

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

(DOKTORA TEZİ)

**TİP 1 DİYABETLİLERDE IL-22 VE IL-9 İMMÜN CEVABININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÇAĞDAŞ UĞUR ADAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. ALİ OSMAN GÜROL**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI



BEYAN

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



ÇAĞDAŞ UĞUR ADAŞ

İTHAF

Annem, Babam, Eşim ve ailemizin yeni üyesi Çağan Onur'a...

TEŞEKKÜR

Tezimin başından sonuna kadar bana destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali Osman GÜROL'a,

Kapısını bana her zaman açık tutan anabilim dalı başkanı ve enstitü müdürümüz Sayın Prof. Dr. Günnur DENİZ'e,

Fikirlerinden ve bilgisinden her zaman faydalandığım Sayın Prof. Dr. Gülderen Yanıkkaya DEMİREL'e

Çalışmamı laboratuvarında tamamlamam konusunda bana destek olan Sayın Doç. Dr. Meltem KİLERCİK'e

Çalışmamızın şekillenmesine ve çalışma örneklerimizin toplanmasında önemli katkılar sağlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem Sezgin MERİÇLİLER'e,

Çalışmamızın Genetik kısmındaki yardımları için Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cumhuriyet Gökhan EKMEKÇİ ve Sayın Hilal Keskin KARAKOYUN'a, Sayın Erdi KELEŞ'e, Sayın Mehmet ÖZTÜRK'e

Desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ağabeylerim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Metin Yusuf GELMEZ ve Sayın Abdullah YILMAZ'a,

Maddi, manevi her türlü desteği benden eksik etmeyen canım annem Sevdâ ADAŞ, canım babam Şerif Ali ADAŞ'a,

Hayatıma kattıkları anlam için sevgili eşim Gamze ADAŞ'a ve oğlumuz Çağan Onur ADAŞ'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-23600

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Tarihçesi	3
2.1.1. Diabetes Mellitus Nedir?.....	3
2.1.2. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi	3
2.2. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi.....	4
2.3. Diabetes Mellitus'un Tanısı	4
2.4. Diabetes Mellitus Etiyolojik Sınıflandırması	5
2.4.1. İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus.....	7
2.5. T Lenfositleri	7
2.5.1. T lenfositleri Genel Özellikleri	7
2.5.2. T lenfosit Alt Grupları.....	8
2.5.2.1. Th22 ve Tc22 Yardımcı T lenfositlerinin Genel Özellikleri	10
2.5.2.2. Th9 ve Tc9 Sitotoksik T Lenfositleri Genel Özellikleri.....	10
2.5.3. Th22, Th9, Tc22 ve Tc9 Alt Gruplarının Diabetes Mellitus ile İlişkisi.....	11
2.6. Sitokinler	12
2.6.1. Genel Özellikleri	12
2.6.1.1. İnterlökin-22 (IL-22) Sitokini.....	13
2.6.1.2. İnterlökin-9 (IL-9) Sitokini.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15

3.1. Araç ve Gereçler.....	15
3.1.1. Kimyasal Maddeler	15
3.1.2. Aletler.....	16
3.2. Çalışma Grubu.....	17
3.2.1. Tip 1 Diyabetli Olgular	17
3.2.2. Sağlıklı Olgular (Kontrol)	17
3.3. Metod.....	18
3.3.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu	18
3.3.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre Sayımının Yapılması	19
3.3.3. Kültür Medyumunun Zenginleştirilmesi.....	19
3.3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücre Kültürü	19
3.3.5. Hücre Yüzey Boyaması.....	19
3.3.6. Hücre İçi Boyama	20
3.3.7. Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonu ve Hücre İçi Sitokin Tayini.....	20
3.3.8. Plazma İzolasyonu	22
3.3.9. Plazmadan Sitokin Tayin Çalışması ve Analizi.....	22
3.3.10. RNA İzolasyonu.....	24
3.3.11. cDNA Dönüşümü.....	27
3.3.12. Spektrofotometrik Ölçümler	28
3.3.13. Primerlerin Dizaynı ve Primer Dizileri	28
3.3.14. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	29
3.3.15. Gen Ekspresyon Analizi.....	30
3.3.16. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Gruplar Arası İstatistiksel Değerlendirme.....	33
4.1.1. Th22 ve Th9 Hücre Sıklığı Düzeyleri.....	33
4.1.2. Tc22 ve Tc9 Hücre Sıklığı Düzeyleri	34
4.1.3. IL-22 ve IL-9 Plazma Sitokin Düzeyleri.....	35
4.1.4. IL-22 ve IL-9 Gen Ekspresyon Düzeyleri.....	36
4.2. Veriler Arasında İlişkinin İncelenmesi.....	38
4.2.1. Th22 ve Tc22 Hücre Sıklığının IL-22 Plazma Sitokin Düzeyi ile İlişkisi.....	38
4.2.2. Th9 ve Tc9 Hücre Sıklığının IL-9 Plazma Sitokin Düzeyi ile İlişkisi.....	39
4.2.3. Th22 ve Tc22 Hücre Sıklığının IL-22 Gen Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi.....	41

4.2.4. Th9 ve Tc9 Hücre Sıklığının IL-9 Gen Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi	42
4.2.5. IL-22 Plazma Sitokin Düzeylerinin IL-22 Gen Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi	44
4.2.6. IL-9 Plazma Sitokin Düzeylerinin IL-9 Gen Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi...	44
4.2.7. Çalışma Verilerinin Klinik Verilerle İlişkisinin İncelenmesi	45
5. TARTIŞMA	47
KAYNAKLAR	51
HAM VERİLER	57
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	58
ETİK KURUL KARARI	62
PATENT HAKKI İZNİ	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	65
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Diabetes mellitus ve glukoz metabolizması bozukluklarında tanı kriteri	5
Tablo 2-2: Diabetes mellitus etiyolojik sınıflandırması	6
Tablo 3-1: Çalışma grubu ve genel klinik karakterizasyonu	17
Tablo 3-2: Standart hazırlama prosedürü.....	22
Tablo 3-3: Denatürasyon Karışımının Hazırlanması	27
Tablo 3-4: Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	27
Tablo 3-5: cDNA Dönüşüm Protokolü.....	28
Tablo 3-6: Primer dizileri	29
Tablo 3-7: Gerçek zamanlı PZR karışımının hazırlanması	29
Tablo 3-8: Gerçek zamanlı PZR protokolü.....	30
Tablo 3-4-11: Çalışma verilerinin klinik verilerle ilişkisi	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Naif T lenfositinin sitokin uyarımlarıyla alt gruplarına farklılaşması	9
Şekil 3-1: Periferik kan mononükleer hücrelerin ayrımı	18
Şekil 3-2: T lenfosit ve alt grupları kapılama stratejisi.....	21
Şekil 3-3: Boncukla akan hücre ölçerde sitokin tayini prosedürü	24
Şekil 3-4: RNA izolasyon Prosedürü.....	26
Şekil 3-5: Gerçek zamanlı PZR protokol basamakları ve tahmini süresi	30
Şekil 4-1: Gruplar arası Th22 hücre yüzdesinin kıyaslanması	33
Şekil 4-2: Gruplar arası Th9 hücre yüzdesinin kıyaslanması	33
Şekil 4-3: Gruplar arası Tc22 hücre yüzdesinin kıyaslanması	34
Şekil 4-4: Gruplar arası Tc9 hücre yüzdesinin kıyaslanması	34
Şekil 4-5: Gruplar arası IL-22 plazma düzeylerinin kıyaslanması	35
Şekil 4-6: Gruplar arası IL-9 plazma düzeylerinin kıyaslanması	35
Şekil 4-7: Gruplar arası IL-22 mRNA düzeyleri	36
Şekil 4-8: Gruplar arası IL-9 mRNA düzeyleri	36
Şekil 4-9: Gerçek zamanlı PZR'da gen ekspresyon görüntüsü	37
Şekil 4-10: Bir örneğe ait IL-22 ve β_2m CT değerleri	37
Şekil 4-11: Bir örneğe ait IL-9 ve β_2m CT değerleri	37
Şekil 4-12: Th22 hücre yüzdesi- plazma IL-22 (pg/ml) ilişkisi.....	38
Şekil 4-13: Tc22 hücre yüzdesi – plazma IL-22(pg/ml) ilişkisi	39
Şekil 4-14: Th9 hücre yüzdesi- plazma IL-9 (pg/ml) ilişkisi.....	40
Şekil 4-15: Tc9 hücre yüzdesi- plazma IL-9 (pg/ml) ilişkisi.....	40
Şekil 4-16: Th22 hücre yüzdesi- IL-22 deltaCT ilişkisi	41
Şekil 4-17: Tc22 hücre yüzdesi- IL-22 deltaCT ilişkisi	42
Şekil 4-18: Th9 hücre yüzdesi- IL-9 deltaCT ilişkisi	43
Şekil 4-19: Tc9 hücre yüzdesi- IL-9 deltaCT ilişkisi	43
Şekil 4-20: Plazma IL-22 (pg/ml) – IL-22 deltaCT ilişkisi	44
Şekil 4-21: Plazma IL-9 (pg/ml) – IL-9 deltaCT ilişkisi	45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABCC8:	ATP binding cassette C8
ADA:	American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Birliği)
ADCC:	Antibody-dependent cellular cytotoxicity (Antikor bağımlı hücresel sitotoksite)
T _m :	Erime sıcaklığı
A:	Adenin
T:	Timin
G:	Guanin
S:	Sitozin
AHÖ:	Akan hücre ölçer
APC:	Allophycocyanin
APG:	Açlık plazma glukoza
ASH :	Antijen sunan hücre
BLK:	Beta lenfosit-spesifik kinaz
CD:	Farklılaşma kümesi (Cluster of differentiation)
CEL:	Karboksil ester lipaz
CO ₂ :	Karbondioksit
DIDMOAD sendr.:	Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optik atrofi ve sağırılık (deafness) ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu)
DM:	Diabetes Mellitus
DN:	Çift negatif (Double negative)
DNA:	Deoksiribonükleik asit
cDNA:	Komplementer Deoksiribonükleik asit
RNA:	Ribonükleik asit

FACS:	Floresanla aktifleşen hücre ayırma yöntemi
FBS:	Fetal sığır serumu
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
GDM:	Gestasyonel diabetes mellitus
HNF-1 α :	Hepatosit nükleer faktör-1 alfa
HNF-1 β :	Hepatosit nükleer faktör-1 beta
HNF-4 α :	Hepatosit nükleer faktör-4 alfa
IGT:	Bozulmuş glukoz toleransı
IFG:	Bozulmuş açlık glukozu
IFN- γ :	İnterferon-gamma
Ig:	İmmünoglobülin
IL:	İnterlökin
INS:	İnsülin
IPF-1:	İnsülin promotör faktör-1
KCNJ11:	Potassium inwardly-rectifying channel J11
KIR:	Öldürücü hücre immunoglobulin benzeri reseptör (Killer-cell immunoglobulin-like receptor)
KLF11:	Kruppel like factor 11
MCP-1:	Monosit kemoatraktan protein-1
mg/dl:	Miligram/desilitre
ml:	Mililitre
mmol/L:	Milimolar/litre
pmol:	Pikomol
MODY1-10:	Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-10
M.Ö:	Milattan önce
MS:	Multiple skleroz

μ l:	Mikrolitre
n:	Birey sayısı
NeuroD1:	Nörojenik diferansiyasyon 1
NK:	Doğal öldürücü hücre (Natural Killer)
NKT:	Natural killer T (Doğal öldürücü T hücresi)
NOD:	Obez olmayan diyabetik (non-obese diabetic)
OGTT:	Oral glukoz tolerans testi
PAX4:	Paired box 4
PBS:	Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PE:	Phycoerythrin
Pe-Cy5:	Phycoerythrin-cyanine5
Pe-Cy7:	Phycoerythrin-cyanine7
PG:	Plazma glukozu
PKMH:	Periferik kan mononükleer hücreler
PMA:	Phorbol-12-myristate-13-acetate
RANTES:	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
EtOH:	Etanol
Rpm:	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RPMI medium-1640:	Roswell Park Memorial Institute medium-1640
SS:	Standart sapma
Th:	T helper (Yardımcı) lenfosit
Tc:	T sitotoksik lenfositler
TEH	Timik epitelyal hücreler
THR:	T hücre reseptörü
TNF- α :	Tümör nekroz faktör-alfa

TURDEP:	Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Projesi
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
T _m :	Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA:	Komplementar Deoksiribonükleik Asit
RNA:	Ribo Nükleik Asit
OD:	Optik Dansite
CRP:	C-Reaktif Protein
Delta CT:	Karşılaştırmalı Siklus Eşiği (Comperative Cycle Threshold)
ICA:	Adacık hücre Antikoru
Anti-GAD:	Glutamik Asit Dekarboksilaz Antikoru
ÇAA:	Çeyreklerarası Açıklık
gDNA:	Genomik Deoksiribonükleik Asit
ASH:	Antijen Sunucu Hücre
MHC:	Majör histokompatibilite kompleksi
AHR:	Aril hidrokarbon reseptörü
dH ₂ O:	Distile su
IDF:	Uluslararası Diyabet Federasyonu
P:	İstatistiksel anlamlılık
ILC:	Doğal lenfoid hücreler
TGF-β:	Transforming growth factor-Beta
C:	Standart kontrol
ÇAA:	Çeyreklerarası aralık
STAT-6:	Signal transducer and activator of transcription 6
IRF-4:	Interferon regulatory factor 4
HbA1c:	Glikozillenmiş Hemoglobulin A1c

REG:	Regeneration Gene
R:	Korelasyon katsayısı
Δ :	Delta
Ct:	Cycle Threshold (Döngü eşiği)
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik asit
CCR:	C-C Kemokin reseptörü
T-bet:	T-box binding transcription factor
FoxP3:	Forkhead box P3
ROR γ t:	RAR-related orphan receptor gamma
SA-PE:	Streptavidin- Phycoerythrin
Tyk2:	Tirozin Kinaz 2
Jak1:	Janus Kinase 1
β_2 m:	Beta 2 Microglobulin
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FSC-H:	Forward Scatter-Height
FSC-A:	Forward Scatter-Area

ÖZET

Adaş Ç.U. Tip 1 Diyabetlilerde IL-22 ve IL-9 İmmün Cevabının Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2020.

Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM), pankreas beta hücre tahribatı ve insülin direncine sebep olan çeşitli mekanizmalara bağlı metabolik hastalıktır. T lenfositleri alt grubu olan Th22, Th9, Tc22 ve Tc9 lenfositlerinin immün cevabının hastalık patogenezinde önemli bir rol alabileceği düşünülmektedir. Hastalık, bu hücrelerin arasındaki dengenin bozularak pankreatik beta hücrelerine immün atağın başlamasıyla meydana gelen bir süreç olarak bilinmektedir. Çalışmamıza katılan gönüllülerin (n:20 T1DM'li ve n:10 sağlıklı kontrol) periferik kan örneklerinden elde edilen periferik kan mononükleer hücreler (PKMH'ler), PMA ve iyonomisin ile 5 saat kültüre edilerek CD3⁺CD4⁺ (T yardımcı), CD3⁺CD8⁺ (T sitotoksik) hücrelerinin yüzey molekül ekspresyonları, hücre içi IL-22 ve IL-9 sitokin sıklığı ve bu sitokinlerin plazma konsantrasyonları akım sitometrik olarak değerlendirilmiştir. IL-22 ve IL-9 gen ekspresyonları kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edilerek $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplanmıştır. Hasta grupları ve sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında, Tip 1DM'li hastalarda Th22, Th9 hücre yüzdesi ile IL-22 ve IL-9 plazma konsantrasyonları sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksektir (sırasıyla; $p<0,001$, $p=0,002$, $p=0,001$, $p=0,02$). IL-22 ve IL-9 gen ekspresyonları incelendiğinde IL-22 gen ekspresyonunun T1DM'li hastalarda sağlıklılara göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Th22 hücre sıklığı ile plazma IL-22 konsantrasyon arasındaki korelasyon ($p=0,011$; $R=0,456$) pozitif yönde anlamlı derecede korelasyon göstermişlerdir. Bu sonuçlar, T hücre alt grupları ile ürettikleri IL-22 ve IL-9'un T1DM patogenezinde önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, IL-22, IL-9, T hücre 22, T hücre 9

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-23600

ABSTRACT

Adas C.U. Evaluation of Immune Response of IL-22 and IL-9 in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. Istanbul University, Institute of Health Science, Institute of Aziz Sancar Experimental Medicine, Immunology Department, Doctoral Thesis, İstanbul. 2020.

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) is a metabolic disease due to various mechanisms leading to pancreatic beta cell destruction and insulin resistance. It is thought that the immune response of the subgroup of T lymphocytes, Th22, Th9, Tc22 and Tc9, can play an important role in the pathogenesis of the disease. The disease is known as a process that occurs when the immune attack begins with pancreatic beta cells by disrupting the balance between these cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from the volunteers (n: 20 patients with T1DM and n:10 healthy controls) participating in our study were cultured for 5 hours with PMA and ionomycin. Surface molecule expressions, intracellular IL-22 and IL-9 cytokine frequency of CD3⁺ CD4⁺ (T helper) and CD3⁺CD8⁺ cells (T cytotoxic) were evaluated by using flow cytometry as well as concentrations of plasma IL-22 and IL-9 cytokines. IL-22 and IL-9 gene expressions were analyzed by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) and calculated by the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. When compared patient groups and healthy controls, Th22, Th9 cell percentage and IL-22 and IL-9 plasma concentrations were significantly higher in patients with T1DM than in healthy individuals ($p < 0.001$, $p = 0.002$, $p = 0.001$, $p = 0.02$, respectively). When IL-22 and IL-9 gene expressions were examined, it was observed that IL-22 gene expression was approximately 2 times higher in T1DM patients than in healthy subjects. Th22 cell frequency/ concentration of plasma IL-22 correlation ($p = 0.011$; $R = 0.456$) showed a positive correlation. These results suggest that T cell subsets and their products, IL-22 and IL-9, may play an important role in the pathogenesis of T1DM.

Key Words: Diabetes Mellitus, IL-22, IL-9, T cell 22 and T cell 9

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project Number:TDK-2017-23600

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), pankreas beta (β) hücre harabiyetine ve insülin direncine yol açan immün sistem ve idiyopatik mekanizmaların rol alması nedeniyle, insülin salınımı ve/veya insülin direncinde meydana gelen bozukluktan kaynaklanan, progresif süreçli ve tedavi edilmediğinde glukoz seviyesinin kronik olarak normal seviyenin üstünde seyretmesi özelliğini barındıran metabolik hastalıktır [1]. Diyabet hastalarının tüm dünyada 422 milyonun üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Hastalık, tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki ana formda bulunmaktadır. İnsüline bağımlı olmayan T2 DM, hastalığın çok daha yaygın olan formu olup görülme sıklığı % 90'ın üzerindedir [1-3].

Adaptif immünitinin elemanı olan T lenfositleri ve alt grupları T1DM'nin oluşmasındaki en önemli mekanizmalardan biridir. Normal şartlar altında otoreaktif T lenfositleri timusta merkezi tolerans mekanizması ile elemine edilirler. Ancak kalan birkaç otoreaktif T lenfosit bu timik eliminasyondan kaçır ve periferik dolaşıma geçer [4]. Bu otoreaktif hücreler, dengeyi oluşturan diğer hücrelerle etkileşimde bulunamamasına bağlı olarak hastalığın başlaması ve ilerlemesine neden olabilmektedir [5-7].

Yardımcı T lenfositleri CD3 ve CD4 eksprese etmelerinin yanında salgıladıkları IL-9 ve IL-22 sitokinlerine göre Th9 veya Th22 isimlerini alırlar. Sitotoksik T lenfositleri ise CD3 ve CD8 ekspresyonlarının yanında salgıladıkları aynı sitokinlerle Tc9 ve Tc22 olarak isimlendirilirler. Son çalışmalar Th22, Th9, Tc22 ve Tc9 lenfositlerinin otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda efektif rol aldıklarını öne sürmektedir [8]. Th22 ve Tc22 lenfositlerinin romatoid artrit [9], inflamatuvar bağırsak hastalığı [10], atopik dermatit [11, 12] ve multiple skleroz [13] gibi birçok otoimmün hastalıklarda regülatör rol aldıkları gösterilmiştir.

IL-9 salgılayan Th9 lenfositleri de inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Bu hücreler, Th22 lenfositleri gibi diyabetli hastalarda Th17 aktivitesine etki ederek hastalıkta önemli rol almaktadır [14-17].

İnsan otoimmün hastalıklarında Th22 ve Th9 hücreleri arasındaki ilişkiyi açıklayan çalışma az sayıdadır. Son dönemde bu hücrelerin genç T1DM'li hastalarda incelenerek hastalık oluşumunda rol alabileceği vurgulanmıştır [18].

Çalışmamıza daha önce diyabetli hastalarda çalışılmadığı için otoimmünite ile ilgisi olan Tc22 ve Tc9 lenfositleri de dahil edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında gerçekleştirdiğimiz çalışmada, T1DM'li hastalar ve sağlıklı kontrollerden elde edilen periferik kan mononükleer hücreler PMA ve iyonomisin ile 5 saat uyarılarak hücre içi IL-22 ve IL-9 boyamalarıyla $CD3^+CD4^+IL22^+$ Th22, $CD3^+CD4^+IL9^+$ Th9, $CD3^+CD8^+IL22^+$ Tc22 ve $CD3^+CD8^+IL9^+$ Tc9 lenfositlerinin sıklığının saptanması, gen düzeyinde IL-22 ve IL-9 genlerinin ekspresyonları ve plazma düzeyinde bu sitokinlerin miktarlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilecek yeni bulguların klinik datalarla ilişkilendirilmesiyle hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Tarihçesi

2.1.1. Diabetes Mellitus Nedir?

Diabetes mellitus, tamamen veya kısmi insülin eksikliği ve/veya insülin direnciyle karakterize, yağ, karbonhidrat ve protein metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemik kompleks bir metabolizma hastalığıdır. Klinik açıdan, poliüri, polidipsi, polifaji, pruritus gibi bilinen belirtiler ile başlar. Zaman içinde hastalığa spesifik nöropati, retinopati ve nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonlar ile birlikte meydana çıkar. Özellikle insülin bağımsız T2DM klasik belirtileri göstermeyebilir. Bu durumda tanı kan testine göre konulur. İnsüline bağımlı olan T1DM'de ise, klasik belirtiler ile hemen tanı koyulabilir [19].

