

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PSORİASİSLİLERDE KANDA FOXP3
GENİNDE TSDR METİLASYONU VE
SİTOKİN DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

BURCU AÇIKGÖZ

MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc2014970077

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PSORİASİSLİLERDE KANDA FOXP3
GENİNDE TSDR METİLASYONU VE
SİTOKİN DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ

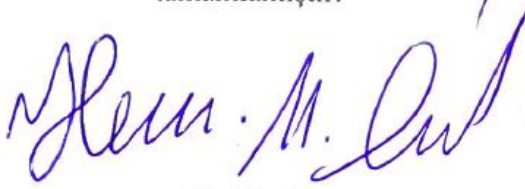
BURCU AÇIKGÖZ

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Harun Muayad SAİD

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 116S159 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc2014970077

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Burcu AÇIKGÖZ ‘PSORİASİSLİLERDE KANDA FOXP3 GENİNDE TSDR METİLASYONU VE SİTOKİN DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ’ konulu Yüksek Lisans tezini 27.03.2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

Yrd.Doç.Dr. Harun SAİD
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



ÜYE

Prof.Dr. Hüray İŞLEKEL
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



ÜYE

Doç.Dr. Zahide ÇAVDAR
Dokuz Eylül Üniversitesi SHMYO



ÜYE

Yrd.Doç.Dr. Özlem ÖZBAĞÇIVAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



ÜYE

Yrd.Doç.Dr. Melis KARTAL YANDIM
İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi

YEDEK ÜYE

Yrd.Doç.Dr. Gamze TUNA
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens.

YEDEK ÜYE

Prof.Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN
İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLOLAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Psoriasis.....	6
2.1.1. Klinik Özellikleri.....	6
2.1.2. Psoriasis Alt Türleri.....	7
2.1.3. Skorelama.....	7
2.1.4. Tedavi	7
2.1.5. Tetikleyici Faktörler	8
2.2. Psoriasis Patogenezi	8
2.2.1. İmmün Sistem.....	9
2.2.2. Treg Hücreler.....	11
2.2.3. FOXP3.....	13
2.2.4. İnterlökinler	15
2.2.4.1. IL-17	16
2.2.4.2. IL-36.....	17
2.2.4.3. IL-10.....	18
2.2.4.4. IL-35.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Araştırmanın Tipi	20
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	20
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grubu	20
3.4. Çalışma Materyali	20
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	20

3.6. Veri Toplama Araçları.....	21
3.6.1. Klinik Verilerin Elde Edilmesi ve Periferik Tam Kan Örneklerinin Toplanması ..	21
3.6.2. <i>FOXP3</i> TSDR Metilasyon Analizi	22
3.6.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu	22
3.6.2.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	23
3.6.2.3. Bisülfid Modifikasyonu.....	23
3.6.2.4. HRM-PCR (High Resolution Melt-Polimerase Chain Reaction) ile Metilasyon Analizi	24
3.6.3. <i>FOXP3</i> Ekspresyon Analizi.....	25
3.6.3.1. Tam Kandan RNA İzolasyonu	25
3.6.3.2. RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	26
3.6.3.3. Komplementer DNA (cDNA) sentezi	26
3.6.3.4. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi	27
3.6.3.5. Agaroz Jel Elektrophorezi	29
3.6.4. ELISA Analizi	29
3.6.4.1. IL-10 Ölçümü	30
3.6.4.2. IL-17A Ölçümü	31
3.6.4.3. IL-35 Ölçümü	32
3.6.4.4. IL-36G Ölçümü	33
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	36
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	36
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	36
3.10. Etik Kurul Onayı	37
4. BULGULAR	38
4.1. <i>FOXP3</i> TSDR Metilasyon Düzeyleri.....	39
4.2. <i>FOXP3</i> Ekspresyon Düzeyleri.....	42
4.2.1. Agaroz Jel Elektrophorezi	45
4.3. İnterlökin Düzeyleri.....	45
5. TARTIŞMA.....	56
5.1. <i>FOXP3</i> ve Psoriasis İlişkisi	56
5.2. İnterlökin Düzeyleri ve Psoriasis İlişkisi.....	60
5.2.1. IL-10	60
5.2.2. IL-17	68
5.2.3. IL-35	77

5.2.4. IL-36	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
7. KAYNAKLAR	81
8. EKLER	96
EK-1. Gönüllü Bilgilendirme Formu (Kontrol Grubu)	96
EK-2. Gönüllü Bilgilendirme Formu (Hasta Grubu)	98
EK-3. Etik Kurul Onayı.....	100
EK-4. Özgeçmiş	101



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. T hücre tiplerinin psoriasisteki yeri.	10
Tablo 2. İmmün baskılayıcı Treg popülasyonları ve özellikleri.	12
Tablo 3. HRM-PCR reaksiyon içeriği.	25
Tablo 4. cDNA sentezi reaksiyon içeriği.	27
Tablo 5. Ekspresyon analizi için kullanılan primerler.	28
Tablo 6. Real-Time PCR reaksiyon içeriği.	28
Tablo 7. Araştırmada kullanılan cihaz listesi.	35
Tablo 8. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet özellikleri ve yaş ortalamaları.	38
Tablo 9. Hasta grupları ve özellikleri.	39
Tablo 10. Hastaların PAŞİ skoru dağılımı.	39
Tablo 11. Hasta ve kontrol grubunda interlökin konsantrasyonlarının istatistiksel analizi.	46
Tablo 12. Hastalık şiddeti düşük ve orta-şiddetli olan hastaların interlökin konsantrasyonlarının istatistiksel analizi.	49
Tablo 13. Tedavi olan ve olmayan hastaların interlökin konsantrasyonlarının istatistiksel analizi.	49
Tablo 14. Psoriasis dışında kronik hastalığı olan ve olmayan hastaların interlökin konsantrasyonlarının istatistiksel analizi.	50
Tablo 15. Hasta bulgularının korelasyon analizi.	51
Tablo 16. Hastalık şiddeti düşük olan hasta bulgularının korelasyon analizi.	52
Tablo 17. Hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hasta bulgularının korelasyon analizi.	54
Tablo 18. IL-10 ve psoriasis ilişkisinin incelendiği çalışmalar ve elde edilen bilgiler.	63
Tablo 19. IL-17 ve psoriasis ilişkisinin incelendiği çalışmalar ve elde edilen bilgiler.	71
Tablo 20. IL-35 ve psoriasis ilişkisinin incelendiği çalışmalar ve elde edilen bilgiler.	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Psoriasis patogenezindeki önemli olayların şematik özeti	11
Şekil 2. Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması	21
Şekil 3. IL-10 standart grafiği.	30
Şekil 4. IL-17A standart grafiği.	32
Şekil 5. IL-35 standart grafiği.	33
Şekil 6. IL-36G standart grafiği.	34
Şekil 7. HRM PCR ile elde edilen erime eğrisi örneği.	40
Şekil 8. Hasta ve kontrol grubunun erime sıcaklıkları.	41
Şekil 9. Hastalık şiddeti gruplarının erime sıcaklıkları.	41
Şekil 10. Tedavi gruplarının erime sıcaklıkları.	42
Şekil 11. Kronik hastalık gruplarının erime sıcaklıkları.	42
Şekil 12. Hasta ve kontrol grubunun göreceli FOXP3 ekspresyon düzeyi.	43
Şekil 13. Hastalık şiddeti gruplarının göreceli FOXP3 ekspresyon düzeyi.	43
Şekil 14. Tedavi gruplarının göreceli FOXP3 ekspresyon düzeyi.	44
Şekil 15. Kronik hastalık gruplarının göreceli FOXP3 ekspresyon düzeyi.	44
Şekil 16. Real-time PCR ürünlerinin %4'lük agaroz jeldeki örnek görüntüsü.	45
Şekil 17. Hasta ve kontrol grubunun IL-10 değerleri.....	46
Şekil 18. Hasta ve kontrol grubunun IL-17A değerleri.....	47
Şekil 19. Hasta ve kontrol grubunun IL-35 değerleri.....	48
Şekil 20. Hasta ve kontrol grubunun IL-36G değerleri.....	48
Şekil 21. Hastalarda PAŞİ skoru – IL-35 korelasyon grafiği.....	50
Şekil 22. Hastalık şiddeti düşük olan hastalarda PAŞİ skoru – IL-17A korelasyon grafiği. ...	53
Şekil 23. Hastalık şiddeti düşük olan hastalarda FOXP3 ekspresyon düzeyi – IL-35 korelasyon grafiği.....	53
Şekil 24. Hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hastalarda PAŞİ skoru – IL-36G korelasyon grafiği.	55
Şekil 25. Hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hastalarda FOXP3 ekspresyon düzeyi – IL-17A korelasyon grafiği.....	55

KISALTMALAR

Breg: Regülatör B hücre

CD: Cluster of differentiation

cDNA: Komplementer DNA

CNS: Conserved noncoding DNA sequence

CTLA: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksinükleotid trifosfat

EBI3: Epstein-Barr virus-induced gene 3

ELISA: Enzim bağı immunosorbent testi

FOXP3: Forkhead box protein 3

GWAS: Genom-wide association study

HRM-PCR: High Resolution Melt-Polimerase Chain Reaction

HRP: Horseradish peroksidaz

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

IPEX: İmmün disregüstasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağı geçen

JAK: Janus tyrosine kinase

MAP: Mitogen-activated protein

MHC: Major histocompatibility complex

NF-κB: Nükleer faktör-kappa B

NK: Natural killer

OD: Optik dansite

PAŞİ: Psoriasis Alan Şiddet İndeksi

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PsA: Psoriatik artrit

RA: Romatoid artrit

RNA: Ribonükleik asit

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

STAT: Signal transducer and activator of transcription

TBE: Tris borat EDTA

TCR: T hücre reseptörü

TGF: Transforming growth factor

Th: Yardımcı T hücre

TMB: Tetrametilbenzidin

TNF: Tümör nekroz faktörü

TSDR: Treg-specific demethylated region

Treg: Regülatör T hücre

UVB: Ultraviyole B

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Harun SAİD'e ve tez çalışmamın temellerini atıp bu sürece hızla alışmamı sağlayan ilk danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Serpil TANRIVERDİ AKHİSAROĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim süresince öneri ve yardımlarıyla yol gösteren Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL'e ve değerli öğretim üyelerine,

Hastaların seçimi ve klinik verilerin toplanmasında verdikleri destekten dolayı Yrd. Doç. Dr. Özlem ÖZBAĞÇIVAN ve Prof. Dr. Şebnem AKTAN'a,

Tez çalışmam süresince başım her sıkıştığında bana büyük bir sabırla yardımcı olan Güler GÜL, Ayşe KOÇAK SEZGİN, Cemre URAL, Duygu HARMANCI KARAGÜLLE, Hüsniye ŞAHİN, Duygu ÜNÜVAR PURCU ve Cumhuriyet DOĞAN'a,

Yıllardır benimle birlikte sürüklenen ve bu süreçte her derdime ortak olan Uğur BORA ve İlkin AYGÜN'e,

Her zaman yanımda olan, maddi, manevi ve bilimsel desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkürü borç bilirim.

PSORİASİSLİLERDE KANDA FOXP3 GENİNDE TSDR METİLASYONU VE SİTOKİN DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Burcu AÇIKGÖZ, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp
Anabilim Dalı, 35340, Inciraltı, İzmir

ÖZET

Deride kırmızı ve sedefi renkte kabukların bulunmasıyla karakterize, immün sistem temelli kronik bir hastalık olan psoriasis kesin tedavisinin bulunmaması nedeniyle hastaların yaşam kalitesi kötü etkilenmektedir. Efektör T hücrelerin etkinliklerini baskılamada görevli regülatör T (Treg) hücreler, yüksek düzeyde FOXP3 ekspresyonuyla karakterizedir. FOXP3 ekspresyonunun kararlılığı, CpG'ce zengin ve korunmuş intronik bölge olan TSDR metilasyonuyla ilişkilendirilmektedir. Treg hücrelerdeki metilasyonun, otoimmün hastalıkların ve psoriasisin patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir. Proinflamatuvar özellikteki IL-17 ve IL-36 ile antiinflamatuvar özellikteki IL-10 ve IL-35'in psoriasis patogeneziyle ilgili olduğu düşünülse de kesin bir sonuca varılamamıştır.

Bu çalışmada, psoriasislilerde periferik kanda *FOXP3* TSDR metilasyon düzeylerinin, *FOXP3* mRNA ekspresyon düzeyi ve seçilmiş sitokinlerin düzeylerinin belirlenmesi ve bulguların hastalık şiddeti ve tedavi durumuyla ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için psoriasisli hasta (n=38) ve sağlıklı kontrol grubundan (n=20) alınan kan örneklerinden HRM-PCR yöntemiyle *FOXP3* TSDR metilasyon analizi, real-time PCR yöntemiyle *FOXP3* mRNA ekspresyon analizi ve ELISA yöntemiyle plazma interlökin düzeylerinin analizi gerçekleştirilmiştir.

Hasta ve kontrol grubunda *FOXP3* TSDR metile durumunda olup, iki grubun erime sıcaklık değerleri ve *FOXP3* mRNA düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Sitokin düzeyleri incelendiğinde IL-10 hastalarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Hastalarda psoriasis alan şiddet indeksi (PAŞİ) skorlarıyla IL-35 pozitif; hastalık şiddeti düşük olan hastalarda PAŞİ skorlarıyla IL-17A pozitif, *FOXP3* ekspresyonuyla IL-35 negatif; hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hastalarda PAŞİ skorlarıyla IL-36G ve *FOXP3* ekspresyonuyla IL-17A pozitif korelasyon göstermektedir.

Sonuç olarak *FOXP3* TSDR metilasyonunun psoriasisteki durumunun daha hassas yöntemlerle araştırılması gerektiği, incelenen sitokinlerin hastalık şiddetine yönelik önemli göstergeler olabileceği, bunun için çalışmanın daha fazla kişi ve hastalığa yönelik çeşitli gruplandırmalarla incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Psoriasis, regülatör T hücre, *FOXP3*, TSDR, metilasyon, interlökin.



DETERMINATION OF FOXP3 TSDR METHYLATION AND CYTOKINE LEVELS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH PSORIASIS

ABSTRACT

Psoriasis is a common, immune-mediated inflammatory disease which is characterized by red colored plaques with well-defined borders and silvery-white dry scales on the skin. Due to psoriasis being a life-long disease and the lack of definitive treatment of the disease, patients are affected by the poor life quality. Regulator T (Treg) cells, which are responsible for suppressing the activity of effector T cells, are characterized by high levels of FOXP3 expression. The stability of FOXP3 expression is associated with the methylation of TSDR, a CpG-rich and conserved intronic region. Methylation level of Treg cells is thought to have an impact on the pathogenesis of autoimmune diseases and psoriasis. Although proinflammatory cytokines (IL-17 and IL-36) and antiinflammatory cytokines (IL-10 and IL-35) are thought to be related to the pathogenesis of psoriasis, no definite result has been obtained.

In this study, it was aimed to determine the levels of *FOXP3* TSDR methylation, *FOXP3* mRNA expression and selected cytokines in the peripheral blood samples of patients with psoriasis and to investigate their relationship with disease severity and treatment status. To perform this task, blood samples taken from patients with psoriasis (n=38) and healthy control group (n=20). To determine *FOXP3* TSDR methylation status, *FOXP3* mRNA expression and interleukin levels; HRM-PCR, real-time PCR and ELISA methods were performed respectively.

In the patient and control groups, *FOXP3* TSDR was methylated. There was no significant difference between the melting temperature values and *FOXP3* mRNA levels of two groups. Among the cytokine results, only IL-10 was found to be significantly lower in patients. There was positive correlation between IL-35 levels and psoriasis area and severity index (PASI) scores in the patient group; IL-17A levels and PASI scores in patients with mild psoriasis; IL-17A and *FOXP3* expression levels, IL-36G levels and PASI scores in patients with moderate-to-severe psoriasis. There was negative correlation between IL-35 and *FOXP3* expression levels in patients with mild psoriasis.

In conclusion, it is suggested to analyse the *FOXP3* TSDR methylation level of patients with psoriasis using more precise methods. The investigated cytokines may be important indicators of disease severity. Therefore, it would be better to use more detailed grouping and larger sample sizes in further studies.

Key Words: Psoriasis, regulator T cell, *FOXP3*, TSDR, methylation, interleukin.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Psoriasis, görülme sıklığı %2-3 olan deride kırmızı ve sedefi renkte kabukların bulunmasıyla karakterize, immün sistem temelli kronik bir hastalıktır (1).

Regülatör T (Treg) hücreler, efektör T hücrelerin etkinliklerini baskılama görevi olan bir T hücre alt grubudur, Treg hücre oluşumu ve işlevi için en önemli düzenleyici transkripsiyon faktörü olan FOXP3'ü (forkhead box protein 3) yüksek düzeyde eksprese ederler (2). Esas olarak gen baskılamada görevli FOXP3, genomda Treg hücreye özgü hipometile bölgelerde gen aktivasyonunu sağlamaktadır (3). FOXP3 ekspresyonunun kararlılığı, *FOXP3* gen bölgesindeki CpG'ce zengin, korunmuş intronik bölge olan 'Treg-specific demethylated region' (TSDR) metilasyonu ile ilişkilidir (4). TSDR hipometilasyonu, Treg hücre soy özellikleri için önemlidir, transkripsiyon faktörlerinin tanıma ve bağlanmasını sağlayarak *FOXP3* transkripsiyonunda arttırıcı etki gösterir (3). Epigenetik çalışmalar, Treg hücrelerindeki metilasyonun, psoriasis patogenezinde rolü olduğunu göstermektedir (5, 6). *FOXP3* TSDR metilasyon ve FOXP3 mRNA ekspresyon düzeylerinin hastalık şiddeti ve hastaların tedavi durumu ile ilişkisinin araştırılması yararlı olacaktır.

Psoriasis patogenezinde etkili, inflamatuvar özellikteki IL-17'nin hastalık varlığında ve şiddetine bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (7, 8). IL-17 üzerine arttırıcı etkide bulunduğu düşünülen IL-36'nın psoriatik deri lezyonlarında varlığı bilinmektedir (9, 10). IL-17 ve IL-36 plazma düzeylerinin belirlenmesi, hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. IL-35, Treg aktivasyonunun düzenlenmesini sağlayarak otoimmün hastalıkların tedavisi için yeni bir potansiyel hedef olarak görülmektedir (11). Antiinflamatuvar özellikteki sitokinlerden IL-10 ile IL-35'in plazmada bulunma miktarı baz alınarak psoriasis ve Treg ilişkisinin araştırılması yararlı olacaktır.

Bu çalışmanın amacı psoriasisli hastalarda periferik kan örneklerindeki *FOXP3* geninin TSDR bölgesinin metilasyonunun ve FOXP3 mRNA ekspresyonunun, seçilmiş sitokinlerin (IL-10, 17, 35, 36) plazmada bulunma düzeyleriyle karşılaştırarak hastalık patogenezinde olası rolünün değerlendirilmesidir. Bu sayede klinik veriler, epigenetik ve inflamatuvar değişiklikler ile birlikte değerlendirilecek ve hastalık bir bütün olarak incelenmiş olacaktır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ile bu parametrelerin psoriasis tanı, izlem ve tedavisinde potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılmasına yönelik faydalı bilgiler edinilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Psoriasis

Halk arasında sedef hastalığı olarak bilinen psoriasis, görülme sıklığı %2–3 arasında değişen, deride kırmızı ve sedefi renkte kabukların bulunmasıyla karakterize, immün sistem temelli kronik bir hastalıktır (1). İnflamatuvar bir deri hastalığı olan psoriasis, doğuştan ve kazanılmış immün sistem hücreleri ve molekülleri aracılığıyla gelişmektedir (12). Hayat boyu süren bu hastalığın kesin bir tedavisinin olmaması nedeniyle, hastaların yaşam kalitesi kötü etkilenmektedir. Genetik, çevresel ve immünolojik durumların hastalığın immünopatogeneze tetikleyici etkisi olduğu bilinmektedir. Günümüzde hastalığın patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olup, bu konu hakkında çalışmalar devam etmektedir (1).

2.1.1. Klinik Özellikleri

Psoriasis; inflamasyon, epidermiste hiperproliferasyon, epidermis farklılaşmasındaki bozulma sonucu görülen pullanma, vasküler değişikliklerden dolayı gelişen kızarıklık olmak üzere klinik olarak dört durum ile karakterize edilmektedir (13). Psoriatik lezyondaki histolojik özelliklerin belirli immünolojik yanıtlar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (1). Psoriasisın karakteristik özelliklerinin histolojik ve immünolojik etkileri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Anjiyogenik faktörlerin etkisiyle papiller kan damarlarında görülen genişleme ve kıvrımlı olması gibi damar yapısındaki değişiklikler, deride kızarıklık, kanama ya da psoriasisın ayırıcı özelliklerinden eriteme neden olmaktadır (1, 14).
- Polimorfonükleer lökositlerin dermal damarlardan epidermis içine girdiği iltihaplanma süreci karakteristik özellikler arasında yer almaktadır. Lezyonlarda proinflamatuvar sitokinlerin salınmasından sorumlu CD4+ T hücreler dendritik hücrelerle birlikte üst papiller dermiste ve CD8+ T hücreler ise epidermiste çokça bulunmaktadır (1, 14).
- Keratinosit tabakasında gerçekleşen aşırı hücre bölünmesi sonucu akantoz, epidermal çıkıntılarda uzama (papillomatoz) ve granüler tabakada kayıp (hipogranuloz) gelişmektedir (1).
- Keratinosit çekirdeklerinin kornifiye tabakada bulunduğu epidermal farklılaşmadaki bozulma (parakeratoz) ve granüler tabaka kaybı psoriasisın ayırıcı özelliklerinden olup epidermisteki bu değişiklikler pullanmaya neden olmaktadır (14).

2.1.2. Psoriasis Alt Türleri

Psoriasisin pek çok farklı alt türü bulunmaktadır. Kronik plak, generalize püstüler, lokalize püstüler, guttat, eritrodermik ve tırnak psoriasis bunlardan bazılarıdır. Psoriasis vulgaris (kronik plak psoriasis) aralarında en çok görülen alt türdür ve kırmızı, pullu ve kabarık plak görüntüsü ile karakterize olup genellikle dirsekler, dizler ve kafa derisinde tutulum göstermektedir (15). Birçok küçük papülün hızla gelişmesi ve yaygınlaşması ile karakterize olan guttat psoriasisli hastaların yaklaşık yarısı kendiliğinden düzelirken diğer yarısında kronik plak psoriasis dönüşmektedir (16). Psoriasis alt tiplerinden diğer ikisi lokalize ve generalize püstüler psoriasisdir. Generalize püstüler psoriasis, yaygın kızarıklık ve subkorneal püstüller ile karakterize, sıklıkla sistemik semptom ve bulguların eşlik ettiği nadir görülen bir alt tiptir (17).

Psoriasisdeki inflamasyon çoğu zaman sadece deri ile sınırlı olsa da bazı hastalarda eklemleri de etkileyerek artrite neden olmaktadır. Psoriatik artrit (PsA), eroziv poliartriküler bir hastalığa dönüşerek eklem tahribatı ve işlevsellik kaybına neden olabilir (1).

2.1.3. Skorlama

Kronik plak psoriasisde hastalık şiddeti genellikle güvenilir ve tekrar edilebilir bir skorlama yöntemi olan Psoriasis Alan Şiddet İndeksi (PAŞİ) ile belirlenmektedir. Bu skorlama yönteminde derideki eritem, kepek ve kalınlık gibi semptomlar anatomik lokalizasyonlarına göre derecelendirilir ve en yüksek değeri 72'dir (12, 18). $PAŞİ \leq 10$ olduğu durumlarda hastalık şiddeti hafif, $PAŞİ > 10$ olduğunda hastalık şiddeti orta-şiddetli olarak belirlenmektedir. Bu değerlendirmeye göre tedavi seçimine yön verilebilmektedir (19, 20).

2.1.4. Tedavi

Psoriasisin kesin bir tedavisi olmamakla birlikte kullanılan tedaviler ile hastalığı en kısa sürede kontrol altına almak ve hastalığın etkilerini en aza indirmeye çalışılmaktadır. Tedavi yaklaşımları fototerapi, topikal preparatlar, sistemik ajanlar, biyolojik ilaçlar ve psikososyal müdahaleleri içermektedir (21). Hastalık şiddetinin hafif ve orta olduğu durumlarda tedavi için genellikle topikal tedavi uygulanırken, topikal tedavinin yeterli gelmediği hastalar için fototerapi ya da siklosporin, metotreksat, asitretin, fumarik asit esterleri gibi sistemik ajanlar tercih edilmektedir (22). Kimi hastalarda hastalığın kontrol altına alınabilmesi için bu tedavi yöntemlerinin birlikte kullanılması gerekebilmektedir (21). Tedavinin izleminde PAŞİ

skorundaki değişim önemlidir. Tedaviye bağlı olarak PAŞİ skorunun %75 azalması tedavi yönteminin hasta için uygun olduğunu gösterirken, PAŞİ skorundaki azalmanın %50 ve daha düşük olduğu durumlarda tedavi yönteminin yeniden düzenlenmesi gerekmektedir (19).

2.1.5. Tetikleyici Faktörler

Psoriasis enfeksiyon, ilaçlar, fiziksel ya da duygusal stres gibi çevresel uyaranlarla tetiklenen, inflamasyonun düzenlenmesindeki bozukluğun genetik olarak programlanmış olduğu bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (23). Çevresel uyaranlara sigara ve alkol kullanımı eklenebilir. Bunların dışında yaralanmanın da çevresel bir tetikleyici olduğu bilinmekte olup hastada yaralanma sonrası yaranın olduğu bölgede Koebner fenomeni gelişebilmektedir (24).

Genetik faktörlerden mutasyonların, tek nükleotid polimorfizminin (SNP) ve deri transkriptomunun psoriasis patogenezeine etkisi olduğu bilinmektedir. Kompleks bir hastalık olan psoriasis ile ilgili 30'dan fazla riskli SNP saptanmış olup, 2006-2017 yılları arasında psoriasis için risk oluşturan 60'tan fazla gen bölgesi tanımlanmıştır (12, 17). İkiz çalışmaları, konkordans oranının tek yumurta ikizlerinde %35-72 arası, çift yumurta ikizlerinde ise %12-23 arası olduğunu göstermektedir (24). Aile temelli çalışmalar ile 12 kadar psoriasisle ilişkili ana (*PSORS*) gen bölgesi tanımlanmıştır (12). Psoriasis için MHC içindeki *PSORS1*'in en güçlü duyarlılık lokusu, *HLA-Cw6*'nın ise birincil ilişkili alel olduğu düşünülmektedir (25). Gerçekleştirilen GWAS çalışmaları ile MHC genleri dışında IL-23/Th17 yollarında yer alan genler, NF-κB sinyal yollarında yer alan genler ve epidermal farklılaşma genlerinin psoriasisle ilişkilendirilmesi, bu genlerin patogeneze de yer aldığını gösterir niteliktedir (1). Son yıllarda deri ve immün sisteme etki eden *IL36RN* ve *CARD14* genlerinin mutasyona uğramasının bağımsız olarak psoriasis tetikleyebileceği düşünülmektedir (12).

Epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA ekspresyonunun gen ekspresyonu ve kromatin yeniden modellemesinde değişikliğe neden olması nedeniyle, çevresel faktörlerin bu yollarla psoriasis tetikleyebileceği düşünülmektedir (26).

2.2. Psoriasis Patogenezi

19. yüzyılda psoriasis anormal keratinosit düzenlenmesi ya da inflamatuvar kaynaklı bir süreç olduğu düşünülmekteyken hücrel immünoloji tekniklerinin gelişmesi ile 1970lerde

beyaz kan hücrelerinin psoriasiste önemli bir rolü olduğu anlaşılmıştır. 1980lerden itibaren çalışmalarda T hücelere odaklanılmış, psoriatik lezyonlarda T hücrelerin varlığı, fonksiyonel olarak önemi ve hastalarda T hücre aktivasyon moleküllerinin serumda arttığı gösterilmiştir (27).

Bazı majör histokompatibilite kompleksi genlerinin psoriasis ile ilişkisi, psoriatik plakların gelişiminin erken dönemlerinde T hücre birikimi ve aktivasyonu ile sitokin salınmasını inhibe eden siklosporine alınan hızlı yanıt, psoriasis patogenezinde inflamatuvar hücrelerin ve özellikle T hücrelerin önemli rol oynadığını gösteren kanıtlardandır. Bu nedenle çalışmalar psoriatik epidermisteki T hücre birikimi ve psoriasis patogenezinde T hücrelerin rolünü araştırmaya odaklanmıştır (28).

2.2.1. İmmün Sistem

Psoriasis, immün sistem aracılı, organ spesifik (deri ya da deri ve eklemler) inflamatuvar hastalık olarak tanımlanmaktadır (23). İmmün sistemde görev alan pek çok hücre ve molekül, psoriasis patogenezinde etkilidir. Keratinositler ve immün sistem hücrelerinden T hücreler hastalık patogenezinin temelini oluşturmaktadır (12). T hücreler, psoriasiste gözlenen derideki keratinosit birikiminde başlıca görev almaktadır ve hastalık sürecinin T hücreler tarafından tetiklenen keratinositlerin bölünerek çoğalmasıyla devam ettiği bilinmektedir (12, 23).

Psoriatik deri lezyonlarında doğuştan bağışıklık hücreleri olan nötrofiller, dendritik AP hücreler ve NKT hücreler ve kazanılmış bağışıklık hücrelerinden T hücreler, inflamatuvar infiltrat ile bir arada bulunmaktadır (23). Normal deride dermis tabakasında az miktarda T hücre ve dendritik hücre bulunabilirken, bu hücreler epidermis tabakasında bulunmamaktadır. Psoriatik lezyonlarda bu hücreler belirgin şekilde artarak epidermis tabakasına göç etmektedir. Epiderminin alt hücre tabakasıyla sınırlanmış dendritik hücreler psoriatik epidermisi infiltre ederken, nötrofiller kornifiye epidermiste küçük agregatlar halinde toplanmaktadır (29). Bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonu patogenezin anahtarı olarak değil, daha çok aşırı çoğalan keratinositlerin bir sonucu olarak görülmektedir (30).

Psoriatik deride iki T hücre sınıfının da (CD4+ Th hücreler ve CD8+ sitotoksik hücreler) artmış olarak bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (30). T hücre tiplerinin psoriasisteki yeri Tablo 1’de özetlenmiştir. Bu hücreler, psoriasiste hastalığın aktivitesini arttırıcı etki

göstermektedir. İnflamatuvar miyeloid dendritik hücrelerden salınan IL-23 ve IL-12, psoriatik sitokinlerin (IL-17, interferon- γ , tümör nekrozis faktör- α ve IL-22) yüksek miktarda üretiminde görevli olan IL-17-üreten T hücre, yardımcı T hücre (Th) 1 ve Th22 hücrelerin aktive edilmesine yol açmaktadır (31).

