

616.5-002.157.2:612.112

B 419 h

II

MFN: 5573

1997-884



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

BEHÇET HASTALIĞINDA NÖTROPİL ENDOTEL

ADEZYONUNDAN SORUMLU FAKTÖRLERİN

ARAŞTIRILMASI-II

PROJE NO:TAG-1208

1997-884

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU
TÜBİTAK

Tıp Araştırma Grubu

Medical Sciences Research Grant Committee

İsim: Enine Kuru Cı'ya

616.5 - 002.157.2: 612.112

B 419 h

II

BEHÇET HASTALIĞINDA NÖTROPİL ENDOTEL

ADEZYONUNDAN SORUMLU FAKTÖRLERİN

ARAŞTIRILMASI-II

PROJE NO: TAG-1208

1997-884

Marmara Ün. Tıp F.
Hematoloji-İmmünoloji
BD

Dr.ŞÜKRAN ŞAHİN (ÖZGÜN)
Prof.Dr.TEVFİK AKOĞLU
Dr.CEMİLE MANTAŞ
Prof.Dr.HASAN YAZICI
Prof.Dr.SABAHATTİN YURDAKUL

S- 40

R- 23

TÜRKİYE GİLMSEL V
TEKNİK YASIRMA
KURUMU KUTUPHANESİ

ARALIK 1994
İSTANBUL

Bağış, Şubat 1995

19384

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: TAG-1208

2- Rapor Tarihi: 06.12.1994

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01 AĞUSTOS 1993 - 01 AĞUSTOS 1994

4- Projenin Adı: Behçet Hastalığında Nötrofil Adezyonundan sorumlu faktörlerin araştırılması -II

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Yürütücü, Şükran Şahin (Özgün)

Araştırmacılar : Cemile Mantaş, Sabahattin Yurdakul
Danışman : Tefvik Akoğlu, Hasan Yazıcı

6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji İmmünoloji
Bilim Dalı Altunizade İstanbul

7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

8- Öz (Abstract):

Biz daha önce Behçet'li hastalarda nötrofillerin endotel hücrelerine adezyonun arttığını göstermiştik. Bu hastaların nötrofillerinde B2 integrinlerin yüksek oranda eksprese edildiğini ve hastaların serum IL-8 düzeylerinin de sağlıklı kişilerden daha yüksek olduğunu bulmuştuk.

Bu çalışmada artmış adezyonun muhtemel mekanizmaları incelendi. Behçet'li hastalarda nötrofil yüzeyinden LECAM molekülünün kolayca döküldüğü görüldü. Hücre yüzeyinin sodyum azid ilave edilerek korunmasından sonra yapılan çalışmada LECAM düzeyi hastalarda 98.6 ± 3.6 , kontrollerde 98 ± 2 olarak bulundu. Sodyum azid ilave edilmeden yapılan çalışmada ise LECAM molekülü hasta nötrofillerinde 26 ± 28.5 , kontrol nötrofillerinde 93.4 ± 7.1 olarak bulundu ($p < 0.001$).

Behçet'li hastaların plazmalarında, solubl LECAM (sLECAM) düzeyinin ise sağlıklı kişilerden daha düşük olduğu görüldü. Sodyum azid ilave edilerek elde edilen plazmada sLECAM, hastada 1.58 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$, kontrolde 1.98 ± 0.6 $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçüldü ($p < 0.05$). Sodyum azid ilave edilmeden elde edilen plazmada ise sLECAM, hastada 1.82 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$, kontrolde 2 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçüldü ($p > 0.5$). Kontrollerin sodyum azidli ve sodyum azidsiz plazmalarında sLECAM düzeyleri arasında anlamlı fark görülmedi. Hastada ise sodyum azidli ve sodyum azidsiz plazmalarda sLECAM düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.1$).

Hasta monositlerinin yüzeyinde aktivasyon belirteci olan CD14, 25F9 ve G16/1 molekülünün artmış olduğu görüldü. Hastada, CD14 94.9 ± 3.7 , 25F9 48.1 ± 32.4 ve G16/1 15 ± 16.2 , kontrolde ise, CD14 87.3 ± 7.8 , 25F9 16.4 ± 15 ve G16/1 1.4 ± 1.4 olarak saptandı. Hasta serumlarında solubl CD14 (sCD14) düzeyinin artmış olduğu saptandı. sCD14 hastada, 8.1 ± 9.2 $\mu\text{g/ml}$, kontrolde 1.39 ± 0.73 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu.

Hasta monosit kültür süpernatantlarının PMN-endotel adezyonunu artırdıkları görüldü. Adezyon oranı, hasta monosit kültür süpernatantı varlığında 53.4 ± 17.9 , kontrol monosit kültür süpernatantı varlığında ise 38.4 ± 9.7 olarak bulundu ($p < 0.05$). Lipopolisakkarid (LPS) ve forbolmiristasetat (PMA) ile uyarıdan sonra da adezyon artırıcı etkiye fark olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: LECAM, Behçet hastalığı, Adezyon, Monosit, IL-8.

9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler

- VIII. Euler Symposium "Vasculitis" (İki adet poster)
- IX. Ulusal Romatoloji Kongresi (Bir adet bildiri)

10- Bilim Dalı: İmmünoloji, Bilim Dalı

Doçentlik B. Dalı Kodu:

ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

11- Dağıtım (*): ☐ Sınırlı☒ Sınırsız

12- Raporun Gizlilik Durumu :

☐ Gizli☒ Gizli Değil

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: TAG-1208

2- Rapor Tarihi: 06.12.1994

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01 AĞUSTOS 1993 - 01 AĞUSTOS 1994

4- Projenin Adı: Behçet Hastalığında Nötrofil Adezyonundan sorumlu faktörlerin araştırılması -II

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Yürütücü : Sükran Şahin (Özgün)
Araştırmacılar : Cemile Mantas, Sabahattin Yurdakul
Danışman : Tefvik Akoğlu, Hasan Yazıcı6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji İmmünoloji
Bilim Dalı Altunizade İstanbul

7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

ABSTRACT

We have shown previously that neutrophil adhesion to endothelial cells was high in patient with Behçet's disease. Furthermore β_2 integrin molecules were found to be highly expressed on neutrophils and serum IL-8 level was also high. In this study we have further evaluated mechanisms responsible in increased adhesion.

LECAM expression on neutrophils was low (26 ± 28.5) in Behçet's patients and this raised up to normal levels (98.6 ± 3.6) when blood samples collected into sodium azide containing tubes for cell membrane protection. Soluble LECAM (sLECAM) level in plasma was also significantly low but even became more significantly depressed when sodium azide added to blood samples before separation plasma from cellular compartment. All these changes were significantly different from normal controls.

In order to find the source of high serum IL-8 levels in Behçet's patients, purified monocytes were examined for activity markers. Behçet's patients monocytes were found to express increased CD14, 25F9 and G16/1 molecules on their surface as compared to normal control monocytes ($CD14$ 94.9 ± 3.7 , $25F9$ 48.1 ± 32.4 and $G16/1$ 15 ± 16.2 in patients, $CD14$ 87.3 ± 7.8 , $25F9$ 16.4 ± 15 and $G16/1$ 1.4 ± 1.4 in controls). Soluble CD14 level was also high in patients' plasma also indicating presence of activated monocytes in these patients.

Patient and control monocytes were cultured with LPS and PMA and collected culture supernatants were tested in neutrophil adhesion experiments performed with normal neutrophils. It has been shown that patients monocytes culture supernatants stimulated normal neutrophil adhesion to endothelial cells significantly.

A) Key Words: LECAM, Behçet's disease, adhesion, monocyte, IL-8.

9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler

- VIII. Euler Symposium "Vasculitis" (İki adet poster)
- IX. Ulusal Romatoloji Kongresi (Bir adet bildiri)

10- Bilim Dalı: İmmünoloji Bilim Dalı
Doçentlik B. Dalı Kodu: ISIC Kodu:
Uzmanlık Alanı Kodu:11- Dağıtım (*): ☐ Sınırlı ☒ Sınırsız12- Raporun Gizlilik Durumu : ☐ Gizli ☒ Gizli Değil

) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I GENEL BİLGİLER	
1 Behcet hastalığında immün bozukluklar	1-2
2 Endotel lökosit adezyon molekülleri	2-5
3 Nötrofil-endotel adezyonunda sitokinler	5-7
II MATERYAL VE METOD	8-20
III BULGULAR	21-25
IV TARTIŞMA	26-30
V KAYNAKLAR	31-33
VI TABLOLAR	34-40

ÖNSÖZ

Bundan önceki çalışmamızda (TAG-765) Behçet'li hastaların nötrofillerinde adezyon moleküllerini incelemiş ve CD11a'nın arttığını saptamıştık. Ayrıca Behçet'li hasta serumlarının, sağlıklı kişilerin nötrofilleri üzerindeki CD11a ve CD11b moleküllerini artırıcı etkisi olduğunu saptadık. Behçet'li hastalarda IL-8 düzeyini de yüksek bulduk. Yine bu hasta serumlarının PMN-endotel adezyonunu artırıcı etkisi olduğunu gördük. Bütün bu bulgulardan hareketle bu çalışmada, Behçet'li hastalarda yine bir adezyon molekülü olan LECAM molekülünü incelendi, Behçet'li hasta monositleri ve bu hastalarda artmış olan IL-8'in hücreyel kaynağı araştırıldı. Bu proje Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na desteklenmiştir (TAG-1208).

ÖZET

Biz daha önce Behçet'li hastalarda nötrofillerin endotel hücrelerine adezyonun arttığını göstermiştik (TAG-765). Ayrıca bu hastaların nötrofillerinde B2 integrinlerin yüksek oranda eksprese edildiğini ve hastaların serum IL-8 düzeylerinin de sağlıklı kişilerden daha yüksek olduğunu bulmuştuk.

Bu çalışmada, artmış adezyonun muhtemel mekanizmaları incelendi. Behçet'li hastalarda nötrofil yüzeyinden LECAM molekülünün kolayca döküldüğü görüldü. Hücre yüzeyinin sodyum azid ilave edilerek korunmasından sonra yapılan çalışmada LECAM düzeyi hastalarda 98.6 ± 3.6 , kontrollerde 98 ± 2 olarak bulundu. Sodyum azid ilave edilmeden yapılan çalışmada ise LECAM molekülü hasta nötrofillerinde 26 ± 28.5 kontrol nötrofillerinde 93.4 ± 7.1 olarak bulundu ($p < 0.001$).

Behçet'li hastaların plazmalarında, soluble LECAM (sLECAM) düzeyinin ise sağlıklı kişilerden daha düşük olduğu görüldü. Sodyum azid ilave edilerek elde edilen plazmada sLECAM, hastada 1.58 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$, kontrolde 1.98 ± 0.6 $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçüldü ($p < 0.05$). Sodyum azid ilave edilmeden elde edilen plazmada ise sLECAM, hastada 1.82 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$, kontrolde 2 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçüldü ($p > 0.5$). Kontrollerin sodyum azidli ve sodyum azidsiz plazmalarında sLECAM düzeyleri arasında anlamlı fark görülmedi. Hastada ise sodyum azidli ve sodyum azidsiz plazmalarda sLECAM düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.1$).

Hasta monositlerinin yüzeyinde aktivasyon belirtici olan CD14, 25F9 ve G16/1 molekülünün artmış olduğu görüldü. Hastada, CD14 94.9 ± 3.7 , 25F9 48.1 ± 32.4 ve G16/1 15 ± 16.2 , kontrolde ise, CD14 87.3 ± 7.8 , 25F9 16.4 ± 15 ve G16/1 1.4 ± 1.4 olarak saptandı. Hasta serumlarında solubl CD14 (sCD14) düzeyinin artmış olarak bulundu. sCD14 hastada, 8.1 ± 9.2 $\mu\text{g/ml}$, kontrolde 1.39 ± 0.73 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

Hasta monosit kültür süpernatantlarının PMN-endotel adezyonunu artırdıkları görüldü. Adezyon oranı, hasta monosit kültür süpernatantı varlığında 53.4 ± 17.2 , kontrol monosit kültür süpernatantı varlığında ise 38.4 ± 9.7 olarak bulundu ($p < 0.05$). Lipopolisakkarid (LPS) ve forbolmiristatasetat (PMA) ile uyarıdan sonra da adezyon artırıcı etkide fark olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

ABSTRACT

We have shown previously that neutrophil adhesion to endothelial cells was high in patients with Behçet's disease. Furthermore $\beta 2$ integrin molecules were found to be highly expressed on neutrophils and serum IL-8 level was also high. In this study we have further evaluated mechanisms responsible in increased adhesion.

LECAM expression on neutrophils was low (26 ± 28.5) in Behçet's patients and this raised up to normal levels (98.6 ± 3.6) when blood samples collected into sodium azide containing tubes for cell membrane protection. Soluble LECAM (sLECAM) level in plasma was also significantly low but even became more significantly depressed when sodium azide added to blood samples before separation plasma from cellular compartment. All these changes were significantly different from normal controls.

In order to find the source of high serum IL-8 levels in Behçet's patients, purified monocytes were examined for activity markers. Behçet's patients monocytes were found to express increased CD14, 25F9 and G16/1 molecules on their surface as compared to normal control monocytes (CD14 94.9 ± 3.7 , 25F9 48.1 ± 32.4 and G16/1 15 ± 16.2 in patients, CD14 87.3 ± 7.8 , 25F9 16.4 ± 15 and G16/1 1.4 ± 1.4 in controls).

Soluble CD14 (sCD14) level was also high in patients plasma also indicating presence of activated monocytes in these patients.