2.1.2. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi

Diabetes, eski Yunancada “sifon” anlamına gelir ve aşırı idrar yapmak olarak ifade edilmektedir. Mellitus, Yunancada “bal” anlamına gelen “mel” kökünden türetilmiştir [20]. M.Ö. 1500'deki Mısır Ebers Papirusları'nda fazla idrar yapılan, idrarla şeker kaybedilen hastalık olarak tanımlanmıştır. M.Ö. 6. ve 4. yüzyıllarda eski Hint hekimleri bu hastalığı barındıran kişilerin idrarlarının karıncaları ve sinekleri çektiğini fark etmişlerdir. İnceledikleri idrarın tatlı olduğunu saptamışlar ve “Tatlı idrar hastalığı” olarak isimlendirdikleri bu rahatsızlığı bir üriner sistem hastalığı olarak değerlendirmişlerdir. Milattan 200 yıl sonra Kapadokyalı Aretaeus hastalığa “diabetes” adını vermiştir [21]. On sekizinci yüzyılda John Rollo hastalık için, Yunanca ve Latince “bal” anlamına gelen “mellitus” kelimesini kullanan ilk kişi olmuştur. 1815'de Chevreul idrardaki şekerin “glukoz” olduğunu saptamış, 1860 yılında Langerhans, pankreastaki adacık hücrelerini tanımlamıştır. 1889 yılında Mering ve Minkowski pankreatektomiyle diyabet oluşumunu saptayarak şeker hastalığından sorumlu organın pankreas olduğunu göstermişlerdir. 1921'de Banting ve Best insülini keşfetmişlerdir. 1955'de oral antidiyabetik ilaçlar (Tolbutamid) kullanılmaya başlanmış, 1973 yılında saflaştırılmış ve antikor üretimine neden olmayan insülin tipleri geliştirilmiştir. Günümüzde “rekombinant” teknoloji kullanılarak tamamıyla sentez ürünü insan insülinleri ve analogları kullanılmaktadır.

Diabetes mellitus, Aretaeus'dan beri tanısı, tanımı, etiyolojisi ve tedavisinde devamlı değişimler ve gelişimler gösteren komplike bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır [22].

2.2. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi

Diabetes mellitus (DM), tüm toplumlarda ve ırklarda görülebilen bir hastalık olmakla birlikte dünyanın bazı yerlerinde görülme sıklığı daha azdır. Grönland ve Alaska Eskimolarında prevalansı düşük olup saptanan olguların çoğu insüline bağımlı olmayan DM'dir. Buna karşın %55'den fazla prevalansla Amerika'da yaşayan Pima Kızılderilileri ilk sırada yer almaktadır [23].

Batı toplumlarında diyabetin prevelansı hızlı bir şekilde yükselmektedir. Günümüzde Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre dünyada 422 milyonu aşkın diyabet hastası bulunmakta ve bu 2005-2030 yılları arasında ulaşılması beklenen sayıya şimdiden ulaşıldığını göstermektedir.

Ülkemizde ise 1998 yılında tamamlanan ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gözetiminde gerçekleşen Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Proje'sinde (TURDEP-I) diyabetin erişkin popülasyonda (≥ 20 yaş) görülme oranı %7,2 olarak belirtilmiştir. TURDEP-II'de bu sıklık, %90 artış göstererek 2010'da %13,7'ye ulaşmıştır [19, 24].

Tüm diyabetlilerin %90'ından fazlası T2DM olan ülkemizde T1DM'nin prevalansı düşüktür. Çocukluk çağı (≤ 15 yaş) T1DM insidansının 100.000 çocuk için yılda % 2,5-6 arasında olduğu tahmin edilmektedir [25].

2.3. Diabetes Mellitus'un Tanısı

Hastalığın, T1DM tanısı için çoğu zaman OGTT yapılması gerekmemektedir. Tanı kriterleri, venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemiyle gerçekleşen ölçümleri temel almaktadır.

Amerikan Diyabet Birliği'nin (ADA) 2013 kılavuzuna göre, açlık plazma glukoz (APG) seviyesinin 126 mg/dl'nin veya Oral Glukoz Tolerans Testiyle (OGTT) şeker yüklenmesi sonrası 2. saat plazma glukoz seviyesinin 200 mg/dl'nin üzerinde olmasının yanı sıra; poliüri, polidipsi, polifaji gibi diyabetik semptomlarının olması şartıyla herhangi bir zaman içinde ölçülen kan glukoz seviyesinin 200 mg/dl $\geq$ bulunması ile de tanı konulabilmektedir [26].

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre sağlıklı bireylerin açlık durumunda kapiller tam kan glukoz seviyesi venöz plazmadaki düzeye eşittir. Toklukta ise plazmadakinden yaklaşık %11 daha düşük kabul edilmektedir. Diyabet ve glukoz metabolizmasının bozuklukları için revizyonları içine alan yeni tanı kriterleri Tablo 2-1'de görülmektedir.

Glikozillenmiş hemoglobin (HbA_{1c}; A1C) de 2008 yılından beri diyabet tanı kriteri olarak kabul görmektedir. Buna bağlı olarak HbA_{1c}'nin $\geq$ %6,5 olması, diyabet tanısı için yeterli kıstas olarak görülmektedir [19].

Tablo 2-1: Diabetes mellitus ve glukoz metabolizması bozukluklarında tanı kriteri

	Aşık DM	İzole IFG	İzole IGT	IFG + IGT	DM Riski Yüksek
APG ($\geq$ 8 st açlıkta)	$\geq$ 126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	-
OGTT 2.stPG (75 g glukoz)	$\geq$ 200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-
Rastgele PG	$\geq$ 200 mg/dl + Diyabet semptomları	-	-	-	-
A1C	$\geq$ %6.5 ($\geq$ 48 mmol/mol)	-	-	-	%5.7-6.4 (39-46 mmol/mol)

DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2.st PG: 2. saat plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, HbA_{1c}=A1C: Glikozillenmiş hemoglobin A1c, IFG: Bozulmuş açlık glukozu (impaired fasting glucose), IGT: Bozulmuş glukoz toleransı (impaired glucose tolerance).

2.4. Diabetes Mellitus Etiyolojik Sınıflandırması

Özet olarak belirtilen diyabet sınıflandırmasında dört klinik tip bulunmaktadır (Tablo 2-2). Bunlardan üç tanesi (tip 1, tip 2 ve gestasyonel diyabet) birincil, diğerleri (spesifik diyabet formları) ikincil diyabet formları olarak nitelendirilmektedir [19, 27-31].

Tablo 2-2: Diabetes mellitus etiyolojik sınıflandırması

I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β -hücre yıkımı vardır)	
A. İmmün aracılıklı B. İdiyopatik	
II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir)	
III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet.	
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri	
A. β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları) 20. Kromozom, HNF-4α (MODY1) 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2) 12. Kromozom, HNF-1α (MODY3) 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4) 17. Kromozom, HNF-1β (MODY5) 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6) 2. Kromozom, KLF11 (MODY7) 9. Kromozom, CEL (MODY8) 7. Kromozom, PAX4 (MODY9) 11. Kromozom, INS (MODY10) 8. Kromozom, BLK (MODY11) - Mitokondriyal DNA 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu) - Diğerleri B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler - Leprechaunism - Lipoatrofik diyabet - Rabson-Mendenhall sendromu - Tip A insülin direnci - Diğerleri C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları - Fibrokalkülöz pankreatopati - Hemokromatoz - Kistik fibroz - Neoplazi - Pankreatit - Travma/pankreatektomi - Diğerleri D. Endokrinopatiler - Akromegali - Aldosteronoma - Cushing sendromu - Feokromositoma - Glukagonoma - Hipertiroidi - Somatostatinoma - Diğerleri	E. İlaç veya kimyasal ajanlar - Atipik anti-psikotikler - Anti-viral ilaçlar β-adrenerjik agonistler - Diazoksid - Fenitoin - Glukokortikoidler α-İnterferon - Nikotinik asit - Pentamidin - Proteaz inhibitörleri - Tiyazid grubu diüretikler - Tiroid hormonu - Vacor - Diğerleri (post transplant diyabet) F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları - Anti-insülin reseptör antikorları "Stiff-man" sendromu - Diğerleri G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar - Alström sendromu - Down sendromu - Friedreich tipi ataksi - Huntington korea - Klinefelter sendromu - Laurence-Moon-Biedl sendromu - Miyotonik distrofi - Porfiria - Prader-Willi sendromu - Turner sendromu - Wolfram (DIDMOAD) sendromu - Diğerleri H. Enfeksiyonlar - Konjenital rubella - Sitomegalovirus - Koksaki B - Diğerleri (adenovirus, kabakulak)

HNF-1 α : Hepatosit nükleer faktör-1 α , MODY1-10: Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-10 (maturity onset diabetes of the young 1-10), HNF-4 α : Hepatosit nükleer faktör-4 α , IPF-1: İnsülin promotör faktör-1, HNF-1 β : Hepatosit nükleer faktör 1 β , NeuroD1: Nörojenik diferansiyasyon 1, BLK: Beta lenfosit-spesifik kinaz, DNA: Deoksi-ribonükleik asit, DIDMOAD sendr.: Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optik atrofi ve sağırılık (deafness) ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu), KLF11: Kruppel like factor 11, CEL: Carboxyl ester lipase (bile salt-dependent lipase), PAX4: Paired box4, ABCC8: ATP binding cassette C8, KCNJ11: Potassium inwardly-rectifying channel J11, INS: İnsülin.

2.4.1. İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus

İnsüline bağımlı diabetes mellitus (T1DM), pankreas β hücre harabiyeti veya fonksiyon bozukluğu sebebiyle mutlak insülin yetersizliği sonucu meydana gelen, başta karbonhidrat mekanizmasına bağlı bozukluklarla başlayan, tedavi edilmediğinde ketoasidoza ve ölüme sebep olan bir süreçtir. T1DM tedavisi için kesin bir çözüm şu ana kadar bulunamamıştır. Ancak yaşam kalitesini arttırmak adına insülin enjeksiyonları, diyet, eğitim, egzersiz, evde kan glukoz ve keton takibi gibi çoklu uygulamalar yapılmaktadır. Her yaşta ortaya çıkabilmesine rağmen en sık çocukluk çağı ve ergenlikte görülmektedir [32].

2.5. T Lenfositleri

2.5.1. T lenfositleri Genel Özellikleri

Yetişkinlerde bütün kan hücreleri kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden köken alırlar [33]. T lenfositler dışındaki tüm kan hücreleri kemik iliğinde olgunlaşırken; T lenfositleri oluşturacak olan progenitör hücrelerin olgunlaşmaları timusta gerçekleşmektedir [34]. Ancak, knock out farelerde yapılan çalışmalarda bağırsak mukozasındaki “cryptopatch” olarak adlandırılan özelleşmiş yapılarda da T hücre gelişimi bildirilmiştir [35].

T lenfositlerinin gelişimi timusun değişik stromal hücrelerinden oluşan çoklu mikro çevre tarafından desteklenir. Bu mikro çevre, timik stromal hücreler, timik epitelyal hücreler (TEH) ve diğer hücrelerden oluşur. Bunlar da mezenşimal hücreler, endotelyal hücreler, dendritik ve makrofaj gibi hemapoetik hücrelerdir. TEH hücreler, kortikal ve medullar epitelyal hücreler olmak üzere iki çeşittir ve üçüncü farengiyal boşluğun endoderminden köken alırlar [36].

Lenfoid progenitör hücreler kan dolaşımından ayrılıp, timusa yerleştikten sonra T hücre gelişim aşamaları başlar. Timusta bir seri proliferasyon ve olgunlaşma aşamaları geçirirler. Her bir aşama olgunlaşmaya katkıda bulunan hücre yüzey molekülleri ile karakterize edilir. T lenfosit gelişmesine katkısı olan her bir olayın, timusun farklı anatomik bölgelerinde gerçekleştiği bildirilmiştir. T lenfositlerinin pozitif seleksiyonu öncelikle timusun korteksinde gerçekleşir. Negatif seleksiyonun ise timusun medulla kısmında gerçekleştiği düşünülmektedir. Negatif seleksiyon medulladaki epitelyal hücreler ve dendritik hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir [37].

Timusa giren öncül hücrelerin CD4 ve CD8 yüzey molekülü bulunmamaktadır. Timustaki T lenfosit öncülleri gelişim aşamasına göre üç sınıfa ayrılabilirler.

Bunlar;

- i) Çift negatif hücreler ($CD4^-$, $CD8^-$)
- ii) Çift pozitif hücreler ($CD4^+$, $CD8^+$)
- iii) Tek pozitif hücreler ($CD4^+$, $CD8^-$ veya $CD4^+$, $CD8^+$) [38, 39].

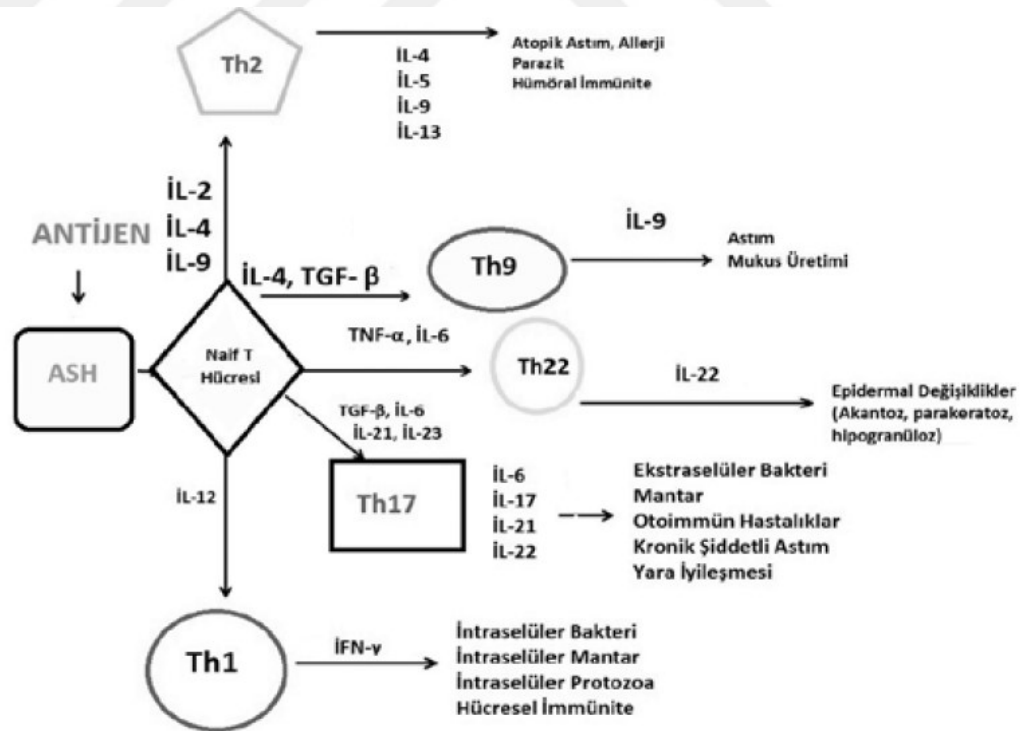
T hücreleri timusu terk ettiğinde ikincil lenfoid organlarda dolaşır. Antijen ile henüz etkileşime girmemiş bu hücrelere naif T hücreleri denir. Naif T hücresi özgül antijeni ile karşılaşmazsa lenfoid dokuyu terk eder ve tekrar kan dolaşımına katılır. Naif T hücresi antijen sunucu hücre (ASH) ile temas edince proliferasyon ve farklılaşma programı efektör T hücrelerine dönüştürür. Böylece antijene karşı hızlı yanıt verir hale gelir. Naif ve aktif T hücreleri arasındaki fark hücre yüzeyindeki kemokin reseptörleri ve integrin ekspresyonudur. $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücreleri fonksiyonel olgunluğa ulaşmak için benzer farklılaşma sürecine uğrar fakat enfeksiyona karşı edinsel immün cevapta farklı roller oynarlar. Her iki serinin naif hücreleri T hücre reseptörü (THR) ile peptid Majör histokompatibilite (MHC) kompleksi etkileşimi aracılığıyla aktifleşir. Farklılaşma, THR'ün sinyal gücü, diğer T hücre yüzey reseptörleri ile etkileşen ligandların eş-uyarımı ve antijenle karşılaşma sırasında lokal sitokin ortamı gibi şartlardan etkilenir. Bu sinyallerin bir araya gelmesi ile imza transkripsiyon faktörleri ve anahtar efektör moleküllerin ekspresyonu güçlenerek olgun T hücrelerinin fonksiyonlarını göstermesi sağlanır [40].

2.5.2. T lenfosit Alt Grupları

Pozitif ve negatif seleksiyon (self antijenleri yabancı olandan ayırt etme yeteneği) safhalarını geçirdikten sonra olgun T hücreler ($CD4^+$ T lenfosit ve $CD8^+$ T lenfosit) olarak periferik dolaşıma geçerler. Periferik kanda total kan lenfositlerin %60-%80 kadarını T hücreleri oluştururken bunların üçte ikisi $CD4^+$, üçte biri $CD8^+$ yüzey belirteçlerini taşır. Naif $CD4^+$ T hücreleri, salgıladıkları sitokinlere göre farklı alt gruplara ayrılır. Bunlar Th1, Th2, Th9, Th17 ve Th22 hücreleridir. Bu alt grupların farklı özellikleri vardır. Th1 aracılı immün yanıt, hücre içi mikroorganizmalara karşı fagosit aracılı savunmada yer alır. Th2 aracılı immün yanıt ise, helmint enfeksiyonlara karşı, IgE ve eozinofil-mast hücresi aracılı immün yanıtı güçlendirir.

Son yıllarda araştırmacılar, farklı sitokinler salgılayan yardımcı T hücrelerini tanımlamıştır. 2009 yılında, bol miktarda IL-22 salgılayan, Th17 hücrelerinden farklı tipte bir CD4 T hücre alt tipi tanımlanmıştır. Bu hücreler, Th22 hücreleri olarak adlandırılmıştır. IL-22'nin kaynağının bu T hücre tipi ve Th17 olduğu anlaşılmıştır. Th22 hücrelerinin cilde yerleşen CCR4, CCR10 reseptörleriyle birlikte CCR10 reseptörlerini de yüzeylerinde eksprese ettikleri belirtilmiştir. Bu tanımlamadan sonra Th22 hücreleriyle ilgili yapılan çalışmaların sayısı artmıştır [41].

CD4 T lenfositleri salgıladıkları sitokinlere göre isim alırlar. IL-12 ile uyarıldıklarında IFN- γ salgılayan hücreler Th1, IL-4 ile uyarıldığında IL-5 ve IL-13 salgılayan hücreler Th2, IL-9 salgılayan hücreler Th9, IL-6 ve TNF- α ile uyarıldıklarında IL-22 salgılayan hücreler Th22 olarak isimlendirilirler. Aynı isimlendirme CD8 T lenfositleri için de geçerlidir. Bu hücreler de salgıladıkları sitokinlere bağlı olarak Tc kısaltmasının yanına salgılanan sitokinin rakamını alırlar. [42]. Naif T lenfositlerinin uyarımlara bağlı alt grup farklılaşmaları Şekil 2-1'de gösterilmiştir.



Şekil 2-1: Naif T lenfositinin sitokin uyarımlarıyla alt gruplarına farklılaşması

2.5.2.1. Th22 ve Tc22 Yardımcı T lenfositlerinin Genel Özellikleri

Th22 hücrelerinin keşfiyle birlikte IL-22'nin büyük miktarda Th22 hücreleri tarafından salgılandığı anlaşılmış ve Th17 hücrelerden belirgin farklarla ayrıldığı vurgulanmıştır. Bunlar:

- a) Th22 hücreleri, Th17 hücrelerinden farklı olarak sadece IL-22 salgılamaktadır. Th17 hücreleriye IL-22'nin dışında IL-17, IL-4, IFN- γ salgılamaktadır [41, 42].
- b) Th17 hücrelerinin farklılaşması retinoid-related orphan C reseptörü üzerinden olurken, Th22 hücrelerinin farklılaşması aril hidrokarbon reseptörü üzerinden olmaktadır [43].
- c) Aril hidrokarbon reseptör (AHR) transkripsiyon faktörünün uyarılması IL-22 salgılanmasını uyarırken, IL-17 salgılanmasını inhibe eder [43].
- d) Th17 hücrelerinden farklı olarak CCL20 eksprese etmezler [44]. Th22 hücreleri; CD3, CD4 belirteçlerini yüzeylerinde eksprese ederler, CD8 hücrelerin belirteçlerini eksprese etmezler. Th22 hücreleri üzerlerinde ayrıca CCR4, CCR6 ve CCR10 reseptörlerini taşır [45].

CD4 ve CD8 eksprese eden lenfositler IL-22 üretebilirler. CD8⁺IFN- γ IL-17IL-22⁺ T lenfositleri Tc22 olarak tanımlanırlar. Normal deriye kıyasla, sedef lezyonları bulunan deride Tc22 hücre miktarının önemli derecede daha fazla olduğu görülmüştür [46, 47].

AHR'in CD8 farklılaşmasındaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Ancak AHR eksik farelerde, THRA β ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ intestinal intraepitelyal T lenfositlerinin sayısının 8 kattan daha fazla azaldığı gösterilmiştir [47].

Son dönemde Tc9 lenfositleri de çalışmalarda CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerinin IL-9 sitokini salınımıyla immünitede görev aldığı düşünülmektedir. Bu hücreler de TGF- β and IL-4 varlığında STAT6 ve IRF4 transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle bu hücrelere farklılaşırlar [14].

Th22 ve Tc22'nin Miyastini gravis [48], kolorektal kanser [49] gibi hastalıklarla ilişkilendirildiği çalışmalarla desteklenmiştir.

