TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ATOPİK DERMATİTLİ ÇOCUKLARDA T REGULATUVAR HÜCRE DÜZEYİ

Dr. Ömer ÇİFTÇİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aydan İKİNCİOĞULLARI

ANKARA
2010

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ATOPİK DERMATİTLİ ÇOCUKLARDA T REGULATUVAR HÜCRE DÜZEYİ

Dr. Ömer ÇİFTÇİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aydan İKİNCİOĞULLARI

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından 2009 yılında 09B3330013 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA

2010

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER iii
KISALTMALAR v
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
TABLOLAR DİZİNİ viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. ATOPİ VE ATOPİK BİREY 3
2.2. ATOPİK DERMATİT 3
2.2.1. Patofizyoloji 4
2.2.2. Klinik ve Tanı 7
2.2.3. Tedavi 11
2.2.4. T Regulatuvar hücreler (Treg) 13
2.2.5. Doğal Treg hücreler (nTreg) 14
2.2.6. Adaptif Treg hücreler 20
3. MATERYAL VE METOD 23
3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN SEÇİMİ 23
3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI 24
3.3. METODLAR 24
3.4. ARAŞTIRMANIN KAYNAĞI 25
3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 25
4. BULGULAR 27
4.1. CD4+CD25^{high}+FOXP3+ TREG HÜCRE YÜZDELERİ (%): 30
4.2. CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg Hücrelerinin Ortalama Floresan Yoğunluğu (MFI) 33
5. TARTIŞMA 35
ÖZET 40

SUMMARY 41
KAYNAKLAR 42

KISALTMALAR

AD	**:**	Atopik Dermatit
AIRE	**:**	Autoimmune regulatuar gen
ASH	**:**	Antijen sunan hücre
Treg	**:**	T regulatuvar hücre
aTreg	**:**	Adaptif T Regulatuvar hücreler
BHR	**:**	Bronş hiperreaktivitesi
CTLA	**:**	Cytotoxic T-lymphocyte antigen- sitotoksik T lenfosit antijen
DH	**:**	Dendritik hücre
FGF	**:**	Fibroblast growth factor- fibroblast büyüme faktörü
FLG	**:**	Flaggrin gen
FOXP3	**:**	Forkhead transkription factor 3
MFI	**:**	Mean Fluorescense intensity (ortalama floresan yoğunluğu)
GITR	**:**	Glucocorticoid induced TNF receptor- Glukokortikoidle indüklenen TNF reseptörü
GVHD	**:**	Graft Versus Host disease
ICOS	**:**	Inducible co-stimulator- indüklenebilir ko-stimulatör
IDEC	**:**	Infalamatuary dendritic epidermal cell - yangısal dentritik epidermal hücreler
IDO	**:**	Indolamin 2,3 dioksijenaz
IFN	**:**	İnterferon
İL	**:**	İnterlökin
IPEX	**:**	İmmün disregulasyon, poliendokrinopati, enteropati, X geçişli
LCT	**:**	Lökotrien

MHC : Major histokompatibilite kompleksi

MMP : Matriks metalloproteinazları

nTreg : Naturel-doğal- Treg hücreler

RAST : Radyoadsorbant test

SCORAD : Scoring of Atopik Dermatit- Atopik dermatit skorlaması

TNF : Tumor Necrosis Factor

TGFβ : Transforming growth factor β

TSLP : Thymic stromal lymphopoietin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. AD'de Langerhans hücreleri ve T hücreler arasındaki etkileşim.....6

Şekil 2.2. Atopik dermatitte Th_2/Th_1 dengesi.....6

Şekil 2.3. İnfant, çocuk ve adolesan dönemde AD tutulum bölgeleri.....8

Şekil 2.4. Scorad'a göre vücut yüzey alanı yüzdeleri 10

Şekil 2.5. CTLA-4 ve IDO etkileşimi 16

Şekil 4.1. Atopik dermatitli ve sağlıklı grubun $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücre yüzdeleri (%) grafiği 32

Şekil 4.2. AD'li ve Kontrol grubunun $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücre ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerleri grafiği 34

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Hanifin ve Rajka kriterleri 9

Tablo 4.1. Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet özellikleri 27

Tablo 4.2. Atopik dermatitli hastaların yaş, cinsiyet ve klinik özellikleri 28

Tablo 4.3. $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ T hücre düzeyleri (% ve MFI) toplu sonuçları.....30

Tablo 4.4. AD ve Kontrol gruplarının $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücre düzeyleri (%) 31

Tablo 4.5. $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücrelerinin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) 33

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Atopik dermatit (AD) şiddetli kaşıntı ile karekterize, kronik, tekrarlayan ataklarla seyreden enflamatuar bir deri hastalığıdır. Primer olarak çocukluk dönemi hastalığı olup, olguların %60'ında ilk bir yaşta, %85'inde ise 5 yaşından önce ortaya çıkmaktadır. Endüstrileşmiş ülkelerde nüfüsun %8-12'sini etkilemektedir ve son 30 yıldır astımda olduğu gibi atopik dermatit görülme sıklığında da artış olmaktadır.

AD patogenezinde bugüne kadar çeşitli faktörler suçlanmıştır. Önceleri kaşıntının hastalığa sıklıkla eşlik ediyor olması nedeniyle histaminin rolü üzerinde durulmuş ancak antihistaminik tedaviye cevabın iyi olmaması nedeniyle daha sonra bu teoriden uzaklaşılmıştır. Başka bir teori ise allerjenle karşılaşan mast hücrelerinden salınan, sitokin ve kemotaktik faktörlerin açığa çıkmasına aracılık eden İgE'dir (1,2). Ancak tüm hastalarda İgE'nin yüksek olmaması nedeniyle daha sonra bu teoriden de uzaklaşılmıştır. Son yıllarda hastalığın patogenezinde hücresel immün yanıtın, özellikle de T regulatuvar hücrelerin kilit rol aldığı düşünülmektedir.

Bilindiği üzere T lenfositler Th_1, Th_2, Th_{17}, Treg gibi farklı fonksiyonlar yürütmekte olan alt gruplara ayrılmaktadır. Treg hücreler; TGF-β üreten Th3 (adaptif Treg), İL-10 üzerinden etki gösteren Tr1 (adaptif Treg) ve regulasyonda daha ön planda olan $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg (doğal Treg) hücreler olmak üzere 3 alt gruba ayrılır. Treg hücreler başlıca self tolerans, otoimmünitenin önlenmesi ve regulasyonda rol alırlar (3). Treg hücrelerin alt grupları arasındaki etkileşim ve regülasyon işleminin nasıl gerçekleştiği henüz tam olarak açıklanamamıştır. $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücrelerin regulasyon işleminde Th3 ve Tr1 (Adaptif Treg, effektör T hücreler) Treg'lerden farklı olarak, İL-10 ve TGF-β gibi sitokinlerin inhibitör etkilerinden ayrı olarak hücre-hücre temasına dayalı fonksiyon gördüğü düşünülmektedir.

$CD4+CD25^{high}+$ Treg'ler transkripsiyonel regulatuvar bir protein olan FOXP3 eksprese ederler. Bu protein Treg hücrelerin gelişimi ve regulasyon işlevleri için ana düzenleyici protein olarak görev yapmaktadır (4), eksikliğinde veya

yokluğunda X kromozumuyla geçiş gösteren immün disregülasyon, poliendokrinopati ve enteropati birlikteliği olarak tanımlanan IPEX sendromu gelişmektedir (5).

Bu çalışmadaki amacmız:

Çocuklarda sık görülen bir hastalık olan atopik dermatitte, hastalığın aktif olduğu tedavi öncesi dönemde periferik kan doğal Treg ($CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg) hücre düzeylerini ölçerek, bu hücre düzeylerinin atopik dermatit gelişim ve patogenezinde katkısı bulunup bulunmadığını değerlendirmektir.

Ayrıca $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücre düzeyleri ile hastalardaki klinik tablo ve laboratuar bulguları arasında ilişki olup olmadığı da denetlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ATOPİ VE ATOPİK BİREY

"Atopi" terimi ilk olarak Coca ve Cooke tarafından 1920 yılında herediter geçiş gösteren bir grup hastalığı (astım, rinit, egzema) tanımlamak için kullanılmıştır (6). Daha sonraları ise, herediter geçiş özelliği, çevresel allerjenlerle karşılaşmada İgE üretiminde artış, İgE kaplı allerjenle – hücre temasında sorun olması gibi durumların birlikte olması sonucu ortaya çıkan tablo olarak tanımlanmıştır (7). Günümüze ise İgE tipi antikor sentezine yatkınlık olarak tanımlanmaktadır.

Önceleri atopinin otozomal dominant kalıtıldığı düşünülmüş (8), daha sonraları ise " multifaktöryel teori " üzerinde durulmuş ve antijenik uyarıya karşı gelişen aşırı İgE yanıtı üzerinde yoğunlaşılmıştır (8). Buna yönelik olarakta İgE üretiminin düzenleyici genleri incelenmiş, son olarak doku grupları suçlanmıştır. Ancak atopi sadece genetik temelli değildir. Çevresel etkenlerinde atopi gelişiminde önemli olduğu gösterilmiştir. Bunlar içerisinde hava partikülleri içerisindeki mikropartiküler allerjenler, akarlar, polenler, hayvansal proteinler ve havayla iletilen diğer allerjenler bulunmaktadır (9).

Atopik bireyler astım, atopik dermatit ve allerjik rinokonjunktivit başta olmak üzere birçok allerjik hastalık gelişimi açısından daha risklidir. Bu hastalıkların birine sahip olan bireylerde sıklıkla ek bir allerjik hastalık varlığı da görülebilmektedir.

2.2. ATOPİK DERMATİT

Atopik dermatit yoğun kaşıntının hakim olduğu, ataklarla seyreden, kronik bir cilt hastalığıdır. Çocuklarda görülen dermatit etkenleri içerisinde sıklık açısından 1. sırada gelir. Ülkelere göre değişmekle birlikte, tüm dünyadaki çocukların %10–20'sini, yetişkinlerin ise %10'nu etkilemektedir (10). İngilterede J. Kay ve

arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada erkek çocuklarında %20, kız çocuklarında ise %19 sıklığında saptanmıştır (11). Türkiye'deki sıklığı ise %0.5 ile %1 olup, çocuklardaki prevalansı %2.2 ile %6.3 arasında değişmektedir (12). AD insidansı tüm dünyada giderek artmakta olup, son 40-50 yıl boyunca her on yılda bir 1-2 kat artış göstermiştir ve bu artış özellikle sanayi ülkelerinin küçük kentlerinde yaşayan, yüksek sosyoekonomik sınıfa ait bireylerde gözlenmiştir (13).

2.2.1. Patofizyoloji

Atopik dermatit gen-gen ve gen-çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu oluşan kompleks bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinde çeşitli etmenler üzerinde durulmaktadır.

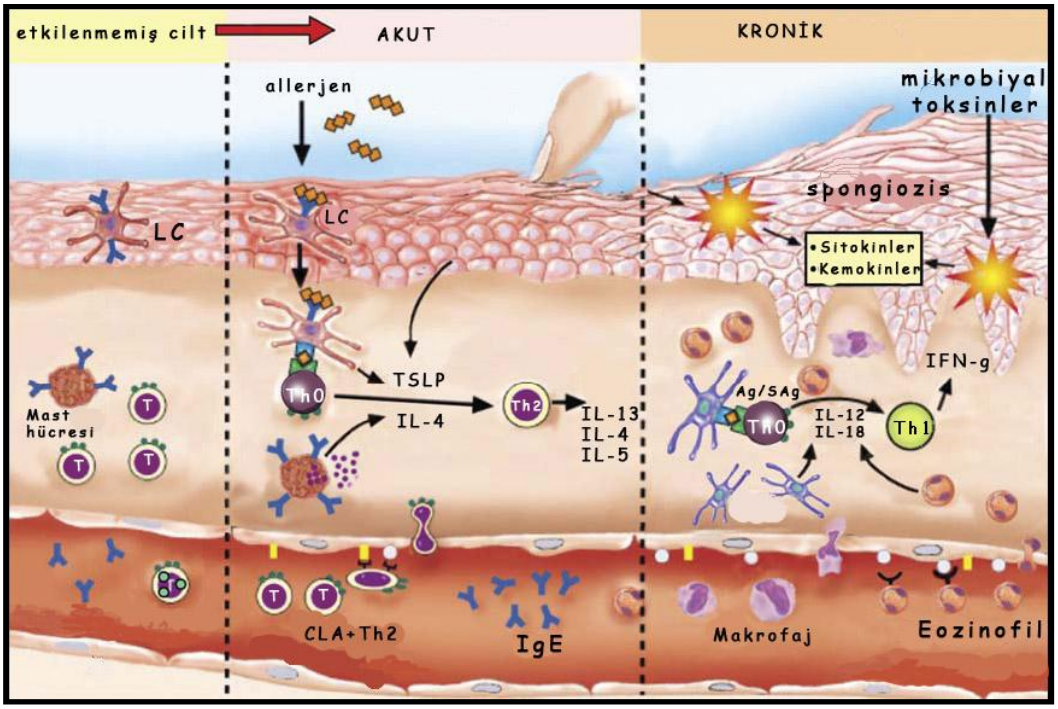
Atopik dermatitte genetik faktörlerin rolü önemlidir ve yirmiden fazla genin sorumlu olduğu düşünülmektedir (14). 3q21, 1q21, 16q, 17q25, 20p ve 3p26 kromozom lokusları atopik dermatit ile birlikteliği gösterilmiş kromozomlardır (15). AD başlangıçta epidermal fonksiyon bozukluğuna neden olan genetik bir faktörün zemininde gelişebilir ve İgE aracılı duyarlanma tabloya daha sonra eklenebilir. Nihayetinde derinin fiziksel, kimyasal maddelere karşı korunması ve AD gelişmemesi için ön şart sağlam epidermal yapının varlığıdır.

Cilt bariyerini bozan bir etken de, korneal tabakanın uygun olmayan pH değerlerine bağlı olarak oluşan seramid değişiklikleri ve bunun sonucunda lameller cisimciklerin yapısının bozulmasıdır.

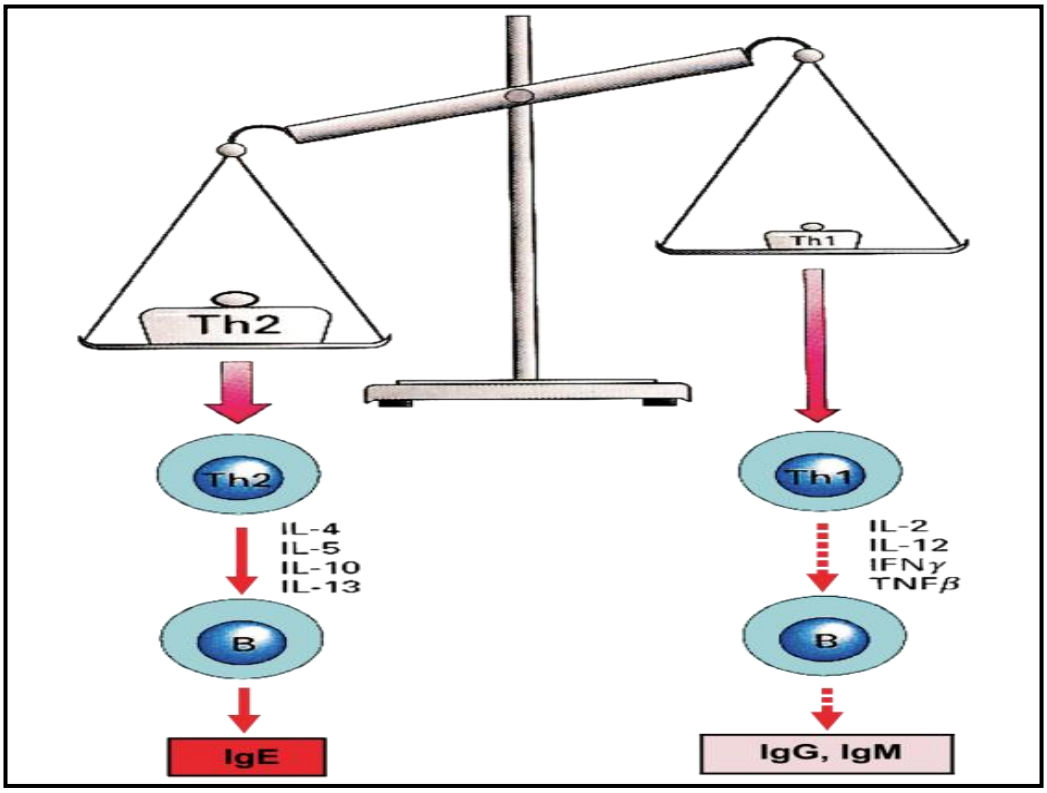
Flaggrin, epidermal farklılaşma için anahtar bir proteindir. Epidermal iskeletin oluşumuna ve korneumun su tutma kapasitesine katkıda bulunmaktadır (16). Genetik çalışmalar sonucunda 1q21.3 kromozomunda kodlanan flaggrin gen (FLG) mutasyonunun AD hastalarında önemli bir rolü olduğu saptanmıştır (16). Altta yatan enflamasyon epidermal bariyer fonksiyonunda rol alan FLG ekspresyonunu değiştirebilir ve çevresel allerjenlerin deriden geçişinin artmasına bunun sonucunda duyarlanma, yangı ve kaşıntı oluşmasına neden olabilir (17).

İgE normal şartlarda serumda çok düşük oranlarda bulunur. Ancak başta allerjik hastalıklarda olmak üzere, parazitik, viral, onkolojik hastalıklar (Hodgkin hastalığı) ve T lenfosit bozukluğu olan immün yetmezlik tablolarında ciddi derecelerde artışlar saptanabilmektedir. İgE, B lenfositlerin farklılaşmasıyla oluşan plazma hücresi tarafından sentezlenir. Sentez aşamasında T, B lenfositler, mast hücreleri, bazofil, birçok yüzey molekülü ve İL-4, İL-13 başta olmak üzere birçok sitokin etkileşim halinde görev almaktadır. Bazı AD'li hastalarda %75-80'e varan oranlarda İgE yüksekliği olabilmekteyken (18), ancak son çalışmalarda erken başlangıçlı AD'nin genellikle saptanabilir bir İgE duyarlaşma bulgusu olmadan geliştiği görülmektedir. İgE duyarlaşması erken başlangıçlı AD'li hastalarda lezyonlar ortaya çıktıktan birkaç ay sonra oluşabilmekte hatta bazı çocuklarda duyarlaşmanın hiç bir zaman oluşmadığı bilinmektedir (19).

Atopik dermatitte yangısal dendritik hücreler İgE taşırlar ve yüksek afiniteli reseptörler (FcERI) eksprese ederler. Bu hücreler allerjenleri alıp Th_1 ve Th_2 hücrelerine ve olasılıkla da Treg hücrelere sunarlar (20). AD'in akut safhasında allerjenler dendritik hücreler tarafından tutulduğunda bilinmeyen bir mekanizma ile Th_2 kutuplaşmasına katkıda bulunur. Ancak kronik safhada yangısal dendritik epidermal hücreler devreye girerek (IDEC) Th_o hücrelerin İL-12 ve İL-18 üretmesine ve böylece Th_1 hücre ve sitokin profilinin hakim olmasına neden olmaktadır (21). Bu iletişim ve etkileşim Şekil 2.1.'de, Th_2 tarafına kaymış olan sitokin ve immünglonülinler ise Şekil 2.2.'de görülmektedir.



Şekil 2.1. AD'de Langerhans hücreleri ve T hücreler arasındaki etkileşim



Şekil 2.2. Atopik dermatitte Th_2/Th_1 dengesi

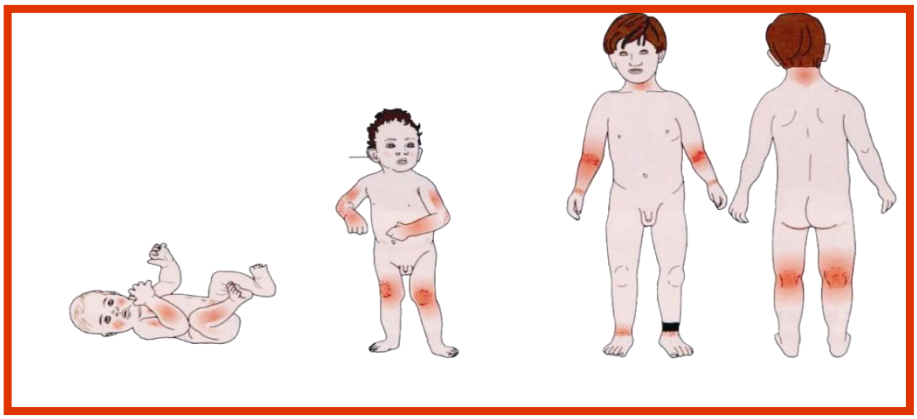
Günümüzde AD patogenezinde üzerinde en çok durulan nokta hücresel immün sistem ve bu sistemin en önemli üyelerinden biri olan Treg hücrelerdir. Ancak AD'te Treg hücrelerle ilgili yapılan çalışmalar çok azdır ve sonuçlar tartışmalıdır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, Treg hücre kompartmanındaki fonksiyonel karışıklık çözülememiş ve AD patogenezinde üstlendiği rol tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.2.2. Klinik ve Tanı

Atopik dermatit infantil, çocukluk ve adolesan-yetişkin olmak üzere 3 farklı dönemde görülebilir.

İnfantil atopik dermatitte en sık tutulan bölge yüzdür. Burun ve ağız çevresinin korunduğu yüzde, özellikle yanaklar olmak üzere alın ve çenede, sınırları belirgin olmayan eritematöz lezyonlar gözlenir (22). Yanaklar dışında saçlı deri ve boyunda, emekleme başladıktan sonra ise ekstremitelerin ekstensör yüzleri ve gövdede lezyonlar gelişebilir (23). AD'li infantların çoğunda cilt belirtileri iki yaşına kadar gerilerken, bazılarında çocukluk dönemine dek devam edebilmektedir (24).

Çocukluk dönemi AD'i subakut lezyonlarla karakterizedir. Lezyonlarda eksudasyon daha azdır. Bu dönemde papüller ve infiltre likenifiye plaklar dikkati çeker. Antekubital ve popliteal fossa, bilekler ve boyun gibi fleksural bölgelerin tutulumu tipiktir. Kaşıntı özellikle geceleri ya da egzersiz sonrası artmaktadır ve hastayı uykusundan uyandıracak kadar şiddetli olabilmektedir. İnfant, çocuk ve adolesan dönemde sıklıkla etkilenen bölgeler Şekil 2.3'te sunulmaktadır.



Şekil 2.3. İnfant, çocuk ve adolesan dönemde AD tutulum bölgeleri

Adolesan ve yetişkinlerde döküntü daha lokalize ve kronik karakterdedir. 12 yaşından itibaren fleksüral bölge lezyonları azalırken el ve üst göz kapağı lezyonları ön plana çıkar (25). Bu dönemde kaşıntılı likenifiye papül ve plaklar dikkati çeker. El ve ayaklarda, palmoplantar, dorsal bölgenin yanı ve bileklerin tutulumu sıktır.

Çocukluk ve adolesan atopik dermatiti, remisyon ve şiddetlenmelerle erişkin döneme kadar sürebilmektedir.

AD tanısında kullanılan özgün ve rutin bir laboratuvar yönteminin olmaması nedeniyle tanı, öykü ve klinik özelliklere dayanılarak konur. Bugün atopik dermatit tanısı için tüm dünyada kullanılan tanı kriterleri ilk olarak 1980 yılında Hanifin ve Rajka tarafından belirlenmiştir (26). "Hanifin-Rajka atopik dermatit tanı kriterleri" olarak adlandırılan bu kriterler major ve minör bulgulardan oluşmaktadır. Bu kriterler Tablo 2.1.'de görülmektedir. Tanıyı desteklemek ve /veya allerjeni tespit etmek için laboratuvar testlerinden yardım alınabilir. Bu amaçla sık olarak kullanılan testler; total İgE düzeyi ölçümü, phadiotop(solunumsal allerjen paneli), spesifik İgE düzeyi (genellikle f(x), yani miks gıda paneli), cilt testi (prick)'dir.

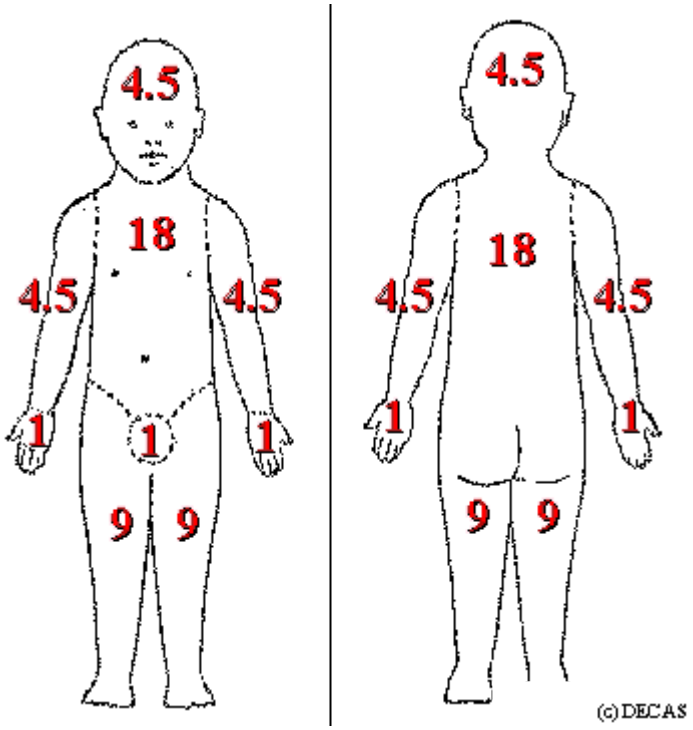
Bir görüşe göre AD tanısı için, kaşıntıya ek olarak en az üç major kriter olmalıdır ancak bu görüş yaygınlığını yitirmiştir. Başka bir görüşe göre ise üç veya daha fazla sayıda minör kriter varlığı, bir major kriter yerine geçebilmektedir. Bu durumda, dört major kriterden üçüne ek olarak üç minör kriterin olması tanı için yeterli kabul edilmiştir (27).

Tablo 2.1. Hanifin ve Rajka kriterleri

Majör	*Minör*
× Kaşıntı × Kronik ve tekrarlayan dermatit × Çocukta veya ailesinde atopi varlığı × Tipik morfoloji ve yerleşim	× Kserozis × Cilt enfeksiyonlarına yatkınlık × El ve ayaklarda nonspesifik dermatit × Pitriasis alba × Beyaz dermografizm × İktiyozis, palmar hiperlinearite × Keratozis pilaris × Yüksek IgE × Pozitif deri testi × Anterior subkapsüler katarakt × Meme başı dermatiti × Erken başlangıç × Terlemeyle kaşıntı × Besin hipersensivitesi

Atopik dermatit tanısı konulan hastalarda, hastalığın klinik şiddetini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan skorlama sistemi SCORAD (scoring of atopic dermatitis)'tır. Bu puanlama A) Lezyonların dağılım yüzdesi, B) Lezyonların yoğunluğu ve C) Subjektif semptomlar olmak üzere 3 parametre üzerinden hesaplanır.

Dağılım yüzdesini (A parametresi) belirlemek için lezyonların bulunduğu vücut bölgelerinin yüzey ölçümleri hesaplanır. SCORAD için vücut yüzey alanlarının yüzdelik oranları Şekil 2.4'te verilmektedir.



Şekil 2.4. SCORAD'a göre vücut yüzey alanı yüzdeleri

Lezyonların yoğunluğu (B parametresi) ise şöyle hesaplanır: Eritem, ödem/ papül, sulu veya kabuklu lezyonlar, ekskoriasyon, likenifikasyon ve cilt kuruluğu parametrelerinin her birine; lezyon olmaması:0, hafif olması: 1, orta derecede olması: 2 ve şiddetli olması ise 3 puan verilir, ardından bu puanlar toplanır.

Son olarak C parametresi yani subjektif semptom puanı hesaplanır. Bu puanlamada ise son 3 gün içindeki hem uyku sorunu hem de kaşıntı hasta ve aile tarafından 0 ile 10 arasında puanlandırılır ve toplanır.

Bu değerler saptandıktan sonra SCORAD formülize edilerek hesaplanır *(SCORAD: A/5 + 7B/2 + C).* SCORAD değerinin; < 25 olması hafif, 25-50 arasında olması orta ve > 50 olması ise şiddetli hastalığı gösterir.

Birçok hastalık AD deri lezyonlarını taklit edebilmekte ve bu hastalıkların ayırıcı tanıda düşünülmesi gerekmektedir (28).

Bu hastalık grubu içinde; k*onjenital hastalıklar* (Netherton sendromu, familyal keratozis pilaris), k*ronik dermatozlar* (seboreik dermatit, kontakt dermatitler, nummuler ekzema, liken simpleks kronikus), e*nfeksiyon ve enfestasyonlar* (scabies, HIV'e eşlik eden dermatozlar, dermatofitozlar), m*alignensiler* (kutanöz T hücreli lenfoma, Letterer-Siwe hastalığı), i*mmün yetmezlikler* (Wiskott-Aldrich sendromu, şiddetli kombine immün yetmezlik, hiper IgE sendromu), m*etabolik hastalıklar* (Çinko, piridoksin (vitamin B6) ve niasin eksikliği), ve i*mmünolojik hastalıklar* (dermatitis herpetiformis, pemfigus folyaseus, dermatomiyozit) yer almaktadır.

2.2.3. Tedavi

AD tedavisinde ilk adım, geniş bir anamneze dayanmaktadır. Hastalığın başlangıç yaşı, aile öyküsü, tetikleyen faktörler, enfeksiyonlar, banyo ve nemlendirme hataları, irritasyonlara maruz kalma, ateş, terleme, emosyonel stres, allerjiler, geçmişte kullanılan tedaviler dikkatle incelenmelidir. Tedavide ilk planda topikal tedavi, oral antihistaminik kullanılması ve/veya bireysel uyarıcı faktörlerden sakınılması genellikle yeterli olabilmektedir.

AD'de kullanılan özgün tedavi yaklaşımları dört grupta sınıflandırılmaktadır (29).

1- Topikal tedaviler

2- Sistemik tedaviler

3- Fototerapi

4- İmmünoterapi

1 - Topikal Tedaviler

Bu grupta nemlendirici, lubrikan ve su tutucu preparatlar başta gelmektedir. Atopik dermatitte birinci seçenek yağlı topikal nemlendiricilerin kullanılmasıdır. Nemlendiricilerin kullanılması, stratum korneum bariyerinin korunması ve tamirine yardımcı olmaktadır.

Topikal kortikosteroidler, antienflamatuvar etkileriyle egzema tedavisinde en değerli ve önemli ilaç olma özelliğini korumaktadır. AD'in alevlenme dönemlerinde kortikosteroid tedavisi büyük önem taşımakta ve özellikle ilk birkaç gün, banyo sonrası, günde iki kez kullanılması önerilmektedir (30).

Topikal tedavide nadir de olsa katran preparatları, kromolin sodyum, doksepin hidroklorid, takrolimus ve ascomycin deriveleri de kullanılabilmektedir.

2 - Sistemik Tedaviler

Klasik antihistaminikler sedatif etkileriyle AD'li hastada pruritus- ekzema-pruritus döngüsünü kırabilmektedir (31). Bu grup ilaçlar içerisinde yaygın olarak kullanılan yeni kuşak bir non-sedatif H1 reseptör antagonisti olan setrizinin, geç faz allerjik reaksiyonlarda eozinofil migrasyonunu inhibe ederek antienflamatuvar etkiye de sahip olduğu belirlenmiştir.

Antibakteriyal ve antifungal ajanlar da AD tedavisinde kullanılabilmektedir. Deri kültürlerinde stafilokok üretilen orta ve ciddi AD'li hastalarla yapılan bir çalışmada, stafilokokal penisilin direnci nedeniyle günde iki kez verilen sefuroksim aksetilin koloni sayısında azalma oluşturduğu ve tedavide etkili olduğu saptanmıştır (32).

Yine kromolin Sodyum, besin allerjilerinde oral yolla uygulananabilmekte, besinlere karşı RAST pozitifliği saptanan çocukluk çağı AD'inde iyi sonuçlar verebilmektedir (32).

Mast hücrelerini stabilize ederek oluşturduğu antiallerjik etkiyle, atak sıklığı ve sayısını azaltan (33), güvenli ve etkili bir ilaç olması nedeniyle çocukluk çağı AD'inde erken dönemde kullanılması önerilen bir diğer ilaç ketotifendir.

Atopik dermatit sistemik tedavisinde bu ilaçların dışında nadir de olsa siklosporin A, interferon, methotreksat, mycophenolic asit, lökotrien inhibitörleri de kullanılabilmektedir.

3-Fototerapi

Akut AD lezyonlarında yüksek doz (80-130 joule/cm²) uzun dalga boylu (340-400 nm) ultraviole ışınlamanın (UVA1) etkinlik açısından glukokortikoid tedavisine alternatif bir seçenek olduğu ileri sürülmektedir (34). Ultraviole ışınların Th_2 tip sitokin yapımını düzenlediği ve AD'li hastaların serumunda eozinofil sayısı ve eozinofilik katyonik protein düzeyini belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir (35). Ancak fototerapi ciddi, yoğun, kortikosteroidlere yanıtsız ya da diğer tedavileri tolere edemeyen AD'li hastalarda önerilmektedir.

4-İmmünoterapi

Son yıllarda allerjen-antikor kompleksi ile yapılan immünoterapinin klasik immünoterapiden daha avantajlı olduğu ileri sürülmektedir. Her hasta için özgün otolog antikor hazırlanmasını gerektirmesi yöntemin dezavantajını oluşturmakla birlikte umut verici bir gelişme olarak kabul edilmektedir (35).

2.2.4. T Regulatuvar hücreler (Treg)

İmmün sistem kendi homeostatik dengesini kurmak ve korumak için çeşitli yollar geliştirmiştir. Bu denge içinde self antijenlere (konağın kendine ait) tolerans

gelişirken, yabancı antijenlere karşı gelişen reaksiyonun aşırıya kaçması engellenmeye çalışılır. İç ya da dış antijenlere / allerjenlere karşı oluşan immün tolerans; klonal delesyon, anerji ve regulatuvar T hücrelerinin (Treg) içinde bulunduğu birkaç mekanizma tarafından gerçekleştirilir. Otoreaktif, T ve B hücrelerin delesyonu self antijenlerin pek çoğuna karşı toleransın gelişmesine neden olur. Timus bu dengenin sağlanmasında anahtar role sahiptir.

1970'li yılların başında immun yanıtı baskılayan bir grup T hücresi tanımlanmıştır(36). Bu hücreler yıllarca supressor T hücresi olarak adlandırılmasına karşın, bu hücreleri tanımlayan klonların bulunamaması, supresyona neden olan mediatörlerin ortaya konulamaması nedeniyle 1980'li yıllarda önemini yitirmiştir. Ancak daha sonra 1995 yılında Sakaguchi ve arkadaşları, farelerde toleransta rol oynayan, otoimmun hastalıkları baskılayan, İL-2 reseptörünün α subunitini (CD25) yapısal olarak üzerinde taşıyan CD4+ hücreleri tanımladılar (37). Bu hücrelerin insandaki eşdeğerleri Regulatuvar T(Treg) hücreleri olarak adlandırılmıştır. Treg hücrelerinin izole edilmesinde ve tanımlanmasında kullanılan teknolojideki gelişmeler sayesinde, bu hücrelerle ilgili çalışmalar son birkaç yıl içinde oldukça önemli bir ölçüde ilerlemiştir. Bu çalışmaların ışığında Treg hücrelerinin birkaç alt grubu tanımlanmıştır. Bunlar arasında; merkezi olarak timusta gelişen, vücudun oto / kendi – antijenlerine özel T hücreleri ($CD4+CD25^{high}$+FOXP3+ Treg hücreleri) (Doğal-Naturel Treg) ile periferde eksojen antijen / allerjenlere maruz kalmakla periferde gelişen T hücreleri (Adaptif Treg hücreleri) yer alır. Hem doğal hem de adaptif Treg hücrelerinin allerjenlere karşı gelişen immun yanıtlarda ve allerjik hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Ancak Treg hücrelerinin doğal ve adaptif alt grupları arasındaki ilişki henüz tam olarak netlik kazanmamıştır.

2.2.5 Doğal Treg hücreler (nTreg)

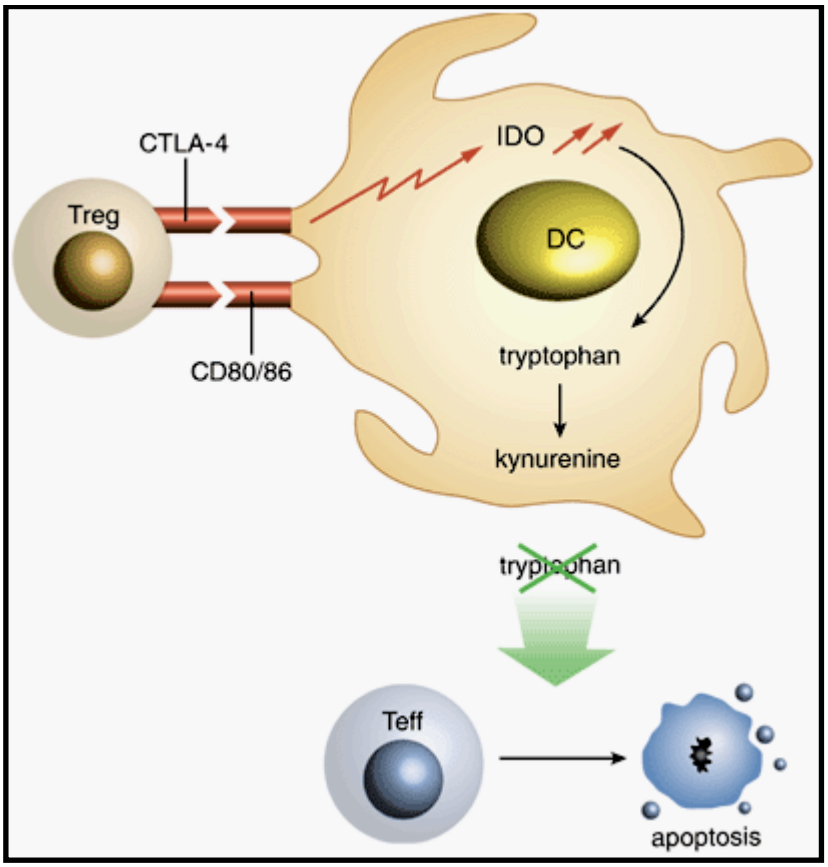
Doğal Treg hücreleri timusta gelişir ve periferdeki CD4+ T hücrelerinin %2-10'unu oluştururlar (38). Yapısal olarak CD25 (İL-2 reseptör α subuniti), sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA-4), glukokortikoidle indüklenen tümör nekrozis faktör

(TNF) reseptörü (glucocorticoid induced TNF receptor, GITR) ve bir transkripsiyon faktörü olan forkhead/winged helix transkripsiyon faktörü 3 (FOXP3) eksprese ederler (39). CD25 molekül ekspresyonu, geçmişte nTreg hücreleri tanımlayan bir belirteç olarak kullanılmasına karşın, aktive Treg (adaptif Treg) hücreleri tarafından da eksprese edildiği için günümüzde nTreg'lerin tanımlaması için değerini yitirmiştir. FOXP3 ise büyük oranda αβ T hücre reseptörüne (THR) sınırlı olup CD25'ten bağımsız eksprese olur ve etki gösterir (40). Doğal Treg hücreler timusta, büyük olasılıkla reseptör-ligand etkileşimi sonucu gelişmekte ve maturasyon aşamasının CD3+CD8+CD4^{high} fazında meydana gelmektedir (41,42).

Doğal Treg hücrelerin repertuvarı ve özgüllüğü non-regulatuvar T hücrelerine benzemektedir. Gelişim sırasında Treg'lerin pozitif seleksiyonu inanıldığı gibi Autoimmun regulatuar (AIRE) aracılığı ile gelişmemektedir. AIRE timik epitelde, doku spesifik proteinlerin (self proteinler) genlerinin transkripsiyonundan ve bu yolla self reaktif klonların delesyonundan sorumlu regulatuvar bir proteindir. Doğal Treg'lerin gelişimi asıl olarak timik stromal lenfoprotein (TSLP) aracılığı ile gerçekleşmektedir (43). TSLP medullada CD11c^{+} dendritik hücreleri aktive ederek yüksek oranda CD80/86 eksprese etmelerini sağlamakta, TSLP ile aktive olan bu dendritik hücreler MHC klas II – CD80/86 etkileşimi ile CD4+CD8-CD25- hücrelerinden nTreg oluşumunu indükler (43). Doğal Treg hücrelerin gelişim ve fonksiyonlarındaki diğer önemli bir molekül de FOXP3'tür. FOXP3 non-Treg hücrelerde (Th_1, Th_2, Natural killer hücreler) saptanmaz (44) ancak FOXP3 taşımayan hücrelere transfer edildiğinde, transfer edilen hücreler, nTreg hücrelerinin tüm fonksiyonlarını gösterir hale gelmekte ve aynı yüzey moleküllerini eksprese edebilmektedir.

Doğal Treg hücreleri, T hücre reseptörü ile uyarılmalarıyla birlikte bu uyarıma İL-2 eklendiğinde prolifere olur ve hem CD4+ hem de CD8+ hücreleri suprese ederler (45). Supresyon hücre-hücre etkileşimi ile olur ve sitokinlerden (İL-4, İL-10, TGF β) bağımsızdır (46). Hücreler in vitro olarak bir membranla birbirinden ayrılırsa baskılanma gerçekleşmez. Tüm olgularda supresyonun oluşabilmesi için T hücre reseptörünün ligandları veya anti CD3 antikorları ile uyarılması gerekir (47). Aynı zamanda doğal Treg hücreleri İL-2 gen

transkripsiyonun indüksiyonunu da inhibe eder (48). Hücre temas aracılı supresyonun yüzey molekülleri ve mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olmasına karşın CTLA-4 ve membran TGFβ moleküllerinin hedef CD4+ ve CD8+CD25- hücrelerinin proliferasyon ve fonksiyonlarını bloke ettiği de bildirilmiştir (49). Aktive CD4+ hücreler üzerinde eksprese olan CD80/CD86, supressör hücreler üzerinde bulunan CTLA-4 ile birleşerek dışarıdan içeriye (outside-in) sinyallere neden olarak supresyon meydana getirir (50). Ayrıca supressör hücrelerdeki CTLA-4 dendritik hücreler üzerindeki CD80/CD86 ligandları aracılığı ile indolamin 2,3 dioksijenazı aktive eder. İndolamin 2,3 dioksijenaz triptofan metabolizmasını hızlandırır. Ortamda azalan triptofan T hücrelerin aktive olmasını engeller ve apoptozise neden olur (51). Bu etkileşim Şekil 2.5.'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. CTLA-4 ve IDO etkileşimi

Glukokortikoidlerle indüklenen TNF reseptörü (GITR), timus ve periferde, sadece aktive olmayan nTregler üzerinde eksprese olur. GITR ekspresyonu nTreg hücreleri, THR ile indüklenen apoptozisten korur. Bu mekanizma sayesinde nTreg hücreleri, timus içinde negatif seleksiyondan kurtulmuş olur (52). GITR periferde ise; agonist ligandı veya özgün antikorları ile birleşince nTreg'lerin meydana getirdiği supresyonu bloke eder (53). İmmün reaksiyonun erken evrelerinde CD25- hücreler için önemli bir sinyal aracı olan GITR ligandının, enflamasyonun geç evrelerinde oluşan enflamatuvar sinyallerle down regule olması sonucu supressor T aktivitesi artar (53), ve böylece oluşan enflamasyonun vücuda zarar verecek düzeye gelmeden kontrol altına alınması sağlanır.

Doğal Treg hücrelerin, CD4+CD25- hücrelerinin proliferasyonunu hücre-hücre teması ile engellediği bilinmektedir. Çalışmalar bu supresyonun nTreg'lerin membranları üzerindeki TGFβ ekspresyonu ile birlikte olduğunu göstermiştir. Uyarılan nTreg hücreler üzerinde yüksek oranda TGFβ eksprese olur, oluşan bu moleküllerin antikorlarla blokajı hücre aracılı supresyonu sonlandırır (54). $TGF\beta_1$ eksprese eden nTreg hücreleri otoimmün hastalıklardan olan Tip 1 diabetes mellitus gelişimini yavaşlatır (55). Yapılan araştırmalar TGF-β ve CTLA-4 aracılı supresyona Th_1 hücrelerin Th_2 hücrelerden daha duyarlı olduğunu göstermiştir (56). TGF β aracılı supresyonun, TGF β -/- farelerde de meydana geldiğinin gösterilmesi, TGF β aracılı supresyon hakkında soru işaretleri oluşturmasına karşın mTGFβ'nın CD4+CD25+ Treg hücrelerinin etkisindeki rolleri kesindir (57). CD4+CD25+ hücreler TGF β'nın sadece latent formunu değil, aktif formunu da eksprese ederler (58). TGF β Treg hücrelerin yalnızca supressif etkilerinde rol oynamaz, aynı zamanda FOXP3 ekspresyonu ve sürekliliğini sağlar (59). TGF β ayrıca İL-2 ile birlikte henüz bilinmeyen bir mekanizma ile CD4+CD25- hücreleri, hücre-hücre taması ile supresyon yapan hücrelere dönüştürebilmektedir (60).

Birkaç çalışmada allerjik hastalıkların regülasyonunda CD4+CD25+ T hücrelerinin rolü araştırılmış, inek sütü allerjisine yönelik çalışmalarda inek sütüne karşı sensitivite geliştiren çocuklarda dolaşımdaki CD4+CD25+ T hücre sıklığının daha yüksek olduğu görülmüş ve bu çocuklarda periferal kandaki mononükleer hücrelerde inek β-laktoglobulinine karşı in vitro proliferatif yanıt klinik olarak

allerjik durumunu koruyan çocuklara kıyasla azalmıştır (55). Allerjik olmayan vericilerden alınan CD25+ T hücreleri kendilerine ait olan, allerjen ile uyarılmış CD4+CD25+ T hücreleri aracılığıyla proliferasyonu ve İL-5 sekresyonunu baskılamıştır ancak bu baskılama allerjik olan vericilerde gerçekleşmemektedir(56). Allerjik vericilerdeki CD25+ T hücrelerinin inhibisyon aktivitesindeki kaybın en belirgin olduğu dönemler, polen sayısının en fazla olduğu semptomatik dönemlerdir. Benzer biçimde, hem allerjik olan hem de olmayan kişilerdeki CD25+ T hücreleri, polen mevsiminin dışında huş ağacı allerjenlerine karşı yanıt olarak T hücresi proliferasyonunu ve T -helper sitokin üretimini belirgin ölçüde baskılamıştır. Huş ağacı polen mevsimi sırasında ise, allerjik hastaların CD25+ T hücreleri, polenlerle indüklenen İL-13 ve İL-15 üretiminin down regülasyonunu gerçekleştirmekte eksik kalmaktadır (56). Bu çalışmalar doğal CD25+ T hücresi popülasyonunun allerjenleri tanıyan T hücrelerinden ya da aktive edilmiş CD25+ eksprese eden antijene özgü 'adaptif' Treg hücrelerinden oluştuğunu göstermiştir.

Alternatif olarak, doğal CD25+ T hücre popülasyonunun özgün olmayan baskılayıcı aktivitesi atopik hastalığın gelişimini inhibe edebilir ancak, bu baskılayıcı aktivite atopik kişilerde süperantijenlere maruz kalmak gibi çeşitli nedenlerden dolayı düşük seviyededir. Farelerde doğal CD25+ T hücrelerinin havayolu enflamasyonunu sınırladığı ancak havayolu hiperaktivitesine engel olmadığı görülmüştür; bu bulgu, CD25+ T hücrelerinin allerjene özgü olmayışlarından dolayı allerjene-özel yanıtlara karşı zayıf kaldıkları düşüncesi ile uyumluluk göstermektedir. Bu nedenle, allerjik yanıtlara karşı güçlü bir yanıt için CD25+ T hücrelerinin özel olmayan sinyaller ile preaktivasyonu gerekmektedir.

Naive, nonpolarize T hücrelerinin Th hücrelere dönüşümü spesifik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ile sağlanmaktadır. En çok bilinen örnekler Th_1 ve Th_2 dönüşümünü sağlayan sırasıyla TBet ve GATA3 transkripsiyon faktörleridir. FOXP3 ise selektif olarak nTreg hücrelerde eksprese olur ve forkhead heliks transkripsiyon reseptör adlı proteini kodlar. Bu molekül CD4+CD25+ Treg hücrelerde eksprese olur ve bu hücrelerin gelişim ve fonksiyonlarından sorumludur (61). Aktive olmamış Treg hücrelerindeki FOXP3 mRNA düzeyi, aktive olmuş veya aktive olmamış konvansiyonel CD4+ T hücrelerden 100 kat fazladır (62).

FOXP3, nTreg gelişiminde yer alan en önemli proteindir. Timus içindeki yüksek afiniteli THR aracılı reaksiyonlar, FOXP3 ekspresyonunun indüklemesine neden olur. Bu indüksiyonda MHC klas II hücreleri ile spesifik peptid etkileşimi önemli basamaklardan birisidir. FOXP3'ün yokluğu CD4+CD25+ Treg hücrelerinin yokluğuna neden olmaktadır (63). Bu tabloya FOXP3 mutasyonları yol açar ve IPEX (İmmün Disregülasyon, Poliendokrinopati, Enteropati, X geçişli) adı verilen lenfoproliferatif hastalık ortaya çıkar. Bu hastalığa sahip erkeklerde adacık hücrelerinin T hücreler tarafından infiltre edilmesi sonucu, yaşamın erken dönemlerinde, Tip1 diabet hastalığı vardır. Bir diğer önemli bulgu egzema ve gıda allerjisi ile prezente olan ağır allerjik enflamasyondur (64,63, 66,67,).

Doğal Treg hücreleri self antijenlere karşı dominant toleransta rol alır. Self toleranstaki asıl mekanizma, timusta, otoreaktif T hücrelerinin klonal delesyonudur ancak bu otoreaktif T hücrelerine pek çok bireyin periferik dolaşım ve dokularında da rastlamak mümkündür. Fakat toplumda otoimmün hastalıklara çok sık rastlanmadığı göz önüne alınırsa, bu hücrelerin periferde baskılandığını söylemek mümkündür. Bu baskılanmada Treg hücreleri çok aktif rol oynamaktadır (68). Periferik CD4+CD25- hücreler anti CD3 ve anti CD28 ile stimüle edilince ektopik FOXP3 eksprese ederek supresif etki kazanabilmeleri bu görüşü desteklemektedir (69,70).

Treg hücrelerinin olası supresyon mekanizmalarından biri de sitolitik aktivitedir. CD4+CD25+FOXP3+ hücreler anti CD3 ve anti CD46 antikorları ile uyarılınca granzim eksprese ederek, perforin aracılı bir mekanizma ile CD4+, CD8+ hücreleri öldürebilmektedir (71). Benzer şekilde, lipopolisakkarid ile aktive edilen nTreg hücreler, B hücrelere THR aracılığı ile bağlanarak litik granulleri ile bu hücreleri sitolize uğratabilmektedir. Ancak bu etki perforinden bağımsız olarak meydana gelmektedir (72).

2.2.6. Adaptif Treg hücreler

Doğal Treg hücrelerinin timusta kendi antijenlerine maruz kalarak pozitif seleksiyon ile seçildikleri açık olmasına karşın, allerjene özgü adaptif Treg hücreler eksojen allerjenlerle (örneğin yiyecek ya da bitkilerden) karşılaşıldıktan sonra ve timustan ziyade daha çok periferde oluşur. Bu durum, adaptif Treg hücrelerinin doğal Treg hücrelerinden farklı yollarla, –tahminen düzenleyici olmayan T hücre öncülleri aracılığıyla– oluştuğunu gösterir. Alternatif olarak adaptif Treg hücreleri doğal Treg hücrelerinin kaynak aldığı aynı Treg hücre dizisinden kaynaklanıyor ve timusta farklılaşarak ancak allerjenlerle karşılaştıktan sonra perifere yayılıyor olabilirler. Adaptif Treg hücrelerinin kolayca tanınmalarını ve izole edilmelerini sağlayacak net işaretleyicileri (marker) olmadığından bu hücrelerin oluşumundaki özel karakteristiklerin ve yolakların çalışılması oldukça zor olmaya devam etmektedir.

İmmün disregülasyon, poliendokrinopatisi, X iliskili sendromu olan ve IPEX tanısı alan ya da FOXP3 geninde mutasyonu olan hastalarda otoimmün hastalıkların ya da yiyecek allerjisi ve egzamanın gelişimi, FOXP3 eksprese eden düzenleyici T hücrelerinin hem otoimmünitenin düzenlenmesinde hem de eksojen allerjenlere karşı allerjik yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu nedenle, doğal ve adaptif Treg hücreleri FOXP3 ekspresyonu bakımından ilintili olabilir. Bu yüzden de allerji oluşumu, FOXP3 eksprese eden allerjene özgü Treg hücrelerinin yetersiz düzeyde oluşumuna bağlı olabileceği de düşünülmektedir(73).

Bir dizi deneysel çalışmada antijene özgü adaptif Treg hücreleri indüklenmiştir. Örneğin, antijenlerin intravenöz ya da oral yollardan uygulanması ile gerçekleştirilen tolerans indüksiyonu antijene özgü (CD25+) adaptif Treg hücrelerinin ya da supressif (baskılayıcı) Th_3 hücrelerinin gelişimini sağlamıştır (74). Bu çalışmalarda FOXP3 ekspresyonu incelenmemiştir. Bunlara ek olarak; peptidin subkutan olarak uygulanması ya da subkutan olarak ozmotik pompalarla uygulanması ya da antijenin solunum yoluna uygulanması veya antijenin ısı ile öldürülmüş '*Listeria monocytogenes*'adjuvanı ile birlikte uygulanması FOXP3 eksprese eden, antijene özgü Treg hücrelerinin gelişimini indüklemiştir. Bu Treg hücrelerinin bazıları İL-10 eksprese ederken, bazıları transforme edici büyüme

faktörü beta (TGFβ) ya da hem İL-10 hem de interferon eksprese etmiştir. İL-10 üreten Treg hücreleri (Th_2 polarizasyonu ve FOXP3 için majör düzenleyici olan GATA-3 eksprese eden hücreler), İL-10 ve IFN-γ üreten Treg hücreleri ve TGF-beta üreten Treg hücreleri oldukça etkili inhibitör aktivitelere sahiptirler ve farelerde astım modelleri üzerinde havayollarında hiper yanıtın (AHR) gelişimini engellemişlerdir. Bu nedenle, FOXP3 eksprese eden ve doğal Treg hücreleri ile ilişkili olabilecek Treg hücresi tipleri Th_2 nedenli inflamasyonun gelişimini inhibe edebileceği düşünülmektedir.

FOXP3 eksprese eden antijene özgü adaptif Treg hücreleri, in vitro olarak İL-10 varlığında ya da vitamin D3 ve deksametazon varlığında oluşan Tr_1 hücreleri ile de ilişkili olabilirler (75,76). Farelerin kortikosteroidlerle tedavi edilmesi antijene özgü Treg hücrelerinin gelişimini engeller; bu durum, kortikosteroid tedavisinin allerjik hastalıkları daha çok kötüleştirme potansiyelini taşıdığını gösterir. Kortikosteroidlerle in vitro tedavi düzenleyici olmayan insan T hücrelerinin FOXP3 ekspresyonunu indüklenebilir,–yalnızca iki kata kadar– ve İL-10 üretimini arttırılabilir, –yine yalnızca iki kata kadar– ve bu türden FOXP3+, İL-10+ T hücrelerinin baskılayıcı aktiviteleri orta düzeydedir. T hücrelerinde FOXP3 ekspresyonunu arttırdığı gösterilen, TGF-β'ya maruz kalmak (77,78) ya da İL-6 reseptörü tarafından bloke edilmek gibi ek mekanizmalar gösterilmiştir (79). Ancak bu türden FOXP3+ hücrelerin *in vivo* olarak tam rollerinin ne olduğu net değildir.

FOXP3 ekspresyonunun FOXP3+ olan küçük T hücresi populasyonlarının genişlemesine bağlı olup olmadığı ya da düzenleyici olmayan T hücrelerinin, Treg hücrelerine gerçek konversiyonuna bağlı olup olmadığı açıklık kazanmamıştır. Periferdeki Treg hücrelerinin indüksiyonunun timusta Treg hücrelerinin FOXP3 ekspresyonunu indükleyen TSLP'yi kapsaması pek olası görünmemektedir (80), bu nedenle, akciğerlerde ya da deride TSLP ekspresyonu allerjik havayolu inflamasyonu ya da atopik dermatit ile sonuçlanmaktadır (81). Her ne kadar farelerdeki T hücrelerinin in vitro ve in vivo olarak yapılan dikkatli analizleri düzenleyici olmayan T hücrelerinin aktivasyonundan sonra FOXP3'ün yukarı regülasyonunun olmadığını gösterse de, bazı şartlar altında uyarılmamış CD25 hücreleri, –tahminen düzenleyici hücre aktivitesi olan hücreler–, timus dışında allerjen ile karşılaştıktan sonra FOXP3

üreten allerjene-özgü adaptif Treg hücrelerine gelişebilirler. Periferde oluşan bu mekanizmalar halen aydınlatılmayı beklemektedir.

Adaptif Treg hücre grubu içerisinde ilk hücre tip 1 regulatuvar (Tr_1) hücrelerdir. Bu hücreler yüksek oranda İL-10, TGFβ ve İL-5 üretirler (82,83). Antijene özgün Tr_1 hücreler in vivo olarak direk yolla oluşabildiği gibi doğal Treg hücrelerden de diferansiye olarak gelişebilmektedir. Bu hücrelerin indüksiyonu vitamin D3 ve deksametazon ile de gerçekleşmektedir (84). İL-10 molekülü hücre-hücre etkileşimi, MHC klas molekülü ve sitokinler üzerinde önemli etkilere sahiptir. Ayrıca bu hücreler allerjene özgün immünoterapinin ana hedef hücreleridir(85).

Adaptif Treg hücrelerin bir diğer alt grubu ise Th_3'tür. Bu hücre grubu Tr_1 hücrelere benzer şekilde uygun antijen veya anti-CD3 antikorları ile uyarılarak, yüksek oranda TGFβ ve değişik miktarlarda İL4, İL-10 salgılarlar (86). Th_3 hücreler primer olarak yabancı antijenin oral alımıyla meydana gelirler ve oral toleranstan sorumlu en önemli hücre grubudur. Barsaklarda yüksek oranda bulunan TGFβ, naive hücrelerin Th_3 hücrelere dönüşümüne yardımcı olur (87). Oluşumlarında mutlak gerekli olmamakla birlikte İL-4 Th_3 gelişimini arttırmaktadır (88). Th_3 ana supresyon mekanizması, Th_1 ve Th_2 yanıtını baskılayan TGFβ salgılamaktadır. Ayrıca Th_3 hücreler plazma hücrelerinden İgA sentezini de uyarırdıkları bilinmektedir (89).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN SEÇİMİ

Bu çalışmaya Mart 2009- Nisan 2010tarihleri arsında, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı'na yeni başvuran ve/veya AD tanısıyla takip edilmekte olan yaşları 0-5 yıl arasında değişen, 16'sı kız, 25'i erkek 41 çocuk alındı. Kontrol grubunda ise Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genel ve Sosyal Pediatri polikliniklerine başvuran, benzer yaş dağılımına sahip, 8'i kız 12'si erkek 20 sağlıklı çocuk vardı.

AD tanısı için Hanifin ve Rajka tanı kriterleri kullanıldı. Hasta grubuna, atopik dermatiti aktif dönemde olan, steroid başta olmak üzere lokal veya sistemik tedavi almayan ya da son tedaviden en az 3 ay süre geçmiş olanlar dahil edildi. Hastalığın klinik şiddetini belirlemek için SCORAD puanlama sistemi uygulandı. Ancak teknik aksaklıklar nedeniyle SCORAD puanlamaları dosya verilerinden, retrospektif olarak yapıldı.

Hasta grubuna alınan olgular için çalışma formu hazırlandı. Bu çalışma formuna hastaların yaşı, cinsiyeti, semptomları, fizik muayene bulguları, özgeçmiş ve soygeçmiş bilgileri, sigaraya maruziyet, tam kan sayımı, total nötrofil, lenfosit, eozinofil sayıları, total İgE düzeyleri, phadiotop değerleri, yapıldıysa cilt prick testi sonuçları, spesifik İgE düzeyleri ve, $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücre düzeyleri {%ve MFI (Mean fluorescens intensity, ortalama floresan yoğunluk)}kaydedildi.

3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Çalışmaya dahil edilecek çocukların ailelerinden ebeveyn onayı belgeleri yazılı olarak alındı. Periferik kan Treg ($CD4+CD25^{high}+FOXP3+$) hücre düzeylerini ölçmek için, hasta ve kontrol gruplarını oluşturan çocuklardan 2'şer cc periferik venöz kan örneği EDTA'lı tüplere alındı.

3.3. METODLAR

$CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücre düzeyleri Anabilim Dalımız İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı'na bağlı İmmünoloji-Allerji Araştırma Laboratuvarı'nda yüzey ve intrasitoplazmik boyama metodu ile 3 renkli direkt immünofloresan yöntemi uygulanarak ölçüldü. Çalışmada CD25 FITC (Immunotech, Marseille, France), CD 4 PC5 (Immunotech, Marseille, France), Anti Human FOXP3 PE (eBioscience), Staining Buffer Set (eBioscience) malzemeleri kullanıldı.

Test Protokolü

- EDTA lı tüpe alınan periferik kan örneğinden 100µl polisteren tüp içine koyuldu.
- CD4-PC5 ve CD25-FITC monoklonal antikorları yüzey boyama protokolüne göre tüp içine eklenip +4°C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda tüp soğuk PBS kullanılarak yıkandı ardından intrasitoplazmik boyama protokolüyle devam edildi.
- Süpernatan uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine taze hazırlanmış 1xFix/Perm working solüsyonundan eklenip +4°C de 45 dakika inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonunda tüp içine 1xPerm Buffer eklenip santrifüj edilerek 2 kez yıkandı.
- Yıkama sonunda pellet üzerine 5 μl FOXP3 PE monoklonal antikoru eklenip +4°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda tüp içine 1xPerm Buffer eklenip santrifüj edilerek 2 kez yıkandı.
- Yıkama sonunda süpernatan uzaklaştırılıp pellet PBS ile resüspanse edilerek akım sitometrisinde (Cytomıcs FC500 Flow Cytometer, Beckman Coulter Coorp. Miami, FL, USA) analiz edildi.
- Analizler, 488 nm lazer eksitasyon (argon-ion), yana saçılım (SS), 90° ile saçılım (FS) ve floresan FL1, floresan FL2, floresan FL4 detektörleri kullanılarak; işlemler ise CXP SoftWare version 2.2 programı ile yapıldı. SS'e karşı FS detektörlerinin kullanımı ile hücreler büyüklük ve granül içeriklerine göre bilgisayar ortamına yansıtılıp CD4+ lenfositler, yerleşim yerleri esas alınarak ayrıldı. Bu CD4+ lenfosit kapısı içinde yer alanCD4+CD25^{high}+ hücre grubu seçilerek bu populasyondaki FOXP3 ekspresyonu ölçüldü.

3.4. ARAŞTIRMANIN KAYNAĞI

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından 2009 yılında 09B3330013 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmanın istatistiksel analizi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda SPSS istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyi (% ve MFI) değerlerinin karşılaştırılmasında non-parametrik testlerden Mann-Whitney U testi kullanıldı. Yaş, cinsiyet, ve sigara tüketimine göre CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyi (%

ve MFI) değerlerinin karşılaştırılmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. Başvuru semptomu, fizik muayene ve diğer laboratuar bulgularının ilişkisini incelemek için non-parametrik korelasyon testlerinden Spearman's rho testi uygulandı. $P< 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Allerji-İmmünoloji Bilim dalı'nda tanı alan ve/veya izlenen 41 atopik dermatitli hasta ve 20 sağlıklı çocuğun CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri (% ve MFI olarak) değerlendirildi.

Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet özellikleri topluca Tablo 4.1'de verilmektedir. Bu grubun 8'i kız, 12'si erkek (%60) idi ve yaşları 1 - 60 ay arasında (median: 12 ay) değişmekteydi.

Tablo 4.1. Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet özellikleri

Sıra no	İsim	Cinsiyet	Yaş (ay)
1	BNT	E	6
2	BDÖ	E	1
3	EY	E	8
4	KE	E	11
5	NŞ	K	7
6	EDA	K	48
7	FZ	E	12
8	ZGK	K	9
9	MAK	E	12
10	MNM	K	36
11	EK	E	12
12	EÖ	E	18
13	MBÖ	E	48
14	HB	K	12
15	CC	E	48
16	BD	K	3
17	HK	E	10
18	DY	K	50
19	TMS	E	60
20	HÇ	K	54

Atopik dermatitli grubun yaş, cinsiyet, klinik ve laboratuar özellikleri ise topluca Tablo 4.2'de sunulmaktadır.

Tablo 4.2. Atopik dermatitli hastaların yaş, cinsiyet ve klinik özellikleri

Ad-Soyad	**Yaş (ay)**	**Cinsiyet**	Başvuru yakınması	Fizik Muayene	Aile atopi	Beyaz Küre(hc/mm3	Total eozinofil Sayısı(hc/ mm3)	Total İgE (kiU/L)	Phadiotop	Sp. İgE	Cilt testi (Prick)	SCORAD puanı
ÇD	5	E	Yanaklarda döküntü	Yanaklarda egzematöz lezyonlar, cilt kuruluğu	Yok	17500	400	21	Negatif	negatif	Bakılamadı	38
ÖNK	24	K	Şikayeti yok	Yanaklarda,kollarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	13400	500	44	Negatif	fX(5) +2	Yumurta +1	33
ES	12	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	16800	400	6	Negatif	fX(5) +1	Yumurta +2	36
AKK	5	E	Kızarıklık, huzursuzluk	Yaygın egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	10500	400	Bakılamadı	Negatif	fx(5) +3	Yumurta +1	62
EEZ	21	K	Kaşıntı	Tüm vücutta cilt kuruluğu, yanaklarda egzematöz lezyonlar	Yok	9600	800	21	Negatif	negatif	Negatif	21
EK	24	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	14800	300	24	Negatif	bakılamadı	Negatif	36
NT	1.5	E	Üfürüm	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	10200	500	48	Negatif	negatif	Bakılamadı	38
SK	14	K	Kaşıntı	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	15400	200	242	Negatif	negatif	Bakılamadı	38
HE	48	E	Yanaklarda döküntü	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	10400	400	Bakılamadı	Negatif	negatif	Bakılamadı	36
BM	12	K	Yanaklarda döküntü	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , kaşıntı	Yok	10200	400	22	Negatif	negatif	Bakılamadı	42
ND	36	K	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	14700	100	26	Negatif	negatif	Negatif	40
EYT	24	E	Burun kanaması	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	11700	400	322	Negatif	negatif	Bakılamadı	41
BŞ	7	E	Yanaklarda kızarıklık, kaşıntı	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	10000	100	30	Negatif	negatif	Bakılamadı	36
AS	14	K	Yanaklarda kızarıklık, kaşıntı	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	7400	700	24	Negatif	fX(5) +1	Bakılamadı	34
EA	6	K	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	12000	200	5	Negatif	fX(5) +1	Negatif	37
AK	8	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Babada astım	11800	200	Bakılamadı	Bakılamadı	bakılamadı	Bakılamadı	36
YAŞ	3.5	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	8900	400	64	Negatif	negatif	Bakılamadı	41
STM	21	E	Yanaklarda döküntü	Yanaklarda ve göcdede egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Annede astım ?	12400	600	60	Negatif	fX(5) +1	Bakılamadı	48
NÇ	36	K	Yanaklarda kızarıklık, kaşıntı	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , yaygın cilt kuruluğu	Yok	9500	300	3	Negatif	negatif	Negatif	46
HKA	14	E	Kaşıntı	Gövdede, sırtta egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	14600	600	48	Negatif	negatif	Negatif	47
MD	36	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	9700	300	50	Negatif	negatif	Bakılamadı	32
AT	7	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda, gövdede egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	13700	300	42	Negatif	fX(5) +1	Bakılamadı	39
STU	8	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	8900	100	Bakılamadı	Bakılamadı	bakılamadı	Bakılamadı	33
FK	60	K	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda, kollarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	9300	100	4	Negatif	negatif	Negatif	41
KA	4	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	6400	0	42	Negatif	negatif	Bakılamadı	34
RG	54	K	Öksürük	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	10900	700	324	Pozitif +2	fX(5) +2	Bakılamadı	32
BY	4	E	Yanaklarda döküntü	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	11600	400	48	Negatif	fX(5) +1	Negatif	30
YG	7	E	Şikayeti yok	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Annede ürtiker	15000	600	44	Negatif	fX(5) +2	Bakılamadı	30
YY	7	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	11400	600	9	Negatif	negatif	Bakılamadı	31
ED	7	K	Yanaklarda kızarıklık, kaşıntı	Yanaklarda, kollarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	15600	700	Bakılamadı	Bakılamadı	bakılamadı	Bakılamadı	38
İU	3	K	Şikayeti yok	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	12400	200	3	Negatif	negatif	Negatif	30
MA	4	K	Yanaklarda döküntü	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	10100	400	122	Pozitif +1	fX(5) +1	Bakılamadı	32
ARA	7	K	Kaşıntı, yanaklarda döküntü	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	10000	100	120	Negatif	negatif	Bakılamadı	32
İMT	5	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	11900	500	4	Pozitif +1	fX(5) +2	Bakılamadı	34
Hİ	7	E	Yanaklarda döküntü	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	8000	100	Bakılamadı	Negatif	fX(5) +2	Negatif	30
GB	5	E	Şikayeti yok	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	7700	100	44	Negatif	fX(5) +2	Bakılamadı	32
BY	11	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	11100	0	4	Negatif	negatif	Negatif	33
ATŞ	1	E	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	6700	400	46	Negatif	negatif	Bakılamadı	34
CSE	3	K	Yanaklarda döküntü, kaşıntı	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Annede ARK	13100	1300	122	Pozitif +1	fX(5) +2	Bakılamadı	30
ŞET	6	K	Yanaklarda kızarıklık	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	16700	600	Bakılamadı	Bakılamadı	bakılamadı	Bakılamadı	30
NEK	2	E	Yanaklarda döküntü	Yanaklarda egzematöz lezyonlar , cilt kuruluğu	Yok	12800	700	53	Negatif	negatif	Bakılamadı	30

f (x) 5 = Genel Gıda Paneli Phadiotop = Solunum Allerjenleri Paneli

AD'li grubun 16'sı kız (%39), 25'i erkek (%61), kız/erkek oranı 0.6 ve yaşları 1-60 ay arasında (median: 7 ay) değişmekte idi. Hasta ve kontrol grubunda yaş ve cinsiyet özellikleri benzer bulunmuştur ($p>0.05$).

Hastaların başvuru şikayetlerine bakıldığında; 21'inde (%51.2) yanaklarda kızarıklık, 9'unda (%22) kaşıntı, 10'unda (%24.4) yanaklarda döküntü vardı. 4 hastanın ise (%9.8) aktif şikayet yoktu. Yine 1 hasta huzursuzluk, 1 hasta öksürük, 1 hasta üfürüm ve 1 hasta burun kanaması nedeniyle başvurmuştu. Hastaların 26'sının evinde sigara (%63.4) içilmekteydi.

Hastaların tümünün fizik muayenesinde cilt kuruluğu vardı. SCORAD puanları materyal ve metod kısmında da belirtildiği üzere retrospektif olarak değerlendirildi. Hastaların SCORAD ortalaması: 36 (21-62) olarak saptandı. SCORAD puanı 1 hastada 62 (ağır AD), 1 hastada 21 (hafif AD), diğer hastalarda ise 25-50 (orta şiddette AD) arasında bulundu.

Beyaz küre sayıları 6400-17500 hücre /mm^3 (median:11400), total nötrofil sayıları 700-8400 hc/mm^3 (median: 3400), total lenfosit 2600-13000 (median: 6200), total eozinofil sayıları 0-1300 (median: 400) olarak saptandı.

41 hastanın 35'inde total İgE değerleri ölçülebildi. Bu ölçümlerde İgE değerleri 0- 324 kiU/L (median: 36) arasında ve % 36'sında yaşa göre yükseklik saptandı.

Tüm hastalarda major kriterlerden olan kaşıntı, kronik/tekrarlayan vasıf ve tipik yerleşim bulguları vardı (%100). 4'üncü major bulgu olan "kendisinde veya ailesinde atopik hastalık olması" ise yalnızca 3 hastada vardı (%7.3). Bir hastanın annesinde doktor tanımlı ürtiker, 1'inin annesinde allerjik rinokonjuktivit, 1 hastanın babasında astım vardı. 1 hastanın annesinde ise astım şüphesi vardı.

Solunumsal allerjen paneli (phadiotop) bakılan 37 hastanın sadece 4'ünde (%10.8) pozitiflik saptandı (1 hasta +2 (pozitif), 3 hasta +1 pozitif (hafif yükseklik)). Spesifik İgE olarak miks gıda paneli (f(x)5) bakılan 36 hastanın 16'sında (%44) pozitiflik saptandı (1 hastada +3, 8 hastada +2, 7 hastda +1 düzeyinde). Cilt testi (prick) yapılan 17 hastanın

sadece 3'ünde (%18) yumurtaya karşı pozitiflik saptandı (1 hastada +2, diğer 2'sinde ise +1düzeyinde).

4.1. CD4+CD25^{high}+FOXP3+ TREG HÜCRE YÜZDELERİ (%):

Hasta ve kontrol grubundaki olguların CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri (% ve MFI olarak) topluca Tablo 4.3'de verilmektedir.

Tablo 4.3. CD4+CD25^{high}+FOXP3+ T hücre düzeyleri (% ve MFI) toplu sonuçları

Hasta grubu				**Kontrol grubu**			
Sıra no	İsim	CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg (%)	CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg (MFI)	Sıra no	İsim	CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg (%)	CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg (MFI)
1	ÇD	30,5	22	1	BNT	92,2	7,5
2	ÖNK	32.7	38,1	2	BDÖ	98,1	6,1
3	ES	53,3	16	3	EY	96,3	9,5
4	AKK	42,2	7,9	4	KE	83,8	5,8
5	ECZ	47,7	11,9	5	NŞ	95,7	5,1
6	EK	30,9	8,8	6	EDA	97,7	9,2
7	NT	60,3	21,3	7	FZ	91,9	6,6
8	SK	36,7	9,1	8	ZGK	88,1	5
9	HE	32,4	15,1	9	MAK	82	5,6
10	BM	51,3	15,3	10	MNM	90,3	3,9
11	ND	38,5	10,8	11	EK	90,9	3,5
12	EYT	46,2	5,6	12	EÖ	96,8	5,8
13	BŞ	33,2	16,2	13	MBÖ	91,6	7,7
14	AS	43,1	20,2	14	HB	89,4	5,6
15	EA	35,6	24,3	15	CC	91,2	5,1
16	AK	41	18,3	16	BD	90	9,8
17	YAŞ	56,3	28,8	17	HK	91,2	7,7
18	STM	53,2	8,9	18	DY	97,4	2,6
19	NÇ	46,1	17,4	19	TMS	93,5	3,4
20	HKA	48,3	8,6	20	HÇ	96,2	5,8
21	MD	48,3	12,9				
22	AT	38,3	19				
23	STU	38,3	8,8				
24	FK	37,7	15,6				
25	KA	49	17,6				
26	RG	40,2	10,2				
27	BY	60,5	8,3				
28	YG	50,4	9,3				
29	YY	47,1	9,3				
30	ED	44,2	15,6				
31	İU	57,7	3,7				
32	MA	35,8	6,1				
33	ARA	35,9	12,9				
34	İMT	36,4	23,9				
35	Hİ	35	10,1				
36	GB	50	6,6				
37	BY	50,3	8,6				
38	ATŞ	46,8	8,5				
39	CSE	51,3	16,4				
40	ŞET	37,5	4				
41	NEK	39,7	4,5				

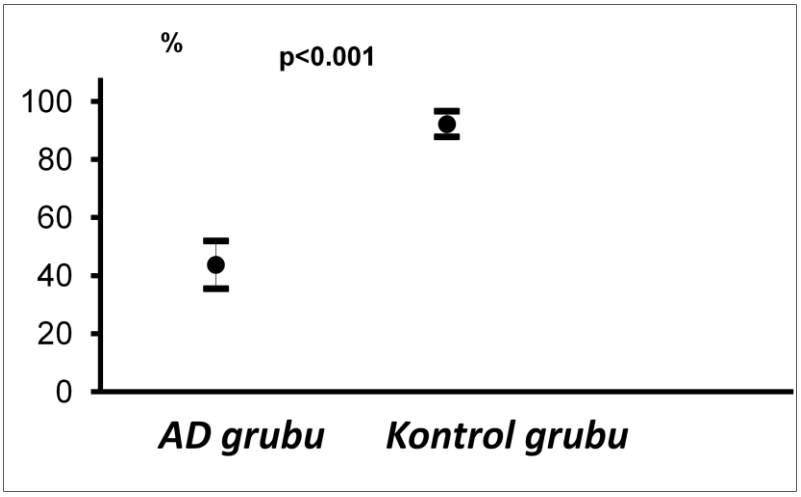
Atopik dermatitli hasta grubunda CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri ortalaması % 43.7 bulundu. Bu değerler % 30.5 ile % 60.5 arasında (standart deviasyon: 8.2 median: 43.1) değişmekteydi. Kontrol grubunda ise CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri ortalaması % 92.2 idi. Kontrol grubunun değerleri ise %82 ile %98.1 arasında (standart deviasyon:4.4 median: 91.7) değişmekteydi.

CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre yüzdeleri (%) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık saptandı ($p<0.001$). Bu bulgular ve sonuçlar Tablo 4.4'te ve Şekil 4.1'da sunulmaktadır.

Tablo 4.4. AD ve Kontrol gruplarının CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri (%)

	AD grubu (n=41)	Kontrol grubu (n=20)
CD4+CD25^{high}+FOXP3+ T reg hücreler (%) (X ± SD)	43.7 ± 8.2	92.2 ± 4.4
	P < 0.001	

AD = Atopik Dermatit



Şekil 4.1. Atopik dermatitli ve sağlıklı grubun CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre yüzdeleri (%) grafiği

Hasta grubunun yaş, cinsiyet, başvuru şikayeti, fizik muayene bulgusu, SCORAD değerleri, beyaz küre sayısı, total lenfosit sayısı, total nötrofil sayısı, total eozinofil sayısı, total İgE, spesifik İgE değerleri ile CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri (%) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı. Sigara maruziyeti olan ve olmayan hastalar arasında da CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri (%) açısından anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Kontrol grubunda da yaş ve cinsiyet ile CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri (%) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

4.2. CD4+CD25^{high}+FOXP3+ TREG HÜCRELERİNİN ORTALAMA FLORESAN YOĞUNLUĞU (MFI):

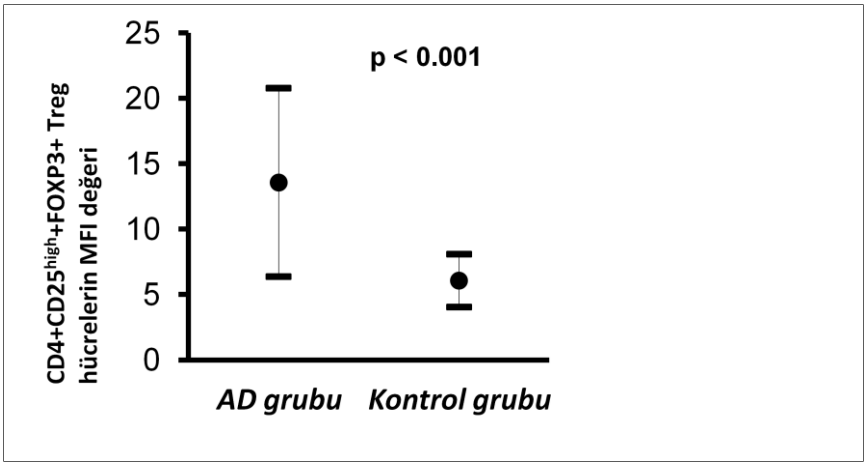
CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerinin ortalama floresan yoğunlukarı değerlerine (MFI) baktığımızda AD'li grupta ortalamanın 13.6 olduğu, sonuçların 4 ile 38 arasında değiştiği (standart deviasyon: 7.2 median: 11.9) görüldü. Kontrol grubunda ise; ortalama değer 6.1 saptandı ve sonuçların 3 ile 10 arasında değiştiği (standart deviasyon:2.0 median: 5.8) görüldü.

AD'li grup ve kontrol grubu CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerinin ortalama floresan yoğunlukarı değerleri (MFI) açısından karşılaştırdıldığında istatisteksel olarak anlamlı derecede farklılık saptandı ($p<0,001$). Bu bulgu ve sonuçlar Tablo 4.5 ve Şekil 4.2'de sunulmaktadır.

Tablo 4.5. CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerinin ortalama floresan yoğunluğu (MFI)

	AD grubu (n=41)	Kontrol grubu (n=20)	
CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri (MFI) (X ± SD)	13.6 ± 7.2	6.1 ± 2.0	
	P < 0.001		

AD = Atopik Dermatit



Şekil 4.2. AD'li ve Kontrol grubunun CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerleri grafiği

Hasta grubunun yaş, cinsiyet, başvuru semptomu, fizik muayene bulgusu, SCORAD değeri, beyaz küre sayısı, total lenfosit sayısı, total nötrofil sayısı, total eozinofil sayısı, total İgE, spesifik İgE değerleri ile CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerinin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. Sigara maruziyeti olan ve olmayan hastalar arasında da CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerinin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Kontrol grubunda da yaş ve cinsiyet ile CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerinin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Atopik dermatit çocukluk çağında sık görülen, kronik, enflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığa neden olan etmenlerin tanımlanması, tedavi olanaklarının artmasına karşın sıklığı tüm dünyada giderek artmakta, tedavi ve izlem maliyetleri nedeniyle de etyopatogenez ve yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması için yoğun çaba harcanmaktadır (10).

AD'de enflamasyonun asıl nedeni aydınlatılamamış ve halen araştırılmaktadır. Önceleri enflamasyonun allerjenle karşılaşan mast hücrelerinden salınan sitokin ve kemotaktik faktörlerin açığa çıkmasına aracılık eden İgE fonksiyonu üzerinde durulmuştur. Ancak tüm hastalarda İgE düzeylerinin yüksek olmaması nedeniyle bu teoriden daha sonra uzaklaşılmıştır. Etyopatogenezde suçlanan bir diğer mekanizma ise; dendritik hücrelerdir. Bu hücreler allerjenleri alıp Th_1 ve Th_2 hücrelerine ve olasılıkla da düzenleyici T hücrelerine sunarlar. Dendritik hücreler İgE taşırlar ve yüksek afiniteli reseptörleri (FcERI) eksprese ederler. İgE dendritik hücrelere bağlandıktan sonra İL-16 üretimi oluşmakta ve bu da ciltteki CD4+ T hücrelerini aktive ederek enflamasyona neden olduğu şeklinde düşünülmekteydi. Ancak etyopatogeneze yönelik yapılan çalışmaların sayısının artmasıyla bu teori değerini yitirmiştir. Günümüzde atopik dermatit patogenezinde hücresel immün yanıtın özellikle de Treg hücrelerin kilit rol aldığı düşünülmektedir (70).

Bilindiği üzere T lenfositler Th_1, Th_2, Th_{17}, Treg gibi farklı fonksiyonlar yürütmekte olan alt gruplara ayrılmaktadır. Treg hücreler başlangıçta, CD4+ olan T hücreleri içerisinde İL-2α subunitini yapısında barındıran hücreler olarak tanımlanmış olmalarına rağmen daha sonra teknolojideki gelişmeler sayesinde, farklı fenotip ve fonksiyonlar üstlenen alt gruplara sahip olduğu görüldü. Treg hücreler başlıca self tolerans, otoimmünitenin önlenmesi ve immün cevabın regulasyonunda rol alır. Regulasyon işleminin nasıl gerçekleştiği açık değildir. İn vitro ortamda hücre temasına dayalı olduğuna inanılsa da İL-10 ve TGF-β gibi sitokinlerin de etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bunların dışında, son yıllarda regulasyon işleminde daha ön

planda rol alan bir protein olan FOXP3 tanımlanmıştır ve bu yönde yapılan çalışmalar hızla artmaktadır.

FOXP3, CD4+CD25+ Treg hücrelerin stoplazmasında regulatuvar bir protein olarak eksprese edilir ve Treg hücrelerinin gelişimi, regulasyon işlevleri için ana düzenleyici faktör olarak çalışmaktadır. Eksikliğinde veya yokluğunda ise çeşitli allerjik ve otoenflamatuvar hastalıklar geliştiği bilinmektedir.

Örneğin; FOXP3 mutasyonu olan farelerde allerjik havayolu inflamasyonu, İgE yüksekliği ve eozinofilinin yanısıra çok sayıda otoimmün sendromun spontan olarak geliştiği gösterilmiştir. Nitekim FOXP3 gen mutasyonu sonucunda X kromozumuna bağlı geçiş gösteren, immün disregulasyon, poliendokrinopati ve enteropati tablosu tanımlanmıştır (IPEX). Astım ve Treg ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışmada da, Treg hücre düzeylerinin düşük olmasının astım patogenezinde rol oynayabileceği yönündedir.

Atopik dermatite bakıldığında ise literatürde regulatuvar T hücre düzeylerinin incelendiği az sayıda çalışma olduğu görüldü. Bu çalışmalarda; genel olarak Treg hücrelerinin farklı alt tiplerinin, yetişkin ve çocuk hastalarda birlikte incelendiği belirlendi. Sadece AD'li çocuklarda yapılmış bir çalışmaya rastlanmadı. Ayrıca mevcut olan bu çalışmaların tümünde CD4+CD25+FOXP3+ Treg ve $CD4+CD25^{high}$+FOXP3+ Treg hücre düzeylerinin yalnızca yüzde olarak ölçüldüğü, MFI (ortalama floresan yoğunluk) olarak değerlendirilmediği dikkati çekti.

Bu yönde yapılan çalışmalar incelenecek olursa; Ito ve arkadaşlarının ortalama yaşları 27.1 ± 7.5 yıl olan 35 atopik dermatitli ve yaşları 27.5 ± 10 yıl olan 36 kontrol grubuyla yaptığı çalışmada; hasta grubunda periferik kan CD4+CD25+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri (%) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. CD4+CD25+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri 1 ay ve 2 ay sonra kontrol edildiğinde ise hastaların cilt lezyonları düzeldikçe, CD4+CD25+FOXP3+ Treg hücre düzeylerinde kullanılan tüm ilaçlardan bağımsız olarak azalma görülmüştür (90). Araştırmacılar, periferik kan ve ciltteki Treg hücre kompartmanlarındaki bu dinamik değişimin atopik dermatit patogenezinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Ito ve arkadaşlarının çalışmasında FOXP3

ekspresyonu tüm CD4+CD25 hücrelerde ölçülmüştür (high, medium ve low CD4+CD25 hücreler ayırtedilmeksizin). Bu durumda effektör T hücrelerinin eksprese ettiği FOXP3 düzeyi de ölçülmüş olmaktadır(91). Çalışmamızda ise Treg hücreler (CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg) sadece periferik kanda ve çocuk hastalarda ölçülmüş; Ito ve arkadaşlarının bulduğu sonuçlardan farklı olarak CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre yüzdeleri belirgin düşük bulunmuştur. Çalışmamızda bu bulguyla birlikte doğal Treg hücrelerin ortalama floresan yoğunlukları da ölçülmüş ve anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Szegedi ve arkadaşlarının atopik dermatitli hastaların periferik kanlarında, CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücreler ve Tr_1 hücrelere yönelik yaptıkları çalışmada; çocuk ve yetişkinlerden oluşan yaş ortalaması 22.2 olan (6-46 yaş) 31 atopik dermatit hastası ve 40 sağlıklı kontrol yer almıştır. Bu çalışmada hasta grubunda, periferik kanda Tr_1 effektör T hücreler yüksek bulunmuş, ancak CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücreler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmada aynı zamanda cilt lezyonları olan hastalardan biopsi örnekleri alınmış, ayrıştırma işlemlerinden sonra ölçümler yapıldığında CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeylerinin (%) anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır(91). Bizim çalışmamızda ise sadece AD'li çocuk hastaların periferik kanlarında CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyleri ölçülmüş ve düşük saptanmıştır. Bu sonuç Szegedi ve ark.'nın elde ettiği sonuçlarla uyumlu değildir. Szegedi ve ark.; CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerin ciltte yüksek periferik kanda ise kontrollerden farksız olmasını, bu hücrelerin ciltte birikimine bağlamışlardır. Çalışmamızda ise CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücreler doku düzeyinde incelenmemiş olmakla birlikte, periferik kanda sağlıklı kontrollere kıyasla düşük düzeyde saptanmış olmaları bu hücrelerin dokuda toplanıyor olmasından kaynaklanabilir. Nitekim çalışmamızda yüzde değerlere ek olarak incelenen CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerin ortalama floresan yoğunluğunun yüksek olarak saptanmış olması, bu hücrelerin fonksiyonel anlamda aktivasyon göstermekte olduğunun bir yansıması olabilir.

Shiou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, 15 atopik dermatitli, 14 sağlıklı ve 12 astımlı hasta yer almıştır. Atopik dermatitli hastaların astımlı ve sağlıklı gruba

göre anlamlı derecede yüksek CD4+CD25+ Treg hücre düzeyine sahip oldukları saptanmıştır. Bu çalışmada periferik kanda Treg hücreler, sadece CD4 ve CD25'i birlikte taşıyan hücreler olarak değerlendirilmişlerdir. Ancak günümüzde regulatuvar T hücrelerini tanımlamak için bu yeterli değildir. Hücre yüzeyinde birlikte saptanacak CD4 ve CD25 pozitifliğine ek olarak intrastoplazmik FOXP3 molekül ekspresyonu gereklidir. Ayrıca bu çalışmada yetişkin ve çocuk hastalar birlikte değerlendirilmiş ve CD4+CD25+FOXP3+ Treg ölçülmemiştir (92). Bizim çalışmamızda ise sadece çocuk hastalarla yapılmış ve doğal Treg hücreler farklı şekilde tanımlanmıştır.

Verhagen ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise; 15 sağlıklı ile yaşları 19-45 arasında değişen 24 AD'li hastadan cilt biopsileri alınarak, bu örnekler üzerinden regulatuvar T hücre düzeyleri değerlendirilmiş; hasta grubunda Tr_1 hücre ve İL-10 düzeyleri yüksek bulunmasına rağmen CD4+CD25+FOXP3+ Treg hücreler hiç saptanmamıştır (2). Ancak bu çalışmada dikkat çeken bir nokta, Tr1 hücre düzeylerinin yüksek bulunmasına rağmen FOXP3 ekspresyonunun hiç saptanamamasıdır. Zira adaptif Treg (Tr1 ve Th3) hücrelerin, doğal Treg hücrelere ($CD4+CD25^{high}+FOXP3+$) oranla daha az da olsa, FOXP3 eksprese ettikleri bilinmektedir. Verhagen ve ark. sonuç olarak CD4+CD25+FOXP3+ Treg hücrelerin saptanmamasının AD gelişiminde rol oynayan bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar Verhagen ve ark.'nın sonuçları ile uyum göstermemektedir. Daha önce de belirttiğimiz gibi bu çalışma da hasta grubu ve çalışma düzeni olarak bizim yaptığımız çalışmadan önemli farklılıklar göstermektedir.

Toparlayacak olursak; yapılan bu çalışmaların ortak özelliği periferik kanda ve ya ciltte Trı hücre düzeylerinin yüksekliğidir. Ancak bu durum Atopik dermatit patogenezini açıklamada yetersiz görünmektedir. Zira immün cevabın ve enflamasyonun regulasyonunda doğal Treg hücrelerin ($CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg) özellikle de FOXP3'ün daha ön planda rol aldığı, hatta bazen bu işlemi adaptif Treg hücre kompartmanlarını düzenleyerek sağladığı bilinmektedir (54). Ayrıca bu ve benzer çalışmalarda $CD4+CD25^{high}+FOXP3+$ Treg hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu incelenmemiştir.

Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları literatür ışığında yorumlayacak olursak: Periferik kanda CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre yüzdelerinin düşük bulunması bu hücrelerin atopik dermatit' li deride birikmesinin sonucu olarak karşımıza çıkabilir. CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre yüzdeleri düşük iken ortalama floresan yoğunluklarının (MFI) yüksek olması ise bu hücrelerin periferik kanda aktif fonksiyon göstererek immün yanıtı regüle etme çabasından kaynaklanıyor olabilir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar atopik dermatit patogenezinde CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerin rolü bulunduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak inceleyebildiğimiz kadarıyla; atopik dermatit ve CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg, yani timus kaynaklı doğal regulatuvar T hücre ilişkisini inceleyen çalışmalar sadece yukarıda sözü edilen çalışmalarla sınırlıdır. Bu çalışmalar hem sayıca yetersiz hem de birbiriyle örtüşmemektedir. Atopik dermatit patogenezinin anlaşılabilmesi için bu yönde daha çok sayıda ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

ÖZET

ATOPİK DERMATİTLİ ÇOCUKLARDA T REGULATUVAR (Treg) HÜCRE DÜZEYİ

Atopik dermatit çocuklarda yaygın görülen kronik, enflamatuvar bir hastalıktır. İmmünolojik ve çevresel faktörlerin birlikte rol aldığı karmaşık bir yapıya sahiptir. Regulatuvar T hücreler tolerans ve immün regulasyonda önemli rol oynarlar. Atopik dermatitte bu hücrelerin rolüyle ilgili olarak yayınlanmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı atopik dermatitli çocuklarda periferik kan CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre düzeyini belirlemek ve hastalığın patogenezinde etkili olup olmadığını değerlendirmektir.

Çalışmamıza atopik dermatit tanı kriterlerine uygun(Hanifin ve Rajka kriterleri), yaşları 1-60 ay arasında (median: 7 ay) değişen 16'sı kız, 25'i erkek toplam 41 hasta dahil edildi. Hastaların tümünde atopik dermatit aktif dönemdeydi ve hastaların hiçbiri son 3 ay içerisinde topikal ve/veya sistemik bir tedavi almamıştı. Kontrol grubu ise yaşları 1-60 ay arasında (median: 12 ay) değişen 8 kız ve 12 erkekten meydana gelmekteydi. FOXP3 molekül ekspresyonu, her hastadan tam kan örneği alınarak (2 cc), 3 renkli boyama yöntemiyle flow sitometri'(FC500 Cytomics, Miami USA) de çalışıldı.

Atopik dermatitli çocuklarda periferik kan CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre yüzdeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük, CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerinin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) ise yüksek saptandı ($p<0.001$).

Periferik kanda CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre yüzdelerinin düşük bulunması bu hücrelerin atopik dermatit' li deride birikmesinin sonucu olarak karşımıza çıkabilir. CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücre yüzdeleri düşük iken ortalama floresan yoğunluklarının (MFI) yüksek olması ise bu hücrelerin periferik kanda aktif fonksiyon göstererek immün yanıtı regüle etme çabasından kaynaklanıyor olabilir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar atopik dermatit patogenezinde CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücrelerin rolü bulunduğunu düşündürmektedir.

SUMMARY

REGULATORY T CELL LEVELS IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS

Atopic dermatitis is a chronic, inflammatory skin disease which is common in children. It exhibits a complex immunological and environmental background. Regulatory T cells (Tregs) have an essential role in tolerance and immune regulation. However, few and controversial data have been published to date on the role of these cells in atopic dermatitis. The aim of this study is to examine peripheral blood CD4+CD25^{high}+FOXP3+ regulatory T cell levels in children with atopic dermatitis and to evaluate their effect on the pathogenesis of the disease.

All patients fulfilled the criteria for Atopic dermatitis (Hanifin and Rajka criteria). 41 atopic dermatitis patients, 16 female, 26 male (age range: 1-60 months, median: 7 months) were included into the study. They all were at the active stage of the disease, prior to any topical and/or systemic treatment. Control group consisted of 20 children age ranging 1-60 months (median: 12). FOXP3 molecule expression on peripheral blood lymphocytes (CD4+CD25+) were studied by whole blood technique (2ml) using three colour staining on flow cytometry (FC500 Cytomics, Miami USA).

Children with atopic dermatitis have significantly lower levels of peripheral blood CD4+CD25^{high}+FOXP3+ regulatory T cells compared to control group ($p < 0.001$).

This study shows that CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg cells were lower in atopic dermatitis patients and suggests that decreased levels of peripheral blood CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg cells may be secondary to accumulation of these cells at skin. Therefore CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg cells may play a role in the pathogenesis of atopic dermatitis.

KAYNAKLAR

1) Gershon RK, Kondo K: Cell interactionsin the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. Immunology 1970;18:723-737.

2) Verhagen J,Akdis M,Traidl-Hoffman C,Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, Behrendt H , Blaser K, Akdis CA: Absence of T regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. J Allergy ClinImmunol 2006, 117:176-183.

3) Romagnani S: Regulation of the T cell response. Clin Exp Allergy 2006,36:1357-1366.

4) Stock P, DeKruyyf R.H, Umetsu D,T. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. 2006;1(1): 12-16.

5) Baud O, Goulet O, Canioni D, et al. Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked syndrome (IPEX) by allogenic bone marrow transplantation. N Engl J Med 2001;344:1758–1762.

6) Coca A, Cooke R – on the classification of the phenomena of hypersensitiveness. J Immunol 1923 ; 8: 763-71.

7) Recognition of the atopic status. Proceedings of workshop panel, WHO meeting, Florence, June 1984. Clin Allergy 1986 ; 16(suppl 1):19-26.

8) Cooke R, Van-Der-Veer A. – Human sensitizasion. J Immunol 1916; 1: 201-305.

9) Horner WE, Helbing A, Salvaggio JE, Lerher SB- Fungal allergens. Clins Microbiol Rev 1995 ; 8:161-79.

10) Rothe MJ, Grant-Kels JM- Atopic dermatitis: an update. J Am Acad Dermatol 1996;35:1-13.

11) Kay J, Gawkrodger DJ, Mortimer MJ, Jaron AG- The prevalance of childhood atopic eczema in a general population. J Am Acad Dermatol 1994; 30:35-9

12) Arıkan Ç, Bahçeçiler Nerin N. Atopik dermatit. Allerji Astım Dergisi 2001;3:22-4.

13) Kristal L. Atopic dermatitis in infants and children. An update. Pediatr Clin North Am. 2000;47(4):877-95.

14) Forrest S, Dunn K, Eliott K et al. Identifying genes predisposing to atopic eczema. J Allergy Clin Immunol 1999;104:1066-70.

15) Haagerup A, Bjerke T, Schiotz PO, et al. Atopic dermatitis: a total genome scan for susceptibility genes. Acta Derm Venereol 2004;84:346-52.

16) Larsen FS. Genetic epidemiology of atopic eczema. In: Williams HC, ed. Atopic Dermatitis. Cambridge: Cambridge University Pres. 2000:113-24.

17) Braff MH, Gallo RL. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. Curr Top Microbiol immunol 2006;306:91-110.

18) Novak N, Bieber T. Allergic and non allergic forms of atopic diseases. J Allergy Clin Immunol 2003;112:252-62.

19) Yuksel H, Can D, Reisli I, et al. Characteristics and prognosis of childhood atopic dermatitis: A multicenter study in Turkey. Int Arch Allergy Immunol 2010;152:362-67.

20) Haagerup A, Bjerke T, Schiotz PO, et al. Atopic dermatitis: a total genome scan for susceptibility genes. Acta Derm Venereol 2004;84:346-52.

21) Haagerup A, Bjerke T, Schiotz PO, et al. Atopic dermatitis: a total genome scan for susceptibility genes. Acta Derm Venereol 2004;84:346-52.

22) Leung DY,Tharp M, Boguniewicz M. Atopic dermatitis. In:Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolf K, Freedberg IM, Austen KF. Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine 5th ed Newyork, Mc Graw Hill. 1999;1464-80. 45.

23) Odom RB, James WD, Berger TG. Atopic dermatitis, eczema, and non infectionus immuno deficiency disorders. Andrews'disease of the skin 9th ed Philadelphia, W.B. Saunders Company. 2000;69-76. 51.

24) Reitamo S. Tacrolimus : A new topical immunomodulatory therapy for atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(3):445-8.

25) Van Leent E, Bos JD. Atopic dermatitis. In: Katsambas A, Lotti TM, eds. European Handbook of Dermatological Treatments. Berlin: Springer-Verlag, 2003: 54–62.

26) Thestrup-Pedersen K. Clinical aspects of atopic dermatitis. Clin Exp Dermatol. 2000;25:535-43

27) Thestrup-Pedersen K. Atopic dermatitis: summary of the 1st Georg Rajka symposium 1998 and a literature review.

28) Leung DY,Tharp M, Boguniewicz M. Atopic dermatitis. In:Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolf K, Freedberg IM, Austen KF. Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine 5th ed Newyork, Mc Graw Hill, 1999;1464-80.

29) Aksungur V. Atopik Dermatit. In: Oğuz O, Serdaroğlu S. Dermatolojide Gelişmeler 3. İstanbul, 1998;87-100.

30) Ruzicka T. Atopic eczema between rationality and irrationality. Atopic eczema between rationality and irrationality. Arch Dermatol. 1998;134:1462-9.

31) Ruzicka T. Atopic eczema between rationality and irrationality. Atopic eczema between rationality and irrationality. Arch Dermatol. 1998;134:1462-9.

32) Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. Nat Rev Immunol 2004;4:978-88.

33) Hanifin JM, Tofte SJ. Update on therapy of atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:S123-5.

34) Leung DY,Tharp M, Boguniewicz M. Atopic dermatitis. In:Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolf K, Freedberg IM, Austen KF. Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine 5th ed Newyork, Mc Graw Hill, 1999;1464-80.

35) Dicarlo JB, McCall CO. Pharmacologic alternatives for severe atopic dermatitis. Int J Dermatol. 2001 Feb;40:82-8.

36) Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of toler.ance: the role of thymic lymphocytes. Immunology. 1970 May; 18:723-37

37) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self – tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

(CD25). Breakdown of a single mechanism of self- tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995 Aug 1; 155(3): 1151-64.

38) Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. CD4+ regulatory T cells: mechanism of induction and effector function. Autoimmun Rev. 2005 Nov;4(8): 491-6.

39) Myers AK, Perroni L, Costigan C, Reardon W. Clinical and molecular findings in IPEX syndrome. Arch Dis Child. 2006 Jan;91(1):63-4.

40) Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. Immunity. 2005 Mar;22(3):329-41.

41) Van Santen HM, Benoist C, Mathis D. Number of T reg cells that diferantiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. J Exp Med. 2004 Nov 15;200(10):1221-30.

42) Cupedo T, Nagasawa M, Weijer K, Blom B, Spits H. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. Eur J Immunol. 2005 Feb;35(2):383-90.

43) Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ. Hassal's cor puscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. Nature. 2005 Aug 25;436(7054):1181-5.

44) PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, S- tockinger B, Wraith DC, O'Garra A. IL-10- secreting regulatory T cells do not Express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occuring CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol. 2004 May 15;172(10):5986-93.

45) Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required fort he in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. J Immunol. 2004 Jun 1;172(11):6519-23.

46) Von Boehmar B. Mechanisms of supression by supressor T cells. Nat Immunol. 2005;6(4):338-344.

47) Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol. 2002 Jun;2:389-400.

48) Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occuring CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. Immunol Rev. 2006 Aug;212:60-73.

49) Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppresion by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J Exp. Med. 2001;194(5):629-44.

50) Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2004 Jul 13;101:10398-403.

51) Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and trypophan catabolism. Nat Rev Immunol. 2004 Oct;4:762-74.

52) Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Miglioriti G, Riccardi C. A new member of the tumor necrozis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1997 Jun 10;94:6216-21.

53) Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenburg D, Carreno BM, Collins M, Shevach EM. Engagement of glucocorticoid induced TNFR family- related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. J Immunol. 2004 Oct 15;173:5008-20.

54) Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppresion by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J EXP Med. 2001;194:629-44.

55) Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Falvell RA. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep16;100:10878-83.

56) Cosmi L, Liotta F, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Lasagni L, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Annunziato F, Romagagni S. Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the supressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokins. Blood. 2004 Apr 15;103:3117-21.

57) Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S. Phenotype, localization, and mechanism of supression of CD4+CD25+ human thymocytes. J Exp Med. 2002 Aug 5;196(3):379-87.

58) Chen W, Wahl SM. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell- mediated immunspression. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Apr;14:85-9.

59) Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF β1 maintains supressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. J Exp Med. 2005 Apr 4;201:1061-7.

60) Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop supressive activity: the role of İL-2, TGF β, and İL-10. J Immunol. 2004 May 1;172(9):5213-21.

61) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development bye the transcription factor foxp3. Science. 2003 Feb 14;299:1057-61.

62) Van Oostehout AJ, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. Eur Respir J. 2005 Nov;26:918-32.

63) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003 Apr;4:330-6.

64) Sakaguchi S. Naturally arising FOXP-3 expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and to nonself. Nat Immunol 2005;6:345-52.

65) Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. Immunol Rev. 2005 Feb;2003:156-64.

66) Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. J Allergy Clin Immunol. 2005 Nov;116:949-59.

67) Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoupolos C, Helms C, Bowcock AM. JM2, encoding a fork head- related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome. J Clin Invest. 2000 Dec;106:75-81.

68) Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occuring CD4+CD25+ regulatory T cells. Trends Immunol. 2004 Jul;25:374-80.

69) Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 15;102:4103-8.

70) Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. İnduction of Foxp3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. J Clin Invest. 2003 Nov;112:1437-43.

71) Grossman WJ, Vernsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. Immunity. 2004 Oct;21:589-601.

72) Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occuring CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. Immunol Rev. 2006 Aug;212:60-73.

73) Umetsu D, McIntire J,Macaubas C, *et al.* Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. Nat Immunol 2002; 3:715-720.

74) Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, *et al.* Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science 1994; 265:1237 1240.

75) Groux H, O'Garra A, Bigler M, *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigenspecific T-cell responses and prevents colitis. Nature 1997; 389:737-742.

76) Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, *et al.* In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. J Exp Med 2002; 195:603-616.

77) Chen W, Jin W, Hardegen N, *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 2003; 198:1875-1886.

78) Zheng SG, Wang JH, Gray JD, *et al.* Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. J Immunol 2004; 172:5213-5221.

79) Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, *et al.* The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. J Clin Invest 2005; 115:313-325.

80) Watanabe N, Wang Y, Lee H, *et al.* Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. Nature 2005; 436:1181-1185.

81) Yoo J, Omori M, Gyarmati D, *et al.* Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. J Exp Med 2005; 202:541-549.

82) Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanism of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor beta: the role of T regulatory cells. Immunology. 2006 Apr;117:433-42

83) Wing K, Fehervari Z, Sakaguchi S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. Int Immunol. 2006 Jul;18:991-1000

84) Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T hepler type 1 and Th2 inducing cytokins. J Axp Med. 2002 Mar4;195:603-16

85) Akdas CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. J Clin Invest. 1998 Jul 1;102:98-106

86) Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta- secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev. 2001 Aug;182:207-14

87) Berthelot JM, Maugars Y. Role for suppressor T cells in the pathogenesis of autoimmune disases (including rheumatoid arthritis). Facts and hypotheses. Joint Bone Spine. 2004 Sep;71:374-80

88) Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF beta secreting regulatory cells. Microbes Infect. 2001 Sep;3:947-54

89) Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th_3 regulatory cells. Immunol Rev. 2001 Aug;182:207-14.

90) Ito Y, Adachi Y, Makino T, Higshiyama H, Fuchizawa T, Shimizu T, Miyawaki T. Annals of Allergy, Asthma and Immunology. 2009;103:160-165.

91) Szegedi A, Barath S, Nagy G, Szodary P, Gal M, Sipka S, Bagdi E, Banham A.H, Krenacs L. Regultaory T cells in atopic dermatitis: epidermal dentritic cell clusters may contribute to their local expansion.British Journal of Dermatology. 2009;160:984-993.

92) Shiou L O, Goleva E, Hall C, Leung Y.M. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. J Allergy Clin Immunol. 2004;113:756-763.