



T.C
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLAR ANABİLİM DALI

VİTİLİGOLU HASTALARDA
DÜZENLEYİCİ T HÜCRELERİNİN VARLIĞININ
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Mehtap KIDIR

DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLAR
UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2011



**T.C
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLAR ANABİLİM DALI**

**VİTİLİGOLU HASTALARDA
DÜZENLEYİCİ T HÜCRELERİNİN VARLIĞININ
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mehtap KIDIR

**DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLAR
UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Ayşe Anıl KARABULUT

KIRIKKALE

2011

TEZ ONAYI

Uzmanlık Öğrencisinin Adı: **Dr. Mehtap KIDIR**

Çalışma Başlığı:

“Viteligolu Hastalarda Düzenleyici (Regülatuvar) T Hücrelerin Varlığının İmmünohistokimyasal Yöntemle Araştırılması”

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinde “Deri ve Zührevi Hastalıklar Uzmanlık Eğitimi” çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıda belirtilen jüri üyeleri tarafından uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / / 2011

Jüri Üyesinin İsim ve Ünvanı

İmzası

Prof. Dr. Mukadder KOÇAK
K.Ü. Tıp Fakültesi
Deri ve Zührevi Hastalıklar A.D. Bşk.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Pınar ATASOY
K.Ü. Tıp Fakültesi
Patoloji A.D. Öğretim Üyesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ayşe Anıl KARABULUT
K.Ü. Tıp Fakültesi
Deri ve Zührevi Hastalıklar A.D. Öğretim Üyesi

Jüri Üyesi
(Tez Danışmanı)

TEŞEKKÜR

Danışmanlığımı üstlenerek bana daima yol gösterici olan, engin deneyimi ile zamanını ve tüm bilgisini büyük bir cömertlikle sunarak karşılaştığım zorlukları aşmama yardımcı olan sayın hocam Doç. Dr. Ayşe Anıl Karabulut'a; uzmanlık eğitimim boyunca olan katkılarından dolayı Dermatoloji AD Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Mukadder Koçak'a ve desteğini, yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Özgür Gündüz'e, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım; Dr. Neriman Şahiner, Dr. Ayşe İşcan, Dr. Deniz Öztürk, Dr. Kıvılcım Çınkır, Dr. Esra Öcal ve Dr. Cihan Dikiş'e, çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, histopatolojik incelemeleri gerçekleştiren Patoloji AD öğretim üyesi sayın hocam Prof. Dr. Pınar Atasoy'a, verilerin istatistiksel analizlerinde yardım ve desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Biyoistatistik AD'dan Yrd. Doç. Dr. Serdal Kenan Köse'ye, tüm sıkıntılara rağmen yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Patoloji AD asistanı ve teknisyen arkadaşlarıma, hiçbir zaman esirgemediği sevgi ve desteği nedeni ile sevgili eşim Veysel Kıdır'a ve mutluluk kaynağım kızım Berra'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mehtap KIDIR

Aralık 2011

ÖZET

Düzenleyici T (Treg) hücreleri; timusta elimine edilemeyen ve kişinin kendi yapılarına karşı saldırgan özellik taşıyan öze tepkili (“self” reaktif) T hücrelerini kontrol altında tutarak immün sistemin homeostazisine katkı sağlamaktadır. CD25 yüzey belirteci ve Foxp3 (“Forkhead box protein 3”) nükleer transkripsiyon faktörü ekspresyonu ile karakterize olan Treg hücrelerinin eksikliğinin otoimmün ve inflamatuvar süreçlerin başlamasına zemin hazırladığı gösterilmiştir. Günümüzde Treg hücre yetersizliğinin vitiligo patogenezindeki önemini sorgulayan az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada; vitiligolu olgulara ait lezyonlu ve lezyonsuz deri örnekleri ile normal deri kesiti içeren kontrol materyallerinde; Treg hücreleri ve bu hücrelerin temel sitokinleri olan interlökin-10 (IL-10) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF)-beta'nın doku dağılımları belirlenerek örnekler arası istatistiksel karşılaştırma yapılması hedeflenmiştir. Çalışma hipotezi; vitiligolu hastalara ait kesitlerde Foxp3 ekspresyonu ile kendisini gösteren Treg hücrelerinin (öncelikle) lezyonel deride; lezyonsuz ve kontrol materyallerine göre düşük olması nedeniyle otoimmün sürecin gelişmiş olması olasıdır. Çalışmaya; lokal etik kurul onayı alındıktan sonra Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar AD polikliniğine başvurarak, tanısı klinikopatolojik olarak doğrulanmış olan, 30 gönüllü, erişkin, vitiligolu olgu davet edilmiş, onam formlarını onaylayan hastalara ait deri örnekleri hasta grubu materyallerini oluşturmuştur. Hasta grubunda; yaşları 18-63 yıl arasında değişen, 13 erkek, 17 kadın, 16'sı vitiligo vulgaris, 11'i akrofasiyal vitiligo, 3'ü universal vitiligo tipte vitiligo olgusu yer almaktadır. Kontrol grubu materyalleri olarak KÜTF Patoloji AD arşivinde yer alan 30 benign melanositik nevüs olgusunun eksizyon örneklerindeki normal deri alanları değerlendirilmiştir. Tüm örnekler standart immünohistokimyasal yöntemi ile CD4, CD25, Foxp3, IL-10, TGF-â için boyanarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında vitiligo lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinde Foxp3 ve CD4 ekspresyonunda düşüklük, TGF-â ekspresyonunda yükseklik izlendi. CD25 ekspresyonu düzeyleri hem lezyonlu hem de lezyonsuz deride kontrollerden daha düşükken; lezyonsuz deride lezyonlu deriye göre daha yüksekti. IL-10 epidermal düzeyleri lezyonsuz deride kontrol grubuna göre dermiste kontrol grubunda lezyonsuz deri örneklerine göre daha yüksek bulunmuştur. İmmünohistopatolojik veriler ile hastalık süresi, otoimmün hastalık öyküsü hastalık yaygınlığı, aktivite skoru, Koebner fenomeninin varlığı arasında korelasyon saptanmamıştır.

Bu çalışma ile vitiligoda Treg hücrelerinin ve temel sitokini olan IL-10 eksikliğinin otoimmün süreçlere katkı sağladığını destekleyen sonuçlar edilmiştir. Bununla birlikte vitiligo etyopatogenezinde Treg hücrelerinin rolünü ortaya koyacak ileri çalışmalar gereklidir.

Anahtar kelimeler: Vitiligo, patogenez, düzenleyici T hücreleri, Foxp3, interlökin-10, transforme edici büyüme faktörü-beta.