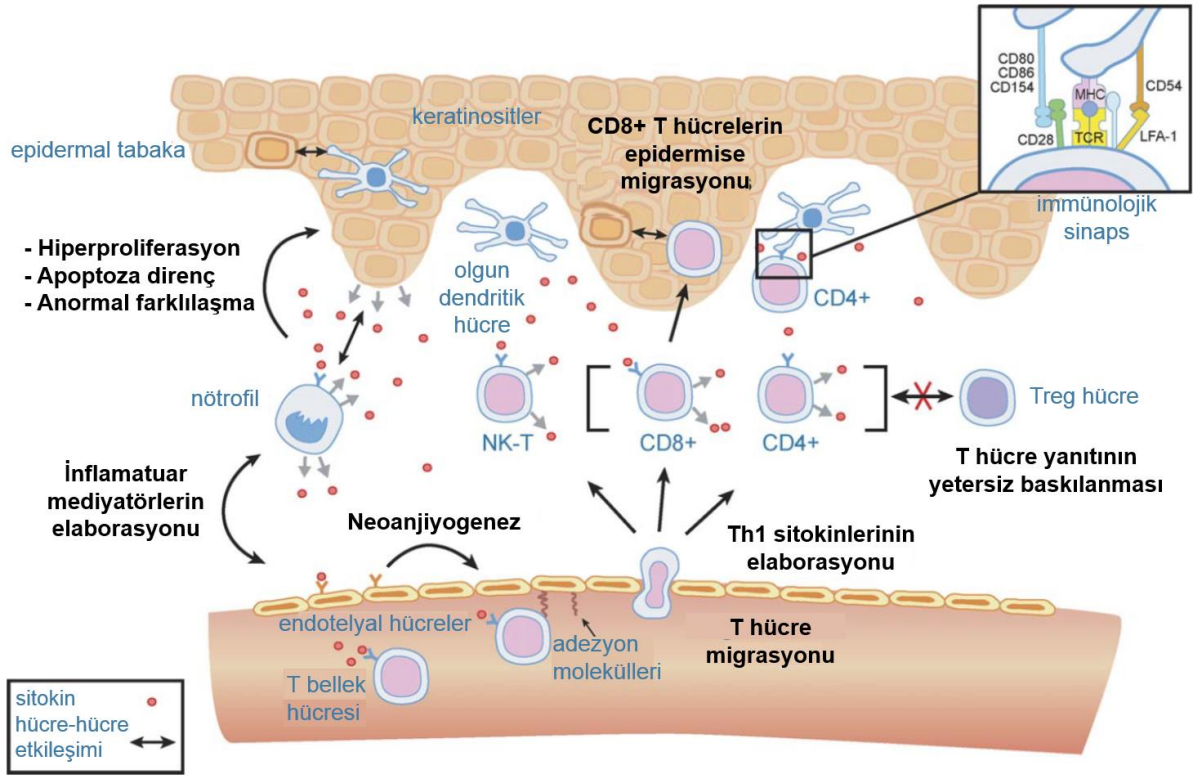
Tablo 1. T hücre tiplerinin psoriasisteki yeri (23).

T hücre alt grubu	Psoriasisteki yeri
CD4 ⁺ T hücre α/β (konvansiyonel yardımcı T hücreler)	Th1 sitokinlerinin (IL-2, IFN- γ , TNF- α) üretilmesi ve inflamasyonun sürdürülmesi
CD8 ⁺ T hücre α/β (konvansiyonel sitotoksik T hücreler)	Epidermise göç, Th1 sitokinlerinin üretilmesi ve keratinosit hiperplazisi
NK T hücreler, TCR α/β (NK T lenfosit) (çift negatif ya da CD ⁺ NKT hücreler)	Keratinosit glikolipidlerinin tanınması, IFN- γ üretilmesi ve Th1 inflamasyonu
CD4 ⁺ CD25 ⁺ , TCR α/β (regülatör T hücreler)	Psoriasisli hastalarda deri ve kandaki baskılama işlevinde eksiklik

IFN: İnterferon; IL: interlökin; NK: natural killer; TCR: T hücre reseptörü; Th1: yardımcı T hücre 1; TNF: tümör nekroz faktörü.

Deri lezyonlarında ve kandaki Treg hücrelerin baskılayıcı aktivitesinin yetersiz olması nedeniyle T hücrelerin aşırı çoğalması ve bu hücrelerdeki sitokin ve kemokin üretimindeki artış kontrol altına alınamamaktadır. Sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin aşırı üretilmesi, epidermal keratinositlerin aşırı çoğalmasına, hücrelerde anormal farklılaşmaya ve apoptotik sinyallere karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Bu epidermal hiperproliferasyon, T hücrelerde üretilen inflamatuvar sitokinler tarafından yönlendirilen neoanjiyogenez ile desteklenmektedir (23). Psoriasis patogenezindeki önemli olayların şematik özeti Şekil 1’de gösterilmiştir.

T hücrelerinin psoriasisteki kritik rolü, T hücre baskılayıcı ajanlar kullanıldığında hastalık durumunda iyileşmenin gözlemlenmesiyle keşfedilmiştir (30). Bu nedenle T hücre aktivasyonunun baskılanması, IL-10 gibi düzenleyici sitokinlerin kullanımı ile Th1 ve Th2 hücreler arasında dengenin sağlanması ve inflamatuvar sitokinlerin baskılanması gibi çeşitli yöntemler tedavide kullanılmak üzere araştırılmaktadır (32).



Şekil 1. Psoriasis patogenezindeki önemli olayların şematik özeti (23).

2.2.2. Treg Hücreler

Treg hücreler, aşırı ve anormal immün yanıtı bastırarak immün tolerans ve homeostazın korunmasını sağlayan özelleşmiş CD4+ T hücre alt grubudur (33). İmmün sistemde düzenleyici fonksiyonu olan bu hücreler, efektör T hücrelerin etkinliklerini baskılamakla görevlidir (34). Treg hücreler ile efektör T hücreler arasındaki denge, antijen uyarımı her iki popülasyonu da aktive ettiğinden dinamik olarak sürdürülmektedir (35).

Treg hücreler, genellikle direkt olarak T hücreleri ve/veya dendritik hücreleri baskılamaktadır. Bu sürecin üç farklı düzenleyici yol olan sitokinler, hücre-hücre etkileşimiyle direkt baskılama ve büyüme faktörleri için rekabet aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (34). Treg hücre aracılı immün yanıtın baskılanmasında çeşitli sinyal mekanizmaları ve TGF- β , IL-10, IL-35 gibi sitokinlerin üretimi önemlidir (36).

Treg hücreler genel olarak CD4, CD25 ve transkripsiyon faktörü olan FOXP3 ekspresyonu ile karakterizedir (36). Bu hücreler, total T hücrelerin %1-3'ünü (37), dolaşımdaki CD4+ hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (23). Treg hücrelerinin çoğunluğu timusta

gelişirken, bazıları periferik lenf düğümlerindeki CD4⁺ T hücrelerin indüklenmesi ile gelişmektedir (23, 33). Bu özelliklerinden dolayı Treg hücreler kökeni ve FOXP3 ekspresyon durumuna göre gruplandırılmaktadır (Tablo 2). Bunlara ek olarak periferik kanda FOXP3^{high} CD45RA⁻ CD25^{high}, FOXP3^{low} CD45RA⁺ CD25^{low} ve FOXP3^{low} CD45RA⁻ CD25^{low} olmak üzere üç ayrı FOXP3 eksprese eden CD4⁺ T hücre olduğu bilinmektedir. Hücrelerdeki FOXP3 ekspresyonu ile Treg hücrelerin baskılama özellikleri doğru orantılıdır (2).

Tablo 2. İmmün baskılayıcı Treg popülasyonları ve özellikleri (38).

Hücre tipi	Fenotip	Baskılama mekanizması
Timusta üretilmiş doğal Treg hücreler (nTreg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	Hücre-hücre teması bağımlı (CTLA-4/CD80/CD86) Sitokin bağımlı (IL-10, TGF- β)
Periferik indüklenmiş Treg hücreler (iTreg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	Hücre-hücre teması bağımlı (CTLA-4/CD80/CD86) Sitokin bağımlı (IL-10, TGF- β)
Tr1 hücreler	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ IL-10 ^{high}	Sitokin aracılı (IL-10)
Th3 hücreler	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ TGF- β ^{high}	Sitokin aracılı (IL-10, TGF- β)
iTreg-35	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ IL-35(+)	Sitokin aracılı (IL-35)

Normalde insan derisinde bulunan T hücrelerin %5-10'u, Treg hücrelerden oluşmaktadır (39). Bu hücreler, immünolojik yanıtı baskılamada ve derideki immünolojik dengenin korunmasında görevlidir. Bu nedenle Treg hücrelerin sayı ve fonksiyon değişiklikleri ile Treg hücre aracılı baskılamaya karşı dirençli efektör T hücrelerin gelişmesi, T hücre düzenlenmesinde bozukluğa yol açabilir (34). Literatürde psoriasislilerde deri ve dolaşımdaki Treg hücre sayısının arttığını ya da azaldığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların yanı sıra Treg sayısında bir değişiklik olmamasına rağmen baskılama aktivitesinde azalma olduğu da gösterilmiştir. Ancak Treg hücrelerdeki fonksiyon bozukluğunun nedenleri hâlâ bilinmemektedir (39). Bunlara ek olarak psoriatik lezyonlarda FOXP3⁺ Treg hücrelerin

IL-17 eksprese eden hücelere dönüşmesi ve bu hücelerin patojenik IL-17 üreticileri olması ile inflamasyonun sürdürölmesinin Treg ve efektör T hüceler arasındaki dengeyi bozabileceğı düşünölmektedir (40). Treg hücelerin psoriasis patogenezindeki rolü ile ilgili kesin bir sonuca varılamamış olup bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerektiğine dikkat çekilmektedir (34). Treg hücre biyolojisinin ayrıntılı olarak incelenmesi ve ortaya koyulmasıyla yakın gelecekte psoriasis gibi immünolojik bozukluklar için spesifik ve güvenli tedavi yöntemlerinin geliştirilebileceğı düşünölmektedir (35).

2.2.3. FOXP3

Treg hücelerde yüksek düzeyde eksprese edilen, Treg hücre oluşumu ve işlevi için en önemli düzenleyici transkripsiyon faktörü olan FOXP3, Treg hüceler için moleküler belirteç ve hücre soyuna özgü bir faktör olarak kabul edilmektedir (2, 34). CD4⁺ CD25⁺ T hücelerin 2000lerin başında karakterize edilmesinin ardından ilerleyen yıllarda FOXP3'ün Treg hüceler için spesifik bir belirteç olduğı bulunmuştur. Self tolerans ve immün homeostazın düzenlenmesi için vazgeçilmez olan Treg hücelerin *FOXP3* mutasyonu gibi nedenlerle fonksiyon bozukluğuna uğramasının, ölümcül otoimmünite, immünopatoloji ve alerjiye neden olabileceğı bilinmektedir (41). nTreg hücelerin timik farklılaşması için esas olan FOXP3, Treg hücelerin baskılayıcı aktivitesi için gerekli olan bir dizi gen ile Treg hücelerin proliferatif ve metabolik olarak uygunluğunu düzenlerken alternatif T hücre farklılaşma yollarını baskılamaktadır (34). FOXP3'ün, Treg ve epitel hücelerdeki hedef genler için transkripsiyonel aktive edici ya da baskılayıcı görevinin önemli olduğı bilinse de bu düzenlemenin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (42).

FOXP3 ekspresyonu, Treg hücelerin baskılayıcı işlevleri için gereklidir. FOXP3 eksikliğinde Treg hücre kaynaklı baskılamamanın ortadan kalktığı çeşitli çalışmalar ile kanıtlanmıştır. FOXP3'ün spesifik olarak Treg hücelerde eksprese edildiğı ve Treg hücre gelişimi için gerekli olduğı, *FOXP3*⁺ ve *FOXP3*⁻ fareler üzerinde yapılan deneyler ile gösterilmiştir. Çalışmada FOXP3'ün Treg hücelerin gelişimi ve bu hüceler tarafından efektör T hüceler üzerine baskılayıcı etkinin gerçekleştirilebilmesi için yeterli olduğı belirtilerek, FOXP3'ün Treg hücelere özgü bir belirteç olduğı öne sürölmüştür (43). Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, naıve T hücelerde FOXP3 ekspresyonu sağlandığında bu hücelerin Treg hücelere dönüştüğı gösterilmiştir. Bu bilgiye dayanarak *FOXP3*'ün Treg

hücre gelişimi için anahtar gen olduğu öne sürülmüştür. *FOXP3* transdüksiyonu ile T hücrelerin Treg hücrelere dönüşmesi sayesinde otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların tedavisi ve transplantasyon toleransında terapötik olarak kullanılabilmesi için çalışılması gereken bir konu olduğuna dikkat çekilmiştir (44). *FOXP3* mutasyonuna bağlı olarak regülatör ve efektör T hücre fonksiyonlarındaki bozuklukların incelendiği hasta çalışmasında, IPEX sendromu (İmmün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı geçen) olan hastalarda *FOXP3* ekspresyonunun yokluğunda immün baskılanmanın azaldığı gösterilmiştir. Çalışmada hastalardaki Treg aktivasyon ve fonksiyon bozukluğunun, regülatör ve efektör T hücrelerdeki aktivasyon-yanıt kusurlarının kombinasyonu olarak ortaya çıktığı hipotezi öne sürülmüştür (45).

Epigenetik faktörlerden biri olan DNA metilasyonunun psoriasis patogeneğinde etkili olduğu düşünülmektedir. DNA metilasyonu, hücrel farklılaşma, genomdaki kararsızlık, imprinting ve X kromozomunun inaktivasyonu gibi biyolojik düzenlemelerden sorumlu epigenetik susturma mekanizmasıdır. Metilasyon, sitozinlerin 5'-karbon uçlarına DNA metiltransferazlarca metil grubu eklenmesi ile gerçekleşmektedir (46). Çalışmaların birinde psoriasisli hastaların doku ve periferik kan mononükleer hücrelerindeki metilasyon düzeyleri sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca hasta örnekleri ile PAŞİ skorları arasında da pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir (47). Anti TNF- α (adalimumab) ile tedavi ve topikal tedavinin sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışma sonucunda adalimumab kullanımının *FOXP3*/CD4 T hücre oranının artışı sağladığı görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkılarak metilasyon düzeylerinin ilaç kullanımına bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir (48).

X kromozomunda bulunan *FOXP3* geni, korunmuş promoter bölgesinin yanı sıra korunmuş üç proksimal intronik bölge (conserved noncoding DNA sequence; CNS1, CNS2, CNS3) ile üç kodlanmayan ve 11 kodlanan ekzondan oluşmaktadır (49-51). Genomda sınırlı sayıda Treg hücreye özgü hipometile bölge bulunmaktadır. *FOXP3*, esas olarak gen baskılama görevindeyken bu bölgelerde gen aktivasyonunu sağlamaktadır (3). *FOXP3* genindeki yüksek oranda korunmuş, kodlanmayan bölgeler olan promoter, TGF β -duyarlı element ve TSDR bölgelerindeki epigenetik modifikasyonların, *FOXP3* transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli olduğu bilinmektedir (52). *FOXP3* ekspresyonunun kararlılığı özellikle, TSDR ya da CNS2 olarak bilinen, *FOXP3* gen bölgesindeki CpG'ce zengin, korunmuş intronik bölgelerin

metilasyonu ile ilişkilidir (4). Enhancer bölge olan TSDR'deki hipometilasyon, Treg hücre soy özellikleri için önemlidir (3).

Treg spesifik demetilasyon paterni, Treg hücrelerin uzun süreli kararlılığı ve fonksiyonu ile yüksek düzeyde uyumlu olduğundan, bu epigenetik paternin FOXP3 ekspresyonu ile birlikte Treg hücrelerin saptanması için güvenilir bir belirteç olduğu düşünülmektedir (33). TSDR metilasyon düzeyinin değiştirilmesinin, FOXP3 ekspresyonunun aktivite ve kararlılığına etki ettiği *in vitro* deneyler ile gösterilmiştir, FOXP3 ekspresyonunun kararlılığı TSDR demetilasyonu ile ilişkili bulunmuştur. TSDR metile durumda ise FOXP3'ün transkripsiyonel aktivitesinde azalma gözlenmiştir (5). TSDR enhancer aktivitesi, demetilasyon durumuna bağlı olarak değişmektedir. Demetilasyon varlığında transkripsiyon faktörlerinin tanıma ve bağlanması sağlanarak FOXP3 transkripsiyonunda artırıcı etki görülmektedir (53). Treg hücrelerde FOXP3 TSDR metile durumda değil iken, regülatör olmayan T hücreler de dahil olmak üzere diğer tüm kan hücrelerinde metile durumdadır (54).

Literatürde psoriasisli hastalarda FOXP3 TSDR metilasyonunun incelendiği tek çalışma metilasyonun psoriasis patogenezinde etkili olduğunu göstermektedir. Çalışma ile periferik kanda FOXP3 TSDR metilasyonunun otoimmün hastalıklara (sistemik lupus eritematozus ve psoriasis) etkisi gösterilmiştir. Yapılan çalışmada psoriasisli hastaların FOXP3 TSDR metilasyon düzeyleri sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur. FOXP3 TSDR metilasyon durumunun saptanması için kullanılan HRM-PCR yönteminin, farklı hastalıklarda periferik kandaki Treg hücre düzeylerini yansıtan güvenilir ve kolay uygulanabilir bir belirteç olabileceği önerilmiştir. Çalışmada otoimmün hastalıklarda demetilasyona yönelik kullanılacak tedavilerin yanıtının, FOXP3 TSDR metilasyonu ile izlenebilmesinin faydalı olacağı ön görülmüştür. Çalışmada sadece kadın hastaların kan örneklerinin kullanılması ve hastalık şiddeti ile ilgili bir bilgi bulunmaması bir eksikliktir (6).

2.2.4. İnterlökinler

Dışarıdan gelen uyarılara yanıt olarak immün sistem hücreleri tarafından salgılanan küçük çözümlü proteinler sitokin olarak adlandırılmaktadır. Sitokin sinyali, hücrelerin fonksiyonel olarak yardımcı, sitotoksik, hafıza veya antikor salgılama potansiyeline sahip uygun hücre soylarına farklılaşması için kritik öneme sahiptir. Sitokinler, yapılarına ve reseptör kompozisyonuna bağlı olarak birkaç farklı ailenin üyelerinden oluşmaktadır. Bunlar

hematopoietinler, interlökinler, interferonlar, TNF ailesi, immünoglobülin süpergen ailesi, kemokinler ve adipokinlerdir (55).

Bir çeşit sitokin olan interlökinler, immün hücrelerde üretilip hücre ve dokularda çeşitli yanıtlar ortaya çıkaran büyük bir immünomodülatör protein grubudur. İnterlökinler, otokrin ya da parakrin olarak hedef hücrelerin yüzeyinde bulunan yüksek afiniteli reseptörlere bağlanırlar (56). Bu bağlanma ile hücrelerde aktivasyon, çoğalma, farklılaşma, immün reaksiyonların düzenlenmesi, hücre büyümesinin baskılanması, diğer sitokinlerin üretimini indüklenmesi ya da baskılanması gibi çeşitli olayları başlatırlar. İnterlökinler bu özelliklerine göre antiinflamatuvar ve proinflamatuvar olarak gruplandırılırlar. Bu iki grup arasındaki dengenin bozulması immün sistemin işlevini düzgün bir şekilde yerine getirememesine neden olmaktadır (57).

Literatürdeki pek çok çalışmada psoriatik lezyonlarda çoğu inflamatuvar interlökinin artmış olarak bulunduğu ve bu interlökinlerin serum konsantrasyonlarının psoriasis şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hangi interlökinlerin hastalık sürecinde önemli rol oynadığının anlaşılması ile potansiyel tedavi hedeflerinin belirlenebileceği düşünülmektedir (58).

2.2.4.1. IL-17

Th17 hücreler tarafından üretilen, yapıcı benzer altı proteinden (IL-17A – IL-17F) oluşan IL-17 ailesi, hücre dışı patojenlere karşı T hücre aracılı immün yanıtta sorumludur (59). IL-17'nin en iyi bilinen işlevi bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı koruma sağlamasıdır (60). Genellikle IL-17 olarak geçen IL-17A en çok CD4⁺ Th17 hücrelerde ve daha az olarak nötrofiller, eozinofiller ve CD8⁺ T hücrelerde üretilmektedir (59). Bu hücrelerin, IL-1 β ve IL-23 gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinler ile uyarılması aracılığıyla IL-17 sekresyonu gerçekleşmektedir (61). 35 kDa ağırlığındaki bu sitokin, epitelyal/endotelyal hücreler, fibroblastlar, osteoblastlar, monositler ve makrofajları hedef alarak proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve metalloproteinazların indüksiyonunu sağlamaktadır (62). IL-17 reseptörleri esas olarak keratinositlerin yüzeylerinde eksprese olduğundan bu hücreler IL-17A için temel hedeflerdendir. IL-17A, reseptör kompleksine bağlandığında transkripsiyon faktörü NF- κ B'yi aktive ederek proinflamatuvar genlerin ekspresyonuna yönlendirmektedir (63).

Son dönemde yapılan çalışmalarda psoriasis patogenezi üzerine etkisinin fazla olduğu düşünülen inflamatuvar özellikteki IL-17, 22 ve 23 üzerinde odaklanılmıştır (31). Bu üç sitokinin psoriasis varlığında ve hastalık şiddetine bağlı olarak arttığını belirten çalışmalar bulunmaktadır (7, 8). Bunlardan IL-17'yi ve IL-23'ü hedef alan tedavinin psoriasis şiddetini düşürücü etkisi gösterilmiştir (64). IL-17'nin psoriatik lezyonlarda aynı zamanda IL-36γ'yı indüklemesi ile keratinositlerde proliferatif yanıtı yol açabileceği ve bu nedenle IL-17'nin psoriasisde keratinositlerin en önemli patojen uyarıcısı olduğu düşünülmektedir (31).

Literatürde psoriasislilerde IL-17 düzeylerinin incelendiği pek çok çalışma bulunma olup bu çalışmalardan çok çeşitli veriler elde edilmiştir. Çalışmaların büyük çoğunluğunda IL-17A'nın psoriatik lezyonda fazla bulunduğu sonucu elde edilmesi nedeniyle IL-17A'nın, lokal bir etki göstererek keratinositlerdeki kemokin ekspresyonunu arttırmasıyla epidermal patolojinin sürdürülmesine neden olduğu düşünülmektedir (65). IL-17 serum düzeyleri incelendiğinde çoğu çalışmada lezyon sonuçlarına benzer olarak psoriasislilerde yüksek ve PAŞİ skorları ile korele bulunmuştur (66, 67). Psoriasis tedavisinde IL-17 sinyal yolağını hedef alan yeni terapötiklerin denendiği klinik çalışmalar artarak devam etmektedir (68). Orta-şiddetli psoriasis grubunda gerçekleştirilen klinik çalışmalardan yola çıkılarak IL-17 yolağı inhibitörlerinin psoriasis tedavisi için umut verici sonuçlar ortaya koyabileceği düşünülmektedir (65).

2.2.4.2. IL-36

IL-36, keratinositler dahil epitelyal hücrelerde üretilen IL-1 ailesine dahil edilen sitokinlerdendir (69). IL-36 genel olarak, aynı biyolojik aktiviteye sahip üç ayrı molekül olan IL-36α (IL-1F6), IL-36β (IL-1F8) ve IL-36γ (IL-1F9) için kullanılmaktadır (70). Keratinositler, plazma hücreleri, kolonik fibroblastlar, T hücreler ve monositlerde üretildiği düşünülen IL-36'nın hedef hücreleri olarak sinoviyal fibroblastlar, CD4+ T hücreler ve dendritik hücreler gösterilmektedir (71). 18 kDa ağırlığındaki bu proinflamatuvar sitokin deride yüksek düzeyde eksprese edilmektedir (10). IL-36'nın esas olarak keratinositler ve miyeloid dendritik hücreler üzerinden etki gösterdiği, T hücrelerde IL-36 reseptör ekspresyonu görülmemesi nedeniyle dolaylı yoldan T hücre aktivasyonu ile derideki inflamasyonun artmasına neden olduğu düşünülmektedir (72). IL-36'nın derideki inflamasyonun düzenlenmesinde önemli olmasının yanı sıra akciğer ve beyindeki inflamasyonda da düzenleyici işlevinin olabileceği

düşünülmektedir (9). IL-36'nın, NF- κ B ve MAP kinaz aktivasyonu ile diğer IL-1 ailesi üyelerine benzer sinyal yolları aracılığıyla hedef hücrelerdeki hücrel aktiviteyi, sitokin ve kemokin sekresyonunu ve çeşitli immün hücrelerin aktivasyonunu indüklediği düşünülmektedir (73).

IL-36'nın psoriatik deri lezyonlarında varlığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (70). IL-36 izoformlarının gen ekspresyon düzeyleri psoriatik deride normal deriye göre yüksek bulunmakla birlikte sadece IL-36 γ hem lezyonel olmayan hem de lezyonel psoriatik deride artış göstermektedir; lezyonel psoriatik deride artış daha fazladır (69). IL36'nın IL-17, 22 ve 23'ün salınmasını artırıcı etki gösterdiği ve IL-36 izoformları ile reseptörlerinin psoriasiste yüksek düzeyde eksprese olması nedeniyle psoriasis patogeneğinde önemli olduğu düşünülmektedir (10). IL-36'nın generalize püstüler psoriasiste inflamatuvar yanıt gelişmesi ve bu yanıtın düzenlenmesinde baskın olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak psoriasis alt tiplerine yönelik tedavi türleri geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir (74). IL-36, tedavi için potansiyel hedef olan sitokinler arasında görülmekte ve bu amaçla yapılan çalışmalar devam etmektedir (58).

2.2.4.3. IL-10

Keratinositler, Treg hücreler, makrofajlar ve monositler gibi farklı hücre popülasyonları tarafından üretilen IL-10, proinflamatuvar sitokinlerin sentezini baskılama yeteneğindeki antiinflamatuvar sitokindir (75). 20.5 kDa ağırlığındaki bu sitokin makrofajlar, monositler, T ve B hücreler, NK hücreler, mast hücreleri, dendritik hücreler ve granülositleri hedef alarak immün baskılama görevini yerine getirmektedir (62). IL-10 hedef hücredeki reseptör kompleksine bağlandıktan sonra JAK-STAT yolağını aktive ederek seçici olarak gen transkripsiyonunun aktivasyonu ya da inhibisyonunu sağlar. IL-10, sitokinler üzerinde immün baskılayıcı etkiye sahip olduğundan otoimmün hastalıkların tedavisi için potansiyel hedef olarak görülmektedir (76).

Yapılan çalışmalarda psoriasislilerdeki IL-10 düzeyleri ile ilgili çok çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmaların çoğunda IL-10 miktarının psoriatik lezyonlarda normal dokuya göre daha az bulunması nedeniyle psoriasis tedavisinde IL-10 etkinliğinin değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir (77). IL-10'un serumdaki miktarının incelendiği çalışmaların çoğunda psoriasisliler ile sağlıklı kişiler arasında anlamlı fark bulunmamıştır (75).

2.2.4.4. IL-35

IL-12 ailesinden olan IL-35, *EBI3* (Epstein-Barr virus-induced gene 3) tarafından kodlanan IL-27 reseptörünün β alt birimi ve *IL12A* tarafından kodlanan IL-12 reseptörünün $\alpha/p35$ alt biriminden oluşan heterodimerik bir sitokindir (78). 60 kDa ağırlığındaki bu sitokin başlıca Treg hücrelerde üretilip çeşitli T hücre alt gruplarını hedef alarak etki göstermektedir (62). Son yıllarda yapılan çalışmalar Treg hücreler dışında Breg ve CD8⁺ Treg hücrelerde de IL-35'in üretildiğini göstermektedir (55). IL-35'in önemli işlevleri Treg hücrelerin proliferasyonu, Th17 hücrelerin işlevinin baskılanması ve inflamatuvar yanıtın baskılanmasıdır (62). IL-35'in, Th17 hücrelerin fonksiyonu ile IL-17 salınmasının azalmasını sağlayarak Treg hücrelerin immün baskılayıcı etkisine büyük ölçüde katkı sağladığı bilinmektedir. Bu etkilerin IL-10 salınması ile düzenlendiği düşünülmektedir (10). IL-35, Treg hücreleri uyararak IL-35 üreten Treg hücrelerin oluşumunu sağlayabilir. IL-35 ile uyarılmış Treg hücreler, IL-10 ile uyarılmış Treg hücelere benzer olarak immün baskılayıcı etki göstermektedir (79). Diğer IL-12 ailesi üyelerinde olduğu gibi IL-35'in, reseptörüne bağlanmasının ardından JAK-STAT yolağını aktive ederek gen ekspresyonu ve hücreyel yanıtı başlattığı düşünülmektedir (80). Bu işlevlerinden dolayı antiinflamatuvar özellikteki IL-35, Treg aktivasyonunun düzenlenmesini sağladığından otoimmün hastalıkların tedavisi için yeni bir potansiyel hedef olarak görülmektedir (11).

Otoimmün bir hastalık olan romatoid artritli (RA) hasta örnekleri incelendiğinde aktif RA hastalarında serum IL-35 düzeyleri ile Treg hücrelerin sayısı düşük bulunmuştur. Bu çalışma ile IL-35'in, RA patogenezindeki periferik immün yanıt sırasında görülen T hücre aktivasyonunun, Treg-aracılı olarak baskılanmasındaki rolü gösterilmiştir (81). Treg hücrelerin psoriasisdeki rolü göz önüne alındığında, IL-35'in psoriasis için önemli bir düzenleyici olabileceği düşünülse de literatürde bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Psoriasis serum IL-35 düzeylerinin incelendiği çalışmaların birinde IL-35 düzeyin saptanamamışken (82), diğerinde sağlıklı kişiler ile psoriasisliler arasında anlamlı fark bulunmamıştır (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma tanımlayıcı bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Haziran 2016 – Ocak 2018 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı tarafından ortaklaşa yürütüldü. Araştırma kapsamında yapılan deneyler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grubu

Çalışmaya Aralık 2016 – Aralık 2017 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Polikliniği'ne başvuran 18 yaşından büyük psoriasisli hastalar (n=38) ve sağlıklı kişiler (n=20) dahil edildi. Psoriasis dışında önemli bir dermatolojik hastalığı bulunanlar çalışmaya dahil edilmedi. Tedavi olmayan hastaların ilk kan alımından önceki bir ay boyunca sistemik tedavi görmemiş, 15 gün boyunca topikal tedavi görmemiş olmasına dikkat edildi. Sağlıklı kontrol grubu, çeşitli nedenlerle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Polikliniği'ne başvuran, sistemik etkilenimi olan bir hastalığı ve ilaç kullanımı olmayan kişilerden oluştu.