Patients and controls monocytes were cultured with LPS and PMA and collected culture supernatants were tested in neutrophils adhesion experiments performed with normal neutrophils. It has been shown that patients monocytes culture supernatants stimulated normal neutrophil adhesion to endothelial cells significantly.

GENEL BİLGİLER

BEHÇET HASTALIĞINDA İMMÜN BOZUKLUKLAR

Behçet hastalığı ilk kez 1937 yılında Dr.Hulusi Behçet tarafından tanımlanan pek çok organ tutulumu ile karakterize,sistemik, kronik bir hastalıktır. Oral aft, genital ülserasyon, üveit, deri lezyonları gibi mukokütanöz semptomlar sıklıkla görülmektedir.

Hastalığın etiyolojisi ile ilgili bugüne kadar tam bir açıklama yapılamamıştır. Bu nedenle hastalığın tanısında ve takibinde yardımcı olacak spesifik bir laboratuvar testi hâla yoktur. Hastaların lezyonlarının histolojik görünümü, yoğun PMN infiltrasyonunun görüldüğü akut enflamasyon özelliklerini taşımaktadır.

Bu hastalığın etiyolojisinde genetik bir baz üzerinde enfeksiyöz faktörlerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu yönde en çok araştırılan iki ajan Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) ve çeşitli streptokok suşlarıdır. Behçet hastalarından alınan serumlarda HSV-1 e karşı T-lenfosit cevabının zayıf olduğu ve serum IFN- γ düzeyinin de artmış olduğu saptanmıştır (Denman,1991). Etiyolojide hangi ajan yer alırsa alsın Behçet'li hastalarda immün sistemin çok farklı yönlerinin bozuk olduğu bilinmektedir.

Asıl bozukluğun ise PMN fonksiyonları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, paterji testinin erken döneminde (ilk 24 saat) ve yeni gelişen eritema nodosum lezyonlarında ağırlıklı olarak mononükleer hücrelerin infiltrasyonu gözlenmiştir (Yamana,1982).

Behçet hastalığında PMN aktivitesinin artmış olduğu da bildirilmiştir. Örneğin, PMN kemotaksisi, lizozomal enzim salınımları, fagositoz, O₂ metabolizmasında artış ve endotel hücrelerine sitotoksik aktivite artışı olduğu rapor edilmiştir (Niwa,1982). PMN lerin endotel hücrelerine adezyonları da artmıştır (Özgün,1993). Bundan başka PMN yüzeyinde adezyon moleküllerinden CD11a molekülü sağlıklı kişilerden daha yüksektir (Özgün,1993).

Ayrıca Behçet'li hastalarda endotel hücre bozuklukları da rapor edilmiştir. Bunlar arasında azalmış prostasiklin yapımı ve fibrinolitik aktivitede bozukluk sayılabilir (Kansu,1993).

Behçet'li hastaların serumlarında IL-8 düzeyleri de yüksektir (Özgün,1993). Bu bulgu artmış PMN kemotaksisi ve artmış adezyonu açıklayabilir.

Endotel ve PMN fonksiyonlarındaki bu ve bilinmeyen değişiklikler Behçet hastalarında sık görülen damar bozuklukları ve bununla ilişkili klinik belirtilerden sorumlu olabilir.

ENDOTEL-LÖKOSİT ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Enflamatuvar yanıtta ilk aşama nötrofillerin damar endoteli hücrelerine yapışmasıdır. Nötrofiller ancak bu aşamadan sonra dokulara geç ederler.

Lökositlerin dokulara göçü, lökosit ve endotel hücrelerinin yüzeyindeki adezyon molekülleri arasındaki dinamik etkileşme ile kontrol edilir.

Adezyonda olaya aktif olarak katılan bu moleküller yapısal özellikleri bakımından beş gruba ayrılırlar.

- 1.İmmünglobulin süper gen ailesi
- 2.İntegrin süper ailesi
- 3.Selektinler
- 4.katedrinler ve diğer sınıflanamayan adezyon molekülleri

1.İMMÜNGLOBULİN SÜPER GEN AİLESİ

İmmünglobulin molekülü ile homoloji gösteren moleküllerdir.Bu grupta ilk tanımlanan ve üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan ICAM-1 molekülüdür.Endotel hücreleri,uyarılmış fibroblastlar,keratinositler ve düz kas hücrelerinin yüzeyinde bulunur.Endotel hücre yüzeyinde sürekli bulunmakla beraber endotel hücresi sitokinlerle aktive olduğunda hücre yüzeyindeki miktarı artar.ICAM-1 ve ICAM-2 olarak iki farklı tipi tanımlanmıştır.ICAM-1 LFA-1 ve CR3'e bağlanır. ICAM-2 ise sadece LFA-1'e bağlanır (Zimmerman,1992).

Bu ailenin bir diğ er  yesi ise VCAM-1 dir. Bu molek l, lenfosit ve monositlerin yüzeyinde bulunan ve VLA olarak isimlendirilen moleküle bağlanır. Endotel hücresi yüzeyinde ancak stimülasyondan sonra görünür. Bu molek l de fibronektin, laminin gibi hücreler arasındaki dokularda bulunur (Hogg,1992).

2.İNTEGRİNLER

B1,B2,B3 integrinler olarak üç grupta toplanabilirler. B1 ve B2 integrinler PMN lerin granüllerinde bulunur ve adeso lar olarak isimlendirilirler.

B2 integrinler alfa ve   zincirlerinden olu mu  heterodimerik yapıda glikoproteinlerdir. Alfa zincirinin üç tipi bulunmaktadır. Bunlar CD11a, CD11b ve CD11c olarak isimlendirilirler.   zincirine ise CD18 adı verilmiştir. Her bir alfa zinciri   zinciri ile nonkovalan bağlıdır. Böylece oluşan CD11a+CD18 molek l  LFA-1, CD11b+CD18 molek l  Mac-1, CD11c+CD18 molek l  ise P 150,95 adını alır. Oluşan bu heterodimerler ICAM molekülleri ile birleşirler. Bu integrinler hücre yüzeyinde sürekli bulunurlar. Ancak PMN lerin aktivasyonu ile bu moleküllerde kalitatif ve kantitatif artış görülür (Stacker,1991).

3. SELEKTİNLER

Selektin ailesinin üyelerinin her birinin amino terminal ucu, memelilerdeki C-tip lektine benzer. Bu moleküller, epidermal growth faktöre benzeyen amino asit sekanslarına ve kompleman regülatör proteinlerinin küçük bir  nitine benzeyen ve çok sayıda tekrarlayan amino asit dizinimlerine sahiptirler. Adezyonda lektin kısmı önemlidir.

Selektinlerin üç tipi tanımlanmıştır.

- 1.E-Selektin
- 2.P-Selektin
- 3.L-Selektin

E-Selektin; endotel hücresi yüzeyinde bulunur. ELAM-1 adı verilen bu molekül normalde endotel hücresi yüzeyinde bulunmaz ancak aktivasyonla ortaya çıkar. Endotel hücresi IL-1 veya TNF ile stimüle edildiğinde ELAM-1 ekspresyonu görülür. Bu molekülün yüzeyde belirmesi için en az bir saat gereklidir. 4-8 saatte masimuma ulaşır ve uyarı devam etse bile 24-48 saat sonra kaybolur. Genellikle B2 integrinlerle bağlanır. Ancak nötrofil endotel adezyonunda B2 integrinler dışında da başka reseptörlere bağlanarak olaya katıldığı düşünülmektedir. Çünkü B2 integrinlere karşı kullanılan antikorlarla nötrofil-endotel adezyonu kısmen inhibe edilebilmektedir. Endotel yüzeyinde bulunuşu lökositlerin adezyonuna neden olur. T lenfositler ve özellikle bellek T lenfositleri bu moleküle bağlanarak dokulara göç ederler. Aynı şekilde monositler de aktive olduklarında bu moleküle bağlanarak damar dışına çıkarlar (Pigott,1991).

P-Selektin; histamin veya trombinle endotel hücresinin aktivasyonundan birkaç saniye sonra endotel hücresinin granüllerinden plazma membranına transfer olur. P-Selektinlere PMN lerin bağlanması için aktive olmaları ve B2 integrinlerin varlığı gerekmektedir. PMN lerin endotel hücresi üzerinde yuvarlanmalarını (rolling) sağlamak şeklinde önemli görevi bulunur. Bu molekül CD62P olarak bilinir. Diğer isimleri ise GMP-140 ve PADGEM dir (Zimmerman,1992).

L-Selektin; monosit, nötrofil ve lenfositlerin bazı alt gruplarında bulunan yüzey molekülüdür. Lektin/ hücre sel yapışma molekülü ailesi olarak tanımlanmışlardır ve bu ailenin bir üyesi olan lektin-adezyon-molekülü-1* (LECAM-1) nötrofil endotel adezyonunda önemlidir. Stimüle olmamış nötrofil yüzeyinde bulunur. Uyarılmış endotel ile PMN lerin ilk adeziv etkileşmesini regüle eder. Nötrofil-endotel etkileşmesinin ilk aşamasındaki yapışma gerçek anlamda yapışma değildir ve bu PMN lerin endotel üzerinde yuvarlanması şeklinde olur (Zimmerman,1992).

Bu aşamada LECAM-1, PMN lerin vasküler endotel hücresi (VEC) üzerinde yuvarlanmasını sağlar ve daha sonra B2 integrinlerin aktive olması ile gerçek PMN-VEC yapışması oluşur. B2 integrinler aktive olup esas adezyon oluştuktan sonra LECAM-1 molekülü PMN yüzeyinden ortama dökülür. Daha sonra bu molekül PMN lerin endotele adezyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon serbest,LECAM-1 molekülünün endotel üzerindeki

ligand ile birleşmesi ve daha sonra , nötrofillerin bu liganda bağlanmasının engellenmesi ile gerçekleşir. Ancak LECAM-1 in endotel üzerinde başka ligandının da olabileceği düşünülmektedir (Smith,1991).

PMN yüzeyinden LECAM-1 molekülünün koparılmasının IL-8 in etkisi ile olduğu ileri sürülmektedir. IL-8,PMN yüzeyinden LECAM-1 in kopması ve $\beta 2$ integrinlerin aktive olmasına neden olmaktadır. IL-8 in etkisi ile gerçekleşen LECAM-1 ve $\beta 2$ integrinlerdeki değişiklikler ekstrasvazasyon için gerekli olan adezyonda kritik rol oynar (Rot,1992).

MEL-14 molekülü, LECAM-1 molekülünün farelerdeki analogudur ve "lenfosit homing reseptör" olarak tanımlanmıştır. Aktive olmamış nötrofillerin endotele bağlanmasını sağlar. Ancak nötrofillerin, enflame dokudan geçişinde down regülatör role sahiptir. PMN lerin kemotaktik aktivasyonundan sonra, 96 k.d. luk bir protein olarak hücre yüzeyinden ortama dökülür. Bu protein,aktive olmuş PMN ler tarafından normal dokunun hasar görmesini ve hücre ekstrasvazasyonunu engeller (Kishimoto,1989).

Yine bir L-Selektin olan LAM-1 (lökosit adezyon molekülü) lenfositlerin "high endothelial venül"e (HEV) yapışmasına aracılık eder. Lenfosit ve nötrofiller aynı LAM-1 molekülünü taşırlar. Lökositlerin stimülasyonundan sonra LAM-1 molekülünün afinitesine ait değişiklikler oluşur ve bu olgu lökosit migrasyonunu direkt etkiler. MEL-14 ve LAM-1 birlikte, lenfositlerin HEV e yapışmasını sağlarlar.

NÖTROFİL-ENDOTEL ADEZYONUNDA SİTOKİNLER

Nötrofillerin endotele adezyonu ve bunu sağlayan yüzey reseptörlerinin sayısı ve aviditesinde pekçok mediatörün etkili olduğu gösterilmiştir. Bu mediatörler lenfositlerden, nötrofillerden ve bizzat endotel hücrelerinden salgılanabilirler. Bu sitokinler yapışma moleküllerini etkiledikleri gibi endotel hücresinin başka fonksiyonlarını da modüle edebilirler. Aşağıda nötrofil-endotel adezyonunda rol oynadığı kanıtlanan önemli mediatörler kısaca anlatılmaktadır.

1.İnterlökkin-1 (IL-1)

Endotel hücrelerinin PAF ("platelet activating factor") ve PDGF ("platelet derived growth factor") yapımını ve endotel üzerinde ICAM-1 ve ELAM-1 ekspresyonunu artırır (Mantovani,1989).

2.Tümör nekrozis faktör (TNF)

Endotel üzerine etkisi IL-1 gibidir. Lökositlerin endotele adezyonunu, IL-1 salınımını ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır.

3.İnterferon (IFN)

Endotel üzerine etkisi kendisine hastır ve diğer sitokinlerden farklıdır. Endotel hücrelerini stimüle ederek onun aksesuar hücre gibi davranmasına neden olur. Endotel hücresi üzerinde ICAM-1 ekspresyonunu çok yavaş olmakla beraber artırır.

4.Transforming growth faktör (TGF)

Endotel üzerinde modülatör aktiviteye sahiptir. Nötrofillerin endotel hücrelerine yapışması TGF- β ile baskılanır. TNF ve IL-1 in nötrofil adezyonu üzerindeki etkilerini baskılar (Gamble,1991).