İNGİLİZCE ÖZET “ABSTRACT”

Regulatory T cells (Treg); contribute the immune system homeostasis by controlling the self reactive T cells that could not be eliminated in timus with aggressive features towards one's own structures. Deficiency of Treg cells; characterized by CD25 and Foxp3 (Forkheadbox protein 3) nuclear transcription factor expressions, are shown to lend basis to start the autoimmune and inflammatory processes. Currently there are only a few studies questioning the importance of pausity of Tregs in vitiligo pathogenesis.

In this study; we intended to find out the tissue distribution of Treg cells and their basic cytokines: interleukin-1 (IL-10) and transforming growth factor (TGF)-beta, among the lesional and non-lesional skin sections of the vitiligo patients, also the normal skin sections as the control materials to be compared with statistically. The hypothesis of this study is that; The autoimmune process in vitiligo possibly occurs due to pausity/deficiency of Treg cells/cytokines manifested with lower expression of Foxp3 in (primarily) the lesional skin of the vitiligo patients than the non-lesional and control skin. Following the local ethics committee approval, the patients previously attended to the University of Kirikkale, Medical School (KUTF), Dermatovenereology Dept. diagnosed clinicopathologically as vitiligo were invited to the study. The patients group was composed of 30 adult volunteers (17 women/13 men) with vitiligo (16 vitiligo vulgaris, 11 acrofacial vitiligo and 3 vitiligo universalis), aged between 18-70 years who signed informed consent. As the control group; 30 normal skin sections obtained from the perilesional regions of the excision samples of benign melanositic nevii were selected from the archives of the KUTF Dept. of Pathology. All sections were stained for CD4, CD25, Foxp3, IL-10, TGF- β with standart immunochemical protocols and analysed.

Compared with the control group, the lesional and non-lesional skin sections of the vitiligo group showed a lower expression profile for Foxp3 and CD4 and an higher expression for TGF- β . The expression of CD25 in lesional and non-lesional skin were lower than the controls whereas higher expressions were observed in non-lesional skin than the lesional sites. IL-10 levels were significantly lower in the samples of lesional skin compared with the non-lesioned skin. The IL-10 expressions were higher in the epidermis of the lesional skin. Contrarily the expression levels were higher in the dermis of the control group compared with vitiligo lesions. In the study group, there were no correlation between; CD4, CD25, Foxp3, IL-10 and TGF- β expressions with the duration of disease, autoimmune disease history, disease activity score or Koebner positivity.

In this study; supporting results are obtained about that the pausity of Treg cells and their main cytokine Il-10, contributing to the autoimmune processes in vitiligo. However there seems further studies are required to reveal the evidence for the role of Treg cells in vitiligo pathogenesis.

Keywords: Vitiligo, pathogenesis, regulatory T cells, Foxp3, interleukin-10, transforming growth factor-beta.

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa</u>
TEZ ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR SAYFASI	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET (“ABSTRACT”)	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. VİTİLİGO	3
2.1.1. TANIM ve TARİHÇE	3
2.1.2. EPİDEMİYOLOJİ	3
2.1.3. ETYOPATOGENEZ	4
2.1.4. KLİNİK BULGULAR ve SINIFLANDIRMA	11
2.1.5. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	14
2.1.6. LABORATUVAR BULGULARI	15
2.1.7. TANI ve AYIRICI TANI	15
2.1.8. TEDAVİ	15
2.1.9. KLİNİK SEYİR ve PROGNOZ	19
2.2.OTOİMMUNİTE VE SELF TOLERANS	20
2.3. DÜZENLEYİCİ T HÜCRELERİ (Treg HÜCRELERİ)	21
2.3.1. TANIM ve TARİHÇE	21
2.3.2. Treg HÜCRELERİ ALT GRUPLARI ve FONKSİYONLARI	22
3. HASTALAR, GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. ETİK KURUL VE PROJE DESTEK ONAYI BİLGİLERİ	33
3.2. HASTA SEÇİMİ ve HASTA GRUBU MATERYALLERİ	33

3.3. KONTROL GRUBU MATERYALLERİ	34
3.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM ve İMMÜNOHİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ	34
3.4.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM	34
3.4.1.1. CD4 immünohistokimyasal boyama yöntemi	35
3.4.1.2. CD25 (IL-2R α) immünohistokimyasal boyama yöntemi	36
3.4.1.3. Foxp3 immünohistokimyasal boyama yöntemi	37
3.4.1.4. TGF- β immünohistokimyasal boyama yöntemi	38
3.4.1.5. IL-10 immünohistokimyasal boyama yöntemi	39
3.4.2. İMMÜNOHİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ	40
3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	72
7. KAYNAKLAR	75
8. EKLER	89
8.1. ÇALIŞMA FORMU	89
8.2. HASTA ONAM FORMU	92

SİMGELER ve KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış olan kısaltmalar ile simgeler; açıklamaları ve tırnak içindeki kısaltmaya temel oluşturan orijinal ifadeleri ile birlikte sunulmuştur.