2.5.2.2. Th9 ve Tc9 Sitotoksik T Lenfositleri Genel Özellikleri

T lenfositlerinin CD4⁺ alt grubu salgıladığı IL-9 sebebiyle Th9, CD8⁺ alt grubu ise Tc9 hücre alt grupları olarak isimlendirilirler [50]. Th9 Naif CD4 T hücresi, TGF- β and IL-4 varlığında transkripsiyon faktörleri PU.1/Spi-1 ve IRF4'ün uyarılmasıyla Th9

hücresine dönüşmektedir. Bu hücreler T-bet, Gata-3, ROR γ t ve FoxP3 eksprese etmezler [51, 52]. Bu hücrelerin farklılaşmasında görev alan sinyal molekülleri ve transkripsiyon faktörleri hala araştırılmaktadır. Th2 hücreleriyle yakından ilişkilidirler, ancak bu hücreler gibi IL-4, IL-5, ve IL-13 salgılamazken IL-10 ve IL-21 salgılamaktadırlar. [51-56].

Her iki hücre grubunun kanser oluşum mekanizmaları [57-59], atopik dermatit [11], aortic diseksiyon hastaları [60], akut koroner sendromu [61], hava yolu enflamasyonları [62] gibi birçok hastalıkla ilişkisi olduğu vurgulanmaktadır.

2.5.3. Th22, Th9, Tc22 ve Tc9 Alt Gruplarının Diabetes Mellitus ile İlişkisi

Otoimmün diyabet olan T1DM T lenfositleri, B lenfositleri, makrofajları, dentritik hücreleri kapsayan ve β hücre yıkımına neden olan otoimmün bir komplikasyon olarak bilinir [63]. Sitokinler bu hücrelerden üretilir ve β hücre yıkımında ve regülasyonunda önemli rol oynarlar. Çalışmalar IL-22 sitokininin IL-1 β salınımını artırarak T2DM'lilerdeki adipoz doku inflamasyonunda önemli bir yeri olduğunu göstermiştir [64]. Ancak başka bir çalışmada IL-22 serum seviyesi normal kontrollere göre diyabetik hastalarda daha düşük bulunmuştur [65]. Ayrıca IL-22 Regenerating (Reg) gen ekspresyonunu adacıklarda artırarak β hücre rejenerasyonunu tetikleyebilir ve apoptozu engelleyebilir. Sonuç olarak, bu sitokinler inflamasyonu hem tetikleyerek hem de düzenleyerek adacıklardaki insulin üreten β hücrelerini koruyabilirler [66]. Başka bir çalışmada Th17 ve Th22'nin, T1DM'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre önemli derecede yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu hastalarda Th22 hücreleri Th17 hücreleri ile pozitif ilişki göstermiştir. Ancak serumda IL-17 ve IL-22 arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Bu bulgular Th22'nin T1DM patogeneze katkıda bulunabileceğine dikkati çekmektedir [67].

Son yapılan çalışmalar, Th1, Th17 ve Th22 hücrelerinin hem periferik sıklığının hem de toplam miktarının, koroner ateroskleroz kalp hastalığı olan diyabetli hastalarda fazlasıyla yüksek bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada proinflamatuvar Th hücrelerinin, özellikle Th22'nin, diyabetlilerde kardiyovaskular komplikasyonları arttırdığı vurgulanmıştır [68]. Bir diğer çalışma da ise obez ve T2DM'lilerde Th22 sıklığı ve IL-22 konsantrasyonunun yükseldiği gösterilmiştir [69]. Buna ek olarak, bazı çalışmalarda IL-17 sitokini ve Th1/Th2 oranlarının T1DM'lilerde önemli rolleri olduğu vurgulanmıştır [70-73]

Bazı verilerle Th22'nin diabetik retinopatide rol alabileceği belirtilmiş ve Reg genlerini regüle ettiği bilinen IL-22 sitokin serum düzeyinin diyabet hastalarında sağlıklılara göre daha düşük olduğu saptanmıştır [65].

IL-22 pankreasta REG gen ailesinin üyelerinin ekspresyonunun artmasını sağlayarak koruyucu rol oynayabilir. Reg proteinlerinin adacık büyümesini, farklılaşmasını ve beta hücre apoptozunun önlenmesini sağladığı birçok çalışmada gösterilmiştir [74-76]. Özellikle Reg1, Reg2 ve Reg3δ genlerinin, streptozotosin ile diyabet yapılmış farelerde ekspresyonunun yükseldiği ve beta hücre rejenerasyonu ve insülin üretimiyle artan bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır [77-80].

Yapılan bir çalışmada genç diyabetli hastalarda Th9 ve Th22 immün cevabı izlenerek IL-9 ve IL-22 serum düzeyleriyle korelasyonları incelenmiş ve bu hücre ile sitokinlerin T1DM'deki patogenezi araştırılmıştır [18]. Ayrıca serumda biyobelirteç saptamak için yapılan çalışmalarda IL-22 ve IL-9 sitokinlerinin diyabet patogenezinde rol alabilecekleri belirtilmiştir [65, 81, 82]. Bu hücre ve sitokinlerinin görevleri henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte çalışmalar devam etmektedir.

2.6. Sitokinler

2.6.1. Genel Özellikleri

Sitokinler, birçok hücre tarafından salınan, immün ve inflamatuvar reaksiyonların aracıları olarak görev alan sinyal proteinleridir. İmmün sistem hücreleri arasındaki iletişimde, hedef hücre yüzeylerindeki veya çözülmüş halde bulunan, kendilerine özgü reseptörlere bağlanıp hedef hücredeki gen ekspresyonunda değişikliklere neden olarak etkinlik göstermektedirler. Birçok sitokin, sentezlendikleri hücre üzerine etki yaparken (otokrin), bazı sitokinler ise yakınındaki hücrelere etki etmektedirler (parakrin). Ayrıca kan dolaşımına katılarak uzaktaki hücrelere etki eden endokrin sitokinler de mevcuttur.

Genel olarak sitokinler, pleiotropik (aynı sitokin birden çok hücre üzerine etkisi) ve redundant etki (birbirinden farklı sitokinlerin aynı hücre üzerinde benzer etkisi) göstermektedirler. Doğal immünitede, makrofaj ve NK hücreleri tarafından salınırken, edinsel immünitede genellikle T lenfositleri tarafından salgılanmaktadır. Vücuda dışarıdan girerek enfeksiyona neden olabilecek patojenlere karşı efektif ve güçlü bir yanıt oluşmasında sitokinlerin rolü büyüktür. Bunun aksine sitokinlerin aşırı oranda

salgılanması da vücutta birçok otoimmün bozukluğa neden olabilmektedir. Bu nedenle, sitokin üretiminde ve salgılanmasında denge sağlamak için dışarıdan yapılan sitokin desteği ve/veya inhibisyonu ile farklı tedavi stratejileri geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Sitokinlerin genel işlevleri:

- Lenfoid hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını sağlamak,
- İmmün cevabı arttırarak ve/veya baskılayarak düzenlemek,
- İnflamasyona katılan hücreleri aktiveleştirme, reaksiyon bölgesine çağırarak biyolojik etkilerini göstermek,
- Kemik iliğini etkileyerek hematopoietik düzenlemeye katılmak,
- Bazı hipofiz hormonlarının, biyolojik maddelerin sentez ve salınımını sağlamak [83].

2.6.1.1. İnterlökin-22 (IL-22) Sitokini

IL-22, ilk olarak 2000 yılında uyarılmış kemirgen timik T hücre hattında tanımlanmamış sitokinlerin taraması yapılırken keşfedilmiştir [84, 85]. Yapılarının %22'si kemirgen IL-10'u ile benzerlik gösterdiği için IL-10 ilişkili T hücre kökenli uyarılabilir faktör olarak bilinirler. Fare ve insan IL-22'si %79 benzerlik gösterir ve IL-22 geni insan 12. kromozomunda yer alır [86]. IL-22, 147 aminoasit uzunluğunda IL-10 süper ailesinde 2 α -helikal glikozillenmiş sitokin olarak sınıflandırılır [87]. Buna ek olarak, IL-22 sinyalleri IL-22R α 1 alt birimi ve ortak IL-10R β 2 ile sağlanmaktadır [87, 88].

Diğer sınıf 2 sitokine benzer olarak, IL-22 dimerlere dönüşür ve iki IL-22R α 1 alt birimine bağlanır. Bağlanma gerçekleştiğinde, STAT3'un aktivasyonuna sebep olan Jak1 ve Tyk2 tirozin kinazlarının fosforilasyonunu tetikler [89].

Kazanılmış immün sistemde IL-22, $\gamma\delta$ T hücreleri, doğal öldürücü T hücreler (NKT), Th1 hücreler, özellikle Th17 hücreler ve Th22 hücreleri tarafından üretilir [90]. Doğal immün sistemde IL-22 mast hücreleri ve doğal lenfoid hücreler (ILCs) tarafından üretilmektedir [91].

IL-22 genellikle IL-6 + TGF- β tarafından uyarılır [92]. Kritik transkripsiyon faktörü AHR'dir [93].

2.6.1.2. İnterlökin-9 (IL-9) Sitokini

IL-9 T hücre kökenli sitokin olup Treg, Th1, Th17 ve Th9 alt gurplardan üretilir. TGF- β ve IL-4, IL-9 üretimini arttırırken IFN γ 'yı inhibe eder [94]. Bu bulgu, Th9 hücrelerinin bilinen T hücre alt gruplarının dışında farklı transkripsiyon faktörü olduğunu göstermektedir [51, 52].

IL-1 ailesi üyeleri IL-9 üretimine katkıda bulunabilir. Ayrıca bu sitokin belli şartlar altında IL-33, T hücrelerinde IL-9 sitokinin salınımını arttırmaktadır [95-97]. IL-1 ailesi, IL-9 geninin aktivatörü olan NF- κ B (nuclear factor- κ B) aktivasyonunu indüklemektedir [98].

Bu sitokin pleotropik etki göstererek T hücre alt gruplarına etki eder ve alerji ve otoimmün hastalıkların immün cevabının düzenlenmesinde önemli rol oynar [99-102]. Ancak IL-9'un anormal salınımı ve ekspresyonunun SLE'li hastalarda var olup olmadığı hala bilinmemektedir, proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar aktiviteleri de henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bazı çalışmalarda, SLE hastalarında IL-9 seviyesinin ekspresyonu ile CD4⁺IL-9⁺ T hücrelerinin yüzdelerinin hastalıkla ilişkisinin daha açık şekilde ortaya konması amaçlamıştır [103, 104]. Ayrıca IL-9 serum düzeyinin diyabetli hastalarda sağlıklılara göre anlamlı derecede yüksek olduğu başka bir çalışmayla vurgulanmıştır [105].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Anti-Human CD3 Pe-Cy5/CD4 PE/CD8 FITC Kokteyl Monoklonal antikoru
(Biolegend, San Diego, ABD)

Alexa Flour 647 Anti-Human IL-9 Monoklonal antikoru (Biolegend, San Diego, ABD)

Pe-Cy7 Anti-Human IL-22 Monoklonal antikoru (Biolegend, San Diego, ABD)

Legendplex Human Th cytokine Mix and Match Subpanel (Biolegend, San Diego, ABD)

RPMI 1640 with L-Glutamine kültür medyumunu (Capricorn, Ebsdorfergrund, Almanya)

Lymphocyte Separation Medium (Capricorn, Ebsdorfergrund, Almanya)

Penisilin&streptomisin (Gibco, Birleşik Krallık)

FBS (Gibco, Birleşik Krallık)

True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, San Diego, ABD)

Brefeldin A Solüsyonu (1,000X) (Biolegend, San Diego, ABD)

PMA (Sigma, St. Louis, ABD)

Ionomycin calcium salt (Sigma, St. Louis, ABD)

DMSO (Sigma, St. Louis, ABD)

Steril PBS (Sigma, St. Louis, ABD)

Steril distile su

Forward ve reverse Primerler (Sentegen Biyotek.,Ankara, Türkiye)

RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Almanya)

Transcriptor First Strand cDNA kit (Roche, Mannheim, Almanya)

LightCycler 480 Syber green I master (Roche, Mannheim, Almanya)

3.1.2. Aletler

Akan hücre ölçer (FACSCanto II 4/2/2, Becton Dickinson, ABD)

Kan sayım Cihazı (XE-2100, Sysmex, Japonya)

%5 CO₂'li Etüv (FN 400/500, Nüve, Türkiye)

Santrifüj (NF 800/800R, Nüve, Türkiye)

Light Cycler 480 Real Time-PCR cihazı (Roche, Almanya)

Veriti 96 Well Thermal Cycler PZR Cihazı (Applied Biosystems, ABD)

NanoPhotometer Pearl Spektrofotometre (Implen, Almanya)

+4°C buzdolabı, -20 °C ve -80°C derin dondurucu

5 ml'lik polistren tüp

Mikropipetler (10'luk, 100'lük, 1000'lik)

Steril pipet uçları (10'luk, 100'lük, 1000'lik)

50 ml ve 15 ml'lik tüpler

Heparinli ve EDTA'lı 10 ml'lik kan tüpleri

Pastör pipetleri

0,5'lik, 1'lik, 1,5'lik polimeraz zincir reaksiyon tüpleri

96 kuyucuklu plaklar

3.2. Çalışma Grubu

27.03.2017-24.12.2017 tarihleri arasında Kadıköy Acıbadem Hastanesi, Endokrinoloji Bölümü, Diyabet Kliniği'nin sağladığı gönüllü hasta ve sağlıklı bireylerden 10'ar ml heparinli ve EDTA'lı periferik kan örnekleri alınarak çalışmanın deneysel kısımlarının gerçekleşeceği Acıbadem Labmed Laboratuvarına gönderilmiştir. Heparinli kandan periferik kan mononükleer hücreler (PKMH'ler) elde edilmiş ve ardından uyarım yapılarak PKMH'lerin bir kısmının hücre yüzey molekül ekspresyonu ve hücre içi sitokin içeriği akan hücre ölçer ile tayin edilmiş, diğer kısmının ise gen ekspresyonları gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile incelenmiştir. EDTA'lı kanlardan elde edilen plazmalardan akan hücre ölçer ile sitokin düzeyleri saptanmıştır.

3.2.1. Tip 1 Diyabetli Olgular

Çalışmaya katılmayı kabul ettiğine dair aydınlatılmış onam formunu imzalamış T1DM tanısı konmuş, ICA ve Anti-GAD pozitif herhangi bir malignite durumu ve/veya kronik rahatsızlığı olmayan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir (10 erkek - 10 kadın) (Tablo 3-1).

3.2.2. Sağlıklı Olgular (Kontrol)

T1DM'li hastalar ile benzer yaş aralığına sahip, ICA ve Anti-GAD negatif herhangi bir malignite durumu ve/veya kronik rahatsızlığı olmayan bireyler çalışmaya dahil edilmiş ve gönüllülerden çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair aydınlatılmış onam formunu imzalatılmıştır. (5 erkek - 5 kadın) (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Çalışma grubu ve genel klinik karakterizasyonu

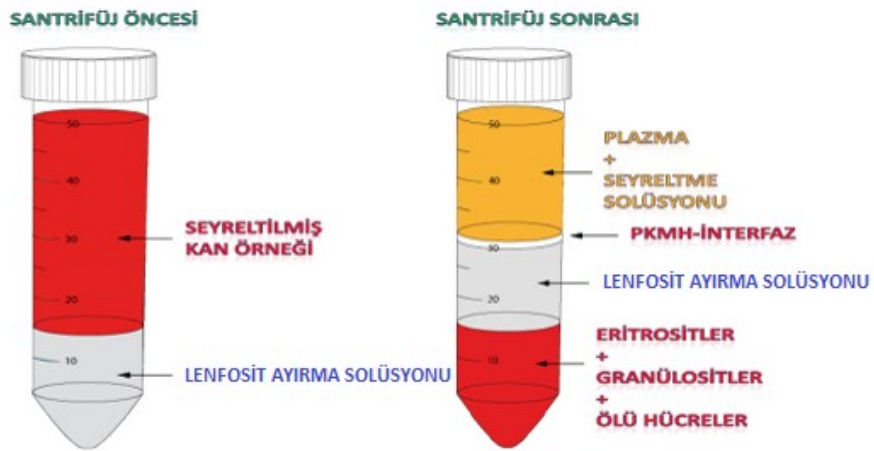
Grup	Yaş (yıl) Ortalama±SS	Hastalık Süreci (yıl) Ortalama±SS	HbA1c (%) Ortalama±SS	Açlık Glukozu (mg/dL) Ortalama±SS	CRP (mg/L) Ortalama±SS	C-peptid (ng/mL) Ortalama±SS
T1DM (n=20)	29,3±5,6	7,50±3,70	7,46±1,2	237,25±54,06	1,39±0,96	0,58±0,19
Sağlıklı (n=10)	28,4±4,6	--	3,76±1,4	89,90±12,00	0,96±0,70	2,5±0,68
p*	0,660	--	<0,001*	<0,001*	0,159	<0,001*

*T1DM ve sağlıklı kontroller arasındaki anlamlılığı, SS: Standart Sapma'yı ifade eder.

3.3. Metod

3.3.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

- Çalışmaya katılan bireylerden alınan 10 ml heparinize periferik kan örnekleri 1:1 oranında Lenfosit ayırma medyumunu (yoğunluk:1.077 g/ml) üzerine yayılarak 30 dakika 2000 rpm 20 °C’de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası kanın lenfosit ayırma solüsyonuna bağlı olarak ayrılmış hali şekil 3-1’de gösterilmiştir.
- Santrifüj sonrası yoğunluk farkına göre oluşan fazlarda üstte kalan kısım pastör pipeti ile uzaklaştırılmış, PKMH’lerin bulunduğu interfaz kısmı 15 ml’lik tüplere aktarılmıştır.
- İki kez PBS ile 5 dakika 1500 rpm 20 °C’de santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Bu işlemin görsel olarak şematize edilmiş hali Şekil 3-1’de gösterilmiştir.



Şekil 3-1: Periferik kan mononükleer hücrelerin ayrımı

3.3.2. Periferik Kan Mononükleer Hücre Sayımının Yapılması

- a) Yıkama işlemleri ardından üst sıvıları uzaklaştırılan PKMH'lerin üzerine 2 ml tamamlanmış RPMI-1640 eklenmiştir.
- b) Elde edilen PKMH süspansiyonundan hücre sayım cihazında (Sysmex XE-2100) sayılarak 1ml medyumda 1×10^6 hücre olacak şekilde miktar belirlenmiştir.

3.3.3. Kültür Medyumunun Zenginleştirilmesi

500 ml'lik medyum, steril şartlarda %1 oranında penisilin-streptomisin (5 ml), ve %10 oranında FBS (50 ml) ile zenginleştirilmiştir.

3.3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücre Kültürü

- a) 1×10^6 hücre içeren 1 ml'lik medyum, 5 ml'lik akan hücre ölçer tüplerinde ekilmiştir.
- b) Her birey için 3 kuyucuk ayrılmış ve kuyucuklardan ikisine PMA (50 ng/ml), iyonomisin (1 mg/ml) uyarıcı maddeler eklenirken, üçüncü kuyucuğa uyarıcı eklenmemiştir.
- c) PKMH'ler 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde 5 saat kültüre edilmiştir.
- d) Kültürün 4. saatinde kuyucuklara bir transport inhibitör proteini olan Brefeldin A (3 $\mu\text{g/ml}$) eklenerek PKMH'lerden sitokinlerin ortama salınması engellenmiştir.
- e) Uyarım sonunda hücreler hücre yüzeyi ve hücre içi boyama için hazır hale getirilmiştir.

3.3.5. Hücre Yüzey Boyaması

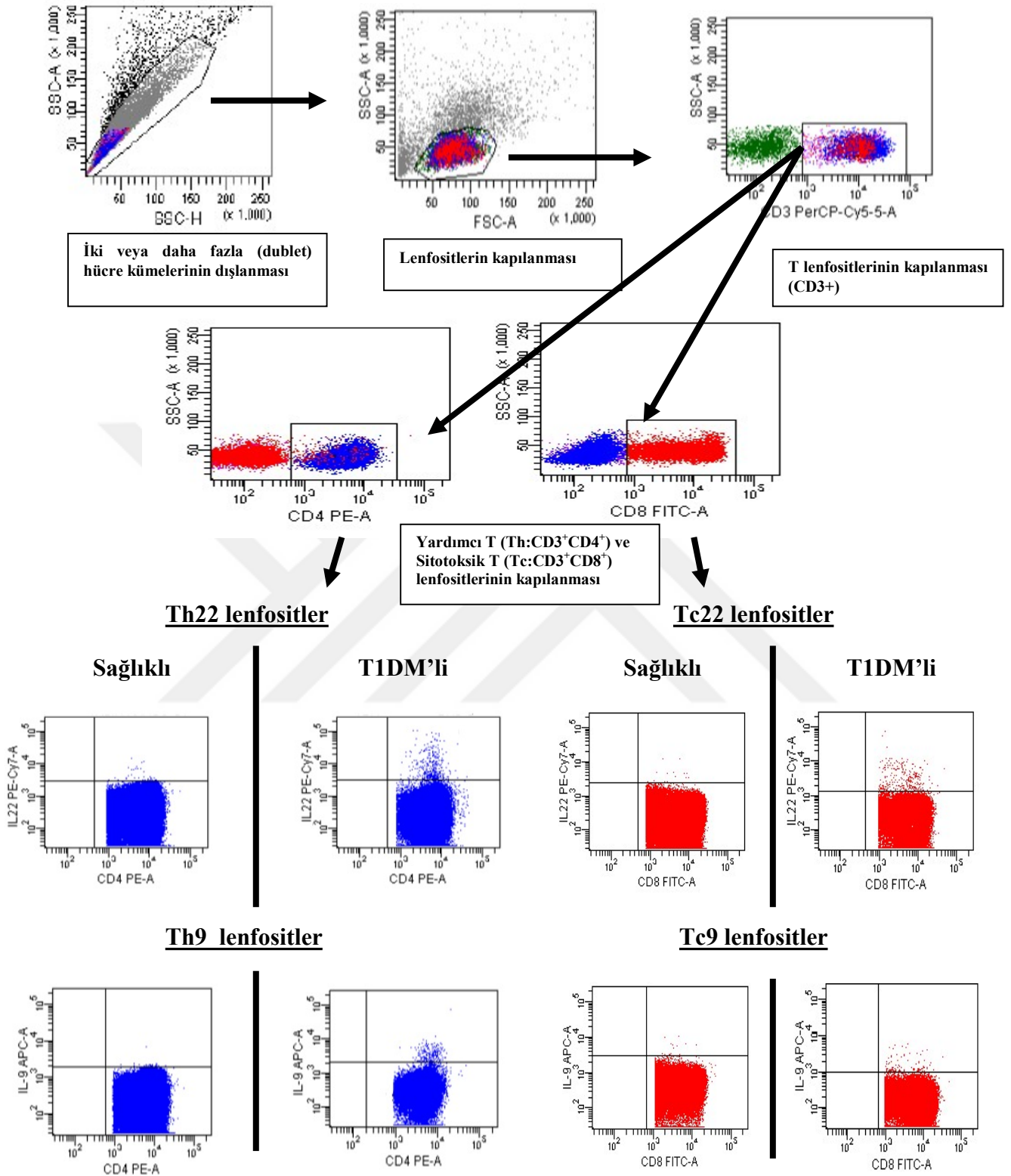
- a) Uyarımdan elde edilen PKMH'ler 5 dakika 1500 rpm'de ve 20°C 'de santrifüj edildikten sonra üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Uyarımlı gruplardan biri genetik çalışma için ayrılmıştır.
- b) Uyarımı yapılan ve uyarımsız her iki koşul için tüplere 10 μl Anti-Human CD3 Pe-Cy5/CD4 PE/CD8 FITC kokteyl monoklonal antikor eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir.
- c) İnkübasyon sonrası tüplere 2 ml PBS eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika 20°C 'de santrifüj edilip üst sıvılar uzaklaştırılmıştır.