3.4. Çalışma Materyali

Aralık 2016 – Aralık 2017 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Polikliniği'ne başvuran psoriasisli hastalar ve sağlıklı kontrol grubundan rutin kan alımına ek olarak 9 mL kan alındı. Araştırmada hasta ve kontrol grubundan alınan kanlardan elde edilen plazma, DNA ve RNA örnekleri çalışma materyali olarak kullanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

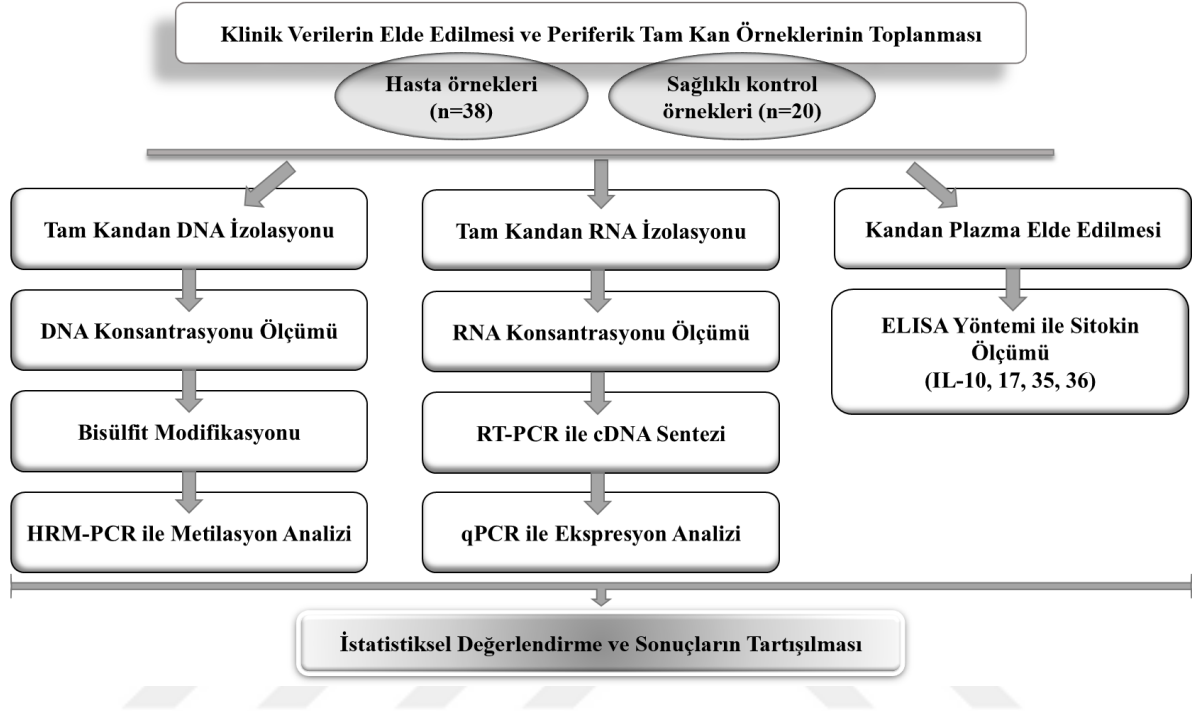
Bağımlı değişkenler: *FOXP3* TSDR metilasyon düzeyi, *FOXP3* ekspresyon düzeyi, sitokin düzeyleri.

Bağımsız değişkenler: Psoriasis tipi, tedavi durumu, PAŞİ skoru.

Kontrol değişkenleri: Yaş ve cinsiyet.

3.6. Veri Toplama Araçları

Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması Şekil 2’de verilmektedir.



Şekil 2. Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması

3.6.1. Klinik Verilerin Elde Edilmesi ve Periferik Tam Kan Örneklerinin Toplanması

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Polikliniği’ne başvuran 18 yaşından büyük, psoriasisli hastalar ve sağlıklı kontrol grubu olarak belirlenen Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Polikliniği’ne başvuran kişiler arasında sistemik etkilenimi olan bir hastalığı ve ilaç kullanımı olmayan kişiler, bilgilendirilmiş gönüllü oluru alınarak çalışmaya dahil edildi. Psoriasis dışında önemli bir dermatolojik hastalığı bulunanlar çalışmaya dahil edilmedi. Hasta kişi sayısı n=38, sağlıklı kişi sayısı n=20’dir. Hastalık alt gruplarına göre kişi dağılımı aşağıdaki gibidir:

- Kronik plak psoriasis, n=36
- Palmoplantar püstüler psoriasis, n=2

Hastaların rutin kontrolleri sırasında klinisyen hekimlerce hastalara ait veriler (demografik veriler, psoriasis alt gruplarının bilgisi, tedavi durumu, PAŞİ skorları gibi) değerlendirildi. Hastalar, tedavi olan (n=16) ve olmayan (n=22) şeklinde iki gruba ayrıldı. Tedavi olmayan hastaların kan alımından önceki bir ay boyunca sistemik tedavi görmemiş, 15 gün boyunca topikal tedavi görmemiş olmasına dikkat edildi.

Tedavi grupları aşağıdaki gibidir:

- Topikal tedavi: kortikosteroid (klobetazol propiyonat), n=12
- Asitretin, n=1
- Siklosporin, n=1
- Topikal tedavi: kortikosteroid (klobetazol propiyonat)+Asitretin, n=1
- Topikal tedavi: kortikosteroid (klobetazol propiyonat)+Metotreksat, n=1

Örnekler, onam formu imzalatılarak hasta ve kontrollerin bilgisi ve izni doğrultusunda toplandı (EK-1 ve EK-2).

Kontrol ve hastalardan rutin kan alımına ek olarak 9 mL kan alındı. Kanlar EDTA'lı kan tüplerine alındıktan sonra tüpler yavaşça altı-yedi kez alt üst edildi. Örnekler bekletilmeden 1000 x g'de 15 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri porsiyonlanarak -80 °C'de saklandı.

3.6.2. *FOXP3* TSDR Metilasyon Analizi

3.6.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu

Elde edilen kan örneklerindeki *FOXP3* TSDR metilasyon düzeylerinin değerlendirilebilmesi için öncelikle DNA izolasyonu yapıldı. Tam kandan DNA izolasyonu, GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit protokolü aşağıdaki gibi uygulandı:

- 1.5 mL'lik tüpteki 200 µL kan örneğinin üzerine 20 µL proteinaz K solüsyonu ve 450 µL lizis solüsyonu eklendi, karışım vortekslendi. Tüp 56 °C'deki ısı bloğunda 30 dk bekletildi. Bu süre boyunca karışım, aralıklarla 10 kez vortekslendi.
- Karışıma 200 µL %100 etanol eklendi ve karışım vortekslendi.
- Hazırlanan lizat, toplama tüpünün içindeki kolona aktarıldı ve kolon 6000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

- Kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 650 µL birinci yıkama tamponu eklendi ve kolon 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi. Kolona 650 µL ikinci yıkama tamponu eklendi ve kolon 20000 x g'de 3 dk santrifüj edildi.
- Kolon, 1.5 mL tüpe yerleştirildi. Kolona 75 µL elüsyon tamponu eklendi ve kolon 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlandı ve elde edilen 150 µL'lik eluat -20 °C'de saklandı.

3.6.2.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bisülfıt modifikasyonundan önce DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenebilmesi için NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) cihazı ile ölçüm gerçekleştirildi. Cihaz DNA modunda 1 µL elüsyon tamponu ile kalibre edildikten sonra 1 µL örnek ile ölçüm gerçekleştirildi. 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okuma yapıldı ve konsantrasyon ng/µL olarak elde edildi. Örneğin saflığını belirlemede kullanılan 260/280 absorbans oranı 1.7 ile 1.9 değerleri arasında olan örnekler bisülfıt modifikasyonu için kullanıldı.

3.6.2.3. Bisülfıt Modifikasyonu

DNA metilasyon düzeyinin incelenebilmesi için bisülfıt modifikasyonu EpiJET Bisulfite Conversion Kit'i (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. Modifikasyon sonrası metillenmiş C değişime uğramazken, metillenmemiş C bazı U'ye dönüşmektedir. Bisülfıt modifikasyonu gerçekleştirilmiş örnekler PCR ile çoğaltıldığında reaksiyon sonunda metillenmiş C-T çiftleri bir değişime uğramazken, metillenmemiş C-T çiftleri A-T çiftlerine dönüşmüş olur (84).

Kullanılan kit protokol doğrultusunda uygulandı:

- Konsantrasyonları belirlenen örnekler 20 µL'de 400 ng DNA olacak şekilde nuclease-free su ile seyreltilip PCR tüpüne aktarıldı. Örneklerin üzerine 120 µL modifikasyon reaktifi eklendi.
- Tüpler termal döngü cihazına yerleştirildikten sonra 98 °C'de 10 dk, 60 °C'de 150 dk protokolü uygulandı.
- Toplama tüpüne yerleştirilmiş mikrokolona 400 µL bağlama tamponu eklendi. Termal döngü cihazından çıkarılan örnekler mikrokolona aktarıldı. Mikrokolon 12000 rpm'de 30

sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp mikrokolon toplama tüpüne geri yerleştirildi.

- Mikrokolona 200 µL yıkama tamponu eklendi ve mikrokolon 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp mikrokolon toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- Mikrokolona 200 µL desülfonasyon tamponu eklendi. Mikrokolon 20 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp mikrokolon toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- Mikrokolona 200 µL yıkama tamponu eklendi ve mikrokolon 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp mikrokolon toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- Mikrokolona 200 µL yıkama tamponu eklendi ve mikrokolon 12000 rpm'de 60 sn santrifüj edildi.
- Mikrokolon, 1.5 mL tüpe yerleştirildi. Mikrokolona 10 µL elüsyon tamponu eklendi ve 12000 rpm'de 60 sn santrifüj edildi. Elde edilen örnekler -20 °C'de saklandı.

3.6.2.4. HRM-PCR (High Resolution Melt-Polimerase Chain Reaction) ile Metilasyon Analizi

HRM-PCR yöntemi kullanılarak, bisülfite modifikasyonu uygulanmış örneklerdeki metilasyon düzeylerine ait veriler elde edildi. Yöntem baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlarının kırılmasına bağlı sıcaklık değişimlerine dayalı ölçüm yapmaktadır. Bisülfite modifikasyonu sonrası değişime uğramayan metile C-G baz çiftleri arasında üçlü hidrojen bağı varken, metile olmayan C-G baz çiftleri A-T baz çiftine dönüştüğü için aralarında ikili hidrojen bağı bulunmaktadır. Bu farka bağlı olarak metile örneklerin erime sıcaklıkları daha yüksek, metile olmayan örneklerin erime sıcaklıkları daha düşük çıkmaktadır (6).

PCR reaksiyonu için Luminaris Color HRM Master Mix (Thermo Scientific), Human FOXP3 Methylation Assay – ADS783'teki (EpigenDx) primer çifti (ADS783FP ve ADS783 RPB), bisülfite modifikasyonu gerçekleştirilmiş %100 metile ve %100 unmetile insan kontrol DNA örneklerini içeren EpiTect PCR Control DNA Set'i (QIAGEN) ve bisülfite modifikasyonu gerçekleştirilmiş DNA örnekleri kullanıldı. Liyofilize primerlere 180 µL nuclease-free su eklenerek 10 µM'lık solüsyonlar hazırlandı. 40 ng/µL konsantrasyonundaki bisülfite

modifikasyonu uygulanmış DNA örnekleri 1:8 oranında seyreltildi. 10 ng/μL konsantrasyonundaki metilasyon kontrolü DNA örnekleri 1:2 oranında seyreltildi. Örnekler ve kontrol DNA örnekleri 5 ng/μL konsantrasyonunda eşitlendi.

HRM-PCR reaksiyonu için Tablo 3'teki reaksiyon karışımı hazırlandı ve 10 μL'lik reaksiyon karışımı 0.1 mL hacimdeki dörtlü strip tüplerine pipetlendi. Negatif kontrol için nuclease-free su kullanıldı. Tüpler, kapakları kapatıldıktan sonra cihaza yerleştirildi. Rotor-Gene Q (QIAGEN) cihazı kullanılarak analiz gerçekleştirildi.

Tablo 3. HRM-PCR reaksiyon içeriği.

Kimyasal	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
Master Mix (2X)	5 μL	1X
Forward Primer (10 μM)	0.5 μL	0.5 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μL	0.5 μM
DNA Örneği (5 ng/μL)	4 μL	20 ng
Toplam	10 μL	

Analiz için 95 °C'de 10 dk ve (95 °C'de 10 sn, 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 20 sn) x45 döngü programı uygulandı. 95 °C'de 1 dk ve 40 °C'de 1 dk bekletildikten sonra 70 °C'den 95 °C'ye 0.1 °C'lik artış ile çizilen erime eğrisi ve erime sıcaklık değerleri elde edildi. Örnekler üçlü çalışıldı ve hesaplama için aynı örneğin bulunduğu üç tüpten elde edilen erime sıcaklıklarının ortalamaları kullanıldı.

3.6.3. FOXP3 Ekspresyon Analizi

3.6.3.1. Tam Kandan RNA İzolasyonu

Psoriasis ve *FOXP3* metilasyonun ilişkisinin gösterilebilmesi için kandaki *FOXP3* RNA düzeylerine bakıldı. Tam kandan RNA izolasyonu, Total RNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) (Geneaid) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit, protokol doğrultusunda uygulandı:

- 1.5 mL'lik tüpteki 300 μL kan örneğinin üzerine 1 mL RBC lizis tamponu eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Tüp 10 dk buzda bekletildi. Bu süre boyunca karışım 2 kez vortekslendi. Karışım 3000 x g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.

- Tüpün dibindeki hücre peleti 100 µL RBC lizis tamponu ile süspanse hale getirildi. Üzerine 400 µL RB tamponu ve 4 µL β-merkaptöetanol eklendi. Karışım sertçe çalkalandıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Karışıma 500 µL %70 etanol eklendi ve karışım sertçe çalkalandı. 500 µL karışım, toplama tüpünün içindeki kolona aktarıldı ve kolon 16000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi. Karışımın kalanı kolona aktarıldı ve kolon 16000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 400 µL W1 tamponu eklendi ve kolon 16000 x g'de 30 sn santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi. Kolona 600 µL yıkama tamponu eklendi ve kolon 16000 x g'de 30 sn santrifüj edildi. Bu basamak tekrar edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi. Kolonu kurutmak için 16000 x g'de 3 dk santrifüj edildi.
- Kolon, 1.5 mL tüpe yerleştirildi. Kolona 20 µL RNase-free su eklendi ve kolon 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 16000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen RNA örnekleri -80 °C'de saklandı.

3.6.3.2. RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

cDNA sentezinden önce RNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenebilmesi için NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) cihazı ile ölçüm gerçekleştirildi. Cihaz RNA modunda 1 µL RNase-free su ile kalibre edildikten sonra 1 µL örnek ile ölçüm gerçekleştirildi. 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okuma yapıldı ve konsantrasyon ng/µL olarak elde edildi. Örneğin saflığını belirlemede kullanılan 260/280 absorbans oranı 1.9 ile 2.1 değerleri arasında olan örnekler cDNA sentezi için kullanıldı.

3.6.3.3. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Konsantrasyonu belirlenmiş izole RNA örneklerinden cDNA elde edebilmek için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i (Thermo Scientific) kullanıldı. PCR koşulları ve PCR karışımı kit talimatlarına uygun olarak hazırlandı. Örnekler 11 µL'de 1000 ng RNA olacak

şekilde nuclease-free su ile seyreltildi. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde steril PCR tüplerinde PCR reaksiyonu hazırlandı (Tablo 4).

Tablo 4. cDNA sentezi reaksiyon içeriği.

Kimyasal	Eklenen Miktar
RNA örneği	1000 ng
Nuclease-free su	0-11 µL
Oligo (dT) ₁₈ primer	1 µL
5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µL
Toplam	20 µL

Hazırlanan PCR reaksiyonuna, termal döngü cihazında 42 °C’de 60 dk, 70 °C’de 5 dk ve son adım 4 °C olan program uygulandı. Elde edilen cDNA örnekleri -80 °C’de saklandı.

3.6.3.4. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi

Gerçek-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (real-time Polymerase Chain Reaction), kullanılan nükleik asitlerin küçük miktarlarını algılama ve ölçme kapasitesine sahip ışıma temelli niceliksel bir yöntemdir (85). Yöntem temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır: Denatürasyon (denaturation) basamağında çoğaltılacak DNA yüksek sıcaklık ile tek zincir haline getirilir. Bağlanma (annealing) basamağında primerler optimum sıcaklıkta tek zincirli DNA’ya bağlanır. Son olarak uzama (elongation/extension) basamağında DNA polimeraz enzimi aracılığıyla ortamdaki deoksinekleotid trifosfatların (dNTP) bağlanmasıyla primer dizisinin uzaması sağlanır (86).

FOXP3 ekspresyon analizi için Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), hedef gen *FOXP3* ve internal kontrol geni olarak *β-aktin* genleri için tasarlanan primerler (87) ve cDNA örnekleri ile PCR reaksiyonu hazırlandı. Kullanılan primer dizileri Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Ekspresyon analizi için kullanılan primerler.

Gen	Primer Dizisi	PCR Ürünü
FOXP3	Forward: 5'-CTGACCAAGGCTTCATCTGTG-3'	175 baz çifti
	Reverse: 5'-ACTCTGGGAATGTGCTGTTTC-3'	
β -aktin	Forward: 5'-AGTTGCGTTAC ACCCTTTCTTG-3'	150 baz çifti
	Reverse: 5'-TCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'	

Liyofilize primerlere nuclease-free su eklenerek 150 μ M olacak şekilde primer ana stok solüsyonları hazırlandı. Ana stok 1:15 oranda seyreltilerek 10 μ M ara stok solüsyonları hazırlandı.

Real-Time PCR reaksiyonu için Tablo 6'daki reaksiyon karışımı hazırlandı ve 20 μ L'lik reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu PCR plaklarına pipetlendi. Kalıp DNA olarak, 40 μ L'de 1000 ng olacak şekilde nuclease-free su ile 1:2 oranında seyreltilen cDNA örnekleri (25 ng/ μ L) kullanıldı. Negatif kontrol için nuclease-free su kullanıldı. Buharlaşmayı önlemek için plak, kapatıcı film ile kaplandı. LightCycler 480 (Roche) cihazı kullanılarak analiz gerçekleştirildi.

Tablo 6. Real-Time PCR reaksiyon içeriği.

Kimyasal	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	10 μ L	1X
Forward Primer (10 μ M)	0.6 μ L	0.3 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.6 μ L	0.3 μ M
cDNA Örneği (25 ng/ μ L)	5 μ L	125 ng
Nuclease-free Su	3.8 μ L	
Toplam	20 μL	

Analiz için 95 °C'de 10 dk ve (95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn) x40 döngü programı uygulandı. Erime eğrisi analiziyle ürünlerin kalite kontrolü gerçekleştirildi. Örnekler üçlü çalışıldı ve hesaplama için üç kuyucuktan elde edilen C_T değerlerinin ortalamaları kullanıldı. Göreceli gen ekspresyon analizi $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (88).

3.6.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR örneklerinin varlığı ve amplifikasyonun doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin gösterilebilmesi için örnekler PCR reaksiyonundan sonra %4'lük agaroz jelde elektroforeze edildi. %4'lük agaroz jel, 4 gram agarozun 1X TBE tamponunda çözülmesiyle hazırlandı. Çözülme işlemi ısıtılarak gerçekleştirildikten sonra çözünen agaroz kısa süre oda sıcaklığında bekletildi ve çözeltiye 5 µL SafeView Classic (ABM) eklendi. Hazırlanan jel, jel döküm aparatına dökülerek, kuyuların oluşması için tarak yerleştirildi. Jelin soğuyarak, jelleşme sürecinin tamamlanması için 30 dakika oda sıcaklığında beklendi. Tarak donan jelden dikkatli biçimde çıkarılarak yüklemenin yapılacağı kuyular elde edildi. Hazırlanan jel içerisinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforeze edilecek örnekler, 6X jel yükleme tamponu ile karıştırılarak 10 µL karışım kuyulara yüklendi. Örneklerin büyüklüklerinin saptanması için 10 µL O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) kuyulara yüklendi. 10 V/cm gerilim uygulanarak örneklerin elektroforeze olması sağlandı. Elektroforez sonuçları UVP EpiChem³ Darkroom sistemi ile görüntülendi.

3.6.4. ELISA Analizi

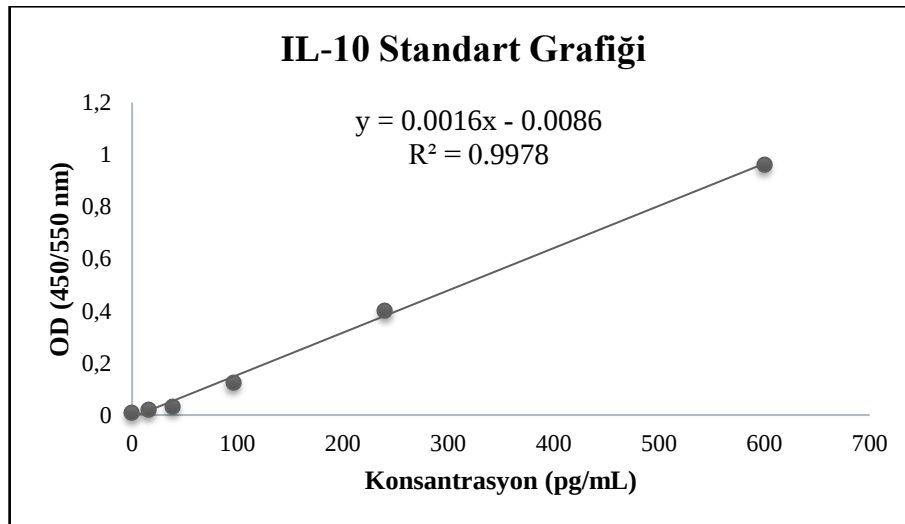
Hastalardan ve sağlıklı kontrol grubundan elde edilen plazma örneklerindeki IL-10, 17A, 35, 36G sitokinlerinin miktarları "sandwich" enzim bağlı immunosorbent testi (ELISA) ile ölçüldü. Kullanılan standartlar ve örnekler, yüzeyi istenen sitokine özgü antikor ile kaplanmış mikrokuyucuklarda biyotinile antikor reaktifi ile birlikte bekletilir. Sitokinler kuyucukların yüzeyindeki antikorlara bağlanırken, biyotinile antikor da bağlanan sitokinlere bağlanır. Yıkama basamağının ardından eklenen horseradish peroksidaz (HRP), sitokinlere bağlı biyotinile antikorlara bağlanır. Bir diğer yıkama basamağının ardından eklenen tetrametilbenzidin (TMB) substratı HRP'ye bağlandığında mavi renk gözlenir. Asidik özellikteki stop solüsyonu eklendiğinde mavi renk, sarıya dönüşür ve sonlandırılan reaksiyon belirtilen dalga boyunda okutulur. Örnekler ikili çalışıldı ve aynı örneğin bulunduğu iki kuyucuktan elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları konsantrasyon hesaplanması için kullanıldı. İkili çalışılan örneklerden elde edilen %CV değerleri IL-10 için 4.4, IL-17A için 9.6, IL-35 için 8.7 ve IL-36G için 1.9 olarak hesaplandı.

3.6.4.1. IL-10 Ölçümü

Hasta ve kontrol grubu plazma örneklerindeki IL-10 miktarının belirlenmesi için Human IL-10 ELISA Kit'i (Thermo Scientific) kullanıldı. Kit, protokol doğrultusunda uygulandı:

- Standart ve örnekler kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi. Kuyucuklara 50'şer µL biyotinile antikor reaktifi pipetlendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er µL yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı.
- Kuyucuklara 100'er µL Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak 30 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er µL yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı.
- Kuyucuklara 100'er µL TMB substrat solüsyonu eklendi. Plak 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi.
- Kuyucuklara 100'er µL stop solüsyonu eklendi.
- Absorbanslar spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm ve 550 nm'de ölçüldü. OD450'den OD550 çıkartılarak Delta OD hesaplandı.

Konsantrasyonlar 600 pg/mL, 240 pg/mL, 96 pg/mL, 38.4 pg/mL, 15.36 pg/mL standartlar kullanılarak oluşturulan doğrusal standart grafiği ile hesaplandı (Şekil 3). Duyarlılığı 3 pg/mL'nin altında olan kitin seçiciliği test edilmiş olup insan IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, TNFα, TNFβ ve IFNγ ile çapraz reaksiyon göstermediği belirtilmiştir.



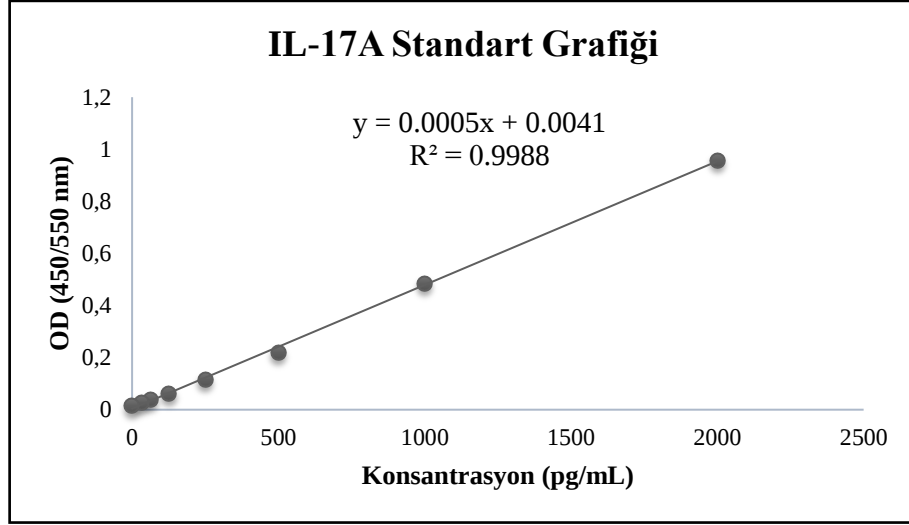
Şekil 3. IL-10 standart grafiği.

3.6.4.2. IL-17A Ölçümü

Hasta ve kontrol grubu plazma örneklerindeki IL-17A miktarının belirlenmesi için Human IL17A ELISA Kit'i (Thermo Scientific) kullanıldı. Kit, protokol doğrultusunda uygulandı:

- Kuyucuklara 50'şer μL biyotinile antikor reaktifi pipetlendi. Standart ve örnekler kuyucuklara 50'şer μL pipetlendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak iki saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er μL yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı.
- Kuyucuklara 100'er μL Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak bir saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er μL yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı.
- Kuyucuklara 100'er μL TMB substrat solüsyonu eklendi. Plak 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi.
- Kuyucuklara 100'er μL stop solüsyonu eklendi.
- Absorbanslar spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm ve 550 nm'de ölçüldü. OD450'den OD550 çıkartılarak Delta OD hesaplandı.

Konsantrasyonlar 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.25 pg/mL standartlar kullanılarak oluşturulan doğrusal standart grafiği ile hesaplandı (Şekil 4). Duyarlılığı 5 pg/mL'nin altında olan kitin seçiciliği test edilmiş olup insan IL17B, IL17D, IL17E, IL17F, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13 ve IL16 ile çapraz reaksiyon göstermediği belirtilmiştir.



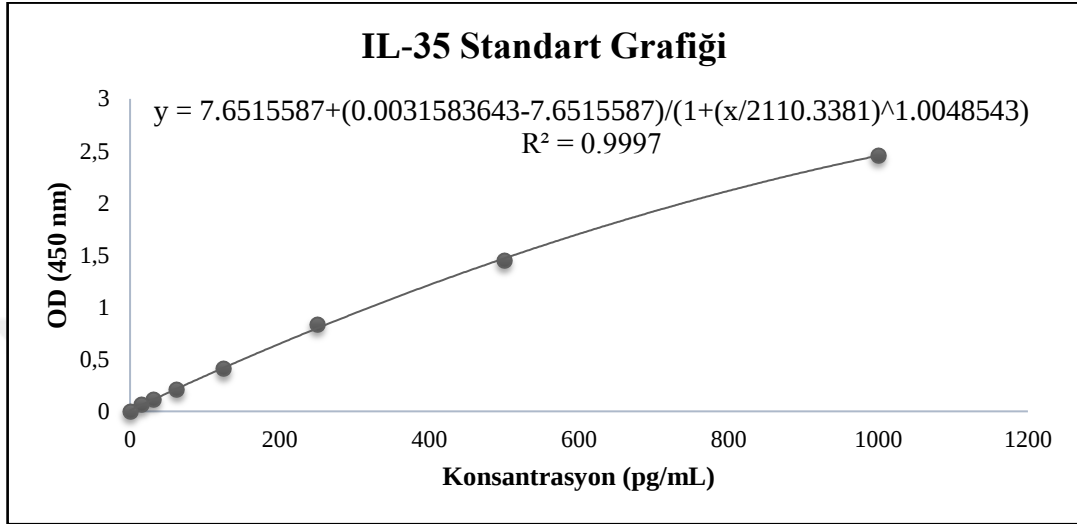
Şekil 4. IL-17A standart grafiği.

3.6.4.3. IL-35 Ölçümü

Hasta ve kontrol grubu plazma örneklerindeki IL-35 miktarının belirlenmesi için Human IL-35 (Interleukin 35) ELISA Kit'i (Elabscience) kullanıldı. Kit, protokol doğrultusunda uygulandı:

- Standart ve örnekler kuyucuklara 100'er µL pipetlendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak 90 dk 37 °C sıcaklığındaki etüvde bekletildi.
- Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra kuyucuklara 100'er µL biyotinile antikor reaktifi pipetlendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak bir saat 37 °C sıcaklığındaki etüvde bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er µL yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı.
- Kuyucuklara 100'er µL Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak 30 dk 37 °C sıcaklığındaki etüvde bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er µL yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı.
- Kuyucuklara 90'ar µL substrat solüsyonu eklendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak 30 dk 37 °C sıcaklığındaki etüvde bekletildi.
- Kuyucuklara 50'şer µL stop solüsyonu eklendi.
- Absorbanslar spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm'de ölçüldü. OD450'den ODKör çıkartılarak Delta OD hesaplandı.