5.İnterlökkin-8 (IL-8)

Endotel hücreleri aktive olduklarında IL-8 sentez ederler.Bu molekülün sentezi, stimülasyondan 4-24 saat sonra maksimum düzeye ulaşır (Schröder,1989). IL-8, PMN ler için kemotaktik etkiye sahiptir. Endotel hücresi tarafından sentez edildiği zaman PMN lerin transmigrasyonunu etkileyebilir (Brandt,1992). IL-8 monosit ve lenfositlerden de salınır. Nötrofillerin adezyonları ve motiliteleri üzerine etki eder. Nötrofil yüzeyinde IL-8 için reseptör bulunmaktadır. Bu reseptörlerle IL-8 hücre tarafından içeri alınır. IL-8 endotel hücresi tarafından salındıktan sonra endotel hücre yüzeyi ile birleşir ve hücrenin lümene bakan yüzeyinde depolanır. IL-8, PMN yüzeyinde spesifik reseptörlere bağlanarak onları aktive eder. Sonuçta PMN ler de β 2 integrinlerini artırarak gerçek PMN-VEC adezyonu gerçekleşir. IL-8 in bir başka etkisi ise PMN ler üzerinde

LECAM-1 molekülünün koparılıp ortama dökülmesini sağlamaktır (Rot,1992). Bunun sonucu olarak PMN lerin adezyonu inhibe olur. Solubl LECAM-1 molekülünün PMN yüzeyindeki adezyon molekülüleri ile kompetisyona girerek bunu gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

IL-8 in çift yönlü etkisi,adezyonda regülatör görevi olduğunu göstermektedir (Huber,1991). Ancak bunun mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Endotel hücresi yüzeyinde depolanan IL-8, adezyonun up-regülasyonuna neden olurken, serbest dolaşan IL-8 down-regülasyonuna neden olmaktadır (Gimbrone,1989).

6.Trombosit aktive eden faktör (PAF)

Endotel hücrelerinden salınan bu molekülün lökositler üzerinde proadeziv etkisi olduğu gösterilmiştir. Endotel üzerinde sürekli bulunmaz, ancak endotel stimüle edildiğinde 1-2 dakika içinde sentezlenir. Sentezlenen bu molekül ortama salınmaz ve hücre yüzeyinde tutulur. Endotel yüzeyine bağlı olan PAF, PMN leri aktive eder.Bu aktivasyon, nötrofil yüzeyindeki PAF reseptörü ile gerçekleşir. PAF ile bu reseptörün bağlanması PMN yüzeyinde CD11a/CD18 ve CD11b/CD18 moleküllerinin up-regülasyonuna neden olur. PAF, endotel yüzeyinde eksprese olduğunda, PMN lerin adeziv özelliğini artıran sinyal gibi işlev görür. PAF tarafından PMN lerin aktivasyonu sonucu bu hücrelerin kemotaktik faktörlere yanıtı artar. Sıvı fazdaki PAF, hücre yüzeyinden L-Selektinlerin dökülmesine neden olur (Zimmerman,1992).

MATERYAL VE METOD

HASTALAR

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalında Behçet hastalığı tanısı ile takip edilen ve "International study group" kriterlerine uygun hastalardan, rutin izlemleri sırasında 10 ml venöz kan alındı. Kanlar çalışma protokolüne bağlı olarak; EDTA lı, EDTA ve sodyum azidli; heparinli veya direkt olarak alındı. Kan örneklerinin bir bölümü hemen buz ile soğutulmuş su banyosuna konurken, diğer bölümü oda ısısında muhafaza edildi. Serum ve plazma ayrılarak porsiyonlandı ve kullanılıncaya kadar -50°C derecede saklandı. Bu çalışma için, 112 hastadan ve sağlıklı kontrol olarak, değişik zamanlarda, toplam 60 laboratuvar personeli ve tıp fakültesi öğrencisinden kan alındı.

MONONÜKLEER HÜCRELERİN VE NÖTROFİLLERİN AYRILMASI

Heparinli veya EDTA lı kanlar oda ısısında 30-45 dakika bekletilip 'buffy coat' un ayrılması sağlandı. Buffy coat pipet ile alındı, ficol içeren lenfoprep solusyonu (d 1.077) üzerine tabakalandırılarak yayıldı ve 30 dakika 400 g de santrifüj edildi. Bu sürenin sonunda ficol üstünde kalan mononükleer hücreler ayrı bir tüpe ve ficolün altında kalan nötrofiller ayrı bir tüpe alındı. Hücreler ayrı ayrı fosfat tampon ile iki kez yıkandı. Nötrofil bulunan tüpteki eritrosit kontaminasyonunu ortamdan uzaklaştırmak için hipotonik şok yapıldı. Bu amaçla %0.2 sodyum klorür solusyonundan hücrelerin üzerine 1 ml ilave edildi ve 60 saniye süre ile çalkalandı, daha sonra % 1.6 luk sodyum klorür suspansiyonundan 1 ml ilave edilerek ortam izotonik hale getirildi ve santrifüj edilip süpernatant atıldı. Bir defada eritrositlerin tamamının lize edilemediği durumlarda bu işlem 1-2 kez daha tekrarlandı. Nötrofiller ve mononükleer hücreler ayrı ayrı daha sonra çalışılacakları tampon veya mediumlarda resuspende edildi.

ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRÜ

Endotel hücreleri daha önceki projede tanımladığımız yöntemle (TAG-765) elde edildi. Kısaca, göbük kordonlarından kollajenaz enzimi kullanarak endotel hücreleri izole edildi ve kültürü yapıldı. Kültür mediumu olarak RPMI kullanıldı. Mediuma, %20 fetal dana serumu, 2mM L-glutamin, %0.225 sodyum bikarbonat, 5 µg/ml gentamisin, 5U/ml heparin, ve endotel hücresi growth faktörü olarak kendi üretimimiz olan (yöntemi TAG-765 nolu projede açıklanmıştır ve yayınlanmak üzere "Thrombosis Research" isimli dergiye gönderilmiştir) 75 µg/ml fare beyin ekstraktı eklendi. Hücreler kültür kabının tabanını doldurdukça pasaj yapılarak çoğaltıldı. Üreyen hücrelerin endotel hücresi olduğu TAG-765 te açıklandığı gibi, kültür süpernatantında Von Willebrand faktör tayini ile saptandı. Adezyon çalışmalarında fibroblast ve düz kas hücrelerini kültür ortamından ekarte edebilmek için üçüncü pasajdan sonraki hücreler kullanıldı. Hücrelerin fazla yaşlanmasının etkilerini önlemek için ise 8. pasajdan sonraki hücreler kullanılmadı. Üçüncü pasajdan sonra endotel hücreleri düz tabanlı, 96 kuyulu kültür plaklarına, her kuyuda 20.000 hücre olacak şekilde ekildi, kültüre devam edildi ve hücreler kültür kabının tabanını tamamen kapladığında adezyon testi yapıldı.

MONONÜKLEER HÜCRE KÜLTÜRLERİ (Monosit, lenfosit)

Bu amaçla Behçet'li 27 hasta ve sağlıklı 17 kişiden kan alınarak yukarıda tanımlanan dansite gradienti yöntemi ile mononükleer hücreleri ayrıldı.

Monosit kültürü: Yukarıda anlatıldığı şekilde Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerden mononükleer hücreler steril koşullarda ayrıldı. Hücreler 2×10^6 /ml olacak şekilde RPMI medium içinde resuspende edildi. Yirmidört kuyulu kültür plaklarının her kuyusuna 1 ml bu hücre suspansiyonundan ilave edilip 37°C de %7 CO2 bulunan ortamda 1 saat inkübe edilip monositlerin kültür plağının tabanına yapışması sağlandı. Yapışmayan hücreler (lenfositler) aspire edilerek ayrıldı. Kuyular iki kez medium ile yıkanarak lenfositler tamamen uzaklaştırıldı. Her kuyuya 0.4ml medium ilave

edilerek kültür yapıldı. Birer kuyuda sadece medium ile kültür yapılırken birer kuyuya da 10 ng/ml forbolmiristatasetat (PMA) veya 100 ng/ml lipopolisakkarit (LPS) ilave edilerek hücreler uyarıldı.

Lenfosit kültürü: Monosit ayırma işleminden sonra elde edilen yapışmayan hücrelerin lenfosit oldukları, monosit yüzey belirteci olan CD14 molekülüne karşı monoklonal antikor kullanılarak flow sitometrik olarak saptandı. Elde edilen hücrelerin pür lenfosit olduklarından emin olunduktan sonra lenfosit kültürü yapıldı. Bu amaçla yapışmayan hücreler 2×10^6 /ml olacak şekilde medium içinde resuspanse edildi ve yirmidört kuyulu kültür plaklarına her kuyuya 200.000 hücre düşecek şekilde dağıtıldı. Kültür ortamına PMA ve LPS ayrı ayrı, yukarıda anlatılan konsantrasyonlarda ilave edilerek kültür yapıldı.

Mononükleer hücre kültürü: Periferik kandan elde edilen mononükleer hücreler (monosit ve lenfosit birarada) 2×10^6 /ml hücre olacak şekilde medium içinde resuspanse edildi ve yukarıda lenfosit kültüründe tarif edildiği şekilde kültür yapıldı.

Her üç tür kültür süpernatantları 24. ve 48. saatlerin sonunda toplandı ve IL-8 düzeyleri ölçülmek üzere -50°C de saklandı. Kültür süresince hücre beslemesi yapılmadı.

Kültür mediumu olarak RPMI kullanıldı ve buna %10 fetal dana serumu, 2mM L-glutamine, %0.225 sodyumbikarbonat, 5µg/ml gentamisin eklendi.

MONOSİT İZOLASYONUNDA PÜRİFİKASYONUN BASARISININ ARAŞTIRILMASI:

Monosit kültürü yapmak amacı ile plastik petriye yapıştırma yöntemi ile monositler izole edildikten sonra, yapıştırma öncesi ve yapıştırma sonrası hücre yüzeyinde CD14 varlığı araştırıldı. Anti-CD14 monoklonal antikor (Coulter USA) ve flow sitometri ile yapılan analiz sonunda CD14 taşıyan hücre (CD14 monosit belirteci olarak bilinir) popülasyonunun, yapıştırma işleminden sonra tamamen kaybolduğu görüldüğü için yöntemin güvenilirliği saptandı.

ADEZYON TESTİ

Sağlıklı 2 kişiden heparinli venöz kan alınarak yukarıda anlatıldığı gibi nötrofiller izole edildi ve son yıkamadan sonra 2×10^6 /ml hücre olacak şekilde RPMI medium içinde resuspende edildi.

Doksanaltı kuyulu plakta üreyen ve kültür kabının tabanını tamamen kaplayan endotel hücrelerinin kültür mediumu atıldı. Hücreler iki kez 37°C ye ısıtılmış RPMI ile yıkandı. Her kuyuya 50 μl nötrofil suspansiyonu ve monosit kültür süpernatantları eklendi. Her hastaya ait monosit kültür süpernatantı üç ayrı kuyuda çalışıldı. Hücreler 37°C de %7 CO_2 bulunan ortamda 45 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda yapışmayan nötrofiller kuyulardan dikkatlice aspire edildi ve kuyular iki kez 37°C ye ısıtılmış medium ile endotel hücrelerinin plağın tabanından ayrılmamasına dikkat edilerek yıkandı. Kuyular mikroskopta tek tek incelenerek hücreler tabandan ayrılmış ise bu kuyular adezyon testinde değerlendirme dışı bırakıldı.

Yapışan nötrofil sayısı TAG-765 teki yöntemden farklı olarak nötrofil myeloperoksidaz (MPO) enzimi ölçülerek hesaplandı (Dobrina,1991). Bunun için; 0.1 M sodyum asetat tompon (pH 4.2) içinde %1 oranında setiltrimetilamonyumbromid (MPO yu solubilize edici ajan) ve 0.2 mM tetrametilbenzidine (MPO nun substratı) eklenerek hazırlanan solusyondan kuyulara 75 μl ilave edildi. İki dakika sonra da her kuyuya 0.7mM H_2O_2 den 75 μl ve bundan 2 dakika sonra da 50 μl 4N asetik asit (10 mM NaN_3 içeren) ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Kuyuların 400 nm de otomatik ELİZA okuyucuda optik dansiteleri ölçüldü.

Kontrol amacı ile ortamda monosit kültür süpernatantı bulunmayan 5 ayrı kuyuya 50 μl nötrofil suspansiyonu eklendi ve inkübasyondan sonra sıvı kısmı atılarak hücrelerin tamamı kuyuda bırakıldı. Bu kuyuların optik dansite ortalaması total nötrofil MPO su olarak formülde yerine konuldu. Sadece endotel bulunan kuyuların optik dansite ortalaması ise "background" değeri olarak kullanıldı. Aşağıdaki formülle adezyon oranı hesaplandı.

Monosit kültür süpernatanı
bulunan kuyunun -Background
Optik dansitesi (ortalama)

Adezyon oranı= 100x

Total nötrofillerin
bulunduğu kuyu -Background
Optik dansitesi (ortalama)

FLOW SİTOMETRİK İNCELEME

Behçet'li 30 hasta ve sağlıklı 30 kişiden venöz kan toplandı. Alınan kanın 5 ml sine 0.1 ml %0.224 gr sodyum azid ve %0.5 gr EDTA içeren solusyondan eklenip kan örnekleri hemen buzlu su içine alındı. Hasta ve kontrol kanlarının her birinin 0.1 ml sine 10 µl anti-LECAM (Immuotech, Fransa) 10 µl 25F9, 10 µl G16/1, (25F9 ve G16/1 aktive monositleri boyayan monoklonal antikorlardır) 5 µl anti-CD11a, 5 µl anti-CD11b, 5µl anti-CD18, 5 µl anti-CD14 monoklonal antikorları eklendi ve 30 dakika buzlu su içinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda örnekler % 0.1 BSA ve 7mM sodyum azid içeren ve 4°C ye soğutulmuş fosfat tampon (PBS, yıkama tamponu) ile iki kez yıkandı. Daha sonra örneklerin üstüne 5 µl, 1/100 dilüe edilmiş florosein izotiyosiyanat (FITC) bağlı goat-anti-mouse antikor (Serotech) ilave edilerek 30 dakika daha buzlu su üstünde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücreler yıkama tamponu ile iki kez yıkandı. Ortamdaki eritrositler lisis tamponu ile (Becton Dickinson) lize edildi ve hücreler %1 paraformaldehit içeren PBS içinde resuspende edildi. Hücreler FACScan de flow sitometrik olarak lenfosit, monosit ve nötrofil 'gate' i alınarak ayrı ayrı incelendi. Her örnek için 7500 hücre analiz edildi. Background boyanma için sadece FITC bağlı goat-anti-mouse antikor kullanıldı.