3.3.6. Hücre İçi Boyama

- a) Hücre yüzey boyamasından tüplere 500 µl fiksasyon solüsyonu eklenip 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- b) Fiksasyon işlemini takiben tüplere 2 ml PBS eklenerek 5 dakika 1800 rpm'de 20°C'de santrifüj edilip üst sıvılar uzaklaştırılmıştır.
- c) Hücrelerin üzerine 2 ml 1X permeabilizasyon solüsyonu eklenerek hücreler 10 dakika karanlık ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- d) Ardından tüpler 5 dakika 1500 rpm 20°C'de santrifüj edildikten sonra tüp içerisinde 500 µl sıvı kalacak şekilde üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- e) Hücrelere 5 µl anti-Human IL-22 PE/Cy7 ve 5 µl anti-Human IL-9 Alexa Flour 647 monoklonal antikorları eklenerek 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- f) Üzerine 2 ml PBS eklenen tüpler 5 dakika 1500 rpm 20°C'de santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmıştır. Bu işlem iki kez yapılmıştır.
- g) Hücrelerin üzerine 500 µl FACS Flow Sheat sıvısı eklenerek akan hücre ölçerde değerlendirilmek üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.7. Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonu ve Hücre İçi Sitokin Tayini

Hücre yüzey boyamasını takiben hücre içi boyama yapılan PKMH'lerin ölçüm ve değerlendirmeleri BD FACSCantoII 4/2/2 cihazında, BD FACSDiva programıyla gerçekleştirilmiştir. T hücre ve alt grup yüzdeleri ve hücre içi IL-22 ve IL-9 sıklığı izotip kontrol varlığında akan hücre ölçer ile saptanmıştır. Bu amaçla ilk olarak FSC-H ve FSC-A alanında dublet ve singlet adı verilen kısımları ayırt edilerek singlet olan kısım kapılanarak ardından total lökosit kapısı içerisindeki CD3⁺ T lenfositlerine kapılama yapılmıştır. CD3⁺ T lenfositleri içerisinde CD4⁺ ve CD8⁺ alt grupları kapılanarak, bu hücre grupları içinde IL-22 ve IL-9 salgılayan hücre yüzdeleri araştırılmıştır (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: T lenfosit ve alt grupları kapılama stratejisi

3.3.8. Plazma İzolasyonu

- a) EDTA anti-koagülanlı 10 ml'lik tüplere alınan periferik venöz kan örnekleri alındıktan 30 dakika içerisinde 10 dakika 1000 g'de santrifüj edilmiştir.
- b) Ardından plazma örnekleri tüplere paylaştırılarak sitokin tayinleri yapılma işlemine kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.9. Plazmadan Sitokin Tayin Çalışması ve Analizi

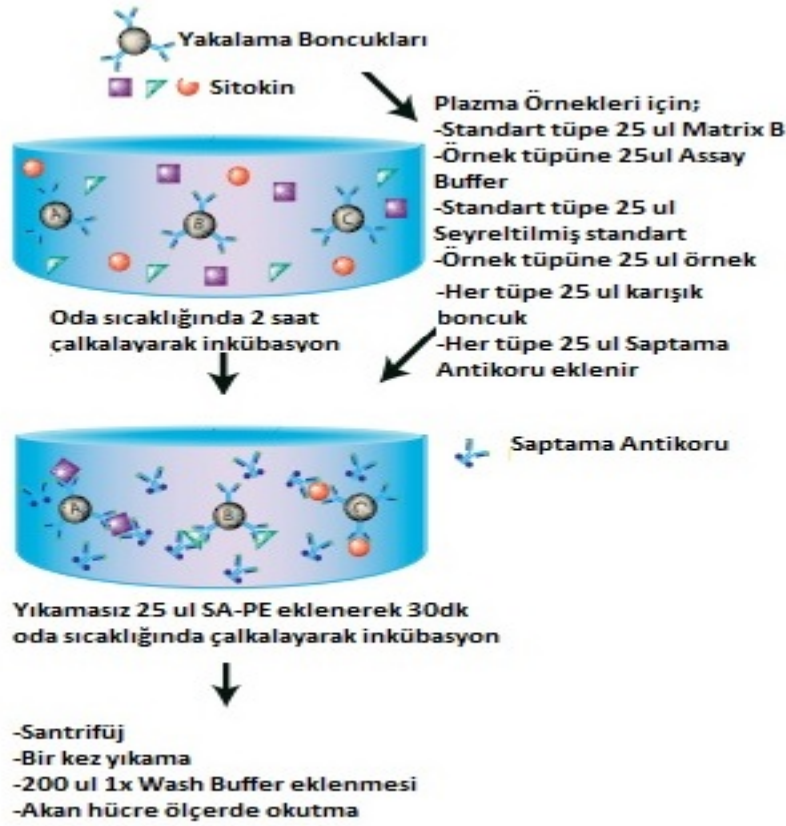
- a) Kit ürünleri kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
- b) Standartlar Tablo 3-2'deki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3-2: Standart hazırlama prosedürü

Tüp/Standart ID	Seri Dilüsyon	Eklenecek Assay Buffer (ul)	Eklenecek Standard	Final Konsantrasyon (pg/mL)
C7	--	--	--	1.000
C6	1:4	75	C7'den 25ul	2.500
C5	1:16	75	C6'den 25ul	625
C4	1:64	75	C5'den 25ul	156,3
C3	1:256	75	C4'den 25ul	39,1
C2	1:1024	75	C3'den 25ul	9,8
C1	1:4096	75	C2'den 25ul	2,4
C0	--	75	--	0

- c) Plazma örnekleri 2 kat Assay Buffer ile seyreltilmiştir.
- d) Standart tüplerine 25 µl Matrix B eklenmiştir.
- e) Örnek tüplerine 25 µl Assay Buffer eklenmiştir.
- f) Her standarttan 25 µl standart tüplerine eklenmiştir.
- g) Her seyreltilmiş plazma örneklerinden 25 µl örnek tüplerine eklenmiştir.
- h) Karışık boncuklardan 25 µl her tüpe eklenmiştir.
- i) Saptama Antikorlarından 25 µl her tüpe eklenmiştir.
- j) Her tüpteki total hacim 100 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.
- k) Tüpler alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunması sağlanmıştır.

- l)** Ardından yaklaşık 1000 rpm’de plate çalkalayıcısı üzerinde 2 saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır.
- m)** Daha sonrasında tüpleri yıkamaksızın, her tüpe 25 µl SA-PE eklenmiştir.
- n)** Tüpler tekrar alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunması sağlanmıştır.
- o)** Ardından yaklaşık 1000 rpm’de plate çalkalayıcısı üzerinde 30 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır.
- p)** Tüpler 1000g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- q)** Süpernatant pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır.
- r)** Sonrasında her tüpe 200 µl 1X wash buffer eklenmiştir. Vortekslenerek boncuklar resüspanse edilmiştir. Ardından 1000g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- s)** Örnekler aynı gün içerisinde akan hücre ölçerde okutulmuştur.
- t)** Protokolün şematik görüntüsü Şekil 3-3’de gösterilmiştir.
- u)** Minimum saptanabilir konsantrasyon (deney sensitivitesi) IL-9 için 1,2 pg/ml, IL-22 için 2,2 pg/ml’dir.



Şekil 3-3: Boncukla akan hücre ölçerde sitokin tayini prosedürü

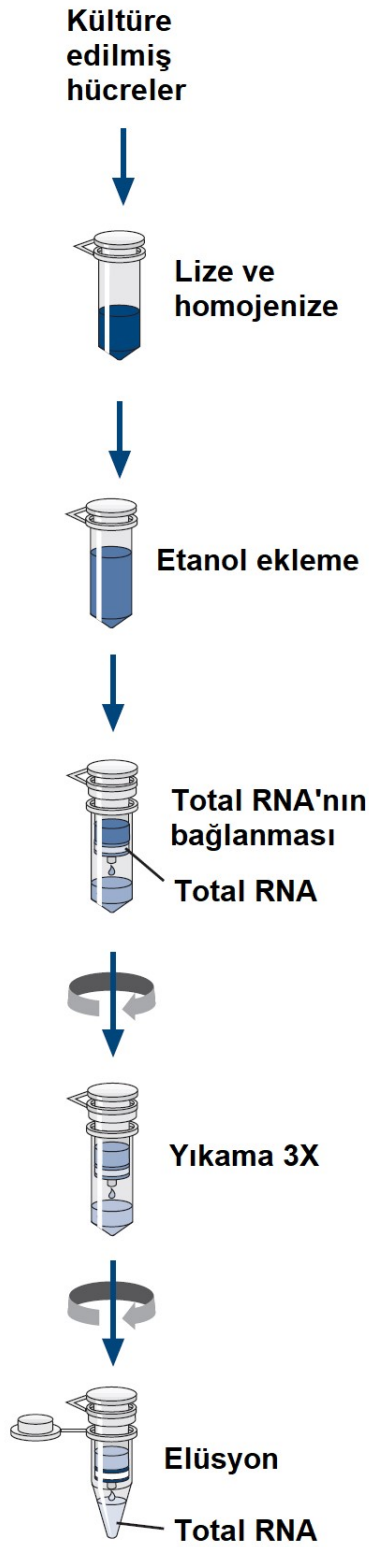
3.3.10. RNA İzolasyonu

Hücre kültüründen alınan PKMH'lerin RNA'ları RNeasy mini kit (Qiagen) ile aşağıdaki basamaklar uygulanarak elde edilmiştir.

- 5 saat uyarılmış yaklaşık 1-2 milyon arasındaki PKMH 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin üzerine 350 µl RLT solüsyonu eklenmiş ve ardından vortekslenmiştir.
- Lizat direkt olarak toplama kolonuna yerleştirilmiş QIAshredder spin kolonuna pipetlenip ardından 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası filtre atılarak toplama tüpüne geçen örneklerin üzerine 350 µl %70'lik EtOH eklenmiştir.
- Son hacimin tamamı toplama tüpüne yerleştirilen RNeasy spin kolonuna eklenmiş ve 15 saniye 11.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Altaki toplama tüpü atılarak, filtre yeni tüpe aktarılmış ve üzerine 700 µl RW1 solüsyonu koyarak 11.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

- g) Alttaki toplama tüpü atılarak, filtre yeni tüpe aktarılmış ve üzerine 500 mikrolitre RPE buffer koyarak 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- h) Filtreyi yeni toplama tüpüne aktardıktan sonra filtre üzerine 50 mikrolitre RNase bulundurmayan su ekleyerek, örnekleri 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- i) Filtreden geçen örnekleri 1,5 mL'lik kapaklı örnek tüplerine aktarıp çalışma yapılana kadar -80°C 'de saklanmıştır.
- j) Protokolün şematik görüntüsü Şekil 3-3'de gösterilmiştir.
- k) Örneklerin RNA ölçümleri NanoPhotometer Pearl spektrofotometresi ile 260 nm dalga boyu densitesiyle yapılmıştır. OD A260/A280 ile örnek kaliteleri saptanmıştır. Örneklerin RNA konsantrasyon ve kaliteleri Tablo: 3-4'de gösterilmiştir.
- l) cDNA dönüşümü için kullanılmak üzere her bireyin RNA miktarı 1000 ng olacak şekilde dilüsyon yapılarak ayarlanmıştır.

RNeasy Mini Prosedür



Şekil 3-4: RNA izolasyon Prosedürü

3.3.11. cDNA Dönüşümü

Tablo:3-3'deki karışım miktarlarına uygun olarak ilk önce denatürasyon karışımı hazırlanmıştır. Her örnek için ayarlanmış 1000 ng RNA örnekleri alınarak aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir.

- a) Hazırlanan karışım PZR cihazına koyularak 65°C'de 10 dakika denature edilmiştir. On dakika sonunda örneklerin bulunduğu PZR plate'i cihazdan alınarak buz bloğun üzerine yerleştirilmiştir.
- b) cDNA'ya dönüştürme işlemini gerçekleştirmek için yine Tablo:3-4'deki reaksiyon karışımı hazırlayarak denatürasyonu gerçekleşmiş örneklerin üzerine eklenmiştir.
- c) cDNA işlemi sonucunda örnekler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.
- d) cDNA dönüşüm protokolü Tablo: 3-5'de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Denatürasyon Karışımının Hazırlanması

Denaturation Karışımı (1X)	Miktar
Anchored Primer	1 µl
Hexamer Primer	2 µl
RNA (1000 ng)	10 µl
Toplam	13 µl

Tablo 3-4: Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon karışımı	1 örnek için
Reaksiyon Tamponu	4 µl
RNaz inhibitörü	0,5 µl
Deoksinükleotid karışımı	2 µl
Reverse Transkriptaz	0,5 µl
Toplam	7 µl

Son hacim: 13 µl Denatürasyon Karışımı + 7 µl Reaksiyon Karışımı = 20 µl

Tablo 3-5: cDNA Dönüşüm Protokolü

	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	65 °C	10 dakika
PZR	50 °C	60 dakika
	85 °C	5 dakika
Bekleme	4 °C	∞

3.3.12. Spektrofotometrik Ölçümler

Örneklerin ölçümleri NanoPhotometer Pearl spektrofotometresi ile 260 nm dalga boyu yoğunluğuyla yapılmıştır. OD A260/A280 oranı ile örnek kaliteleri saptanmıştır. Bu değer 1,8 ile 2,0 arasında olmalıdır. Eğer protein ve fenol kontaminasyonu olursa, değerlerin beklenen değer aralığından daha düşük çıkması beklenmektedir [106].

3.3.13. Primerlerin Dizaynı ve Primer Dizileri

Primerler, “ncbi primer blast” tool’ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) internet sitesi kullanılarak dizayn edilmiştir.

Dizayn yaparken göz önünde bulundurduğumuz parametreler;

- Primer uzunluğu: 18-25 baz çifti arasında,
- Primerlerin oluşturduğu ürün uzunluğu: 75-250 baz çifti arasında,
- Erime sıcaklığı: 58-62 °C arasında,
- GS içeriği: %40-60 arasında olmasına dikkat edilmiştir.

IL-22 için, Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p12 Primary Assembly, IL-9 için Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p12 Primary Assembly seçilmiştir. Ayrıca çalışmanın kontrol geni olarak β 2m kullanılmıştır [107].

Dizayn sırasında ilgili gen transkriptlerinin alternative splicing oluşumlarına uygun seçilmesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde exon birleşme bölgelerine uygun amplikon oluşturacak primer dizaynları yapılmıştır. Dizayn sonrasında elde edilen primerlerin hiçbir şekilde gDNA'yı amplifiye etmediği tespit edilmiştir.

Dizaynlar yapıldıktan sonra “Oligo Analyzer” (<https://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/?c=EU>) aracı kullanılarak

primerlerin kendi (self) ve hetero dimer durumları, toka (hairpin) oluşum ihtimalleri kontrol edilmiştir. Primer dizileri Tablo 3-6’da gösterilmiştir.

Liyofilize halde gelen primerler distile su ile dilue edilerek ve 100 pmol’luk stoklar haline getirilerek -20 °C’de saklanmışlardır. Sonrasında gerçek zamanlı PZR’de kullanılmak için bu stoklardan faydalanarak 10 pmol olacak şekilde tekrar dilusyon yapılmıştır.

Tablo 3-6: Primer dizileri

Primer adı	Primer Dizisi (5'-3')	Sıcaklık (°C)	%GS	Amplikon Uzunluğu (Nükleotid)
IL22_Foward	GSTTGASAAGTSSAASTTSSA	58	47	140
IL22_Reverse	GSTSASTSATASTGASTSSGT	59	52	
IL9_Foward	STSTGTTTGGGSATTSSSTST	59	52	95
IL9_Reverse	GGGTATSTTGTTTGSATGGTGG	59	50	
β₂M_Foward	GAGGCTATSSAGSGTASTSSA	61	57	248
β₂M_Reverse	SGGSAGGSATASTSATSTTTT	58	47	

3.3.14. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

- a) Gerçek zamanlı PZR karışımı her bir örnek için Tablo:3-7’deki miktarlar doğrultusunda hazırlanmıştır.

Tablo 3-7: Gerçek zamanlı PZR karışımının hazırlanması

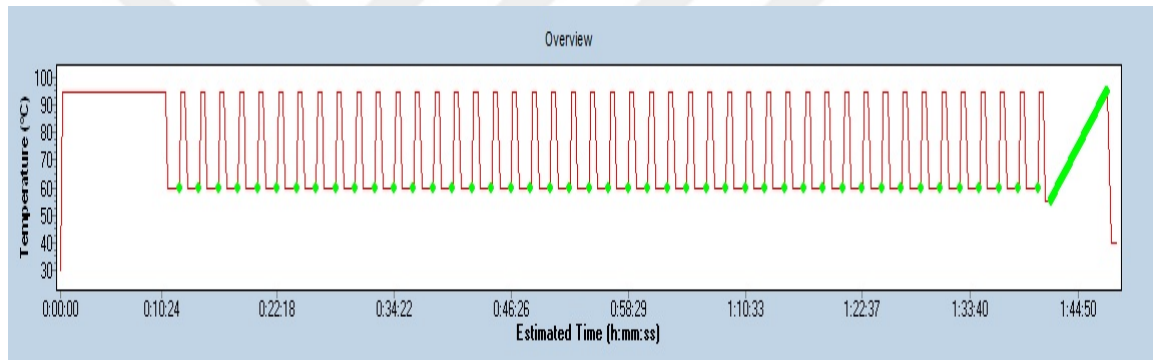
Ürün Adı	Miktar (1x)
dH ₂ O	3 µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
2x Master Karışımı	10 µl
Toplam	15 µl

- b) En son aşamada örnek başına 15 µl olarak hazırlanan SYBRGreen karışımını Roche LightCycler 480 cihazına uygun 96 well plate kuyucuklarına dağıtarak üzerine 5 µl cDNA eklenmiştir.
- c) Plate üzerine şeffaf yapışkanlı kapağı yapıştırılmıştır. Daha sonrasında cihaza yüklenerek Tablo 3-8’da belirtilen PZR protokolü ile çalışma başlatılmıştır.

d) Protokolün cihazdaki tahmini süresi ve basamakları Şekil 3-5’de şematik olarak gösterilmiştir.

Tablo 3-8: Gerçek zamanlı PZR protokolü

Ön inkübasyon	95 °C	5 dakika	
Amplifikasyon	95 °C	10 saniye	45 döngü
	55 °C	20 saniye	
	72 °C	20 saniye	
Erime Eğrisi	95 °C	5 saniye	
	65 °C	1 dakika	
	97 °C	Süresiz	
Soğutma	40 °C	10 dakika	



Şekil 3-5: Gerçek zamanlı PZR protokol basamakları ve tahmini süresi

3.3.15. Gen Ekspresyon Analizi

Bu çalışmada, tip 1 diyabetli hastalar ve sağlıklı bireylerde IL-22 ve IL-9 gen ekspresyon mRNA seviyeleri hesaplanmıştır. Her örnek için ilgili genler iki kez çalışılarak Ct değerlerinin ortalaması alınmıştır.

ΔCt değeri örneğe ait ilgili genin Ct değerinden kontrol geninin (housekeeping) Ct değeri çıkarılarak elde edilmiştir.

$\Delta\Delta Ct$ metodu ilgili genin relatif mRNA kopya sayısını değerlendirmek için kullanılmıştır. Çalışılan örneğin ilgili genin ΔCt 'sinden kontrol geninin ΔCt 'si çıkarılarak elde edilmiştir [108].

$\Delta\Delta Ct$ Formülü;

$$(\Delta Ct \text{ Hasta} - \Delta Ct \text{ Sağlıklı}) = (Ct \text{ Hasta} - Ct \text{ Referans gen}) - (Ct \text{ Sağlıklı} - Ct \text{ Referans gen})$$

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ kat değişimi (fold change) ise genin kaç kat artıp azaldığını belirlemek için kullanılır.

$\Delta\Delta C_t$ Formülü; $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\Delta C_t \text{ Hasta} - \Delta C_t \text{ Sağlıklı})}$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(C_t \text{ Hasta} - C_t \text{ Referans gen}) - (C_t \text{ Sağlıklı} - C_t \text{ Referans gen})]} \quad [109]$$

$2^{-\Delta\Delta C_t} > 1$, T1DM’li hastalarda gen ekspresyon seviyesinin sağlıklı bireylere göre yükseldiğini, $2^{-\Delta\Delta C_t} < 1$, gen ekspresyon seviyesinin düştüğünü, $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ ise gen ekspresyon seviyelerinin eşit olduğunu göstermektedir.



3.3.16. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın hücre yüzey ve hücre içi boyama analizleri FACSDiva yazılımıyla, plazma örneklerinden sitokin tayin analizleri Legendplex Data Analiz yazılımıyla ve genetik ekspresyon değerleri LightCycler yazılımı ile analiz edilmiştir. Kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla hesaplanmıştır.

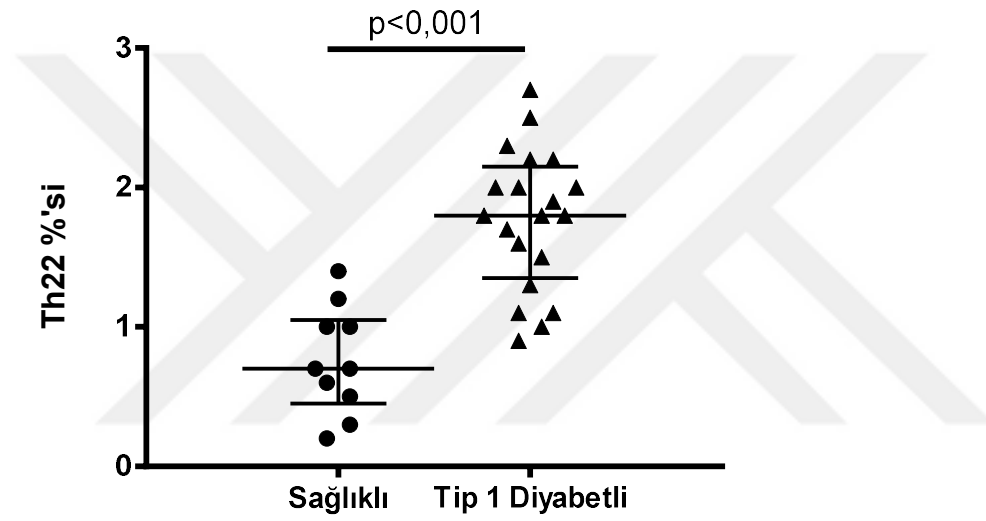
İstatistiksel analizler IBM® SPSS® Statistic versiyon 18 ve Graphpad Prism yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk Testleri ile analitik olarak incelenmiştir. Gruplar arası farkların değerlendirilmesinde normal dağılım göstermeyen gruplar için Mann Whitney-U, normal dağılım gösteren gruplar için Student T testi uygulanmıştır. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan değişkenler için çeyreklerarası aralık [medyan (%25. / %75.)], normal dağılan değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma kullanılarak verilmiştir. Analiz edilen parametreler arasında ilişkiler Spearmen's korelasyonu kullanılarak kıyaslanmıştır. P değerinin 0,05 ve altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

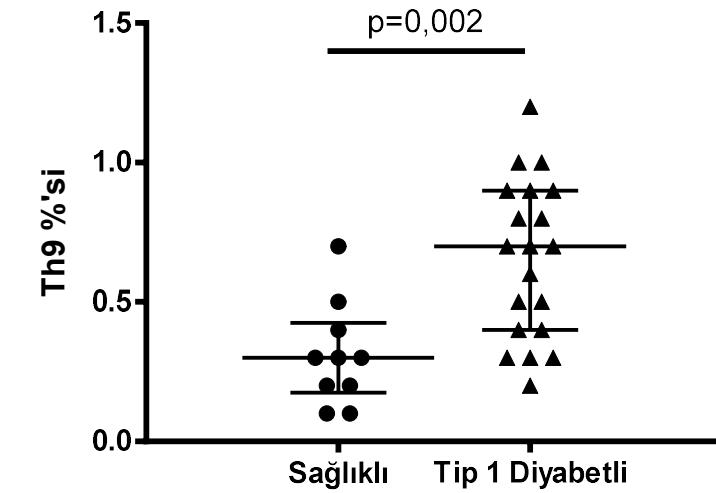
4.1. Gruplar Arası İstatistiksel Değerlendirme

4.1.1. Th22 ve Th9 Hücre Sıklığı Düzeyleri

Sağlıklı gruplar ile T1DM’li hasta grupları arasında Th22 ve Th9 lenfosit hücre yüzdeleri açısından istatistiksel anlamlılık görülmektedir (sırasıyla; $p<0,001$ [0,70 (1,05/0,45) ve 1,80 (1,35/2,15)], $p=0,002$ [0,30 (0,17/0,42) ve 0,70 (0,40/0,90)] (Şekil 4-1, Şekil 4-2).



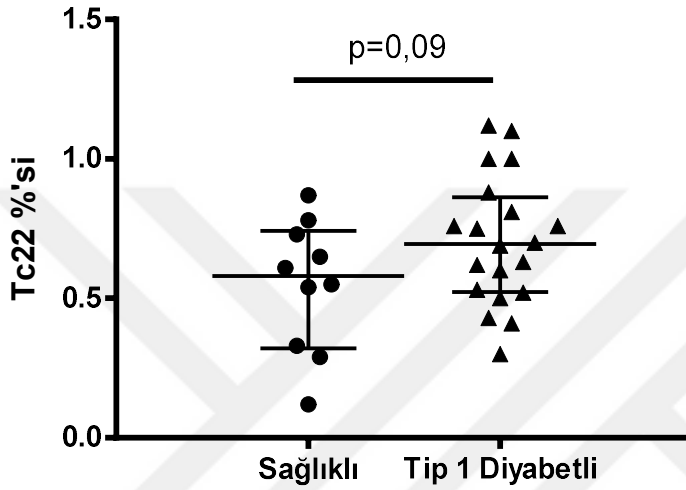
Şekil 4-1: Gruplar arası Th22 hücre yüzdesinin kıyaslanması



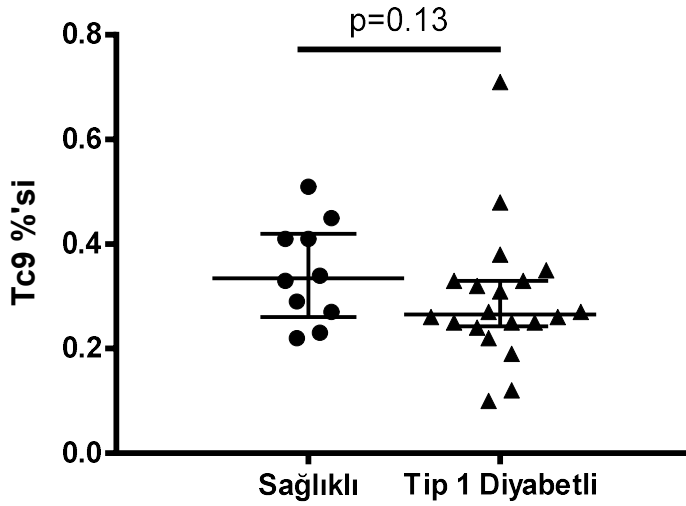
Şekil 4-2: Gruplar arası Th9 hücre yüzdesinin kıyaslanması

4.1.2. Tc22 ve Tc9 Hücre Sıklığı Düzeyleri

Sağlıklı gruplar ile T1DM'li hasta grupları arasında Tc22 ve Tc9 lenfosit hücre yüzdeleri açısından istatistiksel anlamlılık görülmemektedir (Sırasıyla; $p < 0,09$ [0,58 (0,32/0,74) ve 0,69 (0,52/0,86)], $p = 0,13$ [0,33 (0,26/0,42) ve 0,26 (0,24/0,33)] (Şekil 4-3, Şekil 4-4).



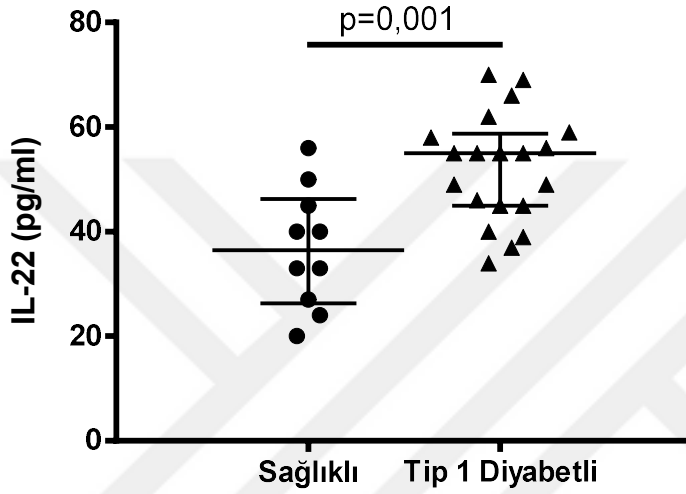
Şekil 4-3: Gruplar arası Tc22 hücre yüzdesinin kıyaslanması



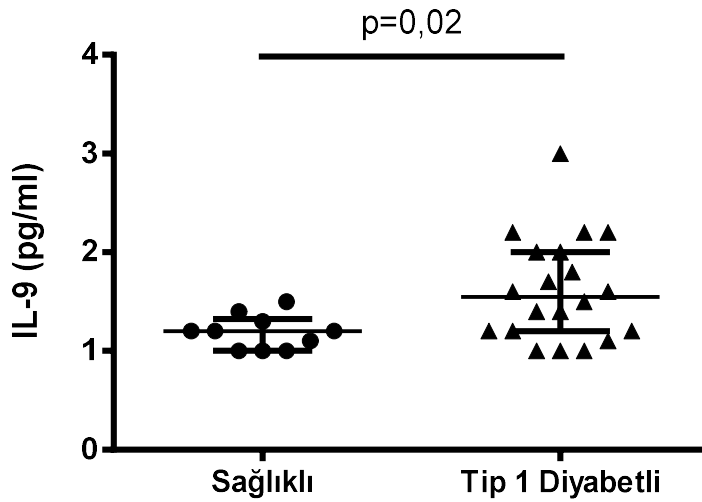
Şekil 4-4: Gruplar arası Tc9 hücre yüzdesinin kıyaslanması

4.1.3. IL-22 ve IL-9 Plazma Sitokin Düzeyleri

Sağlıklı gruplar ile T1DM'li hasta grupları arasında plazma IL-22 ve IL-9 düzeyleri açısından istatistiksel anlamlılık görülmektedir (Sırasıyla; $p=0,001$ [36,50 (26,25/46,25) ve 55,00 (45,00/58,75)], $p=0,02$ [1,20 (1,00/1,32) ve 1,55 (1,20/2,00)] (Şekil 4-5, Şekil 4-6).



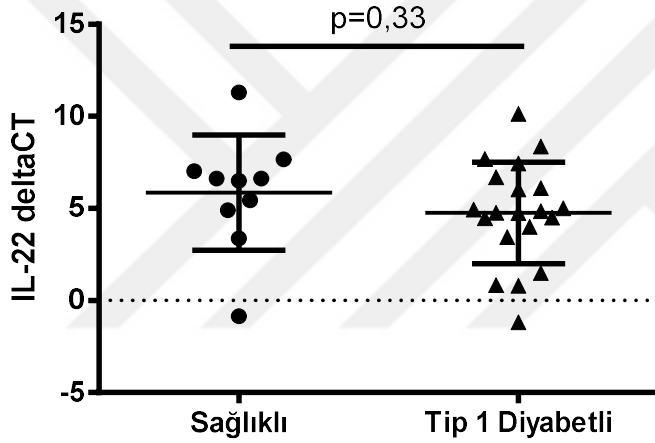
Şekil 4-5: Gruplar arası IL-22 plazma düzeylerinin kıyaslanması



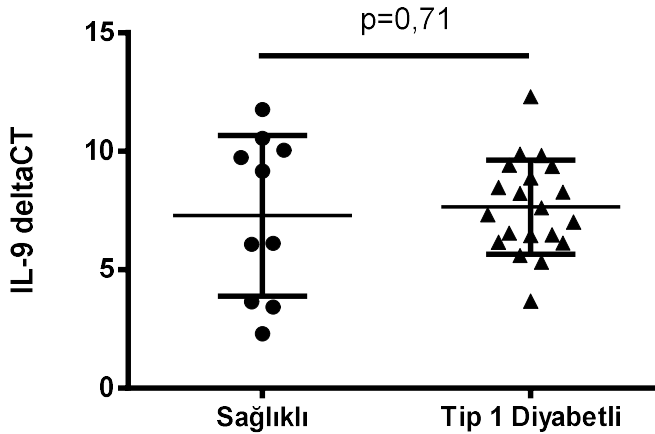
Şekil 4-6: Gruplar arası IL-9 plazma düzeylerinin kıyaslanması

4.1.4. IL-22 ve IL-9 Gen Ekspresyon Düzeyleri

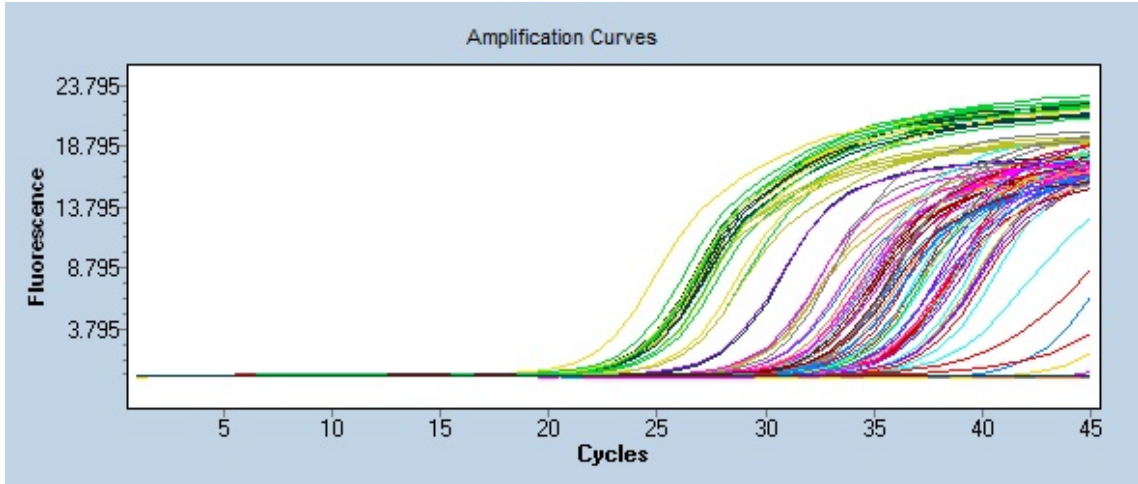
Sağlıklı gruplar ile T1DM’li hasta grupları arasında IL-22 ve IL-9 mRNA ekspresyon açısından istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır. (Sırasıyla; $p=0,33$ $[(5,86\pm1,98)$ ve $(4,75\pm2,75)]$; $p=0,71$ $[(7,27\pm3,39)$ ve $(7,64\pm3,12)]$) (Şekil 4-7, Şekil 4-8). $2^{-\Delta\Delta Ct}$ kat değişimi hesaplamasına göre istenilen genler kontrol genine göre normalize edilerek, T1DM’lilerde IL-22 gen ekspresyonu sağlıklılara göre 2,14 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. IL-9 gen ekspresyonu ise T1DM’lilerde sağlıklılara göre 0,77 kat fark gösterdiği saptanmıştır. T1DM’li ve sağlıklı bireylerin IL-22, IL-9 ve kontrol geni (β_2M) Ct değerleri cihazda çalışılarak elde edilmiştir (Şekil 4-9). Bir örneğe ait gen Ct değerleri Şekil: 4-10 ve Şekil: 4-11’de gösterilmiştir.



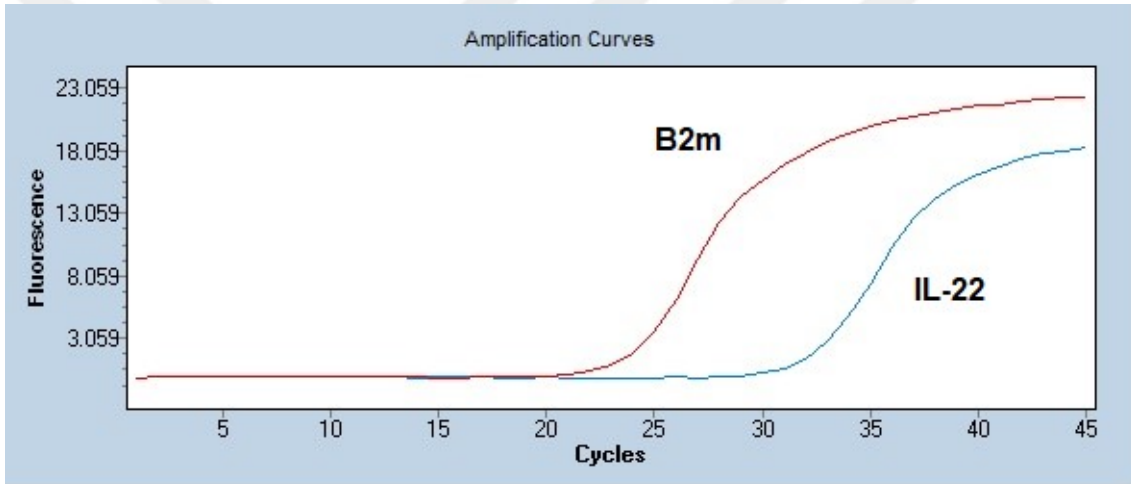
Şekil 4-7: Gruplar arası IL-22 mRNA düzeyleri



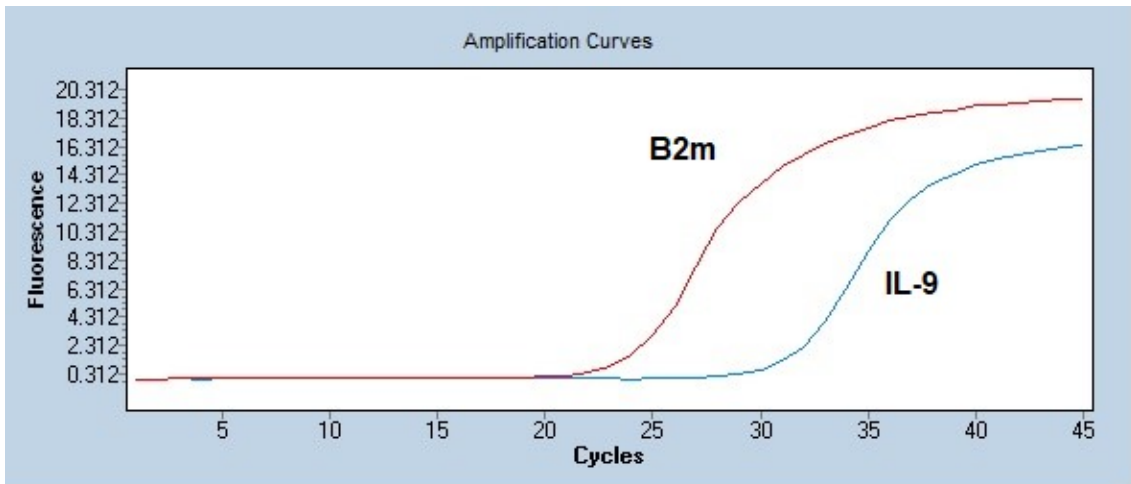
Şekil 4-8: Gruplar arası IL-9 mRNA düzeyleri



Şekil 4-9: Gerçek zamanlı PZR'da gen ekspresyon görüntüsü



Şekil 4-10: Bir örneğe ait IL-22 ve β_2m CT değerleri

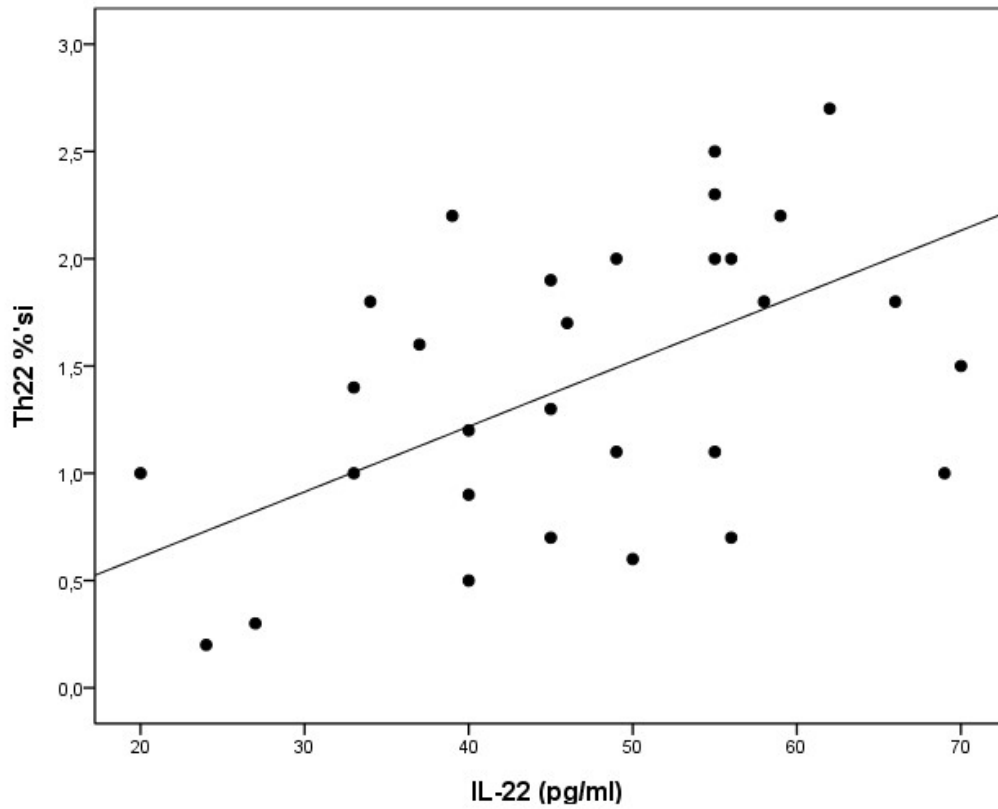


Şekil 4-11: Bir örneğe ait IL-9 ve β_2m CT değerleri

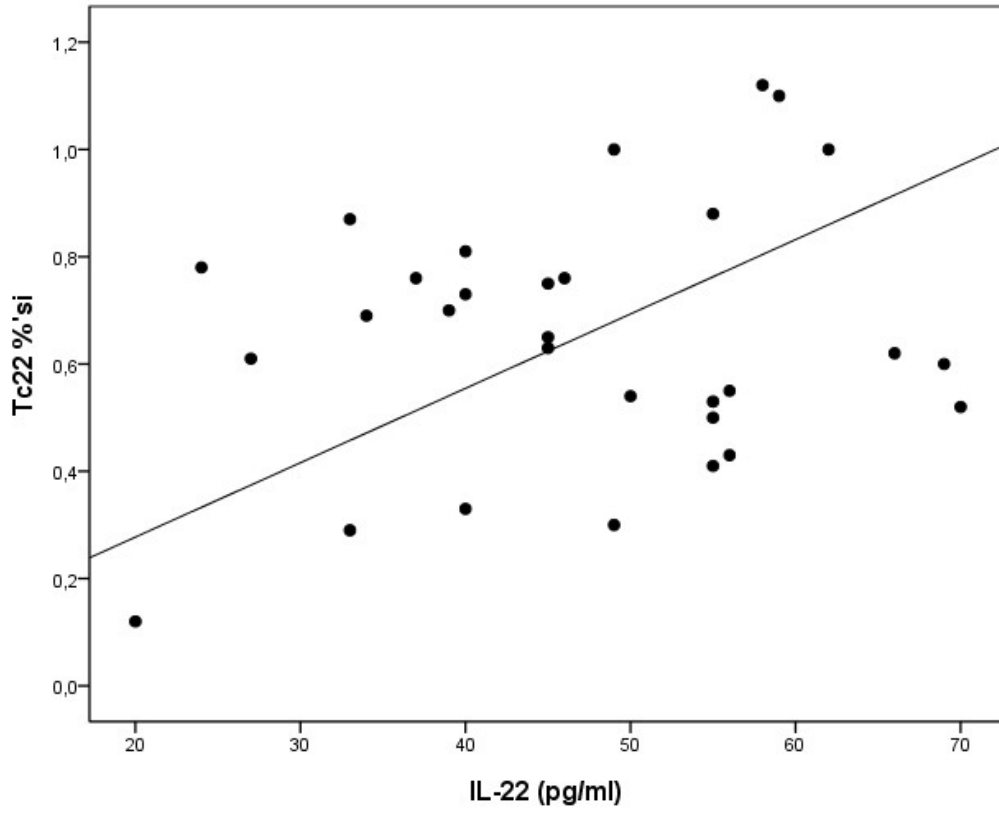
4.2. Veriler Arasında İlişkinin İncelenmesi

4.2.1. Th22 ve Tc22 Hücre Sıklığının IL-22 Plazma Sitokin Düzeyi ile İlişkisi

Th22 hücre yüzdesi ve plazma IL-22'si (pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı ve orta düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermektedir ($p=0,011$; $R=0,456$) (Şekil 4-12). Tc22 hücre yüzdesi ve plazma IL-22'si (pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemektedir ($p=0,200$; $R=0,289$) (Şekil 4-13).



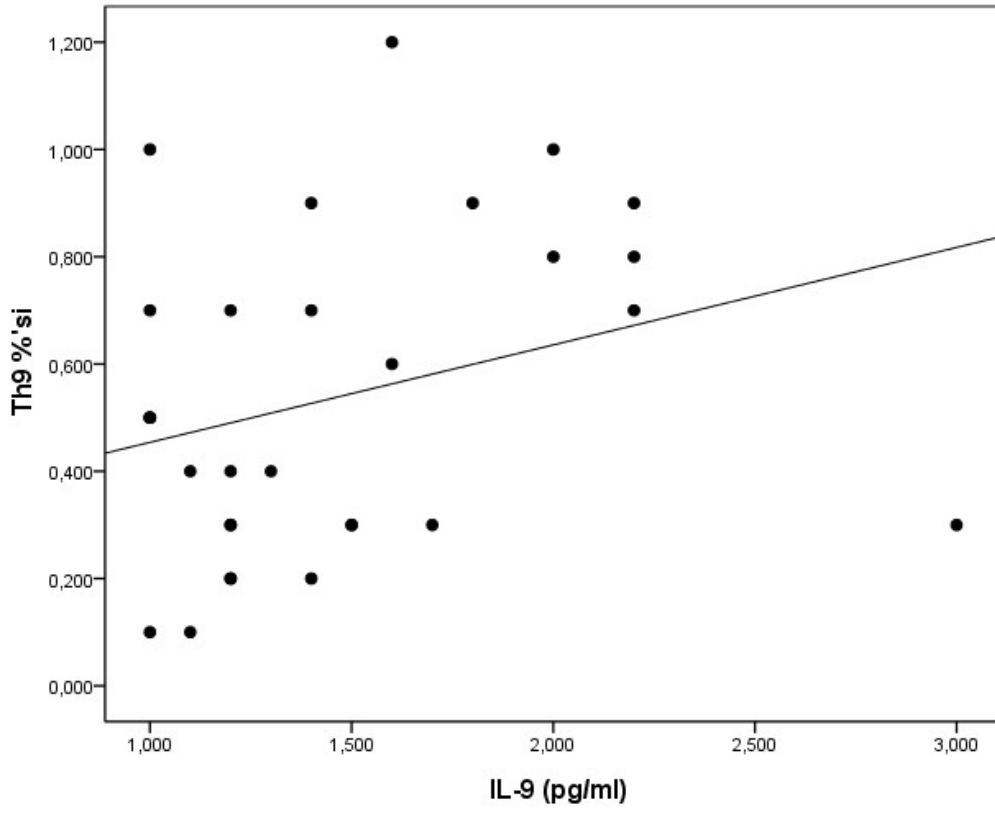
Şekil 4-12: Th22 hücre yüzdesi- plazma IL-22 (pg/ml) ilişkisi



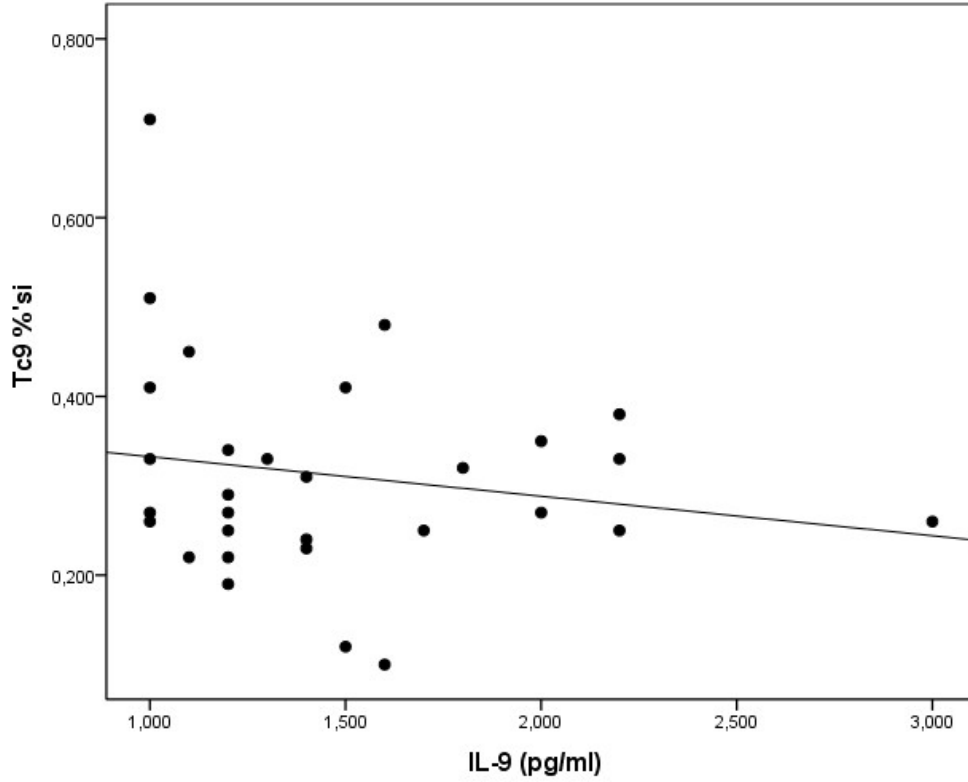
Şekil 4-13: Tc22 hücre yüzdesi – plazma IL-22(pg/ml) ilişkisi

4.2.2. Th9 ve Tc9 Hücre Sıklığının IL-9 Plazma Sitokin Düzeyi ile İlişkisi

Th9 hücre yüzdesi ve plazma IL-9'u (pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemektedir ($p=0,09$; $R=0,315$) (Şekil 4-14). Tc9 hücre yüzdesi ve plazma IL-9'u (pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemektedir ($p=0,156$; $R=0,410$) (Şekil 4-15).



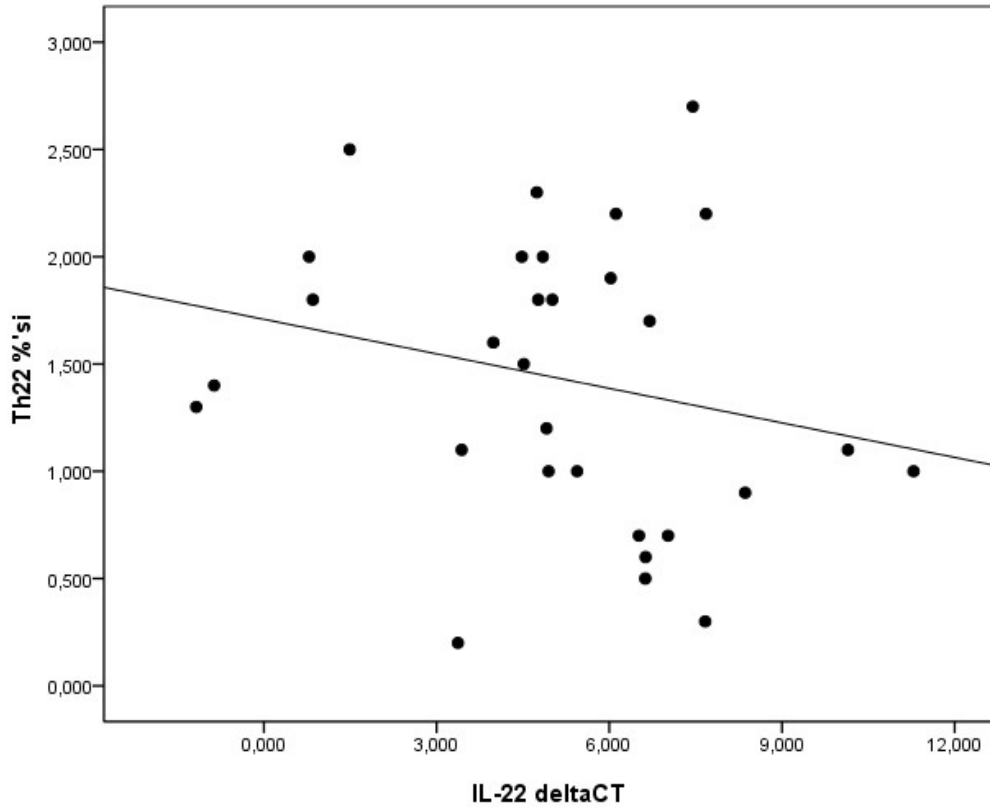
Şekil 4-14: Th9 hücre yüzdesi- plazma IL-9 (pg/ml) ilişkisi



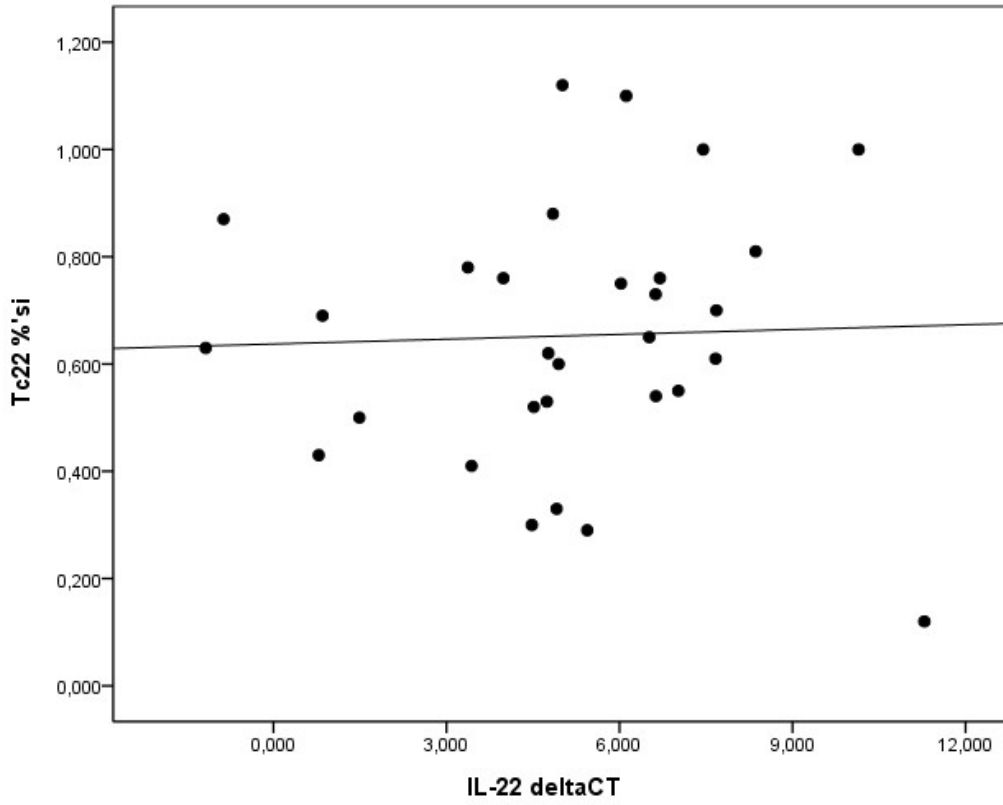
Şekil 4-15: Tc9 hücre yüzdesi- plazma IL-9 (pg/ml) ilişkisi

4.2.3. Th22 ve Tc22 Hücre Sıklığının IL-22 Gen Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi

Th22 hücre yüzdesi ve IL-22 mRNA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemiştir ($p=0,219$; $R=-0,231$) (Şekil 4-16). Tc22 hücre yüzdesi ve IL-22 mRNA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemiştir ($p=0,851$; $R=0,036$) (Şekil 4-17).



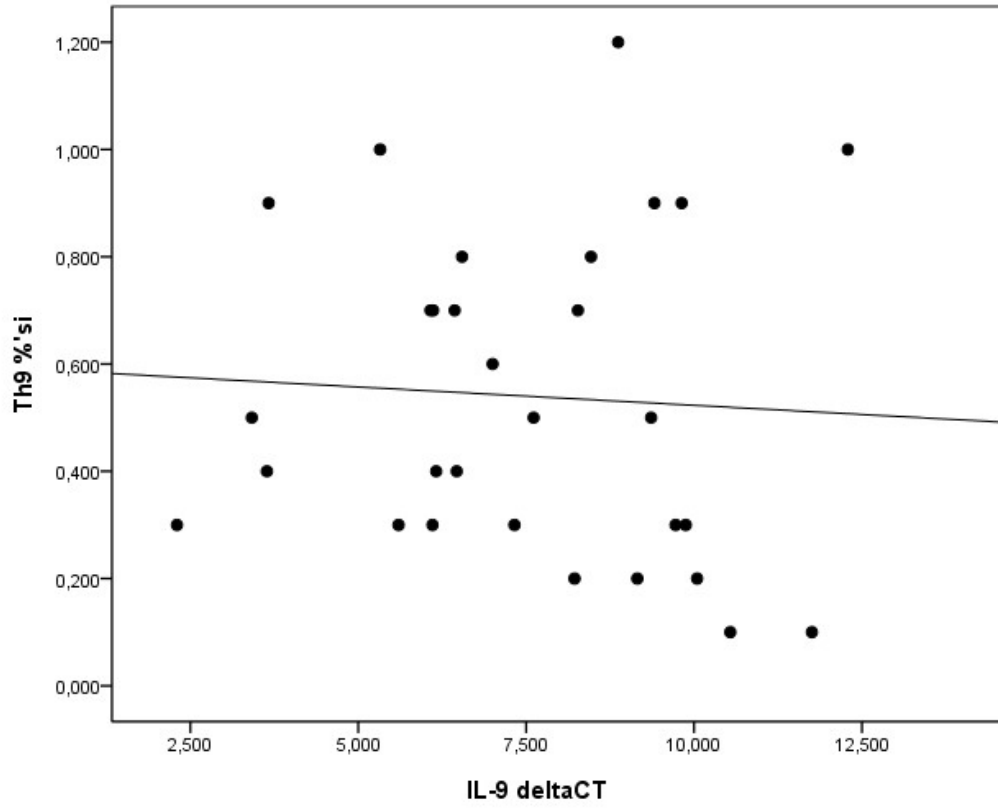
Şekil 4-16: Th22 hücre yüzdesi- IL-22 deltaCT ilişkisi



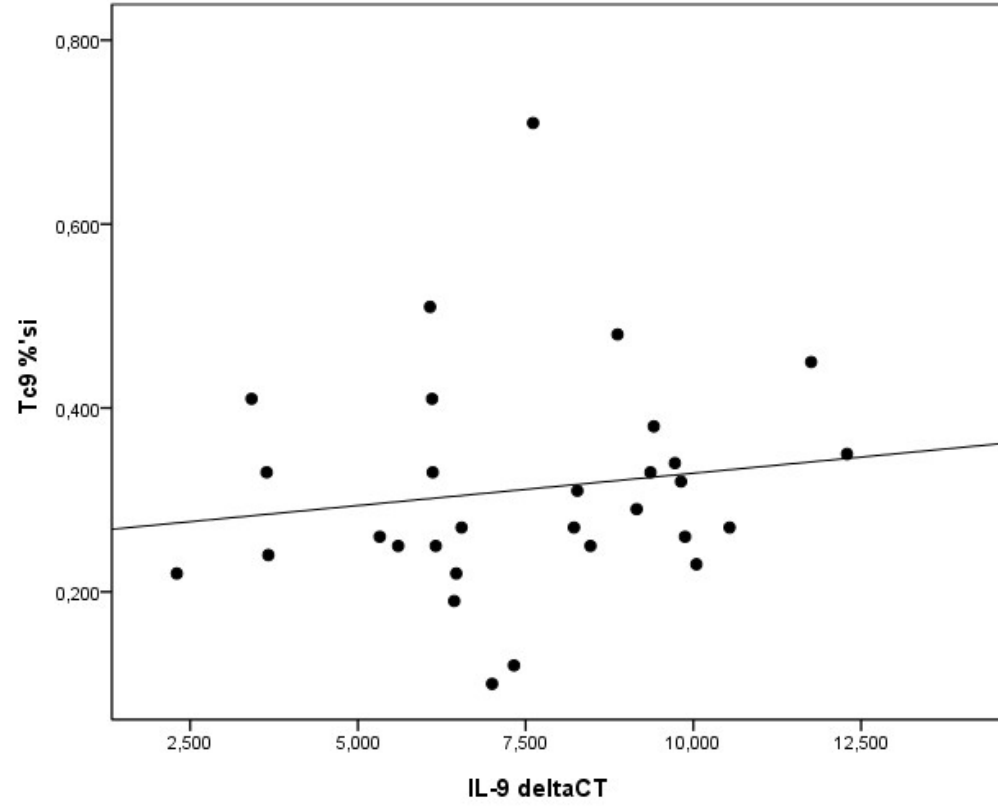
Şekil 4-17: Tc22 hücre yüzdesi- IL-22 deltaCT ilişkisi

4.2.4. Th9 ve Tc9 Hücre Sıklığının IL-9 Gen Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi

Th9 hücre yüzdesi ve IL-9 mRNA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemiştir ($p=0,420$; $R=-0,153$) (Şekil 4-18). Tc9 hücre yüzdesi ve IL-9 mRNA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemiştir ($p=0,317$; $R=0,189$) (Şekil 4-19).



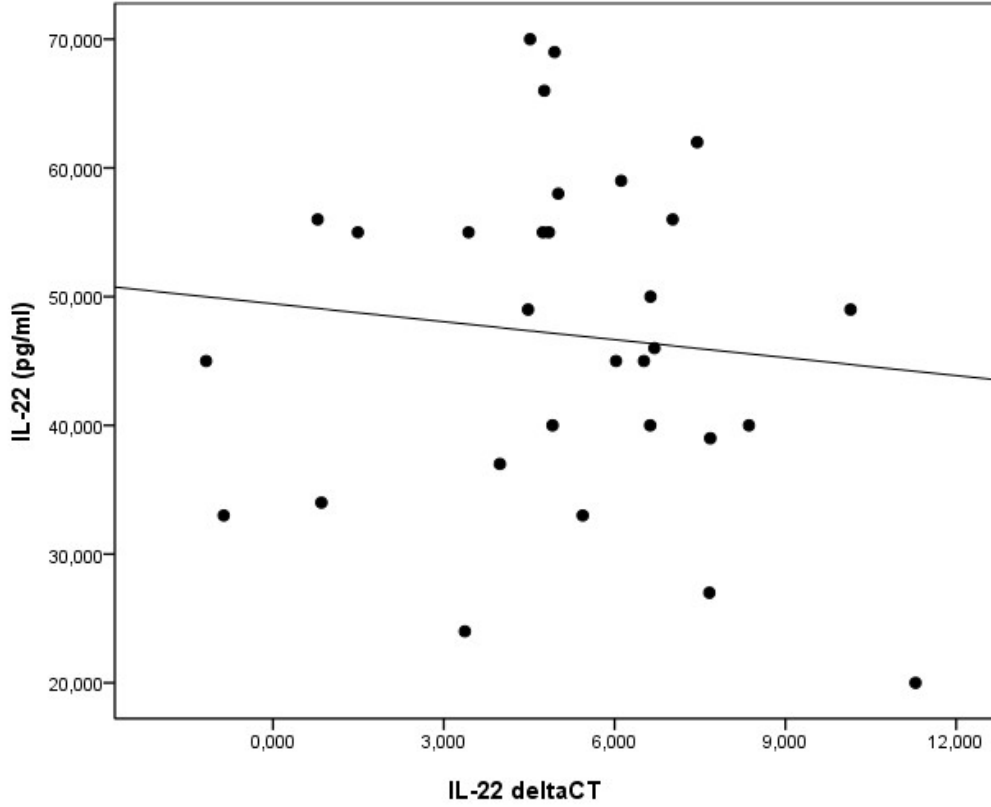
Şekil 4-18: Th9 hücre yüzdesi- IL-9 deltaCT ilişkisi



Şekil 4-19: Tc9 hücre yüzdesi- IL-9 deltaCT ilişkisi

4.2.5. IL-22 Plazma Sitokin Düzeylerinin IL-22 Gen Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi

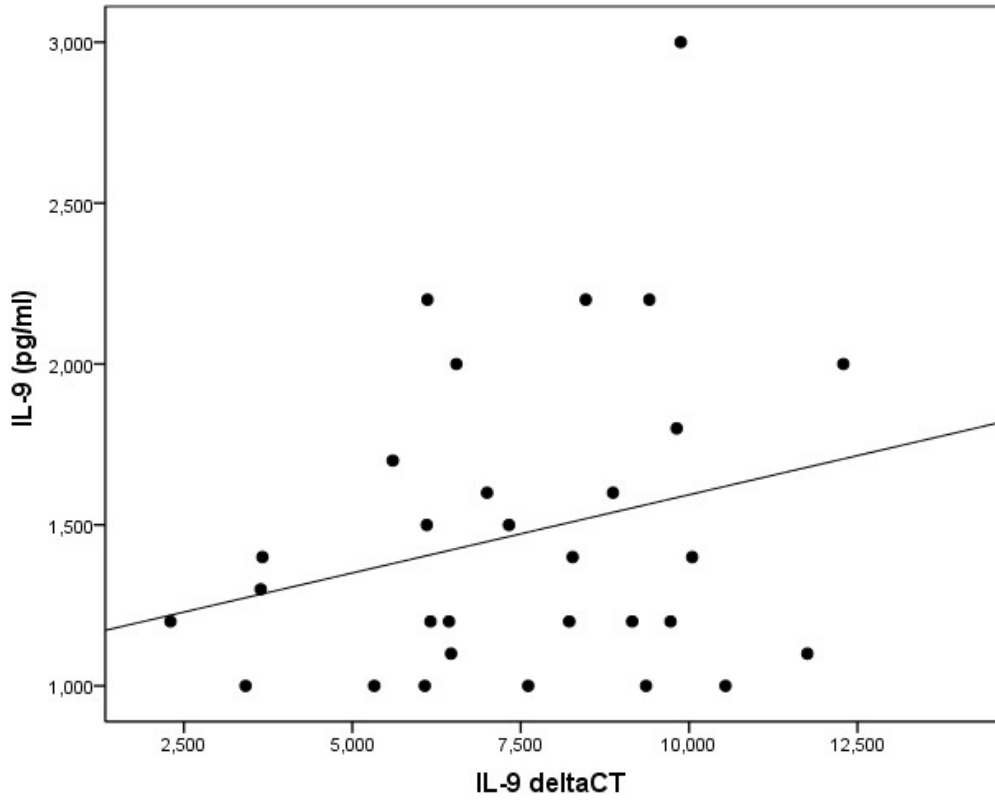
Plazma IL-22 (pg/ml) düzeyi ve IL-22 mRNA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemiştir ($p=0,586$; $R=-0,104$) (Şekil 4-20).



Şekil 4-20: Plazma IL-22 (pg/ml) – IL-22 deltaCT ilişkisi

4.2.6. IL-9 Plazma Sitokin Düzeylerinin IL-9 Gen Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi

Plazma IL-9 (pg/ml) düzeyi ve IL-9 mRNA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemiştir ($p=0,183$; $R=0,250$) (Şekil 4-21).



Şekil 4-21: Plazma IL-9 (pg/ml) – IL-9 deltaCT ilişkisi

4.2.7. Çalışma Verilerinin Klinik Verilerle İlişkisinin İncelenmesi

Th22 hücre sıklığının klinik verilerle ilişkisi incelendiğinde, HbA1c, açlık glukozu ile orta düzeyde pozitif yönde ve c-peptid ile orta düzeyde negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla; $R=0,638$, $p<0,01$; $R=0,661$, $p<0,01$; $R=-0,611$, $p<0,01$).

Th9 hücre sıklığının klinik verilerle ilişkisi incelendiğinde, HbA1c, açlık glukozu ile orta düzeyde pozitif yönde ve c-peptid ile orta düzeyde negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla; $R=0,639$, $p<0,01$; $R=0,692$, $p<0,01$; $R=-0,605$, $p<0,01$).

Th9 hücre sıklığının klinik verilerle ilişkisi incelendiğinde, sadece CRP ile orta derecede pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği saptanmıştır ($R=0,459$, $p<0,05$).

Plazma IL-22 konsantrasyonunun ve hücre sıklığının klinik verilerle ilişkisi incelendiğinde HbA1c ile yüksek düzeyde pozitif yönde, açlık glukozu ile orta düzeyde pozitif yönde ve c-peptid ile orta düzeyde negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği

saptanmıştır (sırasıyla; $R=0,721$, $p<0,01$; $R=0,634$, $p<0,01$; $R=-0,492$, $p<0,01$). Plazma IL-9 konsantrasyonunun klinik verilerle ilişkisi incelendiğinde açlık glukozu ile anlamlılık sınırına yakın orta düzeyde ilişki gösterdiği saptanmıştır ($R=0,34$, $p=0,07$). Tüm verilerin ilişki ve anlamlılıkları Tablo 3-11’de gösterilmiştir.

* Korelasyon anlamlılığı $p\leq 0,05$ ** Korelasyon anlamlılığı $p<0,01$		HbA1c (%)	Açlık Glukoz (mg/dL)	CRP (mg/L)	C-peptid (ng/mL)
TH22 %	R	,638**	,661**	0,212	-,611**
	P	0,000	0,000	0,261	0,000
TH9 %	R	,639**	,692**	0,263	-,605**
	P	0,000	0,000	0,160	0,000
TC22 %	R	0,225	0,16	,459*	-0,07
	P	0,231	0,399	0,011	0,714
TC9 %	R	-0,169	-0,211	0,09	0,23
	P	0,371	0,264	0,637	0,221
IL-22 (pg/ml)	R	,721**	,634**	0,058	-,492**
	P	0,000	0,000	0,761	0,006
IL9 (pg/ml)	R	0,308	0,34	0,102	-0,273
	P	0,098	0,066	0,592	0,144
IL-22 ΔCT	R	-0,069	-0,123	-0,086	0,224
	P	0,719	0,518	0,652	0,234
IL-9 ΔCT	R	0,186	0,052	-0,046	0,034
	P	0,324	0,785	0,81	0,858

P: İstatistiksel anlamlılık, R: Korelasyon katsayısı

Tablo 3-4-11: Çalışma verilerinin klinik verilerle ilişkisi

5. TARTIŞMA

Tip 1 diyabet (T1DM), pankreas beta (β) hücre harabiyetine yol açan immün sistem ve idiyopatik mekanizmaların rol alması nedeniyle, insülin salınımı ve/veya insülin direncinde meydana gelen bozukluktan kaynaklanan, progresif süreçli metabolik bir hastalıktır [1]. Diyabet hastalarının tüm dünyada 422 milyonun üzerinde olduğu tahmin edilmektedir [3]. Kazanılmış bağışıklık sisteminin elemanı olan T lenfositleri ve alt grupları T1DM'in oluşmasındaki en önemli mekanizmalardan biridir. Normal koşullar altında otoreaktif T lenfositleri timusta merkezi tolerans mekanizması ile elemine edilirler. Fakat kalan birkaç otoreaktif T lenfosit bu timik eliminasyondan kaçarak periferik dolaşıma katılır [4]. Bu reaktif hücreler, diğer immün sistem elemanlarıyla dengeyi sağlarken aralarındaki dengenin bozulması hastalığın başlaması ve ilerlemesine neden olabilmektedir [5-7].

Otoimmün diyabet olan T1DM T lenfositleri ve alt gurplarını, B lenfositleri, doğal öldürücü hücreleri, makrofajları, dentritik hücreleri kapsayan ve β hücre yıkımına sebebiyet veren otoimmün bir hastalık olarak bilinir. Sitokinler bu hücrelerden üretilir ve β hücre harabiyet ve regülasyonunda önemli rol alırlar [63].

Çalışmamızda, $CD3^+CD4^+IL-22^+$ (Th22), $CD3^+CD8^+IL-22^+$ (Th22) ile $CD3^+CD4^+IL-9^+$ (Th9) ve $CD3^+CD8^+IL-9^+$ (Tc9) alt grup sıklığı, plazmadan IL-22 ve IL-9 sitokin seviyesi ile bu sitokinlerin gen düzeyindeki ekspresyonları incelenmiş ve klinik verilerle ilişkisi araştırılmıştır. Tc hücrelerinin diyabet ile ilişkisini inceleyen çalışma yok denecek kadar azdır. Bu nedenle çalışmamızda bu hücre grubu da incelenmiştir.

T lenfositleri ve alt gruplarından olan Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 hücreleri ve salgıladıkları sitokinlerin diyabet patogeneğinde rolleri tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalar hastalıkla ilişkilendirilebileceklerini vurgulamaktadır.

Çalışmalar IL-22'nin IL-1 β salınımını arttırarak T2DM'lilerdeki adipoz doku inflamasyonunda önemli bir yeri olduğunu göstermiştir [64]. Ancak başka bir çalışmada IL-22 serum seviyesi kontrollere göre diyabetik hastalarda daha düşük bulunmuştur [65]. Ayrıca IL-22 Regenerating (Reg) gen ekspresyonunu arttırarak adacıklarda β hücre rejenerasyonunu tetikleyebilir ve apoptozu engelleyebilir. Bir diğer çalışmada Th17 ve Th22'nin, T1DM'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre önemli derecede yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu hastalarda Th22 hücreleri Th17 hücreleri ile pozitif ilişki

göstermiştir. Ancak serumda IL-17 ve IL-22 arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır [67]. Th1, Th17 ve Th22 hücrelerinin hem periferik sıklığının hem de toplam miktarının koroner ateroskleroz kalp hastalığı olan diyabetli hastalarda fazlasıyla yüksek bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada proinflamatuvar Th hücrelerinin, özellikle de Th22'nin, diyabetlilerde kardiyovasküler komplikasyonları arttırdığı vurgulanmıştır [68].

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada genç diyabetli hastalarda Th9 ve Th22 immün cevabı izlenerek IL-9 ve IL-22 serum düzeyleriyle korelasyonları incelenerek bu hücre ve sitokinlerin genç T1DM'deki patogenezi araştırılmıştır. Bu çalışmada Th22 ve Th9 hücre sıklığı ile serum IL-22 ve IL-9'un T1DM'lilerde sağlıklılara göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmış ve Th22/IL-22 ilişkisi ile Th9/IL-9 ilişkileri açısından pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. [18]. Çalışmamızda da Th22 hücre sıklığı ve plazma IL-22'si (pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde orta derecede korelasyon gösterirken ($p=0,011$; $R=0,456$), Th9 hücre sıklığı ve plazma IL-9'unun (pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermediği saptanmıştır ($p=0,09$; $R=0,315$). Ayrıca genç T1DM'lilerde yapılan bu çalışmada Th22, Th9 ve salgıladıkları IL-22 ve IL-9'un HbA1c ve CRP verileriyle pozitif yönde anlamlı derecede korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda ise Th22 hücre sıklığının HbA1c, açlık glukozu ile orta derecede pozitif yönde ve c-peptid ile orta derecede negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği (sırasıyla; $R=0,638$, $p<0,001$; $R=0,661$, $p<0,001$; $R=-0,611$, $p<0,001$); Th9 hücre sıklığının HbA1c, açlık glukozu ile orta derecede pozitif yönde ve c-peptid ile orta derecede negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği (sırasıyla; $R=0,639$, $p<0,001$; $R=0,692$, $p<0,001$; $R=-0,605$, $p<0,001$) saptanmıştır. Th22 hücre sıklığının sadece CRP ile orta derecede pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği ($R=0,459$, $p<0,05$) saptanmıştır. Plazma IL-22 konsantrasyonunun klinik verilerle ilişkisi incelendiğinde, HbA1c ile yüksek derecede ve açlık glukozu ile orta derecede pozitif yönde, c-peptid ile orta derecede negatif yönde anlamlı korelasyon gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla; $R=0,721$, $p<0,001$; $R=0,634$, $p<0,001$; $R=-0,492$, $p<0,01$).

Bu çalışmaya ek olarak çalışmamızda Tc22 ve Tc9 hücre sıklıkları, IL-22 ve IL-9 gen ekspresyonları ve bunların aralarındaki ilişkiler de incelenmiştir. Sağlıklı gruplar ile T1DM'li hasta grupları arasında Tc22 ve Tc9 lenfosit hücre yüzdeleri açısından istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır (Sırasıyla; $p<0,09$ [0,58 (0,32/0,74) ve 0,69

(0,52/0,86)], $p=0,13$ [0,33 (0,26/0,42) ve 0,26 (0,24/0,33)]. IL-22 ve IL-9 mRNA ekspresyonu açısından istatistiksel anlamlılık gözlenmemiş (sırasıyla; $p=0,33$ [(5,86 $\pm$ 1,98) ve (4,75 $\pm$ 2,75)]; $p=0,71$ [(7,27 $\pm$ 3,39) ve (7,64 $\pm$ 3,12)] ancak IL-22 ve IL-9 mRNA ekspresyonları açısından istatistiksel anlamlılık saptanamamasına karşın (sırasıyla; $p=0,33$ [(5,86 $\pm$ 1,98) ve (4,75 $\pm$ 2,75)]; $p=0,71$ [(7,27 $\pm$ 3,39) ve (7,64 $\pm$ 3,12)], $2^{-\Delta\Delta C_t}$ kat değişimi hesaplamasına göre tip 1 diyabetlilerde IL-22 gen ekspresyonunun sağlıklılara göre 2,14 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Yine çalışmamızda Tc22 hücre sıklığı ve plazma IL-22'si (pg/ml), Th9 hücre yüzdesi ve plazma IL-9'u (pg/ml), Tc9 hücre yüzdesi ve plazma IL-9'u (pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı derecede korelasyon göstermemiştir (sırasıyla; ($p=0,200$; $R=0,289$), ($p=0,09$; $R=0,315$), ($p=0,156$; $R=0,410$)). Bu sonuçlar, hastalıkta Tc hücrelerinin yerine Th hücrelerinin daha aktif rol alabileceğini, ayrıca IL-22'nin hem gen düzeyinde hem de humoral ve hücreyel düzeyde T1DM'nin patogeneğinde önemli rol alabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmalar, obez ve T2DM'lilerde Th22 sıklığı ve IL-22 konsantrasyonunun yükseldiğini [69] ve serumda biyobelirteç saptanmak için yapılan çalışmalarda IL-22 ve IL-9 sitokinlerinin diyabetli hastalarda yüksek bulunmasının hastalık için umut vadeden biyobelirteç olabileceğini göstermektedir [65, 81, 82]. Çalışmamızda da sağlıklı gruplar ile T1DM'li hasta grupları arasında plazma IL-22 ve IL-9 düzeyleri (sırasıyla; $p=0,001$ [36,50 (26,25/46,25) ve 55,00 (45,00/58,75)], $p=0,02$ [1,20 (1,00/1,32) ve 1,55 (1,20/2,00)] ile Th22 ve Th9 lenfosit hücre sıklığı açısından (sırasıyla; $p<0,001$ [0,70 (1,05/0,45) ve 1,80 (1,35/2,15)], $p=0,0015$ [0,30 (0,17/0,42) ve 0,70 (0,40/0,90)] istatistiksel anlamlılık saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında IL-22'nin sadece diyabetin tip 2 alt grubunda değil aynı zamanda tip 1 alt grubunda da etkin bir rol alabileceği görülmektedir.

Bu sonuçlar yukarıda belirtilen çalışma verilerini desteklemekle birlikte, Th22 ve Th9'un salgıladıkları sitokinler ile hastalık patogeneğinde rol alabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca tip 2 diyabetlilerde yapılan çalışmada da çalışmamızda olduğu gibi Th22 hücre sıklığı ile plazma IL-22 seviyesinin pozitif yönde anlamlı korelasyon sergilediği saptanmıştır [69].

Atopik dermatitli hastalarda yapılan bir çalışmada [11] Th22 ve Th9 hücre sıklığı açısından anlamlı ilişki görülmezken, bizim çalışmamızda anlamlılık olduğu gözlenmiştir. Tc22 ve Tc9 hücre sıklığı ise atopik dermatitli hastalarda olduğu gibi çalışmamızdaki T1DM'li hastalarda da anlamlılık göstermemiştir (sırasıyla; $p<0,09$

[0,58 (0,32/0,74) ve 0,69 (0,52/0,86)], $p=0,13$ [0,33 (0,26/0,42) ve 0,26 (0,24/0,33)]. Bu sonuç otoimmün hastalıklarda Tc hücrelerinin doğrudan ilişkili olmayacağını ancak Th hücre grubunun adacık infiltrasyonunda görev alarak harabiyete sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Diyabette bu hücreler ve sitokinlerle yapılan çalışmalar son dönemlerde artmış olmakla birlikte literatürde yeterli sayıda bulunmaktadır. Bu çalışma, Tc22 ve Tc9 hücre sıklığı ile IL-22 ve IL-9 gen ekspresyonlarının araştırılması açısından ilk olma özelliğini taşıması nedeniyle gelecek çalışmalara ışık tutma niteliğindedir.

Çalışmamızın sonucu, Tc22 ve Tc9 hücrelerinin yerine Th22 ve Th9 hücrelerinin hücre sel, IL-22 ve IL-9 sitokinlerinin de humoral yanıtta önemli bir yere sahip olacağını düşündürmektedir. Ayrıca IL-22'nin gen düzeyindeki artışı, tip 1 diyabette de Th22 ve IL-22'nin hasta klinik verileri ile korelasyon göstermiş olması, bu faktörlerin hastalık patogenezinde önemli bir biyo-belirteç olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Malecki, M.T., *Genetics of type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. 68 Suppl1: p. S10-21.
2. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. 414(6865): p. 782-7.
3. Situation reports. Eriřim 02.04.2020, h.w.w.i.n.-r.f.-s.d.d.
4. Chen, W., A. Xie, and L. Chan, *Mechanistic basis of immunotherapies for type 1 diabetes mellitus*. Transl Res, 2013. 161(4): p. 217-29.
5. Askenasy, E.M. and N. Askenasy, *Is autoimmune diabetes caused by aberrant immune activity or defective suppression of physiological self-reactivity?* Autoimmun Rev, 2013. 12(5): p. 633-7.
6. Tan, T., et al., *Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review*. Clin Rev Allergy Immunol, 2014. 47(2): p. 234-43.
7. Xiao, J., et al., *PDCD5 negatively regulates autoimmunity by upregulating FOXP3(+) regulatory T cells and suppressing Th17 and Th1 responses*. J Autoimmun, 2013. 47: p. 34-44.
8. Gutter, I. and B. Becher, *APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation*. J Clin Invest, 2007. 117(5): p. 1119-27.
9. Zhang, L., et al., *Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis*. PLoS One, 2012. 7(4): p. e31000.
10. Andoh, A., et al., *Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts*. Gastroenterology, 2005. 129(3): p. 969-84.
11. Czarnowicki, T., et al., *Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population*. J Allergy Clin Immunol, 2015. 136(1): p. 104-115 e7.
12. Zhao, L., et al., *IL-22+ CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis*. Int J Rheum Dis, 2013. 16(5): p. 518-26.
13. Rolla, S., et al., *Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN-beta*. J Leukoc Biol, 2014. 96(6): p. 1155-64.
14. Kaplan, M.H., *Th9 cells: differentiation and disease*. Immunol Rev, 2013. 252(1): p. 104-15.
15. Ouyang, H., et al., *Increased interleukin9 and CD4+IL-9+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. Mol Med Rep, 2013. 7(3): p. 1031-7.
16. Pan, H.F., et al., *Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. 24(6): p. 515-22.
17. Saresella, M., et al., *Increased activity of Th-17 and Th-9 lymphocytes and a skewing of the post-thymic differentiation pathway are seen in Alzheimer's disease*. Brain Behav Immun, 2011. 25(3): p. 539-47.
18. Ryba-Stanislawowska, M., et al., *Th9 and Th22 immune response in young patients with type 1 diabetes*. Immunol Res, 2016. 64(3): p. 730-5.
19. Satman, I.v.a., *Diabetes Mellitus ve Komplasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneđi*, 2013. 6. Baskı.
20. Somedan WA, S.T., *Pathologic Physiology Mechanisms of Disease*. 1992 Cilt 2.