Konsantrasyonlar 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.25 pg/mL, 15.625 pg/mL standartlar kullanılarak oluşturulan dört-parametrelili lojistik standart eğrisi ile hesaplandı (Şekil 5). Duyarlılığı 9.375 pg/mL olan kitin seçiciliği test edilmiş olup insan IL-35 analogları ile çapraz reaksiyon göstermediği belirtilmiştir.



Şekil 5. IL-35 standart grafiği.

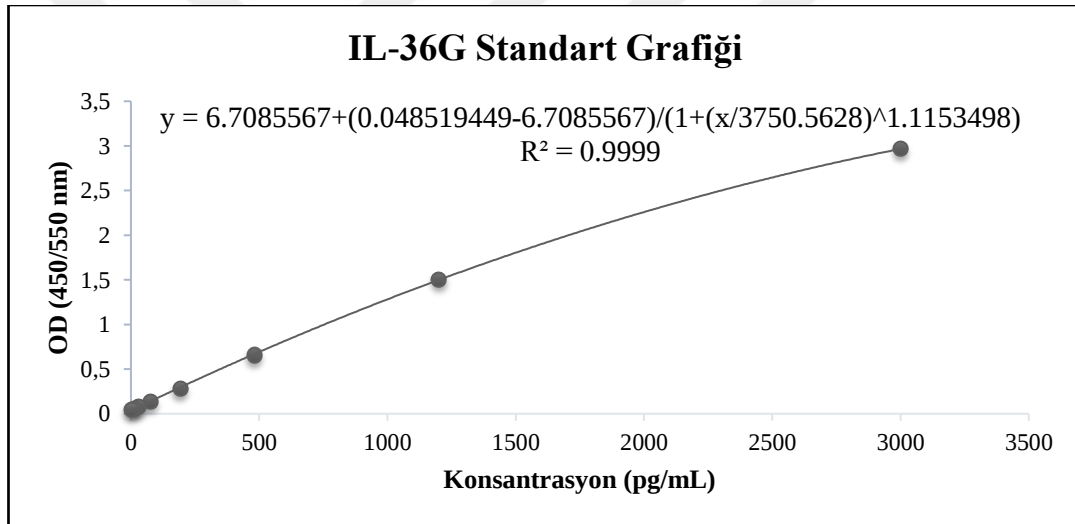
3.6.4.4. IL-36G Ölçümü

Hasta ve kontrol grubu plazma örneklerindeki IL-36G miktarının belirlenmesi için Human IL-36G (IL-1F9) ELISA Kit'i (Thermo Scientific) kullanıldı. Kit, protokol doğrultusunda uygulandı:

- Standart ve örnekler kuyucuklara 100'er µL pipetlendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak düşük devirde çalkalayıcıda 150 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er µL yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı.
- Kuyucuklara 100'er µL biyotinile antikor reaktifi pipetlendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak düşük devirde çalkalayıcıda 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er µL yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı.
- Kuyucuklara 100'er µL Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Plak, kapatıcı film ile kaplanarak düşük devirde çalkalayıcıda 45 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er µL yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı.

- Kuyucuklara 100'er µL TMB substrat solüsyonu eklendi. Plak düşük devirde çalkalayıcıda 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi.
- Kuyucuklara 50'şer µL stop solüsyonu eklendi.
- Absorbanslar spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm ve 550 nm'de ölçüldü. OD450'den OD550 çıkartılarak Delta OD hesaplandı.

Konsantrasyonlar 3000 pg/mL, 1200 pg/mL, 480 pg/mL, 192 pg/mL, 76.80 pg/mL, 30.72 pg/mL, 12.29 pg/mL standartlar kullanılarak oluşturulan dört-parametrelili lojistik standart eğrisi ile hesaplandı (Şekil 6). Duyarlılığı 13 pg/mL olan kitin seçiciliği test edilmiş olup insan IL-1F1 (IL-1α), IL-1F2 (IL-1β), IL-1F3 (IL-1ra), IL-1F4 (IL-18), IL-1F5 (IL-36ra), IL-1F6 (IL-36α), IL-1F7 (IL-37), IL-1F8 (IL-36β), IL-1F10 (IL-38) ve IL-1F11 (IL-33) ile çapraz reaksiyon göstermediği belirtilmiştir.



Şekil 6. IL-36G standart grafiği.

Araştırmada kullanılan cihazlar Tablo 7’de belirtilmiştir.

Tablo 7. Araştırmada kullanılan cihaz listesi.

Adı/Modeli	Projede Kullanım Amacı
Soğutmalı santrifüj cihazı/Sigma 2K15C	Plazma elde edilmesi, DNA ve RNA izolasyonları
Vorteks/Velp Scientifica Zx ³	DNA ve RNA izolasyonları
Isı bloğu/Major Science	DNA izolasyonu
Buzdolabı/Arçelik	Örnek, kimyasal ve kitlerin saklanması
Derin dondurucu (-80°C)/Colora UF85-300S	Örneklerin saklanması
Spektrofotometre/ Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer	DNA ve RNA konsantrasyon ve saflık ölçümü
Termal döngü cihazı/Techne TC-412	cDNA sentezi, bisülfıt modifikasyonu
Real-time PCR cihazı/QIAGEN Rotor-Gene Q	HRM-PCR
Real-time PCR cihazı/ Roche LightCycler 480	Real-time PCR
Güç kaynağı/ATTO AE-8450	Agaroz jel elektroforezi
Elektroforez sistemi/Thermo Minicell Primo EC320	Agaroz jel elektroforezi
Jel görüntüleme sistemi/ UVP EpiChemi ³ Darkroom	Agaroz jel elektroforezi
Spektrofotometrik plak okuyucu/ BioTek Synergy HT	ELISA
Çalkalayıcı/IKA K S 130 basic	ELISA
Etüv/Memmert	ELISA
Otoklav/Hirayama Hiclave HV - 50	Su ve plastik malzemelerin sterilizasyonu

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Projelendirme	Eylül 2015 – Şubat 2016
Örneklerin Toplanması, Plazma Elde Edilmesi, DNA ve RNA İzolasyonu	Aralık 2016 – Aralık 2017
cDNA Sentezi	Ocak 2017 – Aralık 2017
Real-time PCR Analizi	Ekim 2017 – Aralık 2017
Bisülfıt Modifikasyonu	Nisan 2017 – Aralık 2017
HRM-PCR Analizi	Kasım 2017 – Ocak 2018
ELISA Analizi	Haziran 2017 – Aralık 2017
İstatistiksel Analiz ve Tez Yazımı	Aralık 2017 – Şubat 2018

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi SPSS 20.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Ölçümle elde edilen veriler ortalama ve standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri ile, gruplanmış veriler sayı ve yüzde dağılımları ile sunuldu.

Sayısal verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Kolmogorov-Smirnov testinin sonucu 0.05'ten küçük olduğu için tüm parametreler normal dağılıma uygun bulunmadı. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için ki-kare testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bulgular arasında korelasyon olup olmadığı Spearman korelasyon analizi kullanılarak belirlendi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmaya bir yıl için 60 psoriasisli dahil edilmesi öngörülmüş olup çalışma süresi sonunda 38 hastaya ulaşılabildi. Guttat tip, palmoplantar püstüler tip, generalize püstüler tip ve kronik plak psoriasisli hasta örneklerinin elde edilmesi öngörülmekle birlikte çalışma sonunda bu çeşitlilik sağlanamadı. Çalışmaya dahil edilen kronik plak ve palmoplantar püstüler psoriasislilerin sayıları dengeli olmadığı için hastalık alt türüne bağlı analizler gerçekleştirilemedi. Çalışma planında hastaların tedavi öncesi ve sonrası ölçümlerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi hedeflenmişken hastaların kontrollere düzenli olarak

gelmemesi nedeniyle tedavi öncesi/sonrası analizleri gerçekleştirilemedi. Ayrıca çalışmaya dahil edilen hasta sayısı beklenenden az olduğu için tedavi olan hastalar da çalışmaya dahil edilip, farklı hastalar için tedavi var/yok şeklinde iki grup arasında analizler gerçekleştirildi. Çalışmada hastaların kullandıkları tedavilere göre (topikal tedavi, adalimumab, fototerapi, asitretin-siklosporin) gruplandırılıp incelenen parametrelerin analizinin gerçekleştirilmesi planlanmışken, tedavi gruplarındaki hasta sayılarının yeterli ve dengeli olmaması nedeniyle bu hedef gerçekleştirilemedi.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 22.10.2015 tarih ve 2015/24-25 numaralı kararında; 2298-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir (EK-3). Çalışma, hasta ve kontrol grubundan aydınlatılmış onam alınarak gerçekleştirildi (EK-1 ve EK-2).

4. BULGULAR

Çalışma psoriasis tanısı konulan 38 hasta ve 20 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu ile gerçekleştirildi.

Hasta grubunun %44.7'si (n=17) kadın, % 55.3'ü (n=21) erkek; kontrol grubunun %35.0'ı (n=7) kadın, %65.0'ı (n=13) erkekti. Yapılan değerlendirmede iki grup arasında cinsiyet bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.474). Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet özellikleri ve yaş ortalamaları Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet özellikleri ve yaş ortalamaları.

Grup	Cinsiyet	n (%)	Yaş Ort. $\pm$ SD	Min./Maks.	Medyan
Hasta		38 (65.5)	47.9 $\pm$15.1	22/85	51
	Kadın	17 (44.7)	46.0 $\pm$ 16.5	27/85	42
	Erkek	21 (55.3)	49.4 $\pm$ 14.0	22/75	51
Kontrol		20 (34.5)	36.6 $\pm$8.4	27/52	34
	Kadın	7 (35.0)	38.6 $\pm$ 9.0	27/50	35
	Erkek	13 (65.0)	35.5 $\pm$ 8.3	27/52	32

Hastaların 36'sında kronik plak, ikisinde palmoplantar püstüler tipte psoriasis mevcuttu. Hastalık şiddeti PAŞİ skoruna bağlı olduğundan palmoplantar püstüler psoriasis hastaları bu gruplandırmaya dahil edilmedi. Kronik plak psoriasis hastalarının 21'inde hastalık şiddeti düşük iken 15'inde orta-şiddetli düzeydeydi. Hastaların 22'si kan alımından önceki bir ay boyunca sistemik tedavi görmemiş, 15 gün boyunca topikal tedavi görmemiş iken 16 hasta Tablo 9'da belirtilen tedavilerden birini kullanmaktaydı. Hastaların 19'unun psoriasis dışında kronik bir hastalığı var iken geri kalan 19 hastanın psoriasis dışında kronik bir hastalığı bulunmamaktaydı. Hastaların gruplara göre dağılımı Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Hasta grupları ve özellikleri.

Hasta grupları		n	%
Psoriasis alt türü	Kronik plak	36	94.7
	Palmoplantar püstüler	2	5.3
Hastalık şiddeti	Düşük (PAŞİ≤10)	21	58.3
	Orta-şiddetli (PAŞİ>10)	15	41.7
Tedavi durumu	Var	16	42.1
	Yok	22	57.9
Tedavi türü	Topikal	12	75.0
	Asitretin	1	6.3
	Siklosporin	1	6.3
	Topikal+asitretin	1	6.3
	Topikal+metotreksat	1	6.3
Kronik hastalık	Var	19	50.0
	Yok	19	50.0

Hastaların PAŞİ skorları 1.2 ile 46.0 arasında değişmekteydi. PAŞİ skorlarının ortalaması 11.8 ± 9.4 , medyan değeri 7.6 olarak tespit edildi. Hastaların PAŞİ skoruna göre dağılımı Tablo 10'da gösterilmiştir.

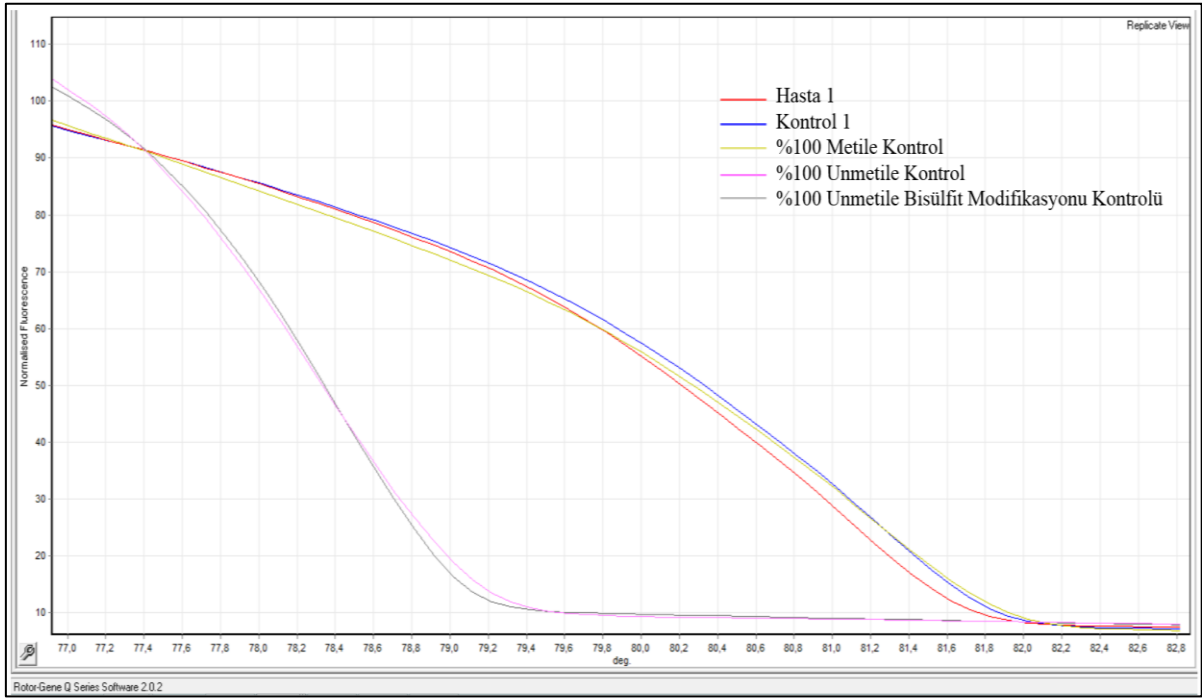
Tablo 10. Hastaların PAŞİ skoru dağılımı.

Gruplar		Ort. $\pm$ SD	Min./Maks.	Medyan
PAŞİ skoru		11.8 $\pm$ 9.4	1.2/46.0	7.6
	≤10	5.7 $\pm$ 1.8	1.2/8.2	5.6
	>10	20.3 $\pm$ 9.0	12.0/46.0	17.6

4.1. FOXP3 TSDR Metilasyon Düzeyleri

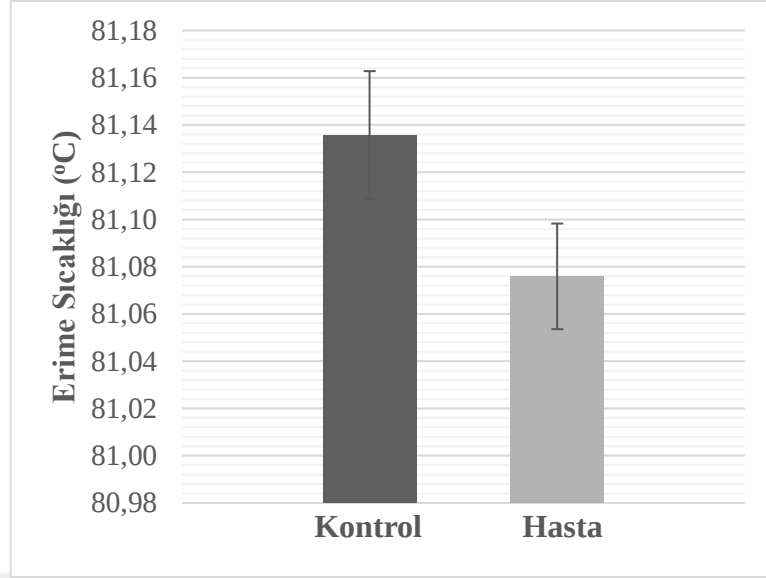
HRM analizi ile incelenen hasta ve kontrol grubu örnekleri elde edilen grafikte, metilasyon kontrolü olarak kullanılan %100 metile örnekler ile aynı bölgede görüldü. HRM

grafiğinden yola çıkılarak hasta ve kontrol örneklerinin tümünün metile olduğu sonucu elde edildi. %100 unmetile kontrol, grafikte daha düşük sıcaklık derecesinde görüldü. Metile ve unmetile kontroller arasındaki fark grafikte gösterildi. Bisülfıt modifikasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için EpiTect PCR Control DNA Set’indeki (QIAGEN) bisülfıt modifikasyonu uygulanmamış %100 unmetile kontrolüne diğer örnekler ile birlikte bisülfıt modifikasyonu uygulandı ve grafikte %100 unmetile kontrol ile aynı bölgede görüldü. Bu sayede bisülfıt modifikasyonunun doğru bir şekilde uygulandığı gösterildi (Şekil 7).



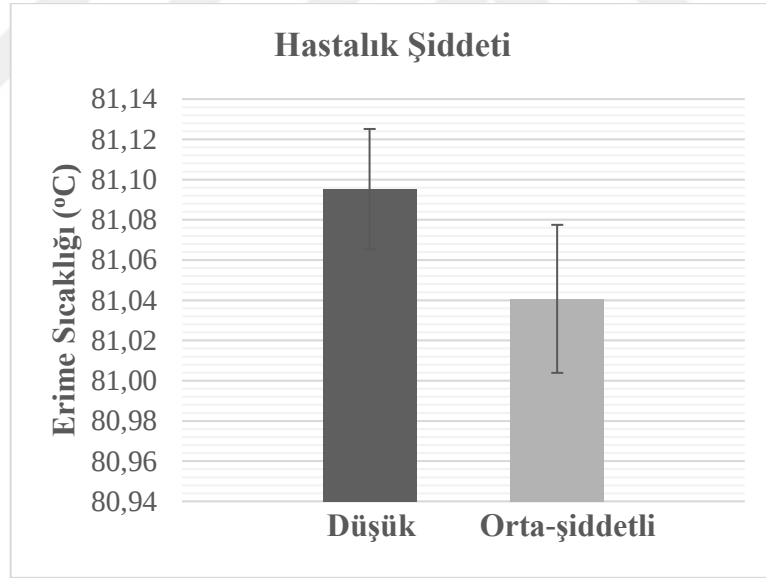
Şekil 7. HRM PCR ile elde edilen erime eğrisi örneği.

Hasta ve kontrol örneklerinin erime sıcaklık değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.174$) (Şekil 8).



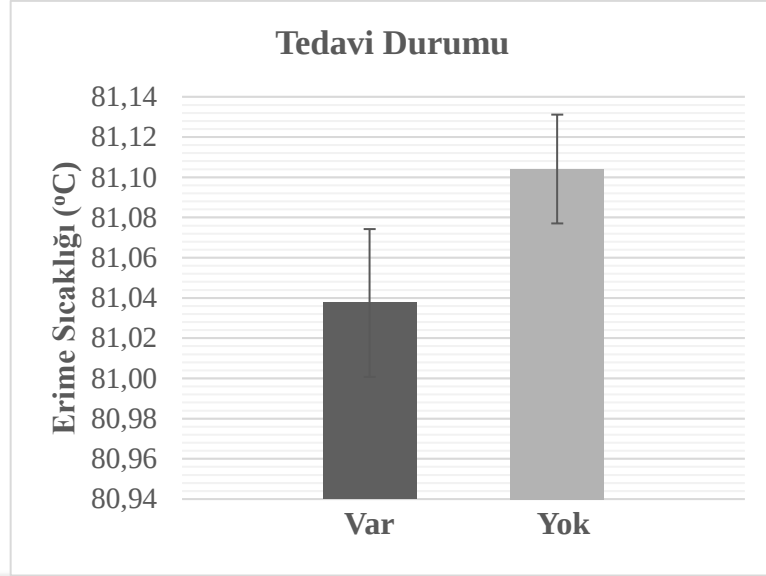
Şekil 8. Hasta ve kontrol grubunun erime sıcaklıkları (Standart hata çizgi ile gösterilmiştir.).

Hastalık şiddeti açısından erime sıcaklık değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.222$) (Şekil 9).



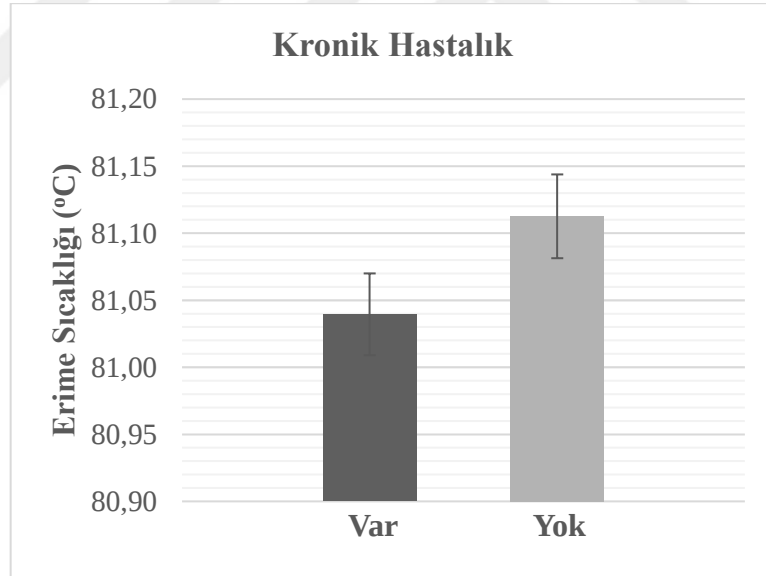
Şekil 9. Hastalık şiddeti gruplarının erime sıcaklıkları (Standart hata çizgi ile gösterilmiştir.).

Tedavi olan ve olmayan hastaların erime sıcaklık değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.178$) (Şekil 10).



Şekil 10. Tedavi gruplarının erime sıcaklıkları (Standart hata çizgi ile gösterilmiştir.).

Psoriasis dışında bir hastalığı olan ve olmayan hastaların erime sıcaklık değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.118$) (Şekil 11).

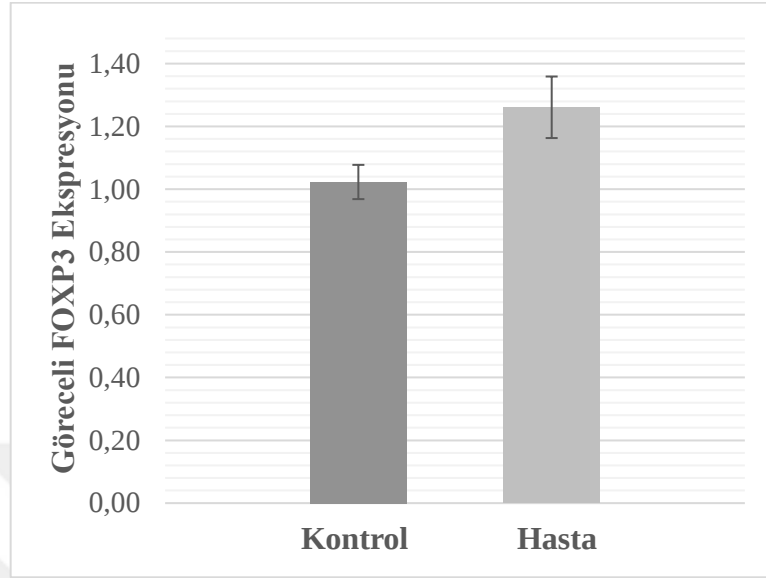


Şekil 11. Kronik hastalık gruplarının erime sıcaklıkları (Standart hata çizgi ile gösterilmiştir.).

4.2. FOXP3 Ekspresyon Düzeyleri

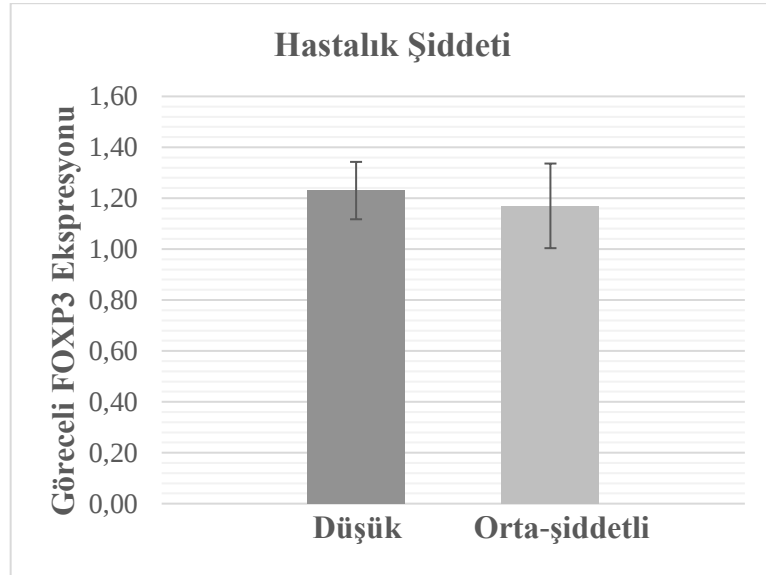
Tüm hasta ve kontrol örnekleri için göreceli gen ekspresyon analizi $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. İnternal kontrol geni olarak β -aktin geni kullanıldı.

FOXP3 ekspresyon düzeyi açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.242$) (Şekil 12).



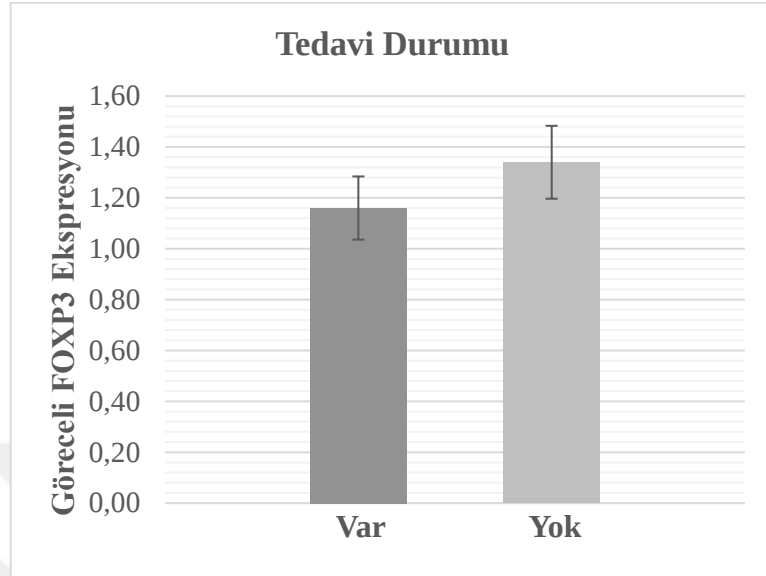
Şekil 12. Hasta ve kontrol grubunun göreceli FOXP3 ekspresyon düzeyi (Standart hata çizgi ile gösterilmiştir.).

Hastalık şiddeti grupları arasında FOXP3 ekspresyonu kıyaslandığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.665$) (Şekil 13).



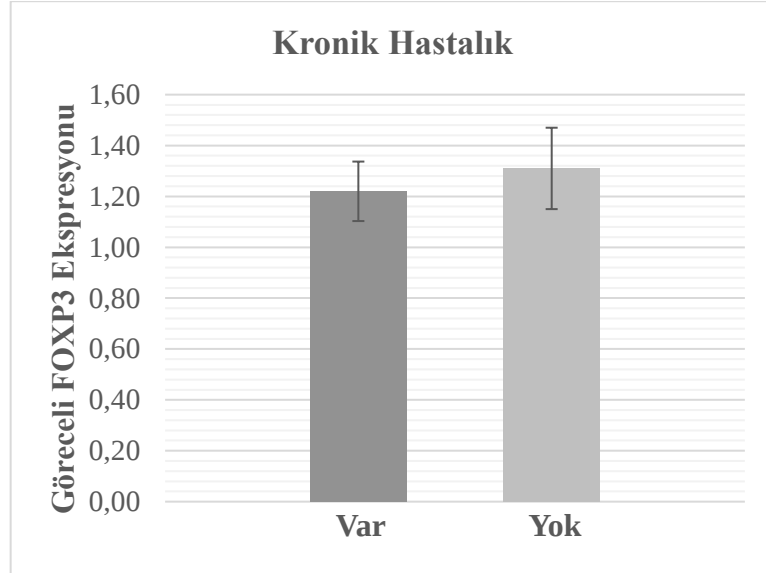
Şekil 13. Hastalık şiddeti gruplarının göreceli FOXP3 ekspresyon düzeyi (Standart hata çizgi ile gösterilmiştir.).

FOXP3 ekspresyonu düzeyi açısından tedavi olan hastalar ve tedavi olmayan hastalar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.554$) (Şekil 14).



Şekil 14. Tedavi gruplarının göreceli FOXP3 ekspresyon düzeyi (Standart hata çizgi ile gösterilmiştir.).

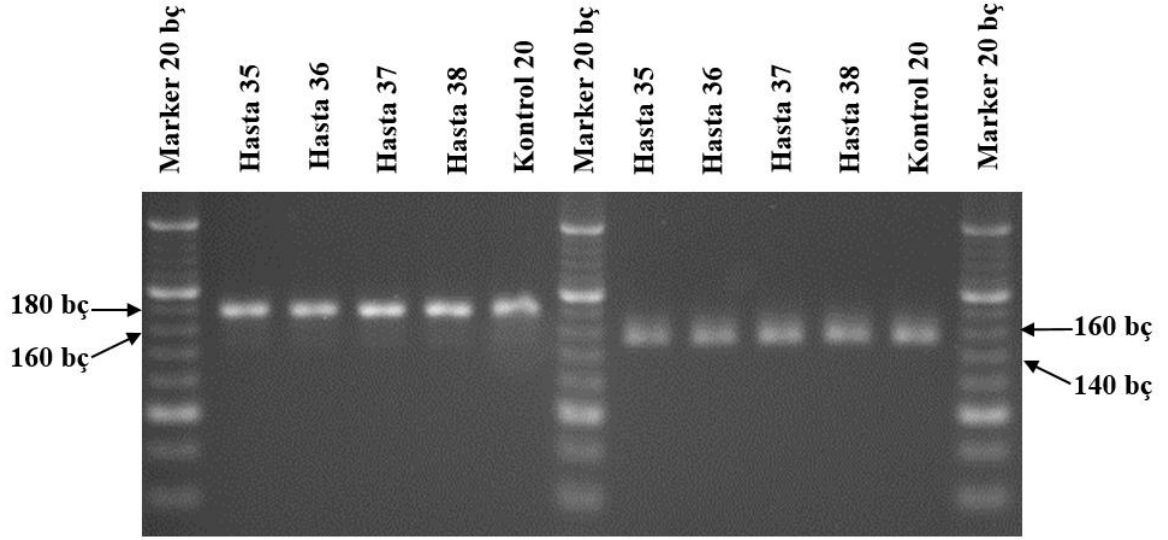
FOXP3 ekspresyonu düzeyi açısından kronik hastalığı olan ve olmayan hastalar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.872$) (Şekil 15).