LECAM MOLEKÜLÜNÜN STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ.

LECAM molekülünün farklı işlem koşullarından nasıl etkilendiğini izlemek amacı ile yapıldı. Bu amaçla kan örneklerinin bir bölümü alındıktan sonra işlemin sonuna kadar sodyum azid ve soğuk inkübasyonla muamele edilirken, bir bölümü ise oda ısısında ve sodyum azid olmadan işlendi. Ayrıca tam kan ve nötrofil ayırma işlemleri uygulanarak, bu işlemlerin etkisi incelendi. Bunun için 30 Behçet'li hasta ve 30 sağlıklı kişiden venöz kan alındı. Alınan bu kanın 5 ml sine 0.1 ml EDTA ve sodyum azid içeren solüsyon (yukarıda flow sitometrik analiz bölümünde tarif edildi) eklendi ve hemen buzlu su üstüne oturtuldu. Kanın 5 ml sine ise sodyum azid içermeyen EDTA solusyonundan 0.1 ml eklendi ve bunlar oda ısısında tutuldu. Bu kanların 0.1 ml sine 10µl anti-LECAM ilave edilerek yukarıda flow sitometri bölümünde anlatıldığı gibi yüzey boyaması yapılarak FACScan de incelendi. Ayrıca sadece EDTA lı solusyon eklenmiş kan örneklerinden yukarıda nötrofillerin ayrılması bölümünde anlatıldığı gibi nötrofiller ayrıldı. Hücreler 3×10^6 /ml olacak şekilde ayarlandı. Bu hücre suspansiyonunun 0.1 ml sine 10 µl anti-LECAM antikoru eklenerek yukarıda flow sitometri bölümünde tarif edildiği gibi yüzey boyaması yapıldı ve FACScan de incelendi.

ELİZA YÖNTEMİ İLE SOLUBLE LECAM DÜZEYİNİN ÖLÇÜMÜ.

Bu amaçla Behçet'li 15 hasta ve sağlıklı 15 kişiden venöz kan alındı. Alınan kanların 5 ml sine 0.1 ml yukarıda tarif edilen EDTA ve sodyum azid solusyonundan eklendi ve örnekler hemen buzlu su üstüne oturtuldu. Kanın kalan 5 ml sine ise sodyum azid içermeyen EDTA solusyonu eklendi ve örnekler plazma ayırma işlemi yapılınca kadar oda ısısında tutuldu. Tüm örnekler 500 g de 15 dakika santrifüj edildi ve plazmaları ayrılarak porsiyonlandı ve kullanılıncaya kadar -20°C de saklandı. Sodyum azid içeren örneklerin santrifüjleri ve plazma ayırma işlemleri sırasında ortamın 4°C olmasına dikkat edildi. Diğer örneklerden plazma ayrımı ise oda ısısında gerçekleştirildi.

Toplanan bu örneklerde ELİZA temeline dayanan soluble LECAM kiti (Bender Med System) kullanarak üretici firmanın tarif ettiği yöntemle soluble LECAM düzeyleri ölçüldü.

LECAM MOLEKÜLÜNÜN STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ.

LECAM molekülünün farklı işlem koşullarından nasıl etkilendiğini izlemek amacı ile yapıldı. Bu amaçla kan örneklerinin bir bölümü alındıktan sonra işlemin sonuna kadar sodyum azid ve soğuk inkübasyonla muamele edilirken, bir bölümü ise oda ısısında ve sodyum azid olmadan işlendi. Ayrıca tam kan ve nötrofil ayırma işlemleri uygulanarak, bu işlemlerin etkisi incelendi. Bunun için 30 Behçet'li hasta ve 30 sağlıklı kişiden venöz kan alındı. Alınan bu kanın 5 ml sine 0.1 ml EDTA ve sodyum azid içeren solüsyon (yukarıda flow sitometrik analiz bölümünde tarif edildi) eklendi ve hemen buzlu su üstüne oturtuldu. Kanın 5 ml sine ise sodyum azid içermeyen EDTA solusyonundan 0.1 ml eklendi ve bunlar oda ısısında tutuldu. Bu kanların 0.1 ml sine 10µl anti-LECAM ilave edilerek yukarıda flow sitometri bölümünde anlatıldığı gibi yüzey boyaması yapılarak FACScan de incelendi. Ayrıca sadece EDTA lı solusyon eklenmiş kan örneklerinden yukarıda nötrofillerin ayrılması bölümünde anlatıldığı gibi nötrofiller ayrıldı. Hücreler 3×10^6 /ml olacak şekilde ayarlandı. Bu hücre suspansiyonunun 0.1 ml sine 10 µl anti-LECAM antikoru eklenerek yukarıda flow sitometri bölümünde tarif edildiği gibi yüzey boyaması yapıldı ve FACScan de incelendi.

ELİZA YÖNTEMİ İLE SOLUBLE LECAM DÜZEYİNİN ÖLÇÜMÜ.

Bu amaçla Behçet'li 15 hasta ve sağlıklı 15 kişiden venöz kan alındı. Alınan kanların 5 ml sine 0.1 ml yukarıda tarif edilen EDTA ve sodyum azid solusyonundan eklendi ve örnekler hemen buzlu su üstüne oturtuldu. Kanın kalan 5 ml sine ise sodyum azid içermeyen EDTA solusyonu eklendi ve örnekler plazma ayırma işlemi yapılincaya kadar oda ısısında tutuldu. Tüm örnekler 500 g de 15 dakika santrifüj edildi ve plazmaları ayrılarak porsiyonlandı ve kullanılincaya kadar -20°C de saklandı. Sodyum azid içeren örneklerin santrifüjleri ve plazma ayırma işlemleri sırasında ortamın 4°C olmasına dikkat edildi. Diğer örneklerden plazma ayrımı ise oda ısısında gerçekleştirildi.

Toplanan bu örneklerde ELİZA temeline dayanan soluble LECAM kiti (Bender Med System) kullanarak üretici firmanın tarif ettiği yöntemle soluble LECAM düzeyleri ölçüldü.

IL-8 İN LECAM MOLEKÜLÜNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.

Bu amaçla Behçet'li 10 hasta ve sağlıklı 10 kişiden yukarıda anlatıldığı gibi EDTA+sodyum azid veya sadece EDTA eklenerek venöz kan alındı. Sodyum azid içeren kanla çalışırken tüm işlemlerin soğukta yapılmasına dikkat edildi. Nötrofiller yukarıda nötrofil izolasyonu bölümünde anlatıldığı gibi elde edildi. Nötrofiller 2×10^6 /ml hücre olacak şekilde RPMI mediumda resuspende edildi, 37°C de %7 CO_2 içeren ortamda bir saat inkübe edildi ve LECAM molekülü tayin etmek üzere içinden örnek alındı. Geride kalan hücre suspansiyonu üzerine 500 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde rekombinant IL-8 (Cymbus) eklenerek aynı koşullarda kültüre bir saat daha devam edildi. Kültür öncesi, bir saatlik kültür sonrası ve IL-8 ile bir saatlik kültür sonrası nötrofillerin yüzeyinde LECAM molekülü ekspresyonu yukarıda flow sitometri bölümünde tarif edildiği şekilde FACScan de incelendi. Bir saatlik kültür sonrası ve IL-8 ile bir saatlik kültür sonrası kültür süpernatantları da ilerde başka bir proje de solubl LECAM düzeyi ölçmek üzere toplandı ve porsiyonlanarak -50°C de saklandı.

ADEZYONUN ANTI-IL-8 İLE İNHİBİSYONU.

Bundan önceki çalışmamızda (TAG-765) Behçet'li hasta serumu varlığında nötrofillerin endotel hücrelerine adezyonunun arttığı ve yine aynı hastalarda IL-8 düzeyinin yüksek olduğu saptandığı için adezyon testinde ortama anti-IL-8 eklenerek adezyonun inhibisyonu araştırıldı. Bu amaçla Behçet'li 15 hasta ve sağlıklı 10 kişinin serumları varlığında (TAG-765 te anlatıldığı şekilde) yukarıda tarif edilen adezyon testi yapılarak yüksek adezyona neden olan hasta serumları saptandı. Daha sonra adezyonu çok yüksek olan üç hastaya ait serumlarla ayrı ayrı, tekrar adezyon testi yapıldı. Ancak bu kez hasta serumu bulunan her 10 kuyudan 5 ine anti-IL-8 eklenerek adezyon inhibisyonunun varlığı araştırıldı.

BEHÇET'LI HASTA SERUMLARINDA IL-8 DÜZEYİNİN ÖLÇÜLMESİ.

Behçet'li 30 hasta ve sağlıklı 30 kişiden yukarıda tarif edildiği şekilde toplanan serumlarda IL-8 düzeyi RIA yöntemi ile ve RIA kiti (Amersham) ile üretici firmanın tarif ettiği yöntemle ölçüldü.

1

KÜLTÜR SÜPERNATANLARINDA IL-8 ÖLÇÜMÜ:

Proje önerimizde, kültür süpernatantlarındaki IL-8 in satın alınacak standart ELİZA kitleri ile ölçüleceği bildirilmişti. Ancak örnek sayısının ortalama 800 e ulaşması nedeni ile 20 adet ELİZA kiti alınması gerekmekte idi. Bilinen enflasyon ve ekonomik tedbirler nedeni ile IL-8 ELİZA kitinin birim fiyatı 35.000.000 TL sına ulaşmış, toplam 20 kit için gereken bütçe ise 700.000.000 TL sına ulaşmıştır. Proje bütçesinde ise IL-8 ELİZA kiti için toplam 75.000.000 TL sı ayrılmış bulunmaktadır. Bu nedenle IL-8 ELİZA yönteminin laboratuvarımızda kurulmasına karar verildi.

A. ELİZA YÖNTEMİNİN KURULMA DENEYLERİ

Bu amaçla mouse-anti-IL-8 monoklonal antikor (mAb) (Cymbus,UK), rekombinantIL-8 (rIL-8) (Cymbus,UK), tavşan-anti-IL-8 poliklonal antikor (poAb) (ENDOGEN USA), goat-anti-mouse horse raddish peroksidaz bağlı antikor (HRPO) (Boehringer GERMANY) ve 96 kuyulu düz tabanlı 'maxi' sorb ELİZA plakları (nunc) satın alındı.

IL-8 'i ölçebilecek ELİZA sisteminin kurulması amacı ile sağlanan bu malzemeler ile değişik yöntemler denendi. Denenen bu yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

a)Criss-Cross yöntemi ile optimal konsantrasyonların saptanması: Bunun için 4 ayrı plak alındı. Poliklonal anti-IL-8 (poAb) PBS içinde dilüe edildi ve her kuyuya 50 ul aşağıdaki konsantrasyonlarda ilave edildi. Plaklar bir gece 4°C de inkübe edildi.

1. plak 10 µg/ml poAb
2. plak 5 µg/ml poAb
3. plak 2.5 µg/ml poAb
4. plak 1.25 µg/ml poAb

Ertesi gün plaklar ters çevrilip içleri boşaltıldı ve 0.2 ml 'Blocking tampon' (%0.05 Tween-20,1mM EDTA, %2.5 Bovine serum albumin (BSA) içeren PBS) ilave edilerek oda ısısında

30 dakika inkübe edildi ve plağın antikori kaplanmayan bölgeleri bloke edildi. Bu sürenin sonunda kuyular tekrar boşaltıldı ve iki kez 0.2 ml PBS ile yıkandı.

Bloking tampon içinde rIL-8 250 ng/ml olacak şekilde dilüe edildi ve her dört plağa aşağıdaki düzende 50 µl olarak ilave edildi.

(Yukarıdan aşağıya)

1. kolon (A1,B1,C1,D1,E1,F1) 250 ng/ml
2. kolon (A2,B2,C2,D2,E2,F2) 62.5 ng/ml
3. kolon (A3,B3,C3,D3,E3,F3) 15.6 ng/ml
4. kolon (A4,B4,C4,D4,E4,F4) 3.9 ng/ml
5. kolon (A5,B5,C5,D5,E5,F5) 0.975 ng/ml
6. kolon (A6,B6,C6,D6,E6,F6) 0.24 ng/ml
7. kolon (A7,B7,C7,D7,E7,F7) 0.06 ng/ml
8. kolon (A8,B8,C8,D8,E8,F8) 0.015 ng/ml

İki saat oda ısısında inkübasyondan sonra kuyular boşaltıldı ve iki kez 0.2 ml PBS ile yıkandı.

Bloking tampon içinde monoklonal anti-IL-8 (mAb) 1 µg/ml olacak şekilde dilüe edildi ve 50 µl olarak aşağıdaki düzende her plağa ayrı ayrı ilave edildi.

(Soldan sağa)

1. sıra (A1-A8) 1 µg/ml
2. sıra (B1-B8) 0.5 µg/ml
3. sıra (C1-C8) 0.25 µg/ml
4. sıra (D1-D8) 0.125 µg/ml
5. sıra (E1-E8) 0.0625 µg/ml

İki saat oda ısısında inkübasyondan sonra kuyular boşaltıldı ve iki kez 0.2 ml PBS ile yıkandı.