<p>ANA: Antinükleer antikor</p> <p>APA: Antitiroid peroksidaz antikor</p> <p>APECED: Otoimmün poliendokrinopati kandidiazis ektodermal distrofi (“Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy”) sendromu</p> <p>ASH: Antijen sunan hücre</p> <p>cAMP: 3',5'-siklik adenozin monofosfat</p> <p>CCL : Kemokin ligand (“Chemokine ligand”)</p> <p>CCL1: Kemokin ligand 1</p> <p>CCL17: Kemokin ligand 17</p> <p>CCL22 : Kemokin ligand 22</p> <p>CCR: Kemokin reseptör</p> <p>CCR4 : Kemokin reseptör 4</p> <p>CCR8: Kemokin reseptör 8</p> <p>CLA: Kutanöz lenfosit antijeni (“Cutaneous lymphocyte antigen”)</p> <p>CTL: Sitotoksik T lenfosit (“Cytotoxic T lymphocyte”)</p> <p>CTLA-4 : Sitotoksik T-lenfosit antijeni – 4</p> <p>COMT: Katekol-O-metil transferaz</p> <p>DBUVB: Dar bant ultraviyole B</p> <p>DH: Dendritik hücre</p> <p>Ex-Treg: Foxp3 ekspresyonunu kaybetmiş T hücresi</p> <p>Foxp3: “Forkhead box protein 3”</p> <p>GITR: Glukokortikoidle indüklenen tümör nekroz faktörü reseptörü (“Glucocorticoid induced tumour necrosis factor receptor”)</p> <p>ICAM-1: İnterselüler adezyon molekülü-1 (“Intercellular adhesion molecule-1”)</p> <p>IFN-γ: İnterferon-gama</p> <p>IL: İnterlökin (“Interleukin”)</p> <p>IL-2: İnterlökin-2</p>	<p>IL-2R: İnterlökin 2 reseptör</p> <p>IL-6: İnterlökin-6</p> <p>IL-8: İnterlökin-8</p> <p>IL-10: İnterlökin-10</p> <p>IL-17: İnterlökin-17</p> <p>IL-35: İnterlökin-35</p> <p>IPEX: İmmün disregülasyon-poliendokrinopati-enteropati-X</p> <p>iT_{reg}: İndüklenebilen (adaptif) düzenleyici T hücresi</p> <p>LH: Langerhans hücresi</p> <p>MAO : Monoamin oksidaz</p> <p>MHC: Doku uyum kompleksi (“Major histocompatibility complex”)</p> <p>nT_{reg}: Doğal düzenleyici T hücresi</p> <p>NPY: Nöropeptit Y</p> <p>PUVA : Psoralen ultraviyole A</p> <p>Teff: Otoreaktif (efektör) T hücresi</p> <p>TGF-β: Transforme edici büyüme faktörü-beta (“Transforming growth factor beta”)</p> <p>Th: T yardımcı</p> <p>THR: T hücre reseptörü</p> <p>TKS: Topikal kortikosteroidler</p> <p>TNF-α: Tümör nekroz faktörü -alfa</p> <p>Treg hücresi: Düzenleyici (regülatuar) T hücre (“T regulatory cell”)</p> <p>TRP1: Tirozinaz ilişkili protein 1</p> <p>TRP2: Tirozinaz ilişkili protein 2</p> <p>TSH: Tiroid stimulan hormon</p> <p>UVA: Ultraviyole A</p> <p>UVB: Ultraviyole B</p> <p>VIDA: Vitiligo hastalık aktivite skoru (“Vitiligo Disease Activity Score”)</p>
--	--

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1. Melanin sentez basamakları.	5
Şekil 2. Doğal ve indüklenmiş düzenleyici T hücrelerinin oluşumları ve sitokinlerle olan ilişkileri.	25
Şekil 3. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin CD4'e ait immünohistopatolojik görünüşleri.	45
Şekil 4. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin CD25'e ait immünohistopatolojik görünüşleri.	48
Şekil 5. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin Foxp3'e ait immünohistopatolojik görünüşleri.	51
Şekil 6. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin IL-10'a ait immünohistopatolojik görünüşleri.	55
Şekil 7. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin TGF- β 'ya ait immünohistopatolojik görünüşleri.	59

TABLolar

Sayfa

Tablo 1. Vitiligo klinik sınıflandırması.	12
Tablo 2. Vitiligo Hastalık Aktivite Skoru (VIDA) skorlaması ölçütleri.	19
Tablo 3. Doğal ve indüklenmiş CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücrelerin temel özellikleri.	24
Tablo 4. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikorlar.	35
Tablo 5. Vitiligolu hasta grubuna ait özellikler.	42
Tablo 6. Hasta grubunun vitiligo klinik tiplerine göre dağılımı.	42
Tablo 7. Hasta grubunun VIDA skorlarına göre dağılımı.	43
Tablo 8. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde CD4 için gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.	46
Tablo 9. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde CD25 için gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.	49
Tablo 10. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde Foxp3 için gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.	52
Tablo 11. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde IL-10 için gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.	56
Tablo 12. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde TGF- β için gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.	60
Tablo 13. Hasta grubunda; otoimmün hastalık varlığı ve ailede otoimmün hastalık öyküsü varlığı, Koebner fenomeninin varlığı açısından oluşturulan alt gruplar arasında immünohistokimyasal parametrelerin lezyonlu ve lezyonsuz deri örnekleri dikkate alınarak gerçekleştirilen istatistiksel karşılaştırması.	62
Tablo 14. Hasta grubunda; lezyonlu ve lezyonsuz deri örnekleri için VYA (vücut yüzey alanı), VIDA (Vitiligo hastalık aktivite skoru) skoru ve hastalık süresi ile immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişkiler.	63

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vitiligo; melanositlerin kaybı ile seyreden, klinikte depigmente maküler lezyonlarla karakterize olan, sık karşılaşılan bir pigmentasyon bozukluğu hastalığıdır. Genellikle ilerleyici seyir gösteren vitiligo, hastaların yaşam kalitesini belirgin düzeyde etkilemekte, özgüven kaybına, sosyal ilişkilerde, iş ve evlilik hayatında olumsuzluklara neden olabilmektedir. Olguların önemli bir kısmında ise tedavi güçlüğü yaşanmaktadır. Etyopatogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamış olan vitiligoda otoimmün süreçlerin rolü üzerinde durulmaktadır. Vitiligoda temel patoloji olarak bazal tabakadaki melanositlerin otoreaktif T hücrelerinin sitotoksik aktivitesi ile ilişkili olarak yıkıma uğradığı görüşü hakimdir.

Düzenleyici (regülatuar) T hücreleri (Treg hücreleri); CD4+ T hücre popülasyonunun % 5-10'lık kısmını oluşturan, immün yanıtların profesyonel olarak baskılanmasında rol oynayan, periferik öz-tolerans ("self-tolerance") ve immün homeostazın idamesinde vazgeçilmez bir kontrol unsuru olan, bir T hücre alt grubudur. CD25 yüzey belirteci ve Foxp3 ("Forkhead box protein 3") nükleer transkripsiyon faktörü ekspresyonu ile karakterize olan Treg hücrelerinin eksikliğinin otoimmün ve inflamatuvar süreçlerin başlamasına zemin hazırladığı gösterilmiştir. Bu nedenle Treg hücrelerinin doku dağılımının veya fonksiyonlarının yetersiz olduğunun saptanması vitiligo gibi otoimmün patogeneze sahip pek çok klinik durumun patogenezi için aydınlatıcı olacaktır.

Vitiligo patogenezinde Treg hücrelerindeki yetersizliğin rolünü ortaya koyan çok sınırlı veri bulunmaktadır. Çalışmamızda; vitiligoda Treg hücrelerinin yanı sıra bu hücrelerin fonksiyonuyla ilintili temel sitokinler olan interlökin-10 (IL-10) ve transforme edici büyüme faktörü-beta'nın (TGF- β 'nin) lezyonlu ve lezyonsuz vitiligolu hasta derisindeki varlığı ile dağılımının ortaya konması planlanmıştır. Normal kontrol deri örnekleriyle karşılaştırılarak gerçekleştirilmesi planlanan çalışma ile Treg hücrelerinin vitiligo patogenezindeki rolü hakkında bilimsel katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Bu amaçla; araştırmaya Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Danışma Kurulu Başkanlığı'nın yazılı onayın alınmasını takiben, KÜTF Deri ve Zührevi Hastalıklar AD polikliniğine başvurarak klinik bulgularla vitiligo tanısı konularak, KÜTF Patoloji AD tarafından gerçekleştirilen histopatolojik

değerlendirmeye vitiligo tanısı doğrulanmış olan hastaların davet edilmesi uygun bulunmuştur. Çalışma grubuna; 18-70 yaşları arasındaki 30 gönüllü, erişkin, vitiligolu olgunun dahil edilmesi ve hasta grubu materyali olarak vitiligolu hastalardan; çalışma öncesi tanı aşamasında alınmış olan, lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları içeren rutin biyopsi örneklerine ait parafin bloklardan hazırlanan kesitlerin değerlendirmeye alınması planlanmıştır. Kontrol materyali olarak; Patoloji AD arşivinde yer alan, 30 olguya ait, benign melanositik nevüs nedeniyle eksize edilen deri materyallerindeki perilezyonel normal deri alanlarının değerlendirilmeye alınması uygun bulunmuştur. Hasta ve kontrol materyallerinin tamamında standart immünohistokimyasal yöntemle boyanmış kesitlerde: CD4, CD25, Foxp3, TGF- β ve IL-10'un doku dağılımının araştırılması ve çalışma verilerinin istatistiksel analizi çerçevesinde örnekler arası karşılaştırma yapılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. VİTİLİGO

2.1.1. TANIM ve TARİHÇE

Vitiligo; her yaşta, her ırkta ve cinsiyette ortaya çıkan, deride pigment kaybı sonucu tebeşir beyazı maküllerle karakterize, genellikle ilerleyici seyir gösteren sık karşılaşılan edinsel bir pigmentasyon bozukluğu hastalığıdır. Depigmentasyonun nedeni epidermal melanositlerin hasarlanmasıdır (1-5). Halk dilinde “Ala Hastalığı” adıyla anılmaktadır.

İlk olarak MÖ 2. yüzyılda Romen fizikçi Celsus’un ‘*De medicina*’ isimli kitabında kullanılan “Vitiligo” kelimesinin, Latince leke ya da hata anlamına gelen ‘*vitium*’ kelimesinden türediği belirtilmektedir (6). Vitiligonun eski Hint ve Budist kaynaklarda ‘*kilasa*’, ‘*sveta khista*’, ‘*charak*’ olarak isimlendirildiği ancak lepra ile karıştırılmış olduğu ileri sürülmektedir. Ebers papirüsleri (MÖ 1500) ve Hipokrat’a (MÖ 460-355) ait kaynaklarda ise vitiligo özgün bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (7-10).

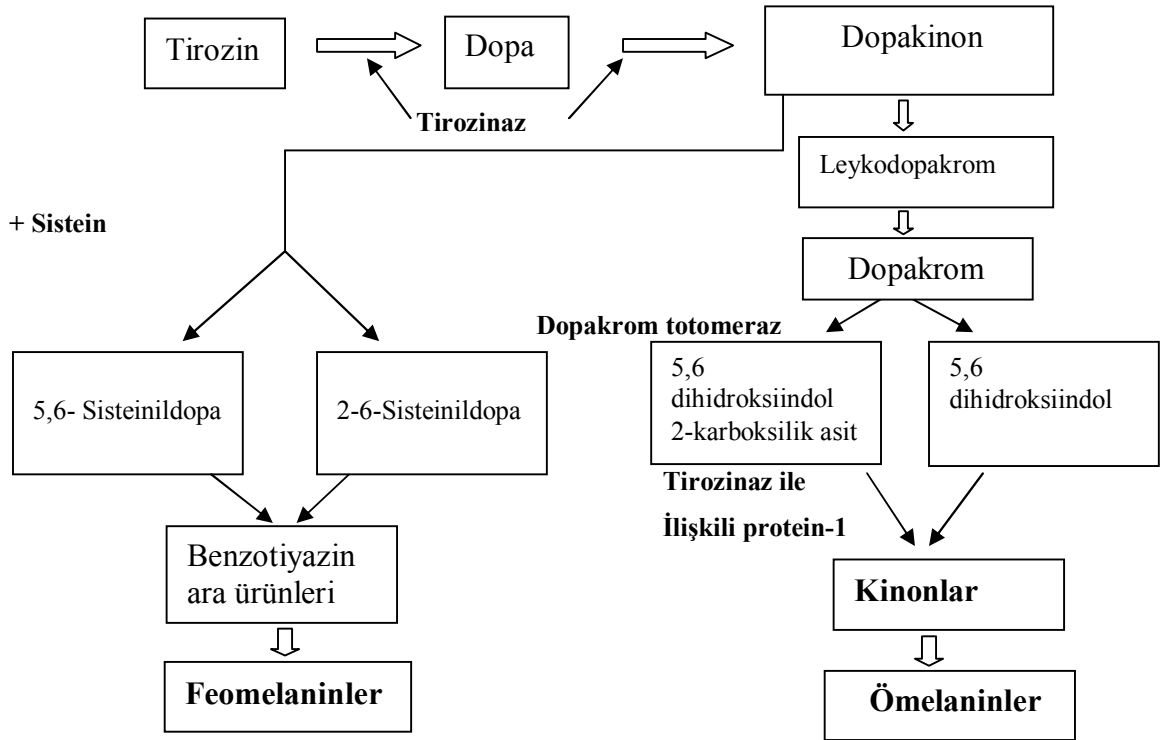
2.1.2. EPİDEMİYOLOJİ

Dünya genelinde vitiligo prevalansı % 0.1-2 arasında bildirilmiştir (11). Ülkemizde vitiligo sıklığı % 0.15-0.32 olarak bildirilmiştir (12). Hastalığın başlama yaşı genellikle 10-30 yaş aralığında olmakla birlikte, vitiligo her yaşta gelişebilir (13). Tüm ırklarda görülebilir ve her iki cinsiyeti de eşit derecede etkiler. Bununla birlikte, kadınlarda ve esmer bireylerde daha yoğun kozmetik kaygıya yol açarak daha sık başvuruya neden olmaktadır (11). Koebner fenomeni dışında kanıt bulunmamakla birlikte vitiligolu olguların büyük kısmına ait anamnezde hastalığın ortaya çıkışının hemen öncesinde önemli olayların (fiziksel ve emosyonel travma, güneş yanığı, gebelik, ciddi hastalık vb.) yaşandığı belirtilmektedir (4).