Şekil 15. Kronik hastalık gruplarının göreceli FOXP3 ekspresyon düzeyi (Standart hata çizgi ile gösterilmiştir.).

4.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi

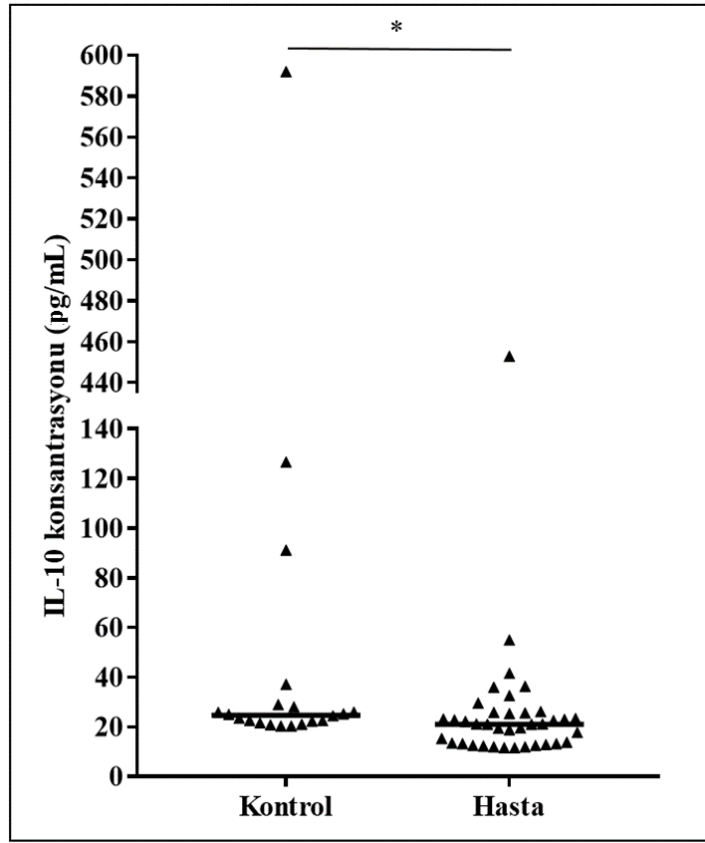
FOXP3 ve *β -aktin* primer çiftleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri, amplifikasyon varlığı ve büyüklük açısından kontrol için %4'lük agaroz jelde yürütüldü. Ürünlerin bütünlüğünü koruduğu ve beklenen baz çifti değerlerinde olduğu gösterildi (Şekil 16).



Şekil 16. Real-time PCR ürünlerinin %4'lük agaroz jeldeki örnek görüntüsü. PCR ürünlerinin büyüklüğü; *FOXP3* 175 bç, *β -aktin* 150 bç'dir.

4.3. İnterlökin Düzeyleri

Hasta grubunun IL-10 değerleri 11.63 pg/mL ile 452.88 pg/mL arasında olup ortalaması 32.81 ± 70.61 pg/mL, medyan değeri 21.10 olarak tespit edildi. Kontrol grubunun IL-10 değerleri 20.40 pg/mL ile 592.00 pg/mL arasında olup ortalaması 61.29 ± 127.76 pg/mL, medyan değeri 24.70 olarak tespit edildi (Şekil 17). Kontrol grubunda IL-10 değerleri hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.008$) (Tablo 11).

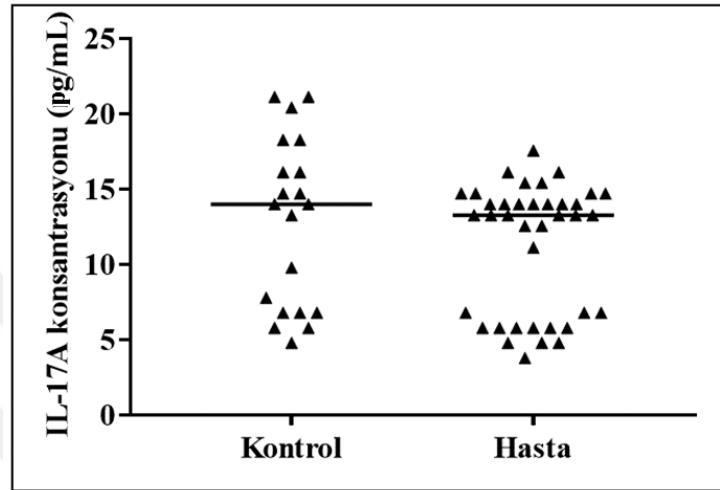


Şekil 17. Hasta ve kontrol grubunun IL-10 değerleri (Kişi sonuçları üçgen ile, medyan değeri çizgi olarak gösterilmiştir.) (*p=0.008).

Tablo 11. Hasta ve kontrol grubunda interlökin konsantrasyonlarının istatistiksel analizi.

	IL-10 (pg/mL)	IL-17A (pg/mL)	IL-35 (pg/mL)	IL-36G (pg/mL)
Grup	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)
Kontrol	61.29 ±127.76 (24.70)	12.83 ±5.59 (14.00)	29.31 ±14.35 (29.22)	30.05 ±30.13 (18.23)
Hasta	32.81 ±70.61 (21.10)	11.24 ±4.26 (13.29)	36.05 ±36.44 (23.41)	25.54 ±36.56 (16.88)
p	0.008	0.134	1.000	0.287

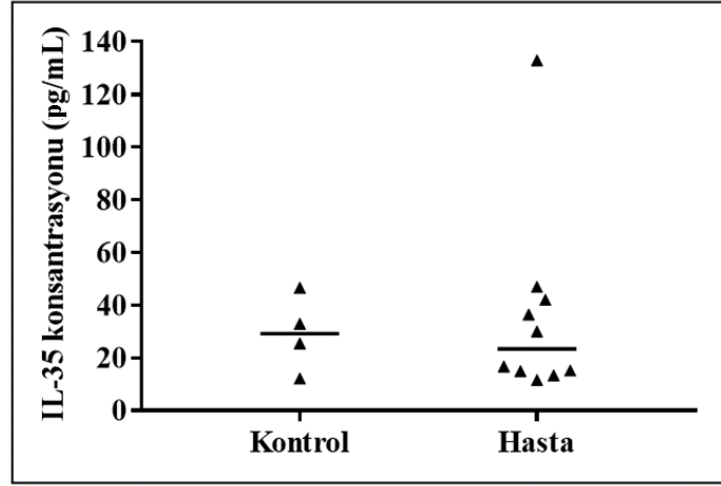
Hasta grubunun IL-17A değerleri 3.80 pg/mL ile 17.57 pg/mL arasında olup ortalaması 11.24 ± 4.26 pg/mL, medyan değeri 13.29 olarak tespit edildi. Kontrol grubunun IL-17A değerleri 4.80 pg/mL ile 21.14 pg/mL arasında olup ortalaması 12.83 ± 5.59 pg/mL, medyan değeri 14.00 olarak tespit edildi (Şekil 18). İki grup arasında IL-17A düzeyi bakımından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.134$) (Tablo 11).



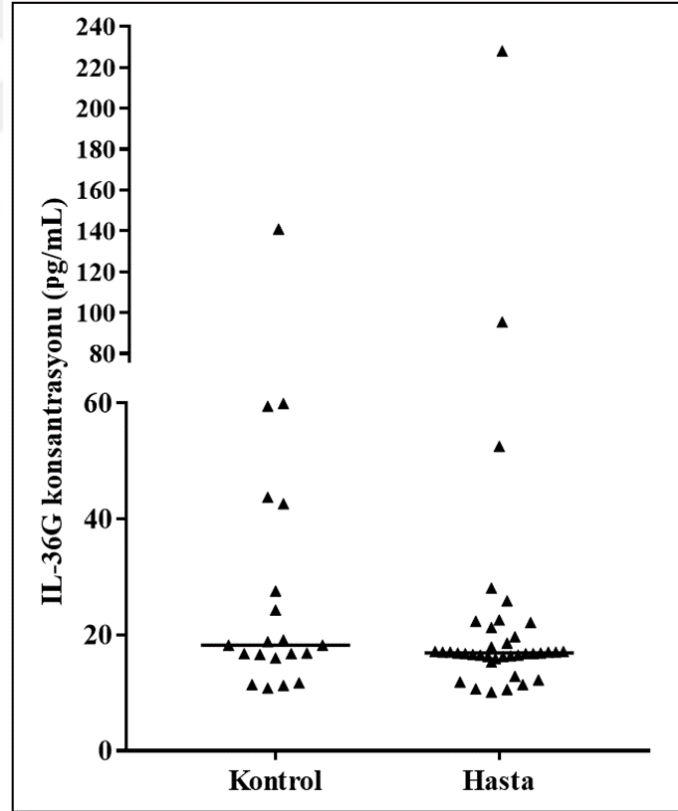
Şekil 18. Hasta ve kontrol grubunun IL-17A değerleri (Kişi sonuçları üçgen ile, medyan değeri çizgi olarak gösterilmiştir.).

IL-35 ölçümlerinde kontrol grubundan 4, hasta grubundan 10 kişi dışındaki değerler ölçülebilir düzeyde değildi. Hasta grubunun IL-35 değerleri 11.61 pg/mL ile 132.99 pg/mL arasında olup ortalaması 36.05 ± 36.44 pg/mL, medyan değeri 23.41 olarak tespit edildi. Kontrol grubunun IL-35 değerleri 12.23 pg/mL ile 46.58 pg/mL arasında olup ortalaması 29.31 ± 14.35 pg/mL, medyan değeri 29.22 olarak tespit edildi (Şekil 19). İki grup arasında IL-35 düzeyi bakımından anlamlı fark bulunmadı ($p=1.000$) (Tablo 11).

Hasta grubunun IL-36G değerleri 10.14 pg/mL ile 227.96 pg/mL arasında olup ortalaması 25.54 ± 36.56 pg/mL, medyan değeri 16.88 olarak tespit edildi. Kontrol grubunun IL-36G değerleri 10.84 pg/mL ile 140.85 pg/mL arasında olup ortalaması 30.05 ± 30.13 pg/mL, medyan değeri 18.23 olarak tespit edildi (Şekil 20). İki grup arasında IL-36G düzeyi bakımından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.287$) (Tablo 11).



Şekil 19. Hasta ve kontrol grubunun IL-35 değerleri (Kişi sonuçları üçgen ile, medyan değeri çizgi olarak gösterilmiştir.).



Şekil 20. Hasta ve kontrol grubunun IL-36G değerleri (Kişi sonuçları üçgen ile, medyan değeri çizgi olarak gösterilmiştir.).

Hastalar hastalık şiddetine göre gruplandırıldığında iki grup arasında interlekin düzeyleri bakımından anlamlı fark bulunmadı (Tablo 12).

Tablo 12. Hastalık şiddeti düşük ve orta-şiddetli olan hastaların interlekin konsantrasyonlarının istatistiksel analizi.

Hastalık şiddeti	IL-10 (pg/mL)	IL-17A (pg/mL)	IL-35 (pg/mL)	IL-36G (pg/mL)
	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)
Düşük	42.02 ±94.77 (21.20)	10.23 ±4.40 (13.29)	18.70±10.15 (15.23)	21.86 ±19.02 (16.88)
Orta-şiddetli	21.01 ±7.50 (21.00)	12.37 ±4.09 (14.00)	53.40 ±46.18 (42.08)	11.88 ±54.39 (17.01)
p	0.773	0.244	0.076	0.395

Hastalar tedavi durumuna göre gruplandırıldığında iki grup arasında interlekin düzeyleri bakımından anlamlı fark bulunmadı (Tablo 13).

Tablo 13. Tedavi olan ve olmayan hastaların interlekin konsantrasyonlarının istatistiksel analizi.

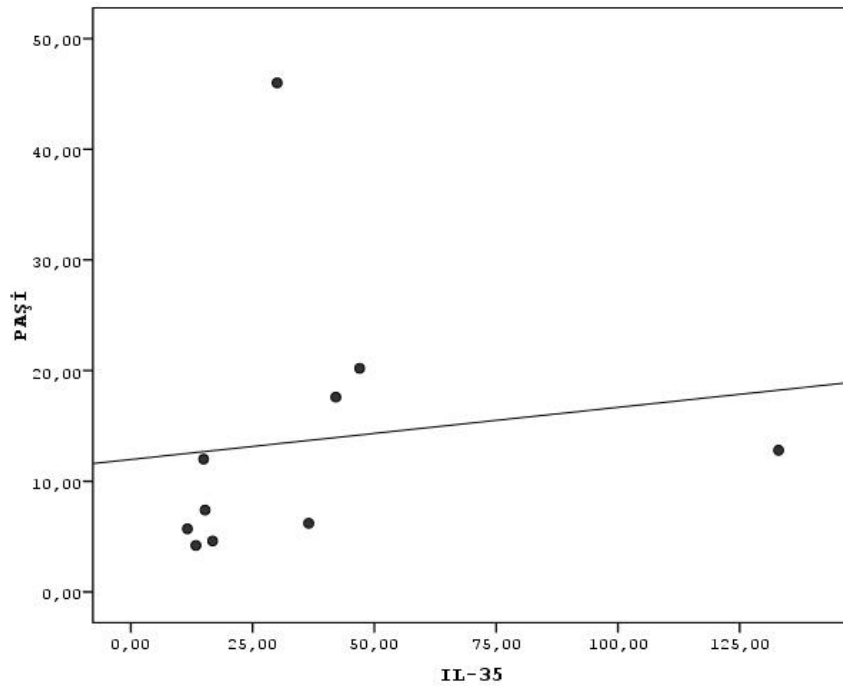
Tedavi durumu	IL-10 (pg/mL)	IL-17A (pg/mL)	IL-35 (pg/mL)	IL-36G (pg/mL)
	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)
Tedavi var	20.16 ±9.18 (17.41)	10.31 ±4.35 (12.93)	41.41±46.29 (23.41)	32.48 ±53.05 (16.82)
Tedavi yok	42.01 ±92.27 (21.70)	11.91 ±4.16 (13.29)	28.02 ±16.43 (25.87)	20.48 ±17.12 (16.94)
p	0.280	0.270	1.000	0.872

Hastalar psoriasis dışında kronik hastalığı olup olmamasına göre gruplandırıldığında iki grup arasında interlekin düzeyleri bakımından anlamlı fark bulunmadı (Tablo 14).

Tablo 14. Psoriasis dışında kronik hastalığı olan ve olmayan hastaların interlekin konsantrasyonlarının istatistiksel analizi.

Kronik hastalık	IL-10 (pg/mL)	IL-17A (pg/mL)	IL-35 (pg/mL)	IL-36G (pg/mL)
	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)	Ort. ±SD (Medyan)
Var	22.92 ±11.24 (21.20)	11.58 ±4.28 (13.29)	38.14 ±43.66 (16.78)	29.69 ±48.85 (16.76)
Yok	42.69 ±99.58 (21.00)	10.89 ±4.31 (12.57)	31.18 ±14.33 (36.51)	21.38 ±18.40 (17.14)
p	0.770	0.576	0.732	0.397

Hasta bulguları arasında korelasyon olup olmadığı incelendiğinde sadece PAŞİ skoru ile IL-35 düzeyi arasında güçlü düzeyde ($r=0.648$) pozitif yönde korelasyon bulundu ($p=0.043$) (Şekil 21). Korelasyon sonuçları Tablo 15’te gösterilmiştir.



Şekil 21. Hastalarda PAŞİ skoru – IL-35 korelasyon grafiği.

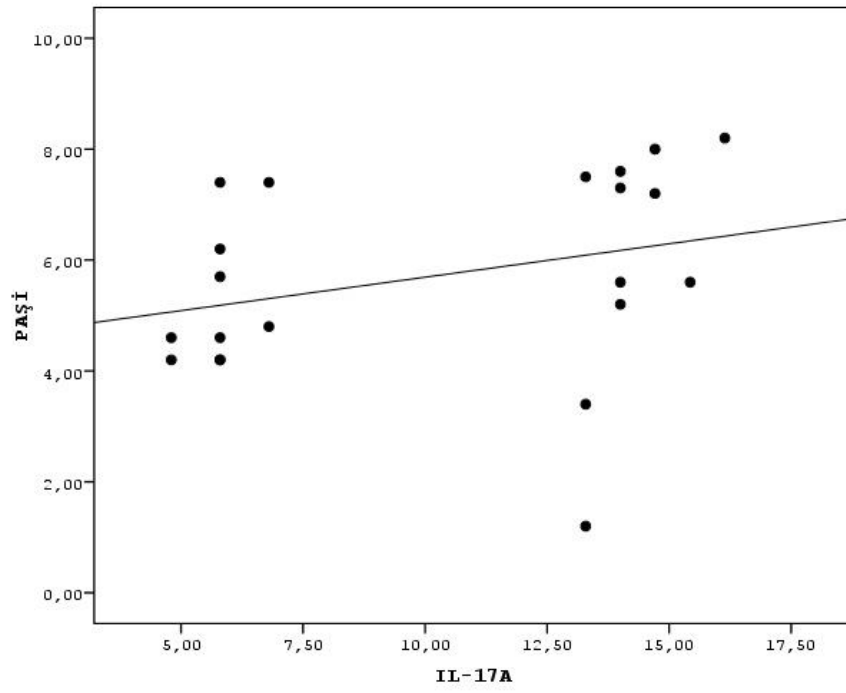
Tablo 15. Hasta bulgularının korelasyon analizi.

Gruplar	r	p
PAŞİ Skoru – <i>FOXP3</i> Metilasyonu	-0.097	0.573
PAŞİ Skoru – <i>FOXP3</i> Ekspresyonu	-0.154	0,369
PAŞİ Skoru – IL-10	-0,410	0.812
PAŞİ Skoru – IL-17A	0.285	0.092
PAŞİ Skoru – IL-35	0.648	0.043
PAŞİ Skoru – IL-36G	0.216	0.205
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – <i>FOXP3</i> Ekspresyonu	-0.211	0.204
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – IL-10	0.139	0.406
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – IL-17A	-0.169	0.311
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – IL-35	0.055	0.881
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – IL-36G	0.033	0.846
<i>FOXP3</i> Ekspresyonu – IL-10	0.013	0.939
<i>FOXP3</i> Ekspresyonu – IL-17A	0.004	0.981
<i>FOXP3</i> Ekspresyonu – IL-35	-0.382	0.276
<i>FOXP3</i> Ekspresyonu – IL-36G	-0.092	0.583
IL-10 – IL-17A	0.183	0.271
IL-10 – IL-35	-0.115	0.751
IL-10 – IL-36G	-0.054	0.747
IL-17A – IL-35	0.088	0.809
IL-17A – IL-36G	0.260	0.114
IL-35 – IL-36G	-0.127	0.726

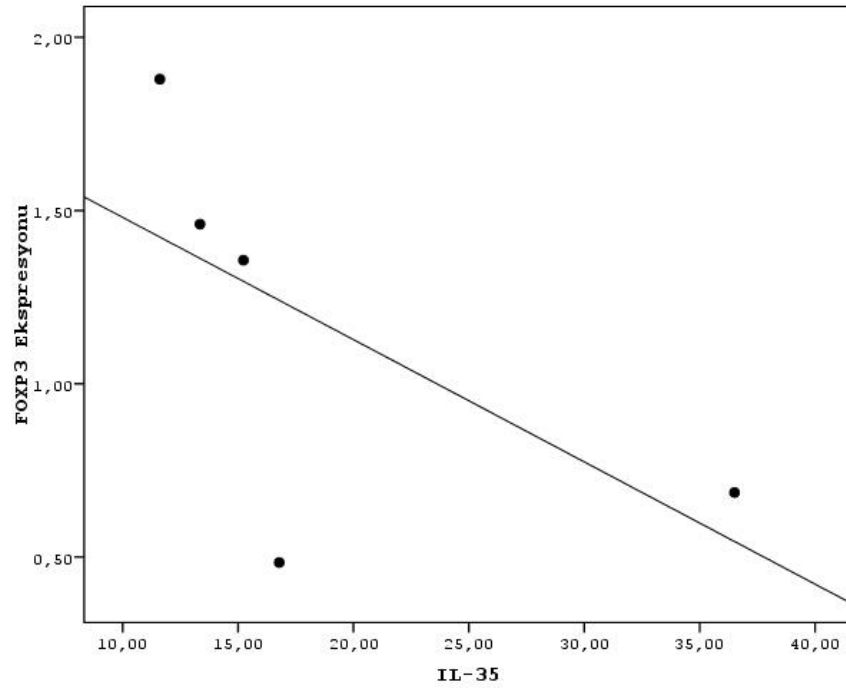
Hastalık şiddeti düşük olan hasta bulguları arasında korelasyon olup olmadığı incelendiğinde PAŞİ ile IL-17A düzeyi arasında orta düzeyde ($r=0.499$) pozitif yönde korelasyon ($p=0.021$) (Şekil 22) ve *FOXP3* ekspresyon düzeyi ile IL-35 düzeyi arasında çok güçlü düzeyde ($r=0.900$) negatif yönde korelasyon ($p=0.037$) (Şekil 23) bulundu. Korelasyon sonuçları Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16. Hastalık şiddeti düşük olan hasta bulgularının korelasyon analizi.

Gruplar	r	p
PAŞİ Skoru – <i>FOXP3</i> Metilasyonu	0.105	0.651
PAŞİ Skoru – <i>FOXP3</i> Ekspresyonu	-0.249	0,277
PAŞİ Skoru – IL-10	-0,155	0.502
PAŞİ Skoru – IL-17A	0.499	0.021
PAŞİ Skoru – IL-35	0.300	0.624
PAŞİ Skoru – IL-36G	0.013	0.955
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – <i>FOXP3</i> Ekspresyonu	-0.239	0.297
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – IL-10	0.072	0.756
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – IL-17A	-0.115	0.620
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – IL-35	0.700	0.188
<i>FOXP3</i> Metilasyonu – IL-36G	0.265	0.247
<i>FOXP3</i> Ekspresyonu – IL-10	-0.003	0.991
<i>FOXP3</i> Ekspresyonu – IL-17A	-0.404	0.070
<i>FOXP3</i> Ekspresyonu – IL-35	-0.900	0.037
<i>FOXP3</i> Ekspresyonu – IL-36G	-0.208	0.365
IL-10 – IL-17A	-0.020	0.931
IL-10 – IL-35	-0.600	0.285
IL-10 – IL-36G	-0.003	0.991
IL-17A – IL-35	-0.354	0.559
IL-17A – IL-36G	0.249	0.277
IL-35 – IL-36G	-0.200	0.747



Şekil 22. Hastalık şiddeti düşük olan hastalarda PAŞİ skoru – IL-17A korelasyon grafiği.

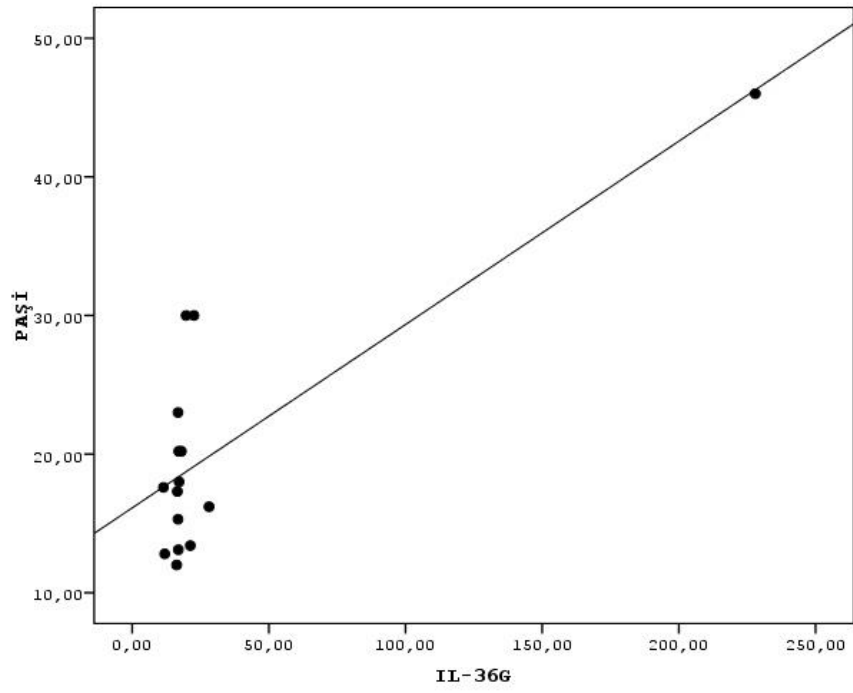


Şekil 23. Hastalık şiddeti düşük olan hastalarda FOXP3 ekspresyon düzeyi – IL-35 korelasyon grafiği.

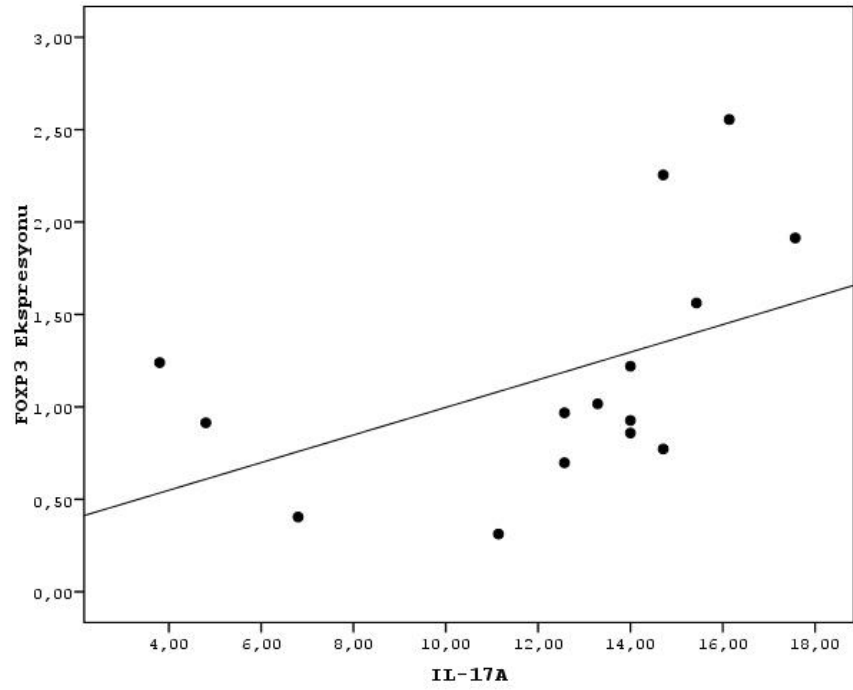
Hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hasta bulguları arasında korelasyon olup olmadığı incelendiğinde PAŞİ ile IL-36G düzeyi arasında güçlü düzeyde ($r=0.532$) pozitif yönde korelasyon ($p=0.041$) (Şekil 24) ve FOXP3 ekspresyon düzeyi ile IL-17A düzeyi arasında güçlü düzeyde ($r=0.583$) pozitif yönde korelasyon ($p=0.022$) (Şekil 25) bulundu. Korelasyon sonuçları Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17. Hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hasta bulgularının korelasyon analizi.

Gruplar	r	p
PAŞİ Skoru – FOXP3 Metilasyonu	0.291	0.292
PAŞİ Skoru – FOXP3 Ekspresyonu	-0.088	0,756
PAŞİ Skoru – IL-10	-0,254	0.361
PAŞİ Skoru – IL17A	-0.189	0.500
PAŞİ Skoru – IL-35	0.100	0.873
PAŞİ Skoru – IL-36G	0.532	0.041
FOXP3 Metilasyonu – FOXP3 Ekspresyonu	-0.380	0.163
FOXP3 Metilasyonu – IL-10	0.208	0.458
FOXP3 Metilasyonu – IL-17A	-0.408	0.131
FOXP3 Metilasyonu – IL-35	0.500	0.391
FOXP3 Metilasyonu – IL-36G	-0.168	0.548
FOXP3 Ekspresyonu – IL-10	-0.082	0.771
FOXP3 Ekspresyonu – IL-17A	0.583	0.022
FOXP3 Ekspresyonu – IL-35	-0.100	0.873
FOXP3 Ekspresyonu – IL-36G	-0.129	0.648
IL-10 – IL-17A	0.338	0.219
IL-10 – IL-35	0.200	0.747
IL-10 – IL-36G	-0.136	0.629
IL-17A – IL-35	0.100	0.873
IL-17A – IL-36G	0.248	0.373
IL-35 – IL-36G	-0.300	0.624



Şekil 24. Hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hastalarda PAŞİ skoru – IL-36G korelasyon grafiği.



Şekil 25. Hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hastalarda FOXP3 ekspresyon düzeyi – IL-17A korelasyon grafiği.

5. TARTIŞMA

5.1 FOXP3 ve Psoriasis İlişkisi

Psoriasis patogenezinin önemli nedenlerinden birinin deride gelişen immünitinin Treg hücreler aracılığı ile düzenlenememesi olduğu düşünülse de yapılan çalışmalardan dolaşımdaki Treg düzeyi ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir. Psoriasislilerde Th17 ve FOXP3+ Treg hücrelerin lezyon ve dolaşımda bulunma yüzdelerinin akış sitometrisi yöntemi ile incelendiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde Th17 hücrelerin dolaşıma göre lezyonda daha fazla bulunduğu, FOXP3+ Treg hücrelerin ise lezyon ve dolaşımda benzer oranlarda bulunduğu belirtilmiştir (89). Dolaşımdaki Treg hücre oranının incelendiği bir çalışmada bu oranın hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak düşük olduğu bulunurken, hastalarda Treg oranı ile PAŞİ skorları arasında korelasyon bulunmamıştır (90).

