MÜSBED 2011;1(2):96-102

Araştırma / Original Paper

IgE Yüksekliği ve/veya Otoimmünite ile Seyreden İmmün Yetmezliklerde Th17 Hücre Farklılaşmasının Araştırılması

Tunç Akkoç, Ayzer Tevetoğlu, İsmail Öğülür , Ayşegül İzgi, Elif Karakoç Aydıner, Safa Barış, Nerin Bahçeciler, Işıl Barlan

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatrik Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Tunç Akkoç
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Pediatrik Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul-Türkiye
Telefon / Phone: +90-532-401-1222 Elektronik posta adresi / E-mail address: tuncakkoc@yahoo.com
Kabul tarihi / Date of acceptance: 26 Ağustos 2011 / August 26, 2011

ÖZET

IgE yüksekliği ve/veya otoimmünite ile seyreden immün yetmezliklerde Th17 hücre farklılaşmasının araştırılması

Amaç: Hiper IgE Sendromu (HIES) tekrarlayan cilt apseleri, pnömoni, mukokutanöz mantar enfeksiyonları, egzema, eozinofili ve yüksek IgE düzeyi ile karakterize, Sık Değişken İmmün Yetmezlik (SDİY) ise solunum ve gastrointestinal sistemde tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla karakterize olan immün yetmezlik hastalıklarıdır. Bu çalışmada patogenezi tam olarak bilinmeyen HIES ve SDİY hastalıklarında altta yatan immünolojik bozukluğun aydınlatılması amacıyla immün yanıtta önemli olduğu bilinen Th17 hücrelerinin farklılaşmasının incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya HIES ve SDİY tanısı almış iki grup hasta ve sağlıklı bireylerden oluşan bir grup kontrol alındı. Her gruptan venöz kandan Periferal Kan Mononükleer Hücreler (PKMH) ve CD45RA+ naif T hücreleri izole edildi. İzole edilen hücreler Th17 farklılaşma koşullarında kültüre edildi ve kültür süpernatantlarındaki IL-17 sitokin seviyesi ELİSA yöntemi ile ölçüldü.

Bulgular: HIES grubunda naif T hücreler Th17 farklılaştırma koşullarında kültüre edildiğinde IL-17 sitokin seviyesinde uyarım öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmedi. Aynı hasta grubundan izole edilen PMKH farklılaştırma koşullarında kültüre edildiğinde ise, IL-17 sitokin salınımı kontrol grubuna göre anlamlılığa yakın olarak düşük bulundu. SDİY ve kontrol gruplarından izole edilen naif T hücreler Th17 farklılaştırma koşullarında kültüre edildiğinde, her iki grupta da uyarım öncesine göre IL-17 sitokin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlendi. İzole edilen PMKH ve naif T hücrelerin Th17 farklılaştırma kültürleri sonucu, kontrol ve SDİY grupları arasında IL-17 sitokin salınımında anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç: Elde edilen veriler HIES'li hastalarda T hücrelerin IL-17 sitokinini üretmede kusurlu olabileceklerini, fakat SDİY'li hastalarda IL-17 üretiminde aksaklık olmadığını düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: HIES, SDIY, immün yetmezlik, Th17

ABSTRACT

Investigation of Th17 cell differentiation in immunodeficiencies associated with high IgE levels and/or autoimmunity

Objective: Hyper IgE Syndrome (HIES) and Common Variably Immunodeficiency (CVID) are immuno-deficiency diseases. HIES is characterized by recurrent skin abscesses, pneumonia, mucocutaneous fungal infections, eczama, eosinophilia and high serum IgE levels. CVID is characterized by recurrent bacterial infections in airways and gastrointestinal tract. In this study, differentiation of Th17 cells were aimed to be investigated in CVID and HIES patients.

Method: Two groups of patients diagnosed either with HIES and CVID and one group including four healty individuals were enrolled into the study. In each group, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and CD45RA+ naive T cells were isolated from venous blood. Isolated cells were cultured in Th17 differentiating conditions and IL-17 levels of culture supernatants were measured by ELISA method.

Results: When naive T cells obtained from HIES patients were cultured under Th17 differentiating conditions, culture supernatant IL-17 cytokine level did not show any significant increase compared to unstimulated group. When PBMCs isolated from the same patients were cultured under differentiating conditions, IL-17 cytokine level had been measured nearly statistical significant compared to healthy control group. On the other hand, when naive T cells isolated from CVID and healthy control groups were cultured under Th17 differentiating conditions, a significant increase had been observed in IL-17 levels of both groups compared to the unstimulated group. Results of differentiated cultures of isolated PBMC and naive T cells showed that there is no significant difference in the IL-17 cytokine levels between the healthy group and CVID.