Bloking tampon içinde HRPO 250 ng/ml olacak şekilde dilüe edildi ve 50 µl olarak her dört plaktaki kuyuların tamamına ilave edildi. İki saat oda ısısında inkübasyondan sonra kuyular boşaltıldı ve PBS ile altı kez yıkandı. Daha sonra kuyulara 100 ml sinde 34 mg ortofenilendiamin (OPD) ve 50 µl H₂O₂ (%30 luk) içeren 0.1 M sitrat tampondan (0.1M sitrik asit ve 0.1M Na₂HPO₄, pH 5) 75 µl ml ilave edildi ve bir saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 50 µl %12.5 luk H₂SO₄ ilave edildi ve 492 nm de otomatik ELİZA okuyucuda optik dansiteleri ölçüldü.

Bu çalışma birkaç kez tekrarlandı ve kuyular arasında anlamlı bir fark saptanamadığı için metodun çalışmadığına karar verildi ve aşağıdaki alternatifler denendi.

b) HRPO nun titre edilmesi : Yukarıdaki yöntem sadece tek bir plakta ancak plaklar 10 µg/ml poAb ile kaplanarak yapıldı. mAb 1 µg/ml olarak A ve D sırasında, 0.5 µg/ml olarak B ve E sırasında ve 0.25 µg/ml olarak C ve F sırasında kullanıldı.

Laboratuvardaki HRPO nun eskimiş olabileceği düşünülerek yeni HRPO satın alındı ve bu HRPO A,B,C sıralarında 250 ng/ml ve D,E,F sıralarında 500 ng/ml olarak kullanıldı. Böylece HRPO titre edilmiş oldu. Ancak bu deney sonunda da anlamlı bir okuma elde edilemedi.

c)HRPO miktarının artırılması: Bu çalışma da bir plakta yapıldı. Plakın A,B,C,D,E,F,G,H, sıralarının 1 den 5 e kadar olan kolonları 10 µg/ml ve 7 den 11 e kadar olan kolonları 5 µg/ml olarak poAb ile kaplandı. mAb ise A,C,E,G sıralarına 1 µg/ml ve B,D,F,H sıralarına 0.5 µg/ml olarak ilave edildi. HRPO ise A,B,C,D, sıralarında 500 ng/ml ve E,F,G,H sıralarında 250 ng/ml olarak kullanıldı. Yine anlamlı bir okuma elde edilemedi.

d)Değişik tamponların denenmesi: Yukarıdaki çalışmalardaki rIL-8, poAb, mAb ve HRPO miktar ve şemalarına sadık kalınarak ve sadece tampon çözeltiler değiştirilerek deneyler tekrarlandı. Bu çalışmada poAb nin kaplama tampon çözeltilisi (Coating tampon) olarak 0.2M Na₂CO₃ ve 0.2M NaHCO₃ PH 9.6 kullanıldı. Bloking tampon olarak kaplama tamponu içine %0.2 oranında BSA eklendi.Yıkama tamponu olarak ise % 0.05 Tween 20 içeren TBS tampon (6 gr tris,8.75 gr NaCl ve bir litre distile su PH 7.5) kullanıldı. rIL-8 ve HRPO, yine TBS/Tween tamponda dilüe edildi ancak TBS/Tween tampona %0.1 BSA ilave edildikten sonra mAB bunun içinde dilüe edildi. İnkübasyon süreleri ise 90 dakika olarak değiştirildi ve inkübasyonlar 37°C de yapıldı. Bu deney sonunda da başarılı olunamadı.

e)Monoklonal antikor miktarının artırılması: Bu çalışmada d şikkındaki kaplama tamponu aynen kullanıldı ancak dilüsyon tamponu ve yıkama tamponu olarak TBS yerine PBS kullanıldı (Tween 20 ve BSA aynen kaldı). Çalışma 37°C de 30 ar dakika

inkübasyonlar şeklinde yapıldı. Burada farklı olarak rIL-8 100 ng/ml olarak tüm kuyularda aynı miktarda kullanıldı. poAb ise 10 µg/ml konsantrasyonda başlanıp plakta tüm sıralarda (A,B,C,D,E,F,G,H) 1. kuyudan başlayarak 12. kuyuya doğru seri dilüsyonla dağıtıldı. mAb ise 5 µg/ml olarak hazırlandı ve A dan başlayarak H ye kadar seri dilüsyonla dağıtıldı. Yine başarılı sonuç alınamadı.

Klasik ELİZA yönteminin tüm alternatifleri denenip, antikorlar ve IL-8 titre edilip, değişik tamponlarla başarılı sonuç alınamaması üzerine, daha temel bir uygunsuzluk olduğu (örneğin antikorun IL-8 ile bağlanmaması veya plakların antikorla kaplanamaması gibi) düşünülerek aşağıdaki deneyler yapıldı:

f) Bu çalışmada plaklar sadece mAb ile kaplanarak üzerine HRPO işaretli goat-anti-mouse ilave edildi ve mAb nin plağa yapışıp yapışmadığı test edildi. Antikorun plağa yapışabildiği ve HRPO işaretli goat-anti-mouse ile bağlandığı, substrat eklenmesi ile renk oluşumu nedeni ile saptandı.

g) Bu çalışmada plaklar mAb ile kaplanıp üstüne rIL-8 ve üstüne poAb ilave edildikten sonra en üste anti-tavşan peroksidaz işaretli antikor ilave edilerek çalışma tekrarlandı. Bu deneyin işlemediği görüldü. Böylece satın alınan monoklonal antikorun IL-8 e bağlanmadığı sonucuna varıldı. Yeni mAb ve rIL-8 almak için bütçe ve zaman kısıtlılığı nedeni ile ELİZA yöntemlerinin kullanılmasından vazgeçildi.

B. NÖTROFİL YÜZEYİNDEKİ IL-8 RESEPTÖRÜ ARACILIĞI İLE IL-8 ÖLÇÜMÜ DENEYLERİ:

Nötrofil yüzeyindeki IL-8 reseptöründen yararlanarak IL-8 tayini yapılabilirliği araştırıldı. Kısaca nötrofiller önce rIL-8 ile inkübe edildi, daha sonra yıkandı ve üzerine mAb (anti-IL-8) ilave edildi. Tekrar inkübe edilip yıkandıktan sonra son olarak anti-mouse FITC ilave edilerek FACScan'de incelendi. Bir başka çalışmada ise mAb yerine poAB kullanıldı. Ancak tavşan antikorunun insan nötrofil yüzeyindeki Fc reseptörlerine non-spesifik olarak bağlandığını bildiğimiz için (daha önceki bir çalışmamızda

saptamıştık) nötrofiller, önce birkaç kez dondurup çözerek agrege ettiğimiz insan IgG si ile 30 dakika inkübe edildi ve nötrofil yüzeyindeki Fc reseptörlerinin kapatılması sağlandı ve çalışma bu nötrofillerle yapıldı. rIL-8 dışında PMA ile aktive edilmiş monosit kültür süpernatanı ve yüksek adezyona neden olan Behçet'li hasta serumları da IL-8 kaynağı olarak denendi.

Sonuçta tüm bu çalışmalar ile IL-8 in ölçümü için kullanılabilecek bir metod kurulamadığı için bu ölçümden şimdilik vazgeçildi. Ancak toplanan kültür süpernatantları (yaklaşık 800 adet örnek) -40°C de deepfreez de saklanmaktadır ve önümüzdeki günlerde yeni antikörler veya yine başarılamazsa standart IL-8 kitleri alınarak ölçülmesine çalışılacaktır.

İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME

Sonuçlar Student'in t-testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama±SD olarak verildi.

BULGULAR

FLOW SİTOMETRİK İNCELEME

Nötrofil yüzeyinde adezyon moleküllerinin incelenmesi:

Behçet'li hastaların nötrofillerinin yüzeyinde adezyon moleküllerini saptamak amacı ile yapılan bu çalışma nötrofil izolasyonu yapılmadan EDTA ve sodyum azid içeren tam kan da yapıldı. Nötrofil yüzeyinde CD11b ve CD18 taşıyan hücre sayıları bakımından, hasta ve kontrol arasında fark görülmezken, CD11a molekülünü taşıyan hücre sayısının hastalarda daha fazla olduğu görüldü (Tablo-1). CD11a, hastada % 89.4 ± 10.6 , sağlıklı kişilerde % 71 ± 8.9 olarak hesaplandı ve aralarında anlamlı fark olduğu bulundu ($p < 0.001$).

Lenfosit yüzeyinde adezyon moleküllerinin incelenmesi:

Bu çalışmada da yine EDTA ve sodyum azid ilave edilmiş tüm kan kullanıldı. Hasta ve sağlıklı kişiler arasında CD11a, CD11b, CD18 ve LECAM moleküllerini taşıyan hücre sayıları bakımından fark görülmedi (Tablo-2).

Monosit yüzeyinde adezyon moleküllerinin incelenmesi:

Monosit yüzeyindeki adezyon moleküllerini saptamak amacı ile yapıldı. Bu çalışmada da EDTA ve sodyum azid ilave edilmiş tüm kan kullanıldı. CD11a, CD18 ve LECAM molekülünü taşıyan hücre sayısı bakımından Behçet'li hasta ve sağlıklı kontroller arasında fark görülmedi. Ancak Tablo-3 te de görüldüğü gibi CD11b molekülünü taşıyan hücre sayısının hastalarda % 94.2 ± 6 , sağlıklı kişilerde % 87.6 ± 10.3 olduğu ve aralarında anlamlı fark ($p < 0.005$) bulunduğu saptandı.

Monosit yüzeyinde aktivasyon moleküllerinin incelenmesi:

Bu çalışma Behçet'li hastalarda monositlerin aktive olup olmadıklarını araştırmak amacı ile yapıldı. Aktivasyonu belirlemek amacı ile sadece aktive olmuş monosit yüzeyinde bulunan 25F2 ve G16/1 moleküllerine ve monosit ile granülosit yüzeyinde bulunan ve özellikle monositler aktive olduklarında artan CD14 molekülüne karşı mAb

kullanıldı.Tablo-4 te de görüldüğü gibi bu üç aktivasyon molekülünü taşıyan monosit sayısının hastalarda daha yüksek olduğu saptandı.25F9 molekülü, hastada %48.1±32.4 ,kontrolde % 16.4±15 (p<0.005), G16/i molekülü hastada %15±16.2, kontrolde % 1.4±1.4 (p<0.005) ve CD14 molekülü ise hastada % 94.9±,kontrolde % 87.3±7.8 (p<0.005) olarak saptandı.

Nötrofil yüzeyinde LECAM molekülünün incelenmesi:

LECAM molekülünün aktive olmuş nötrofil yüzeyinden kolayca kopup ortama dökülen bir moleköl olması nedeni ile, Behçet'li hastaların nötrofillerinde bu molekülün stabilitesini araştırmak amacı ile bu çalışma yapıldı.Bu amaçla ; hasta ve kontrollerden, EDTA+sodyum azid li ve ayrıca sadece EDTA lı kan alındı.Sodyum azidli kan ve sadece EDTA olan kanın yarısında nötrofil izolasyonu yapılmadan LECAM molekülü incelendi ve sadece EDTA lı kanın kalan yarısında da nötrofil izolasyonu yapılarak bu nötrofillerde LECAM molekülü araştırıldı.

Hücre yüzeyi sodyum azid ile stabil hale getirilmiş ve soğuk ortamda çalışılmış nötrofillerde hasta ile sağlıklı kişi arasında LECAM molekülü ekspresyonu bakımından fark görülmedi.Ancak sodyum azid ilave edilmeden oda ısısında tüm kandan yapılan incelemede LECAM molekülünün hastalarda anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü (Tablo-5).Sodyum azid ilave edilmeden ve nötrofillerin ficol ile ayrılmasından sonra yapılan incelemede de yine hasta ile sağlıklı kişi arasında ileri derecede anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo-5).

ELİZA YÖNTEMİ İLE İNCELEME

Solubl LECAM düzeyinin ölçülmesi:

Behçet'li hasta nötrofillerinin yüzeyinde LECAM molekülünün stabilitesinin bozulduğu ve hücre yüzeyinden kolayca döküldüğü yukarıda anlatılan deneyde görüldüğü için, bu molekülün hasta serumundaki konsantrasyonunun araştırılması amacı ile yapıldı. Hasta ve sağlıklı kişilerin plazmaları EDTA+sodyum azid ve sadece EDTA ilave edilerek iki farklı koşuldaki kandan ayrıldı. Sodyum azid ilave edilmiş ve soğukta ayrılmış plazmalarda solubl LECAM düzeyleri, hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak

anlamlı bir şekilde düşük bulundu (Tablo-6). Oda ısısında ve sodyum azidsiz ayrılan plazmada yapılan ölçümlerde solubl LECAM , hastada 1.82 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$ iken kontrollerde 2 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu ($p > 0.5$). Bunun yanında sodyum azid eklenen ve soğukta işlenen örneklerde hasta ile kontroller arasında önemli bir fark olduğu bulundu (kontrolde 1.98 ± 0.6 $\mu\text{g/ml}$ ve hastada 1.58 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$ $p < 0.05$). Sağlıklı kontrollerin EDTA+sodyum azid ve sadece EDTA lı plazmaları arasında fark görülmezken, hastaların EDTA+sodyum azid ve sadece EDTA lı plazmaları arasında da fark görüldü. Sodyum azid ilave edilmemiş hasta plazmalarında solubl LECAM düzeyinin yükseldiği saptandı (Sodyum azidli plazmada 1.58 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$ ve sodyum azidsiz plazmada 1.82 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$ $p < 0.1$, Tablo-6) .