Lezyonda ve periferik kandaki FOXP3+ Treg hücre sayısının psoriasis alt türlerindeki durumunu araştıran bir çalışmadan Treg hücrelerin kronik plak psoriasislilerde guttat psoriasislilere ve kontrol grubuna göre daha yüksek oranda bulunduğu sonucu elde edilmiştir. Guttat psoriasislilerde FOXP3+ Treg hücre sayılarının kontrol grubundan düşük bulunduğu belirtilmiştir. Hastaların dolaşımdaki FOXP3+ hücre yüzdesinin PAŞİ skorları ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Dolaşımdaki IL-17+ hücrelerin yüzdesi incelendiğinde FOXP3+ hücre sonuçlarının tersi olarak guttat psoriasislilerde yüksek, kontrol grubunda düşük, kronik plak psoriasislilerde ise iki gruba göre de düşük olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar FOXP3+ Treg hücre fonksiyonunun inflamasyonda dengesiz olabileceği gibi FOXP3+ Treg hücrelerin farklı psoriasis alt tiplerinde farklı oranlarda bulunması, bu hücrelerin psoriasis oluşumunda farklı etkilerinin olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir (91).

Benzer bir çalışmada Th17 ve Treg hücrelerin dolaşımdaki yüzdeleri incelenmiş ve Th17 hücreler hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak yüksek iken Treg hücreler için iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Treg hücrelerin dolaşımdaki yüzdesi hastalık şiddetine göre incelendiğinde ise orta-şiddetli hastalık grubunda kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirtilmiştir. Her iki hücre grubunun dolaşımdaki yüzdeleri ile PAŞİ skorları pozitif korelasyon göstermektedir. Th17/Treg hücre oranı ile PAŞİ skorları arasındaki korelasyon incelendiğinde dolaşımda pozitif korelasyon, lezyonda ise negatif korelasyon olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak Th17 ve Treg hücrelerin hastalık şiddetini

etkileyebileceğine, lezyondaki IL-17 yoğunluğunun Treg hücreler aracılığıyla düzenlenmediği ancak bu durumun altında farklı bir düzenleme mekanizması olabileceğine dikkat çekilmiştir (92).

Dolaşımdaki Treg düzeyinin bir göstergesi olarak FOXP3 mRNA ekspresyonunun incelendiği çalışmaların bir kısmında ekspresyon düzeyinin normale göre düşük olduğu belirtilmiştir (87, 93-95). Periferik kan mononükleer hücrelerindeki FOXP3 mRNA ekspresyonunun incelendiği çalışmada hastalarda down-regülasyon saptanmıştır. Hastalara 12 haftalık tedavi uygulandıktan sonra ekspresyon düzeyi incelendiğinde tedaviye yanıt veren hastalarda FOXP3 mRNA ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı görülmüştür (93). Benzer bir diğer çalışmada hastalarda kontrollere göre FOXP3 mRNA ekspresyonunun daha düşük olduğu, hastaların dar bant UVB tedavisinden sonra ekspresyon düzeylerinin tedavi öncesine göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca dolaşımdaki Treg ve Th17 hücrelerin durumu da incelenmiş ve hastalarda Treg hücrelerin kontrollere göre düşük, Th17 hücrelerin ise yüksek miktarda olduğu bulunmuştur (94). Başka bir çalışmada da benzer şekilde psoriasislilerde Th17 hücre yüzdesi kontrollere göre yüksek, Treg hücre yüzdesi düşük ve bununla uyumlu olarak FOXP3 mRNA düzeyi de düşük bulunmuştur (87). Benzer sonuçlar elde edilen bir diğer çalışmada dolaşımdaki Treg hücre yüzdesi ve mRNA ekspresyon düzeyinin hastalık şiddeti ile ilişkisi incelenmiş ve şiddetli hastalık grubu sonuçlarının hastalık şiddeti orta olan gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu belirtilmiştir (95).

Psoriasislilerde dolaşımdaki Treg düzeyinin incelendiği çalışmaların bazılarında ise hasta ve kontrol grubu arasında FOXP3 mRNA ekspresyon düzeyi açısından anlamlı fark bulunmamıştır (96-98). Dolaşımdaki Treg hücrelerdeki FOXP3 mRNA ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada hasta ve kontrol grubunda benzer olarak Treg hücrelerde ekspresyonun diğer T hücelere göre 50 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu ve çalışmanın diğer sonuçlarından yola çıkılarak hastalarda Treg sayısında ya da FOXP3 mRNA ekspresyon düzeyinde bir azalma olmamasına rağmen Treg hücrelerdeki baskılayıcı aktivitesindeki kayıp nedeniyle immün düzenleyici işlevini gerçekleştiremediği, Treg hücrelerdeki bu fonksiyon kaybının psoriasis patogenezi için önemli olabileceği düşünülmektedir (96). Bir başka çalışmada dolaşımdaki Treg hücre düzeyinin hasta ve kontrol grubunda benzer bulunması, Treg hücrelerin miktarından çok fonksiyonelliğinin önemli olduğu fikrini destekler niteliktedir (97).

Kronik plak psoriasislilerde yapılan bir çalışmada hastaların lezyonlarında sağlıklı dokuya göre FOXP3 mRNA ekspresyonu daha fazla iken periferik kan mononükleer hücreleri akış sitometrisi ile Treg karakterli hücreler ve FOXP3 mRNA ekspresyon düzeyi açısından incelendiğinde hasta ve kontroller arasında anlamlı fark bulunmamıştır (98).

Bu çalışmada psoriasisliler ile kontrol grubu arasında FOXP3 mRNA ekspresyon düzeyi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Dolayısıyla incelenen hasta grubu için Treg hücre sayısında azalma saptanmamış olup bu sonuç, Treg hücrelerin fonksiyon kaybının psoriasis gelişmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Treg hücrelerle ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda *FOXP3* geninin epigenetik düzenlenmesi üzerine odaklanılmış ve TSDR metilasyonunun Treg hücreler için önemli olduğunu gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Gerçekleştirilen *in vivo* çalışmada TSDR'nin metilasyon durumunun sadece *FOXP3* geninin transkripsiyonunu düzenlemediği, ayrıca FOXP3 ekspresyonunun kararlı bir şekilde sürdürülmesi için önemli rol oynadığı gösterilmiştir (5). İnsanlarda dolaşımdaki Treg hücrelerin incelendiği bir çalışmada sadece Treg hücrelerde TSDR'nin demetile olduğu bulunmuştur. Çalışmada FOXP3 mRNA veya protein saptama yöntemlerinin Treg ve aktive edilmiş T hücreler arasında ayırım yapabilmek için yeterli olmadığı, TSDR demetilasyonu baz alınarak yapılacak ölçümlerin Treg hücrelere özgü sonuçları yansıtacağı belirtilmiştir (99).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser, sepsis, alerji ve atopik dermatit gibi çeşitli hastalık gruplarında dolaşımdaki Treg hücre göstergesi olarak *FOXP3* TSDR metilasyon durumu incelenmiştir (100-104). Literatürde psoriasislilerde dolaşımdaki *FOXP3* TSDR metilasyonunun incelendiği sadece bir çalışma bulunmaktadır. Mevcut çalışmada PAŞİ skorları belirtilmeyen 30 psoriasisli ve 23 sağlıklı kadından alınan tam kandan izole edilen DNA örneklerinin *FOXP3* TSDR metilasyon düzeyi HRM-PCR aracılığıyla incelenmiştir. Çalışmada metilasyon kontrolleri kullanılmamış olup sonuçlar erime sıcaklık değerlerinin karşılaştırılması şeklinde analiz edilmiştir. Sonuç olarak erime sıcaklıkları karşılaştırıldığında psoriasisliler (78.62 ± 0.20) ile kontroller (78.44 ± 0.25) arasında anlamlı fark ($p < 0.01$) bulunduğu, psoriasislilerde *FOXP3* TSDR metilasyonunun yüksek olduğu ve dolayısıyla dolaşımdaki Treg düzeyinin düşük olacağı belirtilmiştir (6).

DNA metilasyon durumunun HRM-PCR aracılığıyla incelenmesinin mümkün olduğu 2010 yılından günümüze gerçekleştirilen araştırmalar ile gösterilmiştir (105-109). Bu yöntem metile ve unmetile DNA'nın farklı termal kararlılığa sahip olmasına bağlı olarak metilasyon kontrolleri baz alınarak belirleme ve kantifikasyon sağlamaktadır (105). Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada DNA metilasyon durumunun incelenmesi için kullanılan HRM-PCR yöntemi, daha yaygın olarak kullanılan spesifik PCR ve pyrosekans analizi ile kıyaslanarak incelenmiş ve HRM-PCR yönteminin metilasyon analizi için kullanılabilecek basit, düşük maliyetli, büyük oranda kesin ve hızlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir (109).

Bu çalışmada tam kandan *FOXP3* TSDR metilasyonu standardize edilmiş primer çifti (Human *FOXP3* Methylation Assay – ADS783) ve metilasyon kontrolleri kullanılarak HRM-PCR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda hasta ve kontrol örneklerinin tümü metile bulunmuş, erime sıcaklıkları karşılaştırıldığında literatürdeki tek çalışmanın (6) aksine iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durumun, hasta ve kontrol grubunun homojen özelliklerde olmaması, kişi sayısının yeterli olmaması, hasta grubunun kendi içinde farklı özelliklere sahip olması (hastalık şiddeti, hastalık alt türü, tedavi durumundaki farklılıklar gibi), metilasyon durumu incelenen bölgenin aynı olmaması ya da deneysel farklılıklar nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde Human *FOXP3* Methylation Assay – ADS783 kullanılarak *FOXP3* TSDR metilasyon durumunun farklı yöntemlerle incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Sağlıklı kişilerin dolaşımdaki Treg hücreleri izole edilip bu hücrelerdeki *FOXP3* TSDR metilasyonu HRM-PCR analiziyle incelendiğinde Treg hücrelerin yüksek oranda demetile olduğu ve kararlı *FOXP3* ekspresyonu ile karakterize oldukları belirtilmiştir (110). Bir başka çalışmada tam kandan izole edilen *FOXP3*+ Treg hücrelerin TSDR metilasyon düzeyi pyrosekans analizi ile gerçekleştirilmiş ve Treg hücrelerdeki *FOXP3* TSDR metilasyonunun yüksek oranda olmasının kararlı Treg hücre soyu üretilmesine engel olabileceğine değinilmiştir (111).

Bu çalışmada *FOXP3* TSDR metilasyonu açısından incelenen bölgede hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu yüzden, *FOXP3* TSDR metilasyonunun incelenen hasta popülasyonu için ayırıcı bir kriter olmadığı düşünülebilir. Ancak, çalışma yöntemsel olarak ele alınırsa tam kandan izole edilen DNA örnekleri kullanıldığı için Treg hücre düzeyi bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan yöntemin Treg hücrelere

özgü olduğu düşünölen *FOXP3* TSDR metilasyon düzeyini yansıtacak düzeyde hassas olmadığı düşünölməsi gereken ikinci bir olasılıktır. Elde edilen sonuçların daha fazla kişi sayısı ve farklı yöntemlerle ele alınması gerektiğı düşünölmektedir.

5.2. İnterlökin Düzeyleri ve Psoriasis İlişkisi

5.2.1. IL-10

Hücrelerarası haberleşmeyi sağlayan sitokinler psoriasis patogeneğinde önemli bir yere sahip olup, bu alanda çokça çalışma bulunmaktadır. Sitokinler arasındaki pozitif-negatif ve otolog geri bildirim düzenlemeleri, sitokin ağı dinamik dengesini sağlamaktadır. IL-10, bu düzenlemede yer alan önemli hücresel immün inhibitörlerdendir (112). Literatürde psoriasisli hastaların dolaşımdaki IL-10 düzeylerinin değeriendirildiğı pek çok çalışma bulunmakta olup bu çalışmalarda ortak bir sonuca varılamamıştır. IL-10'un psoriasis ile ilişkisini ele alan çalışmalar dışında psoriasis tedavisinde IL-10'un kullanıldığı çalışmalar da literatürde yer almaktadır (113, 114). Hasta IL-10 düzeylerini kontrole göre yüksek ve düşük bulan çalışmaların yanı sıra iki grup arasında anlamlı farkın saptanmadığı çalışmalar da bulunmaktadır. Mart 2011 tarihine kadar yayınlanan makalelerin incelendiğı bir meta-analizden hasta ve kontrol IL-10 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadığı ve bu durumun yaş, cinsiyet, PAŞİ skoru ya da psoriasis alt türüne bağı olmadığı belirtilmiştir (75). Literatürde IL-10 konsantrasyon düzeylerinin çalışmalar arası farklılık gösterdiği görölmüştür (Tablo 18). Bu farkın kullanılan ölçüm yöntemi, örnek tipi ve hasta ve kontrol gruplarının değışken olmasından kaynaklanabileceğı düşünölmektedir.

Hasta ve kontrol grubu arasında IL-10 düzeylerinin karşılaştırıldığı çalışmaların çoğunda iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır (7, 115-123). Kronik plak psoriasis hastalarında IL-10 düzeylerinin kontrollerle kıyaslandığında anlamlı fark bulunmayan bir çalışmada, hastaların PAŞİ skorları ile IL-10 düzeylerinin korelasyonu incelendiğinde de anlamlı fark saptanmamıştır (7). Bir başka benzer çalışmada hastalık şiddeti farklı olarak düşük (PAŞİ<7.5), orta (PAŞİ=7.5-12.5) ve şiddetli (PAŞİ>12.5) şeklinde gruplandırılmış ve bu gruplar arasında da IL-10 düzeyi bakımından anlamlı fark bulunmamıştır (120). Psoriasisde sitokin düzeylerinin hastalık şiddeti ve alt tipi ile ilişkisinin incelendiğı bir çalışmada orta-şiddetli düzeydeki hastalık gruplarından kronik plak psoriasis, psoriatik artrit ve eritrodermik psoriasis ile kontrol grubu IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadığı gibi PAŞİ skorları ile de

korelasyon bulunmamıştır. Aynı çalışmada düşük şiddetli kronik plak psoriasis hastaları IL-10 düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubu ve orta-şiddetli hasta grubuna göre yüksek bulunmuş fakat PAŞİ skorları ile korelasyon saptanmamıştır (121).

Literatürde hastalarda dolaşımdaki IL-10'un yüksek düzeyde olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (124-129). Bu çalışmalardan birinde hastaların polisiklik aromatik hidrokarbon ve UV radyasyon ile tedavilerinden sonra IL-10 düzeyinde tedavi öncesine göre anlamlı azalma görülmesine rağmen bu düzey kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (126). Etanercept ile tedavi edilen hastalarda sitokin değişimlerini inceleyen bir çalışmada tedavi ile hastaların PAŞİ skorları düşerken, tedavi öncesinde yüksek IL-10 düzeyinin tedaviden sonra azaldığı belirtilmiştir (127). Hastalarda IL-10 düzeyi kontrollere göre yüksek bulunan bir başka çalışmada tedavi öncesi ve sonrası IL-10 değerleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır (128).

Tamil etnik grubunda *IL-10* ve *FOXP3* gen polimorfizminin psoriasis ile ilişkisini araştıran çalışmadan *IL-10* polimorfizminin psoriasis riskini arttırırken, *FOXP3* polimorfizminin psoriasis riski taşımadığı sonuçlarının yanı sıra hastalarda plazma IL-10 düzeyinin kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu ve incelenen genotiplerin IL-10 düzeyi ile ilişkili olmadığı bulunmuştur (129). Mısır'da yapılan bir çalışmada *IL-10* polimorfizminin psoriasis riski ile ilişkili olduğu ve hastalarda serum IL-10 düzeyinin kontrollere göre anlamlı olarak düşük bulunduğu, genotipler arasında IL-10 düzeyinin anlamlı olarak farklı olduğu belirtilmiştir (130).

Tüm bu çalışmalara ek olarak literatürde IL-10 düzeyini hastalarda kontrollere göre düşük bulunduğu çalışmalar da yer almaktadır (112, 130-135). Bu çalışmaların birinde hastalar kullandıkları tedavilere göre gruplandığında sistemik (efalizumab, siklosporin, asitretin) tedavi kullanan hastalarda IL-10 düzeyinin lokal tedavi (topikal, UVB) kullananlara göre daha yüksek olduğu belirtilmiş (132). Bir başka çalışmada hastaların tedavi öncesi ve sonrası IL-10 değerleri karşılaştırılmış ve tedavi sonrası IL-10 düzeyinin arttığı gösterilmiştir (133). Kronik plak ve eritrodermik psoriasisde IL-10 düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada kronik plak psoriasisde kontrole göre anlamlı düzeyde düşük iken eritrodermik psoriasis grubunda bu iki gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş (112). Hasta IL-10 düzeyi, kullanılan kitten sağlanan sağlıklı

kontrol grubu verileri ile kıyaslandığında düşük bulunan bir çalışmada, ustekinumab tedavisi sonrası da IL-10 düzeyinde değişiklik olmadığı belirtilmiştir (135).

Bu çalışmada hastaların IL-10 düzeyi kontrollere göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuç, Treg hücrelerin sistemik fonksiyonel eksikliğinin bir yansıması olarak plazma IL-10 düzeyindeki azalmanın psoriasis patogeneğine zemin hazırlayabileceği hipotezini destekler niteliktedir.



Tablo 18. IL-10 ve psoriasis ilişkisinin incelendiği çalışmalar ve elde edilen bilgiler.

n	Psoriasis türü	Şiddeti (PAŞİ)	IL-10 düzeyi (pg/mL)	Örnek türü	Ölçüm yöntemi	Kaynak
Hasta n=18 Kontrol n=10	Kronik plak psoriasis	Orta-şiddetli (20.19 ±4.5)	Hasta 4.99 ±5.8 Kontrol 8.99 ±8.8 Anlamlı fark yok, p belirtilmemiş	Serum	ELISA	115 (2003)
Hasta n=12 Kontrol n=5	Kronik plak psoriasis (n=9) Guttat psoriasis (n=2) Eritrodermik psoriasis (n=1)	Belirtilmemiş	Hasta saptanamayan düzeyde Kontrol 6.49 ±1.3	Serum	ELISA (Boncuklu, multiplex)	131 (2003)
Hasta n=5 Kontrol n=5	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Hasta 2.06 ±0.52 Kontrol 2.63 ±0.55 p belirtilmemiş	Serum	ELISA	116 (2004)
Hasta n=45 Kontrol n=45	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Hasta 9.48444 ±11.68606 Kontrol 0.75680 ±0.37151 p=0.000	Serum	ELISA	124 (2005)
Hasta (PsA) n=43 Kontrol n=23	Kronik plak psoriasis (n=40) Palmoplantar püstüler psoriasis (n=3)	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş Hastalarda yüksek p=0.0107	Serum	ELISA (Boncuklu, multiplex)	125 (2007)

Hasta n=40 Kontrol n=40	Kronik plak psoriasis (n=21) Guttat psoriasis (n=11) Eritrodermik psoriasis (n= 6) Scalp psoriasis (n= 2)	Belirtilmemiş (6.26±6.23)	Anlamli fark yok	Serum	ELISA	122 (2007)
Hasta n=65 Kontrol n=114	Kronik plak psoriasis	Orta-şiddetli	Hasta 0.52 ±0.68 Kontrol 2.9 ±8.4 p=0.0227	Plazma	ELISA	132 (2008)
Hasta n=55 Kontrol n=47	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Hasta 4.88 (3.60-5.20) Kontrol 1.18 (0.76-1.74)	Serum	ELISA	126 (2008)
Hasta n=45	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Serum	ELISA (Sandwich, multiplex)	127 (2008)
Hasta n=61 Kontrol n=31	Kronik plak psoriasis	(8.09 ±6.83)	Hasta 11.8 ±4.3 Kontrol 9.9 ±2.7 p=0.0082	Serum	ELISA	128 (2010)
Hasta n=125 Kontrol n>30	Belirtilmemiş	Orta-şiddetli	Hasta medyan 0.8 (0.8-41.2) Kontrol medyan 2.0 (0-5.2) p belirtilmemiş	Serum	ELISA	135 (2010)

Hasta n=65 Kontrol n=10	Kronik plak psoriasis (n=45) PsA (n=10) Eritrodermik psoriasis (n=10)	Düşük Orta-şiddetli (gruplar için) (Kronik plak 1: 44.20 ±7.31) (Kronik plak 2: 8.7 ±7.0) (PsA 60.40 ±6.43) (Eritodermik 64.60 ±4.92)	Belirtilmemiş Anlamlı fark yok	Plazma	ELISA (Boncuklu, multiplex)	121 (2010)
Hasta n=112 Kontrol n=78	Kronik plak psoriasis (n=102) Guttat psoriasis (n=7) Eritrodermik psoriasis (n=5) PsA (n=8)	Düşük Orta-şiddetli (7.3±4.2, 0.7–32.3 aralığında)	Hasta 177 ±18.6 Kontrol 294 ±16.9 p< 0.01	Serum	ELISA	133 (2010)
Hasta n=14 Kontrol n=14	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (ort. 8.5, 2.0-25.3 aralığında)	Hasta 11.50 (2-100) Kontrol 3.90 (1-10) p=0.14	Serum	ELISA (Boncuklu, multiplex)	123 (2010)

Hasta n=30 Kontrol n=30	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Hasta 11.75 ±17.68 Kontrol 17.01 ±35.32 p=0.469	Serum	ELISA (Sandwich)	117 (2011)
Hasta n=10 Kontrol n= 20	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Hasta 109.2 (84.87–139.4) Kontrol 114.71 (91.85–138.09) p belirtilmemiş	Serum	ELISA	134 (2011)
Hasta n=58 Kontrol n=58	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (9.5 ±5.6)	Hasta 0.86 ±0.81 Kontrol 0.68 ±0.30 Anlamlı fark yok	Serum	ELISA (Array)	118 (2012)
Hasta n=71 Kontrol n=15	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (7.9 ±5.2, 1.0- 25.4 aralığında)	Hasta 8.5 ±5.1 Kontrol 7.2 ±0.8 p=0.268	Serum	ELISA (Boncuklu, multiplex)	7 (2012)
Hasta n=36 Kontrol n=15	Kronik plak psoriasis (n=20) Eritrodermik psoriasis (n=16)	Belirtilmemiş	Kronik plak 4.78 ±3.65 Eritrodermik 12.62 ±4.57 Kontrol 7.39 ±2.82 K-EP p=0.0007 KP-PP p=0.0001	Serum	ELISA	112 (2014)

Hasta n=110 Kontrol n=120	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (34.5±18.3, 7-65 aralığında)	Hasta 12.1 ±9.8 medyan 10.2 (5-50) Kontrol 19.9 ±11.1 medyan 20 (6.7-70) p<0.0001	Serum	ELISA (Sandwich)	129 (2014)
Hasta n=19 Kontrol n=17	Kronik plak psoriasis	Belirtilmemiş	Hasta 0.46 ±0.07 Kontrol 0.47 ±0.17 Anlamlı fark yok	Serum	ELISA	119 (2015)
Hasta n=28 Kontrol n=28	Kronik plak psoriasis (n=24) Guttat psoriasis (n=1) Karışık (n=3)	Düşük n=13 Orta n=7 Şiddetli n=8 (10.02 ±7.8)	Hasta 89.4 ±18.68 Kontrol 117.2 ±23.4 p=0.36	Serum	ELISA	120 (2016)
Hasta n=360 Kontrol n=360	Kronik plak psoriasis (n=338) Guttat psoriasis (n=11) Eritrodermik psoriasis (n=6) Püstüler psoriasis (n=5)	Düşük n=171 Orta-şiddetli n=189 (10.54 ±5.7)	Hasta 12.98 (0.10-145.24) Kontrol 12.31 (0.78-74.04) p=0.007	Plazma	ELISA	130 (2017)

5.2.2 IL-17

Proinflamatuvar düzenleyicilerden IL-17'nin psoriasisli hastalarda dolaşımdaki değerlerinin incelendiği pek çok çalışma olup bu çalışmalardan ortak bir sonuç elde edilememiştir. Hasta IL-17 düzeylerini kontrole göre yüksek bulan çalışmalar ile iki grup arasında anlamlı farkın saptanmadığı çalışmalar çoğunluktadır. Kasım 2015 tarihine kadar yayınlanan makalelerin incelendiği bir meta-analizden hastaların plazma IL-17 düzeylerinin kontrollere göre daha yüksek olduğu saptanmış, IL-17'nin psoriasis gelişmesinde etkili olabileceği belirtilmiştir (67).

Hasta ve kontrol grubu arasında IL-17 düzeylerinin karşılaştırıldığı çalışmaların çoğunda hastalarda IL-17 düzeyi kontrollere göre yüksek bulunmuştur (87, 92, 94, 95, 133, 136-146). Çalışmaların birinde IL-17 düzeyi hastalarda kontrollere göre yüksek bulunmuş ve IL-17 düzeyi ile PAŞİ skorları arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon olduğu belirtilmiştir ($p=0.0001$) (133). Hastaların IL-17 düzeyleri yüksek bulunan bir diğer çalışmada IL-17 düzeyi PAŞİ skorları ile pozitif olarak anlamlı korele bulunmuştur ($p=0.001$). Hastalık şiddetine göre ayrılan gruplar arasında kıyaslama yapıldığında orta ve şiddetli hastalık grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek, hastalık şiddeti grupları arasında da şiddetle paralel anlamlı fark bulunmuştur (düşük= 51.41 ± 10.74 , orta= 65.74 ± 13.27 , şiddetli= 73.04 ± 15.68 pg/mL) (92). PAŞİ skorları IL-17 düzeyi ile pozitif olarak korele olan bir diğer çalışmada şiddetli hastalık grubu IL-17 düzeyleri (95.6 ± 70.7) hastalık şiddeti düşük bulunan gruba (35.9 ± 52.4) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) (137). IL-17 düzeyi kontrollere göre yüksek bulunan hasta grubu hastalık şiddetine göre değerlendirildiğinde iki grupta da kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmasının yanı sıra hastalık şiddeti yüksek olan grup bulguları, orta hastalık şiddeti grubuna göre de anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (95). IL-17A düzeyini diğer çalışmalardan farklı olarak akış sitometrisi yöntemi ile değerlendiren bir çalışmada hastalarda kontrollere göre yüksek çıkan IL-17A düzeyleri ile PAŞİ skorları arasında korelasyon bulunmamıştır. Çalışmada hastalığın aktif olup olmamasına göre değerlendirildiğinde IL-17A'nın aktif hasta grubunda daha yüksek olduğu ve IL-17A'nın psoriasis aktivitesi ile hastalığın erken evresi için önemli olabileceği belirtilmiştir (138). Brezilyalı hastalarda IL-17A düzeyini araştıran bir çalışmada kontrollerde ve çoğu hastalarda

IL-17A saptanabilir düzeyde olmamasına rağmen hastalarda anlamlı olarak yüksek düzeyde olduğu, PAŞİ ile IL-17A arasında korelasyon olmadığı saptanmıştır (139).

Literatürde IL-17 düzeylerinin tedavi ile değişimini inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Hastalarda serum IL-17 düzeyleri PAŞİ skorları ile pozitif korele olarak yüksek bulunan bir çalışmada hastalar iki tedavi grubuna ayrılmış, etanercept kullanan grupta IL-17 düzeyinde anlamlı düşüş görülürken (21.48 ± 14.01 , $p < 0.001$) asitretin kullanan grupta fark bulunmamıştır (48.60 ± 19.86) (142). Benzer bir diğer çalışmada asitretin tedavisinden sonra hastaların IL-17 düzeyleri (65.92 ± 16.19) tedavi öncesine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.01$), bu farkın ırk farklılığı, deneysel tasarım ve deneysel şartlara bağlı olabileceği düşünülmüştür (143). Tedavi için adalimumab kullanılan bir çalışmada tedavi sonrası IL-17 değerleri öncesine göre anlamlı olarak düşük ve hatta kontrol grubundan da düşük bulunmuştur ($p < 0.001$) (144). Adalimumab tedavisi uygulanan bir diğer çalışmada benzer şekilde tedavi sonrası IL-17 değerleri öncesine göre anlamlı olarak düşük ve PAŞİ skorları ile IL-17 değerleri pozitif yönde korele bulunmuştur ($p < 0.05$) (146). PAŞİ skorları IL-17 ile pozitif yönde korele olan bir çalışmada dar bant UVB tedavisinden sonra hasta IL-17 düzeyleri (1.810 ± 1.287) tedavi öncesine göre anlamlı olarak düşük ($p < 0.05$) bulunurken kontrollerle kıyaslandığında anlamlı fark saptanmamıştır ($p = 0.634$) (145). Benzer bir başka çalışmada da dar bant UVB tedavisi sonrası hastaların IL-17 düzeylerinde anlamlı düşüş olduğu gösterilmiştir (94).

Hasta ve kontrol grubu arasında IL-17 düzeylerinin karşılaştırıldığı iki grup arasında anlamlı fark bulunmayan çalışmalar da fazlaca bulunmaktadır (7, 8, 121, 123, 125, 128, 147-151). Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada hasta ve kontroller arasında IL-17 düzeyi açısından anlamlı fark bulunmazken PAŞİ skorları ile IL-17 düzeyi pozitif olarak korele bulunmuştur ($p < 0.01$) (147). Başka çalışmalarda da benzer olarak IL-17A düzeyleri PAŞİ skorları ile pozitif yönde korele bulunmuştur ($p = 0.003$) (7), ($p < 0.05$) (8). Hasta ve kontrol IL-17 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmayan çalışmaların bazılarında IL-17 düzeyi ile PAŞİ skorları arasında korelasyona da rastlanmamıştır (148, 149). Hasta ve kontrol IL-17 düzeyinde anlamlı fark bulunmayan bir diğer çalışmada tedavi sonrası IL-17 düzeyinin anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir ($p = 0.0037$) (128). Türk popülasyonunda yapılan bir diğer çalışmada palmoplantar püstüler (9.7 ± 13.09) ve generalize püstüler psoriasis (14.9 ± 10.6) grupları IL-17

düzeyi kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.02$). Çalışmada orta-şiddetli hastalık grubu IL-17 düzeylerinin (11.30 ± 6.0) düşük şiddetli hastalık grubu (3.39 ± 2.6) ve kontrollere göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.001$) bulunmasının yanı sıra PAŞİ skorları ile IL-17 düzeylerinin de pozitif yönde korele olduğu belirtilmiştir ($p<0.05$) (150).

Psoriasisde Treg hücreler ve sitokinlerin rolünü araştıran bir çalışmada serum IL-17 düzeyleri kronik plak psoriasis ve kontrol grubunda düşük, guttat psoriasis grubunda bu iki gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu durum IL-17'nin farklı psoriasis alt türlerinde farklı düzeylerde olabileceğini düşündürürken çalışmadan ayrıca guttat psoriasisde Treg hücrelerin IL-17'ye karşı baskılayıcı özelliklerinin eksik olduğu sonucuna varılmıştır (91).

Psoriasis ile IL-17 ilişkisinin incelendiği bir başka çalışmada IL-17 serum konsantrasyon düzeyi ölçülebilir düzeyin altında bulunmuştur (152).