2.1.3. ETYOPATOGENEZ

Vitiligo etyopatogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamış, epidermiste fonksiyonel melanosit kaybının nedenini açıklamaya yönelik çok sayıda teori geliştirilmiştir. Melanositler, melanin pigmenti sentezini gerçekleştiren hücrelerdir (11). Melanositlerin öncüsü olan ve nöral yarıktan köken alan melanoblastlar farklılaşma evresini tamamlayarak epidermal bazal tabaka, kıl bulbusu, retinal pigment epiteli, uveal traktus, stria vaskülaris, endolenfatik kanallar ve leptomeninkse göç ederek bu dokularda yerleşir (14). Epidermal bazal tabakada melanositlerin keratinositlere oranı 1:5'dir (15). Melanin, özellikle keratinosit nükleuslarının üzerini kaplayarak, ultraviyolenin (UV'nin) oluşturacağı DNA hasarını engelleyen özel bir pigmenttir (14). İnsan derisinde melanositlerde kahverengi siyah ömelanin ve sarı-kırmızı feomelanin olmak üzere iki tip melanin, melanozom olarak adlandırılan lizozom benzeri hücre içi organellerde sentezlenerek paketlenir. Melanozamlar, melanositlerin dendritleri aracılığıyla tam olarak açıklanmamış bir mekanizma ile çevresindeki epidermal ve foliküler keratinositlere aktarılır (14, 16). Keratinositler içinde melanozomların dağılım şekli deri rengini belirler (16). Her bir melanositin dendritik uzantılarıyla ilişki halinde olduğu yaklaşık 36 keratinositte oluşan yapıya 'epidermal melanin ünitesi' adı verilir (15). Vitiligolu deri sınırındaki keratinositlerde sitoplazmik vakuolizasyonlar ve ekstraselüler granüler materyal gözlenmiştir. Lezyonel deride Langerhans hücre sayısında azalma ve artma şeklinde morfolojik ve fonksiyonel farklılıklar rapor edilmiştir. Bu veriler vitiligonun epidermal melanin ünitesi ve Langerhans hücrelerindeki fonksiyonel bozuklukla ilişkili olabileceğine işaret etmektedir (4).

Tirozinden başlayan melanin biyosentezi başta anahtar enzim olan tirozinaz olmak üzere, P geni, tirozin ile ilişkili protein 1 (TRP1) ve membran ilişkili taşıyıcı protein (MATP) tarafından düzenlenir. Melanin sentez basamakları Şekil 1'de özetlenmektedir.



Şekil 1. Melanin sentez basamakları (14).

Vitiligo multifaktöriyel, poligenik bir hastalık olup patogenezi karmaşıktır. Etyopatogenezi; genetik faktörler, nöral faktörler, antioksidan sistemde yetersizlik, biyokimyasal anormallikler, melanoblast/melanosit kök hücrelerin tükenmesi durumu, tanımlanamamış melanosit büyüme faktörlerinin eksikliği ve viral faktörlerin etkisi üzerinde durulmaktadır (3,11,17). Bu faktörlerle ilişkili olarak geliştirilen ve günümüzde en geçerlisi otoimmün teori olarak kabul gören pek çok teori geliştirilmiştir. Vitiligo etyopatogenezi ile ilişkilendirilen faktör ve teoriler şu şekilde özetlenebilir:

1- Genetik Faktörler: Vitiligo olgularının % 20'sinin birinci derece akrabalarından en az birinde, vitiligo bulunduğu bildirilmiştir (3). Melanin biyosentezi, oksidatif gerilime verilen yanıt (katalaz; PTPN22, sitotoksik T-lenfosit antijeni-4 [CTLA-4], ve otoimmün regülatuar protein [AIRE] loküsleri; mannoz bağlayıcı lektin-2 [MBL-2] genleri vb.) ve otoimmünitenin düzenlenmesinde rol oynayan genlerle ilişkili poligenik kalıtım üzerinde durulmaktadır (3, 18-24). Vitiligoda; HLA-A2, -A31, -B13, -B27, -B56, -B60, -Cw6, -DR4, -DR5, -DR7, -DR53 ve DQ3 ile ilişki saptanmıştır (3, 18, 25, 26).

2- Nöral Faktörler: Nöral hipotez; stres ve ciddi emosyonel travmanın vitiligoyu başlatabileceği veya presipite edebileceği gözlemlerine dayandırılmıştır (27). Segmental vitiligonun özgün paterni, sinir uçlarından salınan bazı kimyasal mediyatörlerin melanin üretiminde azalmaya neden olabileceği hipotezine yol açmıştır (3). Nöropeptit Y (NPY), periferik ve santral sinir sistemi boyunca nöronlardan salgılanan, vitiligolu deride yüksek düzeyde saptanmış bir nöropeptittir. NPY de dahil çeşitli nöromediyatörlerin deri ve immün hücre fonksiyonlarını düzenledikleri ileri sürülmüştür (28). Nöral krestten köken alan melanositlerin depigmente derideki sinir sonlanmalarıyla yakın ilişki halinde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca depigmente yamaların merkezinde ve çevresinde dejeneratif, rejeneratif otonomik sinirlerin varlığı ile dermal Schwann hücre bazal membranında kalınlaşma gözlenmiştir (7). Bu veriler nöral faktörlerin direkt veya immünite üzerinde etkileri yoluyla vitiligo patogenezinde rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.

3- Biyokimyasal faktörler: Vitiligodaki ana biyokimyasal anormallikler; katekolamin seviyesinde yükseklik ve redoks dengesinde bozukluktur (1). Vitiligolu hastalarda norepinefrin, epinefrin, DOPA vb. katekolaminlerin ve bunların metabolitleri olan 3-metoksi-4-hidroksifenilglükol, normetanefrin, metanefrin, vanilmandelik asit, homovanilik asitin serum ve idrar seviyeleri yüksek bulunmuştur (29). Vitiligo hastalarında guanozin 5'-trifosfat siklohidrolaz I (GTPCH1) aktivitesinin 3-5 kat yüksek olması sonucu aşırı miktarda yeni tetrahidrobiopterin (6-BH4) sentezlenmektedir. Bunun sonucunda: epidermiste 6-BH4 metaboliti olan 7-tetrahidropterin (7-BH4) birikimi ile keratinositlerde katekolamin sentezinde artış ortaya çıkmaktadır (30). Norepinefrinin aşırı üretilmesiyle ilişkili olarak 6BH-4 sentezinde artış, monoamin oksidaz (MAO)-A ve katekol-O-metil transferaz (COMT) uyarımı gerçekleşmektedir (31, 32). MAO-A aktivitesindeki artışın ve 6-BH4 geri dönüşümünün defektif olmasının bir diğer sonucu olarak hidrojen peroksit toksik seviyelerde birikime uğramaktadır (30, 33).

4- Oksidan-antioksidan sistem bozukluğuna ait faktörler: Oksidan stres teorisi oksidatif stresin vitiligo patogenezinde rol oynuyor olabileceğini ileri sürmektedir. Toksik etkiye sahip olan serbest radikallerin birikiminin, melanosit yıkıma neden olduğu düşünülmektedir. Vitiligo hastalarının serumlarında ve melanosit kültürlerinde nitrik oksit seviyelerinde artış saptanmıştır (11). Kontrol hastalarıyla karşılaştırıldığında, vitiligo hastalarının eritrositlerinde serbest radikallere bağlı hasarı önleme fonksiyonu gören glutatyon seviyeleri daha düşük bulunmuştur (34).

Vitiligolu hastalarda ayrıca düşük epidermal katalaz düzeyine bağlı olarak epidermiste hidrojen peroksit düzeyinin artmış olduğu gösterilmiştir (35). Bu veriler, vitiligolu hastaların daha yüksek düzeyde oksidatif gerilime maruz kaldığına işaret etmektedir (11).

5- Viral faktörler: Vitiligo patogenezinde viral faktörlerin rolü sınırlı veriler nedeniyle tartışmalıdır. *Grimes ve ark.* çalışmalarında, vitiligolu hastaların deri örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu ile % 38 oranında sitomegalovirüs (CMV) viral genomu varlığını ortaya koyarak, CMV'nin vitiligoda tetikleyici olarak etki etmiş olabileceğini ileri sürmüşlerdir (36). Vitiligo patogenezinde rol oynadığı düşünülen diğer virüsler; Hepatit C virüsü, Epstein-Barr virüsü ve İnsan İmmün Yetmezlik virüsü (HIV) olarak bildirilmiştir (37, 38).

5- Melanosit büyüme faktörü eksikliği: Epidermiste melanosit aktivitesi ve sağkalımı için gerekli olan keratinosit kaynaklı sitokinlerin (granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör ve temel fibroblast büyüme faktörü vb.) azaldığı gösterilmiştir (39). Melanoblastların düzgün dağılımı ve sağkalımı için hayati önem taşıyan bir kök hücre reseptörü olan c-KIT ekspresyonu da vitiligoda lezyonlu epidermiste görülmez. Bu bulgular vitiligolu deride melanosit prekürsörlerinin olmadığını göstermektedir (40). Bu nedenle, vitiligolu deride epidermal kök hücrelerinden farklılaşarak repigmentasyon oluşturulması mümkün değildir. Bununla birlikte vitiligo lezyonlarındaki kıl folikülünün şişkin ("bulge") bölümünde c-KIT ekspresyonu gösteren melanosit öncülleri kaynağı bulunur. Bu bölgede melanosit farklılaşmasının uyarılması ve kıl kökünden göç etmesi, PUVA gibi melanogenezi uyarıcı vitiligo tedavilerinde başarı sağlayabilir. Bu durumda, tedavi yanıtı vitiligolu alanda foliküler noktasal repigmentasyon odakları şeklinde kendisini göstermektedir (40, 41).

6- İmmünolojik ve otoimmün faktörler: Güncel veriler vitiligo etyopatogenezinde hücrel bağışıklığın, otoimmünitenin ve sitokinlerin önemli rollerinin olduğunu göstermektedir (42). Segmental olmayan vitiligonun otoimmün hastalıklarla birlikteliği iyi bilinmektedir. Vitiligo olgularında bildirilen hastalıklar; Addison hastalığı, diyabetes mellitus, alopesi areata, pernisiyöz anemi, sistemik lupus eritematozus, inflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit, psoriasis, liken planus, otoimmün poliglandüler sendrom, sarkoidoz, ve kronik aktif hepatit olarak sıralanabilir (3, 17). Geniş hasta grupları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda ise vitiligonun, tiroid yetmezliği ve tiroid antikorları ile anlamlı ilişkisi olduğu

kanıtlanmıştır (43-45). Vitiligoya eşlik eden tiroid yetmezliği, subklinik veya klinik düzeyde olabilir; Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, hipertiroidi veya hipotiroidi olarak görülebilir. İlginç olarak vitiligo genellikle tiroid hastalığı öncesi ortaya çıkmaktadır ve bu durum, tiroid yetmezliği ve tiroidle ilişkili antikolar için düzenli bir taramaya gerek olduğunu göstermektedir (45). Organ-spesifik antikolar daha çok klinik veya subklinik otoimmün hastalığın gelişimi için pozitif bir gösterge olarak kabul edilmekte ve hastanın takibi sırasında hedef organların düzenli ve fonksiyonel bir şekilde incelenmesini gerekli kılmaktadır (46). Otoantikoların pozitif olduğu hastaların aile fertlerinde otoimmün hastalıklarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (44).

Vitiligo patogenezinde hem hücresel hem de hümorale immün sistem suçlanmıştır.

Humoral immünite: Otoimmün patogenezi destekleyen kanıt vitiligolu hastaların serumlarında melanositlere karşı otoantikoların gösterilmesi olmuştur. Jeneralize vitiligolu hastaların % 80'inde normal melanosit yüzeyine karşı otoantikor tespit edilmiştir (47). Bununla birlikte bu otoantikoların melanositlerde yıkıma yol açan antikolar mı olduğu yoksa harap olan melanositlerde açığa çıkan antijenik yapılara karşı gelişmiş antikolar olup bir epifenomeni mi yansıttığı konusunda sorular devam etmektedir. Hayvan deneylerinde, vitiligo lezyonları öncesi otoantikoların var olduğu ortaya konulmuştur. Otoantikoların antijenik hedefleri melanositik sitoplazmik antijenler ve yüzey antijenleri ile sınırlı kalmayıp, melanositler dışında yaygın doku antijenlerini de kapsamaktadır. Bu antikoların normal bireylerde veya başka deri hastalığı olan bireylerde görülme sıklığı düşüktür (17). Çalışmalarda, otoantikoların IgG grubuna ve IgG1, IgG2, IgG3 alt gruplarına ait oldukları saptanmıştır. IgG ve C3 depolanmasının vitiligo lezyonlarında bazal membran zonunda ve keratinositlerde gerçekleştiği gösterilmiştir (17). Melanosit hücre yüzey antijenlerine karşı gelişmiş otoantikoların *in vivo* ve *in vitro* şartlarda melanositleri öldürme yeteneğinde olduğu izlenmiştir. Bu antikoların düzeylerinin hastalığın yaygınlığı ve aktivitesi ile korele olduğu belirtilmiştir (3). Bazı araştırmacılar, vitiligo aktivitesi ile IgA düzeyi arasındaki ilişkinin, melanosit hücre membranına karşı oluşan IgG tipi antikor düzeyi ile arasındaki ilişkiden daha kuvvetli olduğunu ileri sürmüşlerdir (17).

Bir grup vitiligolu hastada melanosit/melanom antijeni Melan A/MART-1'e karşı antikorlar saptanmıştır (47). MART-1 ve melanozomal matriks glikoproteini olan Pmel17 (gp100) melanositik hücrelerinin en immünojenik antijenleridir (48). Tirozinaz, Tirozinaz ilişkili protein-1 (TRP-1) ve Tirozinaz ilişkili protein-2 (TRP-2) de otoantijen olarak saptanmıştır, ancak bu iddiayı destekleyen veriler çelişkilidir (49). Vitiligoda ayrıca 40-45 kD ve 75 kD ağırlığında olan VIT 40-45 ve VIT 75 isimli genel doku antijenlerine, 65 kD ve 90 kD ağırlığında pigment hücrelerine spesifik antijenlere karşı otoantikorlar saptanmıştır (50). Nöral yarıktan köken alan dokuların farklılaşmasında rol oynayan Sry ile ilişkili yüksek mobilite grubu (SOX) transkripsiyon faktörleri, çoklu endokrin sendromla ilişkili vitiligo hastalarında melanositik otoantijenler olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda otoimmün endokrinopati ile ilişkisi olmayan vitiligo hastalarında da rolü olduğu ileri sürülmüştür. Vitiligoda T lenfositlerdeki hücre alt grupları arasında dengesizliklerin yanı sıra hastalık başlangıcında B lenfosit oranında da bir yükselme olduğu saptanmıştır (17).

Segmental olmayan vitiligo hastaları sağlıklı kontrol hastalarıyla karşılaştırıldığında; anti-tiroglobulin, anti-tiroid mikrozomal ve anti-pariyetal hücre gibi organ/doku spesifik otoantikorların belirgin yüksek olduğu görülmektedir (3). PUVA tedavisine veya takiben yapılan sistemik steroid tedavisine cevap veren vitiligo hastalarında, otoantikor seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir (17).

Hücre sel immünite: Jeneralize vitiligoda perilezyonel deride gerçekleştirilen immunohistokimyasal çalışmalarda CD4 ve CD8 T hücre yoğunluğunun saptandığı bildirilmiştir. Sıklıkla CD4/CD8 oranında azalma ve interlökin 2 reseptör (IL-2R ya da CD25), HLA-DR ve MHC (Doku uyum kompleksi) II gibi moleküllerin ekspresyonlarında artma gözlemlendiği rapor edilmiştir. *In vitro* çalışmalarda aktif vitiligolu hastaların monositlerinde proinflamatuvar sitokinler olan interlökin (IL)-8 ve IL-6'nın artmış üretimi gösterilmiştir. Bunların efektör T hücre (Teff) göçünde rol oynadıkları gibi B hücre aktivasyonuna da neden oldukları düşünülmüştür. Özellikle jeneralize vitiligoda, fokal ve dermatomal olmayan vitiligo tiplerinde serumda çözülebilir IL-2 reseptörlerinin (sIL-2R) artmış düzeylerde bulunması vitiligoda T hücre aracılı immün sistemin aktivasyonuna işaret etmektedir (51, 52).

Vitiligolu derideki hücre infiltratının içeriği 1990'lerden beri monoklonal antikorlar kullanılarak incelenmektedir (53, 54). Vitiligo lezyon sınırında, epidermis

ve dermiste kutanöz lenfositik antijen (CLA) pozitif hücreler ve CD3+ T lenfositlerin sayısının çok fazla arttığını gösterilmiştir (54). Aktif lezyonda, CD3+ CD8+ T lenfositler ve CLA+ hücrelerin CD4+ T yardımcı lenfositlerden daha fazla sayıda olduğu görülmüştür. CLA+ T lenfositlerin sayısının dermise göre epidermiste daha fazla olduğu ve lenfositlerin büyük kısmının MHC sınıf II ve interferon-gama (IF- γ) ekspresyonu gösteren aktif hücreler olduğu saptanmıştır. Bu bulgulara ek olarak T hücre infiltratına dermiste artmış sayıda CD68+ makrofajların eşlik ettiği gösterilmiştir (53).

Melanosit farklılaşma antijenleri; melanin sentezinde enzimatik olarak rol alan melanozomal membran-sabit proteinleri, tirozinaz, TRP1, TRP2 ve MART1/Melan-A, Pmel17/gp100 ve gp75'yi içeren yapısal melanozomal proteinlerdir. Bu farklılaşma antijenleri intraselüler proteinler oldukları için MHC-I molekülleri ile hücre yüzeyinde ifade edilebilirler (1). Antijenler, Langerhans hücreleri aracılığıyla bölgesel lenf nodlarına taşınırlar ve CD8+ T hücrelerine sunulur. Aktifleşmiş dentritik hücreler (DH), lenf nodlarına gidip T hücresi uyarımı yapmasının yanında sitotoksik efektör fonksiyonlarını da yerine getirebilmektedir. Bu efektör fonksiyonların depigmentasyonun ortaya çıkmasında ne kadar etkili olduğu üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. DH'lerin membranlarındaki tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ailesi üyelerini devreye sokarak hedef hücrelerde apoptozu başlattıkları düşünülmektedir (55, 56).

Vitiligoda ilerleyici depigmentasyonda melanositlere karşı yönelmiş sitotoksik T lenfositlerin (CTL'nin) aracılık ettiği bir otoimmün cevap söz konusudur. Melanozomal antijenleri hedefleyen CTL sağlıklı kişilerde de görülebilirse de, bunların otoimmün etkilerinin düzenleyici (regülatuar) T (Treg) hücrelerin varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak vitiligolu hastalarda CD8+ T hücreler melanositlere karşı sitotoksiktir ve Treg hücreleri otoimmüniteyi kontrol altında tutamadığı var sayılmakta, bu görüşü destekleyen çok sınırlı veri bulunmaktadır (57). İlerleyici vitiligo aşırı inflamasyonla ilişkili değildir. Melanositlerin, inflamatuvar bir infiltrat oluşturmadan apoptoz ile yok edilebildiği iyi bilinmektedir (58). Buna rağmen vitiligo da inflamatuvar formlara da rastlanabilmektedir (59). Vitiligoda melanosit ölümünün üç yolla gerçekleştiği kabul edilmektedir: (i) TNF- α ve IFN- γ salınımlarıyla hedef hücrelerin indirekt yok edilmesi;

(ii) Ölüm reseptörünün tetiklenmesiyle hedef hücrelerde apoptozun tetiklenmesi; (iii) CTL ve hedef hücre arasındaki hücreler arası boşlukta granzim B ve perforin salınımıyla direkt ölüm (60). Melanositler Fas-ligand aracılı yola duyarlıdır. Otoreaktif T hücrelerinin çoğu perforin ve granzim eksprese ederler. *In vitro* deneylerde melanositlerin granül egzozitozu (perforin/granzim) yoluna duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bu durum melanosit yakınlarındaki T hücrelerinin çoğunluğunun CD8+/CLA+ hücreler olduğunu ve efektör molekül olarak perforin ve granzim eksprese ettiklerini gösteren *van den Wijngaard ve ark.* tarafından da doğrulanmıştır. Bu deneylerde melanositlerin *in vivo* ve *in vitro* ortamda apoptoza dirençli oldukları gösterilmiştir (61). Vitiligoda melanosit yıkımı ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada lenfositlerden salınan IL-1, IFN γ , ve TNF- α gibi sitokinlerin keratinosit ve melanositlerde apoptozu başlatabileceği söylenmiştir (62).

Çalışmalarda Melan-AMART-1'i hedef alan CTL'lerin, timustaki T hücre gelişimi sürecinde belirlendikleri; viral ve bakteriyel birçok epitopa olağan cevap vermenin yanında Melan-AMART-1 ile çapraz reaksiyon verdiği gösterilmiştir (58).

Hayvan modelleri otoimmün hipoteze olan güveni arttırmaktadır. Vitiligo'lu kedi, köpek ve atlarda 85 kD melanosit yüzey antijenlerin karşı gelişen otoantikolar saptanmıştır. Ayrıca tüyler ve oküler yapılarda beyazlaşma göstererek vitiligo için model oluşturan mutant Smyth line tavuklarında gelişen depigmentasyonun immünosupresif tedavi veya burspektomi ile azalabildiği ortaya konmuştur (63, 64).

7. Konverjans teorisi: Konverjans kelimesi aynı noktaya yönelik etkiler ve bunun sonuçları anlamını taşımaktadır. Vitiligo etyopatogenezinde, sıralanan bu altı faktörün karmaşık bir ilişki içinde birlikte melanosit yıkımına neden olduğunu ileri sürülmekte ve konverjans teorisi adı ile anılmaktadır (11, 65).

2.1.4. KLİNİK BULGULAR ve SINIFLANDIRMA

Vitiligo; tebeşir beyazı veya süt beyazı renk tonundaki, amelanotik makül ve yamalarla karakterize bir pigmentasyon bozukluğu hastalığıdır. Lezyonlar tek veya çok sayıda olabilir. Vitiligoda epidermal değişikliklerin bulunmaması tipiktir, eritem genellikle görülmez. Sıklıkla simetrik yerleşimli, iyi sınırlı olan lezyonlar, mukozal yüzeyler de dahil olmak üzere vücudun herhangi bir bölgesinde, değişik şekil ve genişlikte dağılım gösterir. Vitiligolu deri alanlarındaki kıllar, olguların yaklaşık %10-60'ında beyazlaşabilir, buna lökotrişi (saçlı deride: poliyozis) denir. Bazı vitiligo hastalarında ise deri rengi normal kalırken kıllarda beyazlaşma görülebilir.

Vitiligoda başlangıç lezyonları genellikle eller, ön kollar, meme başları, aksilla, anogenital bölge, ayağın dorsal kısmı ve yüzde lokalizedir. Yüzde yerleşim gösteren vitiligo sıklıkla periorifisyal bir dağılım göstermektedir. Vitiligo lezyonları merkezden çevreye doğru ilerleyerek genişleme eğilimi gösterir ve lezyonlar konveks sınırlar sergiler (66).

Vitiligoda çeşitli klinik varyantlar tanımlanmıştır (4). Trikrom vitiligoda lezyonlu depigmente deri ile lezyonsuz normal deri bölgesi arasında değişken genişlikte üçüncü bir ara renk tonu olmasıdır. Dört renkli veya kuadrikrom vitiligo; trikrom vitiligoya ek olarak lezyon sınırında veya perifoliküler alanda hiperpigmentasyonun bulunmasıdır. Pentakrom vitiligoda ise melanin inkontinansını temsil eden bölgelerde ek olarak beşinci bir renk tonu, mavi-gri hiperpigmente görünüm vardır. Vitiligo hastaları nadiren “konfeti tipi” (punctat vitiligo) adı verilen küçük noktasal amelanotik maküllerle seyredebilir. İnflamatuvar vitiligo; depigmente lezyonların sınırında eritem ile karakterizedir. Mavi vitiligo; genellikle postinflamatuvar hipermelanozisli bölgelerde oluşan mavimsi vitiligo maküllerini ifade etmek için kullanılır (11). Periungal tutulum tek başına veya dudaklar, distal penis, meme uçları gibi belirli mukozal yüzeylerin tutulumu ile birlikte görülebilir; buna “lip-tip” vitiligo denir (67).

Vitiligo lezyonları, özellikle başlangıç evresinde silik olabilir. Lezyonlar Wood ışığı altında belirginlik kazanır. Wood ışığı ile yapılan muayene lezyonların dağılımının ve gerçek boyutlarının belirlenmesinde kolaylık sağlar (3).

Vitiligo ile ilgili kaynaklarda çok farklı klinik sınıflamalar mevcuttur. En temel ve prognostik öneme sahip sınıflama vitiligo vulgaris ile segmental vitiligo olarak iki ana gruba ayrılmasıdır. Bununla birlikte hasta gruplarını daha detaylı tanımlayabilmek için tutulum bölgesi ve genişliğine göre daha detaylı klinik sınıflandırma tercih edilmektedir (4) (Tablo 1).

Tablo 1. Vitiligo klinik sınıflandırması (4).

Vitiligo klinik tipi	Alt tipi
Lokalize vitiligo	Unilateral (Segmental) vitