

→ASLI ÖNDER GÜL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AKTİF ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA
KULLANILAN ANTİ-CD20 MONOKLONAL
ANTİKORUNUN (RİTUXİMAB) İMMÜN SİSTEM
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

ASLI ÖNDER GÜL

**DANIŞMAN
PROF. DR. MURAT İNANÇ**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

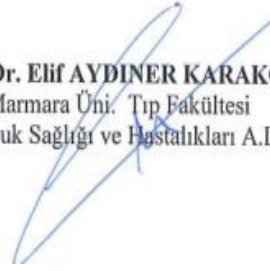
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Programı'nda Yüksek Lisans öğrencisi Aslı ÖNDER GÜL tarafından Prof. Dr. Murat İNANÇ'ın danışmanlığında hazırlanan "Aktif Romatoid Artritli Hastalarda Kullanılan Anti CD20 Monoklonal Antikörünün (Rituximab) İmmün Sistem Hücreleri Üzerine Etkisi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 28.05.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Murat İNANÇ
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Romatoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Günnur DENİZ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Elif AYDINER KARAKOÇ
Marmara Üni. Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.

BEYAN

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

ASLI ÖNDER GÜL

İTHAF

Çocuklarım Enis Kaan ve Elif Ece Gül'e...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın hazırlanması ve yürütülmesi boyunca yardım ve desteğini esirgemeyen, bana olan inancını ve sabrını hiç kaybetmeyen, saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Murat İNANÇ’a,

Eğitimim ve tez çalışmam süresince her zaman desteğini ve yardımlarını hissettiğim, sabırla bana zaman ayıran, dinleyen, önerileriyle bana ışık tutan ve bana inancını hiç kaybetmeyen saygı değer hocam Prof. Dr. Günnur DENİZ’e,

İmmünoloji bilimini ve akan hücre ölçer cihazını sevdiren saygı değer hocam Doç. Dr. Gülderen YANIKKAYA DEMİREL’e,

Eğitimimin ilk gününden beri bana her zaman destek olan Doç. Dr. Sema Bilgiç GAZİOĞLU’na, Doç. Dr. Suzan Adın ÇINAR’a, Prof. Dr. Esin Aktaş ÇETİN’e ve , laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Abdullah Yılmaz’a,

Desteklerini benden esirgemeyen, sevgili dostlarım Doç. Dr. Melike ERSÖZ, Melike MENEKŞE ve Elif TEBER YEŞİLYURT’a,

Tez yazımının örnek toplama aşamasında bana desteğini ve yardımlarını esirgemeyen kardeşim Pınar KASAPOĞLU’na, İ.Ü Romatoloji Bilim Dalından Dr. Yasemin ŞAHİNKAYA’ya, tez yazım aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen kardeşim Cenay CİHAN’a ve özellikle istatistik aşamasında yardımlarını eksik etmeyen Çağdaş Uğur ADAŞ ve Tuba AKAN’a,

Desteklerini eksik etmeyen ve daima yanımda olan fedakar annem Ayla ERAYBAR ve eşim Fikri GÜL’e teşekkür ederim.

Bu çalışma, ROCHE Diagnostik tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Romatoid Artrit Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.2. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi	3
2.3. Romatoid Artrit Etyolojisi ve Patogenezi	3
2.3.1. Romatoid Artrit Patogenezinde B Hücrelerinin Rolü ve Otoantikorlar.....	6
2.4. Romatoid Artrit Klinik Bulguları.....	7
2.5. Romatoid Artrit Sınıflandırma Kriterleri	8
2.6. B Lenfositlerin Genel Özellikleri ve Gelişimi	10
2.7. T Lenfositler.....	12
2.7.1. T Regülatör Hücreler (Treg Hücreler)	13
2.8.1. NK Hücrelerinin Genel Özellikleri	14
2.8.1.1. NKT ve Değişmez NK (iNKT) Hücreleri.....	16
2.8.1.2. NK ve NK Alt Gruplarının RA ile İlişkisi	18
2.9. İmmünolojik Tolerans ve Otoimmünite.....	18
2.9.1. İmmünolojik Tolerans Mekanizmaları.....	19
2.9.2. Otoimmünite: Prensipleri ve Patogenezi.....	19
2.10. Romatoid Artrit Tedavi Stratejileri.....	20
2.10.1. Romatoid Artrit Tedavisinde Rituksimab (anti -CD20moAb tedavisi).....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24

3.1.Araç ve Gereçler	24
3.1.1.Cihazlar	25
3.2.Çalışma Grubu	25
3.2.1.Aktif Romatoid Artritli Olgular	25
3.3.Metod	26
3.3.1 Periferik Kan Hücre Yüzey Boyaması.....	26
3.3.2 Periferik Kan Hücre Yüzey İçi Boyaması.....	27
3.3.3 Hücre Yüzey ve Hücre İçi Molekül Ekspresyonu	28
3.4.İstatistiksel Analiz.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Ritixumab Tedavisi Almadan (0. Ay) ve Tedavi Aldıktan (3. Ay) Sonra Hastaların İmmün Hücre Düzeyleri	30
4.1.1.Total T Lenfosit (CD3 ⁺) Düzeyleri.....	30
4.1.2.CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ NK Hücre Düzeyleri	30
4.1.3.CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ NKT Hücre Düzeyleri	31
4.1.4.Total B Lenfosit(CD19 ⁺) Hücre Düzeyleri.....	32
4.1.5.CD19 ⁺ CD27 ⁺ Hücre Düzeyleri.....	32
4.1.6.CD19 ⁺ CD38 ⁺ Hücre Düzeyleri.....	33
4.1.7.CD19 ⁺ CDw210 ⁺ Hücre Düzeyleri.....	34
4.1.8.CD3 ⁺ iNKT ⁺ Hücre Düzeyleri	35
4.1.9. CD4 ⁺ CD25 ⁺ Hücre Düzeyleri.....	36
4.1.10.CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (Treg) Hücre Düzeyleri.....	37
TARTIŞMA	38
KAYNAKLAR	44
FORMLAR	55
ETİK KURUL KARARI	58
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	61
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: 2010 ACR/EULAR Romatoid artrit sınıflandırma kriterleri (27)	10
Tablo 2-2: Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçlar (90)	21
Tablo 3-1: Çalışma grubu	25



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Romatoid artrit'ten etkilenmemiş ve romatoid artrit'ten etkilenmiş eklem görüntüsü	5
Şekil 2-2: RA etyopatogenezi	6
Şekil 2-3: Avrupa romatizma birliği tarafından sunulan romatoid artrit gelişim aşamaları	8
Şekil 2-4: B hücre olgunlaşma aşamaları	12
Şekil 2-5: T regülatör hücre gelişimi	14
Şekil 2-6: NK hücreleri.....	15
Şekil 2-7: NK hücre ve hedef hücre etkileşimi.....	16
Şekil 2-8: İnvariant NKT hücrelerinin diğer hücre tipleriyle etkileşimleri	17
Şekil 2-9: Rituksimab (anti-CD20) mekanizması.....	22
Şekil 2-10: B hücrelerini seçici olarak tüketen Rituksimab'ın B hücreleri üzerine etki mekanizması.....	23
Şekil 3-1: Hücre Yüzey Ekspresyonu Kapılama Stratejisi.....	28
Şekil 3-2: Hücre İçi Molekül Ekspresyonu Kapılama Stratejisi.....	29
Şekil 4-1: Total T lenfosit (CD3 ⁺) hücre düzeyleri	30
Şekil 4-2: CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ NK hücre düzeyleri	31
Şekil 4-3: CD3 ⁺ CD16 ⁺ 56 ⁺ NKT hücre düzeyleri	31
Şekil 4-4: Total B lenfosit (CD19 ⁺) hücre düzeyleri	32
Şekil 4-5: CD19 ⁺ CD27 ⁺ hücre düzeyleri	33
Şekil 4-6: CD19 ⁺ CD38 ⁺ hücre düzeyleri.....	34
Şekil 4-7: CD19 ⁺ CDw210 ⁺ hücre düzeyleri	35
Şekil 4-8: CD3 ⁺ iNKT ⁺ hücre düzeyleri	36
Şekil 4-9: CD4 ⁺ CD25 ⁺ hücre düzeyleri.....	37
Şekil 4-10: CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ hücre düzeyleri	37

SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

ACR:	American college of rheumatology
ACPA:	Anti- citrullinated ptotein antibody
ADCC:	Antikor bağımlı hücrel sitotoksite
AHÖ:	Akan hücre ölçer
Anti CCP:	Anti-cyclic citrullinated peptides
Alfa GalCer:	Alfa-galaktosil seramid
ASH:	Antijen sunan hücre
APC:	Allophycocyanin
BAFF:	B-hücre aktivasyon reseptörü
BHR:	B hücre reseptörü
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
Breg:	Regülatör B hücresi
CD:	Farklılaşma kümesi (Cluster of differentiation)
CIA	Kollajen induklenen artirit
CRP:	C-reaktif protein
STL:	Sitotoksik T lenfosit
DMARD:	Hastalığı modifiye edici ilaçlar
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilendiamin tetra asetik asit
ESR:	Eritrosit sedimantasyon hız
EULAR	European league against rheumatism
Fab:	İmmünglobülin'in antikor bağlayan kısmı
FACS:	Floresanla aktifleşen hücre ayırma yöntemi

FBS:	Fetal sığır serumu
FITC:	Fluorescein isothiocyante
FcR:	Fc reseptör
FCS:	Forward scatter channel
FDA:	Amerikan gıda ve ilaç bürosu
Foxp3:	Gen Transkripsiyon Faktörü
GM-CSF:	Granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör
HKH:	Hematopoetik kök hücre
IFN- γ :	İnterferon-gamma
Ig:	İmmünoglobülin
IgA:	İmmünoglobülin A
IgD:	İmmünoglobülin D
IgM:	İmmünoglobülin M
IL:	İnterlökin
İmmatür:	Olgunlaşmamış
iNKT:	İnvaryant doğal öldürücü T hücreler
KIR:	Öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptör
Matür:	Olgunlaşmış
MHC:	Major histocompatibility complex
mg/dl:	Miligram/desilitre
ml:	Mililitre
MTX:	Methotrexate
μ l:	Mikrolitre
n:	Birey sayısı
NSAİİ:	Nonsteroid antienflamatuvar ilaçlar
NK:	Doğal öldürücü hücre (Natural Killer)

NKR-P1:	NK lektin tip reseptör
NKT:	Doğal öldürücü T hücresi
PBS:	Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PE:	Phycoerythrin
PerCp:	Peridinin chlorophyll protein
PBMH:	Periferik kan mononükleer hücreler
PMA:	Forbol 12-miristat 13 asetat
RA:	Romatoid artrit
RF:	Romatoid faktör
Rpm:	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RTX:	Rituximab
SD:	Standart sapma
SLE:	Sistemik lupus eritematozus
SSC:	Side scatter channel
THR:	T hücre reseptörü
Th:	T helper (yardımcı) lenfosit
TNF- α :	Tümör nekroz faktör-alfa
Treg:	T regülatör hücre
TSLP:	Timik stromal lenfoprotein

ÖZET

Önder Gül, A. (2019). Aktif romatoid artritli hastalarda kullanılan anti-CD20 monoklonal antikoru (Rituksimab)'nın immün sistem hücreleri üzerine etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Romatoid Artrit (RA), dünya genelinde en sık rastlanan otoimmün hastalıklardan biridir ve nüfusun yaklaşık %1'ini etkilemektedir. RA hastalarının sağlıklı kişilere oranla periferik kan immün sistem hücrelerindeki sayısal değişikliklerin hastalık süreci ile ilişkili olduğu ve bunun sonucunda tedaviye verilen yanıtın etkilendiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda aktif RA tanısı alıp uygulanan tedavilerin yanıtsızlığı durumunda anti-CD20 (Rituksimab) tedavisine başlanmasına karar verilen (n:7) hastalar ile sağlıklı kontrollerin (n:7) tedavi öncesi ve tedaviden sonraki 3. ayda alınan periferik kan örneklerinde özellikle CD3 (T hücre), CD4 (yardımcı T hücre), CD16 (NK hücre), CD19 (B hücre), Breg (düzenleyici B hücre), CD56 (NK hücre), iNKT (değişmez doğal öldürücü hücre), Treg (regülatör T hücre) hücre yüzey molekül ekspresyonlarının sayısal değerleri akan hücre ölçer cihazında ölçülmüştür. Tedavi öncesi ve tedavi başladıktan sonraki 3. ayda alınan periferik kan örnekleri değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan CD19⁺ B (p=0,018) ve CD19⁺CD38⁺ plazma hücrelerinde anlamlı derecede azalma (p=0,028) saptanmasına karşılık, CD4⁺CD25⁺ T hücreleri, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg), CD19⁺CDw210⁺ (Breg) ve CD3⁺iNKT hücrelerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Rituksimab ilaç tedavisi verilen aktif RA hastalarıyla yapılan istatistiksel karşılaştırma baz alındığında tedavi verildikten 3 ay sonra CD19⁺ B hücrelerinde tedavi öncesine göre anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Rituksimab tedavisi sonucu B hücrelerinde saptanan azalma, RA hastalarında tedavinin etkili olduğunun göstergesidir.

Anahtar Kelimeler: Romatoid Artrit, Rituksimab, B hücresi, iNKT, Treg hücreleri.

Bu çalışma ROCHE Diagnostik tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Onder Gül, A. (2019). The Effect of anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) which is used on patients with active romatoid artrits on immune system cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Institute of Aziz Sancar Experimental Medicine, Immunology Department, Graduate Thesis, İstanbul. 2019.

Romatoid Artrits (RA), is one of the common autoimmune diseases which affects 1 % of the world population. It has been shown with various studies that the changes in peripheral blood immune system of the patients with RA is associated with the diagnosis of the disease compared to the healthy individuals and that as a result of this the response to the treatment has also changed. In our study, we analyzed the patients with active RA and insufficient response to standard treatments and thus eligible to receive treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab). We analyzed blood samples of the patients and healthy controls before the treatment and 3 months after to see the changes in molecular expressions of CD3 (T cell), CD4 (helper T cell), CD16 (natural killer cell), CD19 (B cell), Breg (regulatory B cell), CD56 (natural killer cell), iNKT (invariant T cell), Treg (regulatory T cell), under flowcytometer. Our results reveals that in B cells (CD19⁺) and plasma cells (CD19⁺CD38⁺) there was a significant decrease however there was not a substantial difference in T cells (CD4⁺CD25⁺), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg cells), CD19⁺CDw210⁺ (Breg cells) and CD3⁺iNKT⁺ (invariant iNKT cells). There was a significant decrease in B cells after rituximab treatment compared to the pre-treatment values that shows treatment effect.

Key Words: Romatoid Artrits, Rituximab, B cell, iNKT, Treg cell.

The present work was supported by the Roche Diagnostic with an unrestricted grant.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Romatoid Artrit (RA) sebebi bilinmeyen, kronik, yaygın enflamatuvar bir hastalıktır. RA, genellikle otoimmün bir hastalık olarak tanımlanır ve simetrik poliartiküler ağrı ve şişme, sabah tutukluğu, halsizlik ve yorgunlukla karakterize bir hastalıktır. RA değişken bir seyir gösterir, sıklıkla alevlenmeler ve daha az olarak gerçek remisyonlar izlenir. Tedavi edilmeyen hastaların çoğunda eklem hasarının ilerlemesiyle 10-20 yıl içerisinde önemli derecede fiziksel engelliğe yol açabilir (1).

Dünya genelinde görülen bir hastalık olan RA, farklı çalışmalarda ve farklı zaman dilimlerinde önemli değişiklikler göstermekle birlikte erişkin toplumlarda görülme sıklığı % 0.5-1 (2), yıllık insidansı ise % 0.03'tür (3). Genel olarak Asya ve Afrika'da, Birleşik Devletler ve Avrupa'ya göre RA sıklığı azdır (4) ve RA görülme sıklığının Avrupa'da kuzeyden güney ülkelerine gidildikçe azaldığı düşünülmektedir (5).

B hücreleri immün cevapta kritik öneme sahip hücrelerdir. Doğrudan antijen sunumu yapabilmelerinin yanı sıra antijen sunan hücrelerin fonksiyonlarında da etkin rol oynarlar. B hücreleri, T hücre etkinleşmesinde ve farklılaşmasında, foliküler dendritik hücrelerinin farklılaşmasında düzenleyici bir görev üstlenirler (6, 7)

RA'da, sinovyumda germinal merkezi yapılar oldukça fazla olup, B hücrelerinden zengindirler. Bu hücreler farklı ve kompleks antijenleri T hücrelerine sunabilirler. Sinoviyumda CD4⁺ T hücre aktivasyonu, B hücre foliküllerinin varlığına bağlıdır ve B hücre azalması sonucunda T hücrelerin interferon- γ (IFN-gamma) ve interlökin-1 (IL-1) yapımı da baskılanmış olur. B lenfositleri plazma hücrelerinin öncül hücreleri olduklarından antikor üretiminden de sorumludurlar (6, 7).

RA'da Rituksimab (anti-CD20 monoklonal antikor-RTX) tedavisinde amaçlanan, otoantikor yapan plazma hücrelerinin prekürsörlerini yok etmek, otoantijen sunan hücreleri ortadan kaldırarak T hücreleri yanıtsız bırakmak ve sürekli otoantikor üretimiyle kuvvetlenen ve enflamasyonun devamlılığına yardımcı olan B hücrelerinin süregelen döngüsünü ortadan kaldırmaktır (8).

Çalışmamızda aktif RA tanısı konmuş uzun yıllar çeşitli temel tedavi ilaçları ile tedavi gören hastaların bu ilaçlara yanıtsızlığı durumunda başlanmasına karar verilen Rituksimab adlı ilacın verildikten 3 ay sonra hastaların periferik kan örneklerinde

immün sistem hücrelerinde oluşan sayısal değişikliklerinin akan hücre ölçer cihazı ile saptanması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit Tanımı ve Tarihçesi

RA etyolojisi bilinmeyen, kronik, sistemik iltihabi bir hastalıktır. Genellikle otoimmün bir hastalık olarak tanımlanır ve simetrik poliartiküler ağrı ve şişme, sabah tutukluğu, halsizlik ve yorgunlukla karakterizedir. RA değişken bir seyir gösterir sıklıkla alevlenmeler ve daha az olarak gerçek remisyonlar izlenir. İltihabi ve kronik bir hastalık olan RA'da esas olarak periferik eklemlerde tutulum görülür. Tedavi edilmeyen hastaların çoğunda eklem hasarının ilerlemesi 10-20 yıl içerisinde önemli derecede sakatlığa yol açabilir (1). RA, en yaygın görülen iltihabi romatizma hastalıklarından biridir. Önemli fiziksel engelliliğe sebep olması ve bunların yaşam boyu sürebilmesi nedeniyle hastalarda önemli sosyoekonomik ve ruhsal sorunlara yol açabilmektedir. RA'ya ait tarih öncesi kanıtlar bulunmuşsa da hastalığın diğer kronik artropatilerden ayırt edilebilmesi ancak 19'uncu yüzyılın başında mümkün olabilmıştır. Bu hastalığa RA adı 19.yy'da Garrod tarafından verilmiştir. 1940 yılında Waaler ve 1948 yılında Rose ve ark.ları'nın romatoid faktörü (RF) tanımlamaları ve sonraki ilerlemeler RA'da otoimmün mekanizmaların önemi ortaya çıkarmıştır. Günümüzde RA kollajen ve otoimmün hastalıklar içerisinde yer almaktadır (9).

2.2. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi

RA dünyada yaygın görülen bir hastalıktır ve erişkin toplumda görülme sıklığı % 0.5-1 (2), yıllık insidensi ise % 0.03'tür (3). Genel olarak Asya ve Afrika'da, Birleşik Devletler ve Avrupa'ya göre RA daha az sık gözlenir (4) ve RA insidansının Avrupa'da kuzeyden güney ülkelerine gidildikçe azaldığı düşünülmektedir (5). Hastalık, bebek ve yaşlılar dahil her yaştaki bireyleri etkiler ancak, en sık olarak 40-50 yaşındaki kadınlarda ortaya çıkmaktadır. RA, 45 yaşın altındaki erkeklerde sık değildir, ancak yaşın artmasıyla insidens hızlı bir şekilde artar. Kadınlarda insidans 45 yaşına kadar artar, 75 yaşında plato çizer ve sonrasında azalır (10).

2.3. Romatoid Artrit Etiyolojisi ve Patogenezi

Uzun yıllar boyunca RA patofizyolojisi ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmıştır. Bireyin genetik yapısının RA'ya yatkın olması ve RA'nın şiddeti üzerinde kritik rol oynadığı bilinmektedir (11). Hastalığın genetik geçiş mekanizmaları karmaşıktır ve çok

sayıda geni içermektedir. Önemli yatkınlık genleri arasında sınıf II major histokompatibilite (MHC sınıf II) genleri bulunmaktadır. RA'nın belli HLA-DR haplotiplerindeki beta zincirlerindeki özel dizilim ile güçlü bir ilişkisi vardır. Bu ortak epitop 70-74.amino asitleri (glutamin,lösin,arginin,alanin,alanin) içerir ve QKRAA olarak isimlendirilir (12).

Hastalığa özgül etyolojik ajan uzun süredir araştırılmasına rağmen, RA'nın nedeni henüz bulunamamıştır. Farklı faktörlerin etkilediği RA patogenezinde genetik yatkınlığın yanı sıra bilinmeyen çevresel faktörler de önemli bir etkidir. Birçok teorik ve deneysel parametreler otoimmün hastalıklarda enfeksiyonların tetikleyici rolünü desteklemektedir. Buna karşın henüz RA'da sinoviti belirli bir patojenin başlattığı kanıtlanmamıştır (1).

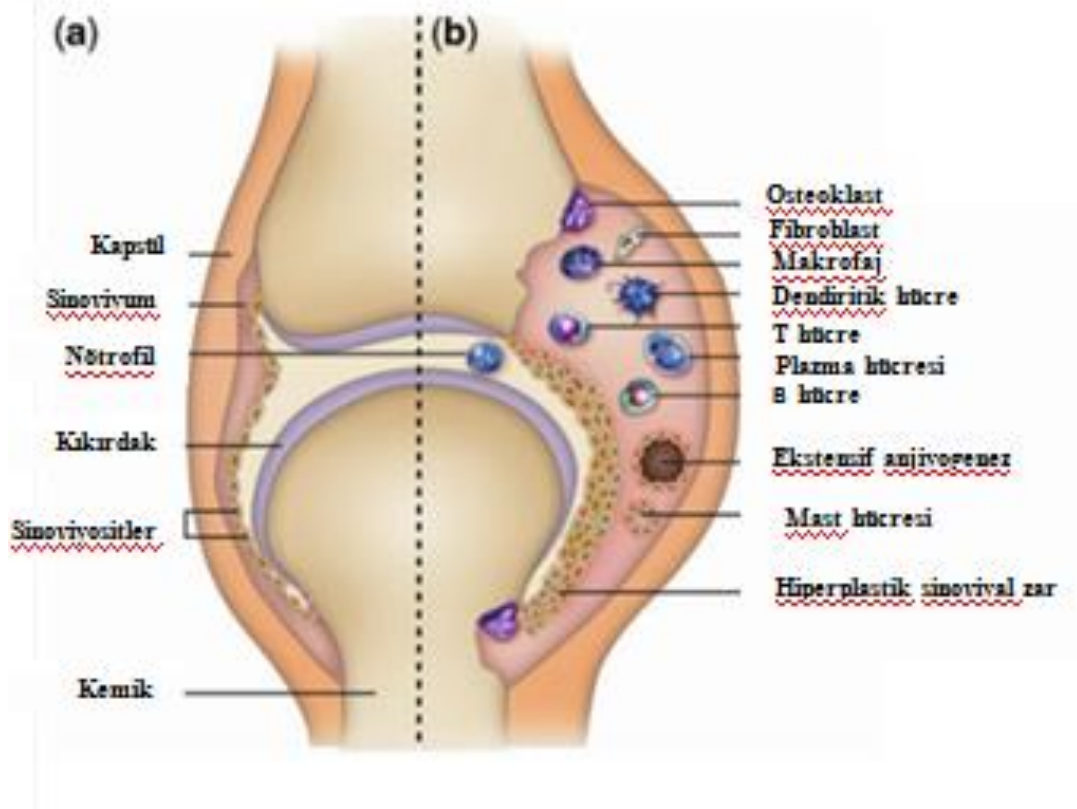
İnfeksiyöz ajanların hedef organları direkt olarak istila edebildiği veya eklem dışı enfeksiyonlarının artriti otoimmüniteyi uyarmak yolu ile tetikleyebildiği, sonuçta steril veya reaktif bir artiritin ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (13).

Eklem dışı enfeksiyonlar hastalığı yüksek olasılıkla, moleküler benzerlik olarak bilinen mekanizmayla hastalığı tetikler. Bu mekanizmaya göre enfeksiyon ajanlar ve konak dokuları arasında proteinlerde antijenik benzerlikler bulunur ve patojene karşı oluşan immün yanıt kendinden olan antijeni tanımayarak konak dokusuna yönelebilir. RA'da bu doku sinoviyadır. Benzer teorilerde, büyük oranda MHC bağımsız bir süreçle, "süperantijenlere" karşı bir otoimmün yanıtın çok sayıda T hücre klonunu aktive ettiği öne sürülmektedir. Bundan sorumlu olabileceği düşünülen antijenler arasında, tip II kollajen, proteoglikan, ısı şoku proteinleri, kıkırdak proteini gp39 ve immünoglobülinler sayılabilir (14, 15). RA'nın birçok hastalığı içeren bir hastalık olması da olasıdır, günümüzde hala bazı yaygın görülen klinik bulgularla tanımlanmaktadır ve hastalığı başlatan veya sürdüren tek etkili bir mekanizma olmayabilir (1).

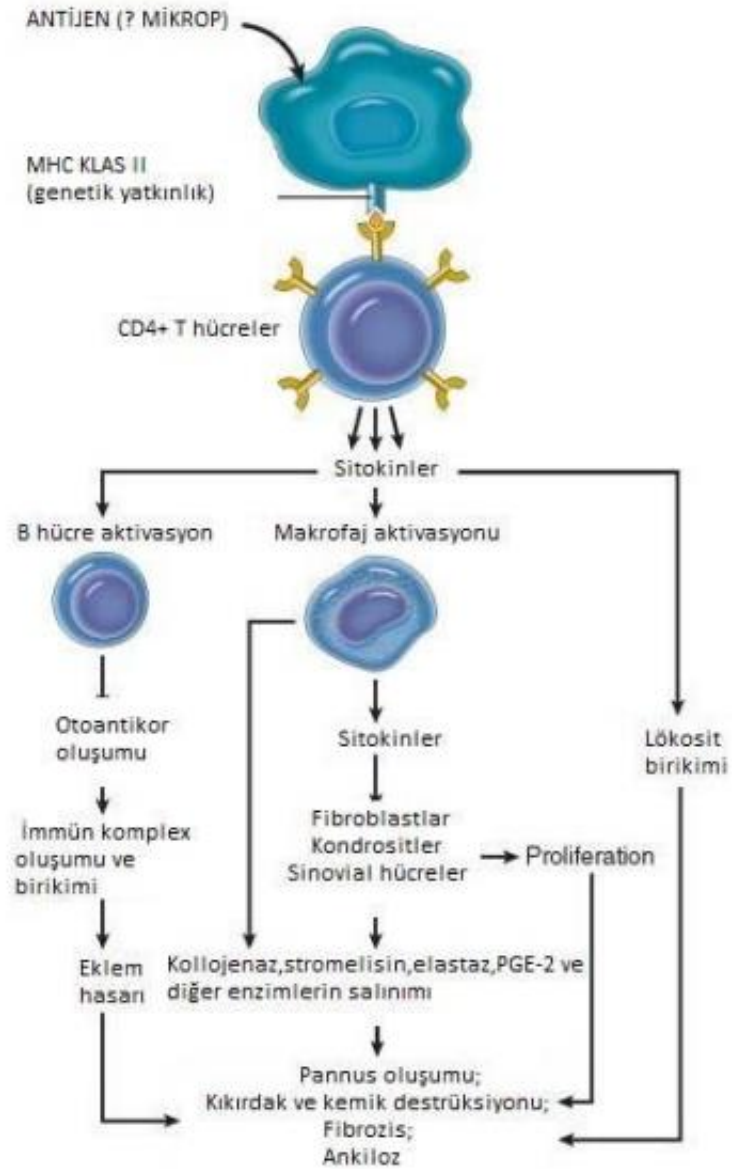
Güncel görüş, romatoid sinoviyumdaki enflamasyon ve doku yıkımının, hücreler arasındaki karmaşık etkileşimler sonucu oluşabileceğidir. Süreç antijen sunan hücre (ASH) ve CD4⁺ T hücre arasındaki bir etkileşimle başlamış olabilir. ASH, T hücre üzerindeki özgül reseptörlere bağlanan MHC sınıf II molekül-peptid antijen bileşimlerini sunar. ASH'dan T hücrelerine uygun bir "ikincil sinyal" veya ek uyarım verilmesi ile T hücre alt kümelerinde klonal bir genişleme olur. T hücreleri sinoviyal makrofajları uyarak IL-1 ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) gibi proinflama uyarı sitokinleri

salgılamalarını sağlarlar, (16) böylece çok sayıda iltihabi ve yıkıcı yolak aktiflenmektedir (1).

RA'daki eklem hasarı, sinoviyumun iç tabakasının çoğalması ile oluşan pannusun (kalınlaşmış sinovyal doku) aşırı büyüyerek komşu kıkırdak ve kemiğe yayılması ve hasara uğratması ile gelişir. Radyografik olarak eklem aralığında daralma ve ekleme komşu kemikte erozyon şeklinde izlenir. Fibroblast benzeri sinoviyositler ve makrofajlar, pannusun temel hücresel elemanlarıdır. Sinoviyal yayılma sırasında hücre dışı matriks hasarından birçok enzim ailesi sorumludur, bunlar arasında serin proteazlar ve katepsinler sayılabilir. Büyük kısmı iç tabakadaki sinoviyositlerde üretilen matriks metalloproteinazlar da doku hasarında önemlidir (1).



Şekil 2-1: Romatoid artrit'ten etkilenmemiş ve romatoid artrit'ten etkilenmiş eklem görüntüsü (17)



Şekil 2-2: RA etyopatogenezi (26)

2.3.1. Romatoid Artrit Patogenezinde B Hücrelerinin Rolü ve Otoantikorlar

B hücreleri immün cevapta kritik öneme sahip hücrelerdir. Doğrudan antijen sunumu yapabilmelerinin yanı sıra antijen sunan hücrelerin fonksiyonlarında da etkin rol oynarlar. B lenfositleri, T hücre etkinleşmesinde ve farklılaşmasında, foliküler dendritik hücrelerinin farklılaşmasında düzenleyici bir görev üstlenirler (6, 7).

RA'da, sinoviyumda germinal merkezi yapılar oldukça fazla olup, B hücrelerinden zengindirler. Bu hücreler farklı ve kompleks antijenleri T hücrelerine sunabilirler. RA'da sinoviyumda CD4⁺ T hücre aktivasyonu, B hücre foliküllerinin varlığına bağlıdır ve B hücre tükenmesi sonucunda T hücrelerin makrofajları uyarak

salgılanan IFN- γ ve IL-1 sitokin yapımı da baskılanmış olur. B lenfositleri plazma hücrelerinin öncül hücreleri olup antikor üretiminden de sorumludurlar (6, 7).

RA hastalarının % 80'in de B hücreleri IgG için spesifik olan otoantikorlar üretir. Bu antikorlar RF olarak adlandırılırlar ve en yaygın izotip immünglobülin M (IgM)'dir ancak immünglobülin A (IgA) ve immünglobülin G (IgG)'de mevcuttur. RA'lı hastalar sıklıkla tip II kollajen, ısı şoku proteinleri, proteoglikanlar, kıkırdak link proteinleri ve ağır zincir bağlayıcı proteinler gibi anti-CCP proteinlere karşı antikorlara sahiptirler. RF ve anti-CCP bulgularının artması eklem hasarı için belirleyici kabul edilir (18). Bu otoantikorlar, kompleman sisteminin aktivasyonunun yanı sıra artan enflamasyona katkıda bulunan immün kompleksleri oluştururlar. RA uzun bir süre T hücresi kaynaklı bir hastalık olarak kabul edilmiştir, ancak B hücreleri de RA patogeneğinde önemli bir rol oynar (19).

RF ve anti-CCP'nin hastalık belirtileri ortaya çıkmadan önce de serumda saptanabilmeleri hastalığın oluşum ve gelişiminde erken humoral immünitinin rolünü göstermektedir (20).

RA hastalarında SLE hastalarında görülen otoantikor çeşitliliğine rastlamasak dahi, 2010 yılında yayınlanan yeni RA sınıflandırma kriterlerinde de yer alan, özgüllüğü % 95'lere varan anti-CCP antikoruna ile özgüllüğü anti-CCP kadar olmasa da hastalık açısından önemli bir otoantikor olan RF'nin varlığı dikkat çekicidir (21). RF'nin geçmişte anti-CCP antikorundan daha eski olup , IgG'ye karşı gelişen IgM veya IgA şeklinde antikorlardır, özgüllüğü daha azdır ve % 55-60'lar civarındadır.

2.4. Romatoid Artrit Klinik Bulguları

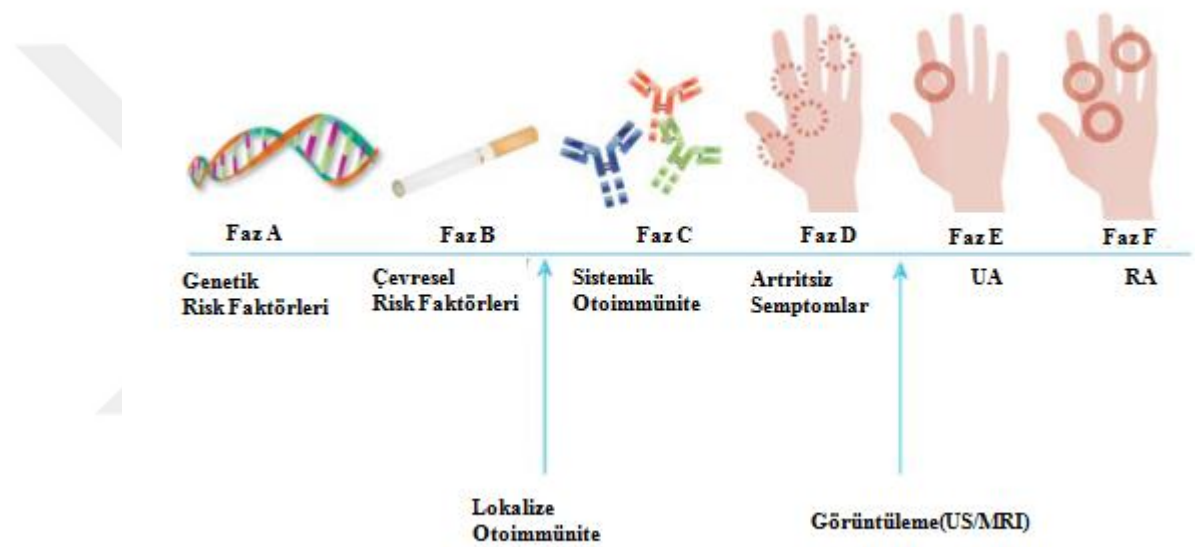
RA'nın erken döneminde hastalığa özgül özellikler yoktur ve hastalığın karakteristik özellikleri zaman içerisinde gelişir. RA tanısını kesin olarak koyduracak tek bir tanısal test yoktur. Bunların yerine, hastalığın tanısının konulması genellikle biraraya getirilen karakteristik semptom, bulgu, laboratuvar verileri ve radyolojik bulgulara dayanmaktadır (1).

RA'nın klinik belirtileri oldukça değişkendir. Tipik olarak hastalık sinsice başlar, semptomların haftalar ile aylar içinde yavaşça ilerlemesi ile karakterizedir. Daha az olarak akut başlangıçlıdır ve genellikle poliartikülerdir (1).

Eklemleri ilgilendiren en önemli semptom ve bulgular eklem ağrısı, sabah tutukluğu, eklem şişliği, eklem bölgesinde kızarıklık, sıcaklık artışı, krepitasyon,

hareket kısıtlanması ve deformitelerdir. RA, en çok ekstremitelerin sinoviyal eklemlerini tutar (9).

RA, esas olarak eklem tutulum bulguları ile ortaya çıkmasına karşın sistemik enflamatuvar bir hastalıktır. Hastaların çoğunda halsizlik, yorgunluk, düşük derecede ateş ve depresyon gibi sistemik semptomlar bulunur. Bu semptomlar artrit gelişmeden haftalar, aylar öncesinden başlayabilir. Belirtiler hastalığın başlangıcında karakteristik olarak dalgalanma gösterdiği için doğru tanı konulmasının aylarca gecikmesi nadir değildir (1).



Şekil 2-3: Avrupa romatizma birliği tarafından sunulan romatoid artrit gelişim aşamaları (28)

2.5. Romatoid Artrit Sınıflandırma Kriterleri

RA ile ilgili yapılan çalışmalarda hastalığın eklem hasarının radyografide saptanmadan önce başladığını göstermiştir. 1990'lı yıllarda “erken artrit” tanımı, 2000’lerde “çok erken artrit veya sinovit” tanımı yapılmıştır. Günümüzde, “erken artrit” kliniğe başvuran ve henüz sınıflandırmaya sokulmayan hastalardan hangilerine RA tanısı konulacağı bilinmemektedir. Anti-CCP ve RF yüksekliği, sigara kullanımı gibi faktörler kısmen fikir vermekle birlikte, RA’da amaç; hastalarda ileriki yıllarda meydana gelecek eklem hasarını önlemek ve bunların yol açacağı fonksiyonel-fiziksel kısıtlamaların önüne geçmek olmalıdır. Bunun için hastaların tanısı en erken şekilde

konulup şüphede kanılan durumlarda dahi katı bir tedavi yöntemi belirlenip uygulanmalıdır (22).

“Erken artrit” kavramı 1990’larda semptomları 12 ay veya 24 aydan daha az süredir mevcut hastalar için kullanılmaktaydı. Günümüzde ise 12 haftadan daha az süredir şikayetleri mevcut hastalarda “çok erken sinovit” tanımlamasıyla farklı bir noktaya gelinmiştir (23). “Erken” veya “çok erken sinovit” kavramı güncel tedavi yaklaşımlarımızın temelini oluşturmaktadır. “Tanımlanamayan artrit kavramı”, “erken sinoviti” olan ancak enfeksiyon hastalıkları veya herhangi bir otoimmün hastalık tanı kriterini karşılamayan hastalar için kullanılmaktadır. 1987 yılı ACR tanı ölçütlerine göre bu sınıfa giren hastaların bir kısmı belli bir süre sonra RA tanı ölçütlerini karşıladığı zaman radyolojide saptanan eklem hasarları çoktan başlamış ve tedavide amaçlanan hedefe ulaşmamızda önemli bir engel teşkil etmiştir. 2010 yılında yeni RA ölçütlerinin belirlenmesiyle birlikte 2010 ve 1987 tanı ölçütleri baz alınarak geriye dönük karşılaştırmalı çalışmalar yapılmıştır (21). Bu çalışmalarda, 1987 tanı ölçütlerine göre sınıflandırılmamış veya “erken artrit” olarak tanı almış hastaların yaklaşık üçte biri 2010 tanı ölçütleri baz alındığında RA tanısı almıştır. RA tanısı için 2010 yılında yenilenen Amerika/Avrupa (ACR/EULAR) Romatizma Birliği’nin belirlediği ölçütler kullanılmaktadır (24, 25).

HEDEF POPÜLASYON 1. ≥ 1 aşikar klinik sinovitli (şişlik) eklem 2. Başka bir hastalıklar (SLE, Gut, PsA) açıklanamayan sinovit A-D kategorisi skorlanır Kesin RA olarak sınıflandırmak için 6/10 skor gerekmektedir < 6/10 skor olan olgular zaman içerisinde bu kriterlerle yeniden değerlendirilmelidir	
	Skor
A. EKLEM TUTULUMU*	
1 büyük eklem	0
2-10 büyük eklem	1
1-3 küçük eklem	2
4-10 küçük eklem	3
> 10 eklem (en az bir tanesi küçük)	5
B. SEROLOJİ**	
RF veya CCP negatif	0
RF veya CCP düşük titrede pozitif	2
RF veya CCP yüksek titrede pozitif	3
C. AKUT FAZ REAKTANLARI***	
CRP veya ESH normal	0
CRP veya ESH yüksek	1
D. SEMPTOM SÜRESİ****	
< 6 hafta	0
≥ 6 hafta	1

* Şiş veya hassas eklem (görüntüleme ile teyit edilmiş olabilir DİF, 1. MKF, 1. MTF eklem hariç Büyük eklemler: omuz, dirsek, kalça, diz, ayak bileği Küçük eklemler: el bileği, 1 interfalangeal, 1-5. MKF, 2-5. MTF

1 test sonucu gerekli Negatif: normalin üst sınırı veya daha düşük Düşük pozitif: normalin üst sınırından < 3 kat yüksek Yüksek pozitif: normalin üst sınırında ≥ 3 kat yüksek *1 test sonucu gerekli Normal ve anormal sonuçlar yerel şabotuar standartlarına göre değişir ****Hastanın bildirdiği süre dikkate alınmalıdır

Tablo 2-1. 2010 ACR/EULAR RA sınıflandırma kriterleri (27)

2.6. B Lenfositlerin Genel Özellikleri ve Gelişimi

Kan hücrelerinin % 5-15'ini oluşturan B hücreleri humoral immün yanıtın sorumlu olup dalak, lenf bezleri, tonsiller ve mukoza ile ilişkili periferik lenfoid dokularda bulunurlar (29). Temel fonksiyonları antikor üretimi ve salınımıdır (30).

Dalak, lenf bezleri, tonsiller vb. gibi periferik lenfoid organlarda bulunan B hücrelerinin kendisine özgü yabancı bir antijen ile karşılaşması durumunda antikor salınımı başlar, buna “antijen bağımlı faz” denir ve humoral immün yanıtın ilk basamağını oluşturur. İki şekilde yabancı antijenleri elimine ederler; B hücrelerinden salınan antikorlar yüzeylerinde “polisakkarit” ve “lipid antijen” barındıran hücre dışı mikroorganizmaların antijenlerine bağlanarak ya da onların hücre dışına saldıkları

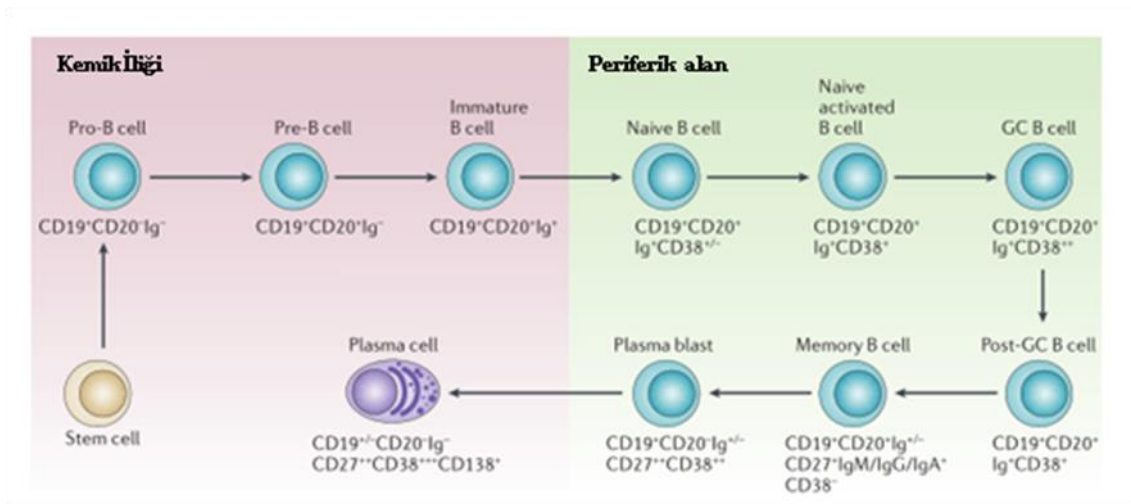
toksin'lerine yönelik primer immün yanıt mekanizmasını başlatarak onları yok ederler (29, 31, 32).

B hücreleri kemik iliğindeki kök hücrelerden köken alır, gelişimi ve olgunlaşması da antijenden bağımsız olarak primer lenfoid organlarda gerçekleşir. T, B, NK hücrelerinin öncü hücreleri olan lenfoid hücreler de kemik iliğinde gelişir. Kemik iliğinde öncü bir B lenfoid hücreden olgun bir B hücresi oluşması 2-3 gün içerisinde olmaktadır (31). Kemik iliğinde oldukça karmaşık bir olgunlaşma süreci olan B hücrelerinin yüzeylerinde yer alacak antijene özgül reseptörler, bu reseptörü kodlayan germline DNA segmentlerinin rastgele somatik rekombinasyonu (rearanjmanı) ile ve bunlara nükleik asit dizilerinin eklenmesiyle oluşur. (30, 31). Karmaşık bir olgunlaşma sürecinden geçen B hücreleri sırasıyla pro-B hücre, pre-B hücre, immature B hücre, matür B hücre olmak üzere isimlendirilirler ve hücre yüzeyinde antijene özgü reseptörleri eksprese ederler böylece hem fonksiyonel hem de fenotipik olgunlaşma ve santral tolerans kazanırlar (31). Bazen bu gelişim ve olgunlaşma sırasında yüzeylerinde otoreaktif taşıyan B hücreleri saptanır ki bu hücreler kemik iliğinde 2 farklı tolerans mekanizması tarafından kontrol edilir. Ya “klonal delesyon” ile yok edilirler (negatif seleksiyon: apoptozis) veya reseptör özgüllüklerini değiştirmeye zorlanırlar (reseptör değiştirme) (30, 33). Olgun, antijenle hiç karşılaşmamış B hücrelerinin yüzey antijen reseptörleri, B hücre reseptörleri (BHR), immunoglobulin M (IgM) ve immunoglobulin D (IgD) molekülleridir.

Bu yüzey antikorlarının antijen spesifisitesi son derece geniş olup “negatif seleksiyon” hipotezine göre her şahıs 10^7 ile 10^{11} yapısal olarak farklı antijeni tanıyabilecek BHR'lerine sahip 10^7 ile 10^{11} B hücre klonu barındırmaktadır. B hücre klonlarının kendisine özgü antijen ile karşılaşmadan önceki fazın adına “antijenden bağımsız faz” denir. Kemik iliğinde tüm oluşum ve gelişim aşamalarını tamamlayan olgun, naif B hücreler dalak, lenfoid dokular gibi periferik lenfoid dokulara göçerek antijen ile karşılaşmak için beklemeye başlarlar. (30, 31, 32, 34).

B lenfositlerin regülatör B hücresi (Breg) olarak adlandırılan ve immün toleransı uyurabildiği bilinen bir alt grubu da vardır. Bu hücrelerin görevleri otoimmünite başta olmak üzere, kanser ve enfeksiyöz hastalıklarında detaylı olarak incelenmiştir. İlk kez immünregülatör B hücrelerinin varlığı ve akut deneysel otoimmün ensefalomyelitinin iyileşmesinde (EAE) rolleri olduğunu bildiren araştırmacılar Janeway ve ark.'ları olmuştur (35). Çeşitli fare modellerinde Breg hücrelerinin kolit, artrit ve EAE

hastalığında hastalığın şiddetini azalttığı gösterilmiştir (36, 37). Aktive olmuş fare B hücrelerinin önemli miktarlarda IL-10 üretebildiği, çeşitli enflamatuvar deneysel modellerde *in vivo* olarak gösterilmiştir. (39). Deneysel modellerde, B hücrelerinin toleransın başlatılması ve sürdürülmesi için çok önemli olduğu görülmüştür. Bu modellerde, Treg hücrelerinin de önemi vurgulanmış, gerçekte Breg ve Treg hücrelerinin toleransı uyarmak ve aracılık etmek için IL-10 üretme konusunda işbirliği içinde oldukları da kanıtlanmıştır. Farelerde yapılan araştırmaları izleyen çalışmalarda, insan vücudunda da B hücrelerinin lokal immün yanıtı düzenleme ve sürdürmede aktif rol oynadıkları bunu da inhibitor görevi üstlenen IL-10 üretimiyle sağladıkları belirlenmiştir. Regülatör fonksiyonlarını, doğrudan regülatör sitokinler olan IL-10 ve TGF- β üreterek ya da zararlı immün cevabı durdurmak için patojenik T hücreleri ile etkileşerek gerçekleştirirler (125). B hücreler, otoimmün hastalıkların gelişiminde otoantikorlar üreterek edinilmiş immün cevap açısından patojenik bir görev üstlenebilirler (40). Breg hücrelerin enflamasyonu baskılayıcı mekanizmaları muhtemelen enflamasyon cevabının tipine bağlı olarak da değişmektedir. RA'da başlıca T hücre aracılı edinsel immün cevap mekanizması işlediği için, Breg hücreleri Th1/Th2 dengesini kontrol ederek enflamasyonu baskılar (41, 42, 125).



Şekil 2-4: B hücre olgunlaşma aşamaları (43)

2.7. T Lenfositler

Kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücrelerden (HKH) köken alan T lenfositler hücrel immün yanıtta görev alan hücreler olup (44) olgunlaşma ve gelişim aşamalarını timusta gerçekleştirirler (45). T lenfositlerin yüzeyinde yer alan CD (CD

cluster of differentiation, farklılaşma kümesi) dediğimiz yüzey reseptörleri ile tanımlama yapabiliriz. T lenfositlerin farklılaşmasının değişik aşamalarında yüzeylerinde “CD4”, “CD8”, “CD25” ve “CD44” reseptörlerini saptayabiliriz. Olgunlaşma aşamalarını timusta geçiren T hücrelerinin çoğu erken T öncü hücreler olarak adlandırılırlar (46) Bu T öncü hücreler “CD4 ve CD8” yüzey reseptör molekülüne sahip değildirler (47). Timusta bulunan timik epitelyal hücreler tarafından üretilen sitokin ve ligandlar etkisiyle bazı gelişim aşamalarından geçen T öncü hücreler (timositler), yüzeylerinde CD4 ve CD8 yüzey moleküllerine sahip olarak aktifleşirler. Stromal hücrelerin MHC molekülü ile de etkileşime girerek, pozitif ve negatif seleksiyona uğratıldıktan sonra olgun T lenfositleri olarak dolaşım ile periferik lenfoid organlara gönderilirler (45, 48, 49, 50).

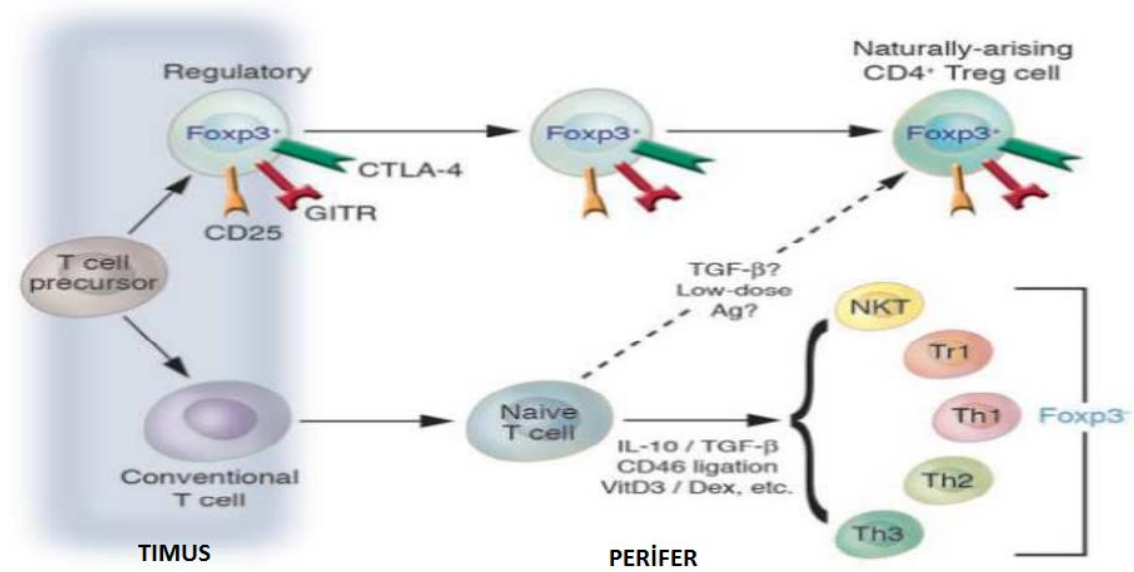
2.7.1. T Regülatör Hücreler (Treg Hücreler)

T regülatör hücre (Treg)’ler CD4⁺ T hücrelerinin bir alt grubudur. Peptid-MHC protein ile eş zamanlı uyarıcı varlığında uyarılan THR’leri aktif T hücrelerinin çoğalmasını ve sitokin üretimini baskılar (51). Timusta yer alan ve medullar ile kortikal dentritik hücrelerinin oluşturduğu mikro çevre Treg hücresi için önemli rol oynamaktadır. Treg, bağışıklık sistemini baskılayarak kendi kendine toleransın devam etmesine yardımcı olmaktadır (52). Treg’leri doğal (nTreg) ve indüklenabilir Treg (iTreg) olarak sınıflandırabiliriz. Timustaki gelişimi sırasında olgunlaşıp fonksiyon nTreg’in yanı sıra iTreg periferde naif CD4⁺ T hücrelerin farklılaşması sırasında gelişim fonksiyon kazanır (51).

Bu hücreler birçok açıdan klasik $\alpha\beta$ CD4⁺ T” hücresine benzemektedir; ancak onları klasik T hücrelerinden ayıran, yüzeylerinde bulunan transkripsiyon faktörü denilen Foxp3 ve CD25 yüzey reseptörüdür (38). Treg’ler immün baskılayıcı etkilerini IL-10 ve TGF- β gibi baskılayıcı sitokinlerin salınımı, IL-2 lokal konsantrasyonunun tüketimi, apoptozisin tetiklenmesi ve hücre-hücre temasında yani kontak inhibisyonunda hücre döngüsünün durdurulması ile gösterir (51).

Treg hücresinin gelişimi diğer $\alpha\beta$ T lenfositlerinin gelişiminden farklıdır. Gelişimleri geç ve negatif seleksiyon olaylarından etkilenmemektedir (53). Hassal cisimcikleri spesifik mikro çevre oluşturarak Treg hücre gelişimine katkı sağlamaktadır. Hassal cisimciklerinde bulunan bir grup özelleşmiş epitelyal hücreler IL-7 benzeri sitokin olan timik stromal lenfoprotein (TSLP) üreterek, medullar dendritik hücrelerin

fonksiyonlarını düzenlemektedirler. TSLP ile uyarılan dendritik hücrelerde yüksek miktarda, yardımcı ligand olan CD80 ve CD86 yüzey molekülü bulunmaktadır. Bu hücreler MHC'ye bağımlı $CD4^+CD8^-CD25^-$ timositleri, $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ Treg hücrelere dönüştürmektedirler. Bunlara ek olarak normal timusun bölümleri incelendiğinde Treg hücre fenotipine sahip olan hücrelerin TLSP içeren Hassal cisimciklerine yakın olduğu bildirilmiştir (54). Dolaşımda yer alan $CD4^+T$ hücrelerinin % 5'ini oluşturan Treg hücrelerin periferdeki otoreaktif T hücrelerini düzenleyerek, otoimmünite gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmektedir (55).



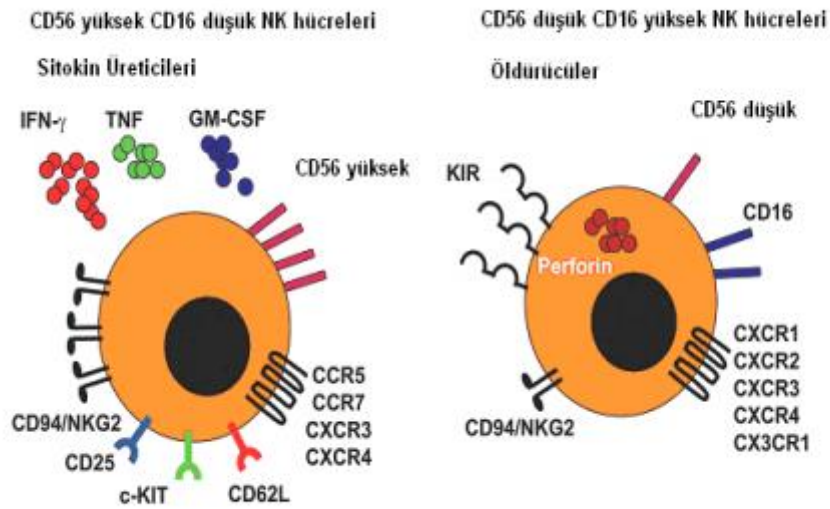
Şekil 2-5: T regülatör hücre gelişimi (56)

2.8. Doğal Öldürücü (Natural Killer, NK) ve Doğal Öldürücü T Hücreleri

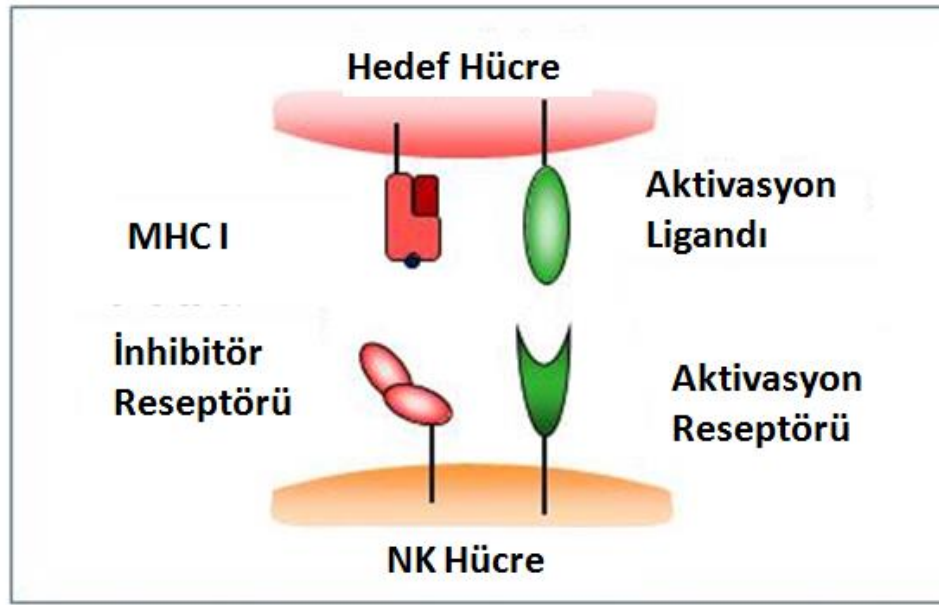
2.8.1. NK Hücrelerinin Genel Özellikleri

Doğal öldürücü (natural killer, NK) hücreler olarak tanımlanan NK hücreleri tüm hücreler gibi kemik iliğinden köken alıp morfolojik olarak büyük granüllü bir yapıya sahip oldukları için aynı zamanda büyük granüllü lenfosit anlamına gelen LGL hücresi olarakta adlandırılırlar. Doğal immün yanıt hücresi olan NK hücreleri temel olarak kan, dalak ve peritoniyal sıvıda bulunur (57). NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin % 4-15'ini oluştururlar. NK hücreleri yüzeylerinde T (THR) ve B (Ig) hücre yüzey antijen reseptörü içermeyen sitotoksik T lenfositleri (STL) olarak adlandırılırlar (58). Bu hücreler fenotip olarak yüzeylerinde $CD3^-CD16^+CD56^+$

barındıran litik aktivite gösteren, yüzeyinde Ig barındırmayan, yapışma ve fagositik aktivite özelliği olmayan hücrelerdir. Herhangibir uyarana ihtiyaç olmaksızın hedef hücreleri öldürebilirler. NK'ya özgü olmayan mitojenler ve IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 sitokinler ile aktive olan. ve doğal immünite elemanı olan NK hücreleri lizis mekanizmasını başlatarak virüsle enfekte hücrelerin yok edilmesini sağlarlar. Bu hücrelerin enfekte olan ve olmayan hücreleri nasıl tanıdığı açıklanamamakla birlikte yüzeylerinde bulunan reseptörlerinin rol oynadığı düşünülmektedir. İki tip hücre yüzey reseptörü eksprese eden NK hücrelerinde NKR-P1 lektin tip reseptör, hedef hücre yüzeyindeki karbonhidrat ligandlarını tanır ve lizisi başlatır, Killer immünoglobulin-benzeri reseptörler (KIR) olarak adlandırılan ve lizisi baskılayan bu reseptörler ise, hedef hücre yüzeyindeki MHC sınıf I molekülüne bağlanır. NK hücreleri, yüzeylerinde MHC yüzey ekspresyonu taşımayan ve MHC sınıf I molekülündeki değişikliklerden dolayı olan virus ile enfekte hücreleri kolayca tanıyıp öldürebilirler (57).



Şekil 2-6: NK hücreleri (59)



Şekil 2-7: NK hücre ve hedef hücre etkileşimi (60)

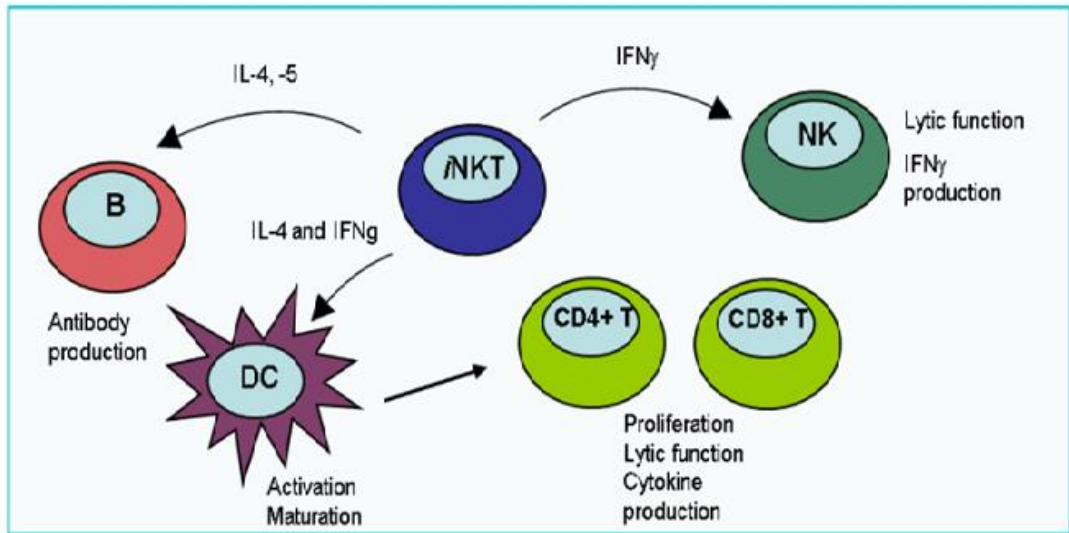
2.8.1.1. NKT ve Değişmez NK (iNKT) Hücreleri

Hem NK hem de T hücreleri ile ortak özellik taşıyan $\alpha\beta$ T hücrelerinin bir alt grubu olan doğal öldürücü T hücreleri (doğal öldürücü T hücre -NKT) otoimmünitenin düzenlenmesinden sorumlu olup yüzeylerinde $CD3^+56^+$ eksprese ederler ve $CD3^+CD56^+$ NKT olarak ifade edilirler. Bu hücreler yüksek miktardaki IFN- γ , IL-4 ve granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) sitokinlerini salgılamakla birlikte ayrıca, IL-2, IL-13, IL-17, IL-21 ve TNF- γ gibi diğer sitokinleri de üretmektedirler.

NKT hücreleri, yüzeylerinde eksprese ettikleri antijenlerine bağlı olarak farklı gruplara ayrılmakta ve farklı isimler almaktadır. Bunlardan ilki yüzeyinde eksprese ettiği CD1d molekülüyle mikrobiyal glikolipid yapıları tanıyan değişmez doğal öldürücü (iNKT) hücreler olarak, diğeri ise bu antijenleri eksprese etmeyen NKT-benzeri hücreler olarak isimlendirilir. NKT hücrelerinin, NK hücreleri gibi NKG2D, NKG2A ve CD94 eksprese ettikleri de bilinmektedir (61).

iNKT önemli bir immün düzenleyici T hücre alt kümesidir. Farelerde, NKT hücrelerinin çoğu, sınırlı bir dizi zincir ile birleştirilmiş bir değişmez $V\alpha 14-J\alpha 18$ TCR'yi eksprese eder (62). Buna göre, bu NKT hücreleri değişmez NKT hücreleri olarak

adlandırılmıştır (63, 64). Bu iNKT hücreleri, glikosfingolipid antijeni olan alfa-galaktosilseramidi (α GalCer) tanır (65). TCR ligasyonu yoluyla aktivasyon üzerine, iNKT hücreleri interlekin IL-4, IL-10, IL-13 gibi Th2 sitokinlerinin yanı sıra IFN- γ ve TNF- α gibi bol miktarda T yardımcı tip 1 (Th1) sitokin salgılar. Aynı hücre tipi tarafından Th1 ve Th2 sitokinlerinin hızlı ve eşzamanlı salınımı, iNKT hücrelerinin ayırt edici özelliğidir (66, 67). Aslında, iNKT hücreleri çok çeşitli immün yanıtları şekillendirir; doku yıkımını, otoimmüniteyi, antitümör tepkilerini, konak savunmasını, alerjiyi ve iltihabı kontrol ederler (68, 69). Böylesi farklı yanıtlar, doku dağılımlarının yanı sıra fonksiyonel heterojenliklerine de bağlanabilir (70, 71). Bununla birlikte, iNKT hücre cevabının tipini ve iNKT hücrelerinin bağışıklık yanıtlarına olan katkısını belirleyen sitokin profilini belirleyen mekanizmalar hala mevcut değildir (72, 73). Günümüzde, 6B11 monoklonal antikorunu veya anti-Valfa24 ve anti Vbeta11 antikorlarının bir kombinasyonunu kullanan iNKT hücrelerinin tanımlanması için birkaç akan hücre ölçer temelli yaklaşım mevcuttur (61). Dolaşımdaki iNKT hücrelerinin sayısındaki kusur; multipl skleroz, tip I diyabet, romatoid artrit, enflamatuvar barsak hastalıkları ve bazı kanser türleri gibi immün aracılı hastalıklarda görülür. Çalışmaların çoğu, sağlık ve hastalıktaki rollerini değerlendirmek ve iNKT bazlı tedavilerin etkinliğini izlemek için dolaşımdaki iNKT hücrelerinin sayısını değerlendirmektedir (82).



Şekil 2-8: iNKT hücrelerinin diğer hücre tipleriyle etkileşimleri (74)

2.8.1.2. NK ve NK Alt Gruplarının RA ile İlişkisi

Kıkırdak yıkımı ve kemik erozyonlarına yol açan eklem ve çevre dokuların iltihabı ile karakterize olan kronik bir otoimmün hastalık olan RA hastalarında etkilenen eklemlerdeki yüksek seviyelerde proinflamatuvar sitokinler (örneğin, TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-23) ve enflamatuvar hücre infiltratları (T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlar dahil) patogenez ile ilişkilidir. Günümüz çalışmaları RA'nın patogenezinde NK hücrelerinin ilişkisi olabileceğini göstermiştir (75, 76). RA hastalarının sinoviyal sıvılarında bulunan lenfositlerin (% 8-25) önemli bir kısmını oluşturan NK hücreleri hastalığın erken döneminde tespit edilebilir.

Yapılan son çalışmalarda otoimmün hastalığı bulunan bireylerin periferik kanlarından alınan örneklerde NK hücrelerinin sayısal değerlerindeki azalmaya paralel olarak fonksiyonlarında da azalma tespit edilmiştir (61). RA hastalarının sinoviyal sıvılarındaki NK hücreleri, CD56^{parlak} (NK hücrelerin ~% 60'ı) ile CD94 / NKG2A ekspresyonları artarken KIR ve CD16'ların ekspresyonları azalır (77, 78). NK hücrelerinin CD56^{parlak} alt popülasyonu RA hastalarının periferik kanında çok düşük miktarlarda tespit edilmiştir. Sinoviyal sıvı içerisindeki CD56^{parlak} NK hücreleri yüksek miktarda CD69 ve NKp44 eksprese ederler ve aynı hastaların periferik kanındaki CD56^{parlak} NK hücrelerinden IFN- γ kadar daha fazla TNF- α üretirler (79). Sinoviyum içindeki CD56^{parlak} NK hücre birikimine karşılık RA hastalarının periferik kanında NK hücrelerinin miktarının ve sitotoksik özelliklerinin de azaldığı gösterilmiştir (80, 81).

2.9. İmmünolojik Tolerans ve Otoimmünite

Sağlıklı bir immün sistem yabancı antijenlere karşı yanıt oluştururken, kendi öz antijenini tanır ve ona karşı bir immün yanıt oluşturmaz, bireyin öz antijenine karşı yanıtsızlık durumuna “**immünolojik tolerans**” denir. Öz antijenleri tanıyabilen lenfositler normal lenfosit gelişim sürecinde sürekli oluşmaktadırlar bunun yanında immün sistem birçok öz antijeni kolaylıkla tanıyabilmekte ve bu antijenlere yönelik yanıtsızlık hali antijenlerin lenfositlerden gizlenmesiyle sağlanamaz. Bu durumda bireyin kendinden olana karşı bir yanıtsızlık durumu geliştirmesi gerekmektedir. Bu da ancak kendinden olan ve olmayan yabancı antijenler arasında ayırım gözetebilen bir yapının varlığını gerektirir. Bu yapının başarısızlığı halinde immün sistem bireyin kendi

hücre ve dokularına saldırabilir. İmmün sistemin kendi öz antijenine yanıt geliştirmesi durumuna “**otoimmünite**” ve oluşturdukları hastalıklara da “**otoimmün hastalıklar**” denilmektedir (83).

2.9.1. İmmünolojik Tolerans Mekanizmaları

İmmünolojik tolerans, konağın kendi öz antijenine karşı lenfositlerin yanıtsızlık durumu olarak açıklanabilir. Bir antijene özgül reseptörü olan lenfosit, o antijen ile karşılaştığında 3 olasılıktan herhangi biri gelişir: Lenfosit reseptör ile antijeni tanır ve immün yanıt gelişir; bu tür yanıtı yol açan antijen “immünojenik antijen” olarak adlandırılır, lenfositler kendi öz antijenini tanır ve o antijene tolerans gelişir; bu tip yanıtı yol açan antijen “tolerojenik antijen” olarak tanımlanır veya, bazı durumlarda antijene özgül lenfositler yukarıdaki iki durumu da göstermez antijeni yok sayarlar, antijen yokmuş gibi davranırlar. Normal koşullarda mikroorganizmalar “immünojenik”, kendi antijenlerimiz ise “tolerojeniktir”, ya da yok sayılırlar (83).

İmmün tolerans farklı öz antijenlerle organlarda daha lenfositler oluşurken sağlanabileceği gibi ki buna “santral tolerans”denir, olgun lenfositlerin periferik organlarda öz antijenlerle karşılaşmasının sonucu da oluşturulan toleransın adına da “periferik tolerans” denir (83).

2.9.2.Otoimmünite: Prensipleri ve Patogenezi

Otoimmünite, öz (otolog) antijenlere yönelik immün aktivasyon yanıtı geliştirmesi olarak tanımlanır ve önemli bir hastalık nedenidir. Toplumda otoimmün hastalıklara % 1-2 oranında rastlandığı tahmin edilmektedir ancak kontrolsüz immün yanıtların gözlemlendiği hastalıklar da öz antijenlere yönelik oldukları kanıtlanmadıkları halde otoimmün hastalıklar olarak isimlendirilirler.

Otoimmünitenin gelişmesinde başlıca faktörler; öz toleransın gelişmemesine katkıda bulunabilen yatkınlık genlerinin kalıtsal geçişi ve öz antijenlere tepkili lenfositleri aktive eden enfeksiyon gibi çevresel tetikleyicilerdir. Deneysel hayvan modelleri, öz toleransın nasıl kaybolduğu ve öze tepkili lenfositlerin nasıl patojenik hale geldiğini anlamamıza yardımcı olmuştur. İmmünolojik anormalliklerin nasıl otoimmün hastalıklarla sonuçlandığı konusunda giderek artan bilgilerin ışığında, henüz hiçbir otoimmün hastalığın nedenini açık bir şekilde ortaya koyulmuş değildir. Bunun sebebi de sıklıkla, insanlarda otoimmün hastalıkların çok çeşitli olması ve birçok genetik ve çevresel etmene bağlı olarak gelişebilmesi, immün yanıtı başlatan ve hedef olan öz

antijenlerin sıklıkla bilinmemesi, otoimmün tepkilerin hastalığın ortaya çıkmasından çok öncesinde başlamış olması gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır. Otoimmünite, öz antijenlere karşı antikor üretilmesi ya da öz antijenlere tepkili T hücrelerinin aktivasyonu sonucu gelişmektedir. Tolerans önce yardımcı T hücrelerinde (CD4⁺) tanımlanmıştır (83).

Merkezi tolerans, olgunlaşmamış lenfositlerin üretken lenfoid organlarda, antijenlerle karşılaşma durumunda öldürülmesiyle sağlanmaktadır.

Periferik tolerans, olgun lenfositlerin periferik dokularda antijenle karşılaşımında oluşturulur.

T hücre merkezi toleransı öz antijenlerin yaygın olarak dağılım gösterdikleri timusta yüksek afinite ile tanınmalarına bağlı olarak gelişir. Böylece merkezi tolerans, yaygın olarak bulunan öz antijenlerimize karşı yüksek afiniteli (eğilimli) reseptör olan sakıncalı T hücrelerinin elenmesini sağlar (83).

2.10. Romatoid Artrit Tedavi Stratejileri

RA'da hastalığın erken teşhis ve tedavisinin öneminin yanı sıra kullanılan ilaç tedavisi, fizik tedavi, iş-uğraşı terapisi, ortopedik girişimler, eğitim programları, psikolojik destek ve mesleki danışmanlık gibi multidisipliner bir yaklaşımda önem taşır. Günümüzde RA tedavisinde izlenen stratejiler belirgin bir biçimde değişmiştir. RA'nın çok erken döneminde, hastalığı modifiye edici ilaçlar (DMARD) ile TNF- α inhibitörlerinin birlikte kullanımı, hastaların çoğunda sinovitin kontrolünü sağlamayı ve hayat kalitesinde iyileşmeyi mümkün kılmıştır (84). RA'da hedef hastalık belirti ve bulgularının baskılarak, gerçek remisyona ulaşmak olmalıdır. Bu sağlanamıyorsa, ulaşılması istenen hedef hastanın yaşam kalitesini artırabilmek için hastalığın bulgularını kontrol altında tutmak, hastanın yaşam aktiviteleri için ağrıyı azaltmak ve eklem hasarının yavaşlatmak olmalıdır (84). TNF- α antagonistlerine verilen yanıt yetersiz olduğu durumlarda anti-CD20 antikoruna ile B hücre tükenmesi tedavisi, RA'lı hastalarda büyük randomize çalışmalarda etkinliği kanıtlamıştır (85, 86).

B hücrelerine yönelik tedaviler, otoimmün hastalıklarda umut verici yeni terapötik hedefler olarak ortaya çıkmıştır (87). B hücre tükenmesi tedavisinin uygulanması, RA patogenezi anlamamıza katkıda bulunmuştur. Otoantikor salgılayan hücrelerin öncülüleri olmasının yanı sıra, B hücreleri, esas olarak proenflamatuvar sitokinler üreterek, antijen sunan hücreler olarak hareket ederek ve B düzenleyici T

hücreyi aktivasyonu ve farklılaşmasıyla, RA'nın immünopatogenezi içinde önemli rollere sahip olabilir (88, 89).

Ağrı kesiciler: (NSAID & parasetamol) ✓ Geçici etki, hastalık gidişine etkisiz ✓ Kırt izon: Tedavi başında & tedavi değışikliğinde veya atakta ✓ Kısa süreli - düşük dozda
Hastalık seyrini değıştiren ilaçlar (DMARD'lar) ✓ Klasik DMARD'lar - Metotreksat - Leflunomid - Sulfasalazin - Hidroksiklorokin
Yeni (hedefe yönelik) DMARD'lar ✓ Biyolojik ilaçlar - anti TNF - anti IL-6 - anti-CD20 (Rituksimab) ✓ T hücre sinyal blokeri ✓ Küçük moleküller - JAK inhibitörleri

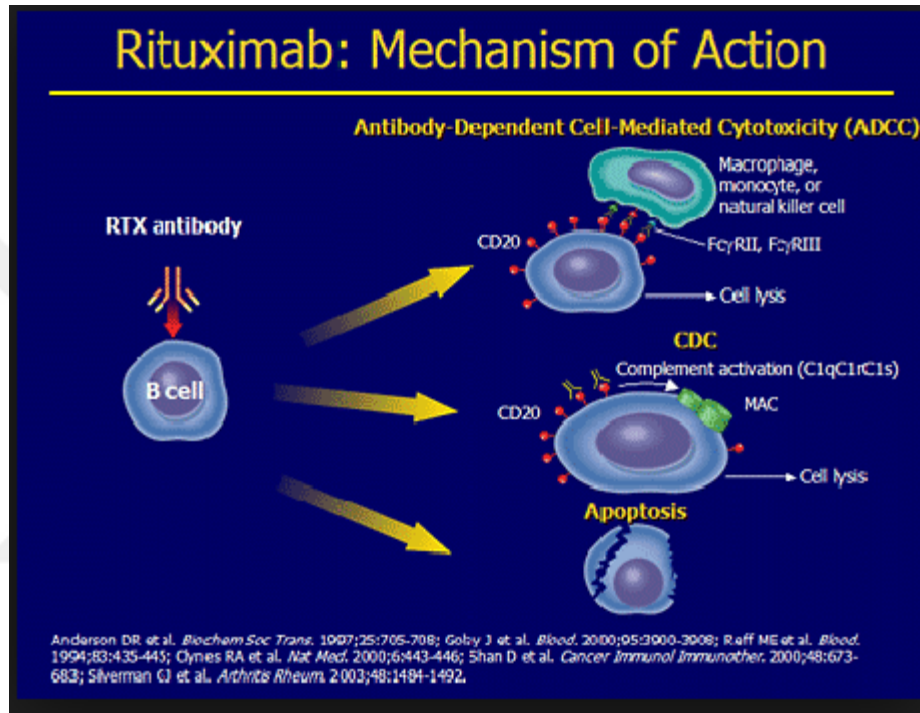
Tablo 2-2: Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçlar (90)

2.10.1. Romatoid Artrit Tedavisinde Rituksimab (anti -CD20moAb tedavisi)

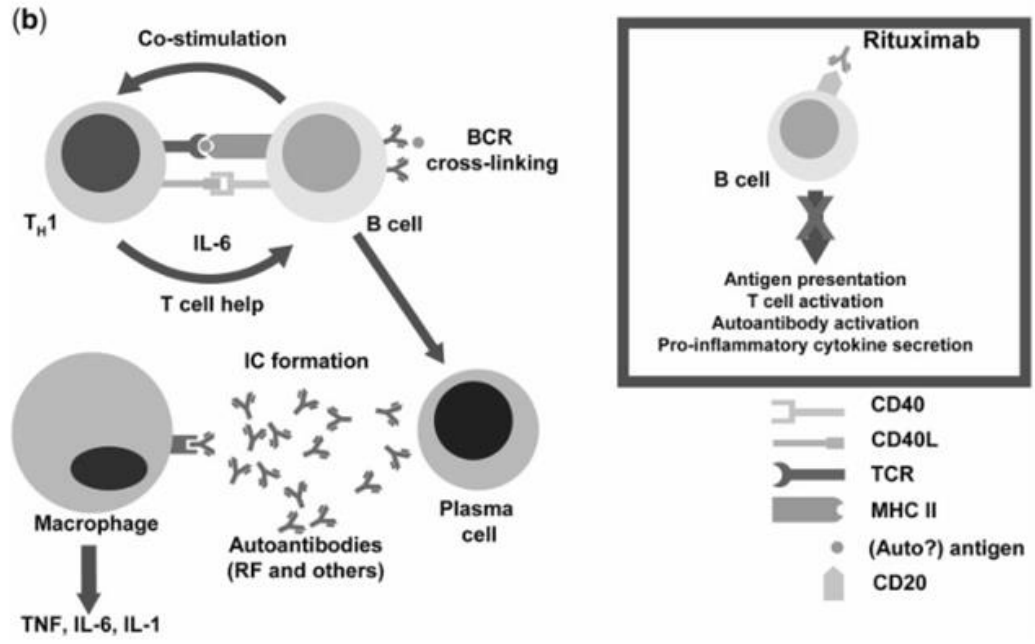
Ritüksimab, otoimmün hastalıklar için önemli bir biyolojik tedavi seçeneği olan CD20'ye karşı kimerik bir monoklonal antikor olup; hücrede apoptozun başlatılmasını tetiklemeşinin yanı sıra CD20'yi hücre yüzeyine bağlayarak hücre aracılı sitotoksitesiteyi başlatıp B lenfositlerinin tükenmesini sağlar. İlk olarak 1997 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından Hodgkin dışı lenfomaların tedavisi için onaylanmış olup, metotreksat (MTX) ile kombinasyon halinde rituximab, bir veya daha fazla TNF- α inhibitörüne yanıtsızlık durumunda RA hastalarının kullanımı için de onaylanmıştır (120, 121). RA'da kullanımındaki ümit verici sonuçlarla birlikte SLE gibi diğer otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (91).

Ritüksimab B hücrelerini hedefleyen ilk kimerik insan-fare antikorudur. Ritüksimab ile hedeflenen kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve beyin dokusundaki B lenfositlerinin önemli bir kısmının yüzeyinde bulunan CD20 antijenine bağlanarak belirgin bir B hücre tükenmesini gerçekleştirir. CD20 reseptörü B hücre

gelişiminin ilk (pro B hücreleri) ve son (plazmablast, plazma hücresi) aşamalarındaki hücrelerin yüzeylerinde bulunmaz (92). Rituksimab Fab kısmıyla CD20 antijenine bağlanırken Fc kısmıyla da kompleman aktivasyonu, ADCC ve apoptoz gibi çeşitli immünolojik mekanizmaları başlatarak B hücre tükenmesine sebep olur (93). FDA tarafından 2006 yılında diğer anti-TNF tedavilere dirençli olgularda Rituksimab'ın kullanılabileceğine onay verilmiştir. Ülkemizde de bu konuda onay alınmıştır. (94).



Şekil 2-9: Rituksimab (anti-CD20) mekanizması (95)



Şekil 2-10: B hücrelerini seçici olarak tüketen Rituksimab'ın etki mekanizması (17, 96)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

- Anti-CD3-FITC/16⁺56⁺ PE Monoklonal antikoru (BD Bioscience Inc., San Diego,USA)
- Anti-CD3-PerCp Monoklonal antikoru (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- Anti-CD4-FITC Monoklonal antikoru (BD Pharmingen Inc., San Diego, USA)
- Anti-CD19-PerCp Monoklonal antikoru (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- Anti-CD25 APC Monoklonal antikoru (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- Anti-CD27 FITC Monoklonal antikoru (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- Anti-CD38-PE Monoklonal antikoru (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- Anti-Human Invariant NK T Cell-FITC Monoklonal antikoru (BD Pharmingen Inc., San Diego, USA)
- Anti-CD210w(IL-10)-FITC Monoklonal antikoru (BD Pharmingen Inc., San Diego,Pharmingen,USA)
- Anti-CD45-PerCP Monoklonal antikoru” (“BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- Anti-CD45-APC Monoklonal antikoru” (“BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- Human Foxp3 Buffer Set (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- Anti-Human Foxp3-PE (BD Pharmingen Inc., San Diego, USA)
- BD FacsLyse (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- BD Facs Flow (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- BD Cellwash (BD Bioscience Inc., San Diego, USA)
- FBS Boyama Tampon Solüsyonu (BD Pharmingen Inc., San Diego, USA)

3.1.1. Cihazlar

- Akan hücre ölçer (BD FACS Calibur, BD FACS Canto II)
- Santrifüj
- +4°C buzdolabı
- Mikropipetler
- Steril pipet uçları
- 12x75'lik Flow tüpleri
- 2 ml'lik EDTA tam kan

3.2. Çalışma Grubu

2011-2013 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A.D. Romatoloji Bilim Dalı'nın sağladığı gönüllü hasta ve sağlıklı bireylerden 2'şer ml EDTA periferik kan örneği alınmış hücre yüzey ve hücre içi molekül ekspresyonu akan hücre ölçer ile tayin edilmiştir.

3.2.1. Aktif Romatoid Artritli Olgular

Çalışmaya katılmayı kabul ettiğine dair yazılı onayı bulunan aktif romatoid artrit tanısı konmuş ve rituksimab tedavisine başlanmış, herhangi bir malign hastalığı olmayan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir (n: 7 kadın).

Kontrol grubu olarak benzer yaş aralığına sahip, herhangi bir malign hastalığı ve/veya kronik rahatsızlığı olmayan bireyler çalışmaya dahil edilmiş ve gönüllülerden çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair yazılı onay alınmıştır (n: 2 erkek - 5 kadın).

Aktif Romatoid Artritli Hastalar	
Birey Sayısı (n)	7
Yaş Ortalaması	51
Hastalık Süreci (ay)	25
Şiş Eklem Sayısı	2
RTX Öncesi Ağrılı Eklem Sayısı	8
Vizüel Analog Skala (VAS)	62.5
DAS28	5.285

ESH (mm/saat)	32
RF+anti-CCP	86
Eş Zamanlı İlaç Metotreksat (n)	5
Eş Zamanlı İlaç Leflunomid (n)	2

Tablo 3-1: Çalışma grubu

3.3. Metod

3.3.1. Periferik Kan Hücre Yüzey Boyaması

a) Çalışmaya katılan bireylerden alınan 2 ml EDTA periferik venöz kan örneklerinin kan sayımı yapılarak elde edilen lökosit değerleri dikkate alınmıştır. Eğer lökosit değerleri mikrolitrede 10,000'in üzerindeyse gerekli dilüsyon BD Facsflow kullanılarak yapılmıştır.

Herbir hasta için;

b) Herbir hastanın hücre yüzey boyaması için;

- Kontrol IgG-FITC/IgG1-PE
- CD3⁺FITC/CD16⁺56⁺ PE
- CD27 FITC/CD19 PerCp
- CD38 FITC/CD19 PerCp
- iNKT FITC/CD3 PerCp
- CDw210 (IL-10)/CD19 PerCp olmak üzere 6 tüp hazırlanmıştır.

c) Hazırlanan bu tüplere uygun miktarda (10 µl) monoklonal antikorlar koyularak üzerlerine 50'şer µl EDTA tam kan koyularak oda ısısında karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiştir.

d) İnkübasyon sonrasında tüplere 2'şer ml BD FacsLyse solüsyonundan koyularak oda ısısında 10 dakika inkübe edilmiştir.

e) İnkübasyon işleminden sonra tüpler 500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

f) Süpernatant kısmı pastör pipetiyle uzaklaştırılır altta kalan pellet üzerine 2'şer ml BD Cell wash koyularak 500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

g) Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir.

h) Yıkama işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılır ve altta kalan pellet üzerine yaklaşık 500 µl BD Facsflow koyularak akan hücre ölçer cihazında okutulmuştur.

3.3.2. Periferik Kan Hücre Yüzey İçi Boyaması

Herbir hastanın hücre içi boyaması için ;

- Kontrol

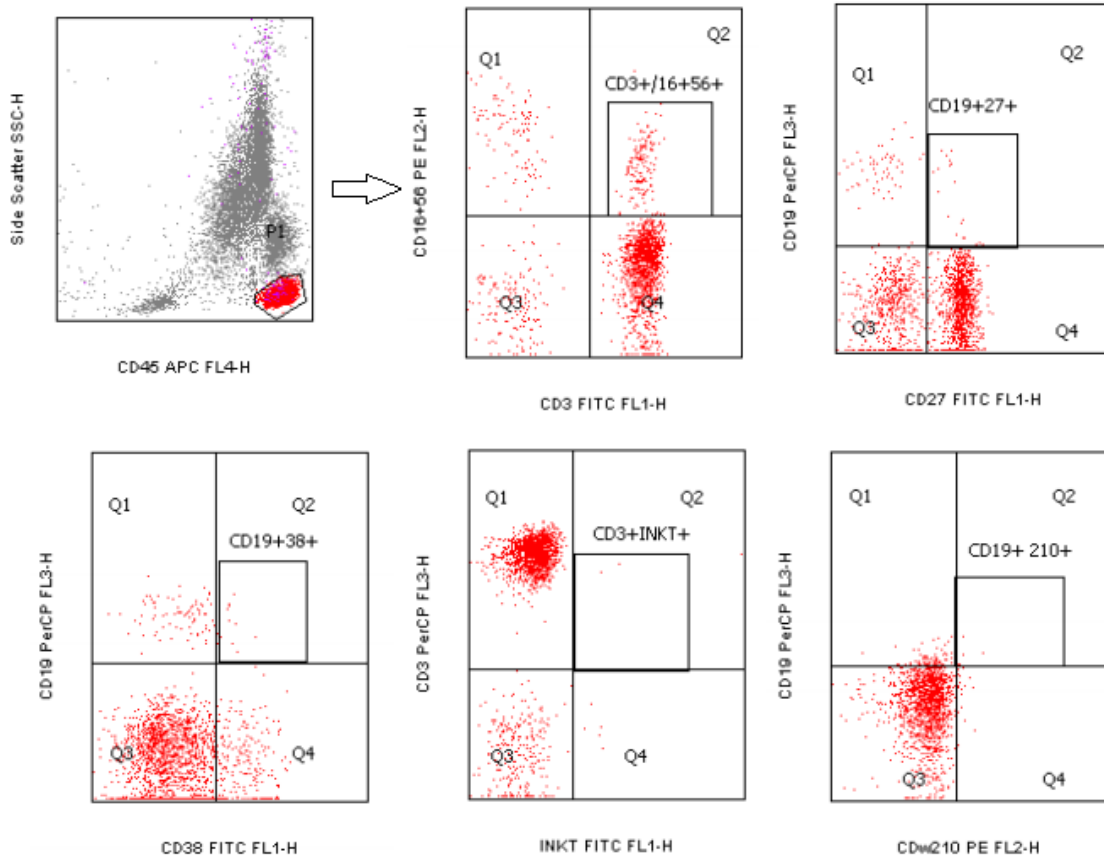
- CD4 FITC/CD25 APC

- CD4 FITC/Foxp3 PE/CD25 APC olmak üzere 3 tüp hazırlanmıştır.

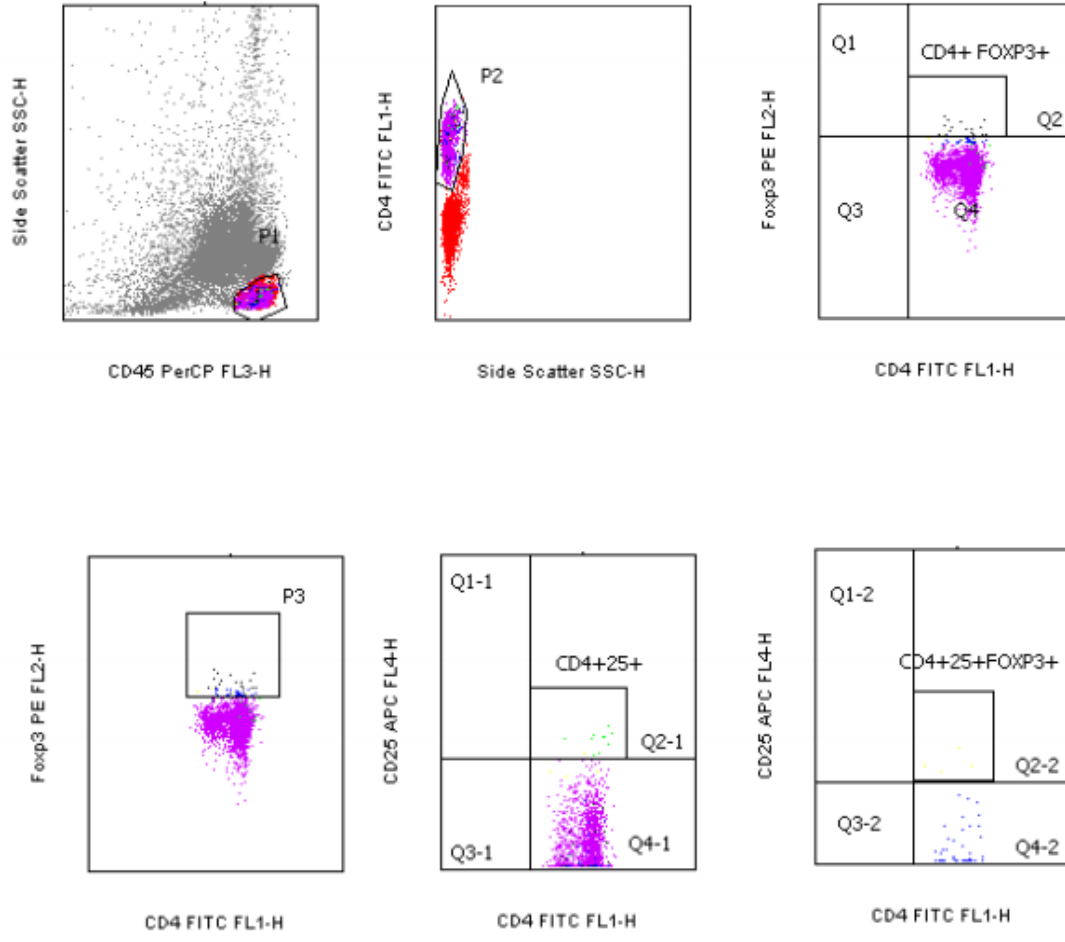
- a) FBS Boyama Tampon Solüsyonu kullanılmadan önce oda ısısına getirilmiştir.
- b) Herbir çalışmadan önce kullanılacak çalışma solüsyonu taze olarak hazırlanmıştır.
- c) Örnek 1×10^7 hücre/ml'de olacak şekilde FBS Boyama Tampon Solüsyonu ile dilüe edilmiştir.
- d) 12x75'lik temiz BDFacs tüplerine önce yüzey antikorları olan CD4 FITC (20 μ l) ve CD25 APC (5 μ l) pipetlenir, üzerine 100 μ l EDTA tam kan koyularak 20 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir.
- e) 20 dakika sonra tüplerin üzerlerine 2 ml FBS Solüsyonu koyularak 10 dakika 250 g'de santrifüj edilmiştir.
- f) Santrifüj sonrasında yıkama solüsyonu aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan pellet nazikçe karıştırılıp üzerine 2 ml Foxp3 tampon solüsyon A'dan eklenip vortekslenerek, 10 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir.
- g) 10 dakika sonra 500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek fiksatif ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- h) Hücreleri yıkamak için resüspende edilen pellet üzerine 2 ml FBS solüsyonundan koyulur ve 500 g'de 5 dakika santrifüjü takiben yıkama solüsyonu ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- i) Hücreleri permeabilize etmek için nazikçe dipte kalan pellet resüspende edilerek üzerine 500 μ l 1x'lık Human Foxp3 tampon solüsyonu C eklenir, vortekslenir ve 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir.
- j) 30 dakika sonra yıkamak için 2 ml FBS solüsyonundan eklenerek 500 g'de 5 dak. santrifüj edilerek, tampon solüsyonu ortamdan uzaklaştırılmış ve bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir.
- k) Pellet resüspende edilip üzerine 20 μ l konjuge Foxp3 antikoru eklenerek 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir.

- l) Tüpün üzerine 2 ml FBS solüsyonu koyularak 500 g'de 5 dakika santrifüj edilir, süpernatant uzaklaştırılarak üzerine 300 µl BD Facsflow koyularak akan hücre ölçer de okutulmuştur.
- m) En az 15,000 CD4⁺ T lenfosit sayılarak analiz yapılmıştır.

3.3.3. Hücre Yüzey ve Hücre İçi Molekül Ekspresyonu



Şekil 3-1: Hücre Yüzey Ekspresyonu Kapılama Stratejisi



Şekil 3-2: Hücre İçi Molekül Ekspresyonu Kapılama Stratejisi

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın “Akan Hücre Ölçer” analizleri “FACSDiva” yazılımıyla, istatistiksel analizi SPSS 18 programı ile yapılmıştır.

Bağımlı gruplar arası farkların değerlendirilmesinde; normal dağılım gösteren gruplarda eşleşmiş “T-testi”, anormal dağılım gösteren grupların değerlendirilmesinde “Wilcoxon testi” kullanılmıştır.

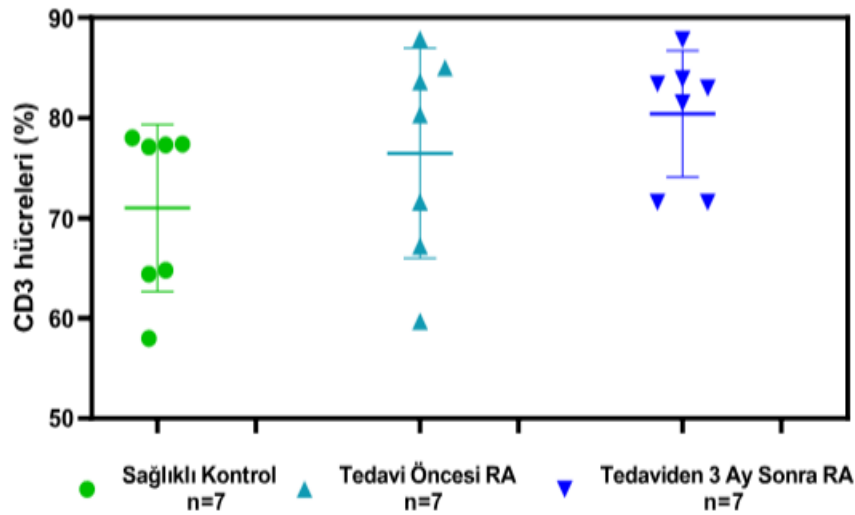
Bağımsız gruplar arası farkların değerlendirilmesinde; normal dağılım gösteren gruplarda eşleşmemiş “T-testi”, anormal dağılım gösteren grupların değerlendirilmesinde “Mann Whitney-U testi” kullanılmış ve “ $p \leq 0,05$ ” olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Ritixumab Tedavisi Almadan (0. Ay) ve Tedavi Aldıktan (3. Ay) Sonra Hastaların İmmün Hücre Düzeyleri

4.1.1.Total T Lenfosit (CD3⁺) Düzeyleri

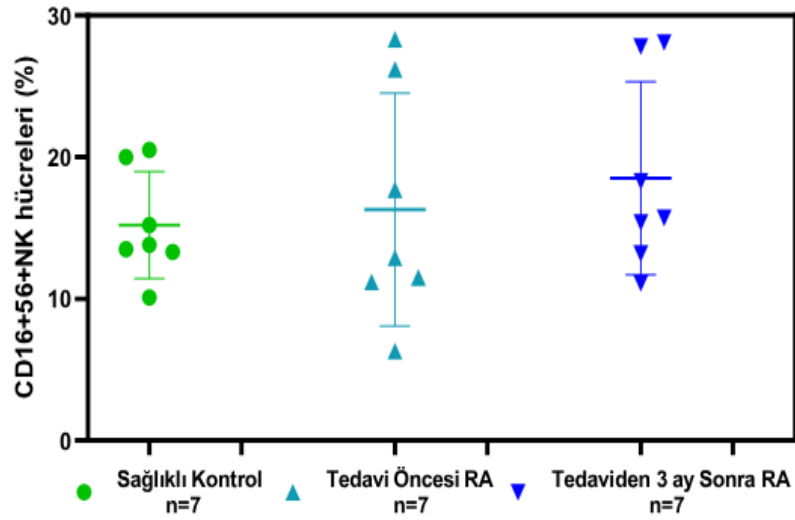
Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrasında (3. ay) hastalarda grup içi istatistiksel değerlendirme yapıldığında total T lenfosit düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,119$). Hastalar ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldıklarında da total T lenfosit düzeylerinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p=0,446$) (Şekil:4-1).



Şekil 4-1: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin total T lenfosit düzeyleri

4.1.2.CD3⁺CD16⁺56⁺ NK Hücre Düzeyleri

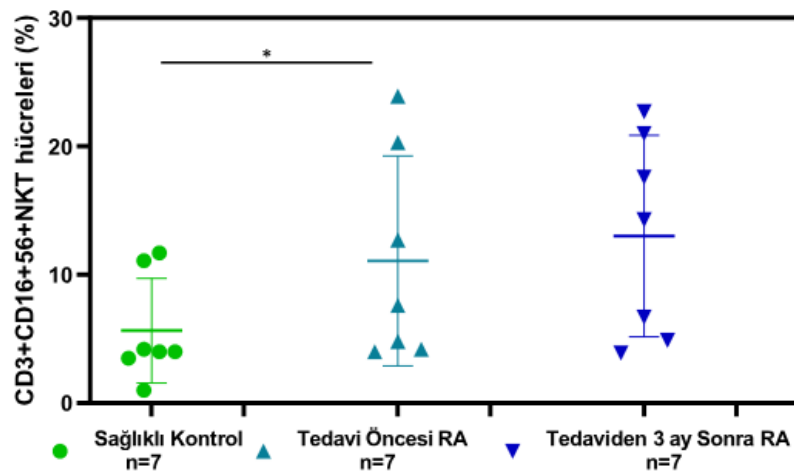
Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrası (3. ay) hastalarda grup içi istatistiksel değerlendirme yapıldığında CD3⁺CD16⁺56⁺ NK hücre düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,399$). Hastalar ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldıklarında da CD3⁺CD16⁺56⁺ NK hücre düzeylerinde artış ya da azalış yönünde bir fark gözlemlenmemiştir ($p=0,315$) (Şekil:4-2).



Şekil 4-2: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin NK lenfosit düzeyleri

4.1.3.CD3⁺CD16⁺56⁺ NKT Hücre Düzeyleri

Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrası (3. ay) hastalarda grup içi değerlendirme yapıldığında CD3⁺CD16⁺56⁺ NKT hücre düzeyleri açısından artış ya da azalış yönünde bir fark görmemekle birlikte ($p=0,831$) sağlıklı kontroller ile hastalar arasında yapılan değerlendirmede tedavi öncesi hastaların NKT düzeylerinin sağlıklı kontrol değerlerine göre anlamlı derecede yüksek olduğunu görmekteyiz ($p=0,009$). Gruplar arası non-parametrik değerlendirme yapıldığında ise istatistiksel açıdan bir anlamlılık saptanmadığını da belirtmemiz gerekir ($p=0,072$) (Şekil:4-3).

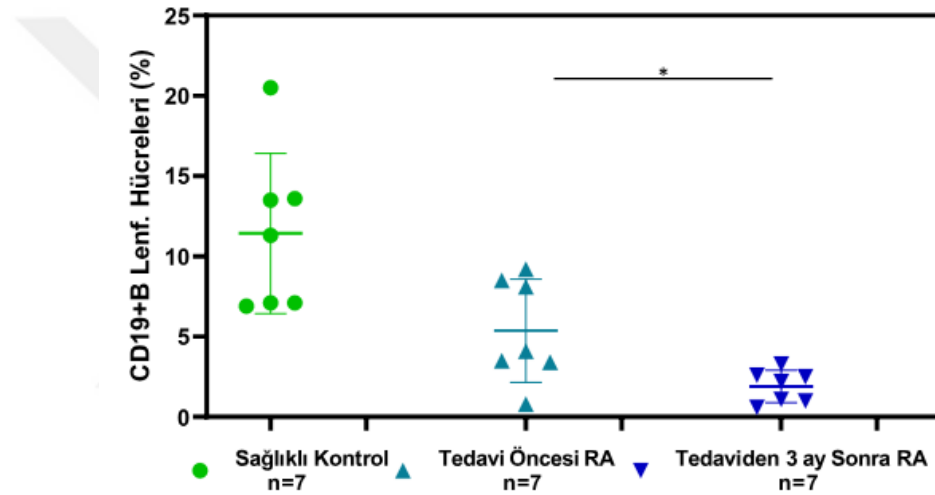


Şekil 4-3: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin NKT lenfosit düzeyleri

(* $p \leq 0,05$)

4.1.4.Total B Lenfosit(CD19⁺) Hücre Düzeyleri

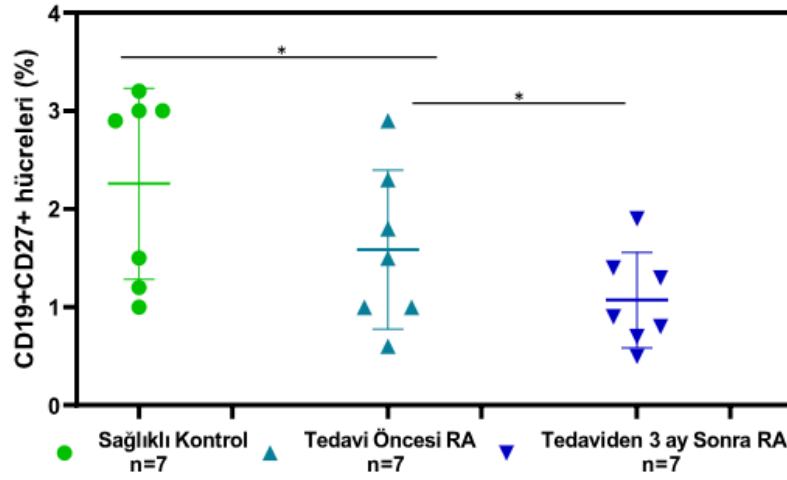
Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrası (3. ay) hastalar arasında istatistiksel değerlendirme yapıldığında total B lenfosit (CD19⁺) hücre düzeyleri açısından yüksek derecede anlamlılık saptanmıştır ($p=0,018$). Bu, tedavi alan hastaların (3. ay) total B lenfositlerinin tedavi almayan hastalara kıyasla azalışı yönünde bir anlamlılıktır ($p=0,018$). Hastalar ile sağlıklı kontroller arasında yapılan değerlendirmede ise total B lenfosit düzeylerinde artış ya da azalış yönünde bir fark gözlemlenmediğini görmekteyiz ($p=0,461$) (Şekil:4-4).



Şekil 4-4: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin total B lenfosit düzeyleri (* $p \leq 0,05$)

4.1.5.CD19⁺CD27⁺ Hücre Düzeyleri

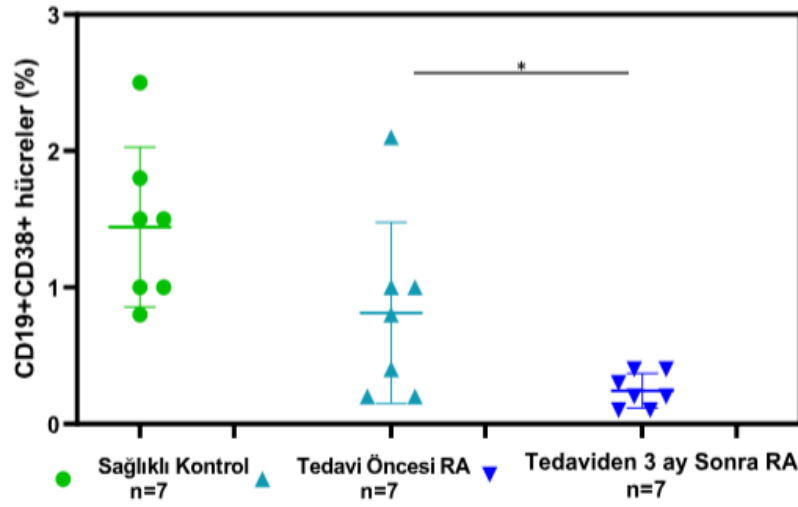
CD19⁺CD27⁺ hafıza B hücre düzeylerinin, yapılan grup içi değerlendirmede istatistiksel açıdan anlamlılık sınırına yakın derecede yüksek saptanmıştır ($p=0,054$). Bunun tedavi alan hastalarda (3. ay) tedavi almayan hastalara göre hafıza B hücre düzeylerinin azalışı yönünde bir fark gösterdiğini belirtebiliriz ($p=0,054$). Sağlıklı kontroller ile hastalar arasında yapılan değerlendirmede de hafıza B hücre düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlılık sınırına yakın derecede yüksek saptanmıştır ($p=0,058$). Bu anlamlılık sağlıklı kontrollere göre hastaların hafıza B hücre düzeyinin daha düşük olduğu yönünde bir anlamlılıktır ($p=0,058$) (Şekil:4-5).



Şekil 4-5: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin hafıza B lenfosit düzeyleri (* $p \leq 0,05$)

4.1.6.CD19⁺CD38⁺ Hücre Düzeyleri

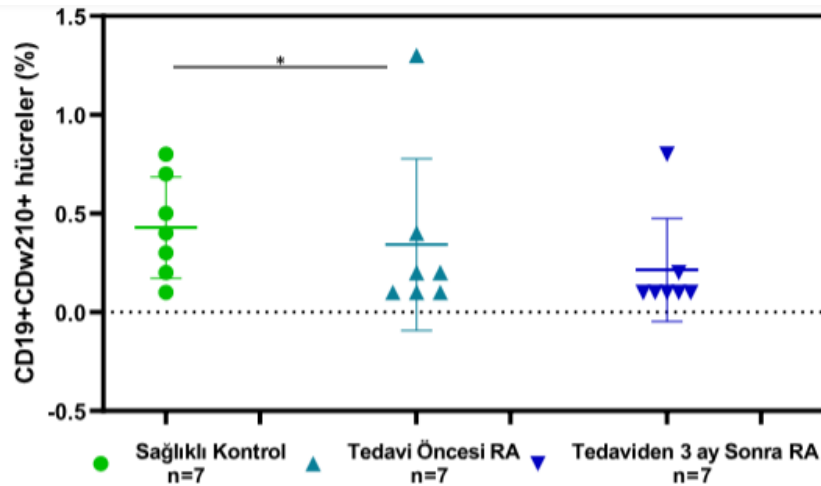
Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrası (3. ay) hastalar karşılaştırıldıklarında CD19⁺CD38⁺ plazma hücre düzeylerinde istatistiksel açıdan yüksek derecede anlamlılık saptanmıştır ($p=0,028$). Bu anlamlılığın tedavi alan hastaların (3. ay) plazma hücre düzeylerinin tedavi almayan hastalara göre azalışı yönünde bir fark olarak saptandığını belirtebiliriz ($p=0,028$). Sağlıklı kontroller ile hastalar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede ise plazma B hücre düzeylerinde bir anlamlılık saptanmadığını görmekteyiz ($p=0,449$) (Şekil:4-6).



Şekil 4-6: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin aktif B lenfosit düzeyleri (* $p \leq 0,05$)

4.1.7.CD19⁺CDw210⁺ Hücre Düzeyleri

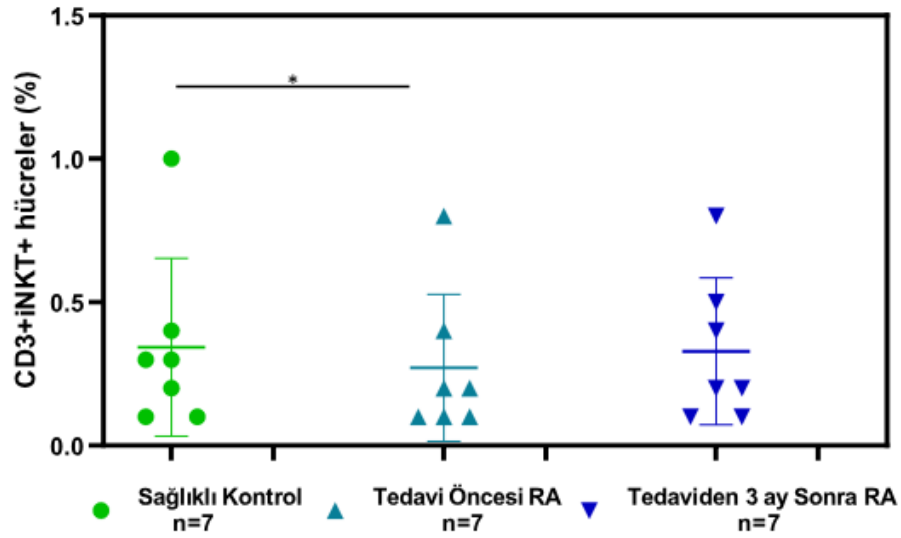
Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrası (3. ay) hastalar istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında CD19⁺CDw210⁺ Breg hücre düzeylerinde artış ya da azalış yönünde bir fark bulunmamıştır ($p=0,178$). Sağlıklı kontroller ile hastalar karşılaştırıldığında CD19⁺CDw210⁺ Breg hücre düzeylerinde bir anlamlılık saptandığını görmekteyiz ($p=0,007$). Bununla birlikte hastalar ve sağlıklı kontroller arasında non-parametrik değerlendirme yapıldığında ise istatistiksel açıdan bir anlamlılık saptanmadığını da belirtmemiz gerekir ($p=0,217$) (Şekil:4-7).



Şekil 4-7: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin CD19⁺CDw210⁺ lenfosit düzeyleri (* p≤0,05)

4.1.8.CD3⁺iNKT⁺ Hücre Düzeyleri

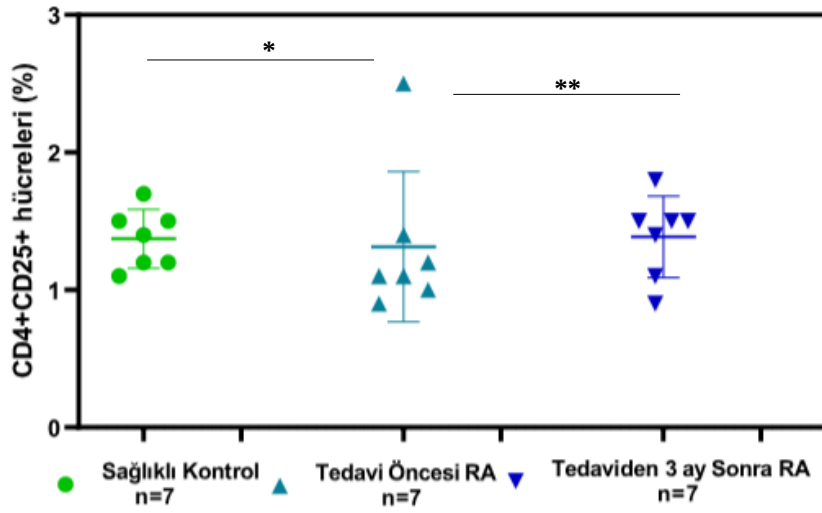
Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrası (3. ay) hastalarda invaryant NKT hücre düzeylerinde istatistiksel açıdan artış ya da azalış yönünde bir fark gözlemlenmemiştir (p=0,940). Sağlıklı kontroller ile hastalar arasında istatistiksel değerlendirme yapıldığında ise değişmez NKT hücre düzeylerinde azalış yönünde bir fark saptandığını görmekteyiz (p=0,001). Ancak hasta ve sağlıklı kontrol olan gruplar arasında non-parametrik değerlendirme yapıldığında ise istatistik açıdan bir anlamlılık saptanmadığını da belirtmemiz gerekir (p=0,511) (Şekil:4-8).



Şekil 4-8: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin CD3⁺iNKT⁺ lenfosit düzeyleri (* $p \leq 0,05$)

4.1.9. CD4⁺CD25⁺ Hücre Düzeyleri

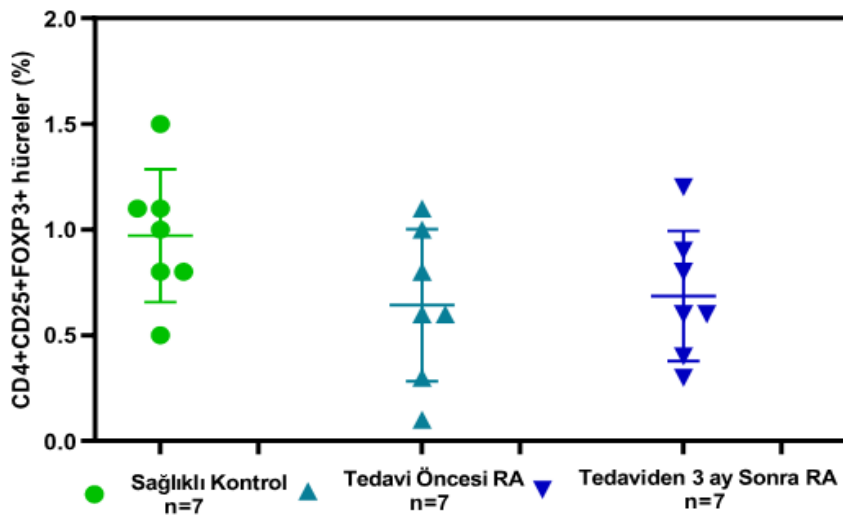
Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrası (3. ay) hastalar karşılaştırıldıklarında CD4⁺CD25⁺ hücre düzeyleri istatistiksel açıdan yüksek derecede anlamlılık saptanmıştır ($p=0,000$). Grup içi non-parametrik değerlendirme yapıldığında CD4⁺CD25⁺ hücre düzeylerinde bir anlamlılık saptanmamıştır ($p=0,271$). Sağlıklı kontroller hastalar ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır ($p=0,006$). Ancak hastalar ve sağlıklı kontroller non-parametrik olarak değerlendirildiklerin de ise istatistik açıdan bir anlamlılık saptanmadığını da belirtmemiz gerekir ($p=0,155$) (Şekil:4-9).



Şekil 4-9: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin CD4⁺CD25⁺ T lenfosit düzeyleri (*p=0,006, **p=0,000)

4.1.10.CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) Hücre Düzeyleri

Tedavi öncesi (0. ay) ve tedavi sonrası (3. ay) hastalar sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında Treg hücre düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlılık saptanmamıştır (p=0,722) (Şekil:4-10).



Şekil 4-10: Tedavi öncesi, tedavi sonrası 3.ay ve sağlıklı bireylerin Treg lenfosit düzeyleri.

TARTIŞMA

Otoimmün hastalıkların başında gelen RA sıklıkla alevlenmeler, poliartiküler tutulumla karakterize olan, yaygın, daha az gerçek remisyonların izlendiği iltihabi bir hastalıktır. RA'da hastalığın oluşum ve gelişim nedenleri hala tam olarak açıklanamamakla birlikte günümüzde tedavide önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Tedavi edilemeyen hastaların çoğunda eklem hasarının ilerlemesi ile yıllar içerisinde önemli bir bedensel engelliğe yol açabileceği bildirilmiştir (1). DMARD ve TNF- α inhibitörlerinin kullanılmasıyla başlayan ve bu ilaçlara yanıtızsızlık durumunda B hücrelerini hedefleyen biyolojik ajanların kullanılmasıyla yakın geçmişte B hücre hedefleyen biyolojik ajanların kullanımı RA tedavisine yeni bir boyut kazandırmıştır. (97). Başlangıçta RA etyopatogenezi ve tedavi çalışmalarında T lenfositlerini hedefleyen tedaviler uygulanmıştır, Hodgkin dışı lenfoma ve RA hastalığı olan iki kişiye eş zamanlı olarak Rituksimab adlı ilaç uygulanarak B hücrelerinde ve eklem bulgularında ilaç öncesine göre anlamlı düzeltilmeler görüldükten sonra B lenfositlerini hedefleyen tedaviler hız kazanmıştır (98, 99).

Çalışmamızda; uzun yıllar boyunca çeşitli tedaviler uygulanmış ancak bu tedavilere cevap alınamamış aktif RA hastalarına uygulanan Rituksimab adlı ilacın hastaların periferik kan örneklerindeki temel immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri incelendi. Aktif RA hastalarının ilaç verilmeden ve verildikten sonra 3. ayda alınan kan örneklerinde; CD19⁺ (B hücre), CD19⁺CD27⁺ (hafıza B hücre), CD19⁺CD38⁺ (B hücre-plazma hücre), CD3⁺ (T hücre), CD4⁺CD25⁺ ve CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg), CD3⁺CD16⁺56⁺ (NK hücre), CD19⁺CDw210⁺ (Breg hücresi) ve değişmez NKT (iNKT) hücre düzeylerindeki değişiklikler, hasta ve sağlıklı bireyler arasında gösterildi.

Otoimmün hastalıklarda homeostaz değişimi sonucunda immün sistem kendi toleransını kaybederek kendinden olan antijene karşı yanıt geliştirebilir. Otoimmün bir hastalık olan RA'da Rituksimab tedavisi ile B hücresi tükenmesinin, hastalara önemli yarar sağladığının gösterilmesi, otoimmün hastalıkların tedavisinde B hücrelerinin hedeflenmesi için orijinal bir kanıt sağlamıştır. Hastalığa ve B hücresi tolerans kaybına yol açabilecek mekanizmalarda B hücresi etkisinin tüm yönleri henüz tam olarak anlaşılmamasına rağmen, Rituksimab ile yapılan öncü çalışmalar B hücrelerinin farklı etkilerini ortaya çıkarmıştır. Öncelikle B hücresinin farklılaşması, aktivasyonu, regülasyonu ve fonksiyonunun yanı sıra, B hücre alt popülasyonlarının anlaşılmasının

farklı otoimmün hastalıklarda klinik çalışmalardan elde edilen verilerin doğru yorumlanması için özellikle gereklidir (100).

Çalışmamızda Rituksimab tedavi öncesi ve tedavi başladıktan sonraki 3. ayda alınan periferik kan örneklerindeki temel immün sistem hücreleri akan hücre ölçer cihazında değerlendirildiğinde; periferik kanlarında yüksek olan CD19⁺ B hücre düzeylerinde ($p<0,018$) ilaç öncesine göre anlamlı derecede azalma olduğu gösterildi. Bulgularımız Rituksimab (anti-CD20) tedavisi verilen aktif RA hastalarının tedavi öncesinde saptanan yüksek CD19 düzeylerinin, 3 ay sonunda düştüğünü, bu klinik etkinliğin B hücrelerindeki baskılanma ile korelasyon gösterdiğini destekleyen, beklenen bir bulgudur. Bulgularımız literatür sonuçları ile uyumludur (101).

Parietti ve ark.'ları yaptıkları çalışmalarında Rituksimab tedavisi gören aktif RA hastalarının 45. gün ve 120. günde alınan periferik kanlarındaki B hücresi sayısal değişikliklerini akan hücre ölçer cihazı ile ölçtüklerinde; başlangıç değerine göre anlamlı bir düşüş saptamışlar ($p<0,05$) ve bu çalışmalarıyla Rituksimab tedavisi ile B hücrelerinin tükenmesinin RA'lı hastalarda etkili olduğunu göstermişlerdir (101).

Edwards JC ve ark.'ları ile *Breedveld F. ve ark.*'ları çalışmalarında periferik kan B hücre incelemeleri, genel olarak metotreksat ile birlikte Rituksimab uygulamanın, dolaşımdaki CD19⁺ B hücrelerinde > % 95 oranında hızlı bir düşüşe yol açtığını ortaya koymuşlardır. Hastaların çoğunda dolaşımdaki B hücre seviyelerinin tedaviden 48 hafta sonra yeniden ortaya çıkan hücrelerle 4-6 ay boyunca düşük seviyelerde kaldığı gösterilmiştir (102, 103).

Leandro ve ark.'larının 3 aydan uzun bir süre Rituksimab ilacını kullanan 25 aktif RA hastasının periferik kanındaki B hücre (CD19⁺) ve B hücre alt gruplarında Kİ (CD19⁺CD20⁺CD38⁺⁺⁺/IgD⁻ ve CD27^{+/++}-hafıza B hücresi veya plazma öncü hücresi) değişiklikleri akan hücre ölçer cihazı kullanarak inceledikleri çalışmalarında; bir hasta hariç diğer tüm hastalarda önemli ölçüde B hücre azalmasının 3 aydan uzun süre devam ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca B-hücresi repopülasyonu sırasında hastalık nüksü yaşayan RA hastalarının, kanlarında hasta olmayanlara kıyasla daha yüksek hafıza B hücreleri (CD19⁺CD27⁺) sıklığına sahip olduklarını saptamışlardır (104).

Çalışmamızda hastaların ilaç tedavisinden sonraki 3. ayda alınan periferik kanlarında CD19⁺CD38⁺ plazma hücrelerinde başlangıç düzeyine göre anlamlı derecede azalma ($p<0,028$), CD19⁺CD27⁺ hafıza B hücrelerinde ise anlamlılık sınırına yakın derecede azalış gözlenmiştir ($p<0,058$). Bulgularımız, Rituksimab ilacı ilk kez

alınmasına karar verilen ve uzun döneme yayılması planlanan (6-12 ay) hastaların periferik kan örneklerinde özellikle plazma ve hafıza B hücrelerinde bakılarak uzun dönemdeki yanıtlarının araştırılması açısından öncü bir çalışmadır.

RA'da son çalışmalar, B hücre ve alt gruplarının hastalığın patogeneziindeki önemini ortaya koymuştur. B hücre alt grubu olan ve düzenleyici B hücre olarak adlandırılan Breg'ler (IL-10 üreten düzenleyici B10 hücreleri), bu işlevlerini temel olarak farelerde ve insanlarda IL-10 üretimi yoluyla gerçekleştirirler. Bregler, enflamatuvar Th1 ve Th17 farklılaşmasını baskılayarak anti-inflamatuvar Th2 hücre yanıtını uyarır ayrıca Th2 hücre yanıtını destekleyen makrofajlar ve ASH üzerinde de etki ederler. Eksojen uyarıcılar (sigara içme, periodontitis), proteinlerin sitrülünasyonuna neden olur ve böylece anti-sitrüline protein antikorlar (ACPA) üretimini ve Th17 ve Th1 hücrelerinin proliferasyonunu uyaran otoantijenleri oluşturur. Bunlar, kırık ve kemik hasarına yol açan fibroblast, makrofaj ve osteoklast aktivasyonunu indükler. Breg'ler ve Treg'ler, RA'da azalır ve böylece proinflamatuvar sitokinler salgılayan Th17 ve Th1 hücreleri proliferer olur ve ACPA üretimini ön plana çıkar (122).

Carter ve ark.'ları 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada RA için bir hayvan modeli olan kollajen ile indüklenen artrit (CIA) Breg'leri tanımlamışlardır. IL-10 üreten B hücrelerinin bulunmadığı kimerik farelerde, T_H1 ve Foxp3⁺ Treg'lerin sayısında bir azalma olduğunu ve enflamatuvar Th1 ve Th17 hücrelerinde IL-10 üretimi olan B hücreli farelere kıyasla bir artış gösterdiğini ve bu nedenle Breg'lerin, doğrudan Th1 ve Th17 hücrelerinin farklılaşmasını inhibe ederek ve hedeflenen efektör T hücrelerinin Treg'lere dönüştürülmesiyle dolaylı olarak kuvvetli anti-enflamatuvar sitokinlerin (IL-10 ve / veya TGF β) üretilmesiyle çevresel toleransın korunmasına katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (123).

Mauri ve ark.'ları 2003 yılında yaptıkları bir araştırmada antikör yanıtlarının spesifikliğini ve B hücrelerinin antijen sunan hücreler olarak işlevini gerçekleştirmede çok önemli olan BHR aktivasyonunun Breg fonksiyonunda rol oynayabildiğini, otoantijene maruz kalmanın Breg'ler tarafından artan IL-10 üretimine yol açtığını ve bu durumun da otoimmün hastalığın gelişiminin baskılanmasına yol açtığını saptamışlardır (124).

Çalışmamızda Rituksimab verilen RA hastalarının 3.ayda alınan periferik kan örneklerinde CD19⁺CD210⁺ Breg hücre düzeyleri istatistiksel olarak

değerlendirildiğinde artış ya da azalış yönünde bir fark saptanmadığını belirtmeliyiz ($p < 0,178$).

T hücrelerinin alt grubu olan iNKT hücrelerinin otomimmüniteyi kontrol eden düzenleyici mekanizmalarda rol oynadığı gösterilmiştir (62).

Mansour ve ark.'lerinin yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş kontrolleri olan erken RA hastalarında iNKT hücre dağarcık yapısını ve işlevini karşılaştırdıkları çalışmada; RA'nın erken dönemlerinde dolaşımdaki iNKT'lerin azaldığını ve bunların görülme miktarlarının hastalık aktivite skoru 28 (DAS28) ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (105). Ayrıca, erken RA hastalarında yüksek afiniteli iNKT'ler, Th1 veya Th2 benzeri fenotip ile değiştirilmiş fonksiyonel bir Th profili sergiledikleri bildirilmiştir. Erken RA hastalarında, dolaşımdaki iNKT hücrelerinin görülme miktarının anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.001$) ve bunların yaş ve cinsiyet ile uyumlu kontrollerle karşılaştırıldığı ve iNKT hücre görülme miktarı, tedavi durumu, cinsiyeti veya tedavi süresi ile ilişkisi bulunamadığı gösterilmiştir (105).

Johansson ve ark.'ları; RA'lı, hastalar tarafından alınan geleneksel tedavilerin (kortikosteroidler, immünosupresif veya steroid olmayan anti-enflamatuvar ilaçlar) iNKT hücrelerinin görülme miktarını etkilemediğini belirtmişlerdir. Ayrıca anti-TNF α ile tedavi edilen hastalarda iNKT hücre miktarında herhangi bir şekilde değişiklik kaydedilmediği belirtilmiştir (106). Prednisolone ile tedavi gören RA hastalarının periferik kanındaki iNKT görülme miktarı kortikoid tedavisi almayan hastalarda ölçülen değerden önemli ölçüde düşük olduğunu göstermişlerdir (106). iNKT hücrelerinin yüksek afiniteli ligandlar tarafından uyarılmasıyla iNKT hücre sitokin üretimini bir Th1 profiline doğru kaydığını, böylece bir pro-enflamatuvar immün yanıtın oluşmasını hızlandırabileceğini belirtmişlerdir (107). RA hastalarından alınan NKT hücrelerinin, Th1-benzeri bir fenotip gösterdiği, bu da, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, IL-4 üreten hücrelerin sayısının azalmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (108) Bu nedenle RA'da, iNKT hücrelerinin ligandları tarafından kalıcı aktivasyonunun hem Th1 sitokin üretimini hem de NKT hücre miktarının azalttığını bildirmişlerdir. RA hastalarının periferik kanın'da iNKT hücresi azalmasını açıklayabilecek bir başka hipotezin de, hedef mekanizma ile ilgili olduğunu açıklamışlardır, buna göre; düzenleyici fonksiyonlarını uygulamak için, iNKT hücreleri tercihen immün sisteme göç ettiklerini, otoimmün ve iltihaplı hastalıklarda iNKT hücrelerinin hedef organlara infiltrasyonun arttığını belirtmişlerdir (109).

Parietti ve ark.'lerinin yaptıkları çalışmada; sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında RA'lı hastaların kanında anlamlı derecede düşük oranda iNKT hücreleri ölçülmüş, ve düşük iNKT hücre miktarı aktif RA hastalığı ile ilişkilendirilmiş ve anti-CD20 ilaç tedavisi gören RA hastalarında klinik sonuç ile ilişkili olarak iNKT hücre sayısında artış gösterildiği belirtilmiştir. Anti-CD20 tedavisine cevap veren RA hastalarında iNKT hücre değerlerinin anlamlı şekilde arttığı da bu çalışma da gösterilmiştir. Hastaların başlangıç değişmez NKT (iNKT) düzeyleri, 45.ve 120.gün iNKT düzeyleri arasında anlamlı bir yükselme saptandığı bildirilmiştir ($p<0,01$) (101).

Çalışmamızda tedavi öncesi ve ilaç tedavisi verildikten sonraki 3. ayda periferik kanları alınan RA hastalarının iNKT hücre düzeyleri değerlendirildiğinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p<0,940$). Buna göre hastaların değişmez NKT hücrelerinde başlangıç değerlerine göre bir iyileşme gözlemlenmedi. Bu sonuçlar *Parietti ve ark.*'lerinin yaptıkları çalışma ile çelişmektedir (101).

Treg, lenfositlerin ayrı bir alt kümesini temsil eden enfeksiyöz ajanlara karşı immün yanıtları sınırlamada ve patolojik otoimmüniteyi önlemede önemli bir fonksiyona sahip oldukları düşünülmektedir. Treg hücrelerinin fonksiyonundaki kusurların RA gibi otoimmün hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (110, 111). Treg'in belirlenmesinde Treg popülasyonunun $CD4^+CD25^{++}$ ekspresyonuna ilaveten $CD4^+$ transkripsiyon faktörü olan $Foxp3^+$ tanımlanmıştır (112, 113). Bu faktörün, Treg'ler tarafından karakteristik olarak hücre yüzeyinde eksprese edildiği ve Treg'lerin gelişiminde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir.

Son yıllarda $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin yeni bir alt kümesi olan immünotolerogenik molekül HLA-G rapor edilmiştir (114). HLA-G seviyeleri otoimmün hastalıkların patogenezeine bağlanmıştır ve önceki veriler, romatoid artrit hastalarında çözünebilir HLA-G (sHLA-G) ve hastalık aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir (115).

Treg'nin RA'daki rolü hala tam olarak tanımlanmamıştır (116, 117). Çalışmamızda ayrıca RA hastalarında ilaç tedavisi başladıktan sonraki 3. ayda alınan periferik kanlarında $CD4^+CD25^+$ T hücrelerinde yüksek derecede anlamlılık ($p<0,000$) saptanmasına rağmen grup içi non-parametrik değerlendirme yapıldığında $CD4^+CD25^+$ hücre düzeylerinde bir anlamlılık saptanmamıştır ($p<0,271$). $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg

hücrelerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p < 0,722$). Bulgular *Parietti ve ark.* 'larının RA hastalarıyla yaptıkları çalışmayı desteklemektedir. *Parietti ve ark.* 'ları çalışmalarında hem $CD4^+CD25^+$ T hücrelerinin hem de $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ekspresyonunun anti-CD20 ile tedavi edilen SLE hastalarında gösterilen aksine RA hastaların da hiçbir iyileşme gözlemlenemediklerini belirtmişlerdir (101).

Feuchtenberger ve ark. 'ları da yaptıkları çalışmada; $CD4^+ CD25^{++}$ hücrelerinin ilaç verilmeden ve ilaç uygulandıktan sonraki yüzey ekspresyonlarının yüzde ve mutlak sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalma saptamadıklarını ayrıca, $Foxp3^+$ hücre yüzey ekspresyon yüzde ve mutlak sayılarında da istatistiksel olarak bir anlam saptamadıklarını belirtmişlerdir (118).

Mottonen ve ark. 'ları RA'lı hastaların hem periferik kanlarında hem de sinoviyal sıvılarındaki CD25 eksprese eden $CD4^+$ Treg karşılaştırdıklarında; RA'lı hastaların periferik kanlarına kıyasla sinoviyal sıvıdaki CD25 eksprese eden $CD4^+$ hücre T hücrelerinin artmış sıklığını bulmuşlardır (119).

Çalışmamızdaki bulgular *Feuchtenberger ve ark.* 'larının yaptıkları çalışmadaki bulgulara benzerdi (118).

Leandro ve ark. 'ları. RA'da Rituksimab ilacının uygulanmasının ardından 1 ay ve 3 ay sonra T hücrelerinin ($CD3^+$) ve NK hücrelerinin ($CD3^-CD56^+$) frekans ve mutlak sayısında önemli değişiklikler bulamamışlardır (104). Çalışmamızda RA hastalarının T hücre ve B hücre alt gruplarını da değerlendirmeye çalıştığımızda; $CD3^+$ total T hücre, $CD3^-/CD16^+56^+$ olan NK hücre, $CD3^+/CD16^+56^+$ olan NKT hücrelerinin, 3. ayda alınan periferik kanlarındaki düzeyleri ile başlangıçtaki düzeyleri arasında herhangi bir değişiklik olmadığı saptanmıştır ($p=0,119$ $p=0,339$ $p=0,831$) $CD3^+$, $CD3^-/CD16^+56^+$ ve $CD3^+/CD16^+56^+$ yüzey antijenlerindeki bulgularımız literatürdeki bu çalışma bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda Rituksimab ilacı verilen RA hastalarında B hücrelerinin azalması ile hastalık arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir ayrıca Rituksimab tedavisi ile B hücresi tükenmesinin, hastalara önemli yarar sağladığının gösterilmesi, otoimmün hastalıkların tedavisinde B hücrelerinin hedeflenmesi için orijinal bir kanıt sağlamıştır.

KAYNAKLAR

1. Turkiewicz AM, Moreland LW. Arthritis & Rheumatism. *Arthritis Care & Research* 2008; **59**(6): 762–784
2. Heath CW, Fortin PR. Epidemiologic studies of rheumatoid arthritis: future directions. *The Journal of Rheumatology* 1992; **32**: 74-7
3. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research* 2002; **4**(3): 265-272
4. Mijiyewa M. Epidemiology and semiology of rheumatoid arthritis in Third World countries. *Nature Reviews Rheumatology* 1995; **62**: 121-6
5. Guillemin F, Briancon S, Klein JM, Sauleau E, Pourel J. Low incidence of rheumatoid arthritis in France. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1994; **23**: 264-8
- 6 Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity *Nature Reviews Immunology* 2001; **2**: 764-6
- 7 Dörner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Current Opinion in Rheumatology* 2004; **16**: 246-53
- 8 Roll P, Dörner T, Tony HP, Anti-CD20 Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2008; **58**(6): 1566-1575
- 9 Doran MF, Pond GR, Crowson CS ve ark. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis and Rheumatism* 2002; **46**: 625
- 10 Symmons DP, Barret EM, Bankhead CR, Scott DG, Silman AJ. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *The Journal of Rheumatology* 1994; **33**: 735-9.
- 11 Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 1978; **298**: 869-71.
- 12 Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilske KR, Stage D ve ark. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis & Rheumatology* 1989; **32**: 15-21.
- 13 Ebringer A, Wilson C, Tiwana H. Is rheumatoid arthritis a form of reactive arthritis? *The Journal of Rheumatology* 2000; **27**: 559-63.

- 14 Albani S, Carson DA, Roudier J. Genetic and environmental factors in the immune pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1992; **18**: 729-40.
- 15 Van Eden W. Heat-shock proteins as immunogenic bacterial antigens with the potential to induce and regulate autoimmune arthritis. *Immunological Reviews* 1991; **121**: 5-28.
- 16 Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1995; **38**: 151-60.
- 17 Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003; **2**: 473-88.
- 18 Drossaers-Bakker KW, de Buck M ve ark. Long-term course and outcome of functional capacity in rheumatoid arthritis: the effect of disease activity and radiologic damage over time. *Arthritis & Rheumatology* 1999, **42**(9): 1854-60.
- 19 Takemura S, Klimiuk PA ve ark. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *The journal of Immunology* 2001, **167**(8): 4710-8.
- 20 Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW ve ark. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and Rheumatism* 2004; **50**: 380-6
- 21 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ ve ark Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Disease* 2010; **69**: 1580-8
- 22 Yıldırım R, Yazıcı Y. Early treatment in rheumatoid arthritis *RAED Dergisi* 2012; **4**(2): 59-67
- 23 Huizinga TW, van der Helm-van Mil A. A quantitative approach to early rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Disease* 2011; **69**: 116-21
- 24 Krabben A, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH. Undifferentiated arthritis characteristics and outcomes when applying the 2010 and 1987 criteria for rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Disease* 2012; **71**: 238-41.
- 25 Van der Linden MP, Knevel R, Huizinga TW, van der Helmvan Mil AH. Classification of rheumatoid arthritis: comparison of the 1987 American College

- of Rheumatology criteria and the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria. *Arthritis and Rheumatism* 2011; **63**: 37-42.
- 26 Kumar V, Abbas K, Fausto N, Michell RN. Rheumatoid Arthritis in Robins and Cotran Patologic Basis of Disease by Saunders, *an imprint of Elsevier Inc* 2010; 3121-5
 - 27 Schneider M, Blumenroth M, Fischer-Betz R, The New ACR/EULAR Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis: Will They Change Our Trials and Clinical Management? *International Journal of Advance in Rheumatology* 2011; **9**(2): 56–61.
 - 28 Kulveer M, Emery P. Preclinical Rheumatoid Arthritis. *American College of Rheumatology* 2016; **68**(4): 779–788
 - 29 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. B cell activation and antibody production. In: *Cellular and molecular immunology*. 7th edition, 2012: 243-68.
 - 30 Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 2000; **343**: 37-49
 - 31 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. B cell activation and antibody production. In: *Cellular and molecular immunology*. 7th edition, 2012: 173-202.
 - 32 Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinic Immunology* 2010; **125**: 33-40.
 - 33 de Souza AW, Mesquita Junior D, Arauja JA, Catelen TT, Cruvinel WM, Andrade LE, da Silva NP, Immune System: part III. The delicate balance of the immune system between tolerans and autoimmunity. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010; **50**: 665-79.
 - 34 Mesquita Junior D, Arauja JA, Catelen TT, Cruvinel Wde M, Andrade LE, Silva NP. Immune System- part II. basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010; **50**: 552-80.
 - 35 Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* 1996; **184** (6): 2271-8
 - 36 Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer FI, Bhan AK. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *International Immunology* 2000; **12** (5): 597-605

- 37 Adams AB, Newell KA. B cells in clinical transplantation tolerance. *Seminars Immunology* 2012; **24**(2): 92-5
- 38 Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunology* 2003; **4**: 337–342.
- 39 Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *The Journal of Immunology* 2004; **172**(6): 3422-7.
- 40 Martin F, Chan AC. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity: insights from the clinic. *Immunity* 2004; **20**(5): 517-27
- 41 Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology* 2002; **3**(10): 944-50.
- 42 Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *The Journal Experimental Medicine* 2003; **197**(4): 489-501.
- 43 Jonathan CW, Cambridge GB. Cell Targeting in Rheumatoid Arthritis and Other Autoimmune Disease. *Nature Reviews Immunology* 2006; **6**: 394-406
- 44 Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in Immunology* 2008; **20**: 207–21.
- 45 Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Advances in Immunology* 2008; **99**(3): 59-94.
- 46 Benz C, Martins VC, Radtke F, Bleul CC. The stream of precursors that colonizes the thymus proceeds selectively through the early T lineage precursor stage of T cell development. *The Journal Experimental Medicine* 2008; **205**:1187–1199.
- 47 Scollay R, Wilson A, D'amico A, Kelly K, Egerton M, Pearse M ve ark. Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. *Immunological Reviews*.1988; **104**: 81-120.
- 48 Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H ve ark. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *The Journal Experimental Medicine* 2004; **200**: 493–505.
- 49 Laviini C, Moran CA, Morandi U, Schoenhuber R. Clinical, Diagnostic and Therapeutic Features *Thymus gland pathology* 2008; 11-17.

- 50 Li J, Li Y, Yao JY, Jin R, Zhu MZ, Qian XP ve ark. Developmental pathway of CD4+CD8–medullary thymocytes during mouse ontogeny and its defect in Aire–/– mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; **104**: 18175-18180.
- 51 Sakaguchi S: Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self tolerans and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology* 2004; **22**: 531-62.
- 52 Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunology Review* 2005; **204**: 195-207.
- 53 Fontenot JD, Gawin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*. 2003; **4**: 330–336.
- 54 Leonard WJ. TSLP: finally in the limelight. *Nature Immunology*.2002; **3**: 605–607.
- 55 Virella G. B Cell Activation and Humoral İmmüne Response. *Medical immunology* 6th edition, 2009; 161-193.
- 56 Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *Journal of Clinic Investigation*. 2004; **114**(9):1209-1217.
- 57 Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji, İmmün sistem işlev ve bozuklukları. Y.Camcıoğlu, G Deniz (editör). *İstanbul Medikal Yayıncılık*,2007.
- 58 Lydyard P, Grossi C, Cells involved in the immune response, In: Roitt IM, Brossotoff J, Male DK.(editör) *The Journal of Allergy and Clinic Immunology*. 4th, 1996; 2: 3-23
- 59 Lünemann A, Lünemann JD, Münz C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Molecular Medicine Reports* 2009; **15**: 352-358.
- 60 Eissmann P. Natural Killer Cells *British Society for Immunology*
- 61 Erşahin G, Bilgiç S, Aktaş E, Salman F, Deniz G. Tip 1 diyabette NKT hücrelerinin rolü. *Deneyisel Tıp Dergisi*, 2011, cilt:1, sayı:1, s:25-33.
- 62 Skold M, Faizunnessa NN, Wang CR, Cardell S. CD1d-specific NK1.1+ T cells with a transgenic variant TCR. *The Journal of Immunology*. 2000; **165**: 168–74.
- 63 Emoto M, Kaufmann SH, Liver NKT. cells. an account of heterogeneity. *Trends Immunology*. 2003; **24**: 364–9.

- 64 Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY ve ark. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *European Journal of Immunology* 1999; **29**: 3768–81.
- 65 Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P ve ark. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *The Journal of Experimental Medicine* 1998; **188**: 1521–8.
- 66 Smyth MJ, Godfrey DI. NKT cells and tumor immunity a double-edged sword. *Nature Immunology* 2000; **1**: 459–60.
- 67 Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunology Today* 2000; **21**: 573–83.
- 68 Akbari O, Stock P, Meyer E ve ark. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature Medicine* 2003; **9**: 582–8.
- 69 Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine* 1999; **189**: 1973–80.
- 70 Kikuchi A, Nieda M, Schmidt C ve ark. In vitro anti-tumour activity of alpha-galactosylceramide-stimulated human invariant Valpha24+ NKT cells against melanoma. *British Journal of Cancer* 2001; **85**: 741–6.
- 71 Duarte N, Stenstrom M, Campino S, Bergman ML, Lundholm M, Holmberg D ve ark. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells. *The Journal of Immunology*. 2004; **173**: 3112–8.
- 72 Kim HY, Kim HJ, Min HS, Kim S, Park WS, Park SH ve ark. NKT cells promote antibody-induced joint inflammation by suppressing transforming growth factor beta1 production. *The Journal of Experimental Medicine* 2005; **201**: 41–7.
- 73 Moodycliffe AM, Nghiem D, Clydesdale G, Ullrich SE. Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nature Immunology* 2000; **1**: 521–5.
- 74 Haygreen E, Institute J. NKT Cells: Invariant British Society for Immunology

- 75 Ahern DJ, Brennan FM: The role of natural killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators? *Immunology Letters* 2011, **136**: 115-121.
- 76 Conigliaro P, Scrivo R, Valesini G, Perricone R: Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmunity Reviews* 2011, **10**: 577-581.
- 77 Dalbeth N, Callan MFC: A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis and Rheumatism* 2002, **46**: 1763-1772
- 78 Pridgeon C, Lennon GP, Pazmany L, Thompson RN, Christmas SE, Moots RJ: Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a CD56bright,CD94bright,CD158negative phenotype. *Rheumatology* 2003; **42**: 870-878.
- 79 De Matos CT, Berg L, Michaëlsson J, Felländer-Tsai L, Kärre K, Söderström K: Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion. *Immunology* 2007; **122**: 291-301.
- 80 Park YW, Kee SJ, Cho YN, Lee EH, Lee HY, Kim EM ve ark. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology* 2009; **60**: 1753-1763.
- 81 Aramaki T, Ida H, Izumi Y, Fujikawa K, Huang M, Arima K ve ark. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* 2009; **19**: 245-252.
- 82 Fereidouni M, Jabbari Azad F, Mahmoudi M, Varasteh A, Farid Hosseini R. Comparison of two flow cytometric methods for detection of human invariant natural killer T cells (iNKT). *Iranian Journal of Immunology* 2010; **7**(1): 1-7.
- 83 Abbas KA, Lichtman HA. Activation of the complement system. *Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System* 2007; 161-162
- 84 Karadağ O, Kiraz S. Romatoid artrit tedavisi: kısa etkili ilaçlar (nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar ve steroidler). *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medicine Science* 2006; **2**(25): 46-51.
- 85 Cohen SB, Emery P, Greenwald MW ve ark. REFLEX Trial Group. Rituximab for RA refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter,

- randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis and Rheumatism* 2006; **54** (9): 2793-2806.
- 86 Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR ve ark. Efficacy of B cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 2004; **350**: 2572–81.
- 87 Sanz I, Anolik JH, Looney RJ. B cell depletion therapy in autoimmune diseases [review]. *Frontiers in Biosciences* 2007; **1**: 2546–67.
- 88 Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid arthritis is B cell dependent. *The Journal of Immunology* 2001; **167**: 4710–8.
- 89 Silverman GJ, Carson DA. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 2003; **14**: 1–6.
- 90 Hamuryudan V. Romatoid artritte güncel tedavi yaklaşımları, değişen kriterler ve biyolojik ajanlar,2017
- 91 Strand V, Kimberly R, Isaacs JD Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Natural Reviews Drug Discovery* 2007; **6**: 75–92.
- 92 Stashenko P, Nadler LM, Hardy R ve ark. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *Journal Immunology* 1980; **125**: 1678-85.
- 93 Martin Mdel P, Cravens PD, Winger R ve ark. Depletion of B lymphocytes from cerebral perivascular spaces by Rituximab. *Archives of Neurology* 2009; **66**: 1016-20.
- 94 Stohl W, Looney RJ. B cell depletion therapy in systemic rheumatic diseases : different strokes for different folks? *Clinical Immunology* 2006; **121**: 1–12.
- 95 Moreland LW, Bridges AJ. B cell targeted therapies: Clinical trials update. *Medscape CME & Education* 2006.
- 96 Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2007; **370**: 1861-74.
- 97 Dalkılıç E, Alkış N, Romatoid artritte B hücre hedefli tedaviler. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2011; **37**(3): 161-164

- 98 Protheroe A, Edwards JC, Simmons A, Maclellan K, Selby P. Remission of inflammatory arthropathy in association with anti-CD20 therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Rheumatology* 1999; **38**: 1150-2
- 99 Stewart M, Malkovska V, Krishnan J, Lessin L, Barth W. Lymphoma in a patient with rheumatoid arthritis receiving methotrexate treatment: successful treatment with rituximab. *Annals of the Rheumatic Disease* 2001; **60**: 892-3
- 100 Blüm S, McKeever K, Ettinger R, Smolen J, Herbst R. B-cell targeted therapeutics in clinical development *Arthritis Research & Therapy* 2013; **15**(1): 4
- 101 Parietti V. ve ark. Rituximab treatment overcomes reduction of regulatory iNKT cells in patient with rheumatoid artrit. *Clinic Immunology* 2010; **134**:331-339.
- 102 Edwards JC ve ark. Efficacy of B-cell-targeted therapy with Rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 2004; **350**: 2572–2581.
- 103 Breedveld F ve ark. Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2007; **47**: 1119–1128.
- 104 Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC: Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with Rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2006, **54**: 613-620.
- 105 Mansour S, Tocheva AS, Sanderson JP, Goulston LM, Platten H, Serhal L ve ark. Structural and Functional Changes of the Invariant NKT clonal Repertoire in early Rheumatoid Arthritis. *Journal Immunology* 2015; **195**(12): 5582-5591
- 106 Johansso U, Macey MG, Kenny D, Provan D, Newland AC. Alpha galactosylceramide-driven expansion of human natural killer T cells is inhibited by prednisolone treatment. *British. Journal of. Haematology.* 2004; **125**(3) 400-444
- 107 Smyth MJ, Godfrey DI. NKT cells and tumor immunity a double-edged sword *Nature Immunology* 2000; **1**(6) 459-460
- 108 Linsen L, Thewissen M, Baete K, Somers V, Geusens P, Raus J ve ark. Peripheral blood but not synovial fluid natural killer T cells are biased towards a Th1-like phenotype in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 2005; **7**: 493-502

- 109 Shao H, Van Kaer L, Sun SL, Kaplan HJ. Sun Infiltration of the inflamed eye by NKT cells in a rat model of experimental autoimmune uveitis. *Journal of Autoimmunity* 2003; **2**: 37-45
- 110 Sarkar S, Fox DA. Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2007; **56**(3): 710-3.
- 111 Janossy G, Panayi G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 1981; **2**(8251): 839-42.
- 112 Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Current Opinion in Immunology* 2005; **17**: 638-42.
- 113 Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology* 2008; **9**: 239-44.
- 114 Feger U, Tolosa E, Huang YH ve ark. HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood* 2007; **110**: 568-77.
- 115 Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, GrosseWilde H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Human Immunology* 2006; **67**: 561-7.
- 116 Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clinical Experimental of Rheumatology* 2007; **25**(46): 4-11.
- 117 Londei M. Role of regulatory T cells in experimental arthritis and implications for clinical use. *Arthritis Research and Therapy* 2005; **7**: 118-20.
- 118 Feuchtenberger M, Müller S, Roll P, Waschbisch A, Schäfer A, Kneitz C ve ark. Frequency of Regulatory T Cells is Not Affected by Transient B Cell Depletion Using Anti-CD20 Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *The Open Rheumatology Journal* 2008; **2**: 81-88
- 119 Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. 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* 2005; **140**: 360-7.
- 120 Anderson DR, Grillo-Lopez A, Varns C, Chambers KS, Hanna N. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochemical Society Transactions* 1997; **25**: 705-8.

- 121 Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R ve ark.. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; **83**: 435–45.
- 122 Sakkas IL, Daoussis D, Mavropoulos A, Liossis NS, Bogdanos PD. Regulatory B cells: New players in inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2018: 1-9
- 123 Carter ve ark. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 2012; **14**: 32.
- 124 Mauri ve ark. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; **197**: 489-501
- 125 İlhan F, Taş SK. Organ Nakillerinde Regulator B hücrelerinin Rolü. *Türkiye Klinkleri J Immun Alergy Special Topics* 2013;**6**(2):29-35

FORMLAR

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Romatoid Artrit (RA), etyolojisi belli olmayan, temel olarak büyük ve küçük eklemleri etkilemekle birlikte sistemik etkilere de yol açan, kronik inflamatuvar bir hastalıktır.

Size hekiminiz tarafından Romatoid Artrit teşhisi konmuş bulunmaktadır. TNF-alfa blokerine dirençli-Aktif ve TNF-alfa blokerine yanıt veren –Aktif olmayan grup içinde olabilirsiniz ve Türkiye’de ruhsatlı olarak bu tip hastalarda kullanılan ve etkisi çeşitli klinik çalışmalarla kanıtlanmış onaylı Rituximab adlı ilacı kullanmaya adaysınız.

Çalışmanın amacı TNF-alfa inhibitör tedavisine yanıt veren ve dirençli olan Rituximab tedavisi almasına karar verilen hastalarda bağışıklık sistemi hücrelerindeki fonksiyonel ve işlevsel değişikliklerin neler olabileceğine ışık tutmaktır. Çalışmamız uzun dönemde bu amacımızı gerçekleştirmede vesile olacaktır.

Yapılması planlanan immünoloji incelemeler için sizden Rituximab tedavisi öncesinde 1 kez ve Rituximab ilacı alımı (en az 3 ay - bu süre hastanın durumuna göre uzayabilir)sonrasında 2.kez olmak üzere toplam 2 kez kolunuzdan 5ml periferik kan örneği alınacaktır.

Alınan kan örneğinden bağışıklık sistem hücreleriniz hakkında bize fikir vermesi için CD3,CD4, CD16,CD19,CD25,CD27,CD38,6B11,IL-10 monoklonal antikorlar ile işaretlenen lenfositler akımsitometrik olarak incelenecektir.

Çalışmaya 15+15 Rituximab tedavisine karar verilen gönüllü hasta ve 15 gönüllü sağlıklı birey katılacaktır.

Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir.

Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu, ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

Araştırma süresince sizden 2 kez kan alınacaktır ve bunun dışında invaziv bir işlem gerçekleştirilmeyecektir.

Kan alma sırasında oluşabilecek herhangi bir sorun karşısında ücretsiz olarak tıbbi destek sağlanacaktır.

Araştırma sırasında inceleme sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda , araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır.Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz.Bu talebinizin, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

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

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

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı

İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı

İmzası

Görevi

İkinci bölüm: (Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Prof.Dr.Murat İnanç tarafından Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof.Dr.Murat İnanç'ı 0212 4142000/32892 no'lu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 767

Tarih : 15.04.2011

Konu : Prof. Dr. Murat İNANÇ hk,

Sayın Prof. Dr. Murat İNANÇ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgi : 25.03.2011 tarihli 1325 sayılı yazınız

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yük. Lis. Öğr. Biyolog Aslı ÖNDER GÜL'ün yürüteceği 2011/666-522 dosya numaralı "Romatoid Artritli Hastalarda anti-CD20 (Rituximab) kullanımının İmmün sistem hücreleri üzerine etkisi" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 01.04.2011 tarihli 06 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

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

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	X	
	SİĞORTA		
	HASTA KARTI/GÜNÜLKLERİ		
	İLAN		
	YILLIK BİLDİRİM		
	SONUÇ RAPORU		
DİĞER	GÜVENLÜK BİLDİRİMLERİ		
	DİĞER		Anabilim Dalı Başkanlığından Doç. Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Raporu Formu, İlgili Elemanların Değerlendirilmesine Dair Belge, ÇV, ÇD

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 06	Tarih: 01.04.2011
	Prof. Dr. Murat İNANÇ ve Yök. Lis. Öğr.Biyolog Aşlı ÖNDER GÜL'ün koordinatörlüğü ve sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen tez başvuru dosyası ve araştırma ile ilgili belgeler gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Istanbul Üniversitesi İnsan Denekler Üzerinde Yürütülecek Bilimsel Araştırmalar ve Etik Değerlendirme Kurulları Yönergesi, 10 Aralık 2010 tarihli, T.C. Sağlık Bakanlığı İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI:	Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlgili *	Katılım **	İmza
Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	Istanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	EX K	E H X	EX H	
Prof.Dr. Benin UMMAN	Kardiyoloji	Istanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E K X	E H X	EX H	
Prof.Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	Istanbul Tıp Fakültesi	EX K	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Prof.Dr. Rukiye EKER ÖMEROĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Istanbul Tıp Fakültesi	E K X	E H X	EX H	
Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	Istanbul Tıp Fakültesi	EX K	E H X	EX H	
Prof.Dr. Pınar SAİP	Onkoloji	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü	E K X	E H X	EX H	
Üzm.Dr. Ahmet Rıza URAS	Biyokimya	Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya	EX K	E H X	EX H	
Doç.Dr. H. Hanzade DOĞAN	Deontoloji	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E K X	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Prof.Dr. Ayşen BULUT	Halk Sağlığı	Emekli	E K X	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Doç.Dr. Tufan TÜREK	İç Hastalıkları	Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hast. 1.Dahiliye Kliniği	EX K	E H X	EX H	
Prof. Dr. Ünal KUZGUN	Ortopedi	Şişli Etilal E. ve Arş. Hst.	EX K	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN	Eczacılık	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	EX K	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK	Hukukçu	Istanbul Üniversitesi	E K X	E H X	EX H	
Prof. Dr. Demir TIRYAKI	Biyotizik	Emekli	EX K	E H X	EX H	
M. Kerim AKMAN	İİBF İktisat bölümü	Özel (Ekonomist)	EX K	E H X	EX H	

* :Araştırma ile ilgili
** :Toplantıda Bulunma

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	İstanbul Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Hıfzı Behcet Kütüphanesi Kat 3 Çapa Fatih/İstanbul 34380
TELEFON	0 212 414 20 00 – 313 46
FAKS	0 212 414 21 53
E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Romatoid Artritli Hastalarda anti-CD20 (Rituximab) kullanımının İmmün sistem hücreleri üzerine etkisi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
	EUDRACT NUMARASI				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Murat İNANÇ			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İç Hastalıkları			
	KOORDİNATÖRÜN UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Murat İNANÇ			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	İç Hastalıkları			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	İ.Ü. Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	İ.Ü. Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı			
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	İstanbul Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☒			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1			
		FAZ 2			
FAZ 3					
FAZ 4					
BE/BY					
DİĞER		Diğer ise belirtiniz:			
İLACI DIŞI ARAŞTIRMA		Belirtiniz:			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	28.03.2011	1	Türkçe X	İngilizce	Diğer
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-	Türkçe	İngilizce	Diğer
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	28.03.2011	1	Türkçe X	İngilizce	Diğer
	OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe	İngilizce	Diğer

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKTİF ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA KULLANILAN
ANTİ CD20 MONOKLONAL ANTİKORUNUN (RİTUXİMAB)
İMMÜN SİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 8	% 6	% 4	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

DEĞERCELİ KAYNAKLAR

1	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1
2	uludagtipdergisi.org İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	%1
4	flipflashpages.uniflip.com İnternet Kaynağı	%1
5	www.guncelpediatrici.com İnternet Kaynağı	%1
6	www.dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
7	www.noropsikiyatriarsivi.com İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

9	sagens.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
10	bapotomasyon.kku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
11	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
12	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
13	Submitted to King's College Öğrenci Ödevi	<%1
14	www.raeddergisi.org İnternet Kaynağı	<%1
15	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
16	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
17	www.rug.nl İnternet Kaynağı	<%1
18	pure.uva.nl İnternet Kaynağı	<%1
19	www.thd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
20	archive.org İnternet Kaynağı	<%1

21	content.guidelinecentral.com İnternet Kaynağı	<%1
22	"Handbook on Immunosenescence", Springer Nature, 2009 Yayın	<%1
23	DEMİREL, Ayşın and KIRNAP, Mehmet. "Romatoid artrit tedavisinde geleneksel ve güncel yaklaşımlar", Fırat Üniversitesi, 2010. Yayın	<%1
24	Emel Öztürk Durmaz. "B hücre aktivasyonu ve antikör üretimi", TURKDERM, 2013 Yayın	<%1
25	John Looney. "Update on the use of rituximab for intractable rheumatoid arthritis", Open Access Rheumatology Research and Reviews, 07/2009 Yayın	<%1
26	Natural Killer T cells, 2012. Yayın	<%1

Alıntıları çıkart

Üzerinde

Eşleştirmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

Üzerinde

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ASLI	Soyadı	ÖNDER GÜL
Doğ.Yeri	Üsküdar	Doğ.Tar.	05.07.1976
Uyruğu	TC	TC Kim No	
Email	asliondergul0816@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü Sağlık Bilimleri İmmünoloji AD.İmmünoloji	2019
Lisans	İ.Ü Fen Fakültesi Biyoloji	2005
Lise	GAREL	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Tibbi Uzm.Yrd.	Acıbadem Labmed	2004-2018-
2.	Lab.Teknikeri	Pakize.İ Tarzi Lab.	1998-2004-
3.	Lab.Teknikeri	YEDİGEN Araştırma Lab.	1997-1998-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Orta	Orta	Orta	72	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	74		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):