Literatürde IL-17 konsantrasyon düzeylerinin çalışmalar arası farklılık gösterdiği görülmüştür (Tablo 19). Bu farkın kullanılan ölçüm yöntemi, örnek tipi ve hasta ve kontrol gruplarının değişken olmasının yanı sıra hastalık alt tipine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada literatürde bulunan bazı çalışmalarda olduğu gibi hasta ve kontrol IL-17 düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamasına rağmen hastalık şiddeti düşük hastaların PAŞİ skorları ile plazma IL-17A düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu durumun IL-17'nin tek başına psoriasis patogenezinin neden olmaya yeterli olmaması, hastalığın erken evrelerinde dolaşımda aktif olabileceği ya da sadece lezyonda bulunması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (152, 153). Çalışmada ayrıca beklenmedik şekilde orta-şiddetli hastalık grubunda dolaşımdaki FOXP3 mRNA ekspresyon düzeyi ile IL-17A düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu durumun aydınlatılabilmesi için IL-17A'nın hastalık şiddeti ve FOXP3 mRNA ekspresyonu ile ilişkisinin daha geniş hasta grubu ile ayrıntılı olarak incelenmesinin gerektiği düşünülmektedir.

Tablo 19. IL-17 ve psoriasis ilişkisinin incelendiği çalışmalar ve elde edilen bilgiler.

n	Psoriasis türü	Şiddeti (PAŞİ)	IL-17 düzeyi (pg/mL)	Örnek türü	Ölçüm yöntemi	Kaynak
Hasta n=30 Kontrol n=23	Kronik plak psoriasis	Orta-şiddetli (9.3 ±8.15, 1.5–33.3 aralığında)	Hasta 8.3 ±3.80 (0.0–13.9, 6.2) Kontrol 7.4 ±3.76 (0.0–13.4, 6.2) p>0.05	Serum	ELISA	147 (2005)
Hasta (PsA) n=43 Kontrol n=23	Kronik plak psoriasis (n=40) Palmoplantar püstüler psoriasis (n=3)	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş Anlamlı fark yok	Serum	ELISA (Boncuklu, multiplex)	125 (2007)
Hasta n=60 Kontrol n=10	Kronik plak psoriasis	Orta-şiddetli (Grup 1 21.54 ±9.09) (Grup 2 22.25 ±5.73)	Grup 1 52.86 ±27.63 Grup 2 52.01 ±21.38 Kontrol 19.68 ±9.78 G1-K p=0.001 G2-K p=0.003	Serum	ELISA	142 (2009)
Hasta n=61 Kontrol n=31	Kronik plak	(8.09 ±6.83)	Hasta 3.3 ±8.5 Kontrol 17.0 ±50.6 p=0.432	Serum	ELISA	128 (2010)

Hasta n=14 Kontrol n=14	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (Ort 8.5, 2.0 -25.3 aralığında)	Hasta 31.38 (1–157) Kontrol 21.50 (1–70) p=0.81	Serum	ELISA (Boncuklu, multiplex)	123 (2010)
Hasta n=65 Kontrol n=10	Kronik plak psoriasis (n=45) PsA (n=10) Eritrodermik psoriasis (n=10)	Düşük Orta-şiddetli (gruplar için) KP o-ş 44.20 ±7.31 KP düşük 8.7 ±7.0 PsA 60.40 ±6.43 EP 64.60 ±4.92	Belirtilmemiş Anlamlı fark yok	Plazma	ELISA (Boncuklu, multiplex)	121 (2010)
Hasta n=21 Kontrol n=17	Belirtilmemiş	Orta-şiddetli (22.2 ±24.9)	Hasta 8.20 Kontrol 5.59 p belirtilmemiş Anlamlı fark yok	Plazma	ELISA	148 (2010)
Hasta n=17 Kontrol n=12	Kronik plak psoriasis (n=8) Guttat psoriasis (n=9)	Orta-şiddetli (10–27)	KP 9.77 ±2.57 GP 19.93 ±1.91 Kontrol 10.97 ±2.10 KP-GP p<0.001 GK-K p<0.001	Serum	ELISA	91 (2010)
Hasta n=54 Kontrol n=18	Belirtilmemiş	Düşük (PAŞİ≤10) n=27 Orta n=18 (10<PAŞİ≤25) Şiddetli n=9 (PAŞİ>25)	Hasta 62.79 ±13.63 Kontrol 50.66 ±12.86 p=0.004	Serum	ELISA	92 (2010)

Hasta n=112 Kontrol n=78	Kronik plak psoriasis (n=102) Guttat psoriasis (n=7) Eritrodermik psoriasis (n=5) PsA (n=8)	Düşük Orta-şiddetli (7.3 ±4.2, 0.7–32.3 aralığında)	Hasta 79.4 ±6.61 Kontrol 62.2 ±7.39 p<0.05	Serum	ELISA	133 (2010)
Hasta n=48 Kontrol n=20	Palmoplantar püstüler psoriasis	-	Hasta 613.8 ±603.2 Kontrol 5.6 ±15.51 p<0.01	Serum	ELISA	136 (2011)
Hasta n=30 Kontrol n=30	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Ölçülebilir düzeyin altında	Serum	ELISA	152 (2011)
Hasta n=30 Kontrol n=13	Kronik plak psoriasis	Orta-şiddetli (PAŞİ>7)	Hasta 103.05 ±12.53 Kontrol 73.75 ±12.53	Serum	ELISA	143 (2012)
Hasta n=47 Kontrol n=47	Kronik plak psoriasis (n=15) Annular psoriasis (n=15) Eritrodermik psoriasis (n=5) Diğer (n=10)	Düşük (PAŞİ<15) n=33 Şiddetli (PAŞİ≥15) n=14 PAŞİ ort 9.0	Hasta 53.7 ±63.9 Kontrol 43.1 ±57.9 p<0.05	Plazma	ELISA (Sandwich)	137 (2012)

Hasta n=70 Kontrol n=50	Kronik plak psoriasis (n=30) Guttat psoriasis (n=20) Palmoplantar püstüler psoriasis (n=17) Generalize püstüler psoriasis (n=3)	Düşük Orta-şiddetli (6.6 ±5.4)	Hasta 6.64 ±8.0 Kontrol 4.4 ±4.1 p=0.08	Serum	ELISA	150 (2012)
Hasta n=71 Kontrol n=15	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (7.9 ±5.2, 1.0-25.4 aralığında)	Hasta 6.4 ±9.1 (3.67) Kontrol 3.7 ±2.0 (3.04) p=0.393	Serum	ELISA (Boncuklu, multiplex, IL-17A)	7 (2012)
Hasta n=60 Kontrol n=30	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (15.7 ±9.7, 4.8-64.2 aralığında)	Hasta 3.163 ±1.834 Kontrol 2.863 ±1.492 p=0.684	Serum	ELISA	8 (2013)
Hasta n=32 Kontrol n=32	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (medyan 4.10, 2.20-15.00 aralığında)	Hasta 2.67 ±3.46 0.45 (0.00–8.59) Kontrol 1.80 ±2.81 0.00 (0.00–11.35) p=0.311	Serum	ELISA (Sandwich)	149 (2014)

Hasta n=20 Kontrol n=10	Belirtilmemiş	Orta-şiddetli	Hastalarda yüksek $p<0.01$	Plazma	ELISA	144 (2014)
Hasta n=20 Kontrol n=31	Kronik plak psoriasis	Belirtilmemiş	Hasta 38.52 ± 5.88 Kontrol $12.81 (11.96-14.50)$ $p<0.05$	Serum	ELISA	87 (2014)
Hasta n=30 Kontrol n=20	Kronik plak psoriasis	Orta-şiddetli (32.4 ± 9.2 , $15.8-44.2$ aralığında)	Hasta 28.74 ± 3.44 Kontrol 8.98 ± 2.53 $p<0.01$	Serum	ELISA (IL-17A)	94 (2014)
Hasta n=21 Kontrol n=10	Belirtilmemiş	Orta-şiddetli	Hasta medyan 5.69 Kontrol medyan 2.87 $p<0.05$	Serum	ELISA	146 (2015)
Hasta n=62 Kontrol n=20	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (12.84 ± 7.60 , $2.1-37.8$ aralığında)	Hasta 7.44 ± 7.58 Kontrol 37.04 ± 71.24 $p=0.654$	Serum	ELISA (Boncuklu, multiplex)	151 (2015)
Hasta n=35 Kontrol n=20	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (16.1 ± 7.2 , medyan 16.4, $3.5-34.2$ aralığında)	Hasta 91.8 ± 291.2 Kontrol 0.0 ± 0.0 (saptanamamış) $p=0.022$	Serum	Akış sitometrisi (IL-17A)	138 (2015)

Hasta n=60 Kontrol n=10	Kronik plak psoriasis	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş Hastada yüksek $p<0.05$	Serum	Enzyme- labelled meter	140 (2015)
Hasta n=53 Kontrol n=35	Kronik plak psoriasis	Düşük (PAŞİ 0-10) (8.3 ±1.1) n=16 Orta (PAŞİ 11-20) (15.2 ±3.0) n=21 Şiddetli (PAŞİ>20) (28.5 ±4.8) n=16 (Tümü 16.4, 7-41 aralığında)	Hasta medyan 3.9 (3.9-3530) Kontrol 3.9 (3.9-3.9) saptanamamış (3.9 saptanamamış/en düşük deteksiyon) $p<0.0001$	Serum	ELISA (IL-17A)	139 (2015)
Hasta n=30 Kontrol n=30	Kronik plak psoriasis	Orta-şiddetli (20.5 ±8.5)	Hasta 2.531 ±1.69 Kontrol 1.691 ±0.45 $p<0.05$	Serum	ELISA	145 (2017)
Hasta n=189 Kontrol n=109	Kronik plak psoriasis	Orta n=94 (PAŞİ 12-20) Şiddetli n=95 (PAŞİ>20)	Orta 77.44 ±19.63 Şiddetli 84.12 ±21.58 Kontrol 16.52 ±6.54 $p<0.05$	Serum	ELISA	95 (2017)
Hasta n=194 Kontrol n=175	Kronik plak psoriasis	Düşük Orta-şiddetli (11.22 ±4.51)	Hasta 16.82 ±4.37 Kontrol 8.14 ±1.79 $p<0.001$	Serum	ELISA	141 (2017)

5.2.3 IL-35

Treg hücrelerde üretilen, bu hücrelerin baskılayıcı işlevlerine önemli ölçüde katkıda bulunduğu ve hem Th17 hücre işlevini hem de IL-17 salınmasını azalttığı düşünülen IL-35'in psoriasisli hastalarda dolaşımdaki düzeyini inceleyen sadece iki çalışma bulunmaktadır (Tablo 20). Brezilyalı kronik plak psoriasislilerde serum IL-35 düzeyinin araştırıldığı çalışmada hasta grubunda bir örnek dışındaki örneklerde ve kontrol grubunda IL-35 saptanabilir düzeyin altında bulunmuştur (82). 2017 yılında yayınlanan çalışmada ise psoriasisliler ile kontroller arasında IL-35 düzeyi bakımından anlamlı fark bulunmazken psoriatik artritlilerde IL-35 düzeyi psoriasisliler ve kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuç IL-35'in psoriasistense psoriatik artrit ile ilişkili olduğunu gösterir niteliktedir (83).

Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak plazma IL-35 düzeyleri incelenmiş ve hasta ve kontroller arasında literatür ile uyumlu olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmada yer alan iki psoriatik artrit hastasının IL-35 düzeyleri incelendiğinde birinin sonucu saptanabilir düzeyin altında iken diğerinin sonucu (132,99 pg/mL) tüm hasta ve kontrollerden yüksektir. Bu bulgu tek başına bir şey ifade etmese de Li ve arkadaşlarının önerdiği gibi IL-35'in psoriatik artrit ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (83). Bu çalışmada ayrıca hastaların PAŞİ skorları ile plazma IL-35 düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır, ancak değerlendirilen kişi sayısı (n=10) çok düşük olduğu için daha geniş kesimde araştırılması gerekmektedir. Çalışmada ayrıca düşük şiddetli hasta grubunda FOXP3 mRNA ekspresyon düzeyi ile plazma IL-35 düzeyi arasında negatif korelasyon saptanmıştır. IL-35'in primer olarak Treg hücrelerde üretildiği düşünüldüğünde bu beklenmedik korelasyon incelenen kişi sayısının azlığına bağlı olarak (n=5) rastlantısal olarak yorumlanabilir. Ancak bu durum, dolaşımda sayıca az olmasına rağmen fonksiyonel olarak çok aktif Treg hücreler aracılığıyla IL-35'in üretimi şeklinde de yorumlanabilir. Bu nedenle dolaşımdaki FOXP3 ve IL-35 düzeyinin hastalık şiddeti ile ilişkisinin daha geniş kesimde ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir.

Tablo 20. IL-35 ve psoriasis ilişkisinin incelendiği çalışmalar ve elde edilen bilgiler.

n	Psoriasis türü	Şiddeti (PAŞİ)	IL-35 düzeyi (pg/mL)	Örnek türü	Ölçüm yöntemi	Kaynak
Hasta n=53 Kontrol n=35	Kronik plak psoriasis	Orta (PAŞİ 8-12) n=22 (9.2 ±1,8) Şiddetli (PAŞİ>12) n=31 (22.8 ±7,1) 17.15 (7-41)	Saptanamamış	Serum	ELISA	(82) (2016)
Hasta n=60 (Ps n=20, PsA n=40) Kontrol n=20	Kronik plak psoriasis (n=40) (Ps n=8, PsA n=32) Püstüler psoriasis (n=20) (Ps n=12, PsA n=8)	Düşük Medyan 3.0 (0.3 – 7.2)	PsA yüksek Ps-PsA p<0.01 Kontrol-PsA p<0.05	Serum	ELISA	(83) (2017)

5.2.4 IL-36

IL-36'nın psoriatik lezyonlarda yüksek oranda bulunması nedeniyle psoriasis patogenezinde etkili bir sitokin olabileceği düşünülmektedir (70). Literatürde psoriasislilerde IL-36'nın dolaşımdaki düzeyini inceleyen tek çalışma bulunmaktadır. Çalışmada hasta IL-36 α düzeyleri kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Bulgular psoriasis alt türlerine göre incelendiğinde püstüler psoriasislilerde IL-36 α düzeyi kronik plak psoriasislilere göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.001$) bulunmuş ve IL-36 α 'nın püstüler psoriasis gibi farklı psoriasis alt türleri ile ilişkili olabileceğine dikkat çekilmiştir. Çalışmada ayrıca IL-36 α 'nın PAŞİ skorları ile ilişkisi incelenmiş ve bu iki parametrenin pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (83).

Bu çalışmada literatürde psoriasislilerde plazma IL-36G düzeylerinin incelendiği ilk çalışma olup hasta ve kontrol IL-36G düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durumun IL-36G'nin sadece lezyonda bulunması ya da araştırma grubunun çoğunluğunu oluşturan kronik plak psoriasisle dolaşımda bulunmaması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada ayrıca hastalık şiddeti orta-şiddetli olan hastaların PAŞİ skoru ile plazma IL-36G düzeyi arasında güçlü pozitif korelasyon bulunmuştur. PAŞİ skorlarının düşük hastalık şiddeti grubunda IL-17A ile orta-şiddetli hastalık şiddeti grubunda IL-36G ile pozitif korelasyon göstermesi, hastalık şiddetine bağlı olarak farklı proinflamatuvar sitokilerinin dolaşımdaki düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bu nedenle bu sitokinlerin hastalık şiddeti ile ilişkisinin daha geniş hasta grubu ile ayrıntılı olarak incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, psoriasislilerde periferik kanda *FOXP3* TSDR metilasyon düzeyleri, *FOXP3* mRNA ekspresyon düzeyleri ve seçilmiş sitokinlerin düzeyleri belirlenmiş ve bulguların hastalık şiddeti ve tedavi durumuyla ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda hasta ve kontrol grubunda *FOXP3* TSDR metile durumunda olup, iki grubun erime sıcaklık değerleri ve *FOXP3* mRNA düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Sitokin düzeyleri incelendiğinde IL-10 hastalarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Hastalarda PAŞİ skorlarıyla IL-35 pozitif; hastalık şiddeti düşük olan hastalarda PAŞİ skorlarıyla IL-17A pozitif, *FOXP3* ekspresyonu ile IL-35 negatif; hastalık şiddeti orta-yüksek olan hastalarda PAŞİ skorlarıyla IL-36G ve *FOXP3* ekspresyonu ile IL-17A pozitif korelasyon göstermektedir. Çalışma psoriasislilerde seçilen epigenetik ve inflamatuvar parametrelerin bir arada araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

Bu çalışmadan elde edilen verilerden yola çıkılarak aşağıdakilerin araştırılması faydalı olacaktır:

- HRM-PCR ile elde edilen metilasyon bulgularının, bisülfite sekans ya da pyrosekans analizi gibi nükleotid bazında sonuç veren daha hassas yöntemlerle kıyaslanması, elde edilen sonuçların doğruluğunu gösterecektir.
- Tam kandan elde edilen ekspresyon ve metilasyon sonuçlarının dolaşımdaki Treg hücre miktarını ne kadar yansıttığı, tam kandan Treg hücrelerin izole edilmesiyle elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıyla belirlenebilir.
- Sitokin düzeylerinin akış sitometrisi gibi daha hassas bir yöntemle incelenmesi ve ELISA ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanması, elde edilen sonuçların doğruluğunu yansıtacağı gibi kitler arası sonuç farklılıklarının da yorumlanabilmesini sağlayacaktır.

Sonuç olarak *FOXP3* TSDR metilasyonunun psoriasisteki durumunun daha hassas yöntemlerle incelenmesi gerektiği, incelenen sitokinlerin hastalık şiddetine yönelik önemli göstergeler olabileceği, bunun için çalışmanın daha fazla kişi ve hastalığa yönelik çeşitli gruplandırmalarla incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Perera, GK, Meglio, PD, Nestle, FO. Psoriasis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2012; 7: 385–422.
2. Morikawa, H, Sakaguchi, S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunological Reviews*, 2014; 259: 192–205.
3. Kitagawa, T, Ohkura, N, Sakaguchi, S. Epigenetic control of thymic Treg-cell development. *Eur. J. Immunol.*, 2015; 45: 11–16.
4. Toker, A, Engelbert, D, Garg, G, Polansky, JK, Floess, S, Miyao, T, Baron, U, Düber, S, Geffers, R, Giehr, P, Schallenberg, S, Kretschmer, K, Olek, S, Walter, J, Weiss, S, Hori, S, Hamann, A, Huehn, J. Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *The Journal of Immunology*, 2013; 190: 3180–3188.
5. Polansky, JK, Kretschmer, K, Freyer, J, Floess, S, Garbe, A, Baron, U, Olek, S, Hamann, A, von Boehmer, H, Huehn, J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol*, 2008; 38: 1654–1663.
6. Ngalamika, O, Liang, G, Zhao, M, Yu, X, Yang, Y, Yin, H, Liu, Y, Yung, S, Chan, TM, Lu, Q. Peripheral whole blood FOXP3 TSDR methylation: a potential marker in severity assessment of autoimmune diseases and chronic infections. *Immunological Investigations*, 2015; Early Online: 1–11.
7. Choe, YB, Hwang, YJ, Hahn, HJ, Jung, JW, Jung, HJ, Lee, YW, Ahn, KJ, Youn, JI. A comparison of serum inflammatory cytokines according to phenotype in patients with psoriasis. *British Association of Dermatologists*, 2012;167: 762–767.
8. Michalak-Stoma, A, Bartosinska, J, Kowal, M, Juskiewicz-Borowiec, M, Gerkowicz, A, Chodorowska, G. Serum Levels of Selected Th17 and Th22 Cytokines in Psoriatic Patients. *Disease Markers*, 2013; 35 (6): 625–631.
9. Gresnigt, MS, van de Veerdonk, FL. Biology of IL-36 cytokines and their role in disease. *Seminars in Immunology*, 2013; 25: 458–465.
10. Clavel, G, Thiolata, A, Boissier, M-C. Interleukin newcomers creating new numbers in rheumatology: IL-34 to IL-38. *Joint Bone Spine*, 2013; 80: 449–453.

11. Collison, LW, Workman, CJ, Kuo, TT, Boyd, K, Wang, Y, Vignali, KM, Cross, R, Sehy, D, Blumberg, RS, Vignali, DAA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007; 450: 566–569.
12. Lowes, MA, Suarez-Farinas, M, Krueger, JG. Immunology of Psoriasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014; 32: 227–55.
13. Stern, RS. Psoriasis. *The Lancet*, 1997; 350: 349–353.
14. Bhale Rao J, Bowcock, AM. The genetics of psoriasis: A complex disorder of the skin and immune system. *Hum. Mol. Genet.*, 1998; 7 (10): 1537–1545.
15. Lowes, MA, Bowcock, AM, Krueger, JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 2007; 445 (7130): 866–73.
16. Elder, JT, Bruce, AT, Gudjonsson, JE, Johnston, A, Stuart, PE, Tejasvi, T, Voorhees, JJ, Abecasis, GR, Nair, RP. "Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology", *The Journal of Investigative Dermatology*, 2010; 130 (5): 1213–26.
17. Liang, Y, Sarkar, MK, Tsoi, LC, Gudjonsson, JE. Psoriasis : a mixed autoimmune and autoinflammatory disease. *Current Opinion in Immunology*, 2017; 49: 1–8.
18. Türkiye Psoriasis Tedavi Klavuzu-2016. *Turkderm*, 2016.
19. Mrowietz, U, Kragballe, K, Reich, K, Spuls, P, Griffiths, CEM., Nast, A, Franke, J, Antoniou, C, Arenberger, P, Balieva, F, Bylaite, M, Correia, O, Dauden, E, Gisondi, P, Iversen, L, Kemeny, L, Lahfa, M, Nijten, T, Rantanen, T, Reich, A, Rosenbach, T, Segaert, S, Smith, C, Talme, T, Volc-Platzer, B, Yawalkar, N. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: A European consensus. *Archives of Dermatological Research*, 2011; 303 (1): 1–10.
20. Finlay, AY. Current severe psoriasis and the Rule of Tens. *British Journal of Dermatology*, 2005; 152 (5): 861–867.
21. Cather, JC, Young, M, Bergman, MJ. Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *J Clin Aesthet Dermatol.*, 2017; 10 (3): S16-25.
22. Lynch, M, Kirby, B, Warren, RB. Treating moderate to severe psoriasis - best use of biologics, *Expert Review of Clinical Immunology*, 2014; 10 (2): 269–79.
23. Gaspari, AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2006; 54 (3 SUPPL. 2): 67–80.

24. Bowcock, AM. The Genetics of Psoriasis and Autoimmunity. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2005; 6: 93-122.
25. Villanova, F, Di Meglio, P, Nestle, FO. Biomarkers in psoriasis and psoriatic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2013; 72 Suppl 2: ii104-10.
26. Zhang, P, Su, Y, Lu, Q. Epigenetics and psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2012; 26 (4): 399–403.
27. Bos, JD, De Rie, MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today*, 1999; 1: 40–46.
28. Barker, JNWN. The pathophysiology of psoriasis. *The Lancet*, 1991; 338: 227-230.
29. Liu, Y, Krueger, JG, Bowcock, M. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes and Immunity*, 2007; 8: 1–12.
30. Harden, JL, Krueger, JG, Bowcock, A. The Immunogenetics of Psoriasis: A Comprehensive Review. *J Autoimmun*, 2015; 64: 66–73.
31. Kim, J, Krueger, JG. The Immunopathogenesis of Psoriasis. *Dermatol Clin*, 2015; 33: 13–23.
32. Griffiths, CEM. The immunological basis of psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2003; 17 Suppl 2: 1–5.
33. Kitagawa, Y, Ohkura, N, Sakaguchi, S. Molecular determinants of regulatory T cell development: The essential roles of epigenetic changes. *Front. Immunol.*, 2013; 4, 1–10.
34. Mattozzi, C, Salvi, M, D'Epiro, S, Giancristoforo, S, Macaluso, L, Luci, C, Lal, K, Calvieri, S, Richetta, AG. Importance of regulatory T cells in the pathogenesis of psoriasis: Review of the literature. *Dermatology*, 2013; 227: 134–145.
35. Wing, K, Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.*, 2010; 11 (1): 7–13.
36. Buckner, JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010; 10 (12): 849–859.
37. Lal, G, Bromberg, JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*, 2009; 114 (18): 3727–3735.
38. Nedoszytko, B, Lange, M, Sokolowska-Wojdylo, M, Renke, J, Trzonkowski, P, Sobjanek, M, Szcerkowska-Dobosz, A, Niedozytko, M, Gorska, A, Romantowski, J, Skokowski, J, Kalinowski, L, Nowicki, R. The role of regulatory T cells and genes

involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part I: Treg properties and functions. *Adv Dermatol Allergol*, 2017; 34 (4): 285–294, 2017.

39. Nedoszytko, B, Lange, M, Sokolowska-Wojdylo, M, Renke, J, Trzonkowski, P, Sobjanek, M, Szcerkowska-Dobosz, A, Niedozytko, M, Gorska, A, Romantowski, J, Czarny, J, Skokowski, J, Kalinowski, L, Nowicki, R. The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part II: The Treg role in skin diseases pathogenesis. *Adv Dermatol Allergol*, 2017; 34 (5): 405–417.
40. Soler, DC, McCormick, TS. The Dark Side of Regulatory T Cells in Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2012; 131 (9): 1785–1786.
41. Sakaguchi, S, Miyara, M, Costantino, CM, Hafler, DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2010; 10: 490-500.
42. Katoh, H, Zheng, P, Liu, Y. FOXP3: Genetic and Epigenetic Implications for Autoimmunity. *J Autoimmun*, 2013; 41: 72–78.
43. Fontenot, JD, Gavin, MA, Rudensky, AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 2003; 4 (4): 330-336.
44. Hori, S, Nomura, T, Sakaguchi, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*, 2003; 299: 1057-1061.
45. Bacchetta, R, Passerini, L, Gambineri, E, Dai, M, Allan, SE, Perroni, L, Dagna-Bricarelli, F, Sartirana, C, Matthes-Martin, S, Lawitschka, A, Azzari, C, Ziegler, SF. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006; 116 (6): 1713-1722.
46. Chandra, A, Ray, A, Senapati, S, Chatterjee, R. Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis. *Molecular Immunology*, 2015; 64: 313–323.
47. Zhang, P, Su, Y, Chen, H, Zhao, M, Lu, Q. Abnormal DNA methylation in skin lesions and PBMCs of patients with psoriasis vulgaris. *Journal of Dermatological Science*, 2010; 60: 40–42.
48. Keijsers, RRM, Joosten, I, Hendriks, AGM, Koenen, HJPM, van Erp, PEJ, van de Kerkhof, PCM. Balance of Treg versus T-effector cells during systemic treatment with

- adalimumab and topical treatment with calcipotriol–betamethasone dipropionate ointment. *Experimental Dermatology*, 2015; 24 (1): 65-67.
49. Tone, Y, Furuuchi, K, Kojima, Y, Tykocinski, ML, Greene, MI, Tone, M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.*, 2008; 9 (2): 194–202.
 50. Haiqi, H, Yong, Z, Yi, L. Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells. *Immunobiology*, 2011; 216 (6): 678–685.
 51. Lopez-Pastrana, J, Shao, Y, Chernaya, V, Wang, H, Yang, XF. Epigenetic enzymes are the therapeutic targets for CD4+CD25+/highFoxp3+ regulatory T cells. *Transl. Res.*, 2015; 165 (1): 221–240.
 52. Huehn, J, Polansky, JK, Hamann, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature Reviews Immunology*, 2009; 9: 83-89.
 53. Polansky, JK, Schreiber, L, Thelemann, C, Ludwig, L, Krüger, M, Baumgrass, R, Cording, S, Floess, S, Hamann, A, Huehn, J. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *J Mol Med*, 2010; 88: 1029–1040.
 54. Baron, U, Floess, S, Wieczorek, G, Baumann, K, Grützkau, A, Dong, J, Thiel, A, Boeld, TJ, Hoffmann, P, Edinger, M, Türbachova, I, Hamann, A, Olek, S, Huehn, J. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol*, 2007; 37 (9): 2378-89.
 55. Sawant, DV, Hamilton, K, Vignali, DAA. Interleukin-35: Expanding Its Job Profile. *J. Interf. cytokine Res.*, 2015; 35 (7): 499–512.
 56. Brocker, C, Thompson, D, Matsumoto, A, Nebert, DW, Vasiliou, V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum. Genomics*, 2010; 5 (1): 30–55.
 57. Trifunović, J, Miller, L, Debeljak, Ž, Horvat, V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression - A review. *Biochem. medica*, 2015; 25 (1): 36–48.
 58. Baliwag, J, Barnes, DH, Johnstoni A. Cytokines in psoriasis. *Cytokine*, 2015; 73: 342–350.
 59. Commins, SP, Borish, L, Steinke, JW. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 125 (2 SUPPL. 2): S53–

S72.

60. Speeckaert, R, Lambert, J, Grine, L, Van Gele, M, De Schepper, S, van Geel, N. The many faces of interleukin-17 in inflammatory skin diseases. *Br. J. Dermatol.*, 2016; 175 (5): 892–901.
61. Veldhoen, M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat. Immunol.*, 2017; 18 (6): 612–621.
62. Akdis, M, Burgler, S, Cramer, R, Eiwegger, T, Fujita, H, Gomez, E, Klunker, S, Meyer, N, O'Mahony, L, Palomares, O, Rhyner, C, Quaked, N, Schaffartzik, A, Van De Veen, W, Zeller, S, Zimmermann, M Akdis, CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011; 127 (3): 701–721.
63. Lynde, CW, Poulin, Y, Vender, R, Bourcier, M, Khalil, S. Interleukin 17A: Toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2014; 71 (1): 141–150.
64. Noda, S, Krueger, JG, Guttman-Yassky, E. The translational revolution and use of biologics in patients with inflammatory skin diseases, *J Allergy Clin Immunol*, 2015; 135: 324-36.
65. Kirkham, BW, Kavanaugh, A, Reich, K. Interleukin-17A: A unique pathway in immune-mediated diseases: Psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology*, 2013; 141 (2): 133–142.
66. Molteni, S, Reali, E. Biomarkers in the Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Psoriasis. *Dove Press*, 2012; 2: 55–66.
67. Zhou, XY, Bao, J, Huang, B, Jin, Y. Association between plasma interleukin-17 levels and risk of psoriasis: a meta-analysis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2017; 42 (2): 161–166.
68. Novelli, L, Chimenti, MS, Chiricozzi, A, Perricone, R. The new era for the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis: Perspectives and validated strategies. *Autoimmun. Rev.*, 2014; 13 (1): 64–69.
69. Furue, K, Yamamura, K, Tsuji, G, Mitoma, C, Uchi, H, Nakahara, T, Kiido-Nakahara, M, Kadono, T, Furue, M. Highlighting Interleukin-36 Signalling in Plaque Psoriasis and Pustular Psoriasis. *Acta Derm. Venereol.*, 2018; 98: 5-13.

