

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

**BEHÇET HASTALARINDA CD127 VE
FOXP3 TAŞIYICILIĞI AÇISINDAN TREG
HÜCRELERİ, BTLA (CD272),
OSTEOPROTEGERİN VE sCTLA
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Nesrin DEMİR

ELAZIĞ- 2010

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. N.Fulya İLHAN

Bilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş kapsam ve kalite yönünden Doktora tezi olarak kabul edilmiştir

Doç. Dr. N. Fulya İLHAN

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN

Prof. Dr. Vedat BULUT

Doç. Dr. Handan AKBULUT

Doç. Dr. N.Fulya İLHAN

Doç. Dr. Tamer DEMİR

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın projelendirilmesinden sonuçlandırılmasına kadar tüm aőamalaradaki özverili yardımlarından dolayı Bilim Dalı Başkanı ve tez danıőmanım Sayın Hocam Doç. Dr. N. Fulya İLHAN'a ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakóltesi İmmünoloji Bilim Dalı Öğretim Üyelerine, çalışmanın yürütüldüğü Fırat Üniversitesi Tıp Fakóltesi İmmünoloji laboratuvar personeline, verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde katkı sağlayan Doç.Dr. Orhan ÖZBEY'e, çalışma arkadaşlarıma, hayatım boyunca bana maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan sevgili eőim Doç.Dr.Tamer DEMİR'e, aileme yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLO LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	IX
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Behçet Hastalığı	5
3.1.1. Tanım	5
3.1.2. Epidemiyolojisi	5
3.1.3. Etyopatogenezi	6
3.1.4. Genetik Eğilimi	7
3.1.5. İmmünolojisi	8
3.1.6. Klinik Bulguları	11
3.1.6.1. Oral ülserler	11
3.1.6.2. Genital ülserler	12
3.1.6.3. Cilt bulguları	12
3.1.6.4. Paterji	12
3.1.6.5. Göz tutulumu	13
3.1.6.6. Eklem tutulumu	13
3.1.6.7. Vasküler tutulum	14
3.1.6.8. Nörolojik tutulu	14

3.1.6.9. Gastrointestinal sistem (GİS) tutulumu	15
3.1.6.10. Diğer bulgular	15
3.1.7. Laboratuvar Bulguları	16
3.1.8. Tanısı	16
3.1.9. Seyir ve prognoz.....	17
3.1.10. Tedavis	18
3.1.10.1. Mukokütanöz lezyonlarda tedavi	18
3.1.10.2. Göz bulgularında tedavi	18
3.1.10.3. Artritli olgularda tedavi	19
3.1.10.4. Gastrointestinal semptomlarda tedavi	19
3.1.10.5. Santral sinir sistemi (SSS) lezyonlarında tedavi.....	20
3.1.10.6. Büyük damar tutulumunda tedavi	20
3.2. Treg Hücreleri	20
3.2.1. Regülatör T hücrelerin tanımlanması	21
3.2.2. Regülatör T hücrelerin gelişimi ve kökenleri	21
3.2.3. Regülatör T hücrelerinin tipleri	23
3.2.4. Supresyon mekanizmaları	28
3.2.5. Otoimmünitede Treg hücreleri.....	31
3.2.6. Kanserde Treg hücreleri	32
3.3. BTLA (B ve T lymphocyte attenuator,CD272).....	37
3.3.1. BTLA'nın sunumu ve yapısı.....	38
3.3.2. BTLA ligandı (HVEM).....	40
3.3.3. BTLA'nın fonksiyonları.....	42
3.3.4. Humoral cevapta BTLA'nın etkileri.....	43

3.3.5.	Otoimmün hastalıklarda BTLA ve HVEM rolleri.....	43
3.3.6.	Allerjik cevaplarda BTLA'nın rolü.....	44
3.4.	Osteoprotegerinin Yapısı.....	45
3.4.1.	Osteoprotegerinin Yapısal Bölgelerinin Aktiviteleri.....	45
3.4.2.	RANKL	47
3.4.3.	RANK Yapısı	49
3.4.4.	OPG, RANKL, RANK ve İmmün Sistem.....	50
3.4.5.	OPG, RANKL, RANK ve İnflamasyondaki Rollerini	52
3.4.6.	OPG, RANKL ve RANK'ın Arteriyel Kalsifikasyonaki Rolü..	52
4.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	55
4.1	Gereç	55
4.1.1.	Çalışma Materyali.....	55
4.2.	Yöntem	56
4.2.1	Hastalar ve sağlıklı kontroller	56
4.3.	Analizler	56
4.3.1.	Flow-sitometrik analizi.....	56
4.3.2.	Osteoprotegerin ve sCTLA-4 tayini	58
4.4.	İstatistik analizler.....	59
5.	BULGULAR.....	60
6.	TARTIŞMA.....	68
7.	KAYNAKLAR.....	84
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	108

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. T regülatör hücre tipleri ve özellikleri

Tablo 4.1. Araştırma gruplarının sayıları

Tablo 4.2. Behçet hastaları ve kontrol grubunun yaş değerleri

Tablo 5.1. Behçet grubunda hastalık süreleri ve aktivasyon kriterleri

Tablo 5.2. Behçet hastaları ve kontrol grubunun lenfosit değerleri

Tablo 5.3. Behçet hastaları ve kontrol grubunda osteoprotegerin ve sCTLA değerleri

Tablo 5.4. Behçet grubunda aktif ve remisyon dönemine göre lenfosit değerleri

Tablo 5.5. Behçet grubunda aktif ve remisyon dönemine göre osteoprotegerin ve sCTLA değerleri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.BTLA/HVEM/LIGHT reseptör etkileşimi biçimleri

Şekil 2.CD3⁺CD272⁺ hücrelerin dot-plot grafiği

Şekil 3.CD4⁺CD25⁺ hücrelerin dot-plot grafiği

Şekil 4.CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ hücrelerin dot-plot grafiği

KISALTMALAR LİSTESİ

BH	: Behçet hastalığı
CTLA-4	: T lymphocyte associated antigen-4
sCTLA-4	: Soluble Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4
BTLA	: B ve T lymphocyte attenuator
OPG	: Osteoprotegerin
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ELİSA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
NK	: Natural killer cells
GİS	: Gastrointestinal sistem
SSS	: Santral sinir sistemi
HLA	: Human leukocyte antigen
CD	: Cluster of differantiation
HSP	: Isı şoku proteinleri
MICA	: MHC class I chain-related molecule A
VCAM	: Vascular cell adhesion molecule
LFA	: Leukocyte function-associated antigen
IFN- γ	: Interferon gamma
IgG	: İmmunoglobulin G
IgA	: İmmunoglobulin A
C3	: Kompleman 3
Th1	: T helper 1
Th2	: T helper 2

IL	: İnterlökin
TNF- α	: Tumor necrosis factor- α
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
IL- β	: İnterlökin-beta
sIL-2R	: Soluble IL-2 reseptör
$\gamma\delta^+$ T Lenfosit	: Gamma-delta T lenfosit
DVT	: Derin ven trombozu
CRP	: C-reaktif protein
NSAİİ	: Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar
Treg	: Regülatör T hücre
TGF-β	: Transforming growth factor- β
CD25	: İnterlökin-2 reseptör α -zincirini
TCR	: T cell receptor
GITR	: Glucocorticoid-induced TNF reseptörü
Th3	: T helper 3
Tr1	: Type 1 T regulatory
TNFR-2	: Tumor necrosis factor receptor superfamily-2
CD62L	: L-selectin ligand
APC	: Antijen sunan hücreler
Foxp3	: Transcription factor forkhead box P3
IL -2Rα	: İnterlökin- 2 reseptör alfa
IPEX	: İmmunedysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
NFAT	: Nuclear factor of activated T-cells

NFκB	: Nuclear factor kappa B
NKT	: Natural killer T cells
DC	: Dendritik hücre
IDO	: İndoleamine 2.3-dioxygenase
MHCsmf-II	: Major Histocompatibility Complex
ILT3	: Ig-like transcripts 3
ILT4	: Ig-like transcripts4
MS	: Multiple skleroz
RA	: Romatoid artrit
JIA	: Jüvenil idiyomatik artrit
PP2A	: Serin /Threonine protein phosphatase 2A
SHP-2	: Shatterproof- 2
PI 3K	: Phosphatidylinositol 3-kinase
PKB/AKT	: Protein kinase B
CD127/ IL-7Rα	: IL-7 reseptör α -zincir
ITIM	: İmmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
PD-1	: Programmed death-1
TNFR	: Tümör nekroz faktörü reseptör
HVEM	: Herpes virus entry mediator
IgV	: Variable domeini
MAPK	: Mitogen activated protein kinases
HSV-1	: Herpes simplex virus type-1
Ltα	: Lymphotoxin α
STAT1/4	: Signal transducer and activator of transcription 1/4

CRDs	: Cysteine-rich domains
EAE	: Deneysel otoimmün ensefalomyelit
MOG	: Myelin oligodendrocyte glycolprotein
IDDM	: İnsulin dependent diabetes mellitus
TRAIL	: TNF ilişkili apoptozisi indükleyen ligand
RANKL	: Receptor activator of NF- κ B ligandı
RANK	: Receptor activator of NF- κ B
PTH	: Paratiroid hormon
OPGL	: Osteoprotegerin Ligand
TRAF6	: TNF receptor-associated factor 6
NFATc1	: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
MAPK	: Mitogen-activated kinase
HIV	: Human immune deficiency virus
FITC	: Floressein isotiosiyanat
PE	: Phycoerytrin
PerCP	: Peridinin chlorophyll protein complex
SCID	: Severe combined immunodeficient
SLE	: Sistemik lupus eritamatozis
IBD	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
APS	: Antiphospholipid Syndrome

1.ÖZET

Behçet hastalığı (BH) nörolojik tutulum, tekrarlayan oral ve genital ülserler, artrit, deri lezyonları, oküler ataklar ile tanımlanan kronik, otoinflamatuvar ve vaskülit ile karakterize bir hastalıktır. Hastalığın ataklarla olması ve tedaviye cevaptaki azlık etyopatogenezinin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır.

Periferik toleransın önemli bir bileşeni, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regülatör T hücrelerini içeren regülatör fonksiyonları olan lenfositler tarafından temsil edilir. T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4), Treg hücrelerinde önemli fonksiyonlara sahip olma yolu ile lenfosit aktivasyonun engelleyen bir molekül olarak tanımlanmıştır. Soluble CTLA (sCTLA) ise Treg hücrelerinin fonksiyonel bir belirteci olarak tanımlanan ve CTLA-4'ün ekstrasellüler salgılanan bir formudur. B ve T lymphocyte attenuator (BTLA, CD272), B hücreleri, T hücreleri, dendritik hücreleri (DC) , natural killer (NK) hücreleri ve makrofajlar tarafından eksprese edilen lenfoid hücrelere özel bir hücre yüzey reseptörüdür ve inhibitör sinyallere eşlik eder. Osteoprotegerin (OPG) ve onun ligandının (RANKL) immün sisteminin fonksiyon ve düzenli gelişmesini kontrol etmekte anahtar bir rolü vardır.

Bu çalışma, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regülatör T hücreleri (Tregs), sCTLA, BTLA ve osteoprotegerinin periferik kan düzeylerinin araştırılması ve BH'da rolleri olup olmadığını göstermek amacıyla planlandı. Çalışmada, BH'nda inhibitor reseptörlerin rollerini tanımlamak hedeflendi. 18'i oküler komplikasyonlu (9'u aktif oküler ataklı), 2'si inflamatuvar artritli ve 5'i mukokutanöz lezyonlu (2'si aktif) toplam 25 Behçet hastası ve 20 sağlıklı kontrolle çalışma yapıldı.

Periferik kan numuneleri (2'şer ml), aseptik olarak EDTA'lı (etilen diamin tetra asetik asit) ve jelli tüplerde toplandı. Hasta ve kontrol grubunun periferik kanlarında, flow-sitometrik yöntemi kullanarak T hücrelerinde ekprese edilen $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD4^+CD25^+CD127^{low}$, $CD4^+CD272^+$ ve $CD3^+CD272^+$ oranlarını analiz edildi. Serum OPG ve sCTLA düzeyleri ise serum örneklerinde Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile belirlendi.

Behçet hastalarında (aktif ve remisyon), sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ($p<0.01$), $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ($p<0.05$), $CD4^+CD272^+$ ($p<0.001$) ve $CD3^+CD272^+$ ($p<0.001$) T hücreleri gözlemlendi. Ancak aktif ve remisyonundaki Behçet hastalarında Treg hücreleri arasında hiçbir fark görülmedi. OPG'in serum düzeylerinin Behçetli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.01$). Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol sCTLA-4 serum düzeyleri arasında hiçbir fark bulunamadı ($p>0.05$). Ama aktif Behçet hastaları ve remisyonundaki Behçet hastaları sCTLA-4 serum düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$). Çalıştığımız parametrelerin ilerde BH gibi etyopatogenezi tam aydınlatılamamış hastalıkların tanısı ve takibinde bize yardımcı olabileceği ve incelenen bu parametrelerin, BH'nın immün disregülasyonundan sorumlu olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler : BH, Treg hücreleri, Foxp3, sCTLA, BTLA, Osteoprotegerin

2.ABSTRACT

Behçet's disease (BD) is characterized by a chronic, autoinflammatory vasculitis with recurrent attacks of oral and genital ulcerations, ocular and skin lesions, arthritic and neurologic involvement. The difficulties in defining the etiopathogenesis result from the intermittent nature of the disease and lack of consistent response to the therapy.

An important component of the peripheral tolerance is represented by the lymphocytes with regulatory functions, including $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatory T cells (Tregs). CTLA-4 is determined as a molecule that which inhibites lymphocyte activation via having important function on Treg cells. sCTLA is a form of CTLA-4 that is secreted into the extracellular space and described as a functional marker of Treg cells. B and T lymphocyte attenuator (BTLA, CD272) is a lymphoid specific cell surface receptor that is expressed by B cells, T cells, dendritic cells (DC), macrophages, and NK cells and participates in inhibitory signaling. Osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) have key roles in controlling the proper development and functioning of the immune system.

In this study it was aimed to research peripheral blood levels of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatory T cells (Tregs), sCTLA, BTLA and osteoprotegerin and show whether they have a roles on Behçet's disease. Additionally it was also aimed to define the role of inhibitory receptors on BD. Totally twenty-five BD patients 18 with ocular complications (9 of them were with active ocular attack), 2 with inflammatory arthritis and the rest 5 patients

with mucocutaneous lesions (2 of them were in active period) and 20 healthy control were studied.

Venous blood samples (2 ml) were collected aseptically in tubes with anti-coagulant (EDTA). We first analyzed the proportions of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, CD4⁺CD272⁺ and CD3⁺CD272⁺ which are expressed in T cells in the peripheral blood of patients with BD and control group by using flow cytometry. Serum levels of OPG and sCTLA were determined by ELISA.

In BD patients (active and remission) had significantly higher CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (p<0.01), CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (p<0.05), CD4⁺CD272⁺ (p<0.001) and CD3⁺CD272⁺ (p<0.001) T cells as compared the to healthy controls. However there were no differences in the Treg cells in BD patients with active and remission phases. OPG serum levels in patients was found to be significantly higher compared to the healthy controls (P< 0.01). There was no difference between sCTLA-4 serum level in Behcet's patients and the healthy controls (p>0.05). However in Behcet's patients with active disease and patients in remission, the serum levels of sCTLA-4 were found significantly different (p<0.05). In future, these researching parameters might be helpful for the diagnosis or follow-up of some diseases as Behçet with obscure etiopathogenesis and it might be concluded that the studied parameters might be responsible for the immune dysregulations in Behçet's disease.

Key Word: Behçet's disease, Treg cells, Foxp3, sCTLA, BTLA, Osteopontin

3.GİRİŞ

3.1.BH

3.1.1.Tanım

Behçet hastalığı 1937 yılında dermatolog Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından oral aft, iridosiklit ve genital ülserden oluşan bir hastalık olarak tarif edilmiştir (19). Kronik, multisistemik, inflamatuvar bir hastalıktır. BH tekrarlayan oral, genital ülserler ve göz bulgularının yanı sıra kas-iskelet, nörolojik ve gastrointestinal sistem (GİS) tutulumları ile seyreden geniş dağılımlı bir vaskülit olarak da tanımlanabilir. Altta yatan patoloji, arter ve venleri içine alan iltihabi yanıttır (13).

Hastalık zaman içerisinde kendi kendini sınırlasa da, körlükle sonuçlanabilen posterior üveit, santral sinir sistemi (SSS) tutulumu, perforasyonla sonlanan gastrointestinal tutulum önemli morbidite ve mortalite nedenleri olarak ortaya çıkabilir (107).

3.1.2.Epidemiyolojisi

Genellikle yaşamın ikinci on yılının sonlarına doğru başlayan hastalık, en sık 20-40 yaşları arasında görülmektedir. Başlangıçta, hastalık erkeklerde daha sık rapor edilmişse de, son 20 yıl içindeki araştırmalar hastalığın neredeyse her iki cinsiyette eşit olarak görüldüğüne işaret etmektedir (101).

BH, hemen hemen tüm dünyada görülmekle birlikte, Türkiye, İsrail, Yunanistan ve Kıbrıs gibi Akdeniz ülkeleri, Irak ve İran gibi Ortadoğu ülkeleri ve Japonya, Kore, Çin gibi Uzakdoğu ülkelerinde diğer ülkelere göre daha sık görülmektedir. Hastalığın yukarıda belirtilen ve tarihi İpek Yolu'nun geçtiği bu ülkelerde daha sık görülmesi, gelişiminde genetik ve/veya çevresel faktörlerin

etkili olabileceğine işaret etmektedir. Söz konusu coğrafyada BH'nin en sık görüldüğü yer Türkiye'dir. Yapılan araştırmalarda Japonya'da prevalans 1/10.000 iken İngiltere'de 1/100.000' den daha az olarak saptanmıştır. Türkiye'de ise hastalığın prevalansı ile ilgili çalışmalarda; 4-37/10.000 arasında değişen oranlar bildirilmiştir (101).

3.1.3.Etyopatogenezi

Etyopatogenezi henüz açıklık kazanmamış olmakla birlikte, HLA-B51 (Human Leukocyte Antigens-B51) ile BH arasında saptanan bağlantı, genetik etkiyi doğrulamaktadır (182). Genetik olarak eğilimli bireylerde infeksiyöz bir ajan tarafından tetiklenen yoğun inflamatuvar yanıtı bağı olarak ortaya çıktığı görüşü kabul edilmektedir. BH'da pozitif aile öyküsü, genetik faktörlerin önemini vurgulayacak şekilde hastalık prevalansı yüksek toplumlarda %12'lere ulaşmaktadır (116).

Gül ve ark. BH'nin kardeşlerde görülme oranını % 4.2 olarak saptamışlar ve hastalığın kardeşlerde görülme risk oranının yüksek olmasının genetik etkiyi desteklediğini bildirmişlerdir (80). BH'na eğilimde genetik komponentin yanı sıra çevresel faktörlerin de etkisi vardır. Almanya'da yaşayan Türklerde, Hawaii ve Amerika Birleşik Devletlerinde yaşayan Japonlar'da hastalık riski Türkiye ve Japonya'ya göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (274).

En olası çevresel tetikleyici olarak Streptococcus sanguis gibi infeksiyöz ajanlar düşünülmektedir. Farklı infeksiyöz ajanların ortak özelliği olarak dikkati çeken ısı şoku proteinlerinin (HSP), insandaki homologları ile benzerliğinin çapraz reaksiyona yol açarak immün yanıtı tetikleyebileceği ileri sürülmektedir (133).

Yeni bulunan bir nöroendokrin hormon olan leptinin, endotel işlevini düzenleyici etkisi nedeniyle Behçet hastalarında anlamlı oranda yüksek olduğu ve endotel tamirinde etkisi olabileceği belirtilmiştir (63).

3.1.4.Genetik Eğilimi

BH'da en sık çalışılan genetik lokus insan lökosit antijen kompleksidir. Hastalık eğilimi, HLA-B genindeki polimorfizmlerle özellikle HLA-B51 ile ilişkili görünmektedir. Bu ilişki Avrupa kökenli hastalara göre Türk ve Japonlar'da daha kuvvetli olsa da, genel olarak tüm toplumlar için geçerlidir (116). HLA-B51'in en az 34 allellik varyasyonu vardır. En yaygın moleküler alt gruplar; HLA-B5101 ve HLA-B5108'dir (237). Ancak HLA-B allellerinin hastalığa eğilimi hangi mekanizmalarla ortaya çıkardığı bilinmiyor, bunun dışında BH sık görülen toplumlarda HLA-B51 prevalansının beklenenden az görülmesi ve HLA-B51 negatif olguların da bulunması primer bir ilişkiden çok başka genetik faktörlerin de etkili olduğu kompleks mekanizmaların varlığını düşündürmektedir. Bunun dışında HLA-B51 ile dağılım dengesizliği sonucu iletilen MHC class I chain-related molecule A (MICA) gibi genlerin, BH'na eğilimde majör rolü oynayabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, aksi görüşler olsa da son çalışmalarda da HLA-B51'in eğilime neden olan majör genetik lokus olduğu ve HLA-B51 pozitif BH olan bireylerde hastalığın daha ağır seyrettiği görüşü kabul görmektedir (237).

BH genel olarak erkeklerde daha sık olmasına karşın, HLA B51'in cinsiyetler arası dağılımında fark saptanmamıştır. Ortaç ve ark. HLA B51 antijenini Behçet olgularında %68, kontrol grubunda ise %21 oranında bildirmişlerdir (183). Nishiyama ve ark. ailesel BH olan olgularda %53.1 oranında

HLA-B51 saptamışlardır. Göz tutulumlu olgularda bu oran %64 iken, göz tutulumu olmayan olgularda ise %14.3 bulunmuştur (176). Bununla birlikte, Kaya ve ark.nın çalışmasında göz tutulumlu olgularda HLA-A29'un arttığı, HLA-Bw6'nın ise azaldığı saptanmıştır. Rölatif risk çeşitli ülkelerde oldukça farklı bildirildiğinden, HLA B51'in BH'ndaki tanısal değeri önemli olmakla beraber kısıtlıdır (108).

3.1.5. İmmünolojisi

BH'da tüm organ sistemlerindeki ortak histopatolojik lezyon, tıkaçıcı vaskülitir. BH'nın klinik bulgularından sorumlu olan bu vaskülit özellikle venülleri tutan bir vaskülitir. Genellikle lezyonun yaşına göre farklı lezyonlarda farklı hücreler rol oynasa da karakteristik olarak perivasküler lenfositik ve monositik hücrel infiltrasyon gözlenir. Nötrofil infiltrasyonu özellikle paterji reaksiyonunda erken dönemde dikkati çeken bir bulgudur (180).

Hastalığın esas patolojik bulguları lenfomononükleer hücrelerin damar çevresinde birikimi, endotel hücrelerinin şişmesi veya çoğalması sonucu küçük damarlarda kısmi tıkanıklık ve fibrinoid dejenerasyondur. Fizik (sönmüş) olması nedeniyle enükle edilen BH tanısı almış bir gözde yapılan histopatolojik çalışmada, bazı damar duvarlarında fibrinoid nekroz, hemorajik nekroz kümeleri ve monositik hücreler saptanmıştır (74). Koroidde de lenfositlerin hakim olduğu orta derecede hücrel infiltrasyon izlenmiştir. Retina ve uveadaki hücrelerin çoğunun T hücreleri olduğu, ancak yer yer B hücre kümelerinin de bulunduğu bildirilmiştir. CD4⁺/CD8⁺ T hücre oranı 1.5/1.0 olarak saptanmıştır. Özellikle endotel hücrelerinde olmak üzere bol miktarda HLA-DR, HLA-DQ ve adezyon molekülleri (hücreler arası adezyon molekülü-1, E-selektin, vascular cell adhesion

molecule (VCAM), leukocyte function-associated 1a ve 1b (LFA-1A/LFA-1B) saptanmıştır. Charteris ve ark. Behçetli gözde yaptıkları histopatolojik çalışmada, damar içi ve çevresinde CD4⁺ T lenfositlerini saptamış. Ancak hiç CD8⁺ T hücresi izlememişlerdir (42).

Charteris ve ark. yaptıkları bir başka çalışmada ise, koroidde çoğunlukla CD4⁺ lenfosit ve makrofajların bulunduğu, B lenfositlerin ise nadir görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca kompleman ve immünglobulin birikimi de saptanmamıştır (41). Bununla birlikte, Mullaney ve ark. episkleral ve koroid ven damar duvarında immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A (IgA) ve Kompleman 3 (C3) varlığı saptamışlardır (171). Elde edilen histopatolojik ve klinik veriler BH'na immun kompleks vaskülitinin yol açtığı kanısını uyandırmışsa da, bugün için geçerli olan görüş T hücre baskılayıcı sistem bozukluğunun ana rolü oynadığı ve ağır bir immunolojik bozukluk olduğudur (177).

Kim ve ark. apoptozisin rolünü ortaya koymak için yaptıkları çalışmalarında; Behçetli olgularda hümör aközdeki çözünür Fas antijenini incelemişler ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ve antijen miktarının üveitin şiddetiyle bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (113). Göz tutulumu olan Behçet hastalarında serum sialik asit düzeyleri araştırılmış hem ataklar arasında hem de ataklar esnasında ve kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (240). Ayrıca, BH'nın aktif döneminde kandaki retina otoantijenine (S antijeni) cevaplı lenfositlerde artış saptanmıştır (55).

Son çalışmalarda, BH'da anormal T hücre yanıtları ile ilgili güçlü kanıtlar bulunmuştur. Sağlıklı kontrollere göre dolaşımda yüksek oranda erken aktivasyon belirteçleri taşıyan T hücreleri saptanmıştır. Bu hücreler birçok inflamatuvar

sitokin üretirlerse de ortamdaki T hücrelerince yüksek oranda interferon gamma (IFN- γ) sentezlendiği, dolaşımdaki dominant T hücre tipinin Th1 hücreler olduğu gösterilmiştir (68).

Behçet hastalarının periferik kanında sellüler aktivitenin arttığı saptanmış olmasına rağmen, BH'lı kadınların çocuklarında neonatal BH görülmesinin raporları humoral faktörlerin rol oynadığını da göstermektedir (64). Behçet hastalığında çeşitli sitokin profilleri ve artan lenfosit popülasyonu ile immün cevabın T helper 1 (Th1) ve T helper 2 (Th2) fenotip lenfosit bölümleri arasında bir dengenin varlığı gösterilmiştir (57). Behçet hastalarında CD8⁺CD16⁺ ve CD8⁺CD56⁺ T lenfosit tiplerinin düzeyleri normal olmasına rağmen CD4⁺CD16⁺, CD4⁺CD56⁺, CD8⁺ $\alpha\beta$, CD8⁺CD11b⁺ düzeyleri yüksek bulunmuştur. Diğer inflamatuvar hastalıklarla BH'nda T lenfosit aktivasyonu benzerlik gösterir (60). Gözün ön kamarasına infiltre olan T lenfositleri oküler BH'nın patogenezinde T hücrelerinin önemli rolü olduğunu gösterir (109). Behçet hastalarında insan anti-CD52 monoklonal antikolar kullanılarak yapılan son çalışmaların çoğunda, hastalık süresince otoreaktif T lenfositlerin merkezi bir rol oynadığı öne sürülmüştür (144). İnterlökin 2 (IL-2), IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, Tumor Necrosis Factor α (TNF α) ve IFN γ gibi proinflamatuvar sitokinleri üreten Th1 fenotip lenfositleri BH'lı hastalarda yüksektir (31,68). Bu bulgular Behçet hastalarındaki mukokutanöz lezyonlarda sunulan sitokin genlerinin analizi ile de desteklenmiştir. Normal deri ile BH lezyonları karşılaştırıldığında BH lezyonlarında IL-8, monosit kemoatraktan protein-1(MCP), IFN- γ ve IL-12 mesajcı ribonükleik asidin (mRNA) ekspresyonunda önemli yükselmeler gözlenmiştir (28). Son çalışmalar Türk Behçet hastalarında spesifik interlökin beta (IL- β) geninde bir polimorfizmi

göstermiştir (48). Behçet hastalarında IL-2'yi inhibe eden soluble IL-2 reseptörünün (sIL-2R) yükseldiği bildirilmiştir (62). Benzer olarak Behçet hastalarında IFN- γ ve TNF- α üreten periferal gamma-delta T ($\gamma\delta^+$ T) lenfositlerinin oranları da yüksek bulunmuştur ve bu durumun mukokutanöz lezyonlarla ilişkili olduğu saptanmıştır. Gerçekten de bu hücreler erken aktivasyon belirteçleri olarak gösterilir ve inflamasyon bölgesinde toplanmaya meyillidirler (85). Behçet hastalarındaki lenfositler spontan olarak TNF α , IL-6 ve IL-8 salgırlar ve aktive Behçet hastalarında bu sitokinlerin düzeyleri yüksek bulunur (62). Behçet hastalarının tedavisinden sonra ise Th1-fenotip sitokinlerinin düzeyleri azalır. Oküler Behçet hastalarında düşük düzeylerde bulunan IL-1 reseptör antagonisti düzeylerinin tedavi edilen vakalarda yükseldiği gösterilmiştir (23).

3.1.6. Klinik Bulguları

3.1.6.1. Oral ülserler

Hastalığın başlangıcında veya herhangi bir döneminde en sık saptanan bulgudur ve Uluslararası BH Çalışma Grubu'nun birçok ülkeden elde ettiği verilere göre hastaların %97-99'unda bulunmaktadır (99).Oral ülserler yılda en az üç kez tekrarlama özelliği gösterir. Oral ülserler BH için olmazsa olmaz bir tanı kriteridir. Oral ülserler çoğunlukla hastalığın ilk belirtisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Genellikle de oral ülserler hastalığın sistemik semptomları ortaya çıkana kadar yıllarca tek bulgu olarak kalabilmektedir Oral ülserler genellikle yanak ve dudak mukozası, yumuşak damak ve dilin ventral yüzü gibi oral mukozanın nonkeratinize bölgelerine lokalize olurlar. Diş etleri, sert damak, ve

dilin dorsal yüzü gibi keratinize bölgeler daha az sıklıkla tutulur. Tonsil ve farenks yerleşimi ise nadir görülebilir (152)

3.1.6.2. Genital ülserler

Genital ülserler olguların %72-94'ünde bulunur. Morfolojik olarak oral ülserlere benzer ancak skar bırakarak iyileşen lezyonlardır. Erkeklerde en fazla lezyonlar skrotumda oluşurken, penis lezyonları daha nadirdir. Kadınlarda ülserler vagina, vulva, serviksde oluşabilir ve dispareni nedeni olabilir. Ülserler her iki cinsten de kasıklar, perianal bölge ve perinede görülebilir (152).

3.1.6.3. Cilt bulguları

BH'nın deri belirtileri hastalığın tanısında son derece önemlidir ve büyük çeşitlilik gösterebilir. Bunlar arasında eritema nodosum benzeri lezyonlar, ekstragenital ülser, papülopüstüler lezyonlar, yüzeysel tromboflebit, paterji reaksiyonu ve diğer vaskülitik deri belirtileri sayılabilir.

Eritema nodosum benzeri lezyonlar genellikle alt ekstremitelere lokalize olurlar. Bu lezyonlar subkutan yerleşim gösterirler ve ağrılı lezyonlardır. Eritemli lezyonlar lokal ısı artışı gösterir ve ortalama 2-3 hafta içerisinde ülserleşmeksizin geriler. Genellikle koyu tenlilerde daha belirgin olmak üzere lezyonların, yerlerinde pigmentasyon bırakarak bazen de skuamlanarak kaybolduğu gözlenir. Lezyonlar daha az sıklıkla yüz, kalça ve boyun lokalizasyonu gösterebilir. Klinik olarak klasik eritema nodosumdan ayırt edilmeleri zordur (152).

3.1.6.4. Paterji

İlk defa 1941 yılında Behçet hastalarında nonspesifik deri uyarılarına karşı hiperreaktivite reaksiyonları görülmüştür. Steril iğne ile cilt delindiğinde veya cilt içerisine steril serum fizyolojik enjekte edildiğinde enjeksiyon yerinde 24-48 saat

sonra püstül veya 2 mm'den büyük eritematöz steril papül oluşması ile test pozitif olarak kabul edilir. BH için oldukça spesifiktir. Bu test doku travmasına karşı oluşan hiper reaktiviteyi gösterir. Paterji reaksiyonu sadece deri ile sınırlı kalmamaktadır. Özellikle göz cerrahisinden sonra üveit ataklarının ortaya çıkması, arteryel kanül takılmasından sonra anevrizma oluşumu ve artrosentez sonrasında sinovit gelişimi de paterji reaksiyonu olarak kabul edilir. Histolojisinde genellikle lenfositlerin eşlik ettiği hızlı nötrofil infiltrasyonu görülmüştür (75).

3.1.6.5. Göz tutulumu

Göz tutulumu, çoğunlukla oral ve genital afttan 3-4 yıl sonra başlar. Tezel'in çalışmasında bu süre 5.7 yıl olarak bulunmuştur (234). Göz tutulumu çeşitli çalışmalarda %23-96 oranında bildirilmiştir (82). Arka segment tutulumu ise, Behçet'li olguların %50-93'ünde görülür (160). Göz tutulumun olguların %87-90.4'ünde iki taraflı olduğu gözlenmiştir (13). BH'nın en sık karşılaşılan göz bulgusu iki taraflı, tekrarlayıcı, granümatöz olmayan iridosiklittir (234).

3.1.6.6. Eklem tutulumu

Hastaların %50-60'ında genellikle alt ekstremitede oligo-monoartrit bulguları gelişir. Oligoartiküler tutulum simetrik olabildiği gibi asimetricde olabilir. Artrit birkaç haftada kendiliğinden geçer. Özellikle deformite bırakmadan iyileşir. En sık diz eklemi, onu takiben ayak bileği, el bileği ve dirsekler gibi büyük eklemler tutulur (52). El-ayak küçük eklemlerinin tutulumu nadir görülür. Sakroiliyak eklem tutulumu %0.5-1 oranında bildirilse de, BH'da sakroiliit bulunmadığını ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır. Eklem ponksiyonu ile elde edilen sıvı çoğunlukla inflamatuvar özelliktedir ve müsin pıhtı testi pozitifdir

Sinovyum histolojisi ise nonspesifiktir. Nadiren vasküler tutulumla bağlı aseptik nekrozda bildirilmiştir (245).

3.1.6.7. Vasküler tutulum

BH, genellikle her boyda arter ve venleri etkileyen sistemik bir vaskülitir. Vasküler tutulum özellikle genç erkeklerde gözlenir ve prognostik olarak önemli bir bulgudur. Vasküler tutulumun göz tutulumu olanlarda daha az sıklıkta ortaya çıktığı düşünölmektedir. Küçük damar tutulumu patolojik belirti ve bulguların çoğundan sorumludur. Büyük damar tutulumu ise hastaların %7-49'unda önemli bir bulgu olarak ortaya çıkar. Venöz lezyonlar arteryel lezyonlara göre daha siktir. Venöz tutulum sıklığı %6.3-23 oranında bildirilmektedir.

Venöz tutulum daha çok alt ekstremitelerde süperfisiyal tromboflebit veya derin ven trombozu (DVT) şeklinde görülür. Yüzeyel tromboflebitin hastaların yaklaşık yarısında göröldüğü ve DVT'nin habercisi olabileceğı düşünölmektedir. Üst ekstremitte venlerinde tutulum nadir görülür. BH'da majör ven tutulumu yüksek mortalite ile birlikte dir. BH'da arteryel lezyonlar, arterlerde tıkanıklık ve anevrizma oluşumuna yol açabilir. Arter tutulumu trombozdan çok anevrizma oluşumuna neden olur (140,184).

3.1.6.8. Nörolojik tutulum

Behçet hastalarının %5-10 kadarında görülür. Nörolojik tutulum hastalığın ilk beş yılında görülür ve yüksek morbidite riski taşır. Mortalite oranı ise %5-10 civarındadır. Genellikle erkeklerde daha sık gözlenir (4,178).

Lezyonlar en sık beyin parankiminde daha sonra omurilik, serebellum ve meninklerde saptanır. Serebral atrofi gelişebilir. BH'da kronik hastalık ve/veya steroid psikozuna bağlı psikiyatrik bozukluklar da görölebilir. Hastalarda akut bir

nörolojik atak görülmesi dahi düzenli nörolojik inceleme yapılması önemlidir (224,258).

3.1.6.9. Gastrointestinal sistem (GİS) tutulumu

GİS tutulumunun sıklığı etkilenen popülasyona göre farklılık gösterebilir. Japonya'da BH'larının 1/3'ünde GİS tutulumu görülürken ülkemizde ve Akdeniz ülkelerinde nadirdir.

Klinik olarak semptomların geniş bir yelpazesi vardır. Disfaji, iştahsızlık, kolik tarzda karın ağrısı, bazen kanlı ishal, kusma, bulantı, şişkinlik hissi gibi yakınmalar görülebilir. Tutulum en sık ilioçekal bölgededir. İnflamasyon Crohn hastalığında olduğu gibi segmental mukozal inflamasyon ve ülser lezyonlar şeklindedir. Histopatolojik olarak granülom oluşumu Crohn hastalığını BH'dan ayırmada çok önemli bir bulgudur. BH'da GİS tutulumu ilioçekal bölgedeki ülserlerin perforasyon riski nedeniyle kötü prognostik bir faktör olarak değerlendirilir (18).

3.1.6.10. Diğer bulgular

Kardiyak tutulum nadir olarak görülmektedir. Fakat perikardit, endokardit, miyokardit, pankardit, kapak lezyonları, koroner vaskülit ve buna bağlı miyokard infarktüsü, ventriküler anevrizma, dilate kardiyomyopati olguları bildirilmiştir. Geniş bir seride dört endomiyokardiyal fibrozis olgusu tanımlanmıştır. Literatürde semptomatik olmayan hastalarda sessiz miyokard iskemisi ve sol ventrikül fonksiyonlarında bozulma bulunduğunu gösterir yayınlar vardır. Epididimit; hastaların yaklaşık %5'inde görülür. Bir iki haftada kendiliğinden geçer, ancak tekrarlama eğilimindedir (81,165). Hastaların %5'ten azında pulmoner arter anevrizması, pulmoner arter veya ven oklüzyonu, pulmoner infarktüs, plevral sıvı

ve fibrozan alveolit şeklinde pulmoner tutulum görülür. Klinik de tekrarlayan hemoptiziler, öksürük ve yan ağrısı gibi yakınmalara neden olur (36).

3.1.7.Laboratuvar Bulguları

Behçet hastalarında tanı koymaya yönelik spesifik bir laboratuvar yöntemi olmamasına rağmen sistemlerin detaylı fiziksel muayeneleri tanı koymada çok yardımcı olur. Fakat bazı hastalarda orta düzeyde anemi ve periferde nötrofil baskın bir lökositöz gözlenmektedir (1,62). Hastalık aktivitesinin spesifik bir belirteci bulunmamaktadır. Bu nedenle, yeni yapılan çok merkezli çalışmalar hastalık aktivitesinin toplam indeksini özetleyebilmek için, BH'nın klinik özelliklerini tanımlamışlardır (130).

BH'nın laboratuvar bulguları nonspesifiktir. Eritrosit sedimentasyon hızında artış ve C-reaktif protein (CRP) yüksekliği gözlenirse de hastalık aktivitesi ile doğrudan korelasyon göstermez. Aktif orogenital, göz ve SSS tutulumuna rağmen normal olabilir. Romatoid faktör ve antinükleer antikorlar negatiftir. Serum immünglobulinlerinde ve C9'da daha belirgin olmak üzere serum komplemanlarında artış gözlenebilir (2).

3.1.8.Tanısı

Hastalığın tanısı klinik olarak konur, özgül bir laboratuvar testi yoktur. Tanı için majör kriterler oral aft, genital ülser, göz ve deri tutulumudur. Minör kriterler ise artrit, gastrointestinal lezyonlar, epididimit, damarsal lezyonlar ve merkezi sinir sistemi tutulumudur. Bu belirtilere göre hastalık komplet, inkomplet, şüpheli ve olası olmak üzere 4 grupta incelenebilir. Dört majör kriterin de olması halinde hastalık komplet BH olarak tanımlanır. Üç majör kriter veya göz tutulumu ile birlikte bir majör kriter varsa inkomplet denir. Göz tutulumu hariç 2 majör belirti

varsa şüpheli, 1 majör belirti varsa olası olarak adlandırılır (20). Bir başka tanılandırma ise Uluslararası Çalışma Grubu kriterleridir. Tekrarlayan oral aftla birlikte şu dört bulgudan en az ikisinin olması gerekir: Tekrarlayan genital lezyonlar, göz tutulumu, deri tutulumu, paterji testi pozitifliği (99).

3.1.9. Seyir ve Prognoz:

BH relaps ve remisyonlarla seyrederek. Klinik seyri ve prognozu çok değişkendir. Genellikle genital ülser, oral aft, ya da göz tutulumu ilk ortaya çıkan lezyonlardır. SSS ve vasküler tutulum ise daha geç dönemlerde gelişir. Özellikle ilk beş-yedi yıl ataklar siktir, sonrasında ataklar arası daha seyrekleşir. Göz semptomları geç dönemde kronikleşir, uzun dönemde körlükle sonlanabilir. Ön üveitin daha baskın seyrettiği olgularda prognoz daha iyidir. Yapılan bir çalışmada, olguların %74'ünde 6-10 yıl içinde yasal körlük geliştiği bildirilmiştir. Göz bulgularının başlamasıyla görme kaybı arasındaki sürenin ortalama olarak 3.36 yıl olduğu bildirilmiştir (243). SSS tutulumu ve GİS tutulumu sonrası gelişen bağırsak perforasyonu veya vasküler tutulumla bağlı büyük arter rüptürü ortaya çıkmazsa yaşam süresi genellikle iyidir. Hastalık SSS, vasküler, GİS tutulumun sık olduğu gençlerde, erkeklerde ve Japonlar'da ağır seyretmektedir (22). Kural-Seyahi ve ark. 20 yıllık takip sonuçlarını yayınladıkları çalışmalarında, mortalite ve morbidite oranlarının genç erkeklerde anlamlı derecede fazla olduğunu, ayrıca göz bulgularının başlamasının ve yarattığı hasarın en fazla hastalığın birkaç yılı içinde olduğunu bildirmişlerdir. Göz tutulumunun geç ortaya çıktığı olgularda görme prognozunun daha iyi olduğunu bildirmişlerdir (125).

3.1.10. Tedavisi

BH'nin tedavisinde primer amaç; semptomları kontrol etmek, organ hasarını önlemek ve inflamasyonu baskılamaktır. Tedavi, tutulan organlara ve tutulum şiddetine göre belirlenmelidir. Çoğu zaman kombinasyon tedavisi tercih edilmelidir. Fakat hayatı tehdit edici SSS ve büyük damar tutulumu olan olgularda konvansiyonel tedaviler her zaman yüz güldürücü olmayabilir (242).

3.1.10.1.Mukokütanöz lezyonlarda tedavi

Topikal steroidler, oral ve genital ülserlerin tedavisinde yararlıdır. Kolşisinin etkisi mukokütanöz lezyonların tedavisinde nötrofil fonksiyonlarını inhibe eder. Talidomidin de oral ve genital ülserlerle beraber psödofollikülit tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. Kolşisine dirençli eritema nodozum tedavisinde sistemik kortikosteroidlerden fayda görülebilir. Streptokokların hastalık patogenezindeki olası rolleri düşünülerek yapılan streptokok eradikasyonuna yönelik benzatin penisilin tedavisinin de mukokütanöz lezyonlar üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir (5).

3.1.10.2.Göz bulgularında tedavi

Göz tutulumu olan hastaların %25'inde tedavi olmasına rağmen körlük gelişmektedir. Erken hastalık başlangıç yaşı ve erkek cinsiyet göz bulguların seyrinde kötü prognostik faktörlerdendir. Tedavide amaç atakların sıklığını ve şiddetini azaltmaktır. Anterior üveit ataklarında topikal midriyatik damlalar ve steroidli damlalar önerilmektedir. Çünkü bu damlalar hem etkili hem de yan etkisi az ajanlardır. Posterior üveit ataklarında bazen topikal enjeksiyon ve sistemik oral steroid kullanımı önerilmektedir. Tek ajan olarak oral kortikosteroid kullanımının oküler ataklarda palyatif etkisinin yanı sıra görmeyi artırıcı etkisi yoktur. Hatta

sekonder retinal tromboza ve katarakta da neden olabilir. Sitotoksik ajanlardan azatioprin, klorambusil ve siklofosamid %50-70 oranında oküler atakların oluşmasını engeller. Azatioprin ve klorambusilin uzun dönem görme üzerine olumlu etkileri de belirtilmiştir (179,244). Kolşisin, kortikosteroid, azatioprin ve klorambusil gibi konvansiyonel tedavilere dirençli hastalarda siklosporin %70-80 oranında etkili bulunmuştur. Bazı hastalarda siklosporine bağlı irreversible nörolojik hasar görülebilir. Bu nedenle nörolojik bulguları olan hastalarda ilaç kontrendikedir (157-259).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda IFN- α 'nın, BH tedavisinde yüz güldürücü etkileri ortaya konmuştur. Bir çalışmada, oküler tutulumu olan Behçet hastalarında %95 tedavi cevabı olduğu görülmüştür. Bir başka çalışmada da IFN2 α ile oküler semptomların tedavisinde dört ay içerisinde %67 komplet remisyon oranı elde edilmiştir (35).

3.1.10.3.Artritli olgularda tedavi

Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ve kolşisin BH'ye bağlı artrit semptomlarının tedavisinde etkili ajanlardır. Yanıtsız hastalarda sülfasalazin, artrit bulgularının kontrolünü önemli ölçüde sağlamaktadır. Genellikle diğer hastalık düzenleyici ajanlar nadiren kullanılmaktadır (35).

3.1.10.4. Gastrointestinal semptomlarda tedavi

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılan ajanlar. BH'nin GİS lezyonlarının tedavisinde de kullanılır. Sülfasalazin ve kortikosteroidler temel ilaçlardır. Steroid dozu hastalığın ciddiyetine bağlıdır (242).

3.1.10.5. Santral sinir sistemi (SSS) lezyonlarında tedavi

SSS tutulumunda yüksek doz oral steroidle beraber, pulse steroid ve siklofosfamid tedavisi iyi bir alternatiftir. Aseptik akut menenjit veya meningoensefalit hastalığının erken fazında steroid tedavisine iyi cevap verir. Ancak kronik, ilerleyici SSS hastalığı kullanılan tedavilere dirençlidir (242,179).

3.1.10.6. Büyük damar tutulumunda tedavi

Steroid ve sitotoksik ajan kombinasyonu arteryel tutulum tedavisinde kullanılır. Antikoagülan ve antiplatelet ajanlar ise derin ven trombozu (DVT)'nun tedavisinde kullanılır. BH'na bağlı damar tutulumu olan hastalarda IFN α tedavisinin etkili olabileceğine dair kontrolsüz bir ön çalışıma vardır (152).

Bu çalışma kapsamında BH'da gözlenen immün yanıtta rolü olan regülatör T hücreler ve immün yanıt ve enflamasyonu düzenlemede rolü olan bazı parametreler irdelenecektir.

3.2.Treg Hücreleri

Bağışıklık sistemimizin ana görevi, dokulara zararı en aza indirerek enfekte hücreleri yok etmektir. Bununla beraber organizmayı, patojenlerin ve mikroorganizmaların istilasından da korumak da görevlerindedir. Regülatör T (Treg) hücrelerin, bağışıklık sistemi ile tolerans arasında ki dengelerin kontrol edilmesinde büyük bir rolü olduğu düşünülmektedir. Treg hücrelerinin çeşitli tipleri tanımlanmıştır. Bu tanımlamada hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonu, sitokin üretimi ve hareket mekanizmaları temel alınmıştır. Treg hücre tiplerinin önemli bir bölümünü antijenle indüklenmiş veya adaptif Treg hücreleri oluşturur. Bu adaptif Treg hücreleri çoğunlukla, immünosüpresif sitokinler olan interlökin-10 (IL-10) ve/veya transforming growth factor- β (TGF- β) üretimi ile tanınır. Treg

hücre tiplerinin diğere önemli bir bölümünü ise doğal olarak meydana gelen ve timusta üretilen CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri oluşturur. Doğal Treg hücreleri ise transkripsiyon faktörü Foxp3'ü (Transcription factor forkhead box P3) sürekli eksprese etmeleri ile tanınır (46). Normal şartlarda otoimmüniteden korunmak için Treg hücrelerinin sayıları ya da fonksiyonları bir dengede tutulur. Fakat süregelen bağışık yanıtlar düzenlenirken sayıları artıp azalabilir. Treg hücre sayılarının artması ile azalan immünite tümör gelişimi veya hastalıklara neden olur. Treg hücre sayılarının azalması ise otoimmüniteyle sonuçlanır. Böylece farklı immün efektör hücrelerin büyük topluluğu içerisinde yeni keşfedilen regülatör T hücreleri, immün yanıtları kontrol etmede ve self reaktif T hücrelerini yok etmede önemli bir rol oynar (46).

3.2.1.Regülatör T hücrelerin tanımlanması

Treg hücreleri, 1970'li yılların başlarında ilk olarak baskılayıcı hücreler olarak tanımlandı (73). Bu baskılayıcı hücreleri doğru olarak tanımanın ve izole etmenin güçlükleri nedeniyle çalışmalar 1980'li yılların sonlarına bırakıldı. 1995'de, Sakaguchi ve arkadaşları, CD4⁺ Treg hücreleri için interlökin-2 reseptor α -zincirini (CD25) fenotipik bir belirteç olarak tanımladılar (199).

3.2.2. Regülatör T hücrelerin gelişimi ve kökenleri

Profesyonel (doğal) Treg hücreleri, timusta gelişir. Adaptif Treg hücreleri ise, sub-optimal antijene maruz kalması ve/veya ko-stimülasyonun özel koşulların altında olgun T hücrelerinin aktif hale gelmesinin sonucu olarak gelişebilir. Doğal Treg hücreleri, timik stromal hücreleri tarafından sunulmuş olan self- peptitler ve stromal hücrelerin TCR (T cell receptor) etkileşimleri süresince kortekste pozitif olarak seçilir (148). Timus fonksiyonel olarak matür T hücre subpopülasyonu gibi

CD25⁺CD4⁺ Treg hücrelerinin de çoğunu üretir. Normal timus self-reaktif CD4⁺ efektör T hücrelerini sürekli olarak üretebilir ve bu hücreler self-reaktif doğal Treg hücreleri tarafından baskılanabilir. Bu aktivite ise timusun üçüncü fonksiyonu olarak tanımlanmıştır (209). Doğal Treg hücreleri fetal ve neonatal gelişiminin erken evreleri boyunca timusta gelişir. Yine de, doğal Treg hücrelerinin, olgunlaşmasının hücresel esası, antijen sunumunda ki rolü, TCR kullanımlarının çeşitliliği ve timik mikroçevre ile etkileşimler, şu ana kadar açık değildir. Çift transgenic fare sistemini kullanarak, antijen-spesifik Treg hücrelerinin, yüksek-affiniteli antijen tanınmasının sonucu olarak geliştiği gösterildi. Bazı timositlerin, negatif seçimden neden kurtulduğu ve Treg hücrelerine neden ayrıldığı halen daha bilinmemektedir (104). Onların medullar epitelyal hücre adaları tarafından sunulan doku antijenlerini seçerek tanıdığı düşünülmüştür. Bu durum ise kuvvetli bir Treg hücre yanıtının oluşmasına neden olur. Birkaç çalışmanın sonucu, farede CD4⁺CD25⁺ T hücrelerinin seçim yeri olarak timik medullayı işaret ederken bazı çalışmalar da, CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerinin pozitif seçim yeri olarak timik korteksi işaret etmektedir (24). Treg hücre seçimi, temel olarak diğer timositlerin seçim süreçlerine benzer fakat tek fark hücresel etkileşimlerin istendiği zaman başlamasıdır. Bu isteklilik hem Treg hücrelerinin seçimine neden olabilen hemde bu hücreleri anarjiye götürebilen bazı sinyallerin doğmasına sebep olduğu gibi negatif seçimden onları koruyan antiapoptotik moleküllerin üretimine de neden olabilir. Bu koruyucu molekülün, anti apoptotik aktivitede rol oynayan glucocorticoid-induced TNF reseptörü (GITR) olabildiği düşünülmüştür (175).

Son zamanlarda doğum sonrası timusta yüksek düzeyde CD25 ekspresyon eden olgun CD4⁺ ya da CD8⁺ timositlerin tiplerinin varlığı ve CD4⁺CD25^{high} regülatör hücrelerin sirkülasyonunun bazı özellikleri gösterildi (50, 220).

Bazı yazarlara göre, Treg hücreleri timustan çıktığında, naif CD45RA⁺GITR⁻ T hücreleri olarak dolaşıma girerler ve gerçekten bu hücreler poliklonal aktif efektör hücrelerin çoğalmasını baskılayabilir. Ancak henüz tepkisel kapasitesi zayıf veya otoantijenlere karşı baskılayıcı cevaplarda yetersiz olduğu görülmüştür (50). Bu yetenek, daha çok hafıza hücre benzeri bir fenotip kazandığı fetal ikincil lenfoid organların içinden geçişi sırasında kazanılır. Ancak, bazı geleneksel CD4⁺CD25⁻ Treg hücrelerinin, periferde CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerine dönüşmesi de göz ardı edilmemelidir (250). Sonuç olarak aktive Treg hücreleri CD69, GITR ve CD45RO sunar ve yanıtın geniş bir kısmını, yani timik seçimden kaçan otoreaktif T efektör hücreleri baskılayabilir (148).

3.2.3. Regülatör T hücrelerinin tipleri

İnsan ve hayvanlarda T regülatör hücrelerinin bir kaç tipi tanımlanmıştır. Fare modellerinden elde edilen geniş veriler temel alındığında, Treg hücrelerinin iki alt grubu özellikleri ve etki mekanizmaları bakımından ayrılır. Doğal (CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri) regülatör hücreler ve profesyonel Treg hücreleri olarak da adlandırılırlar. Timusta gelişir ve otoimmün tepkileri potansiyel olarak engelleyebilir. Adaptif regülatör hücreler olarak adlandırılan ikinci altgrup sub-optimal antijene maruz kalma sırasında ortaya çıkan özel koşullar altında olgun T hücrelerinin aktifleşmesi sonucu gelişir (26).

Bazı çalışmalarda antijenle indüklenebilen (adaptif) Treg hücrelerinin çeşitli tipleri gösterilmiştir. Bu indüklenebilen Treg hücrelerinin supresif

fonksiyonu supresif sitokinlerin (IL-10 ve TGF- β) üretimi ile ilişkilidir. Bu yüzden, indüklenebilir Treg hücrelerinin sınıflandırılmasında farklı supresif sitokinlerin ekspresyonu temel alınmıştır. CD4⁺ regülatör T hücre tip 1 (Tr1), yüksek düzeyde IL-10 ve orta düzeyde IL-5, IFN- γ ve TGF- β üretirken, IL-2 ve IL-4 gibi sitokinleri üretemezler (195,196). T helper 3 (Th3) Treg hücreleri ise TGF- β 'yi yüksek düzeylerde eksprese edebilir (261).

Tablo.3.1. T regulator hücre tipleri ve özellikleri

HÜCRE TİPİ	FENOTİP	İMMÜNSUPRESİF MEKANİZMASI
CD4 ⁺ REGÜLATÖR T HÜCRELER		
I-TİMUSTA TÜRETİLEN DOĞAL OLUŞAN TREG	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ hücre temasına bağımlı	Hücre-hücre temasına bağımlı in vitro (CTLA-4); hücre-hücre teması ve sitokin-bağımlı in vivo (IL10 ve TGF- β)
II-PERİFERDE İNDÜKLENEREK DOĞAL OLUŞAN TREG	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ Foxp3 ekspresyonu değişkendir	hücre temasından bağımsız
Tr1 HÜCRELER	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ IL-10 ^{hi}	Hücre-hücre teması/sitokin aracılı (IL-10 üretir)
Tr3 HÜCRELER	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ TGF- β ^{hi}	Sitokin aracılı (TGF- β üretir)
TGF- β /IL-10 çift pozitif CD4 ⁺ Treg	TGF- β /IL-10 çift pozitif CD4 ⁺ CD25 ⁻ FOXP3 ⁻	Sitokin aracılı (IL-10 ve TGF- β üretir)
CD8 ⁺ REGÜLATÖR T HÜCRELER		
I-T SUPRESÖR HÜCRELER (Ts)	CD8 ⁺ CD28 ⁻	Hücre- hücre temasına bağımlı(CTLA-4)
II-IL-10 ÜRETEN CD8 ⁺ T HÜCRELER	CD8 ⁺ IL-10 ⁺	Sitokin aracılı (IL-10 üretir)

Tablo.3.1'de Treg hücre tipleri ve özellikleri verilmiştir. Timik Treg hücrelerinin, timik seleksiyondan kaçan otoreaktif T hücrelerin periferik tolerans mekanizması ile alakalı olduğu düşünülmektedir (211). Hem CD4⁺CD25⁺ hem de CD8⁺CD25⁺ insan timositleri, olgun Treg hücrelerinin ortak özellikleri olan yüzey

CCR8 ve TNFR2 (Tumor necrosis factor receptor superfamily 2) ve sitoplazmik CTLA proteinine ek olarak CTLA-4, Foxp3 ve GITR mRNA'yı ekprese eder. Bu hücreler, aktivasyonu takiben çoğalmaz veya sitokin üretmez, ancak CTLA-4'ü ve TGF- β 1'i yüzeylerinde sunarlar. Bu hücreler CTLA-4 ve TGF- β 1'in beraber aktivasyonu ile temasa bağlı mekanizma yoluyla hedef T hücrelerinde interlökin-2 reseptör alfa (IL-2R α) zincirinin inhibisyonuna neden olarak, otolog CD4⁺CD25⁻ timositlerinin çoğalmasının baskılar. Hem CD4⁺CD25⁺ hem de CD8⁺CD25⁺ Treg timositleri, Th1 hücreleri üzerinde kuvvetli baskılayıcı faaliyeti gösterirken Th2 hücrelerinde çok daha az baskılayıcıdır. Timusta ortaya çıkan ve gelişen Treg hücreleri, otoimmün hastalıklarının önlenmesi ve self toleransın sürdürülmesinden sorumludur. Th1 hücreleri, Treg timositlerinin supressif aktivitelerine yüksek ölçüde hassastır ve sonuç olarak otoantijenlere karşı Th1 ilişkili immün cevap üzerinde önemli rolleri vardır (148).

Son zamanlarda, hem CD25⁺'in farklı çeşitleri hem de CD25⁻ Treg hücre popülasyonu, tanımlandı (103). Doğal olarak meydana gelen ve timusta üretilen CD4⁺ CD25⁺ Treg'ler, total perifer CD4⁺ hücrelerinin % 5-10'nu oluşturur. Bu hücreler immüsupresif özellikli bir T hücre topluluğudur (200). Treg hücreleri CD25'i sunmalarının yanında birkaç aktivasyon belirteci de sunarlar. Bu belirteçler; GITR, OX40 (CD134), L-selectin ligand (CD62L) ve CTLA-4 (CD152)'tür. Bu belirteçler aktive T hücresi subsetleri ve çeşitli antijen-sunan hücrelerde (APCs) farklı oranlarda sunulduğu için hiç birinin tek başına Treg hücreleri için tanımlayıcı olmadığı gösterildi. Daha yeni yapılan çalışmalarda, Treg hücrelerin tanımlanması için daha özel bir intrasellüler belirteç olarak Foxp3 bulundu (67, 97). Foxp3, CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonları

için önemli bir kopyalama faktörüdür. Sakaguchi ve ark. Foxp3'ü Treg'lerde regülatör fonksiyonun bir belirteci olarak ayırt etmişlerdir (199). Foxp3, hücre içi yerleşim gösterir. Canlı hücrelerden izole edilmez (7). Foxp3'de mutasyonla oluşturulan fonksiyon kaybı hem fareler de hem de insanlarda Treg hücrelerinin yokluğu ile sonuçlanır. Bu durum da insanlarda immunedysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) ve farelerde scurf fare olarak bilinen ciddi otoimmün bozukluklu bir fenotipe neden olur (264).

Ayrıca, Treg'lerde Foxp3'ün biyolojik fonksiyon olarak Rel-family transkripsiyon faktörleri olan; NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) ve NFκB (nuclear factor kappa B) aktivasyonunu bloke edebildiği gösterilmiştir ve sonuç olarak; IL-2 ve diğer sitokin genleri (IL-4 ve IFN-γ) için bir transkripsiyonal baskılayıcı olarak görev yapar. Bu suretle hücreyi immün stimulatör görevlerini yapmamak üzere programlar (197, 273). İnsanlarda Foxp3 ekspresyonu, negatif feedback olarak süren immün yanıtı kontrol etmek için aktive T hücrelerinde de gösterilmiştir (253).

CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerinin timus orjinli mi yoksa çevredeki olgun T hücrelerinden mi, oluşup oluşmadığı halen süren bir tartışmadır. Muhtemelen, her iki kaynağın da önemli bir rolü oynadığı düşünülmektedir. Erken yaşam döneminde, Treg hücrelerinin üretiminde timus epitel yapıları ve Hassal cisimciği önemli bir rolü oynar (142, 257). Treg hücrelerinde soy tanımlama faktörü olan Foxp3'ün ekspresyonu, Treg hücrelerinin ayrı bir T hücre soyu olduğunu desteklemektedir. Kendiliğinden timektomiye maruz kalan neonatal farelerde otoimmün hastalıklar gelişmiştir (190,214). Diğer yandan, insanlarda timusun foksiyonu puberteden sonra büyük ölçüde azalır. Buna rağmen Treg hücreleri

varlığını yaşam boyunca devam ettirir. Bu durum Treg hücrelerinin; kendi kendine yenilenebilir bir hücre havuzundan çıktığını, uzun süre yaşamını sürdürebildiğini ve timus dışından orjin alabildiğini gösterir. Vukmanovic-Stejic ve arkadaşları bir çalışmalarında, insanlarda $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg hücrelerin fonksiyon ve sayıca varlıklarını 70'li yaşlardan sonra bile, sürdürdüklerini ve Treg hücrelerinin, muhtemelen, sadece timus soylu Treg'lerden türemediğini gösterdi. Bu sonuç, Treg hücrelerinin, $CD4^+CD45RO^+CD25^-Foxp3^-$ hafıza T hücrelerinin çevresel havuzundan oluştuğunu düşündürmüştür (239).

Eşit olarak indüklenen Treg hücrelerinin her iki tipi de Th1 kadar Th2 ilişkili immün yanıtları da baskılar. Tr1 ve Th3 Treg hücrelerinin, dentritik hücrelerle uyarıldıktan sonra, dinlenme halindeki T hücrelerinden köken aldığı gösterilmiştir (61). Bu durum dentritik hücre tipine ve aktivasyon durumuna bağlı olarak oluşur. Ayrıca doğal olarak oluşan Treg hücreleri ve indüklenebilir Treg hücrelerinin soyu ilişkilidir. Bu durum $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg hücrelerinin integrin ekspresyonu ile ilişkilidir. $\alpha4\beta7$ integrin sunumu, Tr1 hücrelerinden IL-10 üretimini artırırken, $\alpha4\beta1$ integrin sunumu, Th3 hücrelerinden TGF- β üretimini artırır(219). Son zamanlarda, immatür ve matür dentritik hücrelerini de içeren perifer kan lenfositlerinin invitro kültüründen sonra indüklenebilen TGF- β ve IL-10 çift pozitif $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ adaptif Treg hücrelerinin ekstra bir topluluğu tanımlandı (47).Yine bir başka Treg hücresi olarak immün sistemi kontrol eden, indüklenebilen Treg ve doğal oluşan $CD4^+$ Treg hücreleri ile ilişkili olan $CD8^+$ T supressör hücreleri tanımlanmıştır. $CD8^+$ T supressör hücreler bir oligoklonal T hücre popülasyonundan türetilmiştir. Bu hücreler yüzeylerinde CD28 ekspres etmezler fakat $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri ile aynı düzeyde Foxp3, GITR, CTLA-

4, OX-40, ve CD62L eksprese ederler (173, 208). $CD8^+CD28^-$ hücreler, natural killer T hücreleri (NKT), $\gamma\delta$ T hücreleri de Treg hücre ailesini ihtiva ederler (221).

Treg hücreleri olmayan neonatal timektomili farelere, normal farelerden $CD4^+CD25^+$ T hücreleri transfer edildiğinde multiorgan otoimmün hastalıkların baskılandığı gözlenmiştir. Bu durum $CD4^+CD25^+$ T hücrelerinin self toleransta merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (211). Treg hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getirmek için kullandıkları mekanizmalar şöyle özetlenebilir.

3.2.4. Supresyon mekanizmaları

Hem doğal olarak meydana gelen hem de indüklenebilen her iki grup Treg hücre, supresif fonksiyonlarını başlatabilmeleri için T hücre reseptörüne ihtiyaç duyarlar (213). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda Treg hücrelerinin, T hücre aktivasyonunu ya da fonksiyonunu baskılama mekanizmaların karışık olduğu görülmüştür. Bunlardan en önemlileri,

1-Hücre- hücre teması:

Bir kaç invitro çalışma $CD4^+CD25^+$ Treg hücrelerinin, efektör T hücreleri ile direkt bir hücre-hücre temasına girerek efektör T hücrelerinin IFN- γ üretimini ve hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir. Muhtemelen bu baskılamaya, hücre yüzeylerinden eksprese edilen GITR ve CTLA-4 belirteçleri aracılık etmektedir (212).

Supresif hücrelerde eksprese edilen CTLA-4'ün efektör hücrelerdeki CD80/CD86 ile ligasyonu, supresif sinyallerin geçişine neden olur ve bu durum efektör T hücrelerinin fonksiyonlarının inhibisyonu ile sonuçlanır (186). Effektör T hücre aktivasyonunu etkileyen Treg hücrelerindeki başka bir mekanizma ise DC fonksiyonlarının düzenlenmesiyle oluşur. Supresif hücrelerdeki

CTLA-4 ile DC'deki CD80 /CD86'in ligasyonu ile triptofanı redükte edebilen bir katabolik enzim olan indoleamine 2,3-dioxygenase'n (IDO) aktivasyonu ve ekspresyonu meydana gelir (65). Kùltür ortamında redükte triptofan konsantrasyonunun T hücre silinmesi ve T hücre aktivasyon azalması ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (172). CTLA-4 bloke edilerek farelerde (örneğin: inflamatuvar bağırsak hastalığı) ve insanlarda (örneğin: melanom hastaları) Treg hücrelerinin supresif fonksiyonları gösterilmiştir (192). Bu sonuçlar; CTLA-4'ün Treg hücrelerinin supresif aktivitesinde fonksiyonel olarak önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Diğer taraftan, CTLA-4 geni yok edilmiş farelerin, Treg-spesifik transkripsiyon factor, Foxp3 eksprese eden hücelere sahip olduğu ve bu hücrelerin supresif yetenekleri olduğu gözlenmiştir (225, 229). Bu gözlemler, CTLA-4'ün, Treg fonksiyonu için gerekli tek aksesuar molekül olmadığını göstermiştir. CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerinin hücre-hücre temasına bağlı immün supresyonuna hücrede eksprese edilen TGF- β 'nın da aracılık ettiği rapor edilmiştir (174). Sonraki çalışmalarda TGF- β eksik farelerden fonksiyonel olarak supresif CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerinin izole edilmesi bazı tartışmalara yol açmıştır (213).

Yine IL-10 sekrete eden Tr1 hücrelerinin in vitroda T hücre çoğalmasını inhibe etmesi, Tr1 hücre süpresyonunun IL-10 üretiminden bağımsız olduğunu gösterilmiştir (222). Temas-bağlı supresyon mekanizmalarının daha çok in vitroda baskın olabileceği düşünölmüştür.

İkinci supresyon mekanizması ise soluble faktörlerdir;

2- Soluble faktörler:

Yukardaki çalışmalar Treg hücreleri tarafından oluşturulan T hücre supresyonu temasa bağımlı, ancak sitokinden bağımsız olduğunu akla

getirmektedir. Fakat diğer invitro çalışmalar, Tr1 ve Th3 Treg hücrelerinin supresif aktiviteleri için sırasıyla IL-10 ve TGF- β gibi immünsupresif sitokinlere ihtiyaç duyduklarını açıkça göstermiştir (135, 231). Treg'lerin invitro koşullarda supresif mekanizmalarının kesin bir açıklaması yapılamamıştır. Ancak, bazı invitro çalışmalarda ise Treg aracılı supresyonda immün supresif sitokinlerin rolü gösterilmiştir. Treg hücrelerinin supresyonu, inflamasyonun büyüklüğü ve hedef organın özellikleri gibi birçok fizyolojik faktörlerden etkilenebilmektedir. Gerçekten de IL-10 eksikliğinin kolit gibi bazı otoimmün hastalıkları meydana getirdiği gösterilmiştir (9, 53). Fakat gastrit gibi bazı otoimmün hastalıklar ise IL-10'dan bağımsız olarak oluşabilmektedir. Diyabet gibi otoimmün hastalıklar ise, TGF- β 'ya bağımlı olarak meydana gelebilir (247).

CD4⁺CD25⁺ Treg hücreler granzim-A sunumunu aktif hale getirir ve perforin bağımlı mekanizmalar ile aktive olan CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerini öldürür (78). Ayrıca Treg hücreler, hem insanlarda hemde farelerde sitokinlerin sekresyonu üzerinden DC olgunlaşması ve aktifleşmesini de engeller. Bunun nedeni, IL-10'un DC hücrelerin ko-stimülatör molekülleri ve MHCsınıf-II ekspresyonunu azaltarak antijen sunma kapasitelerini bozmalarıdır (167). TGF- β da MHC sınıfı II ekspresyonunu azaltır ve ko-stimülatör moleküllerinin yüksek düzeyde ekspresyonunu engeller (72). Sağlıklı gönüllülerden alınan CD8⁺ T süpresör hücrelerinin DC'lerde ko-sitümülatör moleküllerin (CD80/CD86) fazla salınımını inhibe ettiği ve DC'lerde önemli ölçüde Ig-like transcripts 3(ILT3) ve Ig-like transcripts 4(ILT4) sunumunu arttırdığı gösterilmiştir (43). Ig-like inhibitör reseptör ailesi üyesi olan bu ILT molekülleri fonksiyonel olarak öldürücü hücre inhibitör reseptörleri ile ilişkilidir. Antijen sunan hücrelerde ILT'nin

bağlanması Ca^{+2} mobilizasyonunu ve tirozin fosforilasyonun inhibe eder (40,191). Üstelik böyle ILT sunan DC'lerin, $CD4^{+}$ alloreaktif T hücrelerinin, immün süpresif fonksiyonlu Treg hücrelerine dönüştürmede etkisi olduğu gösterilmiştir (151).

3.2.5. Otoimmünitede Treg hücreleri

Treg'lerin fonksiyonel aktivitesinin azalması, otoimmün hastalıklara duyarlılığın artmasıyla sonuçlanır. Multiple sklerozis (MS), poliglandüler sendrom tip II, akut romatoid artrit (RA), tip I diyabet, sedef ve myastenia graves'li hastalarla, sağlıklı donörlerdeki hücreler kıyaslandığında sağlıklı kontrollere göre $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg hücrelerinin süpresif fonksiyonunda önemli ölçüde azalma olduğu gösterildi (17). Fakat bu hastaların periferik kanındaki $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg hücrelerinin yüzdesi sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında fark görülmemiştir. Bu durum hastalık gelişiminin nedeni olarak Treg'lerin sayılarından ziyade defektif Treg fonksiyonu olduğunu akla getirir. Ayrıca bazı otoimmün hastalıklarında, hastaların periferik kanında $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg'lerinin azalan düzeyleri de gözlenmiştir (17, 32). Yine de, periferik kanda Treg'lerin sayılarındaki bu azalmadan, kandan inflamasyon bölgesine Treg'lerin göçü, sorumlu olabilir. Gerçekten, RA veya juvenil idiyomatik artritli (JIA) hastalarda yapılan çalışmalar inflamasyon bölgesinde (mesela sinoviyal sıvıda) $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg hücrelerinin yüzdesi ile periferik kandaki yüzdesi kıyaslandığında inflamasyon bölgesinde önemli ölçüde artma gözlenmiştir (170). Gerçekten alerjik hastalarda Th2 cevabın bastırılmasında $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg hücrelerinin yetersiz fonksiyon yaptıklarına dair güçlü deliller vardır. Astmatik hastalarda ya da

alerjik kişilerde, Tr1 hücrelerinden sekrete edilen IL-10'nun disfonksiyonunun ya da azalmasının sağlıklı kişilerle benzerlik gösterdiği bulunmuştur (3,193).

3.2.6. Kanserde Treg hücreleri

CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerinin sayıları, akciğer, pankreas, göğüs, karaciğer, ve deri kanseri olan hastalarının tümörlerinin içinde, çevresinde ve periferik kanında yüksek olarak bulunmuştur (270). Üstelik Treg hücreleri, in vitro da anti-CD3 veya anti- CD3/ anti CD28 yolu ile uyarılan otolog periferik kan T hücrelerinin güçlü immün süpresif aktivite gösterdiği akciğer tümörlerinden izole edildi (271). Bu yüzden Treg hücrelerinin kanser hastalarında anti tümör immün yanıtları bozabildiği kabul edildi. Doğal oluşan CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerine ilaveten IL-10 üreten Tr1 hücrelerinin de kanser hastalarında, etkisiz antitümör immün cevaba yardım ettiği gösterilmiştir (153). Over tümürlü insanlarda plazmosit DC'lerin, IL-10 üzerinden anti tümör yanıtı baskılama yeteneği olan IL-10 üreten CD8⁺ regülatör T hücrelerini indüklediği gösterilmiştir (51).

Bu çalışmanın önemli bir parametresi olan Treg hücre yüzey molekülü CTLA-4 ise T hücre toleransının sürdürülmesinde en önemli hücre yüzey proteindir. CTLA-4, T hücre yüzeylerinde sunulan ko-inhibitör bir moleküldür ve CD28'in homologudur (6). CD152, CD28'in ligandı olan CD80 ve CD86'yı ortak kullanır ve T hücrelerde negatif sinyaller oluşturur. CD28 bağlanması T hücre proliferasyonuna ve IL-2 üretimine neden olurken, T hücrenin CD152 ile uyarılması T hücre cevapsızlığına neden olur ve IL-2 üretiminin azalması ile sonuçlanır (121). CD28, asıl istirahat halindeki T hücrelerin yüzeyinde eksprese edilir. CD152 ise, temel olarak tekrar kullanılmak için intrasellüler kesede

sunulur. Hücre yüzeyinde CTLA-4 sunumu, hücre yüzeyi ve intrasellüler stoklar arasında geçiş yolu ile düzenlenir. Sonra aktive T hücrelerinde hücre yüzeyine taşınır (141). CTLA-4 bu negatif düzenlemeyi, ya T hücre aktivasyonunu önleyerek ya da başlamış aktivasyonu sona erdirerek yapar (121). Bu düzenleme mekanizmaları ile ilgili pek çok görüş vardır. Bu mekanizmalar ile ilgili üç güçlü ihtimal tanımlanmıştır (203). Birinci olarak CTLA-4/CD28 ilişkili kostimulatörü hücreden kaybettirmek yolu ile etki eder (156). İkinci olarak, CTLA-4'ün CD80 ve CD86 ile bağlanıp aktivasyon yolunu engelleyerek inhibisyon yapar ya da tamamen bağımsız negatif sinyal yolu başlatabilir. Böylece, T hücre reseptörünün inhibisyonuna neden olur (25). Örneğin, son zamanlarda CTLA-4'ün insan T hücrelerinde sinyal iletiminde görev alan çok sayıda zincirin yeniden düzenlenmesini inhibe ettiği söylenmektedir. Böylece TCR sinyalini azalttığı gösterilmiştir (155). Üçüncü olarak, T hücre alt guruplarında (muhtemelen CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücreleri) sunulan CTLA-4 ligasyonu, hücrelerin çoğalması ve aktivasyonunu inhibe eden faktörlerin üretimine neden olur (15,192). CTLA-4, sadece aktive T hücrelerinde geçiçi olarak sunulur. Halbuki CD152, CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücrelerinde ise sürekli olarak sunulmaktadır (225, 201). CTLA-4 asıl olarak, CD4⁺CD25⁺ regülatör hücrelerinin fonksiyonlarında, periferik toleransın ve anerjinin oluşumunda, devamında ve korunmasında etkilidir (192, 225). CD152'nin blokasyonu, çeşitli modellerde otoimmünite oluşumuna ve toleransın bozulmasına neden olur. Yine, CD152'nin multipl sklerozlu ve insülin bağımlı diyabetes mellituslu sıçan modellerindeki blokasyonu otoimmün cevapları şiddetlendirmekte ve T hücre anerjisini bozmaktadır (202).

CTLA-4'ün Treg fonksiyonlarındaki rolü, yıllar süren tartışmalara yol açmıştır. İlk olarak normal farelerde CD4⁺CD25⁺ T hücrelerinin, CTLA-4'ü yüksek düzeylerde ifade ettiği bulundu (223, 225). İnsanda son aşamada CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high} T hücrelerinin in vitroda yüksek ölçüde baskılayıcı olduğu ve sadece CTLA-4'ü ekprese ettiği gösterildi (163). Devam eden veriler Treg hücrelerinin fonksiyonu için CTLA-4'ün gerekli olduğunu destekledi. mAb'nın verilmesi yolu ile CTLA-4'ün bloke edilmesi normal farelerde organa özel otoimmün hastalık ve kolit meydana getirir ve diyabete eğilimli non obez diabetik farelerde ise diyabeti şiddetlendirdiği gözlenmiştir (147). Doğal Treg hücreler yolu ile ekprese edilen CTLA-4'ün blokasyonu Treg hücre supresyonunun bitmesine neden olur (225). Foxp3 diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte CTLA geninin promoter (tanıtıcı) bölgesine bağlanarak CTLA-4'ün artan ekspresyonunu düzenler. Foxp3, Foxp3⁺ Treg hücrelerinden CTLA-4'ün yüksek düzeylerde sunulmasına destek olur (154). Son zamanda yapılan bir çalışma, CTLA-4 eksikliğinin Treg hücrelere spesifik olduğunu açıkça kanıtlamıştır. Bu çalışmadaki farelerin, çeşitli otoimmün hastalıklardan ve splenomegali ile birlikte olan lenfoproliferasyondan öldüğü ve Foxp3 eksikliğinde olduğu gibi yüksek miktarlarda IgE üretildiği de gözlemlendi. Treg-spesifik CTLA-4 eksikliği, Treg hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarını etkiler ama Treg hücrelerinin timik üretimini, in vivo hayatta kalmasını, aktivasyon durumlarını etkilemez (265).

Bu çalışmada, Treg hücrelerinde ve immün sistemde çok önemli fonksiyonları olan CTLA-4'ün, BH patogenezinde bir rol oynayıp oynamadığını araştırmak üzere son zamanlarda tanımlanan CTLA'nın çözünebilir bir formu olan sCTLA-4'ün serum düzeyleri incelendi. CTLA'nın çözünebilir bu

formunun da B7'e bağlanabildiği gösterilmiştir (187). CTLA-4 lenfosit aktivasyonunu baskılayan bir molekül olarak tanımlanmıştır. sCTLA-4 ise CTLA-4 reseptörünün membrana bağlı olmayan ve hücre dışına salınan şeklidir ve Treg hücrelerle ilişkili fonksiyonel bir belirteç olarak tanımlanmıştır. Bu çözünebilir molekül, CTLA-4 geninin, CTLA-4 molekülünün transmembran domeinini kodlayan üçüncü eksonu eksik olan alternatif bir kopyasından meydana gelir (181,187). sCTLA-4, alternatif olarak birleştirilen mRNA tarafından oluşturulur. mRNA tarafından kodlanan bu sCTLA-4 üç eksondan oluşur. Ekson 1; öncü proteinini, ekson 2; ligand bağlama domeinini ve ekson 4; molekülün sitoplazmik kuyruğunu kodlar fakat ekson 3 ile kodlanan transmembran domeinine sahip değildir. Değiştirilmiş kopya molekül, dinlenme halindeki CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde bulunur ve ekspresyonu aktivasyonundan 24-48 saat sonra inhibe olur. Yine 72-120 saat sonra prestimülasyon durumuna geri döner (187). CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerde, B hücrelerde ve lenfoid organlarda bulunan bu çözünebilir form, CD80 ve CD86 bağlanabilir (252). Olası bir immünolojik belirteç olarak sCTLA-4 düzeylerinin özellikle otoimmün hastalığı olanlarda yüksek olduğu bildirilmesine ve bu ilişki birkaç hastalıkta ortaya çıkmasına rağmen henüz kesinlik kazanmamıştır (233). sCTLA-4'ün düşük düzeyleri normal insan serumunda bulunur (187).

CTLA-4, fosfataz PP2A (Serin /Threonine protein phosphatase 2A) ve SHP-2 (Shatterproof 2)'a ek olarak phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)'ı da bağlar (131). Hücre ölümü olmadan enerjinin indüksiyonu ile ilişkili reseptör immün fonksiyon ve periferik toleransın devamında anahtar rol oynar. Bazı çalışmalarda CTLA-4 kullanılarak uyarılan sinyal mekanizmasının hücreyi, hücre

ölümüne neden olan indüksiyondan koruduğu ve uzun süreli enerjisi indüklediği gösterilmiştir. PI3-K ve protein kinaz B'nin (PKB/AKT) CTLA-4'ü aktif hale getirmesi, hücre ölümü olmadan T hücre enerjisine neden olur. CD3/CTLA-4 co-ligasyonu T hücre enerjisinin indüklendiği bazı özel şartlar altında hücreleri apoptosisten kurtarır. Bu durum PI3-K ve PKB/AKT bağlı olarak meydana gelir. PI3-K PKB /AKT yolunun inhibisyonu ise enerji olmadan hücre ölümüyle sonuçlanır (206).

Yine bu çalışmada Treg hücrelerini tanımlamak için önemli bir belirteç olan IL-7 reseptör α -zincir (CD127) düzeyleri belirlendi. CD127, Treg hücrelerini belirlemek için son zamanlarda tanımlanmış bir belirteçdir ve aktive T hücrelerinde saptanmıştır, Treg hücrelerinde ise bulunmamış veya düşük düzeyde saptanmaktadır (159).

Hücreler, CD25'i farklı düzeylerde sunmalarına göre sunmalarına ayrılabilirler. Buna göre regülatör olanlar CD25^{high}, aktive olanlar CD25^{int}, naif olanlar ise CD25^{low} olarak tanımlanır ve taşırlar (56). Bu ayırmda sırasıyla yüksek, orta, az düzeyde CD25 yararlı bir belirteçdir. Buna rağmen tek başına CD25 ekspresyon düzeyi, biyolojik bir örnekte Treg miktarını tahmin etmek için yeterli olmayabilir. Liu ve arkadaşları CD127 (IL-7R α) ekspresyonunun Treg hücrelerde az miktarda olduğunu görmüşlerdir. Bununda CD25^{high} sunumu ile birlikte olduğunu bildirmişlerdir. Treg hücrelerini CD4⁺CD25⁺ hücreler içerisinde ise CD4⁺CD25⁺CD127^{low} olarak tanımlamışlardır (143). Fonksiyonel analizlerde CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} hücrelerinin supresif yeteneklerinin fazla olduğu gösterilmiştir. CD127 ekspresyonu Foxp3 miktarı ile negatif koreledir. Foxp3, CD127 ile promoter etkileşimde olduğu için CD127'nin CD4⁺CD25^{high} Treg'lerde

ekspresyonu az olur. CD25, aktive ve memory T hücrelerinden de sunulduğu için Treg'lerin spesifik bir belirteci değildir. Bu nedenle CD127 ekspresyonu, aktive ve memory T hücrelerini, regülatör T hücrelerden ayırmada kullanılabilir (143).

Çalışmada BH'nın immünesinde inhibitör reseptörlerin önemli olup olmadığını anlamak adına inhibitör reseptör ailesinin önemli bir üyesi olan BTLA incelendi. Bunun için Behçetli hastaların (aktif-remisyon) ve kontrol grubundaki kişilerin periferal kanındaki CD4⁺ T hücre yüzeylerindeki BTLA (CD272) oranları tesbit edilmeye çalışıldı.

3.3. BTLA (B ve T lymphocyte attenuator,CD272)

İmmün sistem, çeşitli inhibisyon ve aktivasyon sinyalleri arasındaki denge ile düzenlenen dinamik bir süreçtir (198). İmmün regülasyonda inhibitör reseptör ailesi giderek genişlemektedir BTLA, immün inhibitör bir reseptör olarak son zamanlarda tanımlandı (198). T ve B hücrelerinde yaygın rolleri olduğu gösterildi. BTLA, immün yanıtlarda negatif düzenlemeye aracılık eder. İnhibitör reseptörleri, aktivasyon sinyallerini sınırlama ve bitirme yeteneklerinden dolayı son yıllarda önem kazanmıştır (191).

Inhibitör reseptörlerin bazı ortak özellikleri vardır. Hepsi sitoplazmik uçlarında ITIM'ları (İmmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) içerirler. En son olarak B7 ailesine ait reseptörlerden ITIM içeren BTLA tanımlanmıştır. BTLA, diğer iki T hücre inhibitör reseptörü olan CTLA-4 ve PD-1 (programmed death-1)'e yapısal ve fonksiyonel benzerlik gösterir (38, 44). Ligandları zıt sonuçlar meydana getiren farklı reseptörlere bağlanır ve farklı sonuçlar doğurur. B7 ailesi üyelerinden (CTLA-4 ve PD-1) farklı olarak BTLA, TNFR ailesi üyesi olan HVEM'e (herpes virus entry mediator) bağlanır (210). Genellikle B7 ve

TNFR ailesinin ko-stimulasyon etkileri, fonksiyonel olarak birbirinden farklıdır. HVEM ve BTLA birleşmesi bu iki ailede ko-stimulatör ve ko-inhibitör reseptörler arasındaki ilişkinin ilk örneğidir (37).

3.3.1. BTLA'nın sunumu ve yapısı

BTLA, B7 ailesinin yeni bir reseptörüdür olup Tip I transmembran glikoproteini yapısındadır ve kristal yapı gösterir. Bu glikoproteinin yapısını, sitoplazmik bölge, transmembran bölge, bir sinyal zinciri ve extrasellüler immünglobülin variable domeini (IgV) oluşturur. IgV ise bütün B7 ailesi reseptörlerinde ortak bulunur. IgV domeini ligand bağlanmasından sorumlu extrasellüler bir domeindir. BTLA monomeriktir ve dimerizasyon için gerekli membranda proksimal sistein molekülü eksiktir (77). CTLA-4 ile karşılaştırıldığında, BTLA bağımsız bir yüzey ligandı ile birleşir ve reseptör-ligand kompleksi oluşturur (45). BTLA'nın sitoplazmik bölgesi iki tane ITIM içerir. Bu ITIM'lar SHP-1 ve SHP-2 fosfataz enzimleriyle ilişkilidir (71).

BTLA, polimorfik yapısal özellik ve hücre dağılımı gösterir. Hurchla ve onun çalışma arkadaşları, 2005 yılında 23 sıçan cinsi arasında üç farklı allel buldular. Ig domeininde; BALB/c ve MRL/lpr allellerinin tek amino asidi farklıdır. Fakat C57BL/6 alleli dokuz ilave aa'e sahiptir. BALB/c, BTLA alleli DC'de, B ve T lenfositlerinde sunulur. C57BL/6 BTLA ise ilave olarak CD11⁺ makrofaj ve natural killer hücrelerinden de sunulur (98).

BTLA'nın sunumu, T hücrelerinin farklılaşması ve aktivasyonu süresince değişir. Esas olarak BTLA dinlenme halindeki T hücrelerinde çok düşük düzeylerde sunulur (88). T hücreleri hem Th1 hem de Th2 polarize edecek durumlarda kültüre edildiklerinde, BTLA mRNA'sı, STAT1 (signal transducer

and activator of transcription 1) ve STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) aktivator sinyallerinden bağımsız olarak Th1 hücrelerinde daha yüksek bulunmuştur (256). BTLA proteini hem Th1 hem de Th2'yi indükleyen durumlarda, primer T hücre aktivasyonu ve sekonder reaksiyondan sonraki 2 gün içerisinde pik yapar, 4.günde azalır ve 7.günde sonlanır. Üçüncü aktivasyondan sonra, BTLA seçici olarak Th1 hücrelerinde ekprese edilirken Th2 hücrelerinde ekprese edilmez. Bu sonuçlara göre BTLA ekspresyonu primer olarak T hücre farklılaşmasını yöneten faktörlerden ziyade T hücre aktivasyonu ile kontrol edilir. Th1 spesifik indüksiyonunun tersine Th1 hücrelerinden BTLA'nın seçici olarak ortaya çıkması sessiz bir süreçtir (98).

Timusta, BTLA sunumu pozitif seçim sürecinde düzenlenir. TCR α zincir defektli farelerde ki timositlerde BTLA'nın yokluğunun tersine BTLA, CD4⁻CD8⁻ timositlerden CD4⁺CD8⁺ double pozitif timositlere geçiş süresince artar. Normal farelerde ki CD4⁺ hücrelerde, önemsenmeyecek düzeyde de CD4⁺ ya da CD8⁺ timositlerde bulunurlar (88) Pozitif seçimde BTLA'nın yüksek düzenlenmesi kararlı CD4⁺/CD8⁺ soylarında rol oynayan ve pozitif seçim için zorunlu görülen MAPK (mitogen activated protein kinases) sinyal yolu ile ilgilidir (88). Bu bulgular BTLA'nın timik pozitif seçimde önemli bir rol oynayabileceğini gösterir. Buna rağmen BTLA eksik farelerde periferel lenfoid organ hücre subpopülasyonu ve T hücre gelişimi normal görülmüştür. Bu durum, BTLA sinyalinin immünolojik olarak gerekenden fazla ve ince ayarlı fonksiyonlarla ilgili olduğunu akla getirir (88,256).

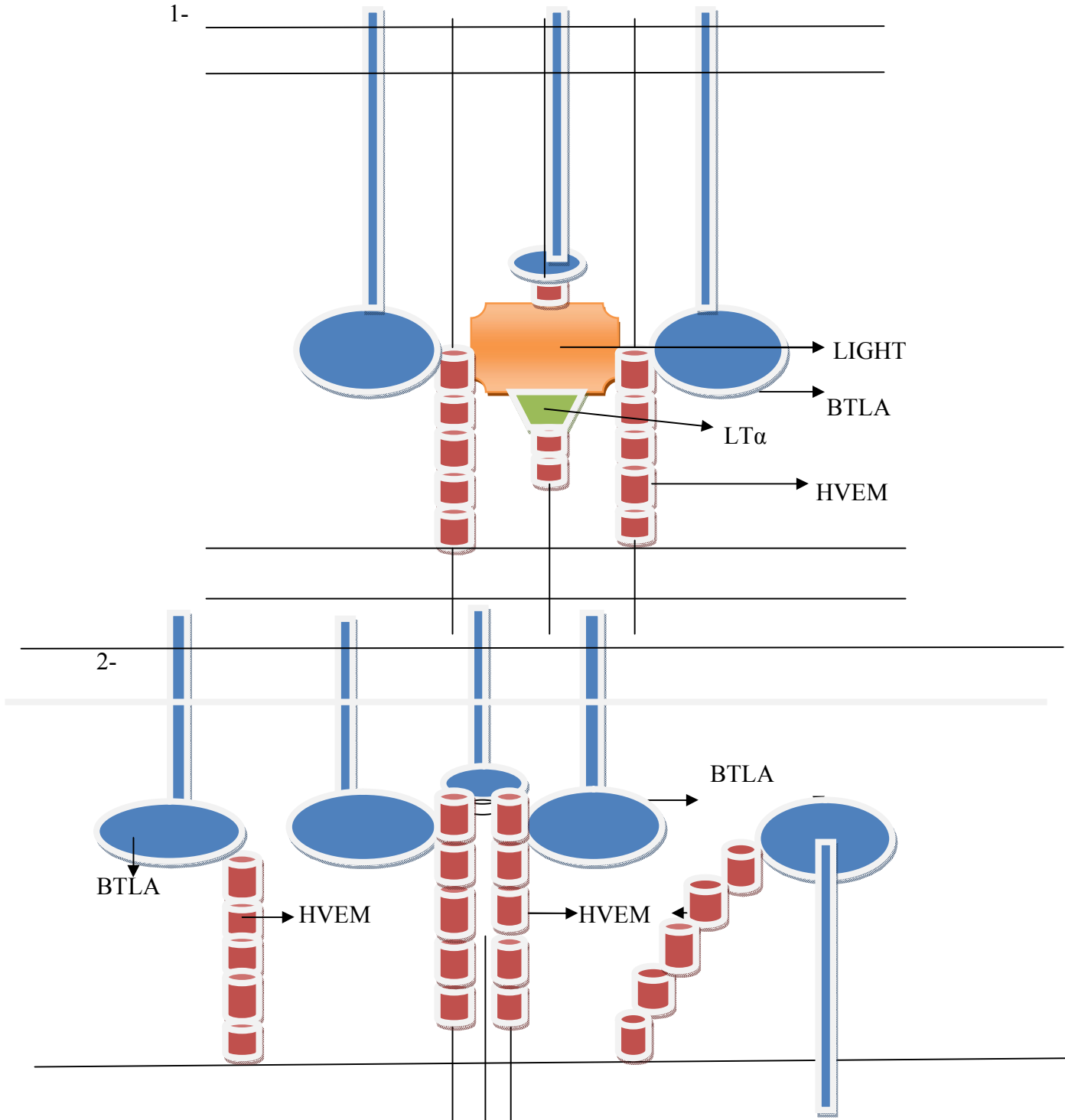
3.3.2. BTLA ligandı (HVEM)

Son zamanlarda iki bağımsız laboratuvar da yapılan çalışmalarda, BTLA'nın TNFR ailesinin ko-stimülasyon moleküllerinden olan (HVEM) ile etkileşmesi süresince T hücre aktivasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (210). HVEM, Herpes simplex virus type-1 (HSV-1)'in orijinal reseptörü olarak izole edilmiştir. Bu reseptör LIGHT ve Lymphotoxin α (LT α) olarak bilinen iki tane TNFR ailesinden liganda sahiptir (158). BTLA ve HVEM'in ligasyonu, B7 aile üyesi için ligand olaran TNFR aile üyelerinin ilk örneğidir. HVEM, Tip I transmembran glikoproteinidir. Bu glikoprotein TNFR ailesinin ortak özelliği olan altı sistein pseudorepeats içeren dört extrasellüler cysteine-rich domains (CRDs)'den oluşur. Bu sisteinler reseptör ligand birleşimi olduğu zaman üçüncü yapısının oluşumu için gerekli olan üç disülfid köprüsünü oluşturur (27). HVEM'in uzaysal olarak ayrı ligand bağlama bölgeleri vardır. LIGHT ve LT α 'nın TNF homolog domeini sıra ile CRD3 ve CRD1 ile etkileşir (204). BTLA-HVEM'in kristal yapısı ve mutojenik deneyler BTLA'nın benzer bir β -sheet binding motif aracılığıyla HVEM ile birbirlerini etkilediğini göstermiştir (45). İlginç bir şekilde BTLA-HVEM-LIGHT invitroda kararlı üçlü bir kompleks oluşturur. Bu kompleks yapı, HVEM'in farklı bir hücrede sunulacağını gösterirken BTLA ve LIGHT'ın aynı hücrede sunulabileceğini göstermektedir (76). BTLA, HVEM'le tek bir reseptör ligand kompleksi oluşturabilir (45). Şekil-1'de BTLA-HVEM-LIGHT kompleksinin bağlanma ve ilişkileri gösterilmiştir.

BTLA ve HVEM mRNA ve yüzey proteininin karmaşık sunumu karşılaştırıldığında esas olarak T ve B hücreleri, monositler ve immatür DC'de sunulduğu gösterilmiştir (128). HVEM, yüksek ölçüde dinlenme halindeki T

hücrelerinde sunulur. T hücrenin aktif hale gelmesi ile sunumu azalır. Sonra T hücreleri geri dinlenme durumuna döndüğünde tekrar ifade edilir. HVEM/LIGHT ile birleşmesi yolu ile DCs ve T hücrelerinde azalır (168).

Şekil-1 BTLA-HVEM-LIGHT Reseptör etkileşimi:



(1) BTLA, HVEM, ve LIGHT/LT α için düşünölen kompleksi modeli. (2) BTLA ve monomerik intercellular ve intracellular BTLA/HVEM kompleksleri ile etkileşen pretrimerize HVEM modeli.

3.3.3. BTLA'nın fonksiyonları

BTLA bağlanması T hücre aktivasyonunu negatif olarak düzenler. BTLA ve HVEM'in bağlanması büyük oranda anti CD3 uyarımlı T hücre aktivasyonunu bozar. Anti BTLA antikorları bu baskılayıcı etkiyi geri çevirir. APC'de HVEM'in sunumu, BTLA fosforilasyonunu ve SHP-2 ile birleşmesini başlatır ve peptid bağımlı T hücre çoğalmasını önemli şekilde azaltır (76,210). BTLA sinyalinin, CD69'un indüksiyonunda hiçbir etkisi yoktur, ama aktivasyondan önce T hücrelerinin çoğalmasını engeller. BTLA bağlanması, T hücrelerinin ilk aktivasyonunu engellemez, ama aktivasyon sonucunu değiştirir (123).

BTLA ilişkili inhibisyon, regülatör T hücreleri ve apoptosisten bağımsızdır fakat IL-2 üretimini azalması ile ilgilidir (131, 256). Anti-CD3 antikorı sınırlı konsantrasyonlarında hatta anti CD28'in varlığında BTLA bağlanması, CD4⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu, CD25'in çoğalmasını ve IL-2 üretimini baskılar. T hücre aktivasyonunda ekstra IL-2'den bağımsız olarak inhibitör etkiler gösterir. İlginç bir şekilde, bu inhibitör etkilere CD8⁺ T hücreleri daha az hassastır (123). Bu fark, BTLA'in CD4⁺ T hücrelerinde yüksek düzeylerde ekspresyonundan dolayı olabilir (88). Ayrıca IL-2, CD8⁺ T hücrelerinin döngüsünün başlaması için gerekli değildir ve bu durum kısmen CD8⁺ T hücrelerinin daha az duyarlı olmasını açıklayabilir (58). Üstelik BTLA eksik farelerden alınan naif T hücreleri veya tam olarak polarize Th1 hücreleri, TCR ilişkili aktivasyona çok yüksek cevap verir (88, 256).

3.3.4. Humoral cevapta BTLA'nın etkileri

BTLA esas olarak ve yüksek ölçüde, B hücrelerinde sunulur. Bu durum, BTLA'nın humoral yanıtta bir rol oynayabildiğini akla getirir. BTLA eksik B hücrelerinin, anti Ig-M'in uyarımına yanıtları daha fazladır. BTLA, B hücre reseptörünü düzenler fakat Toll-like reseptör4 ilişkili stimülasyonu düzenleyemez. BTLA, nitrophenol-conjugated keyhole limpet hemocyanin ile immünize BTLA^{-/-} 129 SvEv farelerinde spesifik Ig-G1, Ig-G2a ve Ig-G2b izotipinin ılımlı derecede artan düzeyleri ile sonuçlanan T hücre-dependent antikor cevaplarını düzenler (256).

3.3.5. Otoimmün hastalıklarda BTLA ve HVEM rolleri

Birçok çalışma BTLA ve HVEM'in otoimmün hastalıklarda rol oynadığını göstermiştir. BTLA-eksik farelerde, normal farelerle kıyaslandığında, deneysel autoimmün ensefalomyelitisin (EAE) daha yüksek insidans gösterdiği, daha erken başladığı, daha uzun sürdüğü ve klinik skorunun arttığı gösterildi (256). Benzer şekilde, HVEM^{-/-} fareler, myelin oligodendrocyte glycolprotein (MOG) peptide-induced EAE'ye daha hassastır. Antijen spesifik mücadeleye yanıt olarak artan T hücre çoğalması ve sitokin üretimi gösterir. Üstelik HVEM^{-/-} farelerin Con A-ilişkili T hücre bağımlı otoimmün hepatitli bir modelinde, normal fareler ile karşılaştırıldığında morbiditenin ve mortalitenin arttığı gösterilmiştir (255). HVEM-Fc bağlanması önemli şekilde kendiliğinden insulün bağımlı diabetes mellitus (IDDM) gelişen non diabetik farelerde otoreaktif T hücre infiltrasyonunu engeller. Sonuç olarak *in vivo* koşullarda BTLA'nın ve HVEM'in aşırı T hücre aktivasyonu ve klonal genişlemesi ile oluşan T hücre-bağımlı otoimmün reaksiyonu negatif şekilde düzenlediği gösterilmiştir (254).

3.3.6. Allerjik cevaplarda BTLA'nın rolü

BTLA /HVEM yolunun invivo allerjik yanıtları düzenlemekte benzersiz bir rolü vardır. Farelerde MHC-uyumsuz kardiyak greft kronik rejeksiyonun standart modelidir. Bu modelde BTLA (ama PD-1değil) güçlü bir şekilde uyarılarak greft yaşam süresinin uzun süre korunduğu gözlemlendi (230). BTLA ya da HVEM'in hedeflenmesi hızlı reddi önler. BTLA'nın asıl etkisini, immün yanıtın zayıf olduğu zamanda gösterdiği düşünülür. Bazı çalışmalarda BTLA'nın artan antijen ve anti CD3 konsantrasyonlarında hiçbir inhibitör etkisinin olmadığı gösterilmiştir (123, 210). Buna rağmen, tam olarak MHC uyumsuz grefler, BTLA ve PD-1'in indüksiyonuna rağmen hızlıca red edilmiştir. Tam olarak MHC-uyumsuz olan birkaç greftde PD-1'in hedeflenmesi reddi hızlandırır. Halbuki BTLA'nın hedeflenmesi beklenmedik şekilde, alloreaktif CD4⁺, CD8⁺ T hücre aktivasyonu ile PD-1 indüksiyonunu artırır ve allogreftin hayatta kalmasını uzatır. Bu durum, PD-1 ekspresyonunun, immün yanıtın kuvvetli olduğu zaman baskın rol oynadığını gösterir. Gerçekten, BTLA bu şartlar altında PD-1 indüksiyonunun bir inhibitörü olarak iş görebilir (230).

Çalışmanın diğer bir parametresi olan osteoprotegerin ise aşağıda belirtildiği gibi çok çeşitli fonksiyonlara sahip olması nedeniyle birçok çalışmanın hedefi olmuştur. Bu çalışmada osteoprotegerinin BH patogenezindeki yerini ve önemini anlamak için bir grup Behçet hastası ile sağlıklı kontrollerin oluşturduğu diğer bir grup karşılaştırıldı. İki grubun periferik kanlarındaki osteoprotegerin düzeyleri araştırıldı.

3.4. Osteoprotegerinin Yapısı

OPG iki farklı bilim adamı grubu tarafından keşfedilmiştir (215). Önce 401 amino asit olarak sentezlenen bir polipeptit yapısındadır. Sonra 21 amino asitlik propeptid kısmı ayrılır ve 380 amino asitlik olgun protein oluşur. Hücre dışına 60 kDa'luk monomerik ve 120 kDa'luk disülfid bağı içeren homodimerik, çözünür bir glikoprotein olarak salgılanır. OPG, TNFR süper ailesinin bir üyesidir. TNFR süper ailesinin diğer reseptörlerinden farklı olarak transmembran ve sitoplazmik yapıları içermez. OPG yedi yapısal bölgeden oluşur. N-terminalinde dört adet sisteinden zengin bölge vardır. Bu bölge TNFR-2 ve CD40 ile yakından ilişkilidir ve diğer TNFR ailesinin üyelerinin hücre dışındaki bölümlerinin özelliklerine benzer özellik gösterir (90, 207). OPG, Osteoprotegerin ligand (OPGL) için çözünebilir bir tuzak reseptör olarak görev yapar ve OPGL'in aktivitesini nötralize edebilir (91).

3.4.1. Osteoprotegerinin Yapısal Bölgelerinin Aktiviteleri

OPG'nin 1. ve 4. bölgeleri osteoklastojenezi inhibe edici aktiviteye sahiptir. Ölüm bölgelerini bulunduran C-terminalinde, proteinin 5. ve 6. bölgeleri bulunur. Bu tip ölüm bölgeleri TNFR-1, DR3, CD95/Fas ve TNF ilişkili apoptozisi indükleyen ligand (TRAIL) gibi apoptozis mediyatörlerinin sitoplazmik bölgesinde bulunur. OPG'nin 4., 5. ve 6. bölgeleri apoptotik sinyalin iletimi ile ilişkilidir. Bu bölgelerle OPG'nin TRAIL'e bağlanarak, TRAIL'le indüklenen apoptozisi inhibe edebileceği gösterilmiştir. TRAIL de OPG'nin osteoklastojenezis üzerindeki inhibitor etkisini engelleyebilir. Proteinin 7. bölgesinde heparin bağlayan bir kısım bulunur. OPG'nin hücre içine alınması için bir transmembran proteoglikanı olan sindekan-1'e, heparin bağlayan bölgesi

aracılığıyla heparin sülfat yan zincirleri ile bağlanması gerekir. Böylece en azından bir kısmı lizozomlar aracılığı ile yıkılır. OPG'nin heparin bağlayan bölgesi, TNF-related activation-induced cytokine receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) bağlayan bölgesinden uzaktadır. Yine bu heparin bağlayan bölge RANKL bağlanması veya kemik yıkımını inhibe edici etkisi ile ilişkili değildir. RANKL/OPG kompleksinin yıkımının da sindekan-1'e bağlanması aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (90, 120, 207).

OPG, osteoklastlar tarafından yapılan kemik yıkımını inhibe eder. Hipokalsemik ve rezorpsiyonu önleyici etkisi vardır. Osteoprotegerinin kemik dokudaki biyolojik etkileri, RANK /RANKL'm etkisi ile terstir. OPG, RANKL'a bağlanır ve bir tuzak reseptör gibi fonksiyon görür. RANKL'm RANK'a bağlanmasını engeller. Böylece osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu inhibe olur. Bunun sonucunda da RANKL kemik rezorpsiyonu oluşturamaz (30, 90, 112, 120). Otozomal resesif geçişli iki juvenil Paget hastasında, OPG'nin 100 kilobazlık bölümünde homozigot delesyon gözlenmiştir. Bu hastalarda kemik yıkımının artması, osteopeni ve kırıklar olması OPG'nin insanlarda da kemikler üzerinde koruyucu bir rolü oynadığını göstermektedir (262).

OPG, osteoblastlar dışında da sentez edilir. Özellikle kardiyovasküler sistem (kalp, arter ve venler), böbrek, karaciğer, dalak, beyin, akciğer ve kemik iliği gibi pek çok doku, hematopoetik ve immün hücreler tarafından salgılanır (30, 112). Salgılanması birçok sitokin, peptid, hormon ve ilaç tarafından düzenlenebilir. Bunlardan bazıları TGF- β , TGF- α , IL-1 α , IL-18, kemik morfojenetik proteinleri ve OPG mRNA seviyelerini artıran 17 β -östradiol'dür (90, 120). OPG sentezini inhibe edenler ise kemik yıkımını arttırdığı bilinen

glukokortikoidler, osteoporoz ve vasküler hastalık oluşturma eğilimi olan siklosporin A, paratiroid hormon (PTH), prostaglandin E2 ve fibroblast büyüme faktörü-2'dir (90, 92, 120, 262) OPG'nin sentezi osteoblastlarda kemik oluşumunu düzenleyen Wnt/ β -katenin sinyali ile de düzenlenmektedir (29).

Kemik iliğinden sentezlenen OPG'nin yaşla azaldığı görülmüştür (149). OPG seviyelerinde renal osteodistrofi, romatoid artrit, primer bilier siroz, Cushing ve HIV (humanimmunodeficiency virus) hastaları ve kemik metastazı olan prostat kanserlerinde artış görülmüştür. Litik kemik lezyonu olan multiplmiyelom hastalarında ise OPG seviyelerinde azalma tespit edilmiştir (90, 92). Çalışmalarda MS hastalarındaki osteoporozla artmış RANKL seviyelerinin yol açabileceği ve RANKL seviyelerindeki yükselmenin ise bu hastalıktaki immün sistemin aktivasyonuna bağlı olabileceği sonucuna varılmış ve OPG seviyelerindeki yükselmenin ise RANKL seviyelerindeki yükselmeyi telafi edici olarak gelişebileceği düşünülmüştür (126).

3.4.2. RANKL

Osteoprotegerin ligandıdır. Osteoprotegerin Ligand (OPGL), RANK ligand, ve osteoclast differentiation factor olarak da adlandırılır. OPLG, tümör nekrozis faktör ligand süperailisinin bir üyesidir (269). Normal ve patolojik durumlarda, RANKL kemik rezorpsiyonunun anahtar mediyatörüdür. RANK, 317 amino asitlik bir peptittir. Bu peptit 40-45 kDa'luk membrana bağlı hücrel ve 32 kDa'luk biyolojik olarak aktif, çözünür iki formdan oluşmuştur. RANKL, lenf nodları, timus, akciğer ve daha fazla olmak üzere dalak, kemik iliği gibi dokularda ve osteoblastlarda sentezlenir. OPGL, mRNA'sının yüksek düzeyleri lenf düğümlerinde, T hücrelerinde ve kemik osteoblastik hücrelerinde bulunabilir.

RANK mRNA'sı, iskelet sistemi, kas, timus, karaciğer, kolon, böbreküstü bezi ve incebağırsakta bulunabilmesine rağmen protein düzeyinde RANK ekspresyonu sadece olgun dendritik hücreler ve osteoklastların yüzeylerinde görülmektedir. Osteoprotegerin, OPGL'na alternative bir reseptör olarak bağlanır (129, 241).

RANKL sentezi pek çok faktör tarafından düzenlenir. Bunlar, transkripsiyonel, translasyonel ve posttraslasyonel seviyelerde hormonlar (1,25-dihidroksi vitamin D3 gibi), büyüme faktörleri ve peptidler (TGF- β 1, fibroblast büyüme faktörü-2 gibi), sitokinler (IL-1 β , IL-6, IL-11 ve TNF α gibi) ve glukokortikoidlerdir. Osteoblast/stromal hücrelerde RANKL'in sentezlenmesini osteoklast oluşumu ve aktivasyonunu uyaran pek çok faktör uyabilir (30, 207).

RANK, öncül ve olgun osteoklastların, uyarılmış T ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunur. RANKL kendine ait bu reseptöre bağlanarak hücreleri uyarır (30, 92). Osteoblastlar yanında T hücrelerinden de artmış miktarda RANKL salgılanması artrit ve diğer inflamatuvar hastalıklarda görülen kemik kaybında RANKL'in rol oynayabileceğini akla getirmektedir (227). RANKL'in osteoporotik etkisi birlikte immün sistem üzerinde de çok önemli etkileri vardır (30, 207). Farede yapılan çalışmalarda meme bezi gelişimi ve laktasyon için gerekli olduğu belirtilmiştir (66). Bazı malign tümör hücrelerinin RANKL birlikte RANK da sentezlemesi tümör hücre proliferasyonunun uyarılmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir (114). Kemik metastazlarının patojenezine bakıldığında RANKL'in pekçok noktada etkili olduğu görülmüştür; RANKL seviyelerindeki artmaya bağlı olarak gelişen artmış kemik yıkımı, tümör hücrelerinin bölünme ve yaşam sürelerini hızlandıran büyüme faktörlerinin salgılanmasına neden olur (102). RANKL'in kemiğe metastaz yapan bazı kanser

hücreleri için kemoatraktan olduğu düşünüldüğü gibi kemik metastazlarında vaskülarizasyonu uyardığı da düşünülmektedir (102).

Osteoblastlar kendi sentezledikleri RANKL miktarını değiştirebilirler. Osteoblastlarda OPG sentezini, RANKL sentezini indükleyen pek çok faktör düzenler. Genellikle RANKL seviyesinde artma olduğunda OPG seviyesinde azalma gözlenir. Fizyolojik şartlarda öncül osteoklastlarda bulunan RANK'a osteoblastlardan üretilen RANKL'in bağlanması ile TRAF6 uyarılır ve NF- κ B aktivasyonu olur. NF- κ B aktivasyonu aracılığı ile c-Fos sentezi artar. Artan c-Fos, NFATc1 ile etkileşerek osteoklastojenik genlerin transkripsiyonunun tetiklenmesine neden olur. Bu sayede uyarı çekirdeğe iletilmiş olur. OPG, RANKL'a bağlanarak RANKL'nin RANK'a bağlanmasını engeller (235). IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IL-17 ve TNF- α gibi bazı sitokinler RANKL sentezini artırır, prostaglandin E2, pek çok mezenkimal transkripsiyon faktörü ve 1,25-dihidroksi vitamin D3 gibi pek çok faktör kemik rezorpsiyonuna sebep olur. TGF- β , OPG sentezini artırarak antirezorptif etki gösterir (90, 92).

3.4.3. RANK Yapısı

OPGL'nin bağlandığı spesifik reseptörü RANK, TNFR süperailisinin transmembrane bir üyesidir (8). RANK hücre dışı kısmı 28 amino asitlik bir sinyal peptitidir. RANK, 21 amino asitlik kısa transmembran ve geniş sitoplazmik kısımları ile toplam 616 amino asitlik bir transmembran proteindir (8). Preosteoklastlara RANKL'in bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. Bu reseptör osteoklastojenez ve kalsiyum metabolizmasını kontrol eder. RANK makrofaj/monositik hücreler, fibroblastlar, T ve B lenfositleri, dendritik hücreler ve öncül ve olgun osteoklastların yüzeyinde bulunur (8,112).

3.4.4. OPG, RANKL, RANK ve İMMÜN SİSTEM

İn vitro çalışmalarda OPGL'in, koloni stimulan faktör-1 ile birleşmede olgun osteoklastları aktif hale getirebildiği ve osteoklastogenezise aracılık edebildiği gösterildi (129, 241). OPGL^{-/-} fareler kullanılarak OPGL'nin immün sistemde ve kemik gelişiminde rolünü gösteren önemli kanıtlar sağlandı. (119). Bu farelerde dendritik hücrelerinin görülmesine rağmen, bütün lenf düğümlerinde eksiklik, T ve B hücrelerinin erken farklılaşmasında defekt gösterilmiştir. Kong ve ark. kemik ve immün sistem arasında önemli bir bağlantı rapor edilmiştir (118). Aktive olan T hücreleri OPGL boyunca osteoklastogenezisi direkt aktive edebilir. Bu T hücre-aracılı düzenleme, yine T hücreler tarafından salgılanan interferon- γ ile baskılanabilir (226). Bu bulgular, kemik metabolizmasının, kompleks ve dinamik etkileşimler boyunca bağışık sistem ile düzenlendiğini akla getirdi. İnvivoda T hücrelerinin aktivasyonu, kemik kaybına ve OPGL aracılı osteoklastogeneziste bir artışa neden olur. OPGL aktivasyonunun engellenmesi çeşitli maling kemik bozukluklarında oluşan kemik kaybını hafifleten bir tedavi gibi etkileyebilir (91).

Osteoprotegerin ligandının dendritik hücreler ile T hücreleri arasındaki etkileşimde rol oynadığı gösterilmiştir. Monosit efektör fonksiyonunda ki rolleri tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat yeni çalışmalarda monosit/makrofaj aktivasyonunda OPGL'nin rolü tanımlanmıştır. OPGL, ko-stimulatör molekül ekspresyonunun düzenlenmesi yolu ile monosit/makrofaj efektör fonksiyonlarını etkiler. Böylece aktive antijen sunumu, kemokin sekresyonu ve sitokin indüksiyonu üzerinde de etkili olur. Bu düzenlemeyi, monositlerde sunulan Nf-kB (RANK) reseptörünün aktivasyonunu düzenleyerek yapmaktadır.

Monosit/makrofajların yaşamlarının devam etmesinde de önemli rol oynar. Bu aktivasyona, MAPK yolağının yanı sıra Bcl-xL protein düzeyinin yeniden düzenlenmesi, p42/44 MAKP ve P38'in aktivasyonu da aracılık edebilir. Birçok çalışmada, monosit aktivasyonu ve efektör fonksiyonundaki etkilerinden dolayı OPG ve RANKL'in immün sistemle ilişkili olduğu gösterilmiştir. RANKL'in RANK'a bağlanması Bcl-xL'nin de etkisi ile immün sistemi uyarma kapasitesini, dendritik hücrelerin canlılığını ve apoptozun inhibisyonunu artırır (8,105,266). Aynı zamanda T hücrelerinin c-jun N-terminal aktivasyonuna neden olur. Uyarılmış T hücrelerinin fonksiyonunu düzenlenmesini sağlar (8).

İmmün sistemde uyarılmış T hücrelerinden salgılanan RANKL ise lenfosit farklılaşmasında önemlidir ve lenf nodu organogenezi için gereklidir (119). Ayrıca, RANKL, TNF gibi olgunlaşmamış bir takım öncüllerin dolaşıma salgılanmasını da uyarıcı bir etkiye sahiptir (30). RANKL knockout farelerde ciddi osteopetrozis ve lenf nodlarının azlığı saptanmıştır. Bunun yanında diş, timus ve erken dönemde T ve B hücrelerinde farklılaşma defekti görülmüştür. Bütün bunlara rağmen dalak yapısı ve peyer plaklarının normal olduğu belirlenmiştir (112, 119). RANK knockout fareler ise yukarıda bahsettiğimiz RANKL knockout fareler gibi T ve B hücrelerinde olgunlaşma defekti ve periferik lenf nodlarının azlığı gözlenmiştir. Fakat bu fareler normal timus gelişimi göstererek, RANKL knockout farelerden farklılık ortaya koymuştur (138). OPG'den yoksun farelerle bir takım çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar OPG'nin B hücrelerinin olgunlaşması ve etkili antikor cevabının oluşturması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Kemik iliğinden alınan dendritik hücrelerin, OPG yoksun farenin allojenik T hücrelerini normal farelerin T hücrelerinden daha çok

uyardığı gözlemlenmiştir (248). Bazı fonksiyonel çalışmalarda OPGL'nin, bir mikst lökosit reaksiyonda dentritik hücre ilişkili T hücre proliferasyonunda artmaya neden olmuştur. Bu gözlem OPGL'nin apoptosis inhibisyonunda ve dendritik hücre aktivasyonunda etkili olduğunu göstermiştir (266) T hücre proliferasyonunda ki bu artışın, muhtemelen dendritik hücrelerin IL-12 ve IL-15 gibi T hücre büyüme faktörleri ve IL-6 ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu arttırması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (106).

3.4.5. OPG, RANKL, RANK VE İNFLAMASYONDAKİ ROLLERİ

OPGL'nin fizyolojik bir rolü lipopolisakkarid ile uyarılan bir endotoksik modelinde test edilmiştir. İn vivo OPGL aktivasyonunun blokasyonu NF- κ B (RANK)-Fc reseptör aktivatörünün aracılığı ile oluşan sepsis nedenli ölümden fareyi koruyabilir. Bu durum monosit fonksiyonu ve inflamasyon ilişkili cevapta OPGL'nin şimdiye kadar tanımlanmamış bir rolü olduğunu göstermiştir. Bu daha sonra inflamasyonla ilişkili artritli bir hayvan modelinde test edilmiştir. RANK-Fc'li tedavi önemli şekilde hastalık gelişimini düzelttiği ve kemik yıkılımını azaltığı gösterilmiştir. İn vivo OPGL faaliyetinin, monosit-makrofaj aracılık edilen hastalıkların gelişmesini engellemektedir(120).

3.4.6. OPG, RANKL ve RANK'IN Arteryel Kalsifikasyondaki Rolü

OPG'nin temel fonksiyonunun osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunun inhibisyonu olduğu bilinmektedir. Fakat diğer dokularda sentezlenen OPG'nin rolü tam olarak bilinmemektedir. Büyük arterlerin mediasında ve koroner arter düz kası ve endotel hücreleri gibi farklı damar hücre tiplerinde OPG sentezinin varlığı gösterilmiştir. Bu durum osteoprotegerinin vasküler yatakta fonksiyonu olduğunu göstermektedir (94,150). OPG'nin endotel hücrelerinde otokrin canlılık

faktörü gibi rol oynadığı belirtilmiştir. OPG yoksun farelerde, artmış osteoklast aktivasyonuna bağlı olarak osteoporoz oluşumunun yanı sıra (164) büyük arterlerinde kalsifikasyon, intima ve medialarında proliferasyon ve aort diseksiyonu görülmüştür (150). Böylece OPG, büyük arterleri medial kalsifikasyona karşı koruduğu sonucuna varılmıştır. OPG ve RANKL'in osteoporoz ve arteriyel kalsifikasyonla ilişkisi özellikle postmenapozal kadınlar ve osteoporozlu yaşlılarda klinik olarak kardiyovasküler hastalık ve arteriyel kalsifikasyonla uygunluk göstermektedir (83).

Yaşlı kadınlarda yapılan çalışmalarda serum OPG seviyeleri ile kardiyovasküler mortalite arasında çok önemli bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (33). Yine, OPG'nin etkileri ile ilgili olarak ratlarda çalışmalar yapılmıştır. OPG, kemik rezorpsiyonunu inhibe eden konsantrasyonlarda kullanıldığında varfarin ve D vitamini ile oluşturulan vasküler kalsifikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (189). OPG yoksun farenin kalsifiye lezyonlarında RANK ve RANKL sentezi belirlenmiştir. Oysa normal farede bu durum gözlenmemiştir (162). Bunun yanında, RANK ve RANKL'in insan vasküler hastalıkları ile doğrudan ilişkisi henüz gösterilememiştir (207). Bütün bu bulguların sonucunda OPG'nin kemik sisteminin yanı sıra vasküler sistem için de koruyucu bir faktör olabileceği ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak yukarıda anlatılanların ışığında; mevcut çalışma, immünopatogenezinde inflamasyon, enfeksiyon, şüpheli otoimmünite ve vaskülit bulunan ve henüz etiyojisi tartışmalı bir hastalık olan Behçeti irdeleyebilmek için Behçet hastalarında Treg hücreleri, CTLA-4(CD152), BTLA oranları ve osteoprotegerin düzeylerinin araştırılması amacıyla planlanmıştır.

Çalışmanın asıl amacı Behçet hastalığında immünsüpresif ve inflamatuvar mekanizmaları değerlendirmek ve Behçet etyopatogenezi üzerinde tartışabilmektir. Behçet hastalarındaki kontrolsüz inflamasyonun temelinde rol oynadığı düşünülen birçok hücre veya molekül bu güne kadar birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışma daha çok inhibitör etkili hücre ve moleküller üzerine planlanmıştır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Çalışma Materyali

Çalışmayı Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi Göz Hastalıkları Kliniğine başvuran hastalar ile Romatoloji ve Dermatoloji kliniğine başvuran Behçet hastaları (aktif-remisyon) ve sağlıklı kontrol grubu oluşturmuştur.

Araştırmadaki Behçet hastaları grubu ile sağlıklı kontrol grubu sayıları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Araştırma Gruplarının Sayıları

Grup 1	Behçet Hastaları Grubu	Aktif Behçetli hastalar	(n=13)
		Remisyonundaki Behçetli hastalar	(n=12)
Grup 2	Sağlıklı Kontrol Grubu		(n=20)

Tablo 4.2. Behçet hastaları ve kontrol grubunun yaş değerleri

	BEHÇET		KONTROL	
	\bar{x}	$\pm S$	\bar{x}	$\pm S$
Yaş	37.45	3.25	29.56	2.97

4.2. Yöntem

Araştırma Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi’nde gerçekleştirilmiştir. Kan analizleri Fırat Tıp Merkezi İmmünoloji Laboratuvarında yapıldı. Aktivasyon-remisyon dönemlerindeki Behçet hastalarından ve sağlıklı kontrollerden kan alınarak sonuçlar değerlendirildi. Öncelikle etik kurul onayı ile birlikte hasta onam formları düzenlendi ve çalışmaya alınan hastalardan kan

alabilmek ve çıkacak sonuçları yayınlayabilmek için onayları alındı. Çalışma öncesi ve sonrası hastaların klinik semptom ve bulguları tarafımızdan değerlendirildi ve genel sağlık kontrolleri de yapılarak çalışma formlarına kaydedildi.

Her iki gruba dahil bireylerden (flow cytometry için) yaklaşık 2ml steril etilendiamintetraasetikasit (EDTA) içeren tüpe ve diğer analizlerde kullanılacak serumu ayırmak için 5 ml jelli tüpe olmak üzere her hastadan toplam 7 ml kan örneği alınarak analizler yapıldı.

4.2.1.Hastalar ve sağlıklı kontroller

Hastalarımız, Uluslararası Çalışma Grubu'nun belirlediği kriterlere göre teşhis edildi ve evrelendirildi. Toplam 25 Behçet hastası ve 20 sağlıklı kontrol, çalışma kapsamına alındı. Yirmibeş Behçet hastasının 9'u oküler ataklı, 2'si aktif inflamatuvar artrit, 2'si ise mukokutanöz lezyon geçirmekte olan 13'ü aktif dönemdeki, kalan 12'si ise remisyondaki hastalardı. Yaş ve cinsiyetleri uygun gönüllü 20 kişilik sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Ondördü kadın ve 11'i erkek hastalardan oluşan Behçet hastalarının ortalama yaşı 37 yıl (20-57 yıl), hastalığın ortalama süresi ise aktif BH'da ortalama 4.39 ± 1.29 yıl, remisyondaki BH'da ortalama 8.13 ± 2.04 yıl (10-168 ay aralığında) olduğu tespit edildi.

4.3. Analizler

4.3.1. Flow-sitometrik analiz

EDTA'lı tüplere alınan kanlarda en geç iki saat içerisinde flow sitometrik inceleme yapıldı. Test prosedürüne uygun olarak her tüpe 20µl monoklonal antikor ve 100µl kan eklendi. Bu inceleme için hücreler IgG1 FITC(floressein isotiosiyanat)/ IgG1 PE (phycoerytrin) ile negatif kontrol için hazırlandı. İkinci

tüp CD4 FITC (IM 0448), CD25 PE (IM 0477) ve anti human Foxp3 PerCP (eBioscience 45-4776), üçüncü tüp CD4 FITC (IM0448), CD3 PerCP(Peridinin chlorophyll a protein) (IM 0479) ve CD272 PE(eBioscience 12-5950) , dördüncü tüp CD127 PerCP (eBioscience 45-1278) CD4 FITC (IM 0448) CD25 PE (IM 0477) boyaması yapıldı.

Treg hücre analizi için kullanılan FoxP3 hücre içi ekspresse edildiğinden hücre lizisi için FACS Permeabilizing Solüsyon 2(BD Perm 2 10X, Katolog No:340973) kullanıldı. 1 mL 10X FACS™ Lysing solüsyon üzerine EDTA'lı tüpten alınan tam kandan 100 µl eklendi. Sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 5 dakika boyunca 500 xg de santrifüj edildi; Supernatantı ayrıldı ve tüpün üzerindeki sıvı kısım dikkatlice steril pastör pipeti ile atıldı. Tüpün altında kalan pelletin üzerine 1X FACS Permeabilizing solüsyon 2'den 0.5 mL eklendi. Tüp 1-2 dakika orta şiddette vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletildi. % 0,5 sığır serum albümünü (BSA) ve % 0,1 NaN₃ içeren PBS eklenerek yıkandı ve 5 dakika boyunca 500 xg de santrifüj edildi. Aynı tüpte üç renkli boyama yapmak için CD4 FITC (IM 0448), CD25 PE (IM 0477) ve anti human Foxp3 PerCP (eBioscience 45-4776)'ün her birinden 20 µl koyularak üzerine 100ml santrifüj edilen kandan ilave edildi. Yine aynı şekilde vorteksledikten sonra floresans kaybı olmaması için karanlıkta 30 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra yıkama adımı tekrarlandı. Tüpe %1 paraformaldehitli PBS'den 500 ml ilave edidi ve cihazın gerekli voltaj ayarları yapılarak tüp Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter USA) cihazı kullanılarak flow sitometri analizi yapıldı.

CD272 analizi için; Üç renkli boyama için CD4 FITC (IM0448), CD3 PerCP (IM 0479) ve CD272 PE(eBioscience 12-5950) için uygulandı. CD4 FITC (IM0448), CD3 PerCP (IM 0479) ve CD272 PE (eBioscience 12-5950)'nin her birinden birbirine temas etmeyecek şekilde tüpün içine 20µl konuldu. Üzerine ise yine 100µl kan ilave edildi. Tüpün hazırlanması tamamlandı. Tüpler 1-2 dakika orta şiddette vortekslendi. Bu aşamadan sonra floresans kaybı olmaması için tüpler ışıktan korundu ve 20 dakika karanlıkta bekletildi. Tüplerin işleme hazır olması için gerekli yıkama ve karıştırma işlemleri TQ prep cihazı ile otomatik olarak yapıldı.

CD127 PerCP (eBioscience 45-1278) analizi için de; CD4 FITC (IM 0448), CD25 PE (IM 0477) ile üç renkli tüp hazırlandı. Analitik flow sitometri Coulter EPICS XL-MCL kullanılarak 10.000 hücrenin tamamını sayarak tamamlandı. Expo-32 analiz programı kullanılarak aynı cihazla analiz edildi.

4.3.2. Osteoprotegerin ve sCTLA-4 tayini

Osteoprotegerin tayini için; periferik kan, hastalar ve sağlıklı kontrollerden toplandı. Kan örnekleri 3000 rpm.de 10 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıştırıldı. Serumlar çalışma gününe kadar -80 °C de saklandı ve tüm örnekler aynı gün çalışıldı. Serumda OPG'in kantitatif ölçümü, Dynex 1DXC-1381 (USA) tam otomatize ELISA sistemi kullanılarak ve ürün protokollerine bağlı kalarak RayBiotech, Human OPG ELISA (Katalog No:ELH-OPG-001) kiti kullanılarak yapıldı. Anti-human Osteoprotegerin kaplı 96 kuyucuklu mikropate'in 8 kuyucuğu kontrol dilüsyonları için kullanıldı. İşlem basamakları protokole uygun olarak gerçekleştirildikten sonra stop solüsyon konan plateler 450 nm dalga boyunda renk yoğunluğu açısından ölçüldü. Kullanılan testte

Osteoprotegerin için saptanabilen en düşük düzey 1pg/ml'den daha azdı. Hasta ve kontrol sonuçları da pg/ml cinsinden hesaplandı.

sCTLA-4 tayini için; periferik kan, hastalar ve sağlıklı kontrollerden toplandı. Kan örnekleri 3000 rpm.de 10 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıştırıldı. Serumlar çalışma gününe kadar -80 °C de saklandı ve tüm örnekler aynı gün çalışıldı. Serumda sCTLA-4'ün kantitatif ölçümü, Dynex 1DXC-1381 (USA) tam otomatize ELISA sistemi kullanılarak ve ürün protokollerine bağlı olarak Bender MedSystems Human sCTLA-4 ELISA (Katalog No:BMS276) kiti kullanılarak yapıldı. Anti-human sCTLA-4 kaplı 96 kuyucuklu mikropate'in 8 kuyucuğu standartlar için kullanıldı. İşlem basamakları protokole uygun olarak gerçekleştirildikten sonra stop solüsyon konan plateler 450 nm dalga boyunda renk yoğunluğu açısından ölçüldü. Kullanılan testte sCTLA-4 için saptanabilen en düşük düzey 0.13ng/ml idi. Ölçüm sonuçlarına göre sCTLA-4 serum konsantrasyonları ng/ml cinsinden saptandı.

4.4. İstatistik analizler

Araştırmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS11.5 (218) paket programından yararlanılarak analiz edilmiş olup, gruplardan elde edilen ortalama değerler Mann - Whitney U testi ile; yüzde değerler ise Ki-Kare testi ile analiz edildi (188).

5. BULGULAR

Behçet hastalarının hastalık süreleri ve aktivasyon kriterleri Tablo 5.1.'de verilmiştir. Tablo 5.1.'e göre hastalık süreleri Aktif dönemde 4.39 yıl, Remisyon döneminde ise 8.13 yıl bulunmuştur. Behçet hastalarının hastalık süresi bakımından Aktif ve Remisyon dönemi arasındaki fark önemli ($P < 0.05$) tespit edilmiştir.

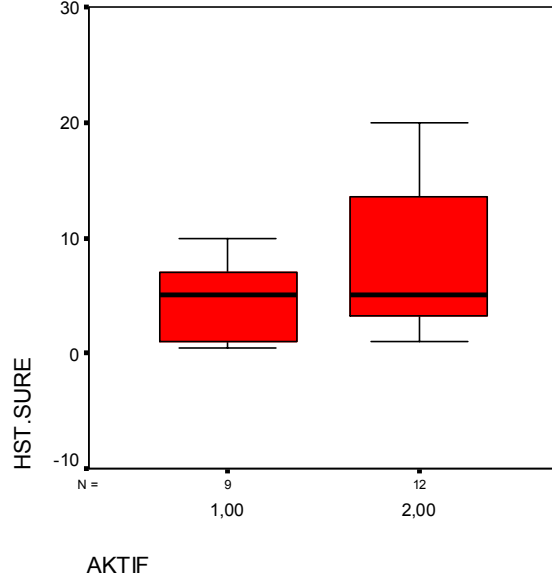
Behçet hastalarının aktif gruba dahil edilenlerin aktivasyon kriterleri incelendiğinde; % 69.23'ünde uveit, %15.38'inde oral-genital ülserler ve % 15.38'inde ise artrit saptandı.

Tablo 5.1. Behçet grubunda hastalık süreleri ve aktivasyon kriterleri

	BEHÇET				P
	Aktif		Remisyon		
	$\bar{x} \pm S$	\bar{x}	$\bar{x} \pm S$	\bar{x}	
Hastalık Süresi (yıl)	4.39	1.29	8.13	2.04	*
Aktivasyon Kriterleri	n	%			
Uveit	9	69.23 ^a			
Oral – Genital Ülser	2	15.38 ^b			
Artrit	2	15.38 ^b			
P		**			

a, b: Aynı sütunda üzerlerinde farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir. *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Grafik 1. Behçet grubunda Aktif ve Remisyon dönemi hastalık süreleri



1: Aktif 2: Remisyon

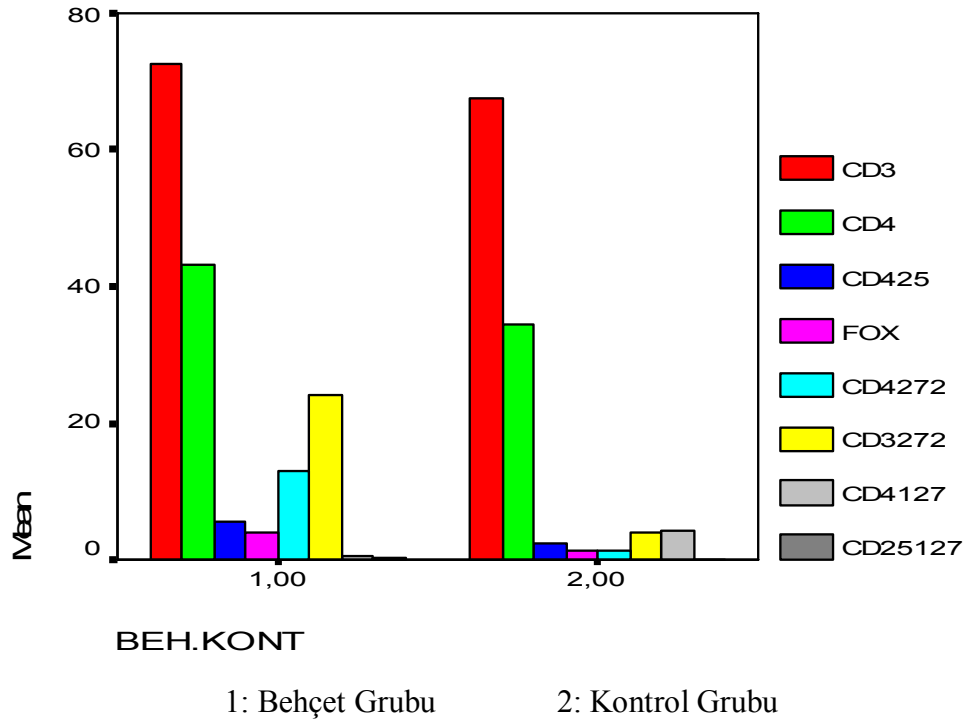
Araştırmanın Behçet hastaları ve kontrol grubu total lenfosit değerleri Tablo 5.2.' de verilmiştir. Tablo 5.2.'e göre Behçet ve kontrol grubu lenfosit değerlerinden $CD4^+CD25^+$ ($p<0.01$), $CD4^+CD25^+Foxp3$ ($p<0.01$), $CD4^+CD127^+$ ($p<0.01$), $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ($p<0.05$), $CD4^+CD272^+$ ($p<0.001$) ve $CD3^+CD272^+$ ($p<0.001$) değerleri arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

Tablo 5.2. Behçet hastaları ve kontrol grubunun lenfosit değerleri

Lenfosit değerleri (%)	BEHÇET		KONTROL		P
	x	Sx	x	Sx	
Total CD3 ⁺	72.06	1.84	68.00	2.68	-
Total CD4 ⁺	43.02	2.25	39.21	2.59	-
CD4 ⁺ CD25 ⁺	5.34	.652	2.70	.204	**
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foyp3	3.96	.590	1.38	.252	**
CD4 ⁺ CD127 ⁺	.638	.129	3.21	.888	**
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low}	.275	.315	.053	.083	*
CD4 ⁺ CD272 ⁺	13.01	1.51	2.90	.814	***
CD3 ⁺ CD272 ⁺	23.79	2.27	6.27	1.27	***

*: p<0.05 **: p<0.01 ***: p<0.001

Grafik 2. Behçet hastaları ve kontrol grubunun lenfosit değerleri



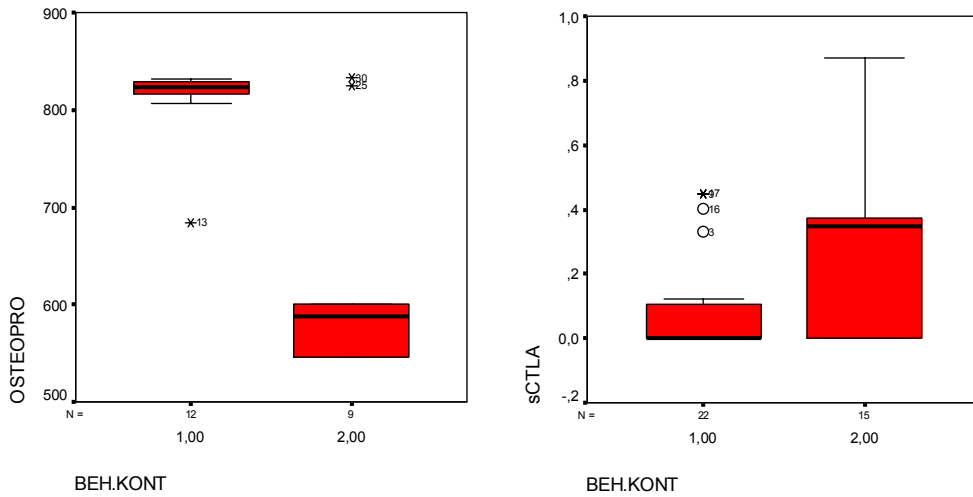
Araştırmanın Behçet hastaları ve kontrol grubu osteoprotegerin ve sCTLA değerleri Tablo 5.3.' de verilmiştir. Tablo 5.3.'e göre Behçet ve kontrol grubu sCTLA değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı ($P>0.05$) bir fark görülmezken; Osteoprotegerin değerleri açısından serum düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve bu değerler arasında anlamlı ($P<0.01$) bir farklılık tespit edilmiştir.

Tablo 5.3. Behçet hastaları ve kontrol grubunda osteoprotegerin ve sCTLA değerleri

Düzeyley	BEHÇET		KONTROL		P
	x	Sx	x	Sx	
sCTLA(pg/ml)	0,236	0,120	0,228	0,079	-
Osteoprotegerin(ng/ml)	813,76	10,14	604,22	33,57	**

** : $P<0.01$

Grafik 3. Behçet hastaları ve kontrol grubu osteoprotegerin ve sCTLA değerleri



1:Behçet Grubu

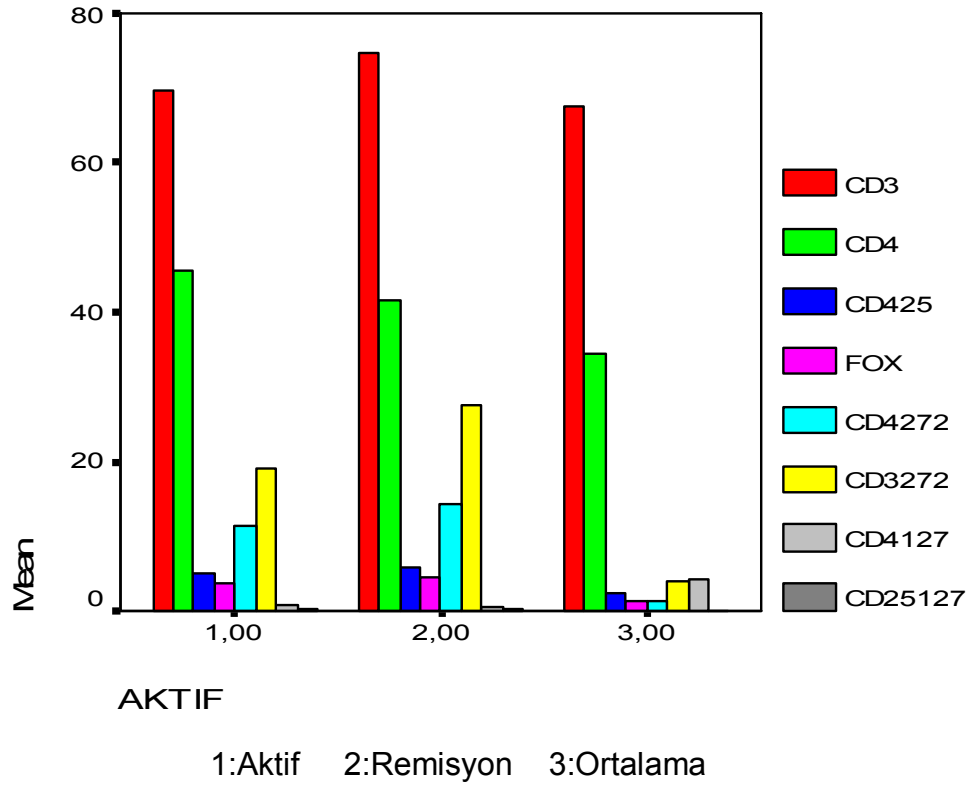
2:Kontrol Grubu

Tablo 5. 4. Behçet grubunda aktif ve remisyon dönemine göre lenfosit değerleri

Lenfosit Değerleri (%)	AKTİF		REMİSYON		P
	x	Sx	x	Sx	
Total CD3 ⁺	70.04	3.29	73.45	2.15	-
Total CD4 ⁺	45.87	4.37	41.05	2.34	-
CD4 ⁺ CD25 ⁺	4.82	.766	5.70	.981	-
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3	3.27	.764	4.44	.845	-
CD4 ⁺ CD127 ⁺	.675	.224	.611	.160	-
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low}	.267	.103	.281	.096	-
CD4 ⁺ CD272 ⁺	11.43	2.41	14.11	1.95	-
CD3 ⁺ CD272 ⁺	1.,06	3.48	27.06	2.74	*

*: p<0.05

Grafik 4. Behçet grubunda aktif ve remisyon dönemine göre lenfosit değerleri



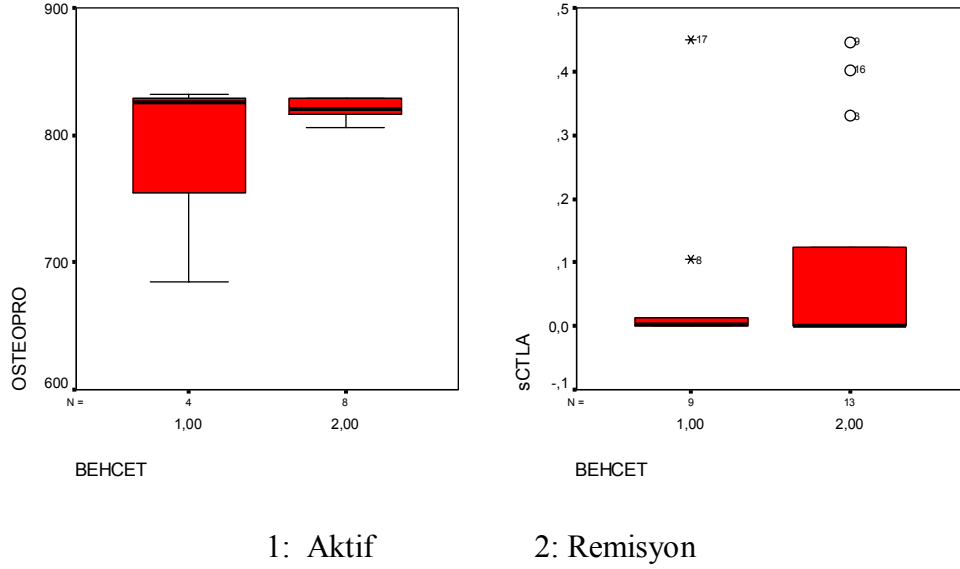
Çalışmaya alınan Behçet hastalarının aktif ve remisyon dönemine ait lenfosit değerleri Tablo 5.4.' de verilmiştir. Tablo 5.4.'e göre Behçet hastaları aktif ve remisyon döneminde lenfosit değerlerinden Total CD3⁺, Total CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3, CD4⁺CD127⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} ve CD4⁺CD272⁺ T lenfosit grupları açısından aktif ve remisyon dönemleri arasında istatistiki olarak anlamlı (P>0.05) bir fark görülmezken; CD3⁺CD272⁺ değerleri arasında anlamlı (P<0.05) farklılık görülmüştür.

Araştırmanın Behçet hastaları aktif ve remisyon dönemi Osteoprotegerin ve sCTLA değerleri Tablo 5.5.' de verilmiştir. Tablo 5.5.'e göre Behçet hastaları aktif ve remisyon dönemi Osteoprotegerin değerleri arasında istatistiki olarak önemli (p>0.05) bir fark görülmezken; sCTLA değerlerinin aktif periyoddaki hastalarda remisyon dönemine nazaran belirgin bir azalma izlenmiş ve bu değerler arasında istatistiki olarak anlamlı bir (p<0.05) farklılık tespit edilmiştir.

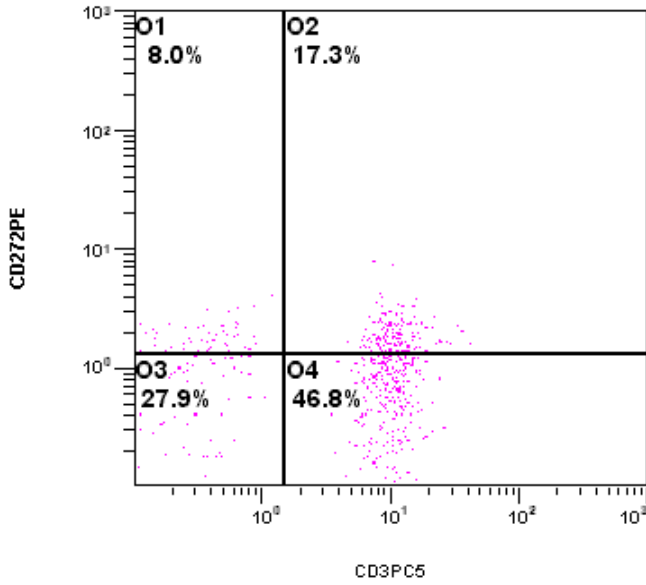
Tablo 5.5 Behçet hastaları aktif ve remisyon grubunda Osteoprotegerin ve sCTLA değerleri

Düzeyleyler	AKTİF		REMİSYON		P
	x	Sx	x	Sx	
sCTLA(pg/ml)	.064	.149	.332	.914	-
Osteoprotegerin(ng/ml)	791.85	71.85	821.07	7.92	-

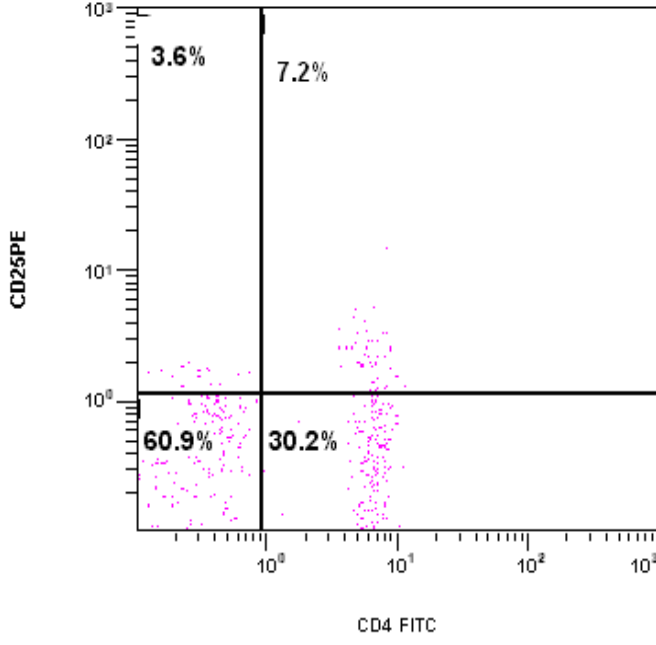
Grafik 5. Behçet hastaları aktif ve remisyon grubunda osteoprotegerin ve sCTLA değerleri



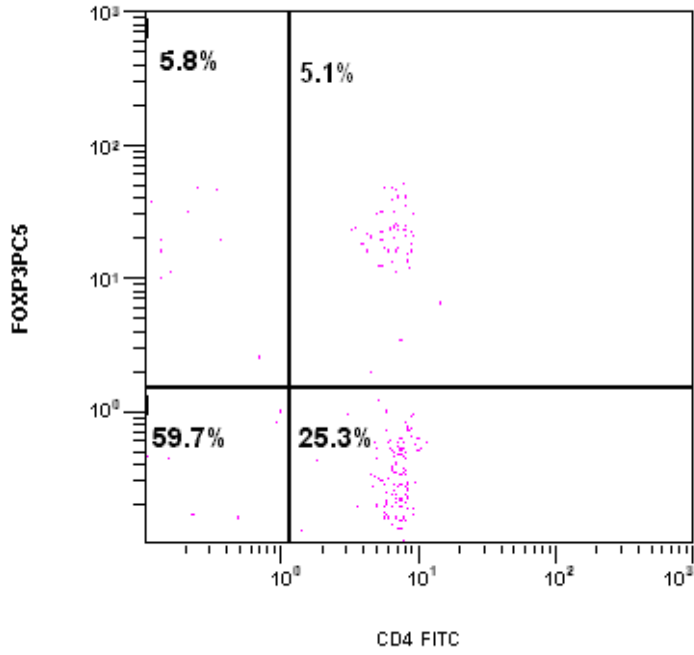
Şekil 2- Behçet hastasında CD3⁺CD272⁺ hücrelerin dot-plot



Şekil 3- Behçet hastasında CD4⁺CD25⁺ hücrelerin dot-plot



Şekil 4- Behçet hastasında CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ hücrelerin dot-plot grafiği



6. TARTIŞMA

BH şiddeti değişen deri ve eklem lezyonları, oral aft, genital ülser ve üveit atakları ile karakterize, multisistemik inflamatuvar bir hastalıktır (89, 246). Lenfositlere, endotel ve mukozal hücelere karşı otoantikolar rapor edilmiş olsa da BH kısmen otoimmün bir hastalık olarak düşünülmektedir (115). BH'nın etiyojisi tam olarak bilinmemektedir. Ancak genellikle hastalığın patogeneğinde kabul edilen hipotez, genetik yatkınlığı olan konakta infeksiyon aracılığıyla büyük bir inflamatuvar yanıtın başlamasıdır. BH'nın etiyojisi ile ilgili araştırmalarda, daha çok Herpes simplex virüsünün immünopatolojisi, streptokok infeksiyonları ve oral ya da mikrobiyal antijenlere karşı otoimmünite üzerinde durulmuştur (59, 132). Hastalığın inflamasyonu kontrolündeki yetersizlikten olduğu düşünüldüğünden bu çalışmada, Behçet hastalarının periferel kanında Treg hücreleri incelendi. Çünkü Treg hücrelerinin otoimmünitede, viral enfeksiyonlarda, inflamatuvar yanıtta ve self toleransın sürdürülmesinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (21). Çalışmada Behçet hastaları ve kontrol grubunda $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regülatör T hücrelerinin önemi tanımlanmaya çalışıldı.

İnsan periferel $CD4^+$ T hücrelerinin %3 ila %7 'sini oluşturan $CD4^+CD25^+$ T hücreleri, immünolojik self toleransın sürdürülmesinde önemlidir (16, 95). Normal kemirgenlerde Treg hücre popülasyonunun olmaması çeşitli otoimmün hastalıklarının kendiliğinden gelişmesine neden olur. Yeni çalışmalar, $CD4^+CD25^+$ regülatör T hücrelerinin, sadece otoimmünitenin engellenmesinde kritik rol oynamadığını, aynı zamanda bakteriler, virüsler, mantarlara ve

intraseküller parazitlere karşı çeşitli immün reaksiyonları da kontrol ettiğini iddia etmektedir (21,217).

Periferik $CD4^+CD25^+$ regülatör T hücreleri, esas olarak bu hücre popülasyonunu alt bölümlere ayrılmasına ve daha iyi tanımlanmasına yardımcı olan çeşitli fenotip belirteçleri ifade ederler. Bu belirteçleri, özellikle GITR, TNFR, OX40, CD103, ve CTLA-4 oluşturur (225). Yine de $CD4^+CD25^+$ regülatör T hücrelerinin esas olarak temas bağıli aktivitelerinde, bu belirteçlerin kesin rolü tartışmalara neden olmuştur. Bu yüzden bu belirteçler birçok yeni araştırmaların da konusu olmuştur. CD25'in ekspresyonuna benzer olan bu belirteçler, T hücrelerinin aktivasyonunun farklı şekilde düzenlenmesinde önemlidirler fakat regülatör ve yeni aktive olmuş T hücreleri arasında kategorik bir ayrım yapmaya yardımcı olmamaktadırlar. Bu yüzden, farelerde $CD4^+CD25^+$ regülatör T hücrelerinin fonksiyon ve gelişmesi için bir belirleyici olarak transkripsiyon faktörü Foxp3'ün tespit edilmesi, bu ikilem için de bir çözüm yolu olarak ileri sürülmektedir (97, 110).

Allan ve ark. sağlıklı insanların periferik kanında $CD4^+CD25^{high}$ T hücre popülasyonunun içinde regülatör $CD4^+$ T hücrelerinin, önemli ölçüde bulunduğunu göstermişlerdir (16). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada farelerde Foxp3'ün Treg hücrelerinde belirgin olarak sunulduğu ve Treg hücrelerinin üretim ve fonksiyonları için kritik önem taşıdığı gösterilmiştir (111). Foxp3 ve CTLA-4, regülatör T hücreleri ile ilişkili moleküllerdir (192). Bir çok çalışmada non-infeksiyöz romatoid artrit ve üveiti içeren insan inflamatuvar hastalıkları ile $CD4^+CD25^+$ regülatör T hücreleri arasında ilişki gösterilmiştir (137). Bu çalışmalarda $CD4^+CD25^+$ regülatör T hücrelerinin hedef organlarda varlığı

gösterilmiş ya da periferik kanda oranlarının arttığı bulunmuştur. Karşıt olarak Kukreja ve ark. insanda immün aracılı diyabette CD4⁺CD25⁺ T hücrelerinin azaldığını rapor etmişlerdir (124). Bununla beraber çalışmacılar CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücre spesifik belirteci olarak Foxp3'ü analiz etmemişlerdir. Bu nedenle azalmış olarak bulunan CD4⁺CD25⁺ T hücrelerinin regülatör T hücre oranlarını temsil edip etmediği açık değildir. Benzer bir şekilde Furinok ve ark. Kawasaki hastalığının akut fazında Foxp3'de azalma ile ilişkili olarak CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücrelerinin azaldığını belirtmiştir. Bu çalışmalarla Foxp3'ün, Treg hücrelerinin gelişiminde ve fonksiyonlarında kesin bir rolü olduğu anlaşılmıştır (69).

Yeni yapılmış çalışmalar, CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücrelerinin de, patojenik mikroplara karşı immün yanıtları düzenlediğini göstermiştir. Hori ve ark. yaptığı çalışmada *Pneumocystis carini* ile infekte olmuş SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) olan farelerde, CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücrelerinin az olduğu bildirilmiş ve T hücre süspansiyonunun transferi ile ağır bir pnömoni tablosunun ortaya çıktığı gözlenmiştir. Halbuki regülatör T hücreleri azaltılmamış T hücre süspansiyonunun transferinde ise böyle bir tablo görülmemiştir (96). Benzer şekilde CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücreler bulunduran T hücre süspansiyonunun transferi, hiçbir inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturmamasına rağmen, SCID'li farelerde CD4⁺CD25⁺ T hücrelerinin azaldığı T hücrelerinin süspansiyonunun transferi ile inflamatuvar bağırsak hastalığının şiddetlendiği gözlemlenmiştir. Üstelik, aseptik koşullarda SCID'li farelerde hastalık oluşmamıştır (217). Bu bulgular, CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücrelerinin,

mikroplara karşı aşırı bağışıklık yanıtı verilmesinde baskılayıcı bir rol oynadığını akla getirmektedir.

BH'nın da viral etjoloji ve otoimmüniteyle ilişkili olduğu bilinmektedir (59). Bütün bu çalışmalara benzer olarak bizim çalışmamızda da Behçet hastaları (aktive ve remisyon) ile sağlıklı kontroller kıyaslandığında $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ hücreleri Behçet hastalarında önemli şekilde daha yüksek görülmüştür. Fakat aktive ve remisyon dönemi Behçet hastaları arasında Treg hücreleri açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. Ne yazık ki bu çalışma kapsamında Treg'lerin fonksiyonel aktivitesi araştırılmamıştır

Hamzaoui ve ark. çalışmalarında, aktive BH'da $CD4^+CD25^+$ regülatör T hücrelerinin arttığını göstermişlerdir. Yine sağlıklı kontrol ve remisyondaki Behçet hastaları ile kıyaslanan aktif Behçet hastalarında $CD4^+CD25^{+/high}$ T hücrelerinin arttığını gözlemlenmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre $CD4^+CD25^+$ regülatör T hücreler klinik alevlenme dönemlerindeki inflamatuvar manifestasyonlar süresince geçici olarak artmakta ve remisyon döneminde normal değerlere gelmektedir. Aktive Behçet hastalarında $CD4^+CD25^{+/high}$ T hücrelerinin supresif fonksiyonlarının, bu hücrelerin poliklonal stimülasyonundan sonra $CD4^+CD25^-$ T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve yanıtlarını azalttığı gözlenerek doğrulanmıştır (86). Böylece $CD4^+CD25^{+/high}$ T hücrelerini araştıran, tekrarlayan çalışmaların sonuçlarına göre, bu hücrelerin fonksiyonlarının self toleransın sürdürülmesinde kritik bir önem taşıdığı düşünülmüştür (86). Bizim çalışmamızda da, bu çalışmada olduğu gibi aktive Behçet hastalarında Treg hücre sayısında önemli artış görülmüştür. Ama bu çalışmadan farklı olarak remisyon ve aktif dönemdeki Behçet hastalarının periferel kanlarındaki Treg hücre sayısı arasında

anlamli bir farklılık görülmemiştir. Bu farklılık belki de bizim çalışma kapsamına aldığımız Behçet hasta sayısının Hamzaoui ve ark yaptığı çalışmadaki Behçet hastası sayısına göre çok daha az olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ama temel olarak iki çalışmada Treg hücrelerinin, Behçet hastalarının fizyopatogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

BH'nın etyolojisinde inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TNF- α , IFN- γ) ve CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelerinin büyük etkisi olduğu düşünülmektedir. BH'nın etiyolojisinin incelendiği çalışmalarda, araştırmacıların ilgisi HSV1 ve mikrobiyal antijenlere odaklanmıştır (87). Dendritik hücrelerde Toll reseptör yolunun, sentezlenen IL-6 ile bağlantılı mikrobiyal indüksiyonunun bir kısmının CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri tarafından oluşan immunsupresyonu engellediği gösterilmiştir (185). Bu yüzden bu inflamatuvar sinyaller, Treg hücreleri tarafından oluşturulan immünosupresyonu geçersiz kılabilir. Böylece meydana gelen immünite, enfeksiyona izin verebilir. BH süresince görülen bu tür olaylar inflamasyonun gelişimine katkıda bulunmaktadır. Patojenlere karşı immün yanıtları azaltan CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücrelerinin bu fonksiyonlarının, inflamatuvar sinyaller tarafından nasıl inhibe edildiği tartışılmaktadır (251).

Bu bulguların tersine, HSP tarafından oluşturulan fazla uyarım (hiperstimülasyon) ve enfeksiyon reaktivasyonunu takiben lokal CD4⁺CD25⁺ regülatör T hücrelerinin homeostasisi ve fonksiyonu artmaktadır. Aktive Behçet hastalarında da aynı durum gözlenmiştir. Aktif BH'ında, CD4⁺CD25⁺ T hücreleri, inhibitör sitokinlerin sekresyonu ile rakip T hücrelerinin çoğalmasını direkt veya dolaylı olarak inhibe edebilir. Treg hücrelerinden sekrete edilen IL-10 T hücre düzenlemesinde önem taşır (84, 134). Aktif BH'da, efektör T hücrelerinin

çoğalmasının kontrol edilemediği bir immün patoloji ve immün sistemin denge bozukluğu izlenir (84). Bizim yaptığımız çalışmada da BH'daki inflamasyondan dolayı Treg hücre fonksiyonları baskılanmış olabilir. Fakat artan efektör T hücrelerine cevap olarak, azalmış Treg fonksiyonunu kompanse edebilmek için genel Treg hücre sayılarında artış ortaya çıkmış olabilir. Ancak bu çalışma kapsamında Treg fonksiyonlarına yönelik örneğin hücre bazda sitokin yanıtın ortaya konulması v.b bir çalışma yapılamamıştır ve BH'da böyle bir hipotezi tartışmak için daha çok geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yine bu çalışmada Treg fonksiyonlarında önemli rol oynadığı düşünülen inhibitör etkileri sCTLA-4 de incelendi. CTLA-4 sunumunun yoğunluğu, Treg hücrelerinin supresif kapasitesi ile ilişkilidir. CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri esas olarak, CTLA-4'ü sunmaktadır. CTLA-4 boyunca oluşan sinyallerin Treg hücrelerinin supresif görevi için zorunlu olduğu düşünülmektedir (136). Sistemik lupus eritematosus, progresif sistemik sklerosis, myastenia gravis ve graves hastalığı gibi birkaç otoimmün hastalıkta yapılan çalışmalarda artan serum sCTLA-4 düzeyleri gözlenmiştir fakat artan sCTLA-4 serum düzeylerinin genel önem ve etkileşimi tam olarak aydınlatılamamıştır (232,268).

Astımın şiddetini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada çocuklarda ölçülen sCTLA-4, sCD28, sCD86 ve sCD80 konsantrasyonlarının akut astımın şiddetini yansıttığı rapor edilmiştir (100). Bir yandan sCTLA-4, antijen sunan hücrelerde sunulan B7'e bağlanabilir ve T hücre yanıtlarını etkileyebilirken, bir yandan da B7/CD28'e aracılık eden kostimülasyonu etkilediği ve B7/CTLA-4 bağlanmasını etkileyebilme gücüne sahip olduğu gösterilmiştir (187). Bu durum, bazı koşullarda otoreaktivite lehinde olan sCTLA-4'ün normal immün cevabı da

etkileyebildiğini akla getirmektedir (181). Bunlara ilaveten genetik çalışmalar otoimmün hastalıklara duyarlılıkta CTLA-4 gen polimorfizimi arasında bir ilişkinin var olduğunu açığa çıkarmıştır (236). Bu çalışmalardaki sonuçlara rağmen Th1/Th2/Th3 sitokinleri ve Myastenia Gravis'li hastaların kültür supernatlarında ölçülen sCTLA-4 düzeyi önemli bir şekilde değişmemiştir (139). Bizim sonuçlarımızda bu çalışmaya benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada Behçet hastalarında CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ hücrelerinde dikkate değer bir artış saptandığı halde aynı grupta sCTLA-4 düzeylerinin değişmediği izlendi. Treg hücrelerinin immünmodülatör etkisi ya da sCTLA-4 gibi moleküllerle ilişkisi tartışmalıdır. Behçet hastalarında, sağlıklı kontrol grubuna oranla daha yüksek Treg hücreleri saptanmasına rağmen sCTLA-4 düzeylerinde iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. CTLA-4, T hücre inhibitör sinyali kontrol eden bir molekül olduğundan sCTLA düzeyi ile Treg hücre miktarının paralellik göstermesi beklenirdi. Ancak, yapılan bu çalışma ile hücresel sinyalde inhibitör rolü olan sCTLA-4 düzeylerinin bu sonuçlara paralellik göstermediği izlendi. Bu çalışmanın sonuçları dikkate alındığında ya da sCTLA-4'ün bir immün düzenleyici molekül olarak BH'da özel bir etkisi yoktur denebilir . Ancak, daha gerçekçi bir sonuca varmak için perifer lenfositlerde özellikle de Treg hücrelerdeki hücreye bağlı CTLA-4'ün belirlenmesi gerekmektedir. BH'da inflamatuvar süreç kronik ve çok değişkenlidir. Bu sonuçlar BH'da bir immünmodülatör olan sCTLA-4'ün özel etkileri ile açıklanamaz ve Treg'lerdeki CTLA-4 sunumunun gösterilmesi daha gerçekçi sonuçlar sunabilecektir. Ama diğer yandan bu çalışmada, Treg hücrelerinin sayıca artmasına rağmen sCTLA'düzeylerinin artmamasının nedeni Treg hücrelerinde fonksiyonel bir

bozukluğu düşündürebilir. Çünkü sCTLA, Treg hücrelerinin fonksiyonları ve supresyonu için çok önemli bir moleküldür. Hatta CTLA-4 molekülünün yoğunluğu ile Treg supresyonu doğru orantılıdır (136). Behçet hastalarında sCTLA düzeyinin yükselmemesi BH'nın patogenezi için yol gösterici olabilir. Şöyle ki, bunun temelini CTLA-4 yolu ile oluşan Treg hücre fonksiyon kaybı oluşturabilir. Çünkü aktif ve remisyon dönemdeki BH'da, sCTLA düzeyleri farklı bulunmuştur. Aktif dönemde azalan sCTLA düzeyine rağmen remisyon döneminde artan düzeyler görülmektedir. Böylece bu çalışma, aktif dönemde Treg hücre fonksiyon kaybını desteklediği görülmektedir.

BH'da Treg hücrelerinin tam rolünü göstermek ve periferik dolaşımında onların fonksiyon ve çoğalmasını düzenleyen faktörleri tanımak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Behçet, periferik kanda hücreler veya salgısal düzeyde immün disregülasyonun ortaya konabildiği, etyolojisi kesin olarak açıklanmamış, multisistemik bir hastalıktır. CD4⁺CD25^{+/high} T hücrelerinin fonksiyonları, otoimmünite, transplantasyon, kanser ve kronik inflamasyonda oluşan çeşitli anormallikleri tanımlamada hedef olarak görülmüştür. Bu nedenle bu hücre popülasyonunun keşfi hala devam etmektedir. Çeşitli immüнопatolojik durumlarda Treg'lere yönelik yapılan tedavilerin, daha bir çok potansiyel regülatör yolları ortaya çıkacağı kesindir (86).

Yine bu çalışmanın en önemli hedeflerinden biri de klinik pratikte kolayca yapılabilen OPG serum ölçümünün, Behçet hastalarındaki düzeylerini tespit etmek ve bu artan düzeylerin, BH'nın vaskülit ve diğer inflamatuvar belirtileri ile ilişkisinin rastlantısal mı yoksa tanısal mı olup olmadığını göstermektir. OPG ilk olarak, bir sıçan bağırsak cDNA dizileme projesi esnasında TNF reseptör

homologu olarak tanımlanmıştır (215). Kemikteki koruyucu etkilerinden dolayı molekül bu şekilde adlandırılmıştır (Latince, os: kemik, koruma: protegere). OPG, kemik iliği stromal hücreleri ve osteoblast hücreleri gibi çeşitli mezenkimal hücreler tarafından salgılanan, çözünebilir bir glikoproteindir (272). OPG, TNFR süper ailesine aittir fakat soluble bir reseptör olması nedeniyle ortak membranöz TNFR'den ayrılır (228). OPG, RANKL'ın biyolojik etkilerini engelleyen bir endojenöz antagonist reseptörü olarak iş görmektedir. Hem membranöz hem de solubl formda bulunur ve böylece kemiğin tekrar biçimlendirilmesinin bir inhibitörü olarak görev yapar. OPG yüksek ölçüde, erişkin akciğer, kalp, böbrek, karaciğer, timus, lenf düğümleri ve kemik iliğinde sentezlenirken vasküler düz kas hücresi, osteoblast, stromal hücreleri, B lenfositleri, artiküler kondrositleri içeren birçok hücre tarafından da sentezlenir (215). OPG, 401 amino asitlik bir protein olarak üretilir ve en son da olarak hücre içi ayrılma yolu ile 380 amino asitlik olgun bir proteine dönüşür (112). 1α 25-dihidroksi vitamin D₃, östrojen, TGF- β yanı sıra IL-1 ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinler, OPG üretimini artırmaktadır. Oysa paratiroid hormonu ve glukokortikoidler ise OPG üretimini inhibe etmektedir (70). OPG, RANKL'ye yüksek affiniteyle bağlanarak bir tuzak reseptör olarak görev yapar ve bu yüzden RANK'ın RANKL ile etkileşimini engeller (119). OPG'nin RANKL ile bağlanmasının sonucu olarak, osteoklast farklılaşmasının, aktivasyonunun ve hayatta kalmasının etkili bir engelleyicisi olarak görev yapar ve bu yüzden kemik rezorpsiyonunun önüne geçer (119). İmmün sistemde, OPG/RANK/RANKL üçlüsünün moleküler ve hücrel mekanizmaları immün yanıtı sürdürmek için önemlidir. Bu sistemde aktive T hücreleri tarafından sunulan RANKL, dendritik hücreleri tarafından sunulan

RANK ile birbirini etkiler. Dendritik hücrelerinde RANK''ın RANKL'ye bağlanması, bu hücrelerin hayatta kalmasını ve fonksiyonlarını düzenlemektedir (49, 249). Diğer taraftan OPG, dendritik hücrelerine ek olarak B lenfositler tarafından üretilir ve bu sistemde bir denge oluşturur. OPG/RANK/ RANKL sistemi, bağışık yanıtı kontrol eden tek sitokin mekanizması değildir (249).

Yapılan bazı çalışmalarda OPG ve RANKL'in koroner arter hastalığı, arteroskleroz ve vasküler kalsifikasyon gibi patolojilerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Gerçekten OPG geni yok edilmiş farelerde yapılan deneyler, OPG'in anti kalsifikasyon özelliğinin olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada OPG'in yokluğu, böbrek arterlerinin kalsifikasyonuna ek olarak aortun da orta derecede kalsifikasyonuna neden olmuştur. OPG'le yapılan tedavi, bu genden yoksun farelerdeki kalsifiye lezyon alanlarını önemli şekilde azaltmıştır (34).

Yeni yapılan çalışmalar OPG'nin, vasküler hastalıkların gelişmesinde önemli bir molekül olarak görev yaptığını göstermiştir (146). Bu çalışmaların sonucuna benzer olarak, bizim çalışmamızda da Behçet hastalarında OPG düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular BH'da görülen vaskülit, uveit ve diğer komplikasyonların gelişmesinde OPG'in rolü olabileceğini akla getirmektedir. Özellikle Behçet hastalarındaki vasküler patolojiler ile yüksek OPG düzeyleri arasında bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir.

Bir araştırmada, OPG düzeylerinin sistemik inflamasyonun belirteçleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (93). Başka bir çalışmada, 40 tane sistemik lupus eritamosis (SLE) hastası değerlendirilmiş, aktif SLE'li hastalarda sağlıklı kontrollere ve diğer immün ilişkili hastalıklara (romatoid artrit ve wegener granülomatosis) göre ortalama serum TRAIL konsantrasyonu yüksek bulunmuştur

(146). Yine yüksek bulunan OPG düzeyleri, Kawasaki hastalığının akut ve subakut dönemi süresince kompanse edilebilir olarak üretilmesinin bir sonucu olabilir. Bu nedenle OPG testi, hastalıkları ayırt etmede ve izlemede klinik yönden faydalı bir belirteç olabilir (216). Başka bir çalışmada serum OPG düzeyleri, APS'li (Antiphospholipid Syndrome) SLE hastalarında artığı ve antifosfolipid antikörlerinin titresiyile korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir (127).

İnsan intestinal epitelyal hücreleri de OPG mRNA'sı ifade eder. RANKL için mRNA sunar ve OPG salgırlar. İnflamasyon oluşmuş insan kolonik epitelyumunda OPG'nin miktarı, sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek bulunmuştur (238)

RANKL/ OPG sistemi inflamatuvar bağırsak hastalığında (IBD) aktif hale gelir. IBD'lı hastalardan elde edilen bağırsaklara ait explant kültürleri ile sağlıklı kontrollerden ya da inflamasyon olmayan segmentlerden alınan dokular kıyaslandığında, IBD'lı hastalarda OPG'nin daha büyük miktarlarda salgılandığı gözlenmiştir. Serum OPG düzeyleri, chron ve ülseratif kolitli hastalarda artmıştır. Bu çalışmalar OPG'in sindirim homeostasisinde ve inflamasyona cevapta önemli bir rolü oynadığını düşündürmüştür (169). OPG düzeylerinin, Cryptosporidium oookistiyle infekte edilmiş deneysel insan epitelyal hücrelerinde hastalık süresince arttığı bulunmuştur. Üstelik TRAIL taşıyan epitelyal hücrelerinin ön tedavisinin, hücrelerde apoptosise sebep olduğu ve parazit sayılarını azalttığı gösterilmiştir (39). IL-2 knockout fare kolit modelinde, recombinant OPG bağırsaklara ait dendritik hücrelerin aktivitesini düzenler ve inflamasyonu ters yöne çevirebilir (10).

Osteoprotegerin NFκB'yi de içine alan inflamatuvar sinyaller tarafından düzenlenir. İnflamatuvar olaylarda NFκB bağırsak epitel hücrelerinde aktif hale getirilir ve aktive olan NFκB, OPG sunumunun artışına neden olur. OPG, sırayla RANKL ve TRAIL'in inflamatuvar etkilerini inhibe edebilir. Böylece düşük OPG düzeylerinin, invaziv patojenlere maruz kalmış hastalarda, klinik görünümü kötüleştirebileceği düşünülmektedir. Bu gözlemler temel alındığında artan OPG düzeylerinin, inflamatuvar bağırsak hastalığına yanıt olarak anti-inflamatuvar bir mediatör olarak görev yaptığı tahmin edilmektedir (166).

Romatoid artrit, ilerleyen synovial inflamasyon ve eklem harabiyeti ile tanımlanan kronik bir hastalıktır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda RANKL /OPG sisteminin, romatoid artritte fokal ve genel kemik kaybının patofizyolojik mekanizmasında rol oynadığı gösterilmiştir . Yeni yapılan çalışmalarda, ilginç bir şekilde romatoid artritli hastalarda OPG'in ve RANKL'in serum düzeyleri, sağlıklı insanlardan daha yüksek bulunmuştur. Buna rağmen OPG/ RANKL oranı benzer miktarda izlenmiştir (194, 260, 79). Bu veriler doğrultusunda, anti TNF tedavisinin, romatizmada kemik erozyonunu uyaran OPG/ RANKL dengesini normalleştirdiği gözlenmiştir (145). Sıçanlarda adjuvanla uyarılan artrit T hücre bağlı bir modelinde, ağır eklem inflamasyonu, kemik ve kıkırdak harabiyeti ve sakatlanma görülmüştür. Hastalığın başlangıcında OPG ile yapılan tedavinin, RANKL'nin blokasyonunun, kemik ve kıkırdak harabiyetini engellediği ama inflamasyonu etkilemediği bulunmuştur (118).

Bütün bu yapılan çalışmalara benzer olarak bizim çalışmamızdaki yüksek OPG değerleri de belkide inflamatuvar bir hastalık olan BH'da inflamasyona karşı konulan bir kompensatuvar mekanizma olarak açıklanabilir. Bizim sonuçlarımız

temel alındığında, OPG serum düzeylerinin BH'nın patofizyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Yine de klinik rutinde bir biokimyasal belirteç olarak rolü şüphelidir. Bu çalışmalara rağmen OPG'in tartışılmamış bir çok etkisi bulunmaktadır. RANK/RANKL/OPG sisteminin hem inflamatuvar hastalıklarda hem de muhtemel immün denetim mekanizmalarında ciddi etkilerinin gösteren birçok fizyolojik roller vardır. OPG'in mukozal inflamasyonda da rolü vardır ve Behçet hastalarında ki oral aft ve mukozal inflamasyonla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (11). Bizim çalışmamızda bu bulguları desteklemiştir.

BH'da inhibitör reseptörlerinin rolünü anlamak için, bu çalışmada inhibitör bir reseptör olan BTLA'nın, CD4⁺ T hücrelerinde ekspresyonu incelendi. Amacımız BTLA inhibitör reseptörünü örnek alarak, BH'da inhibitör reseptörlerinin durumları hakkında bir fikir edinmektir. BTLA, CTLA-4 ve PD-1'le yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlikleri paylaşan ve T hücrelerinde yeni keşfedilen inhibitör bir reseptördür (256). Son zamanlarda BTLA ile karşılıklı birbirini etkileyen reseptörü olarak TNFR üst familyasının bir üyesi olan HVEM tanımlandı (210). HVEM baskın olarak, dinlenme halindeki T hücrelerde, monosit ve dentritik hücrelerde eksprese edilir (205). BTLA esas olarak, naif CD4⁺ T hücreleri ve CD8⁺ T hücreleri tarafından eksprese edilir ve T hücre aktivasyonu üzerine sunumu artar. B hücreleri, makrofajlar, kemik iliğinde üretilen dentritik hücrelerde de bulunur (88).

Negatif bir reseptör olarak BTLA'nın rolü gereğince, BTLA tam olarak eksik olan fareler, T hücrelerinin TCR-aracılı aktivasyona yüksek düzeyde yanıt verir (256). Akut alerjik hava yolları inflamasyonunda BTLA ve PD-1'in rolünün incelendiği bir çalışmada bu reseptörlerin inflamasyonun kontrolünde küçük bir

rolleri olduğu tartışıldı ama bu reseptörler, akut alerjik hava yolu inflamasyonunun süresini sınırlamakta önemli olduğu gözlemlendi. Aynı çalışmada PD-1'le birlikte BTLA'nın, Th2-aracılı immün yanıtla ilişkili olduğu bulunmuştur, çünkü bu reseptörlerden yoksun farelerde, uzamış akciğer inflamasyonu gözlenmiştir (54).

İnvivo transplantasyon modelleriyle yapılan bir çalışmada BTLA'nın, kısmen MHC-uyumsuz olan kardiyak allograftlerin kabulü ile ilişkili olduğu bulunmuştur (230). Yeni yapılan bir çalışmada, hafıza hücrelerinde ve CD8⁺ T hücrelerinde hücre içi dengelerde BTLA/ HVEM etkileşiminin rolü olduğu gösterilmiştir. BTLA'nın veya onun ligandı HVEM'in eksik olduğu farelerde hafıza CD8⁺ T hücrelerini sayılarında artış gözlenmiştir (122). BTLA sunumu eksik fareler, nitrophenol-conjugated keyhole limpet hemocyanin nitrophenol ile bağışıklama yapıldıktan sonra serum Ig değerleri yükselmiştir. Üstelik BTLA-eksik fareler, deneysel otoimmün ensefalomyelitte daha yüksek bir hassasiyet gösterir ve hızlandırılmış BTLA kaybı, kısmen MHC-uyumsuz kardiyak allograft rejeksiyonuna neden olur (230). Bizim çalışmamızda BTLA sunumunu sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında, Behçet hastalarının periferik dolaşımındaki T hücrelerinde artışı bulundu. BTLA bağlanması, esas olarak T hücrelerine inhibitör bir sinyali oluşturur ve böylece T hücre toleransı bakımından önemli bir rolü oynayabilir. BTLA, buna ek olarak, farklı inflamasyon alanlarında BH'da T hücre yanıtını ayarlayabilir. Bizim sonuçlarımıza göre, CD4⁺ Th hücrelerinde BTLA ekspresyonu periferde ya da organlardaki inflamasyonda önemli olabilir. BTLA eksikliğinde otoimmün olayların ve greft reddinin artması BH'daki otoinflamatuvar patogenezinde de rol oynayabileceğini akla getirir. Yaptığımız

çalışmada BTLA düzeylerinin yüksek olması artan inflamasyon ve otoimmün olayları sınırlama amaçlı olabilir.

Sonuç olarak BH'nın patogeneğinde önemli olabileceğini düşündüğümüz parametreler incelendiğinde sonuçların anlamlı olabileceği gözlemlendi. Behçet hastalarındaki CD4⁺CD25⁺ (Medyan: 5.34 ± 0.65) T hücre oranları sağlıklı kontrollere (Medyan: 2.70 ± 0.20) kıyasla önemli şekilde daha yüksek olduğu bulundu. Aynı şekilde Behçet hastalarında (aktif ve remisyon), sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ hücreleri (BH medyan: 3.96 ± 0.59 sağlıklı kontrol medyan:1.38±0.25) gözlemlendi. Ancak aktif ve remisyondaki Behçet hastalarında Treg hücreleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı. Behçet hastaları ile sağlıklı kontroller kıyaslandığında Behçet hastalarında önemli ölçüde yüksek CD4⁺CD272⁺ T hücreleri (Behçet hastalarında: 13.01±1.51, sağlıklı kontrol: 2.90±0.81) tespit edildi (P< 0.001).Buna rağmen aktif ve remisyondaki hastalar (aktif dönem:11.43±2.41 remisyon dönemi:14.11±1.95) arasında anlamlı bir fark bulunamadı (P> 0. 05). OPG'in serum düzeylerinin, Behçetli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulundu (813.76 ± 10.14 vs 604.22 ± 33, 57 pg mL, P<0.01). Behçet hastaları (0,236 ± 0.12, ng ml) ve sağlıklı kontrol (0,228 ± 0.07 ng/ml) sCTLA-4 serum düzeyleri arasında ise hiçbir fark bulunamadı (p>0.05). Ama aktif Behçet hastaları ile remisyondaki Behçet hastaları serum düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulundu (aktif BH: 0.064±0.14 remisyon BH:0.33±0.91). Remisyondaki Behçet hastalarında anlamlı olarak daha yüksek sCTLA-4 düzeyleri gözlemlendi. Böylece incelenen parametrelerin BH'nın immun disregülasyonundan sorumlu olabileceği sonucuna varıldı. Burda incelenen inhibitör özelliği olan gerek hücresel gerek salgısal tüm

bu parametreler, BH'ndaki kontrolsüz inflamasyonu önlemede yetersiz kalıyor olabilirler. Ya da normalden fazla salgılanmakla birlikte, periferde etkilerini gösteremiyor olabilirler. İnflamasyon kontrolünde bu yetersizlik, atak süresince ortaya çıkan kontrolsüz inflamasyonun nedeni olabilir. İnhibitör mekanizmaların kontrolünde önemli olan hürelerin ve moleküllerin, daha ileri fonksiyonel çalışmalara ihtiyacı olduğu açıktır. Böylece, çalıştığımız parametrelerin ilerde BH gibi etyopatogenezi tam aydınlatılamamış hastalıkların tanısı ve takibinde, klinikte yardımcı olabileceği sonucuna varıldı.

7-KAYNAKLAR

1. Adam B, Calikoglu E. (2004). Serum interleukin-6, procalcitonin and C-reactive protein levels in subjects with active Behçet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18:318-20,
2. Adinolfi M, Lehner T. (1976). Acute phase proteins and C9 in patients with Behçet's syndrome and aphthous ulcers. *Clin Exp Immunol* 25:36-9.
3. Akdis M, Verhagen J, Taylor A. (2004). "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory- 1 and T helper- 2 cells". *Journal of Experimental Medicine* 11: 1567–1575.
4. Akman-Demir G, Baykan-Kurt B, Serdaroglu P. (1996). Seven year follow up neurological involvement in Behçet syndrome. *Arch Neurol* 53:691-4.
5. Aktulga E, Altaç M, Müftüoğlu A, et al. (1980). A double blind study of colchicine treatment in Behçet's disease. *Haematologica* 65:399-405.
6. Alexandra P, Treschow Johan B. (2005). Intrinsic tolerance in autologous collagen induced arthritis is generated by CD152-dependent CD4⁺ suppressor cells *Journal of Immunology* 174:6742-6750.
7. Allan S.E, et al. (2005). The role of Foxp3 is forms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* 115:3276–3284.
8. Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390: 175–9.
9. Annacker O, Asseman C, Read S, Powrie F. (2003). Interleukin-10 in the regulation of T cell induced colitis. *Journal of Autoimmunity* 4: 277–279.
10. Ashcroft AJ, Cruickshank SM, Croucher PI. (2003). Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity* 19:849–61.
11. Ashcroft AJ, Carding SR. (2005). RANK ligand and osteoprotegerin: emerging roles in mucosal inflammation. *Gut* 54(9): 1345–1346.
12. Atmaca LS. (1989). Fundus changes associated with Behçet's syndrome. *Graefes' Arch Clin Exp Ophthalmol* 27:340-344.

13. Atmaca LS, İdil A, Batioğlu F. (1996). A descriptive study on Behçet's disease. *Acta Ophthalmol Scand* 74:403- 406.
14. Atmaca LS, Sönmez PA. (2003). Fluorescein and indocyanine green angiography findings in Behçet's disease. *Br J Ophthalmol* 87: 1466-1468. 54.
15. Bachmann MF, Kohler G, Ecabert B, Mak TW, Kopf M. (1999). Lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol* 163:1128–31.
16. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. (2001). CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167: 1245-53.
17. Balandina A, Lecart S, Darteville P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. (2005). “Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis,” *Blood* 105:(2) 735–741.
18. Bayraktar Y, Ozaslan E, Van Thiel DH. (2000). Gastrointestinal manifestations of Behçet's disease. *J Clin Gastroenterol* 30:144-54.
19. Behçet H. (1937). Über rezidivierende, aphthöse durch ein virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalien. *Dermatol Wochenschr* 46: 414-419.
- 20- Behçet's disease Research Committee of Japan. (1947). Behçet's guide to diagnosis of Behçet's *Jpn J Ophthalmol* 8:291-294.
21. Belkaid Y, Piccirillo Ca, Mendez S, Shevach Em, Sacks DI. (2002). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-7.
22. Ben Ezra D, Cohen E. (1986). Treatment and visual prognosis in Behçet's disease. *Br J Ophthalmol* 70:589-92.
23. Benezra D, Maftzir G, Barak V. (1997). Blood serum interleukin-1 receptor antagonist in pars planitis and ocular Behçet disease. *Am Ophthalmol* 123:593-8
24. Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. (2001). Major histocompatibility complex class-II positive cortical epithelium mediates the selection of CD4⁺25⁺ immunoregulatory T cells, *J Exp Med* 194: 427–438.
25. Bluestone JA. (1997). Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol* 158:1989–93.

26. Bluestone JA, Abbas AK. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3: 253–257.
27. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci.* 27:19-26.
28. Bouloumie A, Schini-Kerth VB, Busse R. (1999). Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc res* 41:773-80
29. Boyce BF, Xing L, Chen D. (2005). Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab* 2: 344-5.
30. Boyce BF, Xing L. (2007). Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 9:1.
31. Boyd SR, Young S, Lightman S. (2001). Immunopathology of the noninfectious posterior and intermediate uveitides. *Surv Ophthalmol* 46:209-33
32. Boyer O, Saadoun D, Abriol J. (2004). “CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis.” *Blood* 103(9):3428– 3430.
33. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. (2001). Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 631–7.
34. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C. (1998). Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12: 1260– 1268.
35. Calguneri M, Ozturk MA, Ertenli İ, Kiraz S, Apras S, Ozbalkan Z. (2003). Effect of interferon alpha treatment on the clinical course of refractory Behcet’s disease: an open study. *Ann Rheum Dis* 62:492-3.
36. Candan I, Erol Ç, Sonel A, Akalın H. (1986). Behcet’s disease: cardiac and pulmonary involvement. *Eur Heart J* 7:999- 1002.
37. Carreno BM, Collins M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:29-53.
38. Carreno BM, Collins M. (2003). BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. *Trends Immunol* 24:524-527.

39. Castellanos-Gonzalez A, Yancey LS, Wang HC. (2008). Cryptosporidium infection of human intestinal epithelial cells increases expression of osteoprotegerin: A novel mechanism for evasion of host defenses. *J Infect Dis* 197(6):916-23.
40. Cella M, Nakajima H, Facchetti F, Hoffmann T, Colonna M. (2000). "ILT receptors at the interface between lymphoid and myeloid cells," *Current Topics in Microbiology and Immunology* 251:161–166.
41. Charteris DG, Barton K, McCartney ACE. (1992). CD4⁺ lymphocyte involvement in ocular Behçet's disease. *Autoimmunity* 12:201-206.
42. Charteris DG, Champ C, Rosenthal AR, (1992). Behcet's disease: Activated T-lymphocytes in retinal perivasculitis. *Br J Ophthalmol* 76:499-501.
43. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS. (2002). "Tolerization of dendritic cells by Ts cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4," *Nature Immunology* 3: 215–217.
44. Chen L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4:336-347.
45. Compaan DM, Gonzalez LC, Tom I, Loyet KM, Eaton D, Hymowitz SG. (2005). Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the BTLA-HVEM complex. *J Biol Chem.* 280: 39553-39561.
46. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. (2007). Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007:89195.
47. Cools N, Van Tendeloo VFI, Smits EL. (2008). "Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-β/IL-10 double-positive CD4⁺ regulatory T cells," to appear in *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12(2):690-700.
48. Coskun M, Bacanlı A, Sallakci N, Alpsoy E, Yavuzer U, Yegin O. (2005). Specific interleukin-1 gene polymorphisms in Turkish patients with Behçet' disease. *Exp Dermatol* 14:124-9
49. Cremer I, Dieu-Nosjean MC. (2002). Long-lived immature dendritic cells mediated by TRANCE-RANK interaction. *Blood* 100:3646–3655.
50. Cupedo T, Nagasawa M, Weijer K, Blom B, Spits H, (2005). Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur J Immunol* 35:383–390.

51. Curiel TJ, Coukos G, Zou L. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival," *Nature Medicine* 10(9):942–949.
52. Çalgüneri M, Kiraz S, Ertenli I, Erman M, Karaaslan Y, Çelik I. (1997). Characteristics of peripheral arthritis in Behçet's disease. *New Zealand Medical Journal* 110:80-1.
53. Davidson NJ, Fort MM, Müller W, Leach MW, Rennick DM. (2000). "Chronic colitis in IL-10^{-/-} mice: insufficient counter regulation of a Th1 response," *International Reviews of Immunology* 19: (1) 91–121.
54. Deppong CT. (2006). Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 176: 3909-3913.
55. De Smet MD, Dayan M. (2000). Prospective determination of T cell responses to S-antigen in Behçet's disease patients and controls. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3480-3484.
56. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193:1303–1310.
57. Direskeneli H, Eksioğlu-Demiralp E, Kibaroglu A. (1999). Oligoclonal T cell expansions in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 117:166-170.
58. D'Souza WN, Lefrancois L. (2003). IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol.* 171:5727-5735.
59. Eglm RP, Lehner T, Subak-Sharpe JH. (1982). Detection of RNA complementary to herpes simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lancet* 18: 1356-61.
60. Ekşioğlu-Demiralp E, Direskeneli H, Ergun T, Fresco İ, Akoğlu T. (1999). Increased CD4⁺CD16⁺ and CD45⁺CD56⁺ T cell subsets in Behçet's disease. *Rheumatol Int* 19(1-2): 23-26.
61. Enk AH. (2005). "Dendritic cells in tolerance induction," *Immunology Letters* 99(1):8–11.
62. Evereklioglu C, Er H, Turkoz Y, Cekmen M. (2002). Serum levels of TNF-alpha, sIL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behçet's disease. *Mediators Inflamm* 11:87-93.

63. Evereklioglu C, Inaloz HS, Kirtak N, Doganay S, Bulbul M, Ozerol E, Er H, Ozbek E. (2002). Serum leptin concentration is increased in patients with Behcet's syndrome and is correlated with disease activity. *Br J Dermatol* 147:331-336.
64. Fain O, Mathieu E, Lachassinne E. (1995). Neonatal Behcet's disease. *Am J Med* 98:310-311.
65. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology* 4 (12): 1206-1212.
66. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. (2000). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*. 103: 41-50.
67. Fontenot JD, Rudensky AY. (2005). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3". *Nature Immunology* 6(4): 331-337.
68. Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F. (1999). Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease: a putative pathogenic role of interleukin-12. *Arthritis and Rheumatism* 42:1967-74.
69. Furunok Uge T, Kusuvara K. (2004). CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. *J Pediatrics* 145: 385-90.
70. Gao YH, Shinki T, Yuasa T. (1998). Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 252:697-702.
71. Gavrieli M, Watanabe N, Loftin SK, Murphy TL, Murphy KM. (2003). Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 312:1236-1243.
72. Geissmann F, Revy P, Regnault A. (1999). "TGF- β 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells," *Journal of Immunology* 162 (8):4567-4575.
73. Gershon RK, Kondo K. (1971). "Infectious immunological tolerance" *Immunology* 21(6):903-914,

74. George RK, Chan CC, Whitcup SM, Nussenblat RB. (1997). Ocular immunopathology of Behçet's disease. *Surv Ophthalmol* 42 (2): 157-62.
75. Gilbar A, Winterstein G, Turani H, Landau J, Etzioni A. (1989). Skin hyperreactivity response (pathergy) in Behçet's syndrome. *J Am Acad Dermatol* 19:767-79.
76. Gonzalez LC, Loyet KM, Calemine-Fenau J. (2005). A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpes virus entry mediator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:1116-1121.
77. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 23:515-548.
78. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death". *Immunity* 21 (4):589-601.
79. Guiliani N, Colla S, Rizzoli V. (2004). Update on the pathogenesis of osteolysis in multiple myeloma patients. *Acta Bio Medica Ateneo Parmense* 75:143-152.
80. Gül A, Inanc M, Ocal L, Aral O, Konice M. (2000). Familial aggregation of Behçet's disease in Turkey. *Ann Rheum Dis* 59:622-625.
81. Güllü İ, Benekli M, Müderrisoğlu H. (1986). Silent myocardial ischemia in Behçet's disease. *J Rheumatol* 23:323-7.
82. Haim S, Barzilai D, Hazani E. (1971). Involvement of veins in Behçet's syndrome. *Br J Dermatol* 54:238-241. 42.
83. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. (2000). Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20: 1926-31.
84. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Hamza M, Ayed KH. (2002). Cytokine profile in Behçet's disease relationship with disease activity. *Scan J Rheumatol* 31: 205-10.
85. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Hentati F. (1994). Phenotype and functional profile of T cells expressing gamma delta receptor from patients with active Behçet's disease. *J Heumatol* 21:2301-6.

86. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Houman H. (2006). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 24(5 Suppl 42):S71-8.
87. Hamzaoui K, Kahan A, Ayed K, Hamza M. (1990). Cytotoxic T cells against herpes simplex virus in Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 81: 390-5.
88. Han P, Goularte OD, Rufner K, Wilkinson B, Kaye J. (2004). An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J Immunol*. 172:5931-5939.
89. Hegab S, Mutawas AL. (2000). Immunopathogenesis of Behçet's disease. *Clin Immunol* 2000: 96: 174-86.
90. Hofbauer LC. (1999). Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 141: 195–210.
91. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner*. 15:2–12
92. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. (2001). Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* 92: 460-70.
93. Hofbauer LC, Schoppety M, Christz M, Teichmann J, Lange U. (2006). Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and osteoprotegerin serum levels in psoriatic arthritis. *Rheumatology* 45:1218–1222,
94. Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T, Khosla S. (2001). Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-κB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 334–9.
95. Homan D, Von Herrath M. (2004). Regulatory T cells and type 1 diabetes. *Clin Immunol* 112: 2002-9.
96. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. (2002). CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol* 32: 1282-91.

97. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3," *Science* 299(5609):1057–1061.
98. Hurchla MA, Sedy JR, Gavrieli M, Drake CG, Murphy TL, Murphy KM. (2005). B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly induced in anergic CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 174:3377-3385.
99. International Study Group for Behçet's Disease. (1990). Criteria for diagnosis of Behçet's syndrome. *Lancet* 335:1078-1080.
100. Ip WK, Wong CK, Leung TF, Lam CW. (2006). Plasma concentrations of soluble CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 costimulatory molecules reflect disease severity of acute asthma in children. *Pediatr Pulmonol* 41(7):674-82.
101. İdil A, Gürler A, Boyvat A. (2002). The prevalence of Behçet's disease above the the age of 10 years. *Ophtalmic Epidemiology* 9:325-31.
102. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV, Komnenovic V, Kong YY, Schreiber M, Dixon SJ, Sims SM, Khokha R, Wada T, Penninger JM. (2006). Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440: 692–6.
103. Jonuleit H, Schmitt E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations, *Journal of Immunology* 171(12): 6323–6327.
104. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA. (2001). Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2 :301–306.
105. Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y. (2000). TRANCE, a TNF family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 191: 495–502.
106. Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J. Immunol* 162: 2562–2568.
107. Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamani G. (1998). Behçet's disease. *Semin Arthritis Rheum* 27:197-217.

108. Kaya TI, Tursen U, Gurler A, Dur H. (2002). "Association of class-I HLA antigens with the manifestations of Turkish Behçet's disease patients." *Clin Exp Dermatol* 27:498-501.
109. Keino-H, Sakai-J, Nishioka-K, Sumida-T, Usui-M. (2000). Clonally accumulating T cells in the anterior chamber of Behçet disease. *Am J Ophthalmol* 130:243-5.
110. Khatrı R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-42.
111. Khatrı R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. (2003). An essential role for Scurfin (FoxP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 276: 37672-9.
112. Khosla S. (2001). Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5.
113. Kim WU, Chung SM, Han TW. (2002). Elevated soluble Fas in aqueous humor of patients with Behçet's uveitis: correlation with uveitis severity. *Jpn J Ophthalmol* 46:28-33.
114. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, Yokota Y, Penninger JM, Kong YY. (2006). Receptor activator of NF kappa-B ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id 2. *Mol Cell Biol*. 26: 1002-13.
115. Klok AM, Devries J, Rothova A. (1989). Antibodies against ocular and oral antigens in Behçet's disease associated with uveitis. *Curr Eye Res* 8: 957-62.
116. Kone-Paut I, Geisler I, Weschler B. (1999). Familial aggregation in Behçet's disease: high frequency in siblings and parents of pediatric probands. *Journal of Pediatrics* 135:89-93.
117. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. (2000). Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 21:495-502.
118. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402: 304-309.
119. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. (1999). OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymphnode organogenesis. *Nature* 397:315-323.

120. Kostenuik PJ, Shalhoub V. (2001). Osteoprotegerin: A physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des* 7: 613-35.
121. Krummel MF, Allison JP. (1995). CD28 and CD152 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med* 182:459.
122. Krieg C, Boyman O, Fu YX, Kaye J. (2007). B and T lymphocyte attenuator regulates CD8⁺ T cell intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nat. Immunol.* 8: 162-171.
123. Krieg C, Han P, Stone R, Goularte OD, Kaye J. (2005). Functional analysis of B and T lymphocyte attenuator engagement on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* 175:6420-6427.
124. Kukreja A, Cost G, Marker J et al. (2002) Multiple immune regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109: 131-40.
125. Kural-Seyahi E, Fresko I, Seyahi N. (2003). The long-term mortality and morbidity of behçet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center. *Medicine (Baltimore)* 82:6076.
126. Kurban S, Akpınar Z, Mehmetoglu I. (2008). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin levels in multiple sclerosis *MultipleSclerosis MultScler.* 14(3):431-2.
127. Kwok SK, Shin YJ, Kim HJ, Kim HS, Kim JY. and Yoo SA. (2009). Circulating osteoprotegerin levels are elevated and correlated with antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 18:133-138.
128. Kwon BS, Tan KB, Ni J. (1997). A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J Biol Chem* 272:14272-14276.
129. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 17:93(2):165-76.
130. Lawton G, Bhakta BB, Chamberlain MA, Tennant A. (2004). The Behçet's disease activity index. *Rheumatology* 43:73-78.

131. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK. (1998). Molecular basis of T cell in activation by CTLA-4. *Science* 282:2263–2266.
132. Lehner T. (1997). The role of heat shock protein microbial and autoimmune antigens in the a etiology of Behçet's disease. *Int Rev Immunol* 14: 21-32.
133. Lehner T, Lavery E, Smith R, et al. (1991). Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis* and the corresponding antibodies in Behçet's syndrome. *Infect Immun* 59:1434-41
134. Letterio JJ, Roberts AB. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16: 137-61.
135. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. (2002). The role of IL-10 and TGF-β in the differentiation and effector function of T regulatory cells, *International Archives of Allergy and Immunology* 129(4):263–276.
136. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C. (2002). Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor β, but not interleukin-10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 196: 1335-46.
137. Li Z, Mahesh SP, Kim BJ, Buggage RR, Nussenblatt RB. (2003). Expression of glucocorticoid induced TNF receptor family related protein (GITR) on peripheral T cells from normal human donors and patients with noninfectious Uveitis. *J Autoimmun* 21: 83-92
138. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 156-71.
139. Li X, Xiao BG, Xi JY, Lu CZ, Lu JH. (2008). Decrease of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺regulatory T cells and elevation of CD19⁺BAFF⁺R⁺ B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis. *Clin Immunol*. 126(2):180-188.
140. Lie JT. (1992). Vascular involvement in Behçet's disease: arterial and venous vessels of all sizes. *J Rheumatol* 19:341-3.

141. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mitler RS. (1996). Intracellular trafficking of CD152 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4:535.
142. Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N. (2007). "TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation". *Annual Review of Immunology* 25:193–219,
143. Liu W. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* 203:1701–1711.
144. Lockwood CM, Hale G, Waldman H, Jayne DRW. (2003). Remission induction in Behcet's disease following lymphocyte depletion by the anti-CD52 antibody Campath-1H. *Rheumatology* 42: 1539-1544
145. Lubberts E, Berselaar L. (2003). IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 170:2655–62.
146. Lub-de Hooge MN, de Vries EG, de Jong S, Bijl M. (2005). Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 64:854–858.
147. Luhder F, Hoglund P, Allison JP, Benoist C, Mathis D. (1998). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen- 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med* 187:427-432.
148. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. (2005). Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 4(8):579-86.
149. Makhluף HA, Mueller SM, Mizuno S, Glowacki J. (2000). Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun.* 268: 669–7.
150. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. (2000) Osteoprotegerin is an alpha beta 3-induced, NF-κB-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 20959–62.
151. Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G. (2003). "High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells," *Transplant Immunology* 11 (3-4): 245–258.

152. Marshall SE. (2004). Behcet's disease. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* 18:291-311.
153. Marshall NA, Christie LE, Munro LR. (2004). "Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma," *Blood* 103(5): 1755–1762
154. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM. (2007). Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T cell stimulation. *Nature* 445:931.
155. Martin M, Schneider H, Azouz A, Rudd CE. (2001). Cytotoxic T lymphocyte antigen- 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J Exp Med* 194:1675–81.
156. Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, Reiner SL, Thompson CB. (2000). Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol* 164:5319–27.
- 157- Masuda K, Urayama A, Kogure M. (1988). Double masked trial of cyclosporin in Behcet's disease. *Lancet* 1:1093-5.
158. Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily and lymphotoxin are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*. 8:21-30.
159. Michel L. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor α -chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest* 118(10): 3411–3419.
160. Michelson JB, Friedlaender MH. (1990). Behcet's disease. *Int Ophthalmol Clin* 30:270-271.
161. Michelson JB, Michelson PE, Chisari FV. (1980). Subretinal neovascular membrane and disciform scar in Behcet's disease. *Am J Ophthalmol* 90:182-185.
162. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. (2000). Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis *J Exp Med*. 192: 463–74.
163. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the Foxp3 transcription factor. *Immunity* 30:899.
164. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T,

- Higashio K, Ozawa H. (1998). Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 610–5.
165. Mogulkoc N, Burgess MI, Bishop PW. (2000). Intracardiac thrombus in Behcet's disease: a systematic review. *Chest* 118:479-87.
166. Mohamed JA. (2009). A single nucleotide polymorphism in osteoprotegerin, an anti-inflammatory protein produced in response to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* is associated with an increased risk of non-secretory bacterial diarrhea in US travelers to Mexico. *J Infect Dis* 199(4):477-485
167. Moore KW, O'Garra A, De Waal MR, Vieira P, Mosmann TR. (1993). "Interleukin-10". *Annual Review of Immunology* 11:165–190.
168. Morel Y, Schiano de Colella JM, Harrop J. (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J Immunol*. 165:4397-4404.
169. Moschen AR, Kaser A, Stadlmann S. (2005). The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 43:973–83.
170. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. (2005). "CD4⁺CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis," *Clinical & Experimental Immunology* 140(2): 360–367.
171. Mullaney J, Collum LMT. (1985). Ocular vasculitis in Behçet's. disease. *Int Ophthalmol* 7:183-191. 26.
172. Munn DH, Sharma MD, Lee JR. (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase," *Science* 297(5588): 1867–1870.
173. Najafian N, Chitnis T, Salama AD. (2003). "Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model," *Journal of Clinical Investigation* 112 (7):1037–1048.
174. Nakamura K, Kitani A, Strober W. (2001). "Cell contactdependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β ," *Journal of Experimental Medicine* 194(5):629–644.

175. Nielsen J, Holm TL, Claesson MH. (2004). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *APMIS* 112:642–650.
176. Nishiyama M, Nakae K, Umehara T. (2001). A study of familial occurrence of Behcet's disease with and without ocular lesions. *Jpn J Ophthalmol* 45:313-316.
177. Nussenblatt RB, Palestine AG. (1989). Behçet's disease and other. retinal vasculitidis. Uveitis: fundamentals and clinical practice. Year Book Medical Publishers 12:212-247.
178. O'Duffy JD, Goldstein NP. (1976). Neurologic involvement in seven patients with Behcet's disease. *Am J Med* 61:170-8.
179. O'Duffy JD, Robertson DM, Goldstein NP. (1984). Chlorambucil in the treatment of uveitis and meningoencephalitis of Behcet's disease. *Am J Med* 76:75-84.
180. O'Duffy JD. (1990). Vasculitis in Behcet's disease. *Rheum Dis Clin North Am* 16:423-31.
181. Oaks M, Hallett K, Penwell RT, Stauber EC, Warren SJ, Tector AJ. (2000) A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol.* 201:144–153.
182. Ohn S, Asanuma T, Sugiura S, Wakisaka A. and Aizawa M. (1978). "HLA-Bw51 and Behçet's disease". *J. Am. Med. Assoc* 240:529.
183. Ortaç S, Çakar P, Ünal M. (1999). Oküler tutulumlu BH'nda HLA B51. *Ret-vit* 7:135-138.
184. Park JH, Han MC, Bettmann MA. (1984). Arterial manifestations of Behcet's disease. *AJR* 143:821-5.
185. Pasare C, Medzhitov R. (2003). Toll pathwaydependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1033-6.
186. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. (2004). "Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (28):10398–10403.
187. Pawlak E, Kochanowska IE, Frydecka I, Kielbinski M, Potoczek S, Bilinska M. (2005). The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53:336–341.
188. Petrie A, Watson P. (1999). *Statistics for veterinary and animal science*. Blackwell Science. Lmt. Malden, USA.

189. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. (2001). Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1610–6.
190. Ramsdell F. (2003). “Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage?” *Immunity* 19(2):165–168.
191. Ravetch JV, Lanier LL. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* 290:84-89.
192. Read S, Malmstrom V, Powrie F. (2000). “Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen- 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation”. *Journal of Experimental Medicine* 192(2):295–302.
193. Robinson DS, Larche M, Durham SR. (2004). “Tregs and allergic disease”. *Journal of Clinical Investigation* 114(10):1389–1397.
194. Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JWM, Ryan PFJ, Dunstan CR, Martin TJ, Gillespie MT. (2002). Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol.* 161:1419–1427.
195. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. (2001).“Type-1 T regulatory cells,” *Immunological Reviews* 182 (1):68–79.
196. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. (2006). “Interleukin-10-secreting type-1 regulatory T cells in rodents and humans”. *Immunological Reviews* 212 (1): 28–50.
197. Rudensky AY, Gavin M, Zheng Y. (2006). “Foxp3 and NFAT: partners in tolerance”. *Cell* 126 (2) :253–256.
198. Saito T, Yamasaki S. (2003). Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev* 192:143-160.
199. Sakaguchi N. Sakaguchi S, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995). “Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases”. *Journal of Immunology* 155(3):1151–1164.
200. Sakaguchi S. (2000). “Regulatory T cells: key controllers of immunologic self tolerance”. *Cell* 101(5):455–458.

201. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev* 182: 18-32.
202. Salomon B, Bluestone JA. (2001). Complexities of CD28/B7: CD152 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol* 19:225.
203. Sansom DM. (2000). CD28, CTLA-4 and their ligands. who does what and to whom? *Immunology* 101:169–77.
204. Sarrias MR, Whitbeck JC, Rooney I. (2000). The three HveA receptor ligands, gD, LT- α and LIGHT bind to distinct sites on HveA. *Mol Immunol* 37:665-673.
205. Schneider K., Potter KG, Ware CF. (2004). Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol. Rev* 202: 49-66.
206. Schneider H, Valk E, Leung R, Rudd CE. (2008). CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B. (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *Plosone*. 3: e3842
207. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. (2002). RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22: 549-53.
208. Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S. (2004). “Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and antigen specific CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T suppressor cells,” *Human Immunology* 65(11):1297–1306.
209. Seddom B, Mason D. (2000). The third function of the thymus. *Immunol Today* 21: 95–99.
210. Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 6:90-98.
211. Shevach E. (2000). Regulatory T cells in autoimmunity, *Annu Rev Immunol* 18: 423–449.
212. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. (2001). “Control of T-cell activation by CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells,” *Immunological Reviews* 182:58–67.
213. Shevach EM. (2002). “CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers”. *Nature Reviews Immunology* 2(6): 389–400.

214. Shih FF, Mandik-Nayak L, Wipke BT, Allen PM. (2004). "Massive thymic deletion results in systemic autoimmunity through elimination of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells". *Journal of Experimental Medicine* 199 (3): 323–335.
215. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309–319.
216. Simonini G, Masi L, Giani T, Piscitelli E, Cimaz R and Vierucci S. (2005). Osteoprotegerin serum levels in Kawasaki disease: an additional potential marker in predicting children with coronary artery involvement. *The Journal of Rheumatology* 11: 2233-2238, 276.
217. Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V. (2001). Control of intestinal inflammation by regulatory T cells, *Immunol Rev* 182: 190-200.
218. SPSS (2002). SPSS for Windows Release 11.5. Standart Version. Copyright SPSS Inc.
219. Stassen M, Fondel S, Bopp T. (2004). "Human CD25⁺ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins $\alpha 4\beta 7$ or $\alpha 4\beta 1$ confer distinct suppressive properties upon CD4⁺ T hepler cells". *European Journal of Immunology* 34: (5) 1303–1311.
220. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. (2001). Human CD4⁺CD25⁺ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 31: 1247–1254.
221. Suci-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. (2003). Generation and function of antigen specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol* 11: 235–244.
222. Sundstedt A, O'Neill EJ, Nicolson KS, Wraith DC. (2003). "Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo," *Journal of Immunology* 170(3):1240–1248.
223. Suri-Payer E, Cantor H. (2001). Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Autoimmun* 16:115.
224. Tajima T, Homma S, Sinpo K, Maruo Y, Moriwaka F, Tashiro K. (1994). Clinicoradiological findings of neuro-Behcet's syndrome. *Intern Med* 33:136-41.
225. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen- 4". *Journal of Experimental Medicine* 192 (2): 303–310.

226. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. (2000). T cell mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 408:600–605.
227. Takayanagi H. (2005). Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodont Res* 40: 287–93.
228. Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrett J, Emery J. (1997). Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 204:35-46.
229. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-jordan H, Bi M, Bluestone JA. (2004). “Distinct roles of CTLA-4 and TGF- β 8 Clinical and Developmental Immunology in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function”. *European Journal of Immunology* 34 (11):2996–3005.
230. Tao R, Wang L, Han R, Wang T, Ye Q, Honjo T, Murphy TL, Murphy KM, Hancock WW. (2005). Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. *J. Immunol* 175: 5774-5782.
231. Taylor AJ, Verhagen K, Blaser M, Akdis CA. (2006). “Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells”. *Immunology* 117 (4): 443–442.
232. Tector M, Khatri BO, Kozinski K, Dennert K, Oaks MK. (2009). Biochemical analysis of CTLA-4 immunoreactive material from human blood. *BMC Immunol.* 10:51.
233. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. (2006). A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 24:65–97.
234. Tezel TH, Tezel G. (1993). BH’nda oküler tutulum: Sıklık ve risk faktörleri. *Oftalmoloji* 2:242-249.
235. Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 137–42.

236. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H. (2003). Association of T cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 423:506–511.
237. Verity DH, Marr JE, Ohno S, Wallace GR, Stanford MR. (1999). Behcet's disease, the silk road and HLA-B51. *Tissue Antigens* 54:213-20.
238. Vidal K, Serrant P, Schlosser B, van den Broek P, Lorget F. (2004). Donnet-Hughes A. Osteoprotegerin production by human intestinal epithelial cells: a potential regulator of mucosal immune responses. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G836–44.
239. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE. (2006). "Human CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo," *Journal of Clinical Investigation* 116 (9):2423–2433.
240. Yağcı A, Karcıoğlu ZA, Akkın C. (1990). Serum and aqueous humor sialic acid levels in Behcet's disease. *Ophthalmology* 97:1153-1155.
241. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3597–3602.
242. Yazıcı H, Barnes CG. (1991). Practical treatment recommendations for pharmacotherapy of Behcet's syndrome. *Drugs* 42:796-804.
243. Yazıcı H, Başaran G, Hamuryudan V. (1996). The ten year mortality in Behcet's syndrome. *Br J Rheumatol* 35:139-41.
244. Yazıcı H, Pazarlı H, Barnes CG. (1990). A controlled trial of azathioprine in Behcet's syndrome. *N Engl J Med* 322:281-85.
245. Yazıcı H, Tuzlacı M, Yurdakul S. (1981). A controlled survey of sacroiliitis in Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 40:558-9.
246. Yazıcı H, Yurdakul S, Hamuryudan V. (1998). Behçet's Syndrome. In Klippel, Jh, Dieppe, Pa (Eds.): *Rheumatology*. Mosby 26: 1-266.
247. You S, Thieblemont N, Alyanakian MA, Bach JF, Chatenoud L. (2006). "Transforming growth factor- β and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes". *Immunological reviews* 212 (1): 185– 202

248. Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A, Rafferty KL, Marshall AJ, Moon JJ, Ewings ME, Mohaupt M, Herring SW, Clark EA. (2001). Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *J Immunol.* 166: 1482–91.
249. Yu Q, Gu JX, Kovacs C, Freedman J, Thomas EK, Ostrowski MA. (2003). Cooperation of TNF family members CD40 ligand, receptor activator of NF-kappa B ligand, and TNF-alpha in the activation of dendritic cells and the expansion of viral specific CD8⁺ T cell memory responses in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals. *J Immunol* 170: 1797–1805.
250. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH. (2003). Induction of Foxp3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells, *J Clin Invest* 112: 1437–1443.
251. Walker LK. (2004). CD4⁺CD25⁺ Treg: divided and rule ? *Immunol* 111: 129-37.
252. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405–13.
253. Wang J, Ioan-Facsinay A, Van Der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. (2007). “Transient expression of Foxp3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells,” *European Journal of Immunology* 37 (1):129–138.
254. Wang J, Lo JC, Foster A, et al. (2001). The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J Clin Invest* 108:1771-1780.
255. Wang Y, Subudhi SK, Anders RA. (2005). The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J Clin Invest* 115:711-717.
256. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR. (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* 4:670-679.
257. Watanabe N, Wang YH, Lee HK. (2005). “Hassall’s corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus”. *Nature* 436 (7054):1181–1185.
258. Wechsler B, Isola DB, Vidailhet M. (1993). MRI in 31 patients with Behcet’s disease and neurological involvement: prospective study with clinical correlation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:793-8.

259. Wechsler B, Mertani EB, Le Hoang P. (1986). Cyclosporin A is effective, but not safe, in the management of Behcet's disease. *Arthritis Rheum* 29:574-575.
260. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. (2007). The role of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clinical Endocrinol Metab.* 92:4514-21.
261. Weiner HL (2001). "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th-3 type TGF- β -secreting regulatory cells". *Microbes and Infection* 3 (11):947-954.
262. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S. (2002). Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 347: 175-84.
263. Vijayakrishnan L, Slavik JM, Illes Z. (2004). An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity.* 20:563-575.
264. Wildin RS, Freitas A. (2005). "IPEX and Foxp3: clinical and research perspectives," *Journal of Autoimmunity* 25: 56-62.
265. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P. (2008). CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322:271.
266. Wong BR, Josien R, Choi Y. (1999). TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 65: 715-24.
267. Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y. (1997). A new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186: 2075-2080.
268. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW. (2005). Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 44(8):989-94.
269. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. (1997). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem* 272:25190-25194.

270. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ. (2001). "Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer". *Cancer Research* 61 (12):4766–4772.
271. Woo EY, Yeh H, Chu CS. (2002). "Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation," *Journal of Immunology* 168 (9): 4272–4276.
272. Woo KM, Choi Y, Ko S-H, Ko JS, Oh K-O, Kim KK. (2002). Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp Mol Med.* 34:347–52.
273. Wu Y., Borde M, Heissmeyer V. (2006). "Foxp3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT". *Cell* 126 (2): 375–387,
274. Zouboulis CC, Kotter I, Djawari D. (1997). Epidemiological features of Adamantiades Behcet's disease in Germany and in Europe. *Yonsei Medical Journal* 38:411-22.
275. Zouboulis CC, Orfanos CE. (1998). Treatment of Adamantiades-Behcet disease with systemic interferon alfa. *Archives of Dermatology* 134:1010-6.

8.ÖZGEÇMİŞ

25.09.1969 yılında Elazığ'da doğdum. İlköğrenimim Malatya Şeker İlkokulu'nda, orta öğrenimimi Malatya Sümer Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi Elazığ Atatürk Lisesi'nde tamamladım. 1993 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Mezuniyet sonrası Aksaray Sağlık Meslek Lisesi'nde, Elazığ Cumhuriyet Sağlık Ocağı'nda pratisyen hekim olarak çalıştım. 2005 yılında İmmünoloji doktora programına başladım.2007 yılında aile hekimi olarak Addullahpaşa ASM'de çalışmaya başladım ve halen aynı bölümde çalışmaktayım. Evli ve üç çocuk annesiyim.