21. H., H., *Diabetes Mellitus'un Tarihçesi*. Aktüel Tıp Dergisi 1996. 7: p. 3.
22. Bagriacık N. İlkova H Yayın No:4, İ., *Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflaması ve Sıklığı*. İÜCTF Sürekli Tıp Eğitimi Komisyonu 1997: p. 9.
23. Bennett, P.H., T.A. Burch, and M. Miller, *Diabetes mellitus in American (Pima) Indians*. Lancet, 1971. 2(7716): p. 125-8.
24. Satman, I., et al., *Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults*. Eur J Epidemiol, 2013. 28(2): p. 169-80.
25. Günöz H., S.İ., *Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı-Eylem Planı: 2011/2014* 2011. Sağlık Bakanlığı Yayın No: 816.
26. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2014. 37 Suppl 1: p. S81-90.
27. American Diabetes, A., *Standards of medical care in diabetes--2011*. Diabetes Care, 2011. 34 Suppl 1: p. S11-61.
28. American Diabetes, A., *Standards of medical care in diabetes--2014*. Diabetes Care, 2014. 37 Suppl 1: p. S14-80.
29. International Expert, C., *International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes*. Diabetes Care, 2009. 32(7): p. 1327-34.
30. Tobias, D.K., et al., *Healthful dietary patterns and type 2 diabetes mellitus risk among women with a history of gestational diabetes mellitus*. Arch Intern Med, 2012. 172(20): p. 1566-72.
31. Vandorsten, J.P., et al., *NIH consensus development conference: diagnosing gestational diabetes mellitus*. NIH Consens State Sci Statements, 2013. 29(1): p. 1-31.
32. Sperling, M.A., *Diabetes mellitus in children*. Pediatr Clin North Am, 2005. 52(6): p. xv-xvi.
33. Lai, A.Y. and M. Kondo, *T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell*. Semin Immunol, 2008. 20(4): p. 207-12.
34. Petrie, H.T. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus*. Annu Rev Immunol, 2007. 25: p. 649-79.
35. MacDonald, H.R., A. Wilson, and F. Radtke, *Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice*. Trends Immunol, 2001. 22(3): p. 155-60.
36. Rossi, F.M., et al., *Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1*. Nat Immunol, 2005. 6(6): p. 626-34.
37. Alves, N.L., et al., *Thymic epithelial cells: the multi-tasking framework of the T cell "cradle"*. Trends Immunol, 2009. 30(10): p. 468-74.
38. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(5): p. 309-22.
39. Ma, D., Y. Wei, and F. Liu, *Regulatory mechanisms of thymus and T cell development*. Dev Comp Immunol, 2013. 39(1-2): p. 91-102.
40. Zhu, J. and W.E. Paul, *Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors*. Immunol Rev, 2010. 238(1): p. 247-62.
41. Trifari, S., et al., *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2009. 10(8): p. 864-71.

42. Duhen, T., et al., *Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells*. Nat Immunol, 2009. 10(8): p. 857-63.
43. Ramirez, J.M., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells*. Eur J Immunol, 2010. 40(9): p. 2450-9.
44. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. 204(8): p. 1849-61.
45. Azizi, G., R. Yazdani, and A. Mirshafiey, *Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge*. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2015. 47(4): p. 108-17.
46. Batista, M.D., et al., *CD57 expression and cytokine production by T cells in lesional and unaffected skin from patients with psoriasis*. PLoS One, 2013. 8(2): p. e52144.
47. Res, P.C., et al., *Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis*. PLoS One, 2010. 5(11): p. e14108.
48. Robat-Jazi, B., et al., *High Frequency of Tc22 and Th22 Cells in Myasthenia Gravis Patients and Their Significant Reduction after Thymectomy*. Neuroimmunomodulation, 2018. 25(2): p. 80-88.
49. Cui, G., *TH9, TH17, and TH22 Cell Subsets and Their Main Cytokine Products in the Pathogenesis of Colorectal Cancer*. Front Oncol, 2019. 9: p. 1002.
50. Nowak, E.C. and R.J. Noelle, *Interleukin-9 and T cell subsets*. Cell Cycle, 2009. 8(23): p. 3798-9.
51. Veldhoen, M., et al., *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. Nat Immunol, 2008. 9(12): p. 1341-6.
52. Dardalhon, V., et al., *IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells*. Nat Immunol, 2008. 9(12): p. 1347-55.
53. Chang, H.C., et al., *The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation*. Nat Immunol, 2010. 11(6): p. 527-34.
54. Kaplan, M.H., et al., *STAT3-dependent IL-21 production from T helper cells regulates hematopoietic progenitor cell homeostasis*. Blood, 2011. 117(23): p. 6198-201.
55. Goswami, R. and M.H. Kaplan, *Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells*. J Immunol, 2012. 189(6): p. 3026-33.
56. Tan, C., et al., *Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site*. J Immunol, 2010. 185(11): p. 6795-801.
57. Lu, Y., et al., *Tumor-specific IL-9-producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(6): p. 2265-70.
58. Lu, Y., et al., *Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo*. J Clin Invest, 2012. 122(11): p. 4160-71.
59. Lu, Y. and Q. Yi, *Utilizing TH9 cells as a novel therapeutic strategy for malignancies*. Oncoimmunology, 2013. 2(3): p. e23084.
60. Ye, J., et al., *Circulating Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, and Treg Levels in Aortic Dissection Patients*. Mediators Inflamm, 2018. 2018: p. 5697149.

61. Lin, Y.Z., et al., *Circulating Th22 and Th9 levels in patients with acute coronary syndrome*. Mediators Inflamm, 2013. 2013: p. 635672.
62. Visekruna, A., et al., *Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation*. Eur J Immunol, 2013. 43(3): p. 606-18.
63. Hassan, G.A., et al., *Role of immune system modulation in prevention of type 1 diabetes mellitus*. Indian J Endocrinol Metab, 2012. 16(6): p. 904-9.
64. Dalmas, E., et al., *T cell-derived IL-22 amplifies IL-1beta-driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes*. Diabetes, 2014. 63(6): p. 1966-77.
65. Chen, H., et al., *Expression of T-helper-associated cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with retinopathy*. Mol Vis, 2012. 18: p. 219-26.
66. Singh, B., et al., *Immunomodulation and regeneration of islet Beta cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes*. J Interferon Cytokine Res, 2011. 31(10): p. 711-9.
67. Xu, X., et al., *Increased Th22 cells are independently associated with Th17 cells in type 1 diabetes*. Endocrine, 2014. 46(1): p. 90-8.
68. Zhao, R.X., et al., *Increased peripheral proinflammatory T helper subsets contribute to cardiovascular complications in diabetic patients*. Mediators Inflamm, 2014. 2014: p. 596967.
69. Zhao, R., et al., *Elevated peripheral frequencies of Th22 cells: a novel potent participant in obesity and type 2 diabetes*. PLoS One, 2014. 9(1): p. e85770.
70. Alnek, K., et al., *Increased Blood Levels of Growth Factors, Proinflammatory Cytokines, and Th17 Cytokines in Patients with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes*. PLoS One, 2015. 10(12): p. e0142976.
71. Honkanen, J., et al., *IL-17 immunity in human type 1 diabetes*. J Immunol, 2010. 185(3): p. 1959-67.
72. Vaseghi, H. and Z. Jadali, *Th1/Th2 cytokines in Type 1 diabetes: Relation to duration of disease and gender*. Indian J Endocrinol Metab, 2016. 20(3): p. 312-6.
73. Walker, L.S. and M. von Herrath, *CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2016. 183(1): p. 16-29.
74. Baeza, N., et al., *Specific reg II gene overexpression in the non-obese diabetic mouse pancreas during active diabetogenesis*. FEBS Lett, 1997. 416(3): p. 364-8.
75. Liu, L., J.L. Liu, and C.B. Srikant, *Reg2 protects mouse insulinoma cells from streptozotocin-induced mitochondrial disruption and apoptosis*. Growth Factors, 2010. 28(5): p. 370-8.
76. Xiong, X., et al., *Pancreatic islet-specific overexpression of Reg3beta protein induced the expression of pro-islet genes and protected the mice against streptozotocin-induced diabetes mellitus*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. 300(4): p. E669-80.
77. Huszarik, K., et al., *Adjuvant immunotherapy increases beta cell regenerative factor Reg2 in the pancreas of diabetic mice*. J Immunol, 2010. 185(9): p. 5120-9.
78. Liu, J.L., et al., *Possible roles of reg family proteins in pancreatic islet cell growth*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2008. 8(1): p. 1-10.
79. Parikh, A., A.F. Stephan, and E.S. Tzanakakis, *Regenerating proteins and their expression, regulation and signaling*. Biomol Concepts, 2012. 3(1): p. 57-70.

80. Unno, M., et al., *Production and characterization of Reg knockout mice: reduced proliferation of pancreatic beta-cells in Reg knockout mice*. Diabetes, 2002. 51 Suppl 3: p. S478-83.
81. Shruthi, S., et al., *Increased serum levels of novel T cell cytokines IL-33, IL-9 and IL-17 in subjects with type-1 diabetes*. Cytokine, 2016. 86: p. 6-9.
82. Fisman, E.Z., Y. Adler, and A. Tenenbaum, *Biomarkers in cardiovascular diabetology: interleukins and matrixins*. Adv Cardiol, 2008. 45: p. 44-64.
83. Camcıoğlu, Y., ed. *Bağıışıklık Sistemi ve Yetersizlikleri*. 2013.
84. Dumoutier, L., J. Louahed, and J.C. Renauld, *Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9*. J Immunol, 2000. 164(4): p. 1814-9.
85. Xie, M.H., et al., *Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R*. J Biol Chem, 2000. 275(40): p. 31335-9.
86. Dumoutier, L., et al., *IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes*. Genes Immun, 2000. 1(8): p. 488-94.
87. Pestka, S., et al., *Interleukin-10 and related cytokines and receptors*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 929-79.
88. Kotenko, S.V., et al., *Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes*. J Biol Chem, 2001. 276(4): p. 2725-32.
89. Lejeune, D., et al., *Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10*. J Biol Chem, 2002. 277(37): p. 33676-82.
90. Sonnenberg, G.F., L.A. Fouser, and D. Artis, *Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22*. Nat Immunol, 2011. 12(5): p. 383-90.
91. Guo, H. and D.J. Topham, *Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection*. J Virol, 2010. 84(15): p. 7750-9.
92. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis*. Nature, 2007. 445(7128): p. 648-51.
93. Veldhoen, M., et al., *The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins*. Nature, 2008. 453(7191): p. 106-9.
94. Schmitt, E., et al., *IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma*. J Immunol, 1994. 153(9): p. 3989-96.
95. Beriou, G., et al., *TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells*. J Immunol, 2010. 185(1): p. 46-54.
96. Blom, L., et al., *IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils*. PLoS One, 2011. 6(7): p. e21695.
97. Ramming, A., et al., *Maturation-related histone modifications in the PU.1 promoter regulate Th9-cell development*. Blood, 2012. 119(20): p. 4665-74.
98. Guo, L., et al., *IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(32): p. 13463-8.

99. Elyaman, W., et al., *IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(31): p. 12885-90.
100. Jager, A., et al., *Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes*. J Immunol, 2009. 183(11): p. 7169-77.
101. Knoops, L. and J.C. Renauld, *IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis*. Growth Factors, 2004. 22(4): p. 207-15.
102. Liu, Y., et al., *Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE*. Nat Med, 2006. 12(5): p. 518-25.
103. Nowak, E.C. and R.J. Noelle, *Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine*. Immunology, 2010. 131(2): p. 169-73.
104. Soroosh, P. and T.A. Doherty, *Th9 and allergic disease*. Immunology, 2009. 127(4): p. 450-8.
105. Hang, H., et al., *Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy*. Mol Vis, 2014. 20: p. 1137-45.
106. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Quantitation of DNA and RNA*. CSH Protoc, 2007. 2007: p. pdb ip47.
107. Mane, V.P., et al., *Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis*. J Biomol Tech, 2008. 19(5): p. 342-7.
108. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
109. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.

HAM VERİLER

Örneklerin RNA konsantrasyonları ve kaliteleri

Hasta Kodu	Konsantrasyon (ng/μl)	OD (A230/A260)
H1	300	1,70
H2	210	1,73
H3	150	1,80
H7	180	1,76
H8	250	1,80
H9	130	1,80
H10	280	1,71
H11	120	1,72
H12	150	1,80
H13	220	1,70
H14	190	1,76
H15	110	1,70
H16	130	1,71
H17	160	1,80
H18	210	1,75
H19	120	1,70
H20	170	1,71
K1	250	1,80
K2	190	1,80
K3	170	1,80
K4	170	1,80
K5	210	1,72
K6	400	1,72
K7	350	1,77
K8	160	1,71
K9	220	1,80
K10	310	1,76

H: Hasta, K: Sağlıklı Kontrol

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi

Proje Adı:

TİP 1 DİYABETLİLERDE IL-22 ve IL-9 İMMÜN CEVABININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Araştırmanın Amacı:

Bu araştırmanın amacı, bağışıklık sistemi hücreleri olan T lenfositlerinin tip 1 diyabet sürecindeki etkinliklerini ve fonksiyonlarını araştırmaktır. Araştırılan bu hücre grubunun hastalıkta etkin rol alıp almadığı araştırılarak, diyabet tedavisine katkı sağlanacaktır.

Araştırmada Kullanılacak Yöntemler:

- Bu araştırmaya hasta ve sağlıklı toplam 30 gönüllü katılacaktır.
- Çalışmaya katılacak olan gönüllülere önce yapılacak çalışmayla ilgili aydınlatılmış onam formu okutularak imzalatılacak ve daha sonra gönüllülerin kanları 10 ml’lik heparinli (yeşil kapaklı) ve EDTA’lı tüplere (mor kapaklı) alınacak ve deneysel kısımları İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde ve Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarlarında çalışılacaktır.
- Çalışma basamakları gerçekleştirildikten sonra veriler kendi aralarında istatistiksel analiz yapılarak kıyaslanacaktır.

Çalışmanın basamakları;

1. Akan hücre ölçer adı verilen cihazda IL-22 ve IL-9 sitokin moleküllerini salgılayan hücreler yüzde (%) olarak ölçülecektir.
2. Akım sitometrik boncuk metodu ile kan örneklerinden elde edilen plazma materyali kullanılarak serbest haldeki IL-22 ve IL-9 sitokin moleküllerinin miktarları ölçülecektir.
3. Gerçek zamanlı-Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZR) ile IL-22 ve IL-9 üretimine etkisi olan genlerinin ifade düzeyleri ölçülecektir.
4. Yukarıda çalışılan 3 yöntemin sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilerek hastalık süreci ve mekanizması aydınlatılmaya çalışılacaktır.

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi

- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırmacı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllü kendi hür iradesiyle çalışmaya katılmayabilir, katılsa bile mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın istediğinde çalışmadan ayrılabilir.
- Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
- Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkide bulunmayacaktır.
- Gönüllünün çalışmaya katılım süreci sadece gönüllüden kan örneğinin alınması ile sınırlıdır.
- Çalışma kabul kriterlerine ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırmacının isteği ile çıkarılabilirsiniz.
- Araştırmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkmanız ya da çıkarılmanız halinde hastalığınızın tedavisi ile ilgili hiçbir aksama olmayacaktır.
- Kimlik bilgileriniz gizli tutulacak ve sizden alınacak kandan elde edilecek tüm materyaller özel bir kodlama ile kodlanacak ve bu bilgiler üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

III-Olası riskler ve faydalar

Yapılacak araştırmanın getirebileceği olası riskler:

Size ait bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır. Bu bilgilerin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

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

Olası yararlar:

Bu incelemelerin esas amacı hastalığınız sırasında ortaya çıkan/çıkma olasılığı bulunan immünolojik anomalileri araştırmaktır. Tip 1 diyabet oluşumunda araştırılan hücre gruplarınızın hastalıkta etkin rol alıp almadığına yardımcı olacak ve diyabet immünoterapisine (Bağışık sistemi elemanlarıyla tedavi) yön verecektir.

(Gönüllünün Beyanı)

Çalışmaya Katılma Onayı

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacı- Hekimin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih:



ETİK KURUL KARARI

SAYI: ATADEK-2016/16
KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr. Ali Osman GÜROL , Yrd. Doç. Dr. Meltem KİLERCİK

Sorumluğunu yürüttüğünüz **“TİP 1 DİYABETLİLERDE IL-22 Ve IL-9 İMMÜN CEVABININ DEĞERLENDİRİLMESİ”** başlıklı proje 13.10.2016 tarih 2016/16 Sayılı Atadek Kurul Toplantısında görüşülmüş olup, 2016-16/9 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Prof. Dr. İsmail Hakkı ULUS.

Prof.Dr. İsmail Hakkı ULUS
ATADEK Kurul Başkanı

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU (ATADEK)

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın başlığı:

TİP 1 DİYABETLİLERDE IL-22 Ve IL-9 İMMÜN CEVABININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın yürütücüsü (sorumlusu):

Prof. Dr. Ali Osman GÜROL , Yrd. Doç. Dr. Meltem KİLERCİK

Karar:

Kabul (Etik olarak uygun) (☒)

Revizyon ()*

Etik olarak uygun değil ()**

Toplantı Tarihi: 13/10/2016

Karar Numarası: 2016-16/9

Kurul Üyesi-Unvan Ad-Soyad	İmza	Karara	
		Katılıyorum	Katılmıyorum***
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus (Başkan)		()	()
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan Yrd)		(X)	()
Prof.Dr. Mert Ülgen		(X)	()
Doç.Dr. Ükke Karabacak		(X)	()
Doç.Dr. A.Elif Eroğlu Büyüköner		(X)	()
Doç.Dr. Berrin Karadağ		(X)	()
Yrd.Doç.Dr. Fatih Artvinli		(X)	()
Yrd.Doç.Dr. Günseli Bozdoğan		(X)	()

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TİP 1 DİYABETLİLERDE IL-22 VE IL-9 İMMÜN CEVABININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 15	% 7	% 6	% 10
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Fatma Pelin Cengiz. "Yeni Tanımlanmış Bir T Hücre Alt Tipi: Th22 ve Cilt Hastalıkları", Turkish Journal of Dermatology / Türk Dermatoloji Dergisi, 2014 Yayın	% 2
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
3	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	% 2
4	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	% 1
5	pt.slideshare.net İnternet Kaynağı	% 1
6	readgur.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	azkurs.org İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ÇAĞDAŞ UĞUR	Soyadı	ADAŞ
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	08.06.1989
Uyruğu	T.C	TC Kim No	23429369558
Email	c.uguradas@hotmail.com	Tel	05549345123

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ, DETAE, İMMÜNOLOJİ A.D.	2013
Lisans	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	2011
Lise	GAZİOSMANPAŞA ANADOLU LİSESİ	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	BÖLGE SORUMLUSU	BECTON DICKINSON	2017-...
2.	BİYOLOG	ACIBADEM LABMED	2016-2017

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	ÇOK İYİ	ÇOK İYİ	ÇOK İYİ	83,75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	84		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
SPSS	ÇOK İYİ
GRAPHPAD PRISM	ÇOK İYİ
MICROSOFT OFFICE	ÇOK İYİ

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri:

- 23. Ulusal İmmünoloji Kongresi, En iyi poster ödülü (2015)
- 3. Uygulamalı İmmünohistokimya Eğitimi (2014)
- 3. Uygulamalı Western Blot Eğitimi (2014)
- 20. Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi (2014)
- Türk Diyabet Vakfı, En iyi bilimsel proje 3.'lük ödülü (2013)
- 4. Türk – US Flow Cytometry Workshop (2013)

- 19. Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi (2013)
- İstanbul Üniversitesi, Laboratuvar Deney Hayvanları kullanım Sertifikası (2011)
- Adas CU., Yilmaz A., Satman I., Deniz G., Gurol AO., Yilmaz MT. Evalution of CD3⁺CD56⁺ NKT cells in patient with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. Turkish J. Molecular Bio. and Biotech. May 2017, vol.02 Supplement.
- Gurol AO., Kursun AO., Kasapoglu P., Aydin B., Adas CU., Ozdemir A., Cevik A., Kucuk M., Cakiris A., Kucuksezer UC., Ustek D., Suzergoz F., Bakkaloglu H., Aydin AE., Deniz G., Karsidag K., Yilmaz MT. “An Overview of the Experimental Islet Isolation in Human Pancreas”, J Immune Serum Biol. 1(1):1-3; 2015.
- İlhan Tahrali, Umut Can Kucuksezer, Cagdas Ugur Adas, Abdullah Yilmaz, Ugur Uygunoglu, Ayse Altintas, Gunnur Deniz, “Natural Killer Cells: Do they have any Immune Regulatory Effects in Multiple Sclerosis?”, 2nd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress (MIMIC-II), Antalya-Turkey, 2014 (Poster Presentation).
- İlhan Tahrali, Umut Can Kucuksezer, Esin Cetin-Aktas, Nilgun Okumus-Akdeniz, Abdullah Yilmaz, Cagdas Ugur Adas, Ugur Uygunoglu, Ayse Altintas, Gunnur Deniz, “Natural Killer cells: Do they have any immune regulatory effects in Multiple Sclerosis?”, World Immune Regulation Meeting VIII (WIRM- VIII), Davos-Switzerland, 2014 (Poster Presentation).
- Çağdaş Uğur Adaş, İlhan Tahralı, Abdullah Yılmaz, Umut Can Küçüksezer, İlhan Satman, Günnur Deniz, Ali Osman Gürol, M. Temel Yılmaz, “Tip-1 ve tip-2 diyabetli hastalarda CD3⁺CD56⁺ hücre oranları ve IFN-gamma, IL-17a düzeyleri”, 23. Ulusal İmmünoloji Kongresi, Antalya, 2015 (Poster Bildiri).
- İlhan Tahralı, Umut Can Küçüksezer, Nilgün Akdeniz, Esin Aktaş, Çağdaş Uğur Adaş, Uğur Uygunoğlu, Ayşe Altıntaş, Günnur Deniz, “Multipl Skleroz hastalarında CD16⁺CD56^{soluk} ve CD16⁻CD56^{parlak} NK hücrelerinin farklı sitokin uyarımlarına geç yanıtları”. 23. Ulusal İmmünoloji Kongresi, Antalya, 2015 (Poster Bildiri).
- Çağdaş Uğur Adaş, İlhan Tahralı, Abdullah Yılmaz, Umut Can Küçüksezer, İlhan Satman, Günnur Deniz, Ali Osman Gürol, M. Temel Yılmaz, “Diyabet Patogenezinde CD3⁺CD56⁺ hücre grubu oranları ve salgıladıkları IFN-gamma ve IL-17a düzeyleri”. 51. Ulusal Diyabet Kongresi, Antalya, 2015 (Sözlü Bildiri).
- Suzan Çınar, Çağdaş Uğur Adaş, Selda Hancerli Törün, Ayper Somer, Günnur Deniz, “CD40 ekspresyonu negatif bir hiper immunoglobulin M sendromu olgusu”. 22. Ulusal İmmünoloji Kongresi, İzmir, 2013 (Poster Bildiri).
- Metabolik Sendromda Deneysel Hayvan Modelleri, Gelmez MY, Kasapoğlu P, Adaş ÇU, Tahralı İ, Gazioğlu SB, Çevik A, Deniz G. Deneysel Tıp Dergisi, Cilt:2 Sayı:4 Sayfa 15-21, 2013.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