70. Towne, JE, Sims, JE. IL-36 in psoriasis. *Current Opinion in Pharmacology*, 2012; 12: 486–490.
71. Hahn, M, Frey, S, Hueber, AJ. The novel Interleukin-1 cytokine family members in inflammatory diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2017; 29 (2): 208–213.
72. Foster, AM, Baliwag, J, Chen, CS, Guzman, AM, Stoll, SW, Gudjonsson, JE, Ward, NL, Johnston, A. IL-36 promotes myeloid cell infiltration, activation and inflammatory activity in skin. *J Immunol.*, 2014; 192 (12), 6053–6061.
73. Gabay, C, Towne, JE. Regulation and function of interleukin-36 cytokines in homeostasis and pathological conditions. *J. Leukoc. Biol.*, 2015; 97 (4): 645–652.
74. Johnston, A, Xing, X, Wolterink, L, Barnes, DH, Yin, ZQ, Reingold, L, Kahlenberg, JM, Harms, PW, Gudjonsson, JE. IL-1 and IL-36 are dominant cytokines in generalized pustular psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017; 140 (1): 109–120.
75. Dowlatshahi, EA, Van Der Voort, EAM, Arends, LR, Nijsten, T. Markers of systemic inflammation in psoriasis: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology*, 2013; 169 (2): 266–282.
76. Tian, G, Li, J-L, Wang, D-G, Zhou, D. Targeting IL-10 in Auto-immune Diseases. *Cell Biochem Biophys*, 2014; 70: 37–49.
77. Saxena, A, Khosraviani, S, Noel, S, Mohan, D, Donner, T, Hamad, ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*, 2015; 74 (1): 27–34.
78. Schiopu, A, Wood, KJ. Regulatory T cells: hypes and limitations. *Curr. Opin. Organ Transplant.*, 2008; 13 (4): 333–8.
79. Choi, J, Leung, PSC, Bowlus, C, Gershwin, ME. IL-35 and Autoimmunity: a Comprehensive Perspective. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2015; 49 (3): 327–332.
80. Collison LW, Vignali, DAA. Interleukin-35: Odd one out or part of the family? *Immunol. Rev.*, 2008; 226 (1): 248–262.
81. Nakano, S, Morimoto, S, Suzuki, S, Tsushima, H, Yamanaka, K, Sekigawa, I, Takasaki, Y. Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2015; 54: 1498–1506.

82. Cardoso, P, Lima, E, Lima, M, Rêgo, M, Marques, C, Pitta, I, Duarte, A, Pitta, M. Clinical and cytokine profile evaluation in Northeast Brazilian psoriasis plaque-type patients. *Eur. Cytokine Netw.*, 2016; 27: 1–5.
83. Li, J, Liu, L, Rui, W, Li, X, Xuan, D, Zheng, S, Yu, Y, Zhang, J, Kong, N, Zhu, X, Zou, H, Wan, W, Xue, Y. New Interleukins in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Patients: The Possible Roles of Interleukin-33 to Interleukin-38 in Disease Activities and Bone Erosions. *Dermatology*, 2017; 233 (1): 37–46.
84. Dahl, C, Guldberg, P. High-resolution melting for accurate assessment of DNA methylation. *Clin. Chem.*, 2007; 53 (11): 1877–1878.
85. Bustin, SA, Benes, V, Garson, JA, Hellemans, J, Huggett, J, Kubista, M, Mueller, R, Nolan, T, Pfaffl, MW, Shipley, GL, Vandesompele, J, Wittwer, CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, 2009; 55 (4): 611–622.
86. Nolan, T, Huggett, J, Sanchez, E. Good Practice Guide for the Application of Quantitative PCR (qPCR). LGC, 2013.
87. Ma, L, Xue, H–B, Guan, X–H, Shu, C–M, Wang, F, Zhang, J–H, An, R–Z. The Imbalance of Th17 cells and CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Treg cells in patients with atopic dermatitis. *JEADV*, 2014; 28 (8): 1079–1086.
88. Livak, KJ, Schmittgen, TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 2001; 25 (4): 402–408.
89. Lewis, BJ, Rajpara, S, Haggart, AM, Wilson, HM, Barker, RN, Ormerod, AD. Predominance of activated, clonally expanded T helper type 17 cells within the CD4⁺T cell population in psoriatic lesions. *Clinical and Experimental Immunology*, 2013; 173 (1): 38–46.
90. Karamehic, J, Zecevic, L, Resic, H, Jukic, M, Jukic, T, Ridjic, O, Panjeta, M, Coric, J. Immunophenotype lymphocyte of peripheral blood in patients with psoriasis. *Med Arh*, 2014; 68 (4): 236–8.
91. Yan, KX, Fang, X, Han, L, Zhang, ZH, Kang, KF, Zheng, ZZ, Huang, Q. Foxp3⁺ regulatory T cells and related cytokines differentially expressed in plaque vs. guttate psoriasis vulgaris. *British Journal of Dermatology*, 2010; 163 (1): 48–56.

92. Zhang, L, Yang, XQ, Cheng, J, Hui, RS, Gao, TW. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3⁺ Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clinical Immunology*, 2010; 135: 108–117.
93. Quaglino, P, Bergallo, M, Ponti, R, Barberio, E, Cicchelli, S, Buffa, E, Comessatti, A, Costa, C, Terlizzi, ME, Astegiano, S, Novelli, M, Cavallo, R, Bernengo, MG. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: Modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. *Dermatology*, 2011; 223 (1): 57–67.
94. Wang, X, Wang, G, Gong, Y, Liu, Y, Gu, J, Chen, W, Shi, Y. Disruption of Circulating CD4⁺T-Lymphocyte Subpopulations in Psoriasis Patients is Ameliorated by Narrow-Band UVB Therapy. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014; 71 (1): 499–507.
95. Wang, X, Chen, X, Li, J, Zhang, H, Liu, J, Sun, L. MiR-200a expression in CD4⁺ T cells correlates with the expression of Th17/Treg cells and relevant cytokines in psoriasis vulgaris: A case control study. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 2017; 93: 1158–1164.
96. Sugiyama, H, Gyulai, R, Toichi, E, Garaczi, E, Shimada, S, Stevens, SR, McCormick, TS, Cooper, KD. Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *Journal of Immunology*, 2005; 174 (1): 164–73.
97. Furuhashi, T, Saito, C, Torii, K, Nishida, E, Yamazaki, S, Morita, A. Photo(chemo)therapy Reduces Circulating Th17 Cells and Restores Circulating Regulatory T Cells in Psoriasis. *PLoS ONE*, 2013; 8 (1): 1–9.
98. Kubin, ME, Kokkonen, N, Palatsi, R, Hägg, PM, Väyrynen, JP, Glumoff, V, Haapasaari, K-M, Hurskainen, T, Tasanen, K. Clinical efficiency of topical calcipotriol/betamethasone treatment in psoriasis relies on suppression of the inflammatory TNF α – IL-23 – IL-17 axis. *Acta Dermato-Venereologica*, 2017; 97 (4): 449–455.
99. Wieczorek, G, Asemissen, A, Model, F, Turbachova, I, Floess, S, Liebenberg, V, Baron, U, Stauch, D, Kotsch, K, Pratschke, J, Hamann, A, Loddenkemper, C, Stein, H, Volk, HD, Hoffmüller, U, Grützkau, A, Mustea, A, Huehn, J, Scheibenbogen, C, Olek, S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting

regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Research*, 2009; 69 (2): 599–608.

100. Sherston, SN, Vogt, K, Schlickeiser, S, Sawitzki, B, Harden, PN, Wood, KJ. Demethylation of the TSDR is a marker of squamous cell carcinoma in transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 2014; 14 (11): 2617–2622.
101. Anderson, MR, Enose-Akahata, Y, Massoud, R, Ngouth, N, Tanaka, Y, Oh, U, Jacobson, S. Epigenetic modification of the FoxP3 TSDR in HAM/TSP decreases the functional suppression of Tregs. *J Neuroimmune Pharmacol.*, 2014; 9 (4): 522–532.
102. Paparo, L, Nocerino, R, Cosenza, L, Aitoro, R, Argenio, VD, Di Scala, C, Amoroso, A, Di Costanzo, M, Salvatore, F, Canani, RB. Epigenetic features of FoxP3 in children with cow ' s milk allergy. *Clinical Epigenetics*, 2016; 8: 86.
103. Roesner, LM, Floess, S, Witte, T, Olek, S, Huehn, J, Werfel, T. Foxp3 + regulatory T cells are expanded in severe atopic dermatitis patients. *Allergy*, 2015; 70 (3): 1656-1660.
104. Tatura, R, Zeschnigk, M, Adamzik, M, Probst-Kepper, M, Buer, J, Kehrmann, J. Quantification of Regulatory T Cells in Septic Patients by Real-Time PCR-Based Methylation Assay and Flow Cytometry. *PLoS ONE*, 2012; 7 (11): 1–9.
105. Rodriguez Lopez, CM, Guzman Asenjo, B, Lloyd, AJ, Wilkinson, MJ. Direct Detection and Quantification of Methylation in Nucleic Acid Sequences Using High-Resolution Melting Analysis. *Anal. Chem*, 2010; 82 (21): 9100–9108.
106. Tse, MY, Ashbury, JE, Zwingerman, N, King, WD, Taylor, SAM, Pang, SC. A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. *BMC Research Notes*, 2011; 4 (1): 565.
107. Mencalha, AL, Rodrigues, EF, Abdelhay, E, Fernandez, TS. Accurate monitoring of promoter gene methylation with high-resolution melting polymerase chain reaction using the ABCB1 gene as a model. *Genetics and Molecular Research*, 2013; 12 (1): 714–722.
108. Antunes, J, Silva, DSBS, Balamurugan, K, Duncan, G, Alho, CS, Mccord, B. High-resolution melt analysis of DNA methylation to discriminate semen in biological stains. *Analytical Biochemistry*, 2016; 494: 40–45.

109. Switzeny, OJ, Christmann, M, Renovanz, M, Giese, A, Sommer, C, Kaina, B. MGMT promoter methylation determined by HRM in comparison to MSP and pyrosequencing for predicting high-grade glioma response. *Clinical Epigenetics*, 2016; 8: 49.
110. Daniel, V, Trojan, K, Adamek, M, Opelz, G. IFN γ + Treg in-vivo and in-vitro represent both activated nTreg and peripherally induced aTreg and remain phenotypically stable in-vitro after removal of the stimulus. *BMC Immunol*, 2015; 16 (45): 1-13.
111. Candia, E, Reyes, P, Covian, C, Rodriguez, F, Wainstein, N, Morales, J, Mosso, C, Roseblatt, M, Fierro, JA. Single and combined effect of retinoic acid and rapamycin modulate the generation, activity and homing potential of induced human regulatory T cells. *PLoS ONE*, 2017; 12 (7): 1–32.
112. Zhang, P, Chen, HX, Duan, YQ, Wang, WZ, Zhang, TZ, Li, JW, Tu, YT. Analysis of Th1/Th2 response pattern for erythrodermic psoriasis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 2014; 34 (4): 596–601.
113. Friedrich, M, Döcke, WD, Klein, A, Philipp, S, Volk, HD, Sterry, W, Asadullah, K. Immunomodulation by interleukin-10 therapy decreases the incidence of relapse and prolongs the relapse-free interval in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002; 118 (4): 672–677.
114. Döcke, W-D, Asadullah, K, Belbe, G, Ebeling, M, Höflich, C, Friedrich, M, Sterry, W, Volk, H-D. Comprehensive biomarker monitoring in cytokine therapy: heterogeneous, time-dependent, and persisting immune effects of interleukin-10 application in psoriasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009; 85 (3): 582–93.
115. Szegedi, A, Aleksza, M, Gonda, A, Irinyi, B, Sipka, S, Hunyadi, J, Antal-Szalmás, P. Elevated rate of Thelper1 (TH1) lymphocytes and serum IFN- γ levels in psoriatic patients. *Immunology Letters*, 2003; 86 (3): 277–280.
116. McLoone, PM, Man, I, Yule, S, Fluitman, A, van Loveren, H, Norval, M, Gibbs, NK. Whole-body UVB (TL-01) or UVA-1 irradiation does not alter the levels of immunomodulatory cytokines in the serum of human volunteers. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 2004; 20 (2): 76–80.
117. Verghese, B, Bhatnagar, S, Tanwar, R, Bhattacharjee, J. Serum cytokine profile in psoriasis-a case-control study in a tertiary care hospital from northern India. *Indian J Clin Biochem*, 2011; 26 (4): 373–377.

118. Kaur, S, Zilmer, K, Leping, V, Zilmer, M. Comparative study of systemic inflammatory responses in psoriasis vulgaris and mild to moderate allergic contact dermatitis. *Dermatology*, 2012; 225 (1): 54–61.
119. Hayashi, M, Yanaba, K, Umezawa, Y, Yoshihara, Y, Kikuchi, S, Ishiuchi, Y, Saeki, H, Nakagawa, H. IL-10-producing regulatory B cells are decreased in patients with psoriasis. *J Dermatol Sci*, 2015; 81 (2): 93–100.
120. Sobhan, MR, Farshchian, M, Hoseinzadeh, A. Serum Levels of IL-10 and IL-22 Cytokines in Patients with Psoriasis. *Iran J Immunol*, 2016; 13 (3): 317–323.
121. Deeva, I, Mariani, S, De Luca, C, Pacifico, V, Leoni, L, Raskovic, D, Kharaeva, Z, Korkina, L, Pastore, S. Wide-spectrum profile of inflammatory mediators in the plasma and scales of patients with psoriatic disease. *Cytokine*, 2010; 49 (2): 163–170.
122. Jadali, Z, Izad, M, Eslami, M, Mansouri, P, Safari, R, Bayatian, P, Mirshafiey, A, Salehi Nodeh, A. Th1 / Th2 Cytokines in Psoriasis. *Iranian J Publ Health*, 2007; 36 (2): 87–91.
123. Anderson, KS, Petersson, S, Wong, J, Shubbar, E, Lokko, NN, Carlström, M, Enerbäck, C. Elevation of serum epidermal growth factor and interleukin 1 receptor antagonist in active psoriasis vulgaris. *British Journal of Dermatology*, 2010; 163 (5): 1085–1089.
124. Roussaki-Schulze, AV, Kouskoukis, C, Petinaki, E, Klimi, E, Zafiriou, E, Galanos, A, Rallis, E. Evaluation of Cytokine Serum Levels in Patients with Plaque-Type Psoriasis. *Int J Clin Pharmacol Res*, 2005; XXV (4): 169–173.
125. Szodoray, P, Alex, P, Chappell-Woodward, CM, Madland, TM, Knowlton, N, Dozmorov, I, Zeher, M, Jarvis, JN, Nakken, B, Brun, JG, Centola, M. Circulating cytokines in Norwegian patients with psoriatic arthritis determined by a multiplex cytokine array system. *Rheumatology*, 2007; 46 (3): 417–425.
126. Borska, L, Andrys, C, Krejsek, J, Hamakova, K, Kremlacek, J, Ettler, K, Fiala, Z. Serum levels of the pro-inflammatory cytokine interleukin-12 and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with psoriasis treated by the Goeckerman regimen. *International Journal of Dermatology*, 2008; 47 (8): 800–805.
127. Cordiali-Fei, P, Ardigo, M, Mastroianni, A, Giuliani, A, D'Agosto, G, Bordignon, V, Trento, E, Vento, A, Berardesca, E. Serum Cytokines and Bioumoral Immunological Characterization of Psoriatic Patients in Long Term Etanercept Treatment. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2008; 21: 643–649.

128. Kanda, N, Ishikawa, T, Kamata, M, Tada, Y, Watanabe, S. Increased serum leucine, leucine-37 levels in psoriasis: Positive and negative feedback loops of leucine, leucine-37 and pro- or anti-inflammatory cytokines. *Human Immunology*, 2010; 71 (12): 1161–1171.
129. Indhumathi, S, Rajappa, M, Chandrashekar, L, Ananthanarayanan, PH, Thappa, DM, Negi, VS. T helper-2 cytokine/regulatory T-cell gene polymorphisms and their relation with risk of psoriasis in a South Indian Tamil cohort. *Human Immunology*, 2017; 78 (2): 209–215.
130. Karam, RA, Zidan, HE, Khater, MH. Polymorphisms in the TNF- α and IL-10 gene promoters and risk of psoriasis and correlation with disease severity. *Cytokine*, 2014; 66 (2): 101–105.
131. Jacob, SE, Nassiri, M, Kerdel, FA, Vincek, V. Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators of Inflammation*, 2003; 12 (5): 309–13.
132. Borghi, A, Fogli, E, Stignani, M, Melchiorri, L, Altieri, E, Baricordi, O, Rizzo, R, Virgili, A. Soluble human leukocyte antigen-G and interleukin-10 levels in plasma of psoriatic patients: Preliminary study on a possible correlation between generalized immune status, treatments and disease. *Archives of Dermatological Research*, 2008; 300 (10): 551–559.
133. Takahashi, H, Tsuji, H, Hashimoto, Y, Ishida-Yamamoto, A, Iizuka, H. Serum cytokines and growth factor levels in Japanese patients with psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2010; 35 (6): 645–649.
134. Antiga, E, Del Bianco, E, Difonzo, EM, Fabbri, P, Caproni, M. Serum levels of the regulatory cytokines transforming growth factor-b and interleukin-10 are reduced in patients with discoid lupus erythematosus. *Lupus*, 2011; 20 (6): 556–560.
135. Reddy, M, Torres, G, McCormick, T, Marano, C, Cooper, K, Yeilding, N, Wang, Y, Pendley, C, Prabhakar, U, Wong, J, Davis, C, Xu, S, Brodmerkel, C. Positive treatment effects of ustekinumab in psoriasis: Analysis of lesional and systemic parameters. *Journal of Dermatology*, 2010; 37 (5): 413–425.
136. Murakami, M, Hagforsen, E, Morhenn, V, Ishida-Yamamoto, A, Iizuka, H. Patients with palmoplantar pustulosis have increased IL-17 and IL-22 levels both in the lesion and serum. *Experimental Dermatology*, 2011; 20 (10): 845–847.

137. Yoo, IS, Lee, JH, Song, ST, Kim, JH, Lee, HJ, Kang, SW. T-helper 17 cells: The driving force of psoriasis and psoriatic arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 2012; 15: 531–537.
138. Fotiadou, C, Lazaridou, E, Sotiriou, E, Gerou, S, Kyrgidis, A, Vakirlis, E, Ioannides, D. IL-17A, IL-22, and IL-23 as markers of psoriasis activity: A cross-sectional, hospital-based study. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 2015; 19 (6): 555–560.
139. De Oliveira, PSS, Cardoso, PRG, Lima, EVDA, Pereira, MC, Duarte, ALBP, Pitta, IDR, Rego, MJBDM, Pitta, MGDR. IL-17A, IL-22, IL-6, and IL-21 serum levels in plaque-type psoriasis in Brazilian patients. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–5.
140. Fan, B, Li, X, Ze, K, Xu, R, Shi, R, Geng, L, Li, F, Wang, Y, Chen, J, Li, B. Expression of T-helper 17 cells and signal transducers in patients with psoriasis vulgaris of blood-heat syndrome and blood-stasis syndrome. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2015; 21 (1): 10–16.
141. Zheng, Y, Chen, C, Jia, L, Yu, T, Sun, J. Correlation between microRNA-143 in peripheral blood mononuclear cells and disease severity in patients with psoriasis vulgaris. *Oncotarget*, 2017; 8 (31): 51288–51295.
142. Caproni, M, Antiga, E, Melani, L, Volpi, W, Del Bianco, E, Fabbri, P. Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: A randomized-controlled trial. *Journal of Clinical Immunology*, 2009; 29 (2): 210–214.
143. Niu, X, Cao, W, Ma, H, Feng, J, Li, X, Zhang, X. Acitretin exerted a greater influence on T-helper (Th)1 and Th17 than on Th2 cells in treatment of psoriasis vulgaris. *Journal of Dermatology*, 2012; 39 (11): 916–921.
144. Balato, A, Schiattarella, M, Di Caprio, R, Lembo, S, Mattii, M, Balato, N, Ayala, F. Effects of adalimumab therapy in adult subjects with moderate-to-severe psoriasis on Th17 pathway. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2014; 28 (8): 1016–1024.
145. Bajaj, S, Gautam, RK, Khurana, A, Arora, P, Sharma, N. Effect of narrow band ultraviolet B phototherapy on T helper 17 cell specific cytokines (interleukins-17, 22 and 23) in psoriasis vulgaris. *Journal of Dermatological Treatment*, 2017; 28 (1): 14–17.

146. Luan, L, Han, S, Wang, H, Liu, X. Down-regulation of the Th1, Th17, and Th22 pathways due to anti-TNF- α treatment in psoriasis. *International Immunopharmacology*, 2015; 29 (2): 278–284.
147. Arıcan, O, Aral, M, Sasmaz, S, Ciragil, P. Serum levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators of Inflammation*, 2005; 5: 273–279.
148. Kagami, S, Rizzo, HL, Lee, JJ, Koguchi, Y, Blauvelt, A. Circulating Th17, Th22, and Th1 Cells Are Increased in Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2010; 130 (5): 1373–1383.
149. Kyriakou, A, Patsatsi, A, Vyzantiadis, TA, Sotiriadis, D. Serum levels of TNF- α , IL-12/23p40, and IL-17 in plaque psoriasis and their correlation with disease severity. *J Immunol Res* 2014; 2014: 46754.
150. Yılmaz, SB, Cicek, N, Coskun, M, Yegin, O, Alpsoy, E. Serum and tissue levels of IL-17 in different clinical subtypes of psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 2012; 304 (6): 465–469.
151. Xuan, ML, Lu, CJ, Han, L, Xiang, Y. Circulating levels of inflammatory cytokines in patients with psoriasis vulgaris of different Chinese medicine syndromes. *Chin J Integr Med*, 2015; 21 (2): 108–114.
152. Nakajima, H, Nakajima, K, Tarutani, M, Morishige, R, Sano, S. Kinetics of circulating Th17 cytokines and adipokines in psoriasis patients. *Archives of Dermatological Research*, 2011; 303 (6): 451–455.
153. Nakajima, K, Kanda, T, Takaishi, M, Shiga, T, Miyoshi, K, Nakajima, H, Kamijima, R, Tarutani, M, Benson, JM, Elloso, MM, Gutshall, LL, Naso, MF, Iwakura, Y, DiGiovanni, J, Sano, S. Distinct Roles of IL-23 and IL-17 in the Development of Psoriasis-Like Lesions in a Mouse Model. *The Journal of Immunology*, 2011; 186 (7): 4481–4489.

8. EKLER

EK-1. Gönüllü Bilgilendirme Formu (Kontrol Grubu)

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU (KONTROL GRUBU)

Araştırmanın Adı: Psoriasislilerde Kanda Metilasyon ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

Halk arasında sedef hastalığı olarak bilinen psoriasis, deride kırmızı ve sedefi renkte kabukların varlığı ile izlenen bir hastalıktır.

Bu çalışmada, hastalığınızdan bağımsız olarak sedef hastalığının tanı ve izleminde kullanılabileceği düşünülen bazı belirteçlerin araştırılması hedeflenmektedir. Bu amaçla sizden rutin işlemler için kan alınması sırasında ek olarak 10 ml kan alınacaktır. Kan alınan yerin çevresinde morluk, kızarıklık ve sıcaklık artışı olabilir. Bunun için bölgesel soğutma, kolun yukarı kaldırılması ve antibiyotik tedavisi gerekebilir.

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmaktadır. Çalışmaya 18 yaşından büyük ve kronik plak psoriasis, palmoplantar lokalize psoriasis, palmoplantar püstüler psoriasis, generalize püstüler psoriasis, eritrodermik psoriasis alt gruplarından birine dahil olan hastalar ile sedef hastalığı, sistemik etkilenimi olan bir hastalığı ve ilaç kullanımı olmayan çeşitli sebeplerle dermatoloji polikliniğine gelen kişiler dahil edilecektir. Gönüllülerden alınacak materyallerin artan, çalışmadan elde edilecek sonuçlarla oluşturulabilecek ikinci bir çalışmada kullanılmak üzere saklanacaktır. Çalışmaya 10 gönüllü sağlıklı kişi ve 60 gönüllü hasta alınması hedeflenmektedir.

Sağlıklı kontrol grubuna dahil olacağınız bu çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda, hastalığınız ile ilgili tedaviniz açısından ek bir tıbbi yarar sağlamayacaktır, size zarar verecek bir işlem uygulanmayacaktır.

- Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili masraflar size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum ve kuruluşu ödettirilmeyecektir.
- Gönüllü olarak katılacağınız bu çalışmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahipsiniz. Bu çalışmaya katılmanız ya da çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan ayrılmanız, daha sonraki tıbbi takip ve tedavinizi etkilemeyecektir. Sağlığınız ve araştırmanın gidişatı hakkında araştırmanın her aşamasında bilgi alabilirsiniz.
- Araştırmacı gönüllünün rızasına gerek duymadan olguyu araştırma dışı bırakabilir.

- Bu çalışmada yer almanız durumunda tüm kayıtlarınız gizli tutulacaktır. Kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacı ile toplanacaktır. Çalışma verileri bir yayın ve raporda kullanılırken isminiz belirtilmeyecek ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için gerekli Etik Kurul izni alınmıştır ve araştırma bilgileri ilgili Etik Kurul Komitesine açık olacaktır.

Yukarıda yazılı olan, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum ve anladım. Gerekli açıklamalar sözlü ve yazılı olarak yapıldı. Bu koşullar ile söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın:

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin:

Adı Soyadı:

Telefon Numarası:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının:

Adı Soyadı: Burcu AÇIKGÖZ

Telefon Numarası:

Tarih:

İmza:

EK-2. Gönüllü Bilgilendirme Formu (Hasta Grubu)

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU (HASTA GRUBU)

Araştırmanın Adı: Psoriasislilerde Kanda Metilasyon ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

Halk arasında sedef hastalığı olarak bilinen psoriasis, deride kırmızı ve sedefi renkte kabukların varlığı ile izlenen bir hastalıktır.

Bu çalışmada, hastalığınız ile ilgili almakta olduğunuz/olacağınız tedaviden bağımsız olarak sedef hastalığının tanı ve izleminde kullanılabileceği düşünülen bazı belirteçlerin araştırılması hedeflenmektedir. Bu amaçla tedavi başlangıcından önce ve sekiz hafta sonra sizden rutin işlemler için kan alınması sırasında ek olarak 10 ml kan alınacaktır. Kan alınan yerin çevresinde morluk, kızarıklık ve sıcaklık artışı olabilir. Bunun için bölgesel soğutma, kolun yukarı kaldırılması ve antibiyotik tedavisi gerekebilir.

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmaktadır. Çalışmaya 18 yaşından büyük ve kronik plak psoriasis, palmoplantar lokalize psoriasis, palmoplantar püstüler psoriasis, generalize püstüler psoriasis, eritrodermik psoriasis alt gruplarından birine dahil olan hastalar ile sedef hastalığı, sistemik etkilenimi olan bir hastalığı ve ilaç kullanımı olmayan çeşitli sebeplerle dermatoloji polikliniğine gelen kişiler dahil edilecektir. Gönüllülerden alınacak materyallerin artanı, çalışmadan elde edilecek sonuçlarla oluşturulabilecek ikinci bir çalışmada kullanılmak üzere saklanacaktır. Çalışmaya 10 gönüllü sağlıklı kişi ve 60 gönüllü hasta alınması hedeflenmektedir.

Hasta grubuna dahil olacağınız bu çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda 8 hafta süre ile izlenmeniz gerekmektedir. Yapılacak olan bu araştırma, hastalığınız ile ilgili tedaviniz açısından ek bir tıbbi yarar sağlamayacaktır, size zarar verecek bir işlem uygulanmayacaktır.

- Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili masraflar size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum ve kuruluşu ödettirilmeyecektir.
- Gönüllü olarak katılacağınız bu çalışmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahipsiniz. Bu çalışmaya katılmanız ya da çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan ayrılmanız, daha sonraki tıbbi takip ve tedavinizi etkilemeyecektir. Sağlığınız ve araştırmanın gidişatı hakkında araştırmanın her aşamasında bilgi alabilirsiniz.

- Araştırmacı gönüllünün rızasına gerek duymadan olguyu araştırma dışı bırakabilir.
- Bu çalışmada yer almanız durumunda tüm kayıtlarınız gizli tutulacaktır. Kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacı ile toplanacaktır. Çalışma verileri bir yayın ve raporda kullanılırken isminiz belirtilmeyecek ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için gerekli Etik Kurul izni alınmıştır ve araştırma bilgileri ilgili Etik Kurul Komitesine açık olacaktır.

Yukarıda yazılı olan, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum ve anladım. Gerekli açıklamalar sözlü ve yazılı olarak yapıldı. Bu koşullar ile söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;

Adı Soyadı:

Telefon Numarası:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının;

Adı Soyadı: Burcu AÇIKGÖZ

Telefon Numarası:

Tarih:

İmza:

EK-3. Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/04-25	Tarih: 11.02.2016				
	Yard.Doç.Dr.Harun M.Said'in sorumlusu olduğu "Psoriasislilerde Kanda Metilasyon ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi" isimli klinik araştırmaya ait 27.01.2016 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak;					
	-Çalışma adının "Psoriasislilerde Kanda FOXP3 Geninde TSDR Metilasyonu ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi" olarak değiştirilmesi, ile ilgili belge incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılanadı</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>N.Ş.</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Vesile</i>
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılanadı</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılanadı</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılanadı</i>
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Nihal</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Müge</i>
Doç.Dr.Şeyda Seren INTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Şeyda</i>
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	<i>S.Kızıldağ</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>S.Özkardeşler</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılanadı</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	<i>M.Özkul</i>

EK-4. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Burcu AÇIKGÖZ

TC Kimlik No / Pasaport No:	
Doğum Yılı:	1991
Yazışma Adresi :	
Telefon :	
Faks :	
e-posta :	buracikgoz@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Fizyoloji	Yüksek Lisans	-
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Moleküler Tıp	Yüksek Lisans	-
Türkiye	Anadolu Üniversitesi	Açık Öğretim Fakültesi	Felsefe	Lisans	2016
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2014

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek		

	Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar
