Chicago, USA) varlığında 48 saat kültürleri yapılmış ve akan hücre ölçer ile NK hücre alt gruplarının ($CD3^{-}CD56^{parlak}CD16^{-}$, $CD56^{parlak}CD16^{soluk}$, $CD56^{soluk}CD16^{-}$, $CD56^{soluk}CD16^{soluk}$, $CD56^{soluk}CD16^{parlak}$, $CD56^{-}CD16^{parlak}$) detaylı analizleri yapılmıştır (n=15).

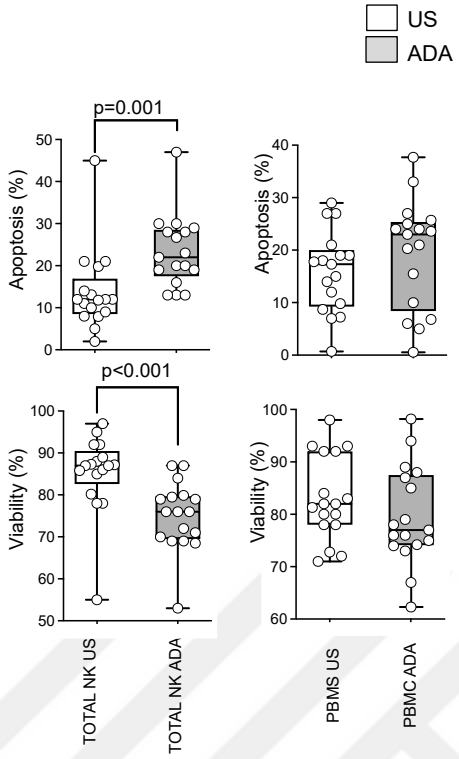


Şekil 34. Adalimumab stimülasyonu ve stimülasyonsuz şartlerda periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde NK hücre alt grup oranları

Sağlıklı bireylerden izole edilen total PKMH hücreleri stimülasyonsuz ve 1 µg/ml adalimumab (ADA, Abbott Laboratories, Chicago, USA) varlığında 48 saat kültürleri yapılmış ve akan hücre ölçer ile NK hücre alt gruplarının ($CD3^{-}CD56^{parlak}CD16^{-}$, $CD56^{parlak}CD16^{soluk}$, $CD56^{soluk}CD16^{-}$, $CD56^{soluk}CD16^{soluk}$, $CD56^{soluk}CD16^{parlak}$, $CD56^{-}CD16^{parlak}$) detaylı analizleri yapılmıştır (n=15).

4.3.2. *In vitro* adalimumab uygulamasının NK hücre apoptotik indeksi ve proliferasyonu üzerine etkisi

Adalimumab'ın $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ total NK hücrelerinde apoptotik indekse etkisi hem saf NK hem de PKMH kültürlerinde Anneksin V ve PI boyaması yapılarak akan hücre ölçer ile analiz edilmiştir. NK hücre kültüründe besi yerine adalimumab eklenmesi apoptotik NK hücre oranını anlamlı olarak arttırmış ($p=0.001$), buna paralel olarak canlı hücre oranını ise anlamlı olarak düşürmüştür ($p<0.001$, Şekil 35). Ancak adalimumab PKMH kültür ortamındaki NK hücrelerinde apoptoz veya canlılık oranlarında istatistiksel anlamlı bir değişim oluşturmamıştır (Şekil 35).

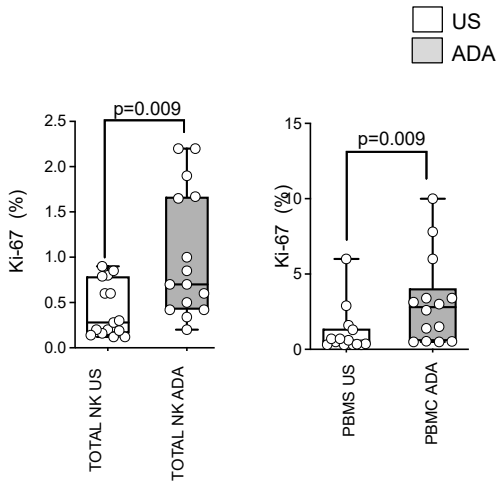


Şekil 35. PKMH ve saf NK hücre kültürlerinde adalimumabın hücre canlılığı ve apoptotik indekse etkisi

Sağlıklı bireylerden izole edilen NK hücrelerinin stimülasyonsuz ve 1 µg/ml adalimumab (ADA, Abbott Laboratories, Chicago, USA) varlığında 48 saat kültürleri yapılmış ve akan hücre ölçer ile NK hücre alt gruplarının Anneksin V boyaması ile apoptoz ve PI boyaması ile canlılık düzeyleri analiz edilmiştir (n=15).

1.2.3. Adalimumab uygulaması ve NK hücre proliferatif yanıtları

PKMH ve saf NK hücre kültürlerinde Ki67 monoklonal antikoru kullanılarak $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ total NK hücrelerinde proliferatif yanıt akan hücre ölçer ile analiz edilmiştir. Adalimumab uygulanması hem izole NK hücre kültüründeki hem de PKMH kültüründeki NK hücrelerinde proliferatif yanıtı anlamlı olarak arttırmıştır (sırasıyla, p=0.009 ve p=0.009, Şekil 36)



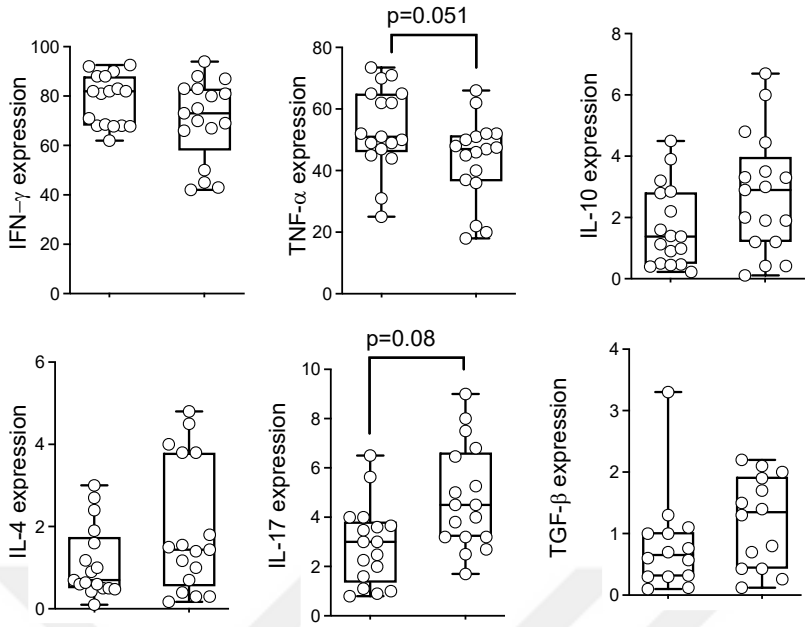
Şekil 36. Adalimumabın *in vitro* NK hücre proliferasyonuna etkisi

Sağlıklı bireylerden izole edilen NK hücrelerinin stimülasyonsuz ve 1 µg/ml adalimumab (ADA, Abbott Laboratories, Chicago, USA) varlığında 48 saat kültürleri yapılmış ve akan hücre ölçer ile NK hücre alt gruplarının Ki-67 boyaması ile proliferasyon düzeyleri analiz edilmiştir (n=15).

4.3.3. NK Hücrelerinde Inflamatuvar ve Antiinflamatuvar Sitokin Salınımı

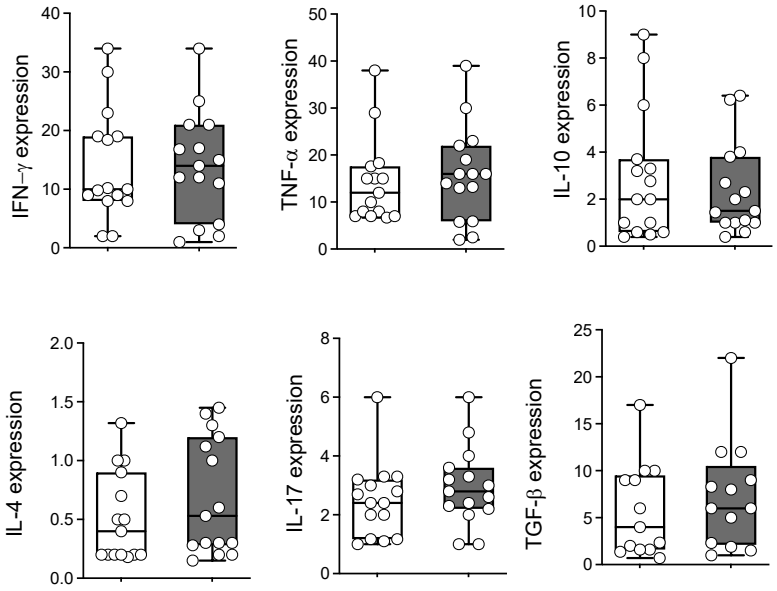
Saflaştırılmış NK hücre kültürlerinde; adalimumab ile muamele edilen NK hücrelerinde TNF-α ekspresyonunun azalma eğiliminde olduğu, IL-17 ekspresyonunun ise istatistiksel anlamlı olarak arttığı izlenmiştir (p=0.08). Regülatör sitokinler IL-10 ve TGF-β düzeylerinde de artma eğilimi izlenmesine karşılık, bu değişim istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (Şekil 37).

PKMH hücre kültürlerinin adalimumab ile muamele edilmesi sonucunda bu hücrelerin sitokin salınım özelliklerinde istatistiksel anlamlı bir değişim izlenmemiştir (Şekil 38).



Şekil 37. Adalimumabın saf NK hücre kültürlerinde NK hücre sitokin salınımına etkisi

Saflaştırılmış NK hücreleri 48 saatlik kültür sonrası sitokinlerin hücre içinde tespit edilebilmesi amacıyla brefeldin A içeren hücre stimülasyon kokteyli ile 4 saat uyarılmış ve uyarım sonrası $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ NK hücrelerindeki IFN-γ, TNF-α, -IL-10, IL-17 TGF-β ve IL-4 ekspresyonu akan hücre ölçer ile tayin edilmiştir.



Şekil 38. Adalimumabın PKMH hücre kültürlerinde NK hücre sitokin salınımına etkisi

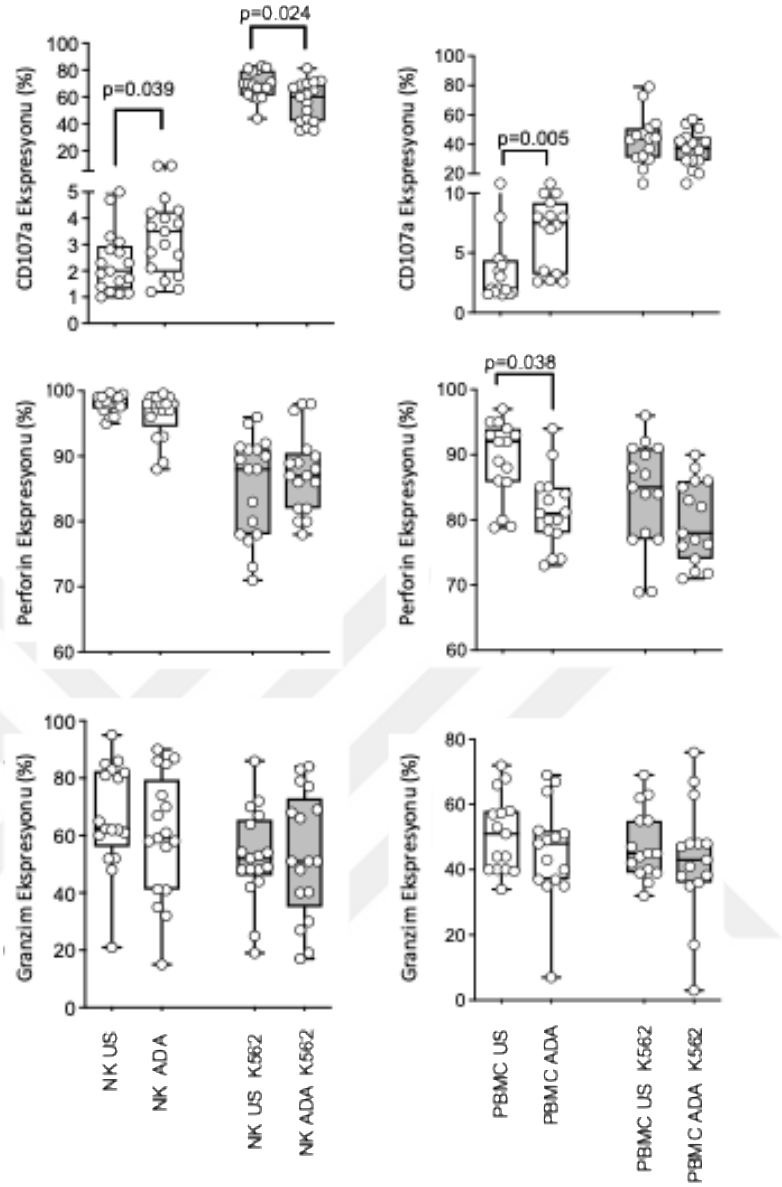
PKMH'ler 48 saatlik kültür sonrası sitokinlerin hücre içinde tespit edilebilmesi amacıyla brefeldin A içeren hücre stimülasyon kokteyli ile 4 saat uyarılmış ve uyarım sonrası $CD3^{-}$

$CD56^{+}CD16^{+}$ NK hücrelerindeki IFN-γ, TNF-α, -IL-10, IL-17 TGF-β ve IL-4 ekspresyonu akan hücre ölçer ile tayin edilmiştir.

4.3.4. Adalimumabın NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesine etkisi

Adalimumab'ın NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesine etkisinin analiz edilmesi amacıyla 48 saat stimülasyonsuz ve 1 µg/ml adalimumab stimülasyonu sonrasında PKMH ve saf NK hücre kültürlerinden toplanan hücreler (10:1) oranında K562 hücreleriyle 4 saat inkübe edilmiştir. $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ NK hücrelerinde Granzim A, perforin ve CD107a oranları akan hücre ölçer ile analiz edilmiştir.

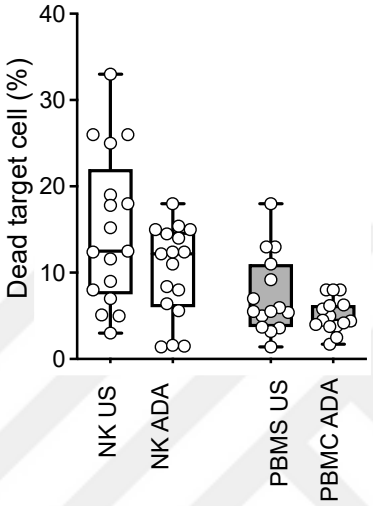
Adalimumab uygulaması NK hücrelerinin CD107a eskpresyonu ile gösterilen degranülasyon düzeylerinde artışa neden olmuştur (Şekil 39). Ancak kültür ortamındaki NK hücrelerinin tümör hücrelerine karşı degranülasyon yanıtlarının adalimumab uygulması sonrasında zayıfladığı saptanmıştır. Bu degranülasyon değişimlerine karşılık, adalimumab uygulaması kültür ortamında NK hücrelerinin sitotoksik granül içeriklerinde (perforin ve granzim) değişime yol açmamıştır (Şekil 39).



Şekil 39. Adalimumabın hücre kültüründe NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesine etkisi

Sağlıklı bireylerden izole edilen NK hücrelerinin stimülasyonsuz ve 1 µg/ml adalimumab (ADA, Abbott Laboratories, Chicago, USA) varlığında 48 saat kültürleri yapılmış ve akan hücre ölçer ile NK hücrelerinin sitotoksik granül ekspresyonları (perforin, granzim) ve degranülasyon oranları (CD107a) analiz edilmiştir (n=15).

Sitotoksik aktiviteyi ayrıca hedef hücre olarak kullandığımız K562'nin ölü hücre oranlarını akan hücre ölçer analizleri ile belirledik. Adalimumab ile muamele edilen NK hücrelerinin, birlikte kültüre K562 hücrelerde ölüme yol açma oranları azalma eğilimindeydi (Şekil 40). Benzer bir eğilim PKMH kültüründeki NK hücrelerinin öldürme fonksiyonları ile de gözlenmiştir (Şekil 40).



Şekil 40. NK hücrelerinin hedef hücreyi öldürme kapasitesinin belirlenmesi

Sağlıklı bireylerden izole edilen NK ve PKMH hücrelerinin stimülasyonsuz ve 1 µg/ml adalimumab (ADA, Abbott Laboratories, Chicago, USA) varlığında 48 saat kültürleri yapılmıştır. İn vitro adalimumab etkisi sonrasında hücreler 2 saat boyunca K562 stimülasyon deneyinde K562 hücreleri ile kokültürleri yapılmıştır. Kokültür sonrasında NK hücrelerinin öldürme başarısını değerlendirmek amacıyla K562 hücrelerinin canlılık oranları karşılaştırılmıştır (n=15).

4.3.5. NK hücre kültür ortamında adalimumab uygulamasının kültür üst sıvısındaki sitokin ve sitotoksik molekül seviyelerine etkisi

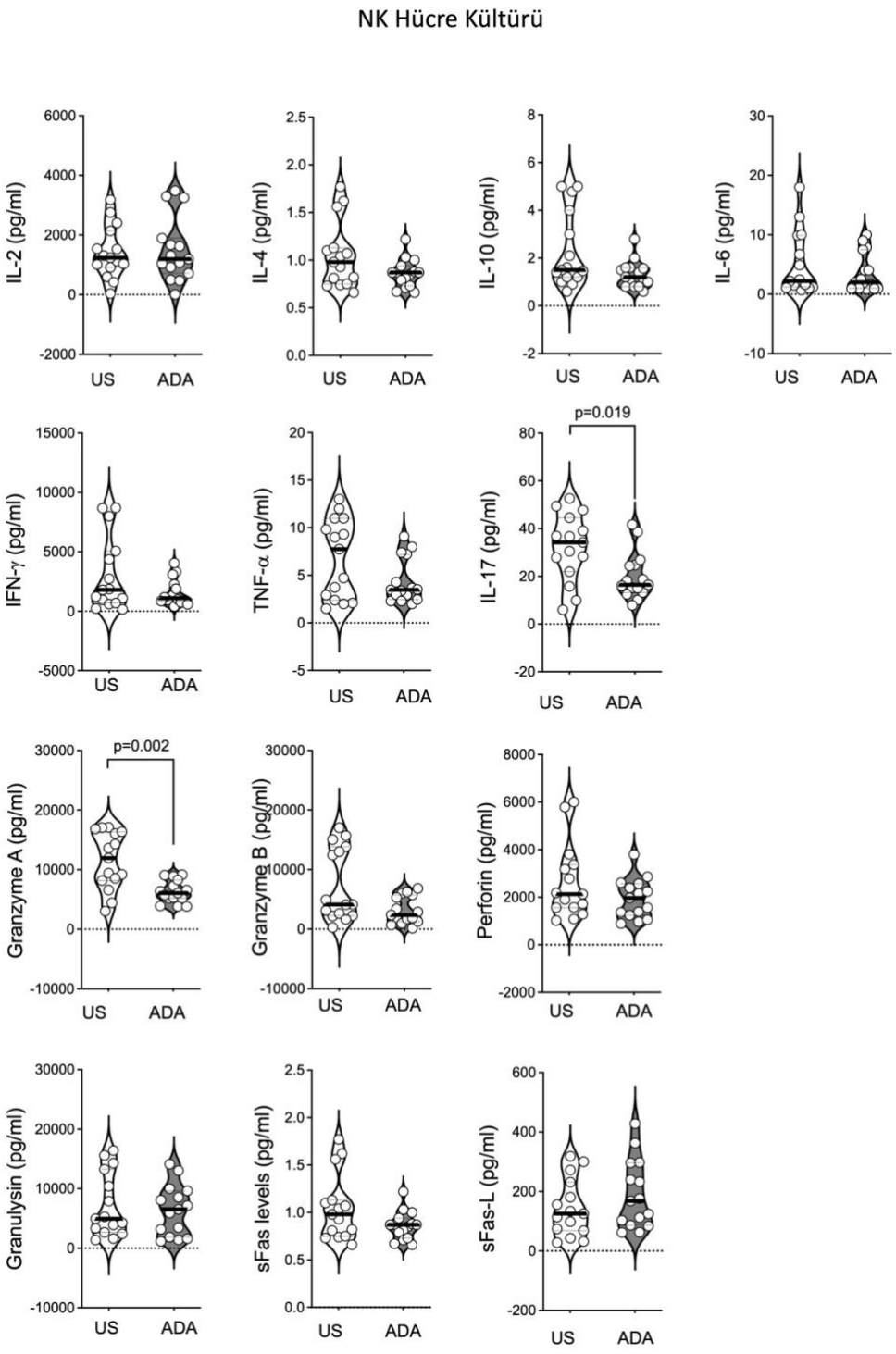
Genel olarak adalimumab eklenmesiyle birlikte NK hücrelerinin kültür üst sıvısına saldığı sitotoksik granül içeriğinin belirgin biçimde azaldığı izlenmiştir. Bu azalma özellikle granzyme A düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlıdır (11513.69 ± 4798.26 pg/mL'ye karşı 6322.37 ± 1874.09 pg/mL, p=0.002). Granzyme B düzeylerinde de benzer yönde bir düşüş eğilimi saptanmış, ancak bu değişim istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmamıştır (p=0.071). Perforin ve granulysin düzeylerinde azalma yönünde bir eğilim gözlenmekle birlikte anlamlı fark izlenmemiştir. Bu bulgular, adalimumabın *in*

vitro koşullarda NK hücrelerinin sitotoksik molekül salınım kapasitesini özellikle granzyme A üzerinden baskılayabildiğini ve sitotoksik efektör fonksiyonlarda zayıflam ile uyumlu bir profil oluşturduğunu düşündürmektedir (Şekil 41).

Sitokin profili açısından değerlendirildiğinde, IL-17A düzeylerinde adalimumab varlığında anlamlı bir azalma saptanmıştır (32.08 ± 14.14 pg/mL'ye karşı 19.90 ± 9.77 pg/mL, p=0.019). Buna karşın IL-2, IL-4, IL-6 ve IFN-γ düzeylerinde iki koşul arasında anlamlı bir farklılık izlenmemiştir. IL-10 ve TNF-α düzeylerinde adalimumab eklenen koşulda azalma yönünde bir eğilim bulunmakla birlikte, yüksek varyasyon nedeniyle bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Apoptoz ilişkili belirteçlerden sFas düzeyleri değişmezken, sFasL düzeyleri adalimumab koşulunda artma eğilimi göstermiş ancak anlamlılığa ulaşmamıştır (Şekil 41).

Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, adalimumabın saf NK hücre kültüründe belirgin etkileri görülmektedir: IL-17A ve özellikle granzim A salınımındaki azalma, hedef hücre öldürme kapasitesinde zayıflama eğilimi ve degranülasyon yanıtındaki bozulma ile birlikte düşünüldüğünde, adalimumabın NK hücrelerinin efektör/sitotoksik çıktısını azaltan bir etki oluşturabileceği; buna karşılık bazı temel büyüme/aktivasyon eksenlerinin (örn. IL-2 ve IFN-γ) kültür üst sıvısı düzeylerinde belirgin şekilde baskılanmadığı anlaşılmaktadır. Bu bulgular, önceki bölümlerde gözlenen apoptoz artışı ve fenotipik kayma ile birlikte yorumlandığında, adalimumab maruziyetinin NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerinde de azalmaya neden olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 41).

Şekil 41 saf NK hücre kültüründe 48 saatlik inkübasyon sonunda kültür üst sıvısında ölçülen sitokin ve sitotoksik molekül düzeylerinin, stimülasyonsuz standart koşul (NK US) ile 1 µg/ml adalimumab eklenen koşul (NK ADA) arasında karşılaştırmasını göstermektedir.



Şekil 41. NK hücre kültürü ortamında üst sıvıdaki sitokin ve sistotoksik molekül düzeyleri

NK; doğal öldürücü hücre, US; stimülasyonsuz standart kültür ortamı, ADA; 1ug/ml adalimumab eklenen kültür ortamı, IL; interlökin, TNF; tümör nekrozis faktör, IFN; interferon

4.3.6. PKMH hücre kültür ortamında adalimumab uygulamasının kültür üst sıvısındaki sitokin ve sitotoksik molekül seviyelerine etkisi

PKMH kültür ortamında adalimumab uygulamasının en belirgin etkisi TNF-α düzeylerinde izlenmiştir. Adalimumab varlığında kültür üst sıvısındaki TNF-α konsantrasyonu anlamlı olarak azalmıştır (3.28 ± 2.87 pg/ml'ye karşı 1.69 ± 0.44 pg/ml, p=0.019). Bu bulgu, PKMH kültüründe TNF-α üretiminin önemli bir kısmının NK dışı hücre kaynaklı (özellikle monosit/makrofaj ve T hücreleri) olabileceğini ve adalimumabın bu mikroçevrede TNF-α eksenini belirgin şekilde baskıladığını düşündürmektedir. Buna karşın saf NK kültüründe TNF-α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş izlenmemiş olması, adalimumabın TNF-α üzerindeki etkisinin hücresel kompozisyona bağlı olarak değiştiğini ve PKMH ortamında daha görünür hale geldiğini desteklemektedir (Şekil 42).

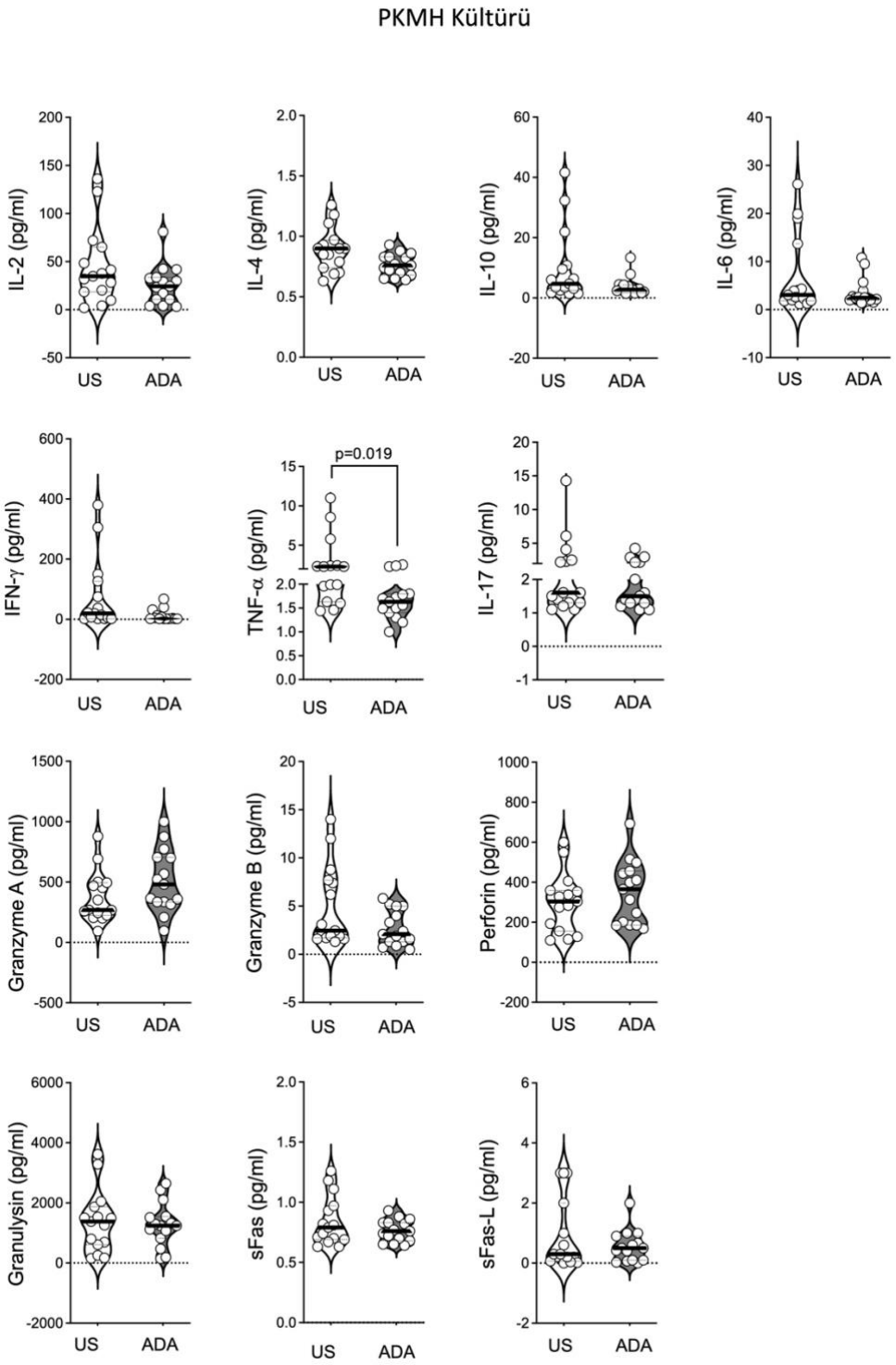
Diğer sitokinler açısından değerlendirildiğinde IL-2, IL-4, IL-6 ve IL-17A düzeylerinde adalimumab eklenen koşulda düşme yönünde eğilimler görülmekle birlikte, bu değişimler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. IL-10 düzeylerinde adalimumab varlığında azalma eğilimi dikkat çekmiştir (10.05 ± 12.25'ten 3.76 ± 3.14'e; p=0.097). Benzer şekilde IFN-γ düzeyleri de adalimumab koşulunda belirgin ölçüde daha düşük saptanmış ve sınırda anlamlılık göstermiştir (76.36 ± 118.64'ten 11.72 ± 19.69'a; p=0.065). Bu iki bulgu, PKMH mikroçevresinde adalimumabın yalnızca TNF-α'yı değil, daha geniş bir proinflamatuvar/immün aktivasyon profilini de aşağı çekebileceğine işaret etmekte ancak mevcut örneklem büyüklüğü ve varyasyon nedeniyle bu etkinin istatistiksel olarak netleşmediği görülmektedir (Şekil 42).

PKMH kültüründe sitotoksik moleküller açısından granzim A, granzim B, perforin ve granulizin düzeylerinde adalimumab ile anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. PKMH ortamında NK hücreleri dışındaki hücrelerin oranı, NK hücrelerinin oranına göre oldukça daha yüksekti. NK hücrelerinin azınlıkta olmaları nedeniyle adalimumab uygulanmasının NK hücreleri üzerindeki etkileri PKMH kültüründe hücre üst sıvısındaki seviyeleri değiştirmek için yetersiz kalmış olabilir. Benzer şekilde PKMH kültüründe adalimumab uyarımı sFas ve sFasL düzeylerinde anlamlı değişiklik oluşturmamıştır (Şekil 42).

Özet olarak, PKMH kültüründe adalimumab uygulaması ile birlikte TNF-α düzeyinde istatistiksel anlamlı bir azalma olmuştur. Ayrıca IFN-γ ve IL-10 gibi diğer bazı

mediyatörlerin seviyelerinde de azalma eğilimi gözlenmiş, ancak bu değişim istatistiksel anlamlılık seviyesinin altında kalmıştır. Ancak sitotoksik molekül düzeylerinde belirgin değişim olmamıştır. Bu bulgular, adalimumabın PKMH mikroçevresinde öncelikle TNF-α eksenini baskılayan bir etki gösterdiğini; NK hücrelerine ait sitotoksik moleküllerin düzeylerinde ise kültür üst sıvısında saptanabilecek bir değişim izlenmemiştir (Şekil 42).

Şekil 42 PKMH kültürlerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda kültür üst sıvısında ölçülen sitokin ve sitotoksik molekül düzeylerinin, stimülasyonsuz standart koşul (PKMH US) ile 1 µg/ml adalimumab eklenen koşul (PKMH ADA) arasında karşılaştırmasını göstermektedir.



Şekil 42. PKMH hücre kültür ortamında üst sıvıdaki sitokin ve sistotoksik molekül düzeyleri

NK; doğal öldürücü hücre, US; stimülasyonsuz standart kültür ortamı, ADA; 1ug/ml adalimumab eklenen kültür ortamı, IL; interlökin, TNF; tümör nekrozis faktör, IFN; interferon

5. TARTIŞMA

5.1. İmmün kontrol noktası reseptörlerinin NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi üzerindeki etkileri

İmmün kontrol noktası reseptörleri, immün yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynarlar ve bu reseptörlerin işlevleri özellikle kanser immünolojisi alanında kapsamlı biçimde araştırılmıştır. İmmün kontrol noktası reseptör inhibitörlerinin kullanıma girmesi, melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve diğer birçok malignitenin tedavisinde çığır açmıştır [81]. Bu reseptörlerin T hücre biyolojisindeki rolleri de büyük ölçüde tanımlanmış olmakla birlikte, diğer lenfosit alt grupları üzerindeki düzenleyici etkilerinin ayrıntıları halen araştırılmaya devam etmektedir [82].

NK hücreleri, anti-tümöral immünitenin ve hücre içi patojenlere karşı konak savunmasının kritik bileşenlerindendir. Bunun yanı sıra NK hücreleri, T hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve endotel gibi diğer immün olarak aktif hücreler ve dokularla karşılıklı etkileşimler içinde bulunan düzenleyici bir hücre grubu olarak da işlev görmektedir [83]. NK hücre aktivasyonu, bu hücrelere iletilen aktive edici ve inhibitör sinyaller arasındaki karmaşık dengenin sonucu olarak düzenlenmektedir [84, 85]. Bu denge esas olarak KIR'ler, LIR'ler ve NKG2A gibi klasik NK hücre reseptörleri aracılığıyla sağlanmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli lenfosit gruplarının fonksiyonlarını düzenleyen immün kontrol noktası reseptörlerinin de özellikle immün ayrıcalıklı bölgelerde ve feto-maternal toleransta NK hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir [86]. Ancak belirli tümörlerde veya kronik viral enfeksiyonlarda bu reseptörlerin aşırı aktivasyonu ya da kötüye kullanımı, NK hücrelerinde "*NK hücre tükenmesi*" olarak adlandırılan disfonksiyonel bir duruma yol açabilmektedir [81].

PD-1, aktive lenfositlerin çeşitli alt gruplarında eksprese edilen inhibitör bir reseptördür ve özellikle T ve B hücre yanıtlarının düzenlenmesindeki rolü iyi tanımlanmıştır. PD-1, aşırı immün yanıtları baskılayarak immün aracılı doku hasarını önleyerek dokuların immün ayrıcalığının sürdürülmesine, otoimmünitenin engellenmesine ve feto-maternal toleransın korunmasına katkı sağlar [86, 87]. Birçok malignite, tümör hücreleri üzerinde PD-1'in ligandlarını (örneğin PD-L1) eksprese ederek bu yolu kendi lehine kullanmaktadır [88]. NK hücrelerinde PD-1 ekspresyonunun birçok tümörde arttığı ve bu durumun tümörler tarafından NK hücre fonksiyonlarının baskılanmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir [81, 89].

Sağlıklı bireylerin periferik kanında PD-1^{+} NK hücreleri NK hücrelerinin küçük bir alt grubunu oluşturur ve bu hücreler terminal diferansiye olmuş NKG2A^{-}, KIR^{+}, CD5^{+} NK hücreleri olarak tanımlanır. PD-1^{+} NK hücrelerinde IFN-γ ve TNF-α ekspresyonu, degranülasyon kapasitesi (CD107a ekspresyonu) ve IL-2'ye yanıt olarak *in vitro* proliferasyon belirgin şekilde azalmıştır [26]. PD-1 protein ve mRNA ekspresyonlarının CD56^{dim} NK hücre alt grubunda daha yüksek olduğu bildirilmiştir. NK hücre sitoplazmasındaki artmış PD-1 mRNA düzeylerinin, hızlı yüzey ekspresyonunu mümkün kılan mekanizmalar aracılığıyla aşırı immün yanıtların ince ayarını yapmaya ve periferik toleransın sürdürülmesine katkı sağladığı düşünülmektedir [90].

Bu çalışmada da önceki gözlemler doğrulanmış, PD-1^{+} NK hücrelerinde TNF-α ve IFN-γ ekspresyonunun ve degranülasyon kapasitesinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca PD-1^{+} NK hücrelerinde IL-10 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. CD56^{dim}CD16^{bright} NK hücreleri, olgun ve sitotoksik NK hücre alt grubunu temsil etmektedir [15]. Bu çalışmada, CD56^{dim}CD16^{bright} alt grubunun sağlıklı bireylerin periferik kanında baskın NK hücre alt grubu olduğu ve PD-1^{+} NK hücre popülasyonu içerisinde de sayısal olarak en fazla temsil edilen alt grup olmaya devam ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, PD-1^{+} NK hücreleri arasında CD56^{dim}CD16^{bright} hücre oranının anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bulgumuz, PD-1 ekspresyonunun efektör NK hücre fenotipi ve fonksiyonlarının azalması ile ilişkili olduğu görüşünü desteklemiştir.

Buna karşılık, PD-1^{+} NK hücreleri arasında CD56^{dim}CD16^{-} NK hücrelerinin oranı belirgin şekilde artmış ve bu alt grubun altı NK hücre alt grubu arasında PD-1 ekspresyonunun en yüksek olduğu grup olduğu gösterilmiştir. CD56^{dim}CD16^{-} NK hücreleri, klasik olmayan ve fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamış özgün bir NK hücre alt grubudur. Bu alt grubun pankreas kanseri ve melanom hastalarında tümör infiltre eden lenfositler arasında baskın NK hücre popülasyonu olduğu bildirilmiştir [91, 92]. Bu çalışmada PD-1 ekspresyonunun en yüksek olduğu NK hücre alt grubunun CD56^{dim}CD16^{-} olması, bu fenotipin NK hücre tükenmesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca PD-1^{+} NK hücrelerinde perforin ve granzim A ekspresyonlarının belirgin şekilde azaldığı ve bu hücrelerin sağlıklı bireylerde K562 hücreleri ile uyarıya dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, PD-1^{+} NK hücrelerinin periferik kanda azınlıkta bulunan, düzenleyici özellikler taşıyan ve sitotoksik yanıtları bozulmuş bir NK hücre popülasyonunu temsil ettiğini ortaya koymaktadır.

CTLA-4, T hücre aktivasyonunda CD28 ko-stimülasyonunu bloke eden ve T hücre yanıtlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir immün kontrol noktası reseptörüdür. CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2), CD28'in ligandları olup, CTLA-4 tarafından bağlanarak CD28 aracılı ko-stimülasyonu engelleyebilir [93]. Ayrıca CTLA-4, düzenleyici T hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarını aracılık eden bir reseptör olarak da görev yapmaktadır [94]. T hücrelerinde CTLA-4 yüzey ekspresyonu sıkı biçimde kontrol edilmekte olup, CTLA-4'ün hücre yüzeyine taşınmasındaki bozukluklar otoimmüniteye yatkınlık ile ilişkilidir [95].

CD28 kostimülatör yolunun, NK hücrelerinde sitokin salınımı ve proliferatif yanıtlar açısından da önemli olduğu gösterilmiştir [96]. B7 molekülleri NK hücre sitotoksisitesini artırabilmekle birlikte, B7 aracılı NK hücre sitolizin mutlak olarak CD28'e bağımlı olmadığı bildirilmiştir [97, 98]. CD28 eksikliği olan farelerden elde edilen NK hücrelerinin, $B7^{+}$ tümör hücrelerini lize etme kapasitesinin azaldığı gösterilmiştir [99]. Kanser hastalarında anti-CTLA-4 monoklonal antikoru olan ipilimumab tedavisinin regülatör T hücrelerini azalttığı ve ileri evre kutanöz melanom hastalarında NK hücre fonksiyonlarını iyileştirdiği bildirilmiştir [100]. CTLA-4 aktivasyonu CD4 pozitif T hücrelerinde IL-2 üretimini baskılarken, CTLA-4 blokajının $CD4^{+}$ T hücrelerinden yeterli IL-2 sağlanmasını mümkün kılarak NK hücre sitotoksisitesini dolaylı yoldan artırdığı gösterilmiştir [101]. Bildiğimiz kadarıyla, CTLA-4^{+} NK hücrelerindeki fonksiyonel değişiklikleri doğrudan inceleyen bir çalışma daha önce yapılmamıştır.

Bu çalışmada, CTLA-4^{+} NK hücrelerinde IFN-γ ve TNF-α ekspresyonunun azaldığı, buna karşılık IL-10 ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. CTLA-4 ekspresyonu en yüksek düzeyde $CD56^{dim}CD16^{-}$ NK hücre alt grubunda saptanmış olup, bu durumun NK hücre tükenmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Buna karşılık, sitotoksik efektör NK hücre grubunu temsil eden $CD56^{dim}CD16^{bright}$ alt grubunda CTLA-4 ekspresyonu anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. CTLA-4 pozitif NK hücrelerinde perforin ekspresyonu belirgin şekilde azalmış, granzim A ekspresyonunda ise azalma eğilimi gözlenmiştir; bu bulgular hücrelerin düzenleyici fenotipi ile uyumludur. İlginç olarak, CTLA-4^{+} NK hücrelerinde CD107a ekspresyonu artmıştır. Bu artmış degranülasyonun, sitotoksik aktiviteden ziyade IL-10 içeren sekretuvar veziküllerin salınımını yansıtıyor olabileceği düşünülmektedir.

LAG-3, yapısal olarak CD4'e benzeyen ve MHC sınıf II moleküllerine CD4'ten daha yüksek afinite ile bağlanabilen bir immün kontrol noktası reseptörüdür. Bu nedenle LAG-3, T yardımcı hücrelerinde CD4 ile MHC sınıf II arasındaki etkileşimi bozabilmektedir [102]. LAG-3; aktive $CD4^+$ T hücreleri, IL-10 üreten düzenleyici Tr1 hücreleri, Foxp3 pozitif düzenleyici T hücreleri, $CD8^+$ T hücreleri ve NK hücrelerinde eksprese edilmektedir [103]. MHC sınıf II moleküllerine ek olarak, LSECtin ve galektin-3 de LAG-3'ün ligandlarıdır ve birçok tümörde anti-tümöral immün yanıtları baskılamak amacıyla eksprese edilmektedir [104]. Galektin-3, istirahat halindeki insan NK hücrelerinde de eksprese edilmekte olup, sitokin uyarıları ile ekspresyon düzeyi değişebilmektedir [105].

LAG-3 geni, NK gen kompleksine görece yakın bir bölgede yer almakta ve özellikle *in vitro* aktive edilen NK hücrelerinde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [106]. NKG2C aracılı kronik NK hücre uyarımı, NK hücre tükenmesine yol açmakta ve bu süreçte LAG-3 ekspresyonunun PD-1'den önce arttığı ve daha erken bir evrede aktive olduğu bildirilmiştir [107]. Bununla birlikte, LAG-3'ün insan NK hücrelerinde sitotoksik aktivitenin düzenlenmesi ile ilişkili olmadığı öne sürülmüştür [106]. LAG-3 geninin olmadığı fare modellerinde tümör hücrelerinin öldürülmesinde yetersizlik görülürken, MHC-I uyumsuz hedef hücrelerin lizisinin korunmuş olduğu gösterilmiştir [31]. Belirli tümörlere sahip hastaların NK hücrelerinde LAG-3 ekspresyonunun arttığı ve LAG-3 blokajının akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi ve multipl miyelomda NK hücre aracılı anti-tümöral sitotoksisiteyi *in vitro* olarak artırdığı bildirilmiştir. Benzer sonuçlar PD-1, KIR ve TIM-3 blokajı sonrası da gözlenmiş, ancak CTLA-4 blokajı ile benzer etki saptanmamıştır [108].

Bu çalışmada, LAG-3 ekspresyonunun da PD-1 ve CTLA-4'e benzer şekilde en yüksek düzeyde $CD56^{dim}CD16^-$ NK hücre alt grubunda olduğu ve sitotoksik efektör $CD56^{dim}CD16^{bright}$ alt grubunda en düşük düzeyde bulunduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, LAG-3 ekspresyonunun da NK hücre tükenmesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak, sağlıklı bireylerden elde edilen $LAG\text{-}3^+$ NK hücrelerinde IFN-γ ve TNF-α ekspresyonu belirgin şekilde azalmış, buna karşılık IL-10 salınımı anlamlı derecede artmıştır. Ayrıca bu hücrelerde degranülasyon kapasitesi ve perforin ile granzim A içeren sitotoksik granül ekspresyonu azalmış ve K562 hücre hattı ile uyarıya dirençli oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular, $LAG\text{-}3^+$ NK hücrelerinin

düzenleyici fenotipe sahip ve sitotoksik yanıtları zayıf bir NK hücre alt grubunu temsil ettiğini ortaya koymaktadır.

TIGIT, NK hücreleri ve T hücre alt gruplarında eksprese edilen bir immün kontrol noktası reseptörüdür. TIGIT'in inhibitör sinyali, yüksek afinite ligand olan poliovirüs reseptörü CD155 (PVR) ve düşük afinite ligand olan CD112 (Nectin-2) ile etkileşim yoluyla iletilmektedir [104]. TIGIT, NK hücrelerinin tümör hücrelerini öldürmesini baskılar ve MHC sınıf I ile ilişkili inhibisyona alternatif bir şekilde kendi hücrelerini tanıma mekanizması sağlar [109]. Gebeliğin birinci, ikinci ve üçüncü trimesterlerinde NK hücreleri ve T hücrelerinde TIGIT ekspresyonunun arttığı ve TIGIT'in feto-maternal toleransta özellikle önemli olduğu gösterilmiştir [86]. Düşük TIGIT ekspresyonuna sahip NK hücrelerinin, IL-12 uyarısına yanıt olarak IFN-γ üretimi, degranülasyon ve sitotoksik aktivite (CD107a ve perforin ekspresyonu) açısından daha güçlü olduğu bildirilmiştir [110]. TIGIT sinyal yolunun blokajı, NK hücrelerinde hem sitokin salınımını hem de sitotoksisiteyi artırmıştır.

Sistemik lupus eritematozuslu hastalarda $CD56^{dim}CD16^{bright}$ $TIGIT^{+}$ NK hücrelerinin, TIGIT negatif NK hücrelerine kıyasla LPS uyarısına yanıt olarak CD69 ve CD107a ekspresyonunun daha düşük olduğu bildirilmiştir [111]. HIV enfeksiyonu olan hastalarda TIGIT ekspresyonu HIV viral yükü ile pozitif, CD4 hücre sayısı ile ise negatif korelasyon göstermiştir [112, 113]. Bu hastalarda $TIGIT^{+}$ NK hücrelerinin fonksiyonel olarak yetersiz olduğu ve HIV-1 replikasyonunu engelleyemedikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte, TIGIT blokajının NK hücrelerinin anti-HIV degranülasyon ve IFN-γ salınımını artırmadığı bildirilmiştir [112].

Bu çalışmada, diğer immün kontrol noktası reseptörlerinden farklı olarak TIGIT ekspresyonunun en yüksek düzeyde $CD56^{dim}CD16^{dim}$ NK hücre alt grubunda olduğu gösterilmiştir. $CD56^{dim}CD16^{dim}$ alt grubundaki hücrelerin büyük kısmı, olgun NK hücre alt gruplarının olgunlaşmamış prekürsörlerini temsil etmektedir [15]. Bu nedenle, $CD56^{dim}CD16^{dim}$ NK hücrelerde artmış TIGIT ekspresyonunun, bu hücrelerden $CD56^{dim}CD16^{bright}$ olgun NK hücrelerinin gelişimi ile ilişkili olup olmadığının ilerleyen çalışmalarda araştırılması gerekmektedir. TIGIT ekspresyonunun yalnızca $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK hücre alt grubunda azaldığı, buna karşılık baskın NK hücre alt grubu olan $CD56^{dim}CD16^{bright}$ hücrelerde anlamlı bir değişiklik göstermediği saptanmıştır. $TIGIT^{+}$ NK hücrelerinde uyarı yokluğunda degranülasyon kapasitesi azalmış olmakla birlikte, sitotoksik granül ekspresyonu değişmemiştir. Diğer immün kontrol noktası

reseptörlerinden farklı olarak, TIGIT^{+} NK hücreleri K562 hücreleri ile uyarıya iyi yanıt vermiş; degranülasyon ve sitotoksik granül ekspresyonlarında anlamlı artış göstermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma üç immün kontrol noktası reseptörünün (PD-1, CTLA-4 ve LAG-3) özellikle CD56^{dim}CD16^{-} NK hücre alt grubunda arttığını ve bu ekspresyonun IL-10 salınımının arttığı, IFN-γ ve TNF-α ekspresyonunun azaldığı regülatör bir NK hücre fenotipi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. PD-1^{+}, CTLA-4^{+} ve LAG-3^{+} NK hücreleri, K562 tümör hücre hattı ile uyarıya yanıt vermeyen, sitotoksik fonksiyonları bozulmuş hücrelerdir. Buna karşılık, TIGIT ekspresyonu özellikle CD56^{dim}CD16^{dim} NK hücre alt grubunda artmış olup, bu ekspresyon degranülasyonun azalması ile ilişkili bulunmuş; ancak sitotoksik granül ekspresyonunda değişiklik saptanmamıştır. Diğer gruplardan farklı olarak, TIGIT^{+} NK hücreleri K562 uyarısına güçlü yanıt vermiş ve degranülasyon ile sitotoksik granül ekspresyonları artmıştır. İmmün kontrol noktası reseptörlerinin NK hücre fonksiyonları üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması, otoimmün hastalıklarda NK hücre disfonksiyonunun ve tümör immünolojisi ile kronik enfeksiyonlarda NK hücre tükenmesinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

5.2. Behçet üveiti hastalarında Adalimumab tedavisi ile remisyon sağlanması sonrasında oluşan NK hücre fenotipi ve yanıtlarının incelenmesi

Behçet hastalığında üveit, morbiditenin en sık ve en önemli nedenlerinden biridir ve özellikle ağır ataklarla seyreden, çoğunlukla genç erkek hastalarda agresif tedavi gerektirmektedir. Günümüzde bu hasta grubunda etkinliği kanıtlanmış ve onaylı tek biyolojik ajan adalimumabdır ve klinik olarak oldukça yüz güldürücü sonuçlar sağlamaktadır. Bu çalışmada, adalimumabın hem Behçet üveiti hem de ankilozan spondilitli hastalarda NK hücreleri üzerindeki immünmodülatör etkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Çalışmamızda, aktif Behçet üveiti döneminde NK hücre sayısının sağlıklı bireylere kıyasla daha düşük olduğu, klinik remisyon sağlandıktan sonra dahi NK hücre oranlarının sağlıklı kontroller düzeyine ulaşmadığı gösterilmiştir. Özellikle sitotoksik efektör NK hücrelerini temsil eden CD56^{dim}CD16^{bright} alt grubunun belirgin şekilde azaldığı ve bu azalmanın adalimumab ile klinik remisyon sonrasında da devam ettiği dikkat çekicidir. Buna karşılık, CD56^{dim}CD16^{bright} sitotoksik NK hücrelerinin öncülü olarak kabul edilen

ve fonksiyonel olarak immatür olduğu bilinen $CD16^{dim}CD56^{dim}$ NK hücre alt grubunun [15] aktif Behçet hastalarında arttığı ve adalimumab sonrası remisyon döneminde bu artışın daha da belirginleştiği saptanmıştır.

Aktif Behçet hastalarında artmış bulunan bir diğer NK hücre alt grubu, fonksiyonel olarak yetersiz olduğu bilinen $CD56^{-}CD16^{bright}$ NK hücreleridir [15]. Ancak bu alt grup, diğer fonksiyonel olarak bozulmuş NK hücre alt gruplarından farklı olarak, adalimumab ile klinik remisyon sağlandıktan sonra anlamlı şekilde azalmıştır. NK hücre sayısı ve dağılımına ilişkin bu bulgular, aktif Behçet hastalığında NK hücrelerinde sayısal azalma olduğunu bildiren önceki çalışmaları doğrulamakta [61] ve literatürde ilk kez Behçet hastalığında altı farklı NK hücre alt grubunun dağılımını ayrıntılı biçimde ortaya koymaktadır. Bulgularımız, temel sitotoksik NK hücre alt grubunun azaldığını, buna karşılık sitokin salgılayan $CD56^{bright}CD16^{dim/-}$ NK hücrelerinde belirgin bir değişiklik olmadığını; fonksiyonel olarak yetersiz $CD56^{-}CD16^{bright}$ ve $CD16^{dim}CD56^{dim}$ NK hücre alt gruplarının ise arttığını göstermektedir. Bu genel tablo, Behçet hastalığında NK hücre disfonksiyonunu düşündüren bir fenotipi işaret etmektedir.

Ankilozan spondilitli hastalar, sınıf I MHC-opati grubunda yer alan bir başka hastalık olarak hastalıklı kontrol grubu şeklinde değerlendirilmiştir. NK hücre sayıları ve alt grup dağılımları açısından Behçet hastalığı ile ankilozan spondilit hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu durum, NK hücrelerindeki bu değişimlerin sınıf I MHC-opati hastalıklarına özgü ortak bir özellik olabileceğini düşündürmektedir.

Aktif Behçet üveiti döneminde NK hücre yüzeyinde aktivatör C-tip lektin benzeri reseptör olan NKG2D ekspresyonunun sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Ayrıca bu artış, adalimumab ile klinik remisyon sağlanmasına rağmen değişmeden devam etmiştir. Bu bulgu, Behçet hastalarında NK hücrelerinde artmış NKG2D ekspresyonunu gösteren ve bu yolun hastalık patogenezinde rol oynayabileceğini öne süren İtalya kaynaklı bir çalışmayla uyumludur [114]. Bununla birlikte, bu yolakta adalimumab tedavisine klinik gözlendiği durumda dahi etkilenme olmamaktadır. Aktif hastalık döneminde inhibitör reseptör NKG2A ekspresyonu sağlıklı bireylerle benzer düzeydeyken, adalimumab ile klinik remisyona giren hastalarda NKG2A ekspresyonunun anlamlı biçimde arttığı saptanmıştır. NK hücre aktivasyonunu baskılayan bir reseptör olan NKG2A'daki bu artış, adalimumab'ın anti-inflamatuvar etkilerinden biri olarak değerlendirilebilir.

Aktif Behçet üveiti olan hastalarda IL-10 ve TGF-β üreten düzenleyici NK hücre oranının artmış olduğu ve bu artışın adalimumab tedavisi sonrasında da devam ettiği gözlenmiştir. Benzer şekilde, proinflamatuvar NK17 hücre popülasyonu da Behçet hastalarında artmış bulunmuş ve adalimumab ile remisyon sağlandıktan sonra dahi bu artışın sürdüğü görülmüştür. Buna karşın, IL-4 salgılayan NK2 hücreleri aktif hastalık döneminde sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş, ancak adalimumab tedavisi sonrasında bu popülasyon belirgin şekilde azalmıştır. Bu azalmanın, hastalık patogenezinden ziyade sistemik inflamasyona karşı gelişen ikincil bir immün denge yanıtını yansıttığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, adalimumab ile klinik iyileşmeye paralel olarak Behçet üveitinde NK hücre havuzunun efektör ağırlıklı bir profilden inhibitör ve düzenleyici dengeye doğru kaydığı görülmüştür. $CD56^{-}CD16^{bright}$ alt grubunun azalması, $CD56^{dim}CD16^{-}$ tükenmiş fenotipli NK hücrelerinin artması, NKG2A ekspresyonunun yükselmesi ve IL-10 üreten düzenleyici NK hücrelerinin artışı bu durumu desteklemektedir. Bu bulgular, NK hücrelerinin MHC sınıf I ile ilişkili üveit patogenezindeki rolünü desteklemekte ve NK reseptör dengelerinin (özellikle NKG2A/NKG2D) potansiyel farmakodinamik biyobelirteçler olabileceğini düşündürmektedir.

5.3. NK hücre kültüründe adalimumab uygulanmasının NK hücre yanıtları ve sağ kalımı üzerine etkileri

Adalimumab tedavisinin *in vitro* koşullarda NK hücre sağkalımı üzerindeki etkisini incelediğimizde, bulguların NK hücrelerinde genel baskılanmadan ziyade NK hücre alt gruplarının dağılımında belirli bir değişime işaret ettiği görülmektedir. Saf NK hücre kültüründe $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ toplam NK oranının azalmasına eşlik eden apoptotik hücre oranında anlamlı bir artış izlenmiştir. NK hücrelerinde gerçekleşen apoptoz NK hücre alt gruplarının oranlarının değişmesine de neden olmuştur. Canlı NK hücre popülasyonu içerisinde ise adalimumaba daha duyarlı alt grupların daha fazla apoptoza gitmesi sonucunda $CD56^{-}CD16^{bright}$ fenotipe sahip hücrelerin göreceli olarak daha fazla hayatta kalması ve bu nedenle NK hücre alt grupları içindeki oranlarının artması olasıdır. Bu oransal artışın kaynağı diğer NK hücre alt gruplarının apoptoz ile ölerek genel orandan veya adalimumab sinyali ile oluşan stres yanıtının CD56'nın yüzey ekspresyonunda

azalmaya neden olması olabilir. Bu iki etki de birlikte veya bağımsız olarak $CD56^{-}CD16^{bright}$ fenotipindeki hücrelerin oransal artışını açıklayabilir. Çalışmamızın ilk aşamasında $CD56^{-}CD16^{bright}$ NK alt grubunu incelediğimizde bu alt grupta PD-1, CTLA-4 ve LAG-3 ekspresyonlarında anlamlı artış saptanmıştır. Bu veriyi adalimumabın *in vivo* etkilerini incelediğimiz deneysel aşamalarda $CD56^{-}CD16^{bright}$ hücrelerdeki artış verisi ile birlikte değerlendirdiğimizde, adalimumabın NK hücrelerinde tükenmişlik (exhaustion) yönünde bir programı tetikleyebileceği hipotezini düşündürmektedir. PKMH kültüründe benzer bir eğilim izlenmekle birlikte, kültür ortamındaki diğer hücrelerin salgıladığı büyüme faktörleri, hücre-hücre temasına bağlı uyarılar ve çözünebilir mediyatörler (örn. IL-2/IL-15) saf NK kültüründe belirginleşen selektif hücre ölümü ve fenotip kaymasını kısmen engellemiş olabilir.

Saf NK hücre kültüründe adalimumab uygulaması ile birlikte apoptozun belirgin olarak arttığı ve canlılığın azaldığı dikkat çekmiştir. NK hücrelerinin otokrin ve parakrin TNF-α salgıladığı daha önce bildirilmiştir [115]. TNF sinyali özellikle TNFR2 aracılığıyla NK hücre proliferasyonunu ve metabolizmasını desteklemektedir ve TNFR2 yokluğunda NK hücre metabolizması ile proliferatif yanıtları bozulmaktadır [116]. Ayrıca *S. Typhimurium* enfeksiyonu fare modelinde TNFR1 sinyalinin NK hücrelerinin inflamasyon sahasında çoğalmasını ve fonksiyonunu olumsuz etkileyebilmekte, TNFR2 ise NK hücre yanıtlarını desteklemektedir [117]. Adalimumabın saf NK kültüründe apoptozu artırıcı etkisi, kültür ortamındaki lokal otokrin ve parakrin TNF-α miktarının azalmasına bağlı olarak özellikle TNFR2 üzerinden sağlanan sağ kalım ve proliferasyon sinyallerinin zayıflaması ile ilişkili olabilir. Buna ek olarak, adalimumabın membrana bağlı TNF'ye bağlanması sonucunda TNF reseptöründe reverse signaling benzeri immünmodülatör yolakların tetiklenmesi de teorik olarak olasıdır. Nitekim romatoid artrit hastalarında adalimumabın monositler üzerinde membrana bağlı TNF üzerinden reverse signaling mekanizmalarını uyarabildiği ve regülatör T hücre oranlarını artırabildiği bildirilmiştir [118]. Bizim çalışmamızda NK hücrelerinde benzer bir reverse signaling mekanizmasının gerçekleşip gerçekleşmediği doğrudan gösterilememiş olmakla birlikte, bu olasılığın tartışma kapsamında akılda tutulması uygun olacaktır.

PKMH kültürlerinde ise apoptoz ve canlılık oranlarında belirgin bir değişiklik izlenmemesi dikkat çekicidir. Bu ortamda NK dışı hücrelerin sayıca baskın olması, monosit ve dendritik hücre kaynaklı sağkalım sinyallerinin ve NK hücre proliferasyonunu

destekleyen sitokinlerin (ör. IL-2 ve IL-15) NK hücrelerinde anti-apoptotik yolakları aktive ederek adalimumabın NK hücre kültüründe gösterdiği etkilerinin gerçeklemesini (anti-apoptotik sinyal sayısını arttırarak hücrede oluşan apoptotik sinyalleri etkisiz kılarak) engellemiş olabilir. Özellikle dendiritik hücre kaynaklı IL-15'in IL-15Rα aracılığıyla çapraz sunumu (trans-presentation) NK hücre homeostazı ve sağkalımı için kritik bir mekanizmadır [119, 120]. Ayrıca monosit kaynaklı IL-15'in NK yanıtlarını desteklediği gösterilmiştir [121]. Bu bulgular, adalimumabın NK hücreleri üzerindeki etkinliğinin daha çok hücresel ve doku düzeyindeki immünolojik mikro çevrede belirginleşebileceği fikriyle uyumludur. Bu bulgular ikinci basamak deneylerde gözlemlediğimiz klinik remisyona rağmen serum sitokin düzeylerinde çok belirgin değişikliklerin izlenmemesi verisini de adalimumabın immünolojik mikro çevreye spesifik etki göstermesi mekanizması üzerinden kısmen açıklamaktadır.

Adalimumab hem saf NK hücre kültüründe hem de PKMH kültüründe Ki67 ekspresyonu ile değerlendirilen NK hücre proliferatif yanıtını artırmıştır. Ki67 artışı, hücrelerin hücre döngüsüne girişinin arttığını göstermektedir. Ancak hücrelerin hücre proliferasyonu döngüsüne girmiş olmaları, tek başına mutlak hücre sayısında net bir artış olup olmayacağını kesin olaarak gösteremez. Bu bulgu ilk bakışta saf NK kültüründe gözlenen apoptoz artışı ile zıt gibi görünse de apoptoz ile birlikte hücre döngüsüne girişin de artması NK hücrelerinin hem üretim hem de yıkımının birlikte hızlandığı bir döngüye işaret ediyor olabilir. Bu tablo, immatür ve öncül NK alt gruplarındaki artış eğilimi verisini de kısmen açıklamaktadır. Burada kaybedilen hücrelerin telafisine yönelik kompansatuvar bir proliferatif yanıt gelişmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Bir diğer ihtimal de 6 NK alt grubundan özellikle en güçlü effektör alt grupların terminal diferansiye oldukları için apoptoza daha kolay girmeleri, immatür ve regülatör hücrelerin ise hücre proliferasyonu aşamalarında olup apoptoza daha dirençli olmalarını sağlamış olabilir. Prolifere olan hücrelerin apoptoza daha dirençli bir grup olması da toplamda $Ki67^{+}$ hücre oranının artmasının nedenlerinden biri olabilir.

Sitokin ekspresyonu incelendiğinde saf NK hücrelerinde IL-17 ekspresyonunda artış izlenirken, TNF-α ekspresyonunda düşme eğilimi gözlenmiştir. Benzer şekilde düzenleyici sitokinler olan IL-10 ve TGF-β'da da artma eğilimi mevcuttur. Adalimumabın TNF-α'ya bağlanarak bu eksendeki sinyalleri engellemesi, IL-17 yönünde bir kayışa katkı sağlamış olabilir. Th17 farklılaşma mekanizmalarının tanımlandığı klasik

çalışmada, Th1 yanıtını baskılayan TGF-β'nın inflamatuvar eş-sinyaller (özellikle IL-6) varlığında IL-17 eksenini destekleyebildiği gösterilmiştir [122]. Nitekim çalışmamızın *in vivo* verilerinde aktif Behçet üveiti sırasında plazma IL-6 düzeylerinin anlamlı olarak artmış olması, TGF-β ile birlikte IL-17 eksenini destekleyebilecek bir mikro çevrenin varlığına işaret etmektedir. Bu çerçevede, TNF-α yolunun baskılanmasıyla birlikte TGF-β yanıtının görece artması ve eşlik eden IL-6 artışı, IL-17 ekseninin güçlenmesine zemin hazırlamış olabilir. Behçet üveitinde *in vivo* verilerimizde IL-17 yolunda artış gözlenmesi de benzer mekanizmaların işlediğine işaret etmektedir. Ayrıca IL-23 sinyalinin IL-17 yanıtını güçlendirdiğine ilişkin veriler [123] ve IL-23R polimorfizmlerinin Behçet hastalığı ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar [58] birlikte değerlendirildiğinde, IL-17 yanıtının bu hasta grubunda genetik ve sitokin ortamı açısından kolaylaşabileceği düşünülebilir. PKMH kültüründe ise monosit ve T hücreleri gibi NK dışı hücrelerin katkısı ve mikroçevrenin sağladığı tamponlayıcı sinyaller nedeniyle adalimumabın NK hücreleri üzerindeki doğrudan etkisinin göreceli olarak seyreldiği ve sitokin yanıtının daha az belirgin hale geldiği değerlendirilebilir.

Adalimumabın kültür ortamında CD107a ile ölçülen bazal degranülasyon düzeyini artırması, NK hücrelerinde granül ekzositozuna yatkınlığın arttığına veya degranülasyon eşiğinin düştüğüne işaret etmektedir. Buna karşılık K562 hedef hücre uyarısına karşı degranülasyon yanıtının adalimumab ile zayıflaması ve hedef hücre öldürme fonksiyonlarında azalma eğilimi, uyarana bağlı fonksiyonel öldürme kapasitesinin azalabileceğini düşündürmektedir. Bazal degranülasyon artışına rağmen hedefe yönelik öldürme yanıtının zayıflaması birkaç mekanizma ile açıklanabilir: (i) önceden granüllerde bazal degranülasyon artışı nedeniyle azalma olması ve hedefle karşılaşma anında mobilize edilecek granül rezervinin azalması, (ii) kültürde $CD56^{-}CD16^{bright}$ alt grubunun artışı ile uyumlu disfonksiyonel ve hiporesponsif bir fenotipe kayış, (iii) *in vivo* verilerimizde adalimumab sonrası inhibitör reseptör ekspresyonunun artması ve aktivatör reseptörlerin azalması ile uyumlu biçimde NK reseptör dengesinin inhibisyon yönüne kayması ve (iv) apoptoz artışı nedeniyle özellikle yüksek öldürücülüğe sahip efektör NK hücrelerinin kaybı sonucunda efektif öldürme kapasitesinin azalması. Bu yorum, *in vitro* adalimumab ile muamele edilen romatoid artrit hastalarına ait NK hücrelerinin B hücresi lenfoma hedeflerine karşı sitotoksik kapasitesinde azalma saptandığını ve bunun TNFR1 sinyali üzerinden olabileceğinin öne sürüldüğünü bildiren çalışma ile de uyumludur

[124]. Dolayısıyla TNFR1/TNFR2 dengesi ve adalimumaba bağlı NK hücrelerinin degranülasyon için granül rezervlerinin azalması gözlenen fenotipik ve fonksiyonel sonuçlara birlikte katkıda bulunmuş olabilir.

5.4. Özet ve Sonuç

Bu tez çalışması, NK hücre fonksiyonlarının klasik aktivatör–inhibitör reseptör dengesinin ötesinde immün kontrol noktası reseptörleri ve mikro çevresel sinyallerle çok katmanlı biçimde düzenlendiğini göstermektedir. Sağlıklı bireylerde PD-1, CTLA-4 ve LAG-3 pozitifliği özellikle $CD56^{dim}CD16^{-}$ alt grubunda belirginleşmesi, bu hücrelerde IFN-γ ve TNF-α ekspresyonunun azalması, degranülasyon ve sitotoksik granül içeriğinin azalması ve IL-10 artışı ile birlikte düzenleyici ve disfonksiyonel (tükenmişlik benzeri) bir fenotipe işaret etmiştir. TIGIT'in daha çok $CD56^{dim}CD16^{dim}$ alt grubunda artması ve K562 uyarısına yanıtının korunması, farklı immün kontrol noktalarının alt grup bağımlı ve mikro çevreye özgü yanıtlar ürettiğini düşündürmektedir. Behçet üveitinde aktif dönemde toplam NK hücrelerinin oranlarında düşme yaşanması ve $CD56^{dim}CD16^{bright}$ sitotoksik efektör alt grubundaki azalmanın remisyon sonrasında da devam etmesi, buna karşılık immatür veya öncül kabul edilen $CD16^{dim}CD56^{dim}$ alt grubun artması ve fonksiyonel olarak yetersiz $CD56^{-}CD16^{bright}$ alt grubun remisyonla azalması; adalimumab ile klinik düzelmenin NK havuzunda tam bir "normalleşmeden" ziyade remisyona neden olabilecek bir yeniden düzenlemeye neden olduğunu düşündürmektedir. Bu yeni düzenleme, NKG2D artışının tedaviyle değişmemesine karşın NKG2A'nın remisyonla yükselmesi ve NKreg ile NK17 yanıtlarının kısmen kalıcı olması ile birlikte değerlendirildiğinde, tedavinin NK reseptör dengesini inhibitör/düzenleyici yöne kaydırarak inflamatuvar yükü kontrol ettiğini düşündürmektedir. *İn vitro* bulgularda, adalimumabın saf NK kültüründe apoptozu artırıp canlılığı azaltırken Ki67 ile ölçülen proliferasyonu hem saf NK hem PKMH kültürlerinde artırmıştır. Bu bir çelişki olmayıp, NK hücrelerinin yaşam döngüsünün hızlanması ve apoptoza nispeten dirençli immatür alt grupların göreceli avantaj kazanması ile açıklanabilir. PKMH kültüründe apoptoz etkisinin belirginleşmemesinin ise monosit ve dendritik hücre kaynaklı destekleyici sinyallerin (özellikle IL-15 trans-presentation'ı) ile tamponlanabileceğini ortaya koymaktadı [119-121]. Saf NK kültüründe TNF-α'da düşme eğilimi ile IL-17 artışı ve IL-10/TGF-β artma eğilimi, TNF ekseninin modülasyonunun IL-6 varlığında IL-17 yönünde kayışı kolaylaştırabileceğini [122] ve aktif Behçet üveitinde plazma IL-6

artışıyla birlikte bu eksenin *in vivo* durumda da desteklenebileceğini; ayrıca IL-23/IL-23R hattının katkısının olası olduğunu [58, 123] düşündürmektedir. Fonksiyonel olarak bazal CD107a artışıyla birlikte K562 yanıtında degranülasyonun zayıflaması ve öldürmede azalma eğilimi bazal aktivasyonun hedefe yönelik öldürme için avantaj sağlamadığını düşündürmektedir.

Bu durum hücre içi granül rezervinin tüketilmesi, disfonksiyonel fenotipe kayış ve efektör hücre kaybı gibi mekanizmaların birlikte katkısıyla açıklanabilmektedir ve literatürde adalimumab maruziyetinde hedef öldürmenin azalabileceğini bildiren verilerle uyumludur [124]. Genel olarak, bulgularımız immün kontrol noktası reseptörlerinin NK disfonksiyonunu belirleyen ana eksenlerden biri olabileceğini, adalimumab ile remisyonun NK havuzunda inhibitör/düzenleyici baskınlığa doğru bir kayışla örtüşebileceğini ve NKG2A/NKG2D dengesi ile belirli NK alt gruplarının farmakodinamik biyo belirteç adayları olarak değerlendirilmesini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Kulp, E.N. and C.M. Lau, *Environmental Signals That Drive Early Life Innate Lymphoid Cell Development.* Eur J Immunol, 2026. **56**(1): p. e70134.
2. Sagebiel, A.F., et al., *Tissue-resident Eomes(+) NK cells are the major innate lymphoid cell population in human infant intestine.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 975.
3. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.* Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237–44.
4. Bryceson, Y.T., H.G. Ljunggren, and E.O. Long, *Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors.* Blood, 2009. **114**(13): p. 2657–66.
5. Bryceson, Y.T., et al., *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells.* Immunol Rev, 2006. **214**: p. 73–91.
6. Topham, N.J. and E.W. Hewitt, *Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?* Immunology, 2009. **128**(1): p. 7–15.
7. Krzewski, K., et al., *LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity.* Blood, 2013. **121**(23): p. 4672–83.
8. 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.
9. Moretta, L. and A. Moretta, *Killer immunoglobulin-like receptors.* Curr Opin Immunol, 2004. **16**(5): p. 626–33.
10. Martinet, L. and M.J. Smyth, *Balancing natural killer cell activation through paired receptors.* Nat Rev Immunol, 2015. **15**(4): p. 243–54.
11. de Andrade, L.F., M.J. Smyth, and L. Martinet, *DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins.* Immunol Cell Biol, 2014. **92**(3): p. 237–44.
12. Kruse, P.H., et al., *Natural cytotoxicity receptors and their ligands.* Immunol Cell Biol, 2014. **92**(3): p. 221–9.
13. Ferlazzo, G., et al., *Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells.* J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 343–51.
14. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets.* Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633–40.
15. Amand, M., et al., *Human CD56(dim)CD16(dim) Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 699.
16. 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.
17. Aktas, E., et al., *Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells.* Clin Exp Immunol, 2005. **140**(2): p. 301–9.
18. Deniz, G., W. van de Veen, and M. Akdis, *Natural killer cells in patients with allergic diseases.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(3): p. 527–535.
19. Rebuffet, L., et al., *High-dimensional single-cell analysis of human natural killer cell heterogeneity.* Nat Immunol, 2024. **25**(8): p. 1474–1488.

20. Testi, R., et al., *The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells.* Immunol Today, 1994. **15**(10): p. 479–83.
21. Addison, E.G., et al., *Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity.* Immunology, 2005. **116**(3): p. 354–61.
22. Schulte-Wrede, U., et al., *An explorative study on deep profiling of peripheral leukocytes to identify predictors for responsiveness to anti-tumour necrosis factor alpha therapies in ankylosing spondylitis: natural killer cells in focus.* Arthritis Res Ther, 2018. **20**(1): p. 191.
23. Esen, F., et al., *Functional and phenotypic changes in natural killer cells expressing immune checkpoint receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, and TIGIT in non-small cell lung cancer: the comparative analysis of tumor microenvironment, peripheral venous blood, and tumor-draining veins.* Immunol Res, 2024. **73**(1): p. 18.
24. Cikman, D.I., et al., *Mediastinal lymph node removal modulates natural killer cell exhaustion in patients with non-small cell lung cancer.* Immunol Res, 2023. **71**(6): p. 959–971.
25. Pires da Silva, I., et al., *Anti-PD-1 alone or in combination with anti-CTLA-4 for advanced melanoma patients with liver metastases.* Eur J Cancer, 2024. **205**: p. 114101.
26. Pesce, S., et al., *Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization.* J Allergy Clin Immunol, 2017. **139**(1): p. 335–346 e3.
27. Stojanovic, A., et al., *CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN-gamma production in response to mature dendritic cells.* J Immunol, 2014. **192**(9): p. 4184–91.
28. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269–81.
29. Torphy, R.J., R.D. Schulick, and Y. Zhu, *Newly Emerging Immune Checkpoints: Promises for Future Cancer Therapy.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).
30. He, Y., et al., *LAG-3 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes.* J Thorac Oncol, 2017. **12**(5): p. 814–823.
31. Miyazaki, T., et al., *Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3.* Science, 1996. **272**(5260): p. 405–8.
32. Saadoun, D. and B. Wechsler, *Behcet's disease.* Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**: p. 20.
33. Gül, A. *Pathogenesis of Behçet's disease: autoinflammatory features and beyond*. in *Seminars in immunopathology*. 2015. Springer.
34. Yazici, H., et al., *The ten-year mortality in Behcet's syndrome.* Br J Rheumatol, 1996. **35**(2): p. 139–41.
35. 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.
36. Evereklioglu, C., *Current concepts in the etiology and treatment of Behcet disease.* Surv Ophthalmol, 2005. **50**(4): p. 297–350.
37. Coskun, B., et al., *Activation markers in Behcet's disease.* Skinmed, 2005. **4**(5): p. 282–6.

38. Altenburg, A., et al., *Epidemiology and clinical manifestations of Adamantiades-Behçet disease in Germany–Current pathogenetic concepts and therapeutic possibilities.* JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2006. **4**(1): p. 49–66.
39. Tugal-Tutkun, I., *Behcet disease in the developing world.* Int Ophthalmol Clin, 2010. **50**(2): p. 87–98.
40. Behcet, H. and E.L. Matteson, *On relapsing, aphthous ulcers of the mouth, eye and genitalia caused by a virus. 1937.* Clin Exp Rheumatol, 2010. **28**(4 Suppl 60): p. S2–5.
41. Yazici, H. and F. Esen, *Mortality in Behcet's syndrome.* Clin Exp Rheumatol, 2008. **26**(5 Suppl 51): p. S138–40.
42. Hatemi, G., et al., *Behcet's syndrome: one year in review 2025.* Clin Exp Rheumatol, 2025. **43**(10): p. 1699–1708.
43. *Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease.* Lancet, 1990. **335**(8697): p. 1078–80.
44. International Team for the Revision of the International Criteria for Behcet's, D., *The International Criteria for Behcet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria.* J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014. **28**(3): p. 338–47.
45. Van Gelder, R.N., et al., *Here Comes the SUN (Part 2): Standardization of Uveitis Nomenclature for Disease Classification Criteria.* Am J Ophthalmol, 2021. **228**: p. A2–A6.
46. Streilein, J.W., *Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 879–89.
47. Shechter, R., A. London, and M. Schwartz, *Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 206–18.
48. Amouzegar, A., S.K. Chauhan, and R. Dana, *Alloimmunity and Tolerance in Corneal Transplantation.* J Immunol, 2016. **196**(10): p. 3983–91.
49. Basu, S., et al., *Intraocular Immune Response in Human Uveitis: Time to Look Beyond Animal Models.* Am J Ophthalmol, 2024. **266**: p. 17–25.
50. Yalcindag, F.N., et al., *Demographic and Clinical Characteristics of Uveitis in Turkey: The First National Registry Report.* Ocul Immunol Inflamm, 2018. **26**(1): p. 17–26.
51. Ozdal, P.C., et al., *Posterior segment involvement in ocular Behcet's disease.* Eur J Ophthalmol, 2002. **12**(5): p. 424–31.
52. Posarelli, C., et al., *Behcet's syndrome and ocular involvement: changes over time.* Clin Exp Rheumatol, 2020. **38 Suppl 127**(5): p. 86–93.
53. Tugal-Tutkun, I., *Uveitis in Behcet disease - an update.* Curr Opin Rheumatol, 2023. **35**(1): p. 17–24.
54. Tugal-Tutkun, I. and P. Cakar Ozdal, *Behcet's disease uveitis: is there a need for new emerging drugs?* Expert Opin Emerg Drugs, 2020. **25**(4): p. 531–547.
55. Hatemi, G., et al., *2018 update of the EULAR recommendations for the management of Behcet's syndrome.* Ann Rheum Dis, 2018. **77**(6): p. 808–818.
56. 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.
57. Gül, A., *Genetics of Behçet's disease: lessons learned from genomewide association studies.* Current opinion in rheumatology, 2014. **26**(1): p. 56–63.

58. Remmers, E.F., et al., *Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease.* Nat Genet, 2010. **42**(8): p. 698–702.
59. Kirino, Y., et al., *Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behcet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1.* Nat Genet, 2013. **45**(2): p. 202–7.
60. Tian, Z., M.E. Gershwin, and C. Zhang, *Regulatory NK cells in autoimmune disease.* J Autoimmun, 2012. **39**(3): p. 206–15.
61. Kucuksezer, U.C., et al., *The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 622306.
62. Hasan, M.S., et al., *Circulating NK cells and their subsets in Behcet's disease.* Clin Exp Immunol, 2017. **188**(2): p. 311–322.
63. Cosan, F., et al., *Natural Killer Cell Subsets and Their Functional Activity in Behcet's Disease.* Immunol Invest, 2017. **46**(4): p. 419–432.
64. Yamaguchi, Y., et al., *Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behcet's disease.* Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R80.
65. Kucuksezer, U.C., et al., *Natural killer cells dominate a Th-1 polarized response in Behcet's disease patients with uveitis.* Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(6 Suppl 94): p. S24–9.
66. Pipitone, N., et al., *New approaches in the treatment of Adamantiades-Behcet's disease.* Curr Opin Rheumatol, 2006. **18**(1): p. 3–9.
67. Leccese, P., et al., *Efficacy of switching to adalimumab in a patient with refractory uveitis of Behcet's disease to infliximab.* Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(4 Suppl 67): p. S93.
68. Fabiani, C., et al., *Efficacy and safety of adalimumab in Behcet's disease-related uveitis: a multicenter retrospective observational study.* Clin Rheumatol, 2017. **36**(1): p. 183–189.
69. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease.* J Pathol, 2008. **214**(2): p. 149–60.
70. Steeland, S., C. Libert, and R.E. Vandenbroucke, *A New Venue of TNF Targeting.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(5).
71. Zelova, H. and J. Hosek, *TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances.* Inflamm Res, 2013. **62**(7): p. 641–51.
72. Mitoma, H., et al., *Molecular mechanisms of action of anti-TNF-alpha agents - Comparison among therapeutic TNF-alpha antagonists.* Cytokine, 2018. **101**: p. 56–63.
73. Nguyen, D.X. and M.R. Ehrenstein, *Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis.* J Exp Med, 2016. **213**(7): p. 1241–53.
74. Blay, J.Y., et al., *Functional interactions of IL2 and TNF in the differentiation of LGL into LAK effectors.* Int J Cancer, 1989. **44**(4): p. 598–604.
75. Favrot, M., et al., *TNF alpha enhancement of NK and LAK cell functions induced by high-dose IL-2 in human peripheral blood mononuclear cells from patients pretreated with alpha IFN + IL-2.* Eur Cytokine Netw, 1990. **1**(4): p. 221–7.
76. Almishri, W., et al., *TNFalpha Augments Cytokine-Induced NK Cell IFNgamma Production through TNFR2.* J Innate Immun, 2016. **8**(6): p. 617–629.
77. Thaher, F., S. Plankenhorn, and R. Klein, *Differential effects of the tumor necrosis factor alpha-blocker infliximab and etanercept on immunocompetent cells in vitro.* Int Immunopharmacol, 2011. **11**(11): p. 1724–31.

78. Tugal-Tutkun, I., et al., *Scoring of dual fluorescein and ICG inflammatory angiographic signs for the grading of posterior segment inflammation (dual fluorescein and ICG angiographic scoring system for uveitis).* Int Ophthalmol, 2010. **30**(5): p. 539–52.
79. Ogdie, A., et al., *Measuring Outcomes in Axial Spondyloarthritis.* Arthritis Care Res (Hoboken), 2020. **72 Suppl 10**: p. 47–71.
80. Sarhan, D., et al., *Adaptive NK Cells with Low TIGIT Expression Are Inherently Resistant to Myeloid-Derived Suppressor Cells.* Cancer Res, 2016. **76**(19): p. 5696–5706.
81. Khan, M., S. Arooj, and H. Wang, *NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 167.
82. Wherry, E.J., *T cell exhaustion.* Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492–9.
83. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503–10.
84. Bellora, F., et al., *The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21659–64.
85. Lanier, L.L., *NK cell recognition.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225–74.
86. Wang, Y., et al., *Dynamics of TIGIT and PD-1 expression on NK cells during the course of normal pregnancy.* Immunol Lett, 2021. **230**: p. 42–48.
87. Ishida, Y., *PD-1: Its Discovery, Involvement in Cancer Immunotherapy, and Beyond.* Cells, 2020. **9**(6).
88. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity.* Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677–704.
89. Sivori, S., et al., *Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications.* Cell Mol Immunol, 2019. **16**(5): p. 430–441.
90. Mariotti, F.R., et al., *PD-1 in human NK cells: evidence of cytoplasmic mRNA and protein expression.* Oncoimmunology, 2019. **8**(3): p. 1557030.
91. Marcon, F., et al., *NK cells in pancreatic cancer demonstrate impaired cytotoxicity and a regulatory IL-10 phenotype.* Oncoimmunology, 2020. **9**(1): p. 1845424.
92. Vujanovic, L., et al., *CD56(dim) CD16(-) Natural Killer Cell Profiling in Melanoma Patients Receiving a Cancer Vaccine and Interferon-alpha.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 14.
93. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227–42.
94. Walker, L.S. and D.M. Sansom, *The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 852–63.
95. Kristiansen, O.P., Z.M. Larsen, and F. Pociot, *CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity?* Genes Immun, 2000. **1**(3): p. 170–84.
96. Nandi, D., J.A. Gross, and J.P. Allison, *CD28-mediated costimulation is necessary for optimal proliferation of murine NK cells.* J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3361–9.
97. Gao, J.X., et al., *Two-signal requirement for activation and effector function of natural killer cell response to allogeneic tumor cells.* Blood, 2003. **102**(13): p. 4456–63.
98. Cook, C.H., et al., *CD28/B7-mediated co-stimulation is critical for early control of murine cytomegalovirus infection.* Viral Immunol, 2009. **22**(2): p. 91–103.

99. Geldhof, A.B., et al., *Interleukin-12-activated natural killer cells recognize B7 costimulatory molecules on tumor cells and autologous dendritic cells.* Blood, 1998. **91**(1): p. 196–206.
100. Sanseviero, E., et al., *Anti-CTLA-4 Activates Intratumoral NK Cells and Combined with IL15/IL15Ralpha Complexes Enhances Tumor Control.* Cancer Immunol Res, 2019. **7**(8): p. 1371–1380.
101. Kerdiles, Y., S. Ugolini, and E. Vivier, *T cell regulation of natural killer cells.* J Exp Med, 2013. **210**(6): p. 1065–8.
102. Baixeras, E., et al., *Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens.* J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 327–37.
103. Gagliani, N., et al., *Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells.* Nat Med, 2013. **19**(6): p. 739–46.
104. Anderson, A.C., N. Joller, and V.K. Kuchroo, *Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation.* Immunity, 2016. **44**(5): p. 989–1004.
105. Brittoli, A., et al., *"In vitro" studies on galectin-3 in human natural killer cells.* Immunol Lett, 2018. **194**: p. 4–12.
106. Huard, B., M. Tournier, and F. Triebel, *LAG-3 does not define a specific mode of natural killing in human.* Immunol Lett, 1998. **61**(2-3): p. 109–12.
107. Merino, A., et al., *Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprograming.* J Clin Invest, 2019. **129**(9): p. 3770–3785.
108. Poh, S.L. and Y.C. Linn, *Immune checkpoint inhibitors enhance cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against human myeloid leukaemic blasts.* Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(5): p. 525–36.
109. Stanietsky, N., et al., *The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17858–63.
110. Wang, F., et al., *TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals.* Eur J Immunol, 2015. **45**(10): p. 2886–97.
111. Luo, Q., et al., *Decreased expression of TIGIT in NK cells correlates negatively with disease activity in systemic lupus erythematosus.* Int J Clin Exp Pathol, 2018. **11**(5): p. 2408–2418.
112. Zhang, X., et al., *Analysis of the Characteristics of TIGIT-Expressing CD3(-)CD56(+)NK Cells in Controlling Different Stages of HIV-1 Infection.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 602492.
113. Yin, X., et al., *Expression of the Inhibitory Receptor TIGIT Is Up-Regulated Specifically on NK Cells With CD226 Activating Receptor From HIV-Infected Individuals.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2341.
114. Bonacini, M., et al., *Higher Frequencies of Lymphocytes Expressing the Natural Killer Group 2D Receptor in Patients With Behcet Disease.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2157.
115. Abel, A.M., et al., *Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 1869.
116. Khan, A.U.H., et al., *The TNFalpha/TNFR2 axis mediates natural killer cell proliferation by promoting aerobic glycolysis.* Cell Mol Immunol, 2023. **20**(10): p. 1140–1155.

117. McCulloch, T.R., et al., *Dichotomous outcomes of TNFR1 and TNFR2 signaling in NK cell-mediated immune responses during inflammation.* Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 9871.
118. Nguyen, D.X., et al., *Regulatory T cells as a biomarker for response to adalimumab in rheumatoid arthritis.* J Allergy Clin Immunol, 2018. **142**(3): p. 978–980 e9.
119. Castillo, E.F., et al., *Dendritic cells support the in vivo development and maintenance of NK cells via IL-15 trans-presentation.* J Immunol, 2009. **183**(8): p. 4948–56.
120. Tamzalit, F., et al., *IL-15.IL-15Ralpha complex shedding following trans-presentation is essential for the survival of IL-15 responding NK and T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(23): p. 8565–70.
121. Carson, W.E., et al., *Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro.* J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2578–82.
122. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.* Nature, 2006. **441**(7090): p. 235–8.
123. Awasthi, A., et al., *Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells.* J Immunol, 2009. **182**(10): p. 5904–8.
124. Nocturne, G., et al., *Impact of anti-TNF therapy on NK cells function and on immunosurveillance against B-cell lymphomas.* J Autoimmun, 2017. **80**: p. 56–64.

FORMLAR

ÖZGEÇMİŞ

FEHİM ESEN, MD, PhD, FEBO

İletişim Adresi: İMÜ Göztepe Prof.Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Eğitim mah. Dr. Erkin cad, Kadıköy, İstanbul, Türkiye

Eğitim:

2000-2003:	İstanbul Atatürk Fen Lisesi
2003-2010:	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İngilizce Tıp Programı
2011- 2015:	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı
2018-2026:	İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, Doktora Programı

İş Deneyimleri:

2010-2011:	İstanbul Sultanbeyli Sağlık Grup Başkanlığı, Tabip
2011-2015:	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi
2015-2017:	Zonguldak Devrek Devlet Hastanesi, Göz Hastalıları Uzmanı (Mecburi hizmet)
2017- 2018:	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Yard. Doçent Doktor
2018- 2021:	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Doktor Öğretim Üyesi
2021- devam:	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Doçent Doktor

İdari Görevler:

2024-devam:	İMÜ Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları AD Başkanı
2023-devam:	İMÜ Rektörlüğü, Eğitimi İzleme Değerlendirme ve Geliştirme Komisyonu, Üye
2020-devam:	Fakülte yönetim kurulu üyesi
2020-devam:	İMÜ Tıp Fakültesi, Dönem 5 Koordinatör Yardımcısı
2018-2021:	İMÜ Tıp Fakültesi, Cerrahi Bilimler Bölümü, Başkan Yard.
2017-2025:	İMÜ Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Staj Koordinatörü

Google Akademik:

Atıf Sayısı:	1274
H-indeksi:	16
i-10 indeksi:	26

Web of Science:

Atıf Sayısı:	821
H-indeksi:	12

Yabancı Diller:

İngilizce (Çok iyi, 24.12.2016 tarihli e-YDS puanı: 100/100)
Almanca (İyi, 09.07.2017 tarihli YÖK-Dil puanı: 93.75/100)

Uluslararası Mesleki Board Sertifikaları:

2016: European Board of Ophthalmology (FEBO Ünvanı)
2018: International Council of Ophthalmolgy, Basic Science
2019: International Council of Ophthalmolgy, Optics Refraction and Instruments
2019: International Council of Ophthalmolgy, Clinical Science

Uluslararası Araştırma Deneyimleri:

Kurum: Ludwig-Maximilian Üniversitesi, Göz Hastalıkları Kliniği (Münih, Almanya)
Danışmanlar: Prof. Dr. Gerhild Wildner, Prof. Dr. Stephan Thurau
Pozisyon: Gönüllü Stajyer
Süre ve tarih: Üç hafta, Haziran-Temmuz 2009
Proje: Eksperimental otoimmün üveit modeli gelişiminde Th1/Th2 dengesinin rolü

Kurum: Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi, Brigham and Women's Hastanesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı (Boston, USA)
Danışman: Prof. Dr. Mark Feinberg, Dr. Zhouxio Cao
Pozisyon: Maaşlı Stajyer (Brigham and Womens Hastanesi Maaşı ile)
Süre ve tarih: Dokuz hafta, Temmuz-Eylül 2008
Proje: Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerinin farklılaşma ve aktivasyonlarında Krüppel-like faktör 10'un rolü

Kurum: Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi, Brigham and Women's Hastanesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı (Boston, USA)
Danışman: Prof. Dr. Mark Feinberg, Dr. Zhouxio Cao
Pozisyon: Maaşlı Stajyer (Brigham and Womens Hastanesi Maaşı ile)
Süre ve tarih: Sekiz Hafta, Temmuz-Eylül 2007
Danışmanlar: Prof. Dr. Mark Feinberg, Dr. Zhouxio Cao
Proje: Endotelyal progenitör hücre farklılaşması sırasında Krüppel-like faktör grubu transkripsiyon faktörleri ve kardiyovasküler hücre marker ekspresyonlarının analizi
Regülatör T hücrelerinde Krüppel-like faktör ailesine ait transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının incelenmesi

Kurum: Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi, Brigham and Women's Hastanesi, Nöroloji Anabilim Dalı (Boston, USA)
Pozisyon: Burslu Stajyer (Kuchroo Lab Bursu ile)
Süre ve tarih: On iki hafta, Temmuz-Eylül 2006
Danışmanlar: Prof. Dr. Vijay Kuchroo, Dr. Estelle Bettelli
Proje: Experimental otoimmün ensefalomiyelit modelinde patojenik effektör Th17 hücrelerinin farklılaşmalarının tanımlanması

Kurum: Max-Planck Nörobiyoloji Enstitüsü (Münih, Almanya)
Position: Burslu Stajyer (DAAD-Alman Akademik Değişim Servisi Bursu)
Süre ve tarih: On dört hafta, Haziran-Eylül 2005
Danışmanlar: Dr. Andreas Holz, Prof. Dr. Hartmut Wekerle
Proje: T hücre ve B hücre çift trangenik fareler ile spontan optikospinal ensefalomiyelit modeli geliştirilmesi

Akademik İlgi Alanları:

Kornea nakli ve immünolojisi
Oküler inflamasyon, otoimmünite
Behçet Sendromu

Adaptif immün yanıtlar, T hücre biyolojisi
Klinik araştırma metodolojisi
Vasküler inflamasyon, Nöroimmünoloji
Tıpta uzmanlık eğitimi planlaması ve geliştirilmesi

Başarı ve Ödüller:

Mayıs 2025, **"Sağlık Kahramanları Ödülü"**, Uganda Yumbe Valiliği
Kasım 2022, **"Doçent Doktor Kategorisinde Yayın Ödülü"**, İstanbul Medeniyet Üniversitesi
Kasım 2018, **"En İyi Cerrahi Video İkincilik Ödülü"** Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongresi
Haziran 2015, "**İkincilik Ödülü"** Marmara Tıbbi Hizmetleri Geliştirme Ve Yardım Derneği, Bilimsel Araştırma Ödülü Yarışması
Şubat 2011, **"Takdirname"** İstanbul Valiliği
Haziran 2009, **"Eczacıbaşı Tıp Öğrencileri Bilimsel Araştırma Ödülü"**
Mayıs 2008, **"Sözlü Sunum Üçüncülük Ödülü"** İstanbul Medical Faculty International Medical Sciences Student Congress.
Ekim 2007, "**En İyi Bilimsel Araştırma Ödülü "** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Öğrenci Kongresi
Mayıs 2006, "**En İyi Sunum Ödülü"** Hacettepe Üniversitesi Tıp Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresi
Haziran 2005, **"DAAD Yaz Stajı Bursu"** Alman Akademik Değişim Servisi
Haziran 2003, "**ÖSS Sınavında Sıralamada 10.'luk"** (TÜBİTAK Puanı ile), 2003 yılında Cerrahpaşa Tıp Fakültesine En Yüksek Puan ile giren öğrenci ünvanı.
Aralık 2002, **"Bronz Madalya"** TÜBİTAK Biyoloji Olimpiyatı
2002-2003, İki yıl üst üste TÜBİTAK Ulusal Biyoloji Olimpiyat Takımı seçmeleri için eğitim kampına davet edildim.

Desteklenen Deneysel Araştırma Projeleri:

- 2022-2023: TUBITAK Project ID: 122S252 (yardımcı araştırmacı)
- 2018-2021: TUBITAK – Project ID: 118S845 (yardımcı araştırmacı)
- 2019-2020: IMU BAP – Project ID: 1466 (sorumlu araştırmacı)
- 2019-2019: IMU BAP – Project ID: 1603 (sorumlu araştırmacı)
- 2021-2023: IU BAP – Project ID: 37285 (yardımcı araştırmacı)
- 2020-2023: IU BAP – Project ID: 35128 (yardımcı araştırmacı)
- 2019-2021: IU BAP – Project ID: 33335 (yardımcı araştırmacı)
- 2017-2019: IU BAP – Project ID: 20591 (yardımcı araştırmacı)

Üyelikler:

European Society of Cataract and Refractive Surgeons (2020-devam)
International Ocular Inflammation Society (2019-devam)
Türk İmmünoloji Derneği (2018-devam ediyor)
American Academy of Ophthalmology (2015-2018)
International Society for Behçet's Disease (2014- devam ediyor)
Türk Oftalmoloji Derneği (2011- devam ediyor)
Genç Hekim Platformu (2013- devam ediyor)
Genç Hekimler Derneği (2015-devam ediyor)
World Medical Association (Assosiye üye, 2013- devam ediyor)
World Medical Association Junior Doctors Network (2013-2020)
Türk Tabipler Birliği (2012- devam ediyor)
İstanbul Tabip Odası (2012- devam ediyor)
Atatürk Fen Lisesi Mezunları Derneği (2003- devam ediyor)

Editör Kurulu Görevlendirmeleri:

2023-2025: Frontiers in Immunology (SCI-E, Q1), Special Issue Editor
2020-2022: Medeniyet Medical Journal (PubMed/ESCI), Editör Yardımcısı
2020-devam: Medicine (SCI-E) Editör Kurulu Üyesi
2008-2010: Cerrahpaşa Öğrenci Bilimsel Dergisi, Editör
2013-2015: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenci Bilimsel Dergisi, Editör

Mesleki Görevlendirmeler:

Mütevelli Heyeti Üyesi, Türkiye Organ Nakli Vakfı, 2025-devam
İstanbul Delegesi, Türk Oftalmoloji Derneği, 2019-devam
Başkan, Genç Hekimler Derneği/Genç Hekim Platformu, 2016-2019.
Medical Ethics Officer, World Medical Association Junior Doctors Network (WMA/JDN), 2015-2016.
Kurucu, Genel Sekreter, Genç Hekimler Derneği, 2015-2016.
Kurucu, Genel Sekreter, Genç Hekim Platformu, 2013-2016.
WMA Delegasyon Üyesi, 69th World Health Assembly, Cenevre Birleşmiş Milletler Kampüsü, İsviçre, Mayıs 2016
WMA Delegasyon Üyesi, 68th World Health Assembly, Cenevre Birleşmiş Milletler Kampüsü, İsviçre, Mayıs 2015
Genel Sekreter, WMA/JDN Eastern Mediterranean Region Meeting on "Research Training in Postgraduate Medical Education". İstanbul, Türkiye, Kasım 2013
Genel Sekreter, WMA/JDN Eastern Mediterranean Region Meeting on "Healthcare in Danger". İstanbul, Türkiye, Eylül 2013
Bilimsel Editör, International Medical Student Research Congress. Çerrahpaşa, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2009
Başkan Yardımcısı, International Medical Student Research Congress. Cerrahpaşa, Istanbul, Turkey, Mayıs 2007
Danışman Yardımcısı, İmmünoloji çalışma grubu danışmanı, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenci Bilimsel Araştırma Kulübü, 2011-2015

Organizasyonunda Yönetici Olduğum Uluslararası Toplantılar/Kongreler:

Research training in postgraduate medical education, WMA/JDN Eastern Mediterranean Region Meeting. Istanbul, Turkey, Kasım 2015
JDN: Opportunities, projects, and initiatives, WJA/JDN and IFMSA GA Joint Meeting. Antalya, Turkey, Mart, 2015
Healthcare in danger, WMA/JDN Eastern Mediterranean Region Meeting. Istanbul, Turkey, Eylül 2013

Organizasyonunda Yönetici Olduğum Ulusal Kongre/Çalıştaylar:

Hekim Sağlığı ve İyilik Hali Sempozyumu (Uluslararası katılımlı), Acıbadem Tıp Fakültesi Kampüsü, İstanbul, Türkiye, Şubat 2015
Tıpta Uzmanlık Eğitiminde Müfredatlar: TUKMOS ve CanMEDS Karşılaştırmalı İncelemesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kampüsü, İstanbul, Türkiye, Kasım 2014
Tıpta Uzmanlık Eğitimi Problemleri ve Eğitim Planlaması, Meram Tıp Fakültesi Kampüsü, Konya, Türkiye, Nisan 2014
Sağlıkta Hizmetlerinde Kalite ve Uzmanlık Eğitiminin Rolü, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, Türkiye, Mart 2014
Çalışma Saatleri Ve Hekimlerin İyilik Hali Çalıştayı, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kampüsü, İstanbul, Türkiye, Şubat 2014
Tıpta Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliği Çalıştayı. Ramada İstanbul Old City, İstanbul, Türkiye, Eylül 2013
Tıpta Uzmanlık Eğitimi Programları, Tezler, Çalışma Koşulları Ve Asistan Temsiliyeti. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kampüsü, İzmir, Türkiye, Nisan 2013
Asistan Çalışma Şartlarına İlişkin Asistan Görüşleri. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kampüsü, Ankara, Türkiye, Mart 2013

Uzmanlık Eğitiminde Sorunlar Ve Çözüm Önerileri. Meram Tıp Fakültesi Kampüsü, Konya, Türkiye, Mart 2013
Uzmanlık Eğitiminde Standardizasyon Sürecinde Asistan Görüşleri Çalıştayı. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kampüsü, İstanbul, Türkiye, Şubat 2013

Davetli Konuşmalar/Çalıştaylar:

Instrumentation, patient selection and preoperative evaluation, International Transplantation Network / Turkish Ophthalmological Society 2nd Corneal Transplantation Course, TODEM, İstanbul, 06.11.2024
Corneal Transplantation and Donor Selection Criteria, International Transplantation Network & Kazakh Ministry of Health Transplant Coordination Meeting, Hilton Kozyatağ, İstanbul, 16.11.2023
Instrumentation, patient selection and preoperative evaluation, International Transplantation Network / Turkish Ophthalmological Society 1st Corneal Transplantation Course, TODEM, İstanbul, 25.05.2023
Behçet üveiti ve Yönetimi, RADER Güz Atölyesi, Girne, KKTC, 24-26 Eylül 2021
Management of cataract surgery in uveitic patients, World Medicine – Global Eye Event (International Webinar), Irak, 30 Nisan 2019
Sık rastlanılan göz hastalıkları ve tedavileri, 6. Ulusal Aile Hekimliği Kongresi – IKON 2019, Bodrum, Türkiye, 2019
ASM ortamında görme taraması, oftalmoskop kullanımı ve göz dibi muayenesi, 6. Ulusal Aile Hekimliği Kongresi – IKON 2019, Bodrum, Türkiye, 2019
Kornea Nakli, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Organ Nakli Koordinatörleri Sertifikasyon Eğitimi, İstanbul, Mart 2019
Kornea Nakli ve Bağışıklık, Kadıköy Anadolu Lisesi, İstanbul, Türkiye, Aralık 2018
Kontakt lens uygulaması, 10th Academy for Eyecare Excellence. Izmir, Türkiye, Mart 2018
Kontakt lens olgu sunumu, Eye Health Advisor, Istanbul, Türkiye, Nisan 2018
Introduction to World Medical Association Junior Doctors Network, JDS Kuwait Genel Kurulu, Kuveyt, Mayıs 2016
Kontakt lens çalıştayı, 4. Cerrahpaşa Ulusal Bilim Günleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mart 2016
Turkish Young Doctors Platform Experience, JDN Hellas Genel Kurulu, Atina, Yunanistan, Aralık 2015
Medical research ethics and autonomy: challenges for junior doctors, Research training in postgraduate medical education, WMA/JDN Eastern Mediterranean Region Meeting. İstanbul, Türkiye, Eylül 2015
Oftalmoskopi Çalıştayı, 15. MaSCo Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2015
Mezun Oturumu: İstanbul Üniversitesinde Öğrenci Olarak Kazanımlarım, İstanbul Üniversitesi Kariyer Günleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Nisan 2015
Kontakt Lens Çalıştayı, 13. MaSCo Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2013

Öğrenci Kongre Görevleri:

Oturum başkanı/jüri, 8th International Medical Student Research Congress. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2021
Oturum başkanı/jüri, 5. Cerrahpaşa Ulusal Bilim Günleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mart 2020
Oturum başkanı/jüri, 7th International Medical Student Research Congress. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2019
Poster jürisi, 3. İMÜ Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2018

Oturum başkanı, 5. Cerrahpaşa Ulusal Bilim Günleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mart 2018
Oturum başkanı/jüri, 6th International Medical Student Research Congress. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2017
Oturum başkanı, 4. Cerrahpaşa Ulusal Bilim Günleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mart 2016
Oturum başkanı, 5th International Medical Student Research Congress. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2015
Oturum başkanı, 3. Cerrahpaşa Ulusal Bilim Günleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mart 2014
Oturum başkanı, 4th International Medical Student Research Congress. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2013
Oturum başkanı, 2. Cerrahpaşa Ulusal Bilim Günleri, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mart 2012
Oturum başkanı, 3rd International Medical Student Research Congress. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Mayıs 2011

SCI veya SCI-E İndeksli Makaleler:

1. **Esen F**, Kokoglu A, Çetin Ç, Turkyilmaz O, Ceylan NA, Oray M, Direskeneli H, Tugal-Tutkun İ, Gul A, Deniz G, Aktas Çetin E. Adalimumab-induced changes in NK cells phenotype, receptors and functions after clinical remission of Behçet's uveitis. Am J Ophthalmol. 2026 Jan 19:S0002-9394(26)00013-9. doi:10.1016/j.ajo.2026.01.006. Epub ahead of print. PMID:41564966.
2. Baysal B, Dogan MB, Turkyılmaz O, Yuksel Karatoprak E, **Esen F**. Distinctive MRI findings and clinical correlations in pediatric idiopathic intracranial hypertension: optic nerve sheath dilatation and scleral flattening as diagnostic indicators. Acta Radiol. 2025 Nov 21:2841851251395724. doi:10.1177/02841851251395724. Epub ahead of print. PMID:41269882.
3. Mutlu Sönmez M, Beyca CC, Ersoy EE, **Esen F**. Management of functional epiphora with botulinum toxin: a injection after lacrimal surgery. Int Ophthalmol. 2025;46(1):33.
4. Koru L, **Esen F**, Celikel K, Turkyilmaz Ö, Kaya F, Kucuk E, Aydin Z, Dizman EN, Dursun HK, Ozen Balci M, Haslak F, Ozturk K. Anti-Nuclear Antibody Staining Patterns in Juvenile Idiopathic Arthritis: Association of AC-1 Pattern and Elevated Titers with Uveitis. Medeni Med J. 2025;40(3):180-186.
5. Bulut Kızılay E, **Esen F**, Kızılay ME, Direskeneli H, Alibaz-Oner F. Optic Disc and Retinal Structural Changes in Takayasu Arteritis: Implications for Normotensive Glaucoma. Ocul Immunol Inflamm. 2025;33(9):2121-2127.
6. **Esen F**, Turner CT. Editorial: Roles of granzymes in inflammation, aging, and autoimmunity. Front Immunol. 2025;16:1672898.
7. Yilmaz OF, Durmus E, **Esen F**, Bikmazer A, Kisakurek AB, Ersoy EE, Koyuncu O, Gormez V, Oguz H. Does Corneal Tattooing Improve Psychosocial Functioning in Patients With Corneal Leukoma? A Pilot Study. Eye Contact Lens. 2025;51(8):368-373.
8. Demirci M, Ozben B, Karaca S, Sayar N, **Esen F**, Tigen K. Assessment of Cardiac Functions in Patients With Keratoconus Using Two-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography and Three-Dimensional Echocardiography. Echocardiography. 2025;42(6):e70207.
9. Durmuş E, Kose A, Aykut V, Yenerel NM, Oğuz H, **Esen F**. Wound morphologies of sclerotomies closed with scleral massage and scleral needling techniques: A comparative study. Indian J Ophthalmol. 2025;73(6):875-880.
10. **Esen F**, Cikman DI, Engin A, Turna A, Batur S, Oz B, Turna HZ, Deniz G, Aktas Cetin E. Functional and phenotypic changes in natural killer cells expressing immune checkpoint receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, and TIGIT in non-small cell lung cancer:

the comparative analysis of tumor microenvironment, peripheral venous blood, and tumor-draining veins. Immunol Res. 2024;73(1):18.
11. Öcal-Demir S, Kahraman K, Bozbeyoğlu G, **Esen F**. Clinical Presentation of Cat Scratch Disease in Pediatric Patients-A Single-Center Study. Turk Arch Pediatr. 2024;59(6):574-579.
12. Koru L, **Esen F**, Turkyilmaz O, Kucuk E, Kaya F, Aydin Z, Haslak F, Ozturk K. Clinical characteristics of pediatric noninfectious uveitis and risk factors for severe disease: a single-center study. Clin Rheumatol. 2024;43(9):2933-2942.
13. Durmus E, Kunbaz A, Kaya SP, **Esen F**, Oguz H, Aykut V. Autologous-Fibrin Induction: A Novel Approach for Sutureless Sclerotomy Closure in Pars Plana Vitrectomy. Curr Eye Res. 2024;49(12):1308-1312..
14. Kızılay ME, Şengün GD, **Esen F**, Durmuş E, Oğuz H, Aykut V. Factors affecting prognosis and need for anti-vascular endothelial growth factor injections in wet age-related macular degeneration. Int Ophthalmol. 2024 Jul 4;44(1):312. doi:10.1007/s10792-024-03243-1. PMID:38963653.
15. Karakus IS, Catak MC, Frohne A, Bayram Catak F, Yorgun Altunbas M, Babayeva R, Bal SK, Eltan SB, Yalcin Gungoren E, **Esen F**, Zemheri IE, Karakoc-Aydiner E, Ozen A, Caki-Kilic S, Kraakman MJ, Boztug K, Baris S. Rapamycin Controls Lymphoproliferation and Reverses T-Cell Responses in a Patient with a Novel STIM1 Loss-of-Function Deletion. J Clin Immunol. 2024;44(4):94.
16. Sali F, Aykut V, Kunbaz A, Durmus E, Hepokur M, Oguz H, **Esen F**. Endothelial loss following postoperative intracameral triamcinolone acetonide and subconjunctival dexamethasone injections. Cutan Ocul Toxicol. 2023;42(4):237-242.
17. Cikman DI, **Esen F**, Engin A, Turna A, Agkoc M, Yilmaz A, Saglam OF, Deniz G, Aktas EC. Mediastinal lymph node removal modulates natural killer cell exhaustion in patients with non-small cell lung cancer. Immunol Res. 2023;71(6):959-971.
18. Engin A, Turna A, **Esen F**, et al. Mediastinal lymph node removal ameliorates cytotoxic T-lymphocyte functions in patients with non-small cell lung cancer. Tumori. 2023;109(1):97-104.
19. Hepokur M, Gunes M, Durmus E, Aykut V, **Esen F**, Oguz H. Long-term follow-up of choroidal changes following COVID-19 infection: analysis of choroidal thickness and choroidal vascularity index. Can J Ophthalmol. 2023;58(1):59-65.
20. Hepokur M, Ersoy EE, Kısakürek B, Sali F, Durmus E, Aykut V, Oguz H, **Esen F**. Optical coherence tomography and Scheimpflug imaging of the iridocorneal angle following intravitreal injection of different medications: A longitudinal analysis [published online ahead of print, 2023 Feb 3]. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2023;41:103319.
21. Genç S, Cakir H, Baykara M, **Esen F**. Transconjunctival sutureless intrascleral fixation of 3-piece intraocular lenses using a curved needle. J Cataract Refract Surg. 2022;48(8):969-970.
22. Aykut V, Ucar IC, Akkaya Turhan S, Ucar T, Durmus E, Oguz H, **Esen F**, Erol B. Corneal Sensation and Nerve Fiber Changes in Patients With Interstitial Cystitis. Cornea. 2022;41(6):729-733.
23. Durmus E, Aykut V, Karagoz I, Hepokur M, Turkyilmaz O, Savran Elibol E, **Esen F**, Oguz H. A Novel Use of Retinoscopy for the Evaluation of Binocular Balance of Spherical Refractive Errors. Semin Ophthalmol. 2022;37(2):222-226.
24. **Esen F**, Deniz G, Aktas EC. PD-1, CTLA-4, LAG-3, and TIGIT: The roles of immune checkpoint receptors on the regulation of human NK cell phenotype and functions. Immunol Lett. 2021;240:15-23. doi:10.1016/j.imlet.2021.09.009
25. Aykut V, Ucar IC, Akkaya Turhan S, Ucar T, Durmus E, Oguz H, **Esen F**, Erol B. Corneal Sensation and Nerve Fiber Changes in Patients With Interstitial Cystitis. Cornea. 2021 Oct 23. doi: 10.1097/ICO.0000000000002887. Online ahead of print.

26. Uçar IÇ, **Esen F**, Turhan SA, Oguz H, Ulasoglu HC, Aykut V. Corneal neuropathic pain in irritable bowel syndrome: clinical findings and in vivo corneal confocal microscopy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2021;259(10):3011-3017.A
27. Durmus E, **Esen F**, Yenerel M, Sanisoglu H, Oguz H. Clinical outcome and endothelial loss following prepupillary and retropupillary implantation of iris claw intraocular lenses. Int Ophthalmol. 2021;41(12):3961-3969.
28. Hepokur M, Gunes M, Durmus E, Aykut V, **Esen F**, Oguz H. Long-term follow-up of choroidal changes following COVID-19 infection: analysis of choroidal thickness and choroidal vascularity index. Can J Ophthalmol. 2021: S0008-4182(21)00246-5.
29. Durmus E, Aykut V, Karagoz I, Hepokur M, Turkyilmaz O, Savran Elibol E, **Esen F**, Oguz H. A Novel Use of Retinoscopy for the Evaluation of Binocular Balance of Spherical Refractive Errors. Semin Ophthalmol. 2021 41:3961–3969
30. Engin A, Turna A, **Esen F**, Agkoc M, Cikman DI, Saglam OF, Deniz G, Aktas EC. Mediastinal lymph node removal ameliorates cytotoxic T-lymphocyte functions in patients with non-small cell lung cancer. Tumori. 2021 Dec 17:3008916211064643. Doi 10.1177/03008916211064643. Online ahead of print. PMID: 34918599
31. Aykut V, **Esen F**, Sali F, Oguz H. Refractive outcome of trocar-assisted sutureless scleral fixation with 3-piece intraocular lenses. Int Ophthalmol. 2021; 41(8):2689-2694
32. Ozcelik Kose A, **Esen F**, Imamoglu S, Ercalik NY, Tekcan H, Kugu S. Effects of Ab Interno XEN Gel Implantation on Postural Intraocular Pressure Elevations. Semin Ophthalmol. 2021;36(3):82-87.
33. Kucuksezer UC, Aktas Cetin E, **Esen F**, Tahrali I, Akdeniz N, Gelmez MY, Deniz G. The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2021;12:622306
34. Genç S, **Esen F**. Knot-free suture scleral fixation of dislocated intraocular lenses: the clinical results of a novel surgical technique. J Cataract Refract Surg. 2021; 47(7):898-901
35. Hanege FM, Kocoglu E, Kalcioglu MT, Celik S, Cag Y, **Esen F**, Bayindir E, Pence S, Alp Mese E, Agalar C. SARS-CoV-2 Presence in the Saliva, Tears, and Cerumen of COVID-19 Patients. Laryngoscope. 2021;131(5):E1677-E1682.
36. Mangan MS, **Esen F**. Double-Organ Bias in Controlled Trials on Eyelid Ptosis. Ophthalmic Plast Reconstr Surg. 2021;37(4):381-384.
37. Genc S, **Esen F**, Guler E, Çakir H. A theoretical model for graft punch size calculations to prevent Descemet's membrane folds following deep anterior lamellar keratoplasty. Arq Bras Oftalmol. 2020;83(5):366-371
38. **Esen F**, Eraslan M, Cerman E, Celiker H, Kazokoglu H. Diurnal Spikes of Intraocular Pressure in Uveitic Glaucoma: A 24-hour Intraocular Pressure Monitoring Study. Semin Ophthalmol. 2020;35(4):246-251.
39. Yildiz Balci S, Turan-Vural E, Turkyilmaz O, **Esen F**, Aksaray S. Complete blood count parameters and neutrophil-to-lymphocyte ratio values as markers for differentiation between systemic infectious and non-infectious uveitis. Int Ophthalmol. 2020;40(11):3033-3041
40. Kucukkomurcu E, Unal AU, **Esen F**, Ozen G, Direskeneli H, Kazokoglu H. Ocular Posterior Segment Involvement in Patients with Antiphospholipid Syndrome and Systemic Lupus Erythematosus. Ocul Immunol Inflamm. 2020;28(1):86-91.
41. Genc S, **Esen F**, Guler E, Çakir H. A theoretical model for graft punch size calculations to prevent Descemet's membrane folds following deep anterior lamellar keratoplasty. Arq Bras Oftalmol. 2020;83(5):366-371.
42. Celik S, Kalcioglu MT, Esen F, Hanege FM, Cag Y, Kocoglu E. SARS-CoV-2 Presence in Cerumen. Ear Nose Throat J. 2021;100(2suppl):158S-159S.
43. **Esen F**, Ergelen R, Alibaz-Öner F, Çelik G, Direskeneli H, Kazokoğlu H. Ocular findings and blood flow in patients with Takayasu arteritis: a cross- sectional study. Br J Ophthalmol. 2019;103(7):928-932.

44. Genc S, Tulu Aygun B, **Esen F**, Yildirim Y, Agca A. Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty with Split Corneal Grafts: The Influence of Tamponade Material and Endothelial Storage Time. Semin Ophthalmol. 2019;34(6):458-463.
45. **Esen F**, Erdagi-Bulut A, Toker E. Efficacy and safety of low concentration, bisulfite-containing, intracameral epinephrine and topical atropine treatments for t the prevention of intraoperative floppy iris syndrome. Cutan Ocul Toxicol. 2018; 37(3):286-290.
46. Aykut V, Elbay A, Uçar IÇ, **Esen F**, Karadag R, Oguz H. Corneal sensitivity and subjective complaints of pain in patients with fibromyalgia. Eye. 2018; 32(4):763-767
47. Aykut V, Elbay A, **Esen F**, Kocaman G, Savran Elibol E, Oguz H. Patterns of Altered Corneal Sensation in Patients With Chronic Migraine. Eye Contact Lens. 2018 Nov;44 Suppl 2:S400-S403.
48. **Esen F**, Toker E. Influence of Apical Clearance on Mini-Scleral Lens Settling, Clinical Performance, and Corneal Thickness Changes. Eye Contact Lens. 2017; 43(4):230-235.
49. **Esen F**, Alhan E, Kuru O, Sahin O. Safety Assessment and Power Analyses in Published Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Randomized Controlled Trials. Am J Ophthalmol. 2016; 169:68-72.
50. Çekiç O, Biberoglu E, **Esen F**. Peripapillary retinal leukemic infiltration associated with papilledema in a T-ALL patient without cranial or optic nerve involvement. Tumori. 2016 11:102 (Suppl. 2).
51. **Esen F**, Köstek M, Emekli AS, Eraslan M. Double-Organ Bias in Published Randomized Controlled Trials of Glaucoma. J Glaucoma. 2016; 25(6):520-2.
52. Karabas L, **Esen F**, Sahin O. Comment on bilateral same-session intravitreal injections. Int J Ophthalmol. 2015; 8(4):852-3
53. Karabas L, **Esen F**, Celiker H, Elcioglu N, Cerman E, Eraslan M, Kazokoglu H, Sahin O. Decreased subfoveal choroidal thickness and failure of emmetropisation in patients with oculocutaneous albinism. Br J Ophthalmol. 2014; 98(8):1087-90
54. Karabas L, **Esen F**, Celiker H, Elcioglu N, Cerman E, Eraslan M, Kazokoglu H, Sahin O. Authors' response: evaluation of choroidal thickness among patients with oculocutaneous albinism. Br J Ophthalmol. 2014; 98(8):1135-6.
55. Cerman E, **Esen F**, Eraslan M, Kazokoglu H. Orbital myositis associated with celiac disease. Int Ophthalmol. 2014; 34(3):635-8
56. Yazici H, Gogus F, **Esen F**, Yazici Y. There was less self-critique among basic than in clinical science articles in three rheumatology journals. J Clin Epidemiol. 2014; 67(6):654-7.
57. Seymen P, Aytac E, **Esen F**, Tel C, Demir F, Genc H, Uzun H, Oz B, Altug T, Seymen HO. Darbepoetin alpha ameliorates neuronal damage in a rat model of acute ethanol intoxication. Int J Neurosci. 2013; 123(2):99-103.
58. Wara AK, Croce K, Foo S, Sun X, Icli B, Tesmenitsky Y, **Esen F**, Rosenzweig A, Feinberg MW. Bone marrow-derived CMPs and GMPs represent highly functional proangiogenic cells: implications for ischemic cardiovascular disease. Blood. 2011; 118(24):6461-4.
59. Wara AK, Foo S, Croce K, Sun X, Icli B, Tesmenitsky Y, **Esen F**, Lee JS, Subramaniam M, Spelsberg TC, Lev EI, Leshem-Lev D, Pande RL, Creager MA, Rosenzweig A, Feinberg MW. TGF-β1 signaling and Krüppel-like factor 10 regulate bone marrow-derived proangiogenic cell differentiation, function, and neovascularization. Blood. 2011; 8:118(24):6450-60.
60. **Esen F**, Schimmel EK, Yazici H, Yazici Y: An audit of Behcet's Syndrome research. J Rheumatol. 2011;38(1):99-103
61. Soyucen E, **Esen F**: Benign joint hypermobility syndrome: A cause of childhood asthma? Med Hypotheses. 2010; 74:823-24.
62. **Esen F**, Celik A, Yazici H: A survey of the use of diseased control groups in genetic association studies. Clin Exp Rheumatol. 2009; 27 (Suppl. 53): S4-S5.
63. Cao Z, Wara AK, Icli B, Sun X, Packard RR, **Esen F**, Stapleton CJ, Subramaniam M, Kretschmer K, Apostolou I, von Boehmer H, Hansson GK, Spelsberg TC, Libby P,

Feinberg MW. Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor-beta1 to regulate CD4(+)CD25(-) T cells and T regulatory cells. J Biol Chem. 2009; 284(37): 24914-24.
64. Yazici H, **Esen F**: Mortality in Behcet's Syndrome. Clin Exp Rheumatol. 2008; 26 (Suppl. 51): S138-S140.
65. Altintas A, **Esen F**: Immunopathogenesis of multiple sclerosis. Archives of Neuropsychiatry 2008; 45 Supplement: 10-4.

ULAKBİM İndeksli Dergi Makaleleri:

1. Durmus E, Aykut V, Hepokur M, Sali F, Sanisoglu HA, Oguz H, **Esen F**. Visual Outcomes, Endothelial Loss, and Complications Following Iris-Claw Intraocular Lens Implantation and Trocar-Assisted Sutureless Scleral Fixation of Intraocular Lenses. Beyoglu Eye J. 2023;8(4):253-259. (PubMed)
2. Hepokur M, Kizilay EB, Durmus E, Aykut V, **Esen F**, Oguz H. The influence of corneal incision size on endothelial cell loss and surgically induced astigmatism following phacoemulsification cataract surgery. North Clin Istanb. 2022;9(4):385-390. (Web of Science, ESCI)
3. **Esen F**, Türkyılmaz Ö, Aykut V, Direskeneli H, Deniz G, Oğuz H, Çetin E. Influence of Interferon alpha-2a Treatment on Monocyte Subsets in Patients with Uveitis. Turk J Immunol 2020; 8(2):50−56. (Web of Science, ESCI)
4. Genç S, Yidiz Kepez B, **Esen F**, Hassan IA, Adan IAK, Salkaci O, Çakir H. Dirençli kornea ülser tedavisinde 360 derece konjonktiva tenon kompleksi ile örtme tedavisi. MN Oftalmoloji. 2020
5. Genç S, Senel Kukner A, Yucel O, Tozkoparan S, **Esen F**. Combined Intracapsular Lens Removal and Scleral Fixation of Intraocular Lenses Through the Same Scleral Tunnel in Cases with Severely Dislocated Lenses. Beyoglu Eye J. 2020; 5(3):223-227. (PubMed)
6. Aykut V, **Esen F**, Oguz H. A novel, low-cost and practical illumination approach for bimanual vitrectomy. North Clin Istanb. 2020;7(3):275-279. (Web of Science, ESCI)
7. Aykut V, **Esen F**, Oguz H. Intraocular Pressure Changes After Pars Plana Vitrectomy for Rhegmatogenous Retinal Detachment. Ret-Vit 2020; 29: 15-19.
8. Genc S, Guler E, Cakir H, Salkaci O, **Esen F**. Hypotony Maculopathy After Trabeculectomy in a Patient With GAPO Syndrome. Beyoglu Eye J. 2019; 4(1):51-53.
9. Oguz H, **Esen F.** Glokomun teşhis ve takibinde görme alanı. Turkiye Klinikleri J Ophthalmol-Special Topics 2018;11(1):38-47.
10. Celiker H, **Esen F**, Sahin O. Adjuvant Therapies for Diabetic Retinopathy Patients Undergoing Cataract Surgery: a Summary of Current Evidence. Glo-Kat 2018; 13: 204-209
11. Eraslan M, **Esen F**, Hacıağaoğlu S, Cerman E, Celiker H, Kazokoglu H: Üveitik Glokomda Koroid Kalınlıkları İncelemesi: Arttırılmış Derinlik Görüntüleme Optik Koherens Tomografi Çalışması. Journal of Glaucoma Cataract. 2017; 12:51-55.
12. Genç S, **Esen F**, Güler E, Çakır H. Blue ring technique for clearer visualization of incision line during corneal transplantation. Beyoglu Eye J. 2017; 2(3):101-103.
13. Tavsanli ME, **Esen F**, Ozpinar E, Yanik ER, Altintas A: Immunity of the central and peripheral nervous system. Turk J Immunol. 2010; 15(1):1-6. (Web of Science, ESCI)
14. Altintas A, Tavsanli ME, **Esen F**: Immune properties of central and peripheral nervous system and the blood-brain barrier. Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics. 2009; 2(4):1-7.

Diğer Yayınlar:

1. Karadag R, Aykut V, **Esen F**, Oguz H, Demirok A. Descemet's membrane endothelial keratoplasty in aphakic and vitrectomized eye. GMS Ophthalmol Cases. 2020;10:Doc02. doi: 10.3205/oc000129. (PubMed Endeksli)

2. Tourneur I, Walker X, Wiley E, Mattar C, **Esen F**, Mijaljica G, Roditis K, Louis K, Murt A, Hornung T: Health and Asylum Seekers in Europe. World Medical Journal. 2015; 61(3):89-97**.**
3. Mattar C, Runyan A, Tun W, **Esen F**, Wiley E, Pereira I. Junior doctor's work hours: from regulations to reality. World Medical Journal. 2015; 60(3):98-99.

Uluslararası Kongre Bildirileri:

1. Durmuş E, Aykut V, **Esen F**, Hepokur M, Sali F, Oğuz H. A comparison of trocar-assisted sutureless scleral fixation and iris claw intraocular lens implantation in aphakia. 39. ESCRS Kongresi, Amsterdam, Hollanda, 8 - 11 Ekim 2021.
2. **Esen F**, Güneş M, Türkyılmaz Ö, Aykut V, Durmuş E, Hepokur M, Oğuz H. Clinical outcomes of uveitic cataract surgeries in the era of biologics. 39. ESCRS Kongresi, Amsterdam, Hollanda, 8 - 11 Ekim 2021.
3. Aykut V, **Esen F**, Sali F, Durmuş E, Hepokur M, Oğuz H. Intracameral use of triamcinolone acetonide increases endothelial cell loss following phacoemulsification cataract surgery combined with pars plana vitrectomy. 39. ESCRS Kongresi, Amsterdam, Hollanda, 8 Ekim - 11 Kasım 2021.
4. **Esen F**, Aykut V, Türkyılmaz Ö, Deniz G, Oğuz H, Direskeneli RH, Çetin E. The influence of interferon-alpha treatment on natural killer cell subsets and natural killer T cells in patients with uveitis. World Immune Regulation Meeting XIV 2020, 4 - 07 Ekim 2020.
5. **Esen F**, Aykut V, Sali F, Oğuz H. Refractive outcome of trocar-assisted sutureless scleral fixation of 3-piece intraocular lenses. 38TH Congress of ESCRS, Amsterdam, Netherlands, 2020 (On-line, Sözlü Sunum)
6. **Esen F**, Turkyilmaz O, Aykut V, Deniz G, Oguz H, Direskeneli H, Aktas Cetin E. The Influence of interferon-alpha treatment on natural killer cell subsets and natural killer T cells in patients with uveitis. World Immune Regulation Meeting-XIV Virtual congress, 04-07 October 2020, P28(Poster presentation).
7. **Esen F**, Turna A, Engin A, Yılmaz A, Oz B, Batur S, Deniz G, Aktaş Çetin E. Tumor associated changes in natural killer cells. Immune Regulation Meeting-XIV Virtual Congress, 04-07 October 2020, P62(Poster presentation), Davos, Switzerland.
8. **Esen F**, Turkyılmaz O, Aykut V, Deniz G, Oğuz H, Direskeneli H, Cetin E. Lymphocyte subsets and immune checkpoint receptors after interferon-alpha treatment: a preliminary study. 15th International Ocular Inflammation Society Congress, Kaohsiung, Taiwan, 2019
9. **Esen F**, Genc S, Onder S, Karadag R, Aykut V, Demirok A, Taskapili M, Deniz G, Oguz H, Aktas Cetin E. Rejection in an immune privileged tissue: characteristics of immune checkpoints and lymphocyte subsets in corneal rejection, International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress IV, Bursa, Turkey, 2019 (sözlü sunum)
10. **Esen F**, Genc S, Aykut V, Karadag R, Deniz G, Oguz H, Cetin E. Corneal infiltrating natural killer cell phenotypes in corneal rejection. 23rd ESCRS Winter Meeting, Athens, Greece, 2019 (sözlü sunum).
11. Karag R, Kilic G, **Esen F**, Aykut A, Demirok A, Oguz H. Long-term results of ExPRESS glaucoma shunt surgery. 23rd ESCRS Winter Meeting, Athens, Greece, 2019 (poster sunumu).
12. Karag R, Aykut A, **Esen F**, Oguz H, Demirok A. New approach: Descemet's membrane endothelial keratoplasty in aphakic and vitrectomized eye. 23rd ESCRS Winter Meeting, Athens, Greece, 2019 (poster sunumu).
13. **Esen F**, Genc S, Aygun Tulu B. The influence of endothelial waiting time on the success of Descemet's membrane endothelial keratoplasty with split corneal grafts. 32eme Congres National de la SMO, Marrakech, Morocco, 2019 (sözlü sunum)

14. Genc S, **Esen F**, Zakariyya A. Procedure quintet; Phaco + Capsular tension ring + IOL+ Iridotomy + DMEK. 32eme Congres National de la SMO, Marrakech, Morocco, 2019 (sözlü sunum)
15. Genc S, **Esen F**, Aygun Tulu B, Zakariyya A, Cakir H. Préparation de la Membrane du Descemet (MD) et réalisation d'une DMEK (Descemet membrane endothelial keratoplasty). 32eme Congres National de la SMO, Marrakech, Morocco, 2019 (video sunumu)
16. Uçar Ç, Aykut V, **Esen F**, Oğuz H. Ocular surface findings and corneal sensation in irritable bowel syndrome. 17th Meeting of Black See Ophthalmological Society, İstanbul, Turkey, 2019 (Sözlü Sunum)
17. Aktas Cetin E, Turna A, **Esen F**, Engin A, Deniz G. Immunoscoring of early stage non-small cell lung cancer; determination of suppressor and cytotoxic lymphocyte populations and their cytotoxic mechanisms**,** International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress IV, Bursa, Turkey, 2019 (poster sunumu)
18. Aktas Cetin E, Turna A, **Esen F**, Engin A, Agkoc M, Deniz G. Mediastinal lymph node removal improves natural killer cell dysfunction in non-small cell lung cancer, International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress IV, Bursa, Turkey, 2019 (poster sunumu)
19. **Esen F**, Turkyilmaz O, Oguz H. Optic neuritis associated with cat scratch disease. 16th International Internal medicine training meetings, Buchrest, Rumania, 2019 (poster sunumu)
20. **Esen F**, Turkyilmaz O. Anti Tumor Necrosis Alpha Therapy in The Management of Refractory Pediatric Behçet's Uveitis. International Congress on Behçet's Disease, Rotterdam, Netherlands, 2018 (poster sunumu)
21. **Esen F,** Cetin Aktas E, Genc S, Deniz G, Taskapili M, Oguz H. Corneal infiltrating lymphocytes in corneal rejection: pilot study. 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, Netherlands, 2018 (poster sunumu)
22. Cetin Aktas E, Turna A, **Esen F**, Engin A, Agkoc A, Deniz G. Reduced DNAM expression and impaired function of cytokine-secreting and cytotoxic NK cells in tumor draining lymph nodes in non small cell lung cancer. 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, Netherlands, 2018 (poster sunumu)
23. Genc S, **Esen F**. The experience of corneal transplantation center in Turkey: Clinical characteristics and preferred surgical methods. International Transplant Network Congress, Antalya, Turkey, 2018 (sözlü sunum)
24. Eraslan M, **Esen F**, Çerman E, Kazokoglu H, Celiker H. Intraocular pressure is increased significantly more during outside of office hours in uveitic glaucoma. 9th International Symposium on Uveitis, Dublin, Ireland, 2016 (sözlü sunum)
25. **Esen F**. Prevalence of Behçets uveitis and other uveitic conditions in secondary eye care: A preliminary study. 17th International Conference on Behçet's Disease. Matera, Italy, 2016 (poster sunumu)
26. *Kucukkomurcu E**,** Unal AU**,** **Esen F**, Ozen G, Direskeneli H, Kazokoglu MH. Ocular Posterior Segment Findings in Antiphospholipid Syndrome. Annual European Congress of Rheumatology European League Against Rheumatism, Londra, Birleşik Krallık, 2016* (poster sunumu)
27. **Esen F**, Cekic O, Kucukkomurcu E, Eraslan M. Long-term Intraocular Pressure Alterations after Diabetic Vitrectomy. World Glaucoma Congress, Hong Kong 2015 (poster sunumu)
28. Eraslan M, **Esen F**, Çeliker H, Çerman E, Kazokoglu H. Continuous 24-hour introcular pressure monitoring in uveitic glaucoma. World Glaucoma Congress, Hong Kong 2015 (poster sunumu)
29. **Esen F**, Kucukkomurcu E, Er A, Akkaya Turhan S, Toker E. Methodological limitations in published multifocal intraocular lens randomized controlled trials. European Society of Cataract and Refractive Surgery Winter Meeting, Istanbul, Turkey 2015 (sözlü sunum)

30. **Esen F**, Erdagi-Bulut A, Toker E. Topical 1% atropine and intracameral epinephrine 1:8000 reduces the incidence of intraoperative floppy iris syndrome. European Society of Cataract and Refractive Surgery Winter Meeting, Istanbul, Turkey 2015 (sözlü sunum)
31. **Esen F**, Eyvaz E, Seferoglu OB, Toker E. A comparison of clinical performance and short-term settling of two mini-scleral lens designs. 45th European Contact Lens Society of Ophthalmologists Congress. Izmir, Turkey 2015 (sözlü sunum)
32. ***Esen F**, Kazokoglu H, Alibaz-Oner F, Celik G, Celiker H, Direskeneli H.* Visual Prognosis Following Cerebral Sinus Thrombosis in Behcet's Syndrome. 16th International Conference on Behçet's Disease. Paris, France 2014 (poster sunumu)
33. *Toker E, **Esen F**, Ozaslan D. Mini-scleral contact lenses:* Settling, apical clearance and corneal thickness changes after 8 hours of wear. 44th European Contact Lens Society of Ophthalmologists Congress. Dubrovnik, Croatia 2014 (sözlü sunum)
34. ***Esen F**, Kostek M, Emekli AS, Eraslan M: Double organ bias in the randomized controlled trials of glaucoma. 11th European Glaucoma Society Congress. Nice, France. 2014* (poster sunumu)
35. ***Esen F**, Celiker H, Alhan O, Kuru P, Sahin O: Lack of basic epidemiological data and power calculations in published Anti-VEGF randomized controlled trials. 12th MediterRetina Club. Istanbul, Turkey. 2014* (sözlü sunum)
36. ***Esen F,** Biberoglu E, Cekic O:* Complete spontaneous resolution of dense sub-inner limiting membrane macular hemorrhage in a patient with acute myeloid leukemia. *12th MediterRetina Club. Istanbul, Turkey. 2014* (poster sunumu)
37. *Biberoglu E, Cekic O, **Esen F:*** Peripapillary retinal leukemic infiltration associated with bilateral papilledema in an acute lymphoblastic leukemia patient without cranial or optic nerve involvement. *12th MediterRetina Club. Istanbul, Turkey. 2014* (poster sunumu)
38. ***Esen F**, Kazokoglu H, Alibaz-Oner F, Direskeneli H: Ocular findings in Takayasu's Arteritis is milder in a Turkish series. 12th International Ocular Inflammation Society Congress. Valencia, Spain. 2014* (poster sunumu)
39. ***Esen F**, Yazici H: Double organ bias in the randomized controlled trials of uveitis. 8th International Symposium on Uveitis. Halkidiki, Greece. 2012* (sözlü sunum)
40. *Cerman E, **Esen F**. Orbital varix presenting with glaucoma. The 4th World Congress on Controversies in Opthalmaology. Istanbul, Turkey. 2012* (poster sunumu)
41. *Cerman E, **Esen F**. Orbital myositis associated with coeliac disease. The 16th Afro Asian Congress of Ophthalmology. Istanbul, Turkey. 2012* (poster sunumu)
42. ***Esen F**, Yenice O, Elcioglu N. Subfoveal choroidal thickness is decreased in patients with oculocutaneus albinism. The 16th Afro Asian Congress of Ophthalmology. Istanbul, Turkey. 2012* (sözlü sunum)
43. *Tascilar K, Atac E, **Esen F**, Yazici* H. **[SAT0466] The "Table1 P value' 'issue; baseline group comparision is inappropriately omitted in non-randomised studies.** Ann Rheum Dis 2012;71(Suppl3):630 (European League Against Rheumatism, Berlin 2012) (poster sunumu)
44. *Tascilar K, Melikoglu M, Atac E, **Esen F**, Yazici* H. **[AB0982]** Uveitis and vascular involvement in Behcet's Syndrome. Ann Rheum Dis 2011;70(Suppl3):743 (European League Against Rheumatism, London 2011) (poster sunumu)
45. *Tascilar K, Atac E, **Esen F**, Yazici* H. **[0466] The "Table1 P value' 'issue; baseline group comparision is inappropriately omitted in non-randomised studies.** American Collage of Rheumatology Meeting, Chicago, 2011 (poster sunumu)
46. **Esen F**, Schimmel EK, Yazici H, Yazici Y. **[FRI0488]** An audit of Behcet's Syndrome research: A 10-year survey. Ann Rheum Dis 2010;69(Suppl3):475 (European League Against Rheumatism, Rome 2010) (poster sunumu)
47. Wara A, Foo S, Icli B, Cao Z, **Esen F**, Subramaniam M, Spelsberg TC, Rosenzweig A, Feinberg MW: Abstract 5685: TGF-beta Signaling and Kruppel-like Factor 10 Regulate Bone Marrow-derived EPC Differentiation, Function, and Neovascularization.

Circulation. 2009; 120:S1140. (American Heart Association, Orlando, FL 2009) (poster sunumu)

48. **Esen F**, Yazici H: **[AB1022] A Survey of the use of diseased control groups in genentic association studies.** Ann Rheum Dis 2008; 67(Suppl II):647. (European League Against Rheumatism, Paris 2008) (poster sunumu)

Ulusal Kongre Bildirileri:

1. Hepokur M, Güneş M, Durmuş E, Aykut V, **Esen F**, Oğuz H. COVID-19 enfeksiyonu sonrası koroid değişikliklerinin uzun süreli takibi: koroid kalınlığı ve koroid vaskülarite indeksi analizi. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
2. Davas M, Türkyılmaz Ö, Oğuz H, Aykut V, **Esen F**, Hepokur M, Durmuş E. Impending Santral Retinal Ven Oklüzyonu. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
3. Aykut V, Sali F, **Esen F**, Oğuz H. Pars plana vitrektomiPars Plana Vitrektomi ile Kombine Katarakt Cerrahisinden Sonra Ön Kamaraya Triamsinolon Asetonid Verilmesinin Kornea Endoteli Üzerine Etkileri. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
4. Davas M, Durmuş E, Oğuz H, Aykut V, **Esen F**, Hepokur M. Bone wax alerjisi. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
5. Ersoy EE, Durmuş E, Aykut V, **Esen F**, Hepokur M, Oğuz H. Silikon Yağının Çıkarılmasını Takiben Steril Endoftalmi ve Retrolental Fibrin Plak Oluşumu. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
6. Durmuş E, **Esen F**, Aykut V, Sanisoğlu H, Hepokur M, Sali F, Oğuz H. Trokar Yardımlı Sütürsüz Skleral Fiksasyon ile İris Kıskaçlı Sekonder Göz içi Lens İmplantasyonun Klinik Sonuçlarının Karşılaştırılması. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
7. Güneş M, Aykut V, Türkyılmaz Ö, Durmuş E, **Esen F**, Oğuz H. Üveit lokalizasyonuna göre arka vitre dekolmanı dinamikleri ve vitreomaküler ara yüzey patolojilerinin değerlendirilmesi. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
8. Kızılay ME, Durmuş E, **Esen F**, Oğuz H, Aykut V. Daha Önce Tedavi Almamış Yaş Tip Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu Hastalarında Enjeksiyon Sayısı ve Görme Değişime Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi: Mikronütrisyon, Cinsiyet, Hormon Replasman Tedavisi ve Yaşam Tarzı Değişiklikleri. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
9. Fincan M, Türkyılmaz Ö, Aykut V, **Esen F**, Oğuz H. Çoklu besin desteği kullanımı ile ilişkili sekonder otoimmün hemolitik anemi ve eksudatif retina dekolmanı. TOD 55. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 3 - 07 Kasım 2021.
10. Uçar İ. Ç. , Aykut V, **Esen F**, Akkaya Turhan S, Ulaşoğlu H. C. , Oğuz H. Irritabl Bağırsak Sendromunda Korneal Subbazal Sinir Pleksusu Değişiklikleri Ve Oküler Yüzey Bulguları. TOD 2020 Sanal Ulusal Kongresi Ve Canlı Cerrahi Birleşik Toplantısı, 09 Aralık 2020 - 13 Ocak 2021.
11. Durmuş E, Kutlutürk I, Aykut V, **Esen F**, Oğuz H. Skiaskopinin Binoküler Denge Testi İçin Yeni Bir Kullanım Yöntemi. TOD 2020 Sanal Ulusal Kongresi Ve Canlı Cerrahi Birleşik Toplantısı, 9 - 13 Aralık 2020.
12. **Esen F**, Çetin E, Genç S, Önder S, Aykut V, Taşkapılı M, Deniz G, Oğuz H. Kornea rejeksiyonunda dokudaki ve aköz humordaki immünolojik değişikliklerin deteylı incelenmesi: İmmünohistokimya, flow sitometri ve solubil reseptörler. TOD 2020 Sanal Ulusal Kongresi Ve Canlı Birleşik Toplantısı, 9 - 13 Aralık 2020, ss.1
13. Aykut V, **Esen F**, Türkyılmaz Ö, Deniz G, Direskeneli R. H. , Oğuz H, Çetin E. Üveit hastalarında interferon alfa-2 tedavisinin monosit alt grupları ve nötrofiller üzerine etkileri. TOD 2020 Sanal Ulusal Kongresi Ve Canlı Cerrahi Birleşik Toplantısı, 09 Aralık 2020 - 13 Ocak 2021.

14. **Esen F**, Türkyılmaz Ö, Aykut V, Deniz G, Oğuz H, Direskeneli R. H. , Çetin E. Üveit hastalarında ınterferon-alfatedavısının nkt ve nk hücrealt gruplarına etkisi. 25. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20 - 22 Kasım 2020, ss.1
15. **Esen F**, Aykut V, Sali F, Oğuz H. Refractive outcome of trocar-assisted sutureless scleral fixation of 3-piece intraocular lenses. 38th ESCRS Congress of the ESCRS, 2 - 04 Ekim 2020.
16. Aykut V, **Esen F**. İnterstisyel Sistit Hastalarında Kuru Göz Bulguların Değerlendirilmesi. Uluslararası Sağlık Bilimlerinde Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 3 - 06 Haziran 2020.
17. A
18. **Esen F**, Bulut Kızılay E, Alibaz Öner F, Türkyılmaz Ö, Aykut V, Kazokoğlu H, Oğuz H, Direskeneli H. [UB-SS-14] Takayasu Arteritinde Göz Bulgularının Uzun Dönem Takibi: Ön Sonuçlar. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
19. Aktaş Çetin E, **Esen F**, Türkyılmaz Ö, Aykut V, Deniz G, Direskeneli H, Oğuz H. [UB-SS-05] İnterferon-alfa tedavisi alan üveit hastalarında doğal öldürücü hücre alt grupları ve immün kontrol noktası reseptör ekspresyonlarının incelenmesi: ön sonuçlar. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
20. Türkyılmaz Ö, Balcı S, **Esen F**, Turan Vural E. [UB-SS-12] Enfeksiyöz ve Nonenfeksiyöz Üveitlerde İlk Akut Üveit Atağında Nötrofil/Lenfosit ve Trombosit/Lenfosit Oranlarının Değerlendirilmesi. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
21. Çakır H, Genç S, **Esen F**. [KRC-SS-11] Psödofakik Hastalarda Sublukse Lensin Dışarı Alınmadan Skleraya Fikasasyonu İle İlgili Farklı Bir Cerrahi Yaklaşım. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
22. **Esen F**, Türkyılmaz Ö, Hepokur M, Aykut V, Oğuz H. [PS-846] Behçet Hastalığı İle İlişkili Nöroretinit. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
23. Bulut Kızılay E, Alibaz Öner F, Türkyılmaz Ö, Aykut V, Oğuz H, Direskeneli H, **Esen F**. [PS-084] Takayasu arteriti hastalarında glokom taraması. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
24. Hacıağaoğlu S, **Esen F**, Ünsal MA. [PS-165] Gerilim Tipi Bağ Ağrısı ve İnflamatuvar Kuru Göz Hastalığı İlişkisi. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
25. Genç S, Kepez Yıldız B, **Esen F**, Güler E, Hassan IA, Adan IAK, Çakır H. [PS-193] Korneal Dezmatosel Olgularında Konjonktival Örtme Sonuçları. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
26. Aykut V, Sali F, **Esen F**, Oğuz H. [PS-876]Katarakt Cerrahisi ile Kombine Vitrektomi Yapılan Hastalarda İntrakameral Triamsinolon Asetonid Kullanımının Kornea Endoteli Üzerine Etkisi. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019
27. Aykut V, **Esen F**, Oğuz H. [PS-916] Tek Parça Sert Göz İçi Lens Dislokasyonunun 5-0 Prolen Stür İle Düzeltilmesi. Türk Oftalmoloji Derneği 53. Ulusal Kongresi, Antalya, 2019s
28. Engin A, Turna A, **Esen F**, Ağkoç M, Deniz G, Aktaş Çetin E. Erken Evre Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserli Olgularda Video Yardımlı Mediasytinoskopik Lenfadenektomi Uygulamasının Sitotoksik T Lenfositlerinde Sitokin Salınımı ve İmmün Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarına Etkisi . X. Aziz Sancar DETAE Günleri, İstanbul, 2018, (SB-01, sözlü sunum)
29. Aktaş Çetin E, Turna A, **Esen F**, Engin A, Ağkoç M, Deniz G. Erken Evre Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserinde Yapılan VAMLA Doğal Öldürücü Hücre Fonksiyonlarını Düzenler. VIII. Ulusal Akciğer Kanseri Kongresi, 34, Bodrum, 2018 (S-03, sözlü sunum)
30. **Esen F**, Genç S, Aykut V, Taşkapılı M, Deniz G, Oğuz H, Aktaş Çetin E. [SS-KOY-40] Kornea Rejeksiyonu Hastalarında Korneayı İnfiltre Eden Lenfosit Alt Gruplarının ve PD-1 Ekspresyonlarının Flow Sitometrik Karakterizasyonu. Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongresi, Antalya, 2018

31. Aykut V, **Esen F**, Oğuz H. [SS-VRC-27] İntravenöz branül kullanılarak oluşturulan 4 portlu, düşük maliyetli, 23G bimanüel vitrektomi sistemi. Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongresi, Antalya, 2018
32. **Esen F**, Türkyılmaz Ö, Aykut V, Arı Yaylalı S, Oğuz H. [PS-363] Nöroretinit ile karışan patern distrofi zemininde non-arteritik iskemik optik nöropati olgusu. Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongresi, Antalya, 2018
33. Turkyılmaz O, **Esen F**, Oguz H. [PS-453] Faktör 2 ve PAI G4/G5 mutasyonu olan anteriyör üveit hastasında santral retinal arter oklüzyonunun spontan rekanlizasyonu. Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongresi, Antalya, 2018
34. Genc S, **Esen F**, Aygül Tülü B, Yıldırım Y, Kepez B, Çakır H, Taşkapılı M, Baykara M, Ağca A. [PS-247] Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK) ameliyatı için Descemet Membrane (DM) taraf işaretleme yöntemlerimiz. Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongresi, Antalya, 2018
35. Demirok A, Genç S, **Esen F**, Tülü B, Yıldırım Y, Ağca A, Taşkapılı M. [PS-121] Hava ve SF6 tamponad ile uygulanan Descemet membran endoteyal keratoplasti olgularında ek girişim ihtiyaçları ve başarı oranlarının kıyaslanması. Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongresi, Antalya, 2018
36. Şalkacı O, Genç S, **Esen F**, Tülü B, YıldırımY, Ağca A, Demirok A, Taşkapılı M. [PS-137] Bölünmüş korneal greft ile Descemet membranı endotelyal keratoplasti sonuçları: Endotel bekleme süresinin cerrahi başarı üzerine etkisi. Türk Oftalmoloji Derneği 52. Ulusal Kongresi, Antalya, 2018
37. Aykut V, Esen F, Oguz H. [SS-06] Yırtıklı Retina Dekolmanı Cerrahisi Sonrasında Göz İçi Basıncı Değişiklikleri. TOD 31. Yaz Sempozyumu, Van, 2018
38. **Esen F**, Ergelen R, Kazokoğlu H: [SS-TR-39] Subfoveal koroid kalınlığı ile oftalmik arter hemodinamiği ve retinal kanlanma arasındaki ilişki. Türk Oftalmoloji Derneği 51. Ulusal Kongresi, Antalya, 2017
39. **Esen F**: [PS-0690] Batı Karadeniz Bölgesinde Üveit İnsidans ve Prevalansı ile İkinci Basamak Başvurularının Klinik ve Epidemiyolojik Özellikleri. Türk Oftalmoloji Derneği 50. Ulusal Kongresi, Antalya, 2016
40. **Küçükkömürcü E**, Ünal AU, Esen F, Özen G, Direskeneli H, Kazokoğlu MH. [PS-0888] Antifosfolipid Sendromu Tanılı Hastalarda Oküler Posterior Segment Tutulumunun Değerlendirilmesi. 50. Ulusal Türk Oftalmoloji Derneği Kongresi, Antalya, 2016
41. **Esen F**, Kazokoğlu MH, Ergelen R, Alibaz-Öner F, Çelik G, Direskeneli H: [SS-TR-084] Takayasu Arteriti Hastalarında Oküler Dolaşım Bulguları. Türk Oftalmoloji Derneği 49. Ulusal Kongresi, İstanbul, 2015.
42. Sümmen S, **Esen F**, Seferoğlu ÖB, Toker E: [SS-KL-02] İki Farklı Mini-skleral Lensin Uygulama Sonrası Çökme Hızlarının Karşılaştırılması. Türk Oftalmoloji Derneği 49. Ulusal Kongresi, İstanbul, 2015
43. Eyvaz E, Seferoglu ÖB, **Esen F**, Toker E: [SS-KL-03] Keratokonus Hastalarında İki Farklı Mini-Skleral Lens İle Görme Keskinliği ve Hasta Konforunun Değerlendirilmesi. Türk Oftalmoloji Derneği 49. Ulusal Kongresi, İstanbul, 2015.
44. **Esen F**, Eyvaz E, Çekiç O: [PS1060] Yırtıklı Retina Dekolmanlı Gözlerde Konvansiyonel Skleral Çökertme Cerrahisi Ardından Maküla Altı Sıvının Emilim Süresi. Türk Oftalmoloji Derneği 49. Ulusal Kongresi, İstanbul, 2015
45. **Esen F**, Kazokoğlu MH, Alibaz-Öner F, Çelik G, Çeliker H, Direskeneli H: [SS-UB-303] Behçet Sendromunda serebral sinüs trombozu ardından görme prognozu. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
46. Sahin O, **Esen F**, Çeliker H, Alhan O, Pınar Kuru P: [SS-TR-247] Yayınlanmış Anti-VEGF Randomize Kontrollü Çalismalarında Metodolojik Sınırlamalar Ve Güc Hesabi Eksiklikleri. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
47. Toker AE, **Esen F**, Özarslan-Özcan D: [SS-KL-117] Skleral Kontakt Lensler: 8 Saatlik Kullanımda Çökme, Apikal Yükseklik ve Kornea Kalınlığı Değişiklileri. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014

48. **Esen F**, Kazokoğlu MH, Alibaz-Öner F, Çelik G, Direskeneli H: [PS-1190] Türk hastalarda Takayasu Arteritine bağlı iskemik oküler bulgular daha nadir izlenmektedir Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
49. Sözen Delil FI, **Esen F**, Köstek M, Emekli AS, Eraslan M: [PS-0021] Glokom Randomize Kontrollü Çalışmalarında Çift Organ Biası. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
50. Eraslan M, **Esen F**, Çeliker H, Çerman E, Kazokoğlu MH: [PS-0068] Üveitik lokomda Göz İçi Basıncında Diürnal Varyasyon Çalışması: Ön sonuçları. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
51. Küçükkömürcü E, **Esen F**, Er A, Akkaya-Turhan S, Toker AE: [PS-0260]Multifokal İntraoküler Lens Randomize Kontrollü Çalışmalarında Metodolojik Sınırlamalar. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
52. Eyvaz E, Sümmen S, **Esen F**, Toker AE: [PS-0269] Sert nükleer kataraktlarda torsiyonel ve longitudinal fakoemülsifikasyon yöntemlerinin endotel kaybı açısından karşılaştırılması. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
53. Biberoğlu E, **Esen F**, Çekiç O: [PS-0574] Hematolojik malignitelere sekonder retinal hemorajilerin klinik seyri. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
54. Sümmen S, **Esen F**, Biberoğlu E, Çekiç O: [PS-1213] Diyabetik vitrektomi öncesi bevacizumab enjeksiyonunun etkinliği. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
55. Küçükkömürcü E, **Esen F**, Çeliker H, Kazokoğlu MH: [PS-1193] Yüksek Doz İntravitreal Triamsinolon Uygulaması: 18 Aylık Takip Sonuçları. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2014
56. **Esen F**, Erdagi-Bulut A, Toker E: [SS-KRC-55] Sistemik alpha bloker kullanan hastalarda preoperatif atropin ve intraoperatif intrakameral adrenalin kullanımı floppy iris sendromu gelişimini azaltmaktadir. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi, Antalya, 2013
57. **Esen F**, Cerman E, Eraslan M, Sozen-Delil FI: [PS-0681] Miyotonik distrofi hastasında izlole inferior oblik kas parezisi. Türk Oftalmoloji Derneği 47. Ulusal Kongresi, Antalya, 2013
58. Sozen-Delil FI, **Esen F**, Kazokoglu H: [PS-0840] Serebral Sinüs Trombozununa Sekonder Gelişen Pseudotümör Serebri Olgu Sunumları. Türk Oftalmoloji Derneği 47. Ulusal Kongresi, Antalya, 2013
59. Seferoglu OB, Celiker H, **Esen F**, Eraslan M, Cerman E, Sahin O: [PS-0904] Ven Tıkanıklığına bağlı makula ödemi tedavisinde anti-VEGF tedavisinin Anti-VEGF Fokal Lazer kombine tedavisi sonuçları ile karşılaştırılması. Türk Oftalmoloji Derneği 47. Ulusal Kongresi, Antalya, 2013
60. **Esen F**, Erdagi-Bulut A, Cekin B, Toker E: **[SOZ-KRC-080]** Sistemik alfa blokorler ve floppy iris sendromu. Türk Oftalmoloji Derneği 46. Ulusal Kongresi, Antalya, 2012
61. Erdagi-Bulut A, **Esen F**, Yildirim S, Toker E: **[SOZ-KRC-065]** Sert kataraktlarda Ozil IP torsiyonel fako sonuçlarımız. Türk Oftalmoloji Derneği 46. Ulusal Kongresi, Antalya, 2012
62. **Esen F**, Sahin-Yenice O, Elcioglu N: **[POS-166] Albinism hastalarında koroid yapısı**. Türk Oftalmoloji Derneği 46. Ulusal Kongresi, Antalya, 2012
63. Sozen-Delil FI, Cerman E, **Esen F**: **[POS-283]** Glokomla birliktelik gösteren orbital varis. Türk Oftalmoloji Derneği 46. Ulusal Kongresi, Antalya, 2012
64. Sozen-Delil FI, Cerman E, **Esen F**: **[POS-378] Çölyak hastalığı ile birliktelik gösteren orbital miyozit olgusu.** Türk Oftalmoloji Derneği 46. Ulusal Kongresi, Antalya, 2012

Yönetilen Tezler:

1. **Başlık:** Takayasu arteriti hastalarında glokom belirti ve bulgularının araştırılması
   Tez Öğrencisi: Dr. Esra Bulut Kızılay
   Tamamlanma Tarihi: 2020
2. **Başlık:** Farklı üveit antitelerinde arka vitre dejenerasyonu dinamikleri ve vitreomaküler ara yüzey değişikliklerinin incelenmesi
   Tez Öğrencisi: Dr. Medine Güneş
   Tamamlanma Tarihi: 2021
3. **Başlık:** Kliğimizde asistanların dahil olduğu katarakt ameliyatlarındaki intraoperatif ve erken postoperatif komplikasyon oranlarının uzman katarakt vakaları ile karşılaştırılması ve risk faktörlerinin belirlenmesi
   Tez Öğrencisi: Dr. Gözde Derin Şengün
   Tamamlanma Tarihi: 2024
4. **Başlık:** Non-enfeksiyöz üveit hastalarında katarakt cerrahisinde yeni bir tedavi yaklaşımı: Sistemik steroid yerine sadece intraoperatif posterior subtenon triamsinolon enjeksiyonu uygulanan hastaların klinik sonuçları
   Tez Öğrencisi: Dr. Ulviyya Askarova
   Tamamlanma Tarihi: 2025
5. **Başlık:** Takayasu arteriti hastalarında 10 yıllık retinopati seyrinin takibi
   Tez Öğrencisi: Dr. Zahide Büşra Şahin
   Tamamlanma Tarihi: 2025

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE FONKSİYONLARINI ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ: İMMÜN KONTROL NOKTALARI, LOKAL İMMÜN SUPRESYON VE BİYOLOJİK TEDAVİLERİN ETKİLERİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%9	%8	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Fehim Esen, Günnur Deniz, Esin Cetin Aktas. "PD-1, CTLA-4, LAG-3, and TIGIT: The roles of immune checkpoint receptors on the regulation of human NK cell phenotype and functions", Immunology Letters, 2021 Yayın	%1
3	www.turkimmunoloji.org.tr İnternet Kaynağı	%1
4	epub.ub.uni-greifswald.de İnternet Kaynağı	%1
5	Fehim Esen, Ayşenur Kokoglu, Çigdem Çetin, Ozlem Turkyilmaz et al. "Adalimumab-induced changes in NK cells phenotype, receptors and functions after clinical remission of Behçet's	<%1