Conclusion: These results show that there may be a defect in IL-17 secreting T cells in HIES group, but there is no defect in IL-17 secreting T cells in CVID patients.

Key words: HIES, CVID, immunodeficiency, Th17

GİRİŞ

İmmün sistemde Th1 hücrelerinin otoimmünite ile Th2 hücrelerinin IgE üretimi ve allerji ile yakın ilişkili olduğu bilinmektedir. Th1 ve Th2 hücrelerinin arasındaki denge Th2 baskın yöne kaydığında IgE üretimi artmakta ve allerjik hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Son dönemlerde tanımlanan T hücre alt gruplarından Treg ve Th17 hücreleri, Th1 ve Th2

tip immün cevap arasındaki dengeyi kontrol eden hücre gruplarıdır. Th17 hücreleri IL-17 salgılama kapasitesine sahip olmakla birlikte otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamakta, bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı savunmada görev almaktadır (1,2).

Th17 hücrelerinin anlaşılması ile ilgili ilk önemli çalışmalar, daha önceleri Th1 hücreleri tarafından yönetildiği düşünülen otoimmün hastalık hayvan modellerinden gelmiştir. Özellikle Langrish ve ark. tarafından Th17 hücrelerinin EAE (Experimental Autoimmune Encephalo-myelitis, deneysel otoimmün ensefalit) hayvan modelinde Th1 hücrelerine göre çok daha etkin olduklarının gözlemlenmesi ile bu hücrelerin bilinen proinflamatuvar hücre grubu oldukları ortaya çıkmıştır (3).

Naif T hücrelerden T hücre alt gruplarının farklılaşmasında rol oynayan soya özgü transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. Th1 farklılaşmasında T-bet, Th2 farklılaşmasında GATA3, Treg farklılaşmasında FoxP3 ve fare Th17 farklılaşmasında RORγt (retinoic-acid related orphan receptor) transkripsiyon faktörleri rol almaktadır (4,5). Yapılan güncel çalışmalarda fare RORγt ve insan RORC2 gen dizilimlerinin homolog olduğu ve RORC2'nin insan Th17 farklılaşmasında anahtar transkripsiyon faktörü olduğu gösterilmiştir (6). RORC2, STAT sinyalinin iletiminde önemlidir ve STAT-3 pekçok immünolojik yol için anahtar rol oynayan regülatuvar bir proteindir (7).

TGF-β, IL-6 ve IL-23'ün Th17 hücre gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir (8,9). Bettelli ve ark. naif T hücrelerden Th17 hücrelerinin farklılaşmalarında TGF-β ve IL-6 sitokinlerinin birlikte uyarımının etkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgu esasında oldukça ilginçtir, çünkü TGF-β sitokini tek başına etki ettiği zaman T hücre farklılaşmasını antiinflamatuvar özellikteki regülatör T hüceleri yönüne ilerletmekte, IL-6 ile birlikte uyarım sağlandığı zaman ise proinflamatuvar T hücre grubunun gelişimini sağlamaktadır. Bu ve diğer başka bulgular, Th17 hücrelerinin regülatör T hücreleri ile birlikte karşılıklı olarak antagonist etkileşimle bağışıklık yanıtını dengelediğini düşündürmektedir (9).

Birçok bulgu Th17 hücrelerinin romatoid artrit (RA) patogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir. Normal farelerin eklem aralıklarına Th17 yanıtının temel moleküllerinden IL-17 enjeksiyonu RA benzeri değişikliklere yol açmaktadır. Yine allograft rejeksiyonu hayvan modeli ve hastalarında yapılan çalışmalar, reddedilen dokuda IL-17 ekspresyonunda artış olduğunu göstermekte ve Th17 hücrelerinin bu mekanizmada da rol alabileceğini düşündürmektedir. Th17 hücrelerinin bunlara ilave olarak, diğer bazı kronik hastalıklarda da rol oynadığını düşündüren bulgular mevcuttur. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE), psöriyazis, multipl skleroz, sistemik skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalıkları bu hastalıklardan bazılarıdır (10).

Hiper IgE Sendromu (HIES), hem immünolojik hem de nonimmünolojik mekanizmaların baskın olduğu multisistemik bir hastalıktır. Tekrarlayan cilt abseleri, pnömoni, mukokutanöz mantar enfeksiyonları, egzema, eozinofili ve yüksek IgE düzeyi ile karakterize olan ve oldukça nadir görülen bir immün yetmezlik hastalığıdır (11-14).

HIES hastalığının otozomal dominant (OD) ve otozomal resesif (OR) kalıtılan iki formu tanımlanmıştır. HIES OD formunda hastaların %70'inde STAT-3 geninde mutasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar STAT-3 geninin SH2 büklümünde ve DNA bağlayıcı büklümünde heterozigot bölge veya missense delesyonlar olarak belirlenmiştir (14-16). HIES OR formu ise ilk olarak 2004 yılında Renner ve ark. tarafından 13 hastada tanımlanmış ve OD formundan farklı klinik özellikler ile prezente edildiği gösterilmiştir (17). OR HIES olarak takip edilen bir hastada STAT-3 yolağında tirozin kinaz 2 (Tyk-2) geninde homozigot mutasyon gösterilmiştir (18). Yapılan güncel çalışmalarda OR HIES hastalarında DOCK8 (Dedicator of Cytokinesis 8) homozigot delesyonları ya da nokta mutasyonları tespit edilmiştir. DOCK8 eksikliği viral enfeksiyonlara duyarlılık, atopik egzema, kusurlu T hücre aktivasyonu, Th17 hücre farklılaşmasında bozukluk, kusurlu eozinofil homeostazisi ve düzensiz IgE düzeyi ile karakterize çeşitli hücresel immün yetmezlikler ile ilişkilendirilmiştir (19).

STAT-3 daha önce de bahsedildiği gibi bakteriyel ve mantar enfeksiyonlara karşı savunmada önemli rolü olan Th17 hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonu için önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Gerek OR gerekse OD HIES'li olgularda tekrarlayan mukokütanöz mantar enfeksiyonlarının görülmesi, Th17 hücrelerinin gelişimi veya farklılaşması sürecinde de bozukluklar olacağını yansıtmaktadır. Yakın zamanda HIES'li hastalardan edilen T hücrelerinin IL-17 üreten Th17 hücrelerine farklılaşamadıkları gösterilmiştir (14).

Sık Değişken İmmün Yetmezlik (SDİY) tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar, iki veya daha çok immünoglobülin izotipinde (düşük IgG, IgA veya IgM) hipogammaglobülinemi ve bozulmuş antikor yanıtı ile karakterize edilen heterojen bir hastalıktır (20). SDİY hastalarında lenfoma ve gastrik

kanser gibi malignite gelişme ve hastaların %20-25'inde otoimmün hastalık görülme riski vardır. Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis ve Heamophilus influenza kapsülsüz bakterileri SDİY'li hastalarda sinopulmonar sistemde tekrarlayan enfeksiyonlara sebep olmaktadır (21). SDİY'ye neden olan immünolojik bozukluklar net olarak bilinmemektedir. Bu hastaların bazılarında antijen sunucu hücrelerin, monositlerin, NK hücrelerin, T ve B lenfositlerinin sayı ve fonksiyonlarında farklılıklar olduğu bulunmuştur (22).

SDİY'li hastaların bazılarında aktive T hücrelerinde eksprese olan ICOS (inducible costimulator) seviyesi düşüktür. ICOS mutasyonu belirlenen SDİY'li hastalarda tekrarlanan bakteri enfeksiyonları, splenomegali, otoimmün nötropeni ve neoplazi görüldüğü rapor edilmiştir. Ayrıca bu hastalarda periferik kanda B hücre (CD27+IgM-IgD-) sayısı ise ya çok azdır ya da yoktur ve düşük seviyede IL-10 üretildiği gösterilmiştir (21).

Bu çalışma ile HIES ve SDİY hastalarında altta yatan immünolojik bozukluğun aydınlatılması amacı ile bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı savunmada önemli olduğu bilinen ve IL-17 sitokini üreten Th17 hücrelerinin farklılaşmasının incelenmesi hedeflendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grupları

Bu çalışmaya, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı'nda takibe alınan, 10-38 yaş arası, ESİD/PAGİD kriterlerine göre Sık Değişken İmmün Yetmezlik ve Hiper IgE Sendromu tanısı ile izlenen hastalar dahil edilmiştir. Denekler 3 gruba ayrılmıştır. Grup I: HIES tanısı almış hastalar (n=3), Grup II: SDIY tanısı almış hastalar (n=4), Grup III: Sağlıklı kontrol (n=4)

Venöz Kan Alımı ve PMKH İzolasyonu

Deneklerden heparinli tüplere 10 ml venöz kan alındı ve alınan kan lenfosit izolasyonu yapılmak üzere steril ortam olan UV kabininde 15 ml'lik steril falkonlara aktarıldı. Bu kan örnekleri 1/1 oranında steril PBS ile sulandırıldı. Her örnek için ayrı bir steril 50 ml'lik falkon tüp alınarak örneklere göre kodlandı ve her tüpe 3 ml steril fikol eklendi. Daha sonra fikol eklenen tüplere PBS ile volümü arttırılan kan örnekleri steril pastör pipeti kullanılarak yayıldı. Bu aşamayı müteakip tüpler 20 dak 2000 rpm devirde santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerin ortasında toplanmış olan buffy-coat kısmı örneklere göre kodlanış yeni falkon tüplere alındı. Daha sonra tüplere hücre kültür besiyeri RPMI 1640 %10 FCS konularak 1500 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Birinci yıkama işlemi sonrasında UV kabinine alınan tüplerin üst kısımları boşaltıldı ve çökmüş olan lenfositler kaldırılarak yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Son yıkama işleminin ardından hücreler hücre kültürü besiyeri ile 1 ml'ye tamamlandı. 1 ml'de bulunan lenfosit sayısının tayini için, lenfosit süspansiyonundan 10µl örnek alınarak yine aynı miktarda Tripan mavisi ile karıştırıldı. Boyayı içine almamış ve şişmemiş lenfositler canlı olarak nitelendirilerek, Thoma lamında 16 büyük kare 40x'lik büyütme altında sayıldı. Bulunan hücre sayıları 2x104 ile çarpılarak, lenfosit sayıları tüm örnekler için hesaplandı.

CD45RA+ Naif T Hücre İzolasyonu ve Saflığının Tayini

Mononükleer hücre süspansiyonundan CD45RA+ naif T hücre izolasyonu, istenmeyen hücrelerin immünomanyetik olarak işaretlenerek bir mıknatıs yardımıyla ayrıştırılması esasına dayanan Human Naif CD4+ T Cell Enrichment Kit (Stemcell, Canada) kullanımı ile gerçekleştirildi.

Hastalardan izole edilen CD45RA+ naif T hücrelerinin saflığını tespit edebilmek için, her grup süspansiyondan 50 µl'lik örnek FACS tüpüne alındı. Her bir tüpe CD45RA-FITC antikoru eklenerek karanlık ortamda 20 dakika bekletildi. Bekleme süresi sonunda izole edilen CD45RA+ naif T hücre saflığına akım sitometri aletinde bakıldı.

Hücre Kültürü

Naif T hücre ve PKMH uyarımı 48 kuyucuklu plaklarda yapıldı. Her bir kuyucuk 500 µl'de 0,6x106 hücre olacak şekilde ayarlandı. Tüm örnekler için uyarımlı ve uyarımsız (US) olacak şekilde ikişer kuyucuk hazırlandı. Uyarımsız kuyucuklara sadece hücreler eklenirken, uyarımlı kuyucuklara hücreler üzerine PHA (2µg/ml) (Sigma) ve IL-2 (20ng/ml) (BD Bioscience) eklendi. Kuyucukların son hacmi hücre kültürü ortamı ile 500 µl olacak şekilde tamamlandı. Kültür plakları 37˚C'de CO2'li etüvde 3 gün inkübe edildi. 3 gün sonunda uyarımlı plaklara anti-CD2 0,5 µg/ml (BD Bioscien-

ce), anti-CD3 0,5 µg/ml (BD Bioscience), anti-CD28 0,5 µg/ml (BD Bioscience); Cdmix ile birlikte TGFβ 5 ng/ml (BD Bioscience), anti-IFNγ 10 µg/ml (BD Bioscience), IL-6 20 ng/ml (BD Bioscience), IL-1β 20 ng/ml (BD Bioscience), IL-21 20 g/ml (BD Bioscience) ve IL-23 20 ng/ml (BD Bioscience) konularak 37˚C'de CO2'li etüvde 4 gün inkübe edildi. Daha sonra kültür ortamına 1 µg/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) ve 20 ng/ml PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich) eklendi ve 3 gün kültüre edildi.

ELİSA Yöntemi ile IL-17 Tayini

Th17 farklılaştırma ortamında kültüre edilen hücrelerin süpernantlarındaki IL-17 sitokin seviyesinin tayini, Human IL-17 ELISA KIT (Invitrogen) kullanımı ile gerçekleştirildi. Kitin içerisinde bulunan prosedür aynen uygulandıktan sonra, uygun dalga boyunda (450 nm) kolorimetrik ölçüm yapıldı. Çizilen standart eğrisine uygun olarak kültür süpernatantlardaki IL-17 sitokin seviyesi belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Gruplar arası sitokin seviyelerinin ikili karşılaştırılmaları Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirilmeler için SPSS (Releose 16- SPSS INC., 1989-1992) paket programı kullanıldı. Yapılan karşılaştırmalarda p değeri ≤ 0,05 bulunduğunda, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

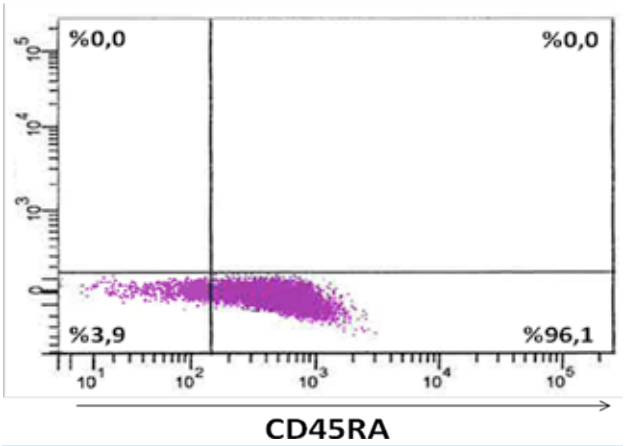
BULGULAR

CD45RA+ Naif T Hücre Saflığı

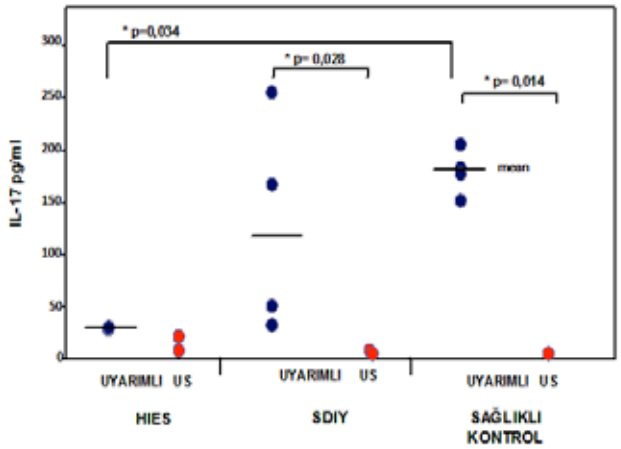
CD45RA+ naif T hücrelerin saflığı akım sitometri aleti kullanılarak tespit edildi. Akım sitometri analizi değerlendirildiğinde gruplarda bulunan hastalardan ortalama % 96,1 saflıkta CD45RA+ naif T hücre izole edildi (Şekil 1).

CD45RA+ T Hücre Kültürü IL-17 Sitokin Seviyeleri

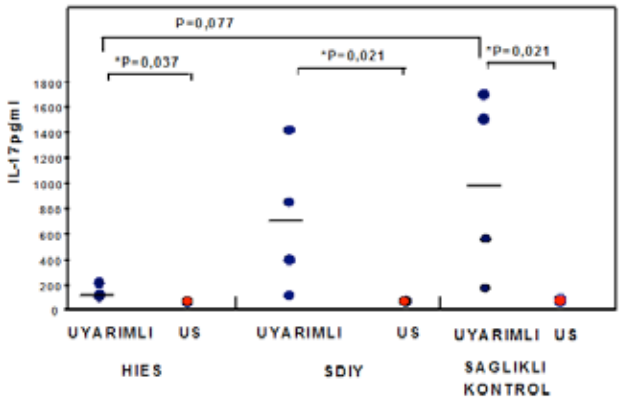
CD45RA+ naif T hücreler Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde, süpernatantlardaki IL-17 sitokin düzeyi Şekil 2'deki gibi belirlendi.



Şekil 1: CD+%RA+ naif T hücre saflığının akım sitometri analiz sonucu



Şekil 2: CD45RA+ naif T hücrelerin Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyaranlarla kültüre edildiğinde süpernatantlarında ölçülen IL-17 sitokin düzeyi



Şekil 3: PKMH Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde süpernatantlarında ölçülen IL-17 sitokin düzeyi

HIES grubunda CD45RA+ naif T hücreleri Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde uyarım öncesi [7,9402(0-15,88) pg/ml] ve sonrası [19,4315 (18,68-20,37) pg/ml] arasında IL-17 sitokin seviyelerinde anlamlı fark saptanmadı (p> 0,05). SDİY grubunda CD45RA+ naif T hücreleri Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan siokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde salınan IL-17 sitokin seviyesi uyarım sonrasında [117,02 (0-243,62) pg/ml] uyarım öncesine göre (0) anlamlı olarak artış göstermiştir (p=0,028). Sağlıklı kontrol grubunda CD45RA+ naif T hücreleri Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan siokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde salınan IL-17 sitokin seviyesi uyarım sonrasında [170,045 (0-194,07) pg/ml] uyarım öncesine göre (0) anlamlı olarak artış göstermiştir (p= 0,014).

Naif T hücreler Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde sağlıklı kontrol grubunda IL-17 sitokin seviyesi [170,045 (0-194,07) pg/ml] HIES grubuna göre [19,4315 (18,68-20,37) pg/ml] anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,034). Naif T hücreler Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde uyarım sonrası IL-17 sitokin seviyesi sağlıklı kontrol [170,045 (0-194,07) pg/ml] ve SDİY [117,02 (0-243,62) pg/ml] grupları arasında anlamlı olarak farklı bulunmamıştır (p> 0,05). Naif T hücreler Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde SDİY grubunda IL-17 sitokin seviyesi [117,02 (0-243,62) pg/ml] HIES grubuna göre [19,4315(18,68-20,37) pg/ml] anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,034).

PKMH Hücre Kültürü IL-17 Sitokin Seviyeleri

PKMH, Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyaranlar ile kültüre edildiğinde süpernatantlardaki IL-17 sitokin düzeyi Şekil 3'deki gibi belirlendi.

HIES grubunda PKMH, Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uyanlarla kültüre edildiğinde [74,0298 (30,46-142,27) pg/ml] IL-17 düzeyi uyarım yapılmayan gruba göre (0) anlamlı olarak artış göstermiştir (p=0,037). SDİY grubunda PKMH, kültür sonrasında [636,2541 (53,96-1361,87) pg/ml] IL-17 düzeyi uyarım yapılmayan gruba göre (0) anlamlı olarak artış göstermiştir (p=0,021). Sağlıklı kontrol grubunda PKMH, kültür sonrasında [934,7764 (118,75-1646,2) pg/ml] IL-17 düzeyi uyarım yapılmayan gruba göre [13,92 (7,53-29,9) pg/ml] anlamlı olarak artış göstermiştir (p=0,021).

PKMH kültüre edildiğinde, sağlıklı kontrol grubunda IL-17 sitokin seviyesi [934,7764 (118,75-1646,2) pg/ml] HIES grubuna göre [74,0298 (30,46-142,27) pg/ml] istatistiksel olarak anlamlılığa yakın yüksek bulunmuştur (p=0,077). PKMH kültüre edildiğinde, sağlıklı kontrol grubu [934,7764 (118,75-1646,2) pg/ml] ve SDİY grubu [636,2541 (53,96-1361,87) pg/ml] arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı IL-17 sitokin seviyesi saptanmamıştır (p> 0,05).

TARTIŞMA

Vücudun bağışıklık mekanizmasındaki bozukluğa bağlı hastalıklara immün yetersizlik hastalıkları denir. Ülkemizde akraba evliliklerinin sık olması nedeniyle kalıtsal immün yetmezlik hastalıklarının yüksek olduğu düşünülmektedir. Hiper IgE sendromu (HIES); tekrarlayan cilt abseleri, pnömoni, mukokutanöz mantar enfeksiyonları, egzema, eozinofili ve yüksek IgE düzeyi ile karakterize olan multisistemik bir hastalıktır (11,12). Çalışmamıza dahil olan HIES grubu hastalarda serum IgE seviyesi 2000 IU/ml'nin üzerindedir. Hastaların tamamında tekrarlayan cilt abseleri ve bronşektazi görülmekle birlikte, hastaların ikisinde lenfadenopati gözlenmiştir.

Th17 hücreleri otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamakta, bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı savunmada görev almaktadırlar. Burgler ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada anti-CD3 ve anti-CD28 antikorlarının uyarımı ile IL-1β, IL-6, IL-23, anti-IFNγ, TGFβ sitokinlerinin naif T hücrelerden Th17 hücre farklılaşmasında önemli olduğunu göstermişlerdir (6). Bu çalışmada, izole edilen PKMH ve CD45RA+ T hücreleri anti-CD2, anti-CD3, anti-CD28 uyaranları ve TGFβ, anti-IFNγ, IL-6, IL-1β, IL-23, IL-21 sitokinlerinin oluşturduğu Th17 farklılaştırma koşullarında kültüre edilmiştir.

Minegishi ve ark. (14) yapmış oldukları çalışmada HIES'li hastalardan elde edilen T hücrelerin IL-17 üreten Th17 hücrelerine farklılaşamadıklarını göstermişlerdir. Benzer bir sonuçla bu çalışmada, HIES'li hastalardan izole edilen naif T hücrelerin farklılaştırma kültürü sonrasında IL-17 sitokin salınımında istatistiksel olarak anlamlı artış olmadığı gözlemlenmiştir (14).

HIES ve sağlıklı kontrol gruplarında CD45RA+ naif T hücreler Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokin ve uya-

ranlar ile kültüre edildiğinde, uyarım sonrasında sağlıklı kontrol grubunda HIES grubuna göre anlamlı olarak yüksek IL-17 sitokin salınımı gözlemlenmiştir.

HIES ve sağlıklı kontrol gruplarından izole edilen PKMH Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan ortamda kültüre edildiğinde, kültür sonucu süpernatantlarda ölçülen IL-17 sitokin seviyesi sağlıklı kontrol grubunda HIES grubuna göre istatistiki anlamlılığa yakın olarak yüksek bulunmuştur.

Gözlenen bu sitokin profili HIES hastalarında IL-17 salgılayan Th17 hücrelerinin farklılaşmasında bozukluk olabileceğini düşündürmektedir. HIES'li hastalarda tespit edilen düşük IL-17 sitokin seviyesi bu sitokinin salınımından sorumlu olan Th17 hücrelerinin faklılaşma yolağında etkili bir gen mutasyonundan kaynaklanabilmektedir. Bu gen mutasyonunun belirlenebilmesi için Th17 hücre farklılaştırma kültürü sonucu hücreler alınarak bir sonraki basamakta gen ekspresyonunun incelenmesi amaçlanmıştır.

SDİY hastalığı havayollarında ve gastrointestinal bölgelerde tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla karakterize olmakla birlikte, buna otoimmün hastalıklarda eşlik edebilir. SDİY'li hastaların bazılarında antijen sunucu hücrelerin, monositlerin, NK hücrelerin, T ve B lenfositlerin sayı ve fonksiyonlarında farklılıklar olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu hastalarda T hücre aktivasyon ve poliferasyonunda azalma ve T hücreden sitokin salınımında bozukluk olabileceği de belirlenmiştir (23,24). SDİY'li hastalarda Th17 hücrelerinin farklılaşması ilk olarak çalışmamızda incelenmiştir. SDİY'li hastalardan izole edilen PKMH ve CD45RA+ T hücreler Th17 farklılaşma koşullarını sağlayan uyaranlar ve sitokinlerle kültüre edilmiştir.

Elde edilen verilere göre, SDİY ve sağlıklı kontrol gruplarında CD45RA+ naif T hücreler Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan ortamda kültüre edildiğinde her iki grupta da uyarım öncesine göre IL-17 sitokin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı yükselme gözlenmiştir. Buna ek olarak, her iki grup arasında süpernatantlarda ölçülen IL-17 sitokin seviyesi anlamlı olarak farklı bulunmamıştır.

PKMH Th17 farklılaştırma koşullarını oluşturan sitokinler varlığında kültüre edildiğinde, kültür sonucu süpernatantlarda ölçülen IL-17 sitokin seviyesi sağlıklı kontrol ve SDİY grupları arasında anlamlı olarak farklı değildir. Uyarım sonrası IL-17 sitokin seviyesi sağlıklı kontrol, SDİY ve HIES gruplarında anlamlı olarak artış göstermiştir.

Çalışmamızda elde etiğimiz veriler, HIES'li hastalarda T hücrelerin IL-17 sitokinini üretmede kusurlu olabileceklerini ancak SDİY'li hastalarda bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı savunmada görev alan Th17 hücrelerinin farklılaşma yolağında herhangi bir bozukluk olmadığını düşündürmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma "IgE Yüksekliği ve/veya Otoimmünite ile Seyreden İmmün Yetmezliklerde Th17 Hücre Farklılaşmasının Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezidir ve SAG-C-YLP-120309-0032 no ile Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BABKO) tarafından desteklenmiştir. Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 19.12.2008 tarih ve MAR-YÇ-2008-0216 sayılı raporu ile onaylanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis Ca. Th17 cells in the big picture of immunology. J Allergy Clin Immunol. 2007;120:247-54.

2. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. Microbial Immonol. 2007;51:1139-47.

3. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med. 2005;201:233-40.

4. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL17+ T helper cells. Cell. 2006;126:1121-33.

5. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. Nat Immunol. 2008;9:641-9.

6. Burgler S, Ouaked N, Bassin C, Basinski TM, Mantel PY, Siegmund K, Meyer N, Akdis CA, Schmidt-Weber CB. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. J Allergy Clin Immunol. 2009;123:588-95.

7. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. Nature. 2008; 452:773-6.

8. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. Nat Immunol. 2008;9:650-7.

9. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. 2006;441:235-8. Epub 2006

10. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin Exp Immunol. 2007;148:32-46.

11. Freeman AF, Holland SM. The hyper-IgE syndromes. Immunol Allergy Clin North Am. 2008;28:277-91.

12. Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, Greenberg F, Hill SC, Malech HL, Miller JA, O'Connell AC, Puck JM. Hyper-IgE syndrome with recurrent infections—an autosomal dominant multisystem disorder. N Engl J Med. 1999;340:692-702.

13. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson VL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM,Malech HL, Gallin JI, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schäffer AA, Puck JM, Grimbacher B. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. N Engl J Med. 2007;357:1608-19.

14. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. Nature. 2007;448:1058-62.

15. Grimbacher B, Schäffer AA, Holland SM, Davis J, Gallin JI, Malech HL, Atkinson TP, Belohradsky BH, Buckley RH, Cossu F, Español T, Garty BZ, Matamoros N, Myers LA,Nelson RP, Ochs HD, Renner ED, Wellinghausen N, Puck JM. Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. Am J Hum Genet. 1999;65:735-44.

16. Renner ED, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Rack AL, Reichenbach J, Carey JC, Zhu Q, Jansson AF, Barboza J, Schimke LF, Leppert MF, Getz MM, Seger RA, Hill HR,Belohradsky BH, Torgerson TR, Ochs HD. Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:181-7.

17. Renner ED, Puck JM, Holland SM, Schmitt M, Weiss M, Frosch M, Bergmann M, Davis J, Belohradsky BH, Grimbacher B. Autosomal recessive hyperimmunoglobulin E syndrome: a distinct disease entity. J Pediatr. 2004;144:93-9.

18. Woellner C, Schäffer AA, Puck JM, Renner ED, Knebel C, Holland SM, Plebani A, Grimbacher B. The hyper IgE syndrome and mutations in TYK2. Immunity. 2007;26:535.

19. Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, Sassi A, Woellner C, Lopez-Herrera G, Chen A, Kim HS, Lloret MG, Schulze I, Ehl S, Thiel J, Pfeifer D, Veelken H, Niehues T, Siepermann K, Weinspach S, Reisli I, Keles S, Genel F, Kutukculer N, Camcioğlu Y, Somer A, Karakoc-Aydiner E, Barlan I, Gennery A, Metin A, Degerliyurt A, Pietrogrande MC, Yeganeh M, Baz Z, Al-Tamemi S, Klein C, Puck JM, Holland SM, McCabe ER, Grimbacher B, Chatila TA. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. J Allergy Clin Immunol. 2009;124:1289-302.

20. Ochs HD, Stiehm ER, Winkelstein JA. Antibody deficiency. In: Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein JA (eds). Immunologic disorders in infants and childrens. Antibody deficiency. 5th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2004. p.373-80.

21. Glocker E, Ehl S, Grimbacher B. Common variable immunodeficiency in children. Curr Opin Pediatr. 2007;19:685-92.

22. Bayry J, Hermine O, Webster DA, Lévy Y, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency: the immune system in chaos. Trends Mol Med. 2005;11:370-6.

23. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. Lancet. 2008;372:489-502.

24. Chen X, Jensen PE. MHC class II antigen presentation and immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes. Exp Mol Pathol. 2008;85:40-4.

Reproduced with permission of the copyright owner. Further reproduction prohibited without permission.