Solubl CD14 (sCD14) düzeylerinin ölçülmesi:

Behçet'li hasta monositlerinin yüzeyinde CD14 molekülünü artmış olduğu saptandığı için hasta serumlarında bu molekülün solubl formunun araştırılması amacı ile yapıldı. Hasta serumlarında solubl CD14 düzeyinin sağlıklı kişilere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Tablo-7 de görüldüğü gibi sCD14 hastalarda 8.1 ± 9.2 $\mu\text{g/ml}$, kontrolde 1.39 ± 0.73 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) olarak bulundu.

RİA (RADIOIMMUNASSAY) YÖNTEMİ İLE SERUM IL-8 DÜZEYİNİN İNCELENMESİ

Tag-765 nolu projemizde Behçet'li hastalarda IL-8 düzeylerini yüksek bulmuştuk. Bu çalışmada yeni hastalarda aynı kan örneğinde IL-8, sCD14 ve hücrelerin yüzeyinde adezyon molekülleri incelenip her hastanın tüm bu parametrelerini birbiri ile karşılaştırabilmek amacı ile kan örneklerinde IL-8 düzeyleri tekrar ölçüldü. Tablo-8 de de görüldüğü gibi hasta serumlarında IL-8 düzeyi sağlıklı kişilere göre artmış olarak saptandı. (Hastada 232.7 ± 79.1 pg/ml , kontrolde 97.5 ± 56.3 pg/ml $p < 0.001$). Bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görüldü.

ADEZYON TESTLERİ

Behçet'li hasta serumlarının nötrofil-endotel adezyonuna etkisi:

Behçet'li hastaların serumlarının nötrofil-endotel adezyonunu artırıcı etkisi daha önceki çalışmamızda saptanmıştı (TAG-765). Bu çalışma, yüksek adezyona neden olan hasta serumlarını saptayıp, daha sonra bu serumları adezyon inhibisyon deneyinde kullanabilmek amacı ile yapıldı. Tablo-9 da da görüldüğü gibi hasta serumları yüksek adezyona neden olmaktadır. Bunlardan 72,79 ve 65 nolu hastaların serumlarının çok yüksek adezyona neden olduğu görüldü ve adezyon inhibisyon testinde kullanılmak üzere seçildi.

Anti-IL-8 ile nötrofil-endotel adezyonunun inhibisyonu:

Behçet'li hastalarda artmış olan nötrofil-endotel adezyonunun, hasta serumunda yüksek olan IL-8 den kaynaklanabileceğini düşünerek, hasta serumları varlığında yapılan adezyon testinde, ortama anti-IL-8 monoklonal antikör ilave edilerek, adezyonun inhibisyonunun varlığı araştırıldı. Tablo-10 da da görüldüğü gibi anti-IL-8 varlığında istatistiksel olarak anlamlı adezyon inhibisyonu saptanmadı.

Monosit kültür süpernatantlarının nötrofil-endotel adezyonuna etkisi:

Hasta ve sağlıklı kişilerin monositlerinin, uyaran (PMA ve LPS) veya uyaransız yapılan kültür süpernatantları 48. saatte toplanarak adezyon testinde kullanıldı. Sağlıklı iki kişiden alınan nötrofiller ayrılarak karıştırıldı ve bir nötrofil havuzu oluşturuldu. Bu nötrofillerle monosit kültür süpernatantları varlığında adezyon testi yapıldı. Tablo-11 de de görüldüğü gibi uyarılmamış monosit kültür süpernatantları varlığında hasta ile sağlıklı kişiler arasında fark bulundu. Hasta monosit kültür süpernatantı varlığında adezyon oranı 53.4 ± 17.9 , kontrol monosit kültür süpernatantı varlığında ise 38.4 ± 9.7 olarak bulundu. Bu artışın istatistiksel olarak ta anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). PMA ile uyarılmış kültür süpernatantları ile hastalarda artış görülmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Hastada 55.6 ± 19.8 , kontrolde 40.4 ± 13.5). LPS ile uyarılmış kültür süpernatantlarının varlığında ise

adezyon oranında önemli bir artış görülmedi.

IL-8 in LECAM molekülü üzerine etkisi:

Behçet'li hastanın nötrofilleri yüzeyinde LECAM molekülünün kolayca döküldüğü saptandı. Bu dökülmeye IL-8 in önemli görevi olduğu bilindiğinden, hasta ve normal kişilerin nötrofilleri üzerine IL-8 eklenerek kültürleri yapıldı ve hücre yüzeyindeki LECAM ekspresyonu flow sitometrik olarak incelendi. Tablo-12 ve 13 te görüldüğü gibi IL-8 in LECAM molekülünün ekspresyonunu artırıcı veya azaltıcı etkisinin hasta ve kontroller arasında farklı olmadığı saptandı.

PROJEDE ÖNERİLDİĞİ HALDE GERÇEKLEŞTİRİLEMEYEN ÇALIŞMALAR

1

Proje önerisinin protokolünde, Behçet'li hastaların ameliyat materyalinden damar endoteli elde edilerek, bunun kültürü yapıp, kültür süpernatantlarında IL-8 ölçümü yapılacağı taahhüt edilmişti. Ancak hastanemizde ve materyal temini için iletişim kurulan, Koşuyolu Kalp ve Damar Cerrahisi Merkezi ile Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinde bu zaman içerisinde Behçet'li hasta ameliyat edilmeyip materyal bulunamadığından damar endoteli kültürü yapılamadı. ✓ Projedeki bir başka öneri ise; Behçet'li hastaların kemik iliği kültürlerinin yapıp, bu kültür süpernatantlarında IL-8 düzeyinin ölçümü idi. ancak Behçet'li hastalardan bu materyalin elde edilmesinin etik olmayacağı (çünkü kemik iliği alımı için endikasyonu olan Behçet'li hasta bulunamadı ✓ dolayısıyla endikasyonu olmadan kemik iliği alınması gerekecekti) düşünülebilirdi. Gerçekten Hastanemiz Etik kurulu başkanı Prof.Dr.Nefise Barlas Ulusoy ile bu konu tartışıldı ve bu işlemin etik olmadığı kararına varıldı. Bu nedenle önerinin bu bölümü de yapılamadı.

TARTIŞMA

Behçet hastalığı histolojik olarak, nötrofil infiltrasyonu ile karakterize kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Kronik bir hastalık olmasına rağmen akut enflamasyonun karakterini taşımaktadır. çünkü bu hastaların lezyonlarında yoğun bir nötrofil infiltrasyonu vardır ve bu görünüm akut enflamasyonun tipik özelliğidir.

Bu hastalıkta nötrofiller pekçok yönden bozulmuştur. kemotaksisleri ve yüzeylerinde adezyon molekülleri artmıştır. Bu hastaların serumlarında nötrofil kemotaksisinin artmasına neden olabilecek IL-8 düzeyi de artmıştır (Özgün,1993). Behçet'li hastalarda nötrofillerin adezyonunda tetiği çeken etken bilinmemektedir.

Enflamasyon olgusunun tipik belirtisi olan PMN-endotel adezyonunda nötrofil yüzeyindeki LECAM molekülü önemli bir role sahiptir. Bu molekül adezyonun ilk aşamasında nötrofillerin endotel üzerinde yuvarlanmasını sağlar. Daha sonra gerçek adezyon başladığında ve nötrofiller aktive olarak yüzeylerindeki adezyon moleküllerinin artışından sonra LECAM molekülü nötrofil yüzeyinden dökülür ve solubl formu şeklinde ortamda bulunur.

Solubl LECAM (sLECAM) molekülünün en önemli görevi adezyonu inhibe etmek, yani enflamasyonun "negatif feedback" mekanizmasını işletmektir. Ancak bu molekülün adezyonu hangi mekanizma ile inhibe ettiği bilinmemektedir. sLECAM molekülünün endotel üzerinde, PMN yüzeyindeki $\beta 2$ integrinlerin bağlandıkları ligandlara bağlanarak adezyonu inhibe ettiği düşünülmektedir (Rot,1992).

Biz daha önceki çalışmamızda Behçet'li hastaların nötrofillerinin yüzeyinde adezyon moleküllerinin artmış olduğunu saptadık (Özgün,1993) ve bu durum bu çalışmada da doğrulandı (Tablo-1).

Yine bu çalışmada LECAM molekülünün nötrofil yüzeyinden kolayca döküldüğü görüldü (Tablo-5). Hücre yüzeyini stabil hale getiren sodyum azid ilave edilerek LECAM molekülü ekspresyonu araştırıldığında, hücre yüzeyi stabil iken Behçet'li hasta nötrofillerinin LECAM ekspresyonu normal bulundu. Ancak bu işlem yapılmadan ölçüm yapılırsa LECAM

molekölünün sağlıklı kişilere göre azalmış olduğu görüldü (Tablo-5).

Daha önce başka araştırmacılar da hücre yüzeyi stabil hale getirilmeden yapılan çalışmada bu molekölü Behçet'li hastalarda düşük bulduklarını rapor etmişlerdir (Inaba,1993). PMN lerin yüzeyinden LECAM molekölünün kolayca dökülmesi onların aktive olduklarını göstermektedir. Zaten Behçet'li hasta nötrofillerinin aktive nötrofiller oldukları daha önce yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir .

Bu çalışmada ayrıca hasta plazmalarında solubl LECAM düzeyleri ölçüldü. Ancak Behçet'li hasta nötrofillerinin in vitro koşullarda yüzeylerinden LECAM moleküllerini kolayca dökükleri daha önce saptanmış olduğundan, plazma ayırma işlemi sırasında ortama sodyum azid ilave edip örnekler derhal buzlu su içine alınarak soğutuldu. Kontrol olması ve arada fark olup olmadığının incelenebilmesi amacı ile de örneklerin bir kısmına sodyum azid ilave edilmedi ve plazma oda ısısında elde edildi.

LECAM molekölünün Behçet'li hasta nötrofillerinden kolayca dökülmesi nedeniyle, hasta serumunda sLECAM düzeyinin de yüksek olabileceğini düşünerek yaptığımız bu çalışmamızda beklenenin aksine sodyum azid ilave ettiğimiz örneklerde plazma sLECAM düzeyi sağlıklı kişilere göre daha düşük bulundu (Tablo-6).

Sodyum azid ilave edilmeden ve oda ısısında toplanan örneklerde ise ,plazma ayırma işlemi sırasında PMN yüzeyinden ortama LECAM molekölü dökülmesine rağmen hastaların sLECAM düzeyleri sağlıklı kişilerin sLECAM düzeyine ulaşamadı (Tablo-6). Oysa Behçet'li hasta nötrofillerinin aktive nötrofiller olduğu ve yüzeylerinden LECAM molekölünü ortama dökükleri gösterilmişti. Bu nedenle normal koşullarda, bizim bu dökülen molekölü serumda bulabilmemiz gerekmekte idi.

Bu bulgu göstermektedir ki, Behçet'li hastalarda sLECAM molekölü bir şekilde ortamdan kaybolmaktadır. Değişik enflamatuvar hastalıklarda (sepsiste, AIDS te) serum sLECAM düzeyi yüksek bulunmuştur, ve normalde beklenen de budur. Ancak S.C.Donelly yaptığı bir çalışmada "Adult Repiratory Distress" Sendromlu (ARDS) hastalarda sLECAM düzeyini düşük bulmuştur ve düşük solubl LECAM düzeyi ile hastanın

mortalitesi arasında korelasyon olduğunu göstermiştir.

Bu araştırmacı, sLECAM in endotel üzerindeki ligandına bağlanarak ortamdaki uzaklaştığını ve dolaşan molekülün bu nedenle düşük bulunduğunu savunmaktadır (Donnelly,1994). Eğer sLECAM endotel yüzeyine bağlanmış olsaydı PMN-endotel adezyonu inhibe olur ve enflamasyon dururdu. Oysa Behçet'li hastalarda enflamasyon devam etmektedir ve lezyonlarda yoğun PMN infiltrasyonu vardır. Bu nedenle sLECAM in başka bir şekilde tüketildiği düşünülebilir. Bir olasılık olarak, serumda sLECAM i parçalayan bir proteazın var olabileceği düşünülebilir. Belkide Behçet'li hastalarda enflamasyonu sürekli aktive eden mekanizmalar dışında, enflamasyonun inhibisyonunu sağlayan mekanizmalarda bozukluk bulunmaktadır ve süregelen enflamasyonun nedeni bu olabilir. Tüm bu varsayımlara rağmen sLECAM in düşük bulunmasının nedeni bilinmemektedir ve bunu açıklamak için bu konuda daha ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Bu çalışmada Behçet'li hastaların monositlerinin de aktive oldukları saptandı. Aktive olmuş monosit yüzeyindeki iki ayrı molekülü tanıyan 25F9 ve G16/1 adındaki iki antikorla yapılan çalışmada bu moleküllerin sağlıklı kişilerden daha yüksek olduğu görüldü (Tablo-4)

Normalde monosit yüzeyinde bulunan ve monositler aktive olduklarında hücre yüzeyinde miktarı artan CD14 molekülü de Behçet'li hastalarda yüksek bulundu (Tablo-4). Aktive monosit yüzeyinden dökülen ve enflamasyon belirteci olan solubl CD14 (sCD14) molekülü de bu hastaların serumunda yüksek bulundu (Tablo-7). Ancak solubl CD14 ile serumda yüksek bulunan IL-8 arasında bir korelasyon görülmedi. Bazı hastalarda IL-8 i yüksek bulunurken sCD14 normal bulundu veya sCD14 yüksek bulunurken IL-8 düzeylerinin normal olduğu gözlemlendi.

Bu bulgular Behçet'li hastalarda birden fazla hücre popülasyonunun hastalık etkeni olabileceğini ve bunlardan sadece bir tanesinin bile aktivasyonunun hastalığın semptomlarını oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca serumda yüksek IL-8 düzeyini oluşturan hücrenin monosit dışında başka bir hücre olduğu da düşünülebilir. Çünkü monositler aktive olduklarında IL-8 üretmektedirler. Ancak bir hastada aynı gün alınan serum örneklerinde IL-8

yüksek bulunurken monosit aktivasyonunu gösteren sCD14 düşük bulunabilmektedir.

Monosit kültürleri yapılarak kültür süpernatantlarının PMN-endotel adezyonuna etkisi araştırıldığında Behçet'li hasta monosit kültür süpernatantlarının adezyonu artırdığı görüldü (Tablo-11). Bu bulgu da, Behçet'li hastanın monositlerinin in vivo olarak aktive olduklarını ve adezyonu artırıcı sitokin salgıladıklarını göstermektedir.

Hasta ve kontrol monositleri PMA ve LPS ile uyarıldıktan sonra elde edilen süpernatanın adezyonu artırıcı etkisi, hasta monosit kültür süpernatantlarından daha yüksek olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sonuç olarak bu bulgu da, diğer bulgularımıza ek olarak, hasta monositlerinin aktive monositler olduğunu göstermektedir.

Behçet'li hasta lenfositlerinin adezyon molekülleri incelendiğinde ise CD11a, CD11b, CD18 ve LECAM molekülü ekspresyonu bakımından sağlıklı kişilerle fark görülmedi (Tablo-2). Behçet'li hasta lenfositlerinin aktive oldukları ve bu hastalıkta esas rol oynayan hücrenin lenfositler olduğunu savunan araştırmacılar olmasına rağmen bizim çalışmamızda adezyon molekülleri bakımından sağlıklı kişilerden farklı bulgular elde edilmemiştir. Bu nedenle Behçet'li hastalarda diğer lenfosit aktivasyon belirtilerinin incelenmesi yararlı olacaktır.

LECAM molekülünün IL-8 ile ilişkili olduğu ve LECAM ın hücre yüzeyinden dökülmesinde IL-8 in önemli etkisi olabileceği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Rot,1992). Bu çalışmamızda saptadığımız "unstable" LECAM molekülü varlığı ve serumda yüksek IL-8 düzeyi, Behçet hastalığında da bu iki molekülün ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmada rekombinant IL-8 in hasta nötrofilleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Tablo-12 ve13).

Ancak bu çalışmanın in vitro koşullarda yapıldığı ve in vivo koşullarda bilinmeyen bazı maddelerin IL-8 in bu yöndeki etkisini değiştirebileceği hatırlanmalıdır.

Bütün bu bulgular Behçet hastalığında enflamasyonun başlaması ve inhibisyonu mekanizmalarında bozukluk olduğunu göstermektedir. Ancak bu konuların tam aydınlatılabilmesi için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Brandt E., Petersen F., and Flad H.D. Recombination tumor necrosis factor- α potentiates neutrophil degranulation in response to host defense cytokines neutrophil-activating peptide 2 and IL-8 by modulating intracellular cyclic AMP levels. *J. Immunol.* 149:1356-1364 (1992)

Dobrina A., Menegazzi R., Carlos T. M., Nardone E., Cramer R., Sacchi T., Harlan M. and Patriarca P. Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial

cells. *J. Clin. Invest.* 88, 20-26 (1991)

Donnelly C.S., Haslett C., Dransfield I., Robertson E.C., Carter B.C., Ross J.A., Grant I.S., Tedder T.F. Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome. *Lancet.* 344, 215-219 (1994)

Denman A.M., Pelton B.K., Hylton W., Malkowsky M. and Dinning W.D. Herpes Simplex virus infection and Behçet's syndrome. *Behçet's Disease.* Marcel Dekker, Inc. New York. Sayfa: 415-420 (1991)

Gamble J.R. and Vadas M.A. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor- β . *J. Immunol.* 146:1147-1154 (1991)

Gimbrone M.A., Obin M.S., Brock A.F., Luis E.A., Hass P.E., Hebert C.A., Yip Y.K., Leung D.W., Lowe D.G., Kohr W.J., Darbonne W.C., Bechthol K.B., Baker J.B. Endothelial interleukin-8: A novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 246:1601-1603 (1989)

Hogg N. roll, roll, roll your leukocyte gently down the vein.... *Immunology Today* 13, 113-115 (1992)

Huber A.R., Kunkel S.L., Todd R.F., Weiss S.J.. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254:99-102 (1991)

KAYNAKLAR

Brandt E., Petersen F., and Flad H.D. Recombination tumor necrosis factor- α potentiates neutrophil degranulation in response to host defense cytokines neutrophil-activating peptide 2 and IL-8 by modulating intracellular cyclic AMP levels. *J. Immunol.* 149:1356-1364 (1992)

Dobrina A., Menegazzi R., Carlos T. M., Nardone E., Cramer R., Zacchi T., Harlan M. and Patriarca P. Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 88:20-26 (1991)

Donnelly C.S., Haslett C., Dransfield I., Robertson E.C., Carter D.C., Ross J.A., Grant I.S., Tedder T.F. Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome. *Lancet.* 344:215-219 (1994)

Denman A.M., Pelton B.K., Hylton W., Malkowsky M. and Dinning W.D. Herpes Simplex virus infection and Behçet's syndrome. *Behçet's Disease.* Marcel Dekker, Inc. New York. Sayfa:415-420 (1991)

Gamble J.R. and Vadas M.A. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor- β . *J. Immunol.* 146:1149-1154 (1991)

Gimbrone M.A., Obin M.S., Brock A.F., Luis E.A., Hass P.E., Hebert C.A., Yap Y.K., Leung D.W., Lowe D.G., Kohr W.J., Darbonne W.C., Bechthol K.B., Baker J.B. Endothelial interleukin-8: A novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 246:1601-1603 (1989)

Hogg N. roll, roll, roll your leukocyte gently down the vein.... *Immunology Today* 13:113-115 (1992)

Huber A.R., Kunkel S.L., Todd R.F., Weiss S.J.. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254:97-102 (1991)

Inaba G., Kaku H., Ujihara H., Miyanaga Y. and Hara R. Leukocyte adhesion molecules in active ocular lesions in Behçet's Disease. Behçet's Disease. Edit. by B.Wechsler and P.Godeau Proceeding of the 6th International Conference on Behçet's Disease, Amsterdam sayfa 13-18 (1993)

Kansu E., Koç Y., Koray Z., Duru S., Batman F., Kansu T, Akkaya S., Elem B., Şahin G., Telater H., Zileli T. Endothelin-1,2 levels in Behçet's Disease. 6 th International conference on Behçet's Disease özet kitabı Sayfa 26.(1993)

Kishimoto T.K., Jutila M.A., Berg E.L., Butcher E.C. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors.Science,245,1238-1241 (1991)

Mantovani A. and Dejana E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. Immunolog Today 10:370-375 (1989)

Niwa Y. and Sakane T. Auto-oxidative in Behçet's disease:Endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils.Behçet's Disease University of Tokyo Press sayfa 301-315 (1982)

Özgün Ş.,akoğlu T.,Direskeneli H., Yurdakul S.,Yazıcı H. and Hekim N. Neutrophil adhesion to endothelial cells in patients with Behçet's disease.Behçet's Disease Edit. by B. Wechsler and P.Godeau, Proceeding of the 6th International Conference on Behçet's Disease, Amsterdam sayfa 135-138 (1993)

Pigott R., Needham L.A., Edwards R.M.,Walkerand C., Power C. Structural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leukocyte adhesion molecule-1 using a panel of monoclonal antibodies. J.Immunol. 147,130-135 (1991)

Rott A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8 role of neutrophil emigration. Immunology Today.13,291-294 (1992)

Schröder J.M. and Christophers E. Secretion of novel and homologous neutrophil activating peptides by LPS-stimulated

human endothelial cells. J. Immunol 142:244-251 (1989)

Smith C.W., Kishimoto T.K., Abbass O., Hughes B., Rothlein R., McIntire L.V., Butcher E. and Anderson D.C. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule-1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. J. Invest. 87,609-618 (1991)

Stacker S.A. and Springer T.A. Leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptor on stimulated endothelium. J. Immunol. 146,648-655 (1991)

Yamana S., Aoi K., Yamamoto M. and Ofuji T. Studies on the pathogenesis of Behçet's disease: Is Behçet's disease Mediated by mononuclear cells. Behçet's Disease. University of Tokyo press. Sayfa 459-468 (1982)

Zimmerman G.A., Prescott S.M., McIntire M.T. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. Immunology Today 13,93-99 (1992)

Tablo-1 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin
nötrofillerinin yüzeylerinde adezyon molekülü
ekspresyonu (%)

	CD11a	CD11b	CD18
Normal PMN	71±8.7 (n 19)	98±1.7 (n 30)	97.8±3.6 (n 30)
Hasta PMN	89.4±10.8 (n 50)	92.8±9.8 (n 30)	95.5±10.1 (n 30)
	p<0.001	p>0.5	p>0.5

Tablo-2 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin
lenfositlerinin yüzeyinde adezyon moleküllerinin
ekspresyonu (%)

	CD11a	CD11b	CD18	LECAM
Normal lenfosit (n 30)	87.3±11.8	28.9±15.1	90.5±	58.6±16.9
Hasta lenfosit (n 30)	86.9±9.6	31±11.4	87±9.6	45.5±41.1
	p>0.5	p>0.5	p>0.5	p>0.5

Tablo-3 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin monositlerinin yüzeyinde adezyon moleküllerinin ekspresyonu (%)

	CD11a	CD11b	CD18	LECAM
Normal monosit (n 30)	91.9±8.1	87.6±10.3	92.9±8.9	87.3±
Hasta monosit (n 30)	94.6±6.2	94.2±6	96.2±5.7	88.6±10.7
	p>0.5	p<0.005	p>0.5	p>0.5

Tablo-4 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin monositlerinin yüzeyinde aktivasyon moleküllerinin ekspresyonu (%)

	25F9	G16/1	CD14
Normal monosit (n 30)	16.4±15	1.4±1.4	87.3±7.8
Hasta monosit (n 30)	48.1±32.4	15±16.2	94.9±3.7
	p<0.005	p<0.005	p<0.005

Tablo-5 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin nötrofillerinde değişik koşullarda LECAM molekülü ekspresyonu (%)

	Tam kan		Nötrofil
	Sodyum azidli soğuk ortam	Sodyum azidsiz oda ısısı	Sodyum azidsiz oda ısısı
Hasta PMN (n 30)	98.6±3.6	89.1±16.3	26.4±28.5
Normal PMN (n 30)	98±2	96±5.3	93.4±7.1
	p>0.5	p<0.02	p<0.001

Tablo-6 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin plazmalarında değişik koşullarda solubl LECAM molekülü düzeyleri (µg/ml)

	EDTA+sodyum azidli plazma soğuk ortam	EDTA lı plazma ve oda ısısı	
Normal plazma	1.98±0.6 (n 15)	2±0.5 (n 15)	p>0.5
Hasta plazma	1.58±0.4 (n 15)	1.82±0.5 (n 15)	p<0.1
	p<0.05	p>0.5	

Tablo-7 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin serumlarında
solubl CD14 düzeyleri (µg/ml)

Hasta	8.1±7.2 (n 30)
Kontrol	1.39±0.73 (n 30)
	p<0.001

İ

Tablo-8 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin serumlarında
IL-8 düzeyleri (pg/ml)

Hasta	232.7±79.1 (n 30)
Kontrol	97.5±56.3 (n 27)
	p<0.001

Tablo-9 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin serumlarının
PMN-endotel adezyonuna etkisi

Adezyon oranı (%)	
Hasta (n 14)	29.6±9.2
Kontrol (n 10)	24.8±11.3
	p<0.05

Tablo-10 Behçet'li hasta serumlarının neden olduğu artmış
PMN-endotel adezyonunun anti-IL-8 ile inhibisyonu.

Adezyon oranı (%)		
Hasta no	Sadece serum	Serum+anti-IL-8
73	31.2	37.4
65	40.4	51.8
79	41.6	44.8
Ortalama	37.7±5.6	44.6±7.2 p>0.5

Tablo-11 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin monosit kültür süpernatantlarının PMN-endotel adezyonuna etkisi

Adezyon oranı %			
	Stimüle olmamış monosit kültür süpernatanı	PMA ile uyarılmış monosit kültür süpernatanı	LPS ile uyarılmış monosit kültür süpernatanı
Hasta monosit	53.4±17.9 (n 8)	55.6±19.8 (n 9)	46.5±11.3 (n 9)
Kontrol monosit	38.4±9.7 (n 8)	40.4±13.5 (n 7)	41.9±13.8 (n 7)
	p<0.05	p>0.5	p>0.5

Tablo-12 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin EDTA+ sodyum azid varlığında nötrofillerin yüzeyindeki LECAM molekülüne IL-8 in etkisi (%)

	Kültür öncesi	37°C de 1 saat kültür	IL-8 ile 37°C de 1 saat kültür
Hasta PMN (n 10)	36.2±23.9	40.1±19.5	47.5±22.4
	p>0.5	p>0.5	
Kontrol PMN (n 3)	67.3±5	63.3±10	56±13
	p>0.5	p>0.5	

Tablo-13 Behçet'li hasta ve sağlıklı kişilerin, sadece EDTA varlığında, nötrofillerin yüzeyindeki LECAM molekülüne IL-8 in etkisi (%)

	Kültür öncesi	37°C de 1 saat kültür	IL-8 ile 37°C de 1 saat kültür
Hasta PMN (n 10)	24.8±19.8	25.2±20.4	29.1±26.4
		p>0.5	p>0.5
Kontroll PMN (n 4)	58.7±7.3	49.7±8.1	51±4.5
		p>0.5	p>0.5

NOT

Bu çalışmadaki bazı bulgular aşağıda adı belirtilen kongrelere poster veya sözlü bildiri olarak sunulmuştur ve özetleri ektedir.

1. VIII. Euler symposium "Vasculits" (İki adet poster)
2. IX. Ulusal Romatoloji Kongresi (Bir adet bildiri)



Clinical Rheumatology

ISSN 0770-3198

CONTENTS

Page

M.A. Cimmino, B. Seriola, S. Accardo <i>Prevalence of nail involvement in nodal osteoarthritis</i>	203
W. Brückle, T. Drexel, K. Grasedyck, M. Schattenkirchner <i>Treatment of psoriatic arthritis with Auranofin and Gold Sodium Thiomalate</i>	209
R. Rosen, Y. Tomer, R. Carel, A. Weinberger <i>Serum 17-beta-estradiol and testosterone levels in asymptomatic hyperuricaemic men</i>	219
M.L. Pacor, D. Biasi, C. Lunardi, P. Cortina, P. Caramaschi, D. Girelli, M. Botto, G. Urbani, G. Lombardo, L.M. Bambara <i>Cyclosporin in Behçet disease: results in 16 patients after 24 months of therapy</i>	224
S. Sasaki, H. Iwata, H. Ishiguro, K. Obata, T. Miura <i>Detection of Stromelysin in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis</i>	228
J.L. Poet, I. Tonolli Serabian, H. Camboulives, M. Dufour, H. Roux <i>Broadband ultrasound attenuation of the os calcis: preliminary study</i>	234
N. Imeryüz, H. Yazici, H. Koçak, M. Erk, A. Özder, S.M. Karcier, M. Örkən, Z. Yurdakul, H. Özdoğan <i>Pericardial and pulmonary involvement in rheumatoid arthritis in Turkey</i>	239
E. Collantes, F.J. Tinahones, A. Cisnal, J. Añon, P. Sanchez-Guño <i>Variability of lipid phenotypes in hyperuricaemic-hyperlipidemic patients</i>	244
K. Krüger, M. Schattenkirchner <i>Comparison of Cyclosporin A and Azathioprine in the treatment of rheumatoid arthritis - Results of a double-blind multicentre study</i>	248
M. Sanila, A. Kotaniemi, J. Viikari, H. Isomäki <i>Height loss rate as a marker of osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis</i>	256
A. Oda, M. Miyata, E. Kodama, H. Satoh, Y. Sato, T. Nishimaki, H. Nomaguchi, R. Kasukawa <i>Antibodies to 65Kd heat-shock protein were elevated in rheumatoid arthritis</i>	261
B. Gömür, P. Petrou <i>Dermatoglyphics and ankylosing spondylitis</i>	265
H.M. Markusse, M. Schoonbrood, M. Oudkerk, S.C. Henzen-Logmans <i>Leucocytoclastic vasculitis as presenting feature of primary Sjögren's syndrome</i>	269
H.D. Stahl, T.H. Eitlin, A. Plohmman, E.W. Radü, J. Müller-Braund, U. Steiger, A. Tyndall <i>Central nervous system lupus: concomitant occurrence of myelopathy and cognitive dysfunction</i>	273
M. Hashimoto, S. Nonaka, E. Furuta, T. Wada, Y. Suenaga, M. Yasuda, M. Shingu, M. Nobunaga <i>Methotrexate for steroid-resistant systemic lupus erythematosus</i>	280
R. Westhovens, A. Verstraeten, D. Knockaert, M. Van Holsbeek, A. Sileghem, D. Vanderschueren, J. Dequeker <i>Cauda Equina Syndrome complicating ankylosing spondylitis: role of computed tomography and magnetic resonance imaging demonstrated in two cases</i>	284
G. Nesher, M. Sonnenblick <i>Steroid-sparing medications in temporal arteritis - Report of three cases and review of 174 reported patients</i>	289

	CD 4	CD 8	CD 11b	CD 16	CD 56	CD4 1b/8	CD 8/16	CD 8/56	CD 4/16	CD 4/56	CD 56/16
Behçet	48 ± 10	24 ± 7	20 ± 7	14 ± 5	39 ± 14	10.9 ± 6	5.4 ± 3	4.2 ± 4	15.5 ± 3	10 ± 6	11 ± 5
control	49 ± 9	20 ± 6	32 ± 10	17 ± 6	29 ± 11	5.2 ± 4	3.4 ± 2	3.6 ± 2	4 ± 1.6	12 ± 6	14 ± 6
	NS	p<0.03	p<0.01	p<0.05	p<0.02	p<0.001	p<0.03	NS	NS	NS	NS

peptides. The role of these antibodies needs to be defined, but these peptides can induce in rats experimental lesions which is a principal manifestation of BD.

Unstable LECAM expression of neutrophils in patients with Behçet's disease.

Özgül, T. Akoğlu, H. Yazıcı. Marmara University, Medical School, Department of Hematology and Immunology and Istanbul University, Cerrahpaşa Medical School, Department of Rheumatology, Istanbul, Turkey.

We have previously shown that in vitro adhesion of normal neutrophils to normal endothelial cells is high in the presence of Behçet's patients serum. We have also shown that exposure to patients serum causes incremental expression of adhesion molecules on both neutrophils and endothelial cells. However, the serum IL-8 level, which has dual effects on adhesion, was found to be high in patients sera and this finding could be explained by further studies. We have now studied LECAM expression on patients neutrophils and found 29.2% expression in patient neutrophils compared with 15.2% of controls ($p<0.001$). If however the blood sample is treated immediately following sampling by addition of sodium azide and rapidly cooled LECAM expression increases to normal ($94.2 \pm 3.6\%$) indicating instability of the LECAM molecule of patients neutrophils. Soluble LECAM in patients plasma was found to be low ($1.58 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$) compared to the normals $1.98 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ ($p<0.05$) in the presence of sodium azide and cooling however, LECAM levels were $1.8 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ in the patients serum and $2 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ in the controls, also indicating instability of the LECAM molecule on patient neutrophils. Increased IL-8 levels in the patients plasma together with increased adhesion of neutrophils to endothelial cells can be explained by unstable (or defective) LECAM molecule in patients where defective soluble LECAM may not be operative in the negative feedback of IL-8 production by neutrophils and endothelium.

Presence of activated monocytes in patients with Behçet's disease.

Özgül, Ş. Şahin (Özgül), S. Yurdakul. Marmara University, Medical School Department of hematology and immunology and Istanbul University, Cerrahpaşa Medical School, Department of Rheumatology, Istanbul, Turkey.

Behçet's patients neutrophils have shown to be activated and expressed increased adhesion molecules. In vitro adhesion of neutrophils to endothelial cells was also found to be increased. In this study we analysed monocyte activation markers. Monocytes were found to express increased CD14 molecule ($94.9 \pm 3.7\%$) as compared to normal controls ($87.3 \pm 7.8\%$) this difference was significant ($p<0.005$). Soluble CD14 molecule was also found to be increased in patients sera as

compared to controls ($8.1 \pm 9.2 \mu\text{g/ml}$ vs. $1.39 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ and $p<0.001$). Furthermore, two other late inflammatory stage monocyte markers were also found to be high on Behçet's patients monocytes. Staining with 25179 monoclonal antibody was $48.1 \pm 32.4\%$ positive in BD but $16.4 \pm 15\%$ positive in normal controls and staining with G16/1 monoclonal antibody was $15 \pm 16.2\%$ positive in the patients but $1.4 \pm 1.4\%$ positive in the controls. All these findings indicate monocyte activation in patients with BD in parallel with neutrophils activation and may be explained by use chronic inflammatory nature of Behçet's lesions.

313 T Lymphocyte subpopulations in Behçet's Disease.

E. Eksioglu Demiralp, Ş. Şahin Özgül, H. Direskeneli, V. Hamuryudan, T. Akoğlu. Marmara Medical School, Department of Hematology, Immunology, Department of Rheumatology, Cerrahpaşa Medical School, Department of Rheumatology, Istanbul, Turkey.

Behçet's disease (BD) is a chronic inflammatory disorder with immune abnormalities. Various T lymphocyte subgroup changes have previously been described in BD. In this study we investigated T lymphocyte subgroups (CD4, CD8, CD11b, CD16, CD56, CD11b/CD8, CD56/CD16, CD4/CD16/CD56, CD8/CD16/CD56) with flow cytometry using 2 and 3 color immunofluorescence staining in 37 patients with BD and 20 healthy control (see Table above).

The observed increase in CD56 (+) cells were evenly distributed in both CD4 and CD8 cell populations in BD. Although no significant differences were observed in CD56 (+) 16 (+) NK populations, the increase in CD8 CD16 population demonstrates an increase in cytotoxic T cell population. The increased CD11b/CD8 (+) and CD16/CD8 (+) populations in addition to CD56 positivity might signify the effect of inflammation on T cells in BD.

314 Peripheral blood lymphocyte population in patients with Behçet's disease and recurrent oral ulceration.

G. Toköz, N. Düzgün, K. Özoran, A. Güler, H. Tutkay. Ankara University, Departments of Immunology and Dermatology, Ankara, Turkey.

Ninety-five patients with Behçet's Disease (BD) according to the International Study Group Criteria (clinically 44 active and 51 inactive), 34 patients with recurrent oral ulceration and 130 healthy volunteers were included to the study. Flow-cytometrical analysis of T lymphocytes (Total T, Th, T_s/c) and B lymphocytes were performed in the patient and control groups. None of the patients was receiving immunosuppressive therapy during the study.

While the peripheral blood total T, T_s/c and active T lymphocyte count in 44 active BD patients were significantly high-

IX.ULUSAL ROMATOLOJİ KONGRESİ

11-14 Ekim 1994

PROGRAM ve SERBEST BİLDİRİ ÖZET KİTABI

Düzenleyen: ROMATİZMA DERNEĞİ (İstanbul)

KONGRE YERİ
GRAND HOTEL VİSTA
KEMER, ANTALYA

IX.ULUSAL ROMATOLOJİ KONGRESİ

11-14 Ekim 1994

PROGRAM ve SERBEST BİLDİRİ ÖZET KİTABI

Düzenleyen: ROMATİZMA DERNEĞİ (İstanbul)

KONGRE YERİ
GRAND HOTEL VİSTA
KEMER, ANTALYA

BEHÇET'Lİ HASTADA MONOSİT KÜLTÜR SÜPERNATANLARININ NORMAL NÖTROFİL-ENDOTEL ADEZYONUNA ETKİSİ

Ş.ŞAHİN (ÖZGÜN), S.YURDAKUL, V.HAMURYUDAN, İ.YAZICI,
T.AKOĞLU

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı
İmmünoloji Bilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı, İstanbul

Behçet'li hasta serumları in vitro nötrofil-endotel adezyonunu artırır. Adezyondaki bu artışın nedeni serumdaki yüksek IL-8 olabilir. Hasta monositlerinin de aktive oldukları daha önceki çalışmamızda flow sitometrik inceleme ile 25F9, G16/1 ve CD14 moleküllerinin artışı ile gösterilmişti.

Bu çalışmada Behçet'li 10 hasta ve sağlıklı 10 kişinin monositlerinin kültürleri yapılarak kültür süpernatantlarının nötrofil-endotel adezyonuna etkisi araştırıldı. Dansite gradienti ile ayrılmış periferik mononükleer hücrelerden, plastik yüzeye yapıştırma yöntemi ile monositler elde edildi ve tek başına veya forbol miristat asetat (PMA) ve lipopolisakkarid (LPS) ile uyarılarak kültürleri yapıldı. Kırksekiz saatlik kültür sonunda kültür süpernatantları toplandı.

Doksanaltı kuyulu kültür plağında üretilen endotel hücresi üzerine sağlıklı insan nötrofilleri ilave edilerek monosit kültür süpernatantları varlığında yapışmaları test edildi. Yapışan nötrofillerin gösterilebilmesi amacı ile nötrofil miyeloperoksidaz enzimi ELİSA yöntemi ile ölçüldü. Uyarılmış hasta monosit kültür süpernatantlarının varlığında nötrofil yapışma oranı 53.4 ± 17.9 kontrol monosit kültür süpernatantı ile 38.4 ± 9.8 ($p < 0.05$) olarak bulundu. PMA ile uyarılmış kültür süpernatantları ile nötrofil yapışma oranı hastalar için 55.6 ± 19.8 , kontroller için 40.4 ± 13.5 ($p > 0.05$); LPS ile uyarılmış monosit kültür süpernatantları ile hastalarda 46.5 ± 11.3 , kontrollerde 41.9 ± 13.8 ($p > 0.5$) olarak bulundu. Uyarı öncesinde hasta monosit kültür süpernatantlarının adezyonu artırıcı etkisi, bu hücrelerden in vivo aktive olduklarını göstermektedir.

Kayıt No. 249
Gönderen 12.12.94



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HEMATOLOJİ - İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

TÜBİTAK TIP ARAŞTIRMA GRUBU BAŞKANLIĞINA

[TAG-1208 nolu projenin yürütücüsüyüm. Projenin kesin raporu ilişiktedir.

Bilgilerinize arz ederim.

Dr.Şükran Şahin (Özgün)

Prof.Dr. İzzet BERKELE'ye 2 kopya
verildi. Dosyasına iktisad
13-1-94 tarihli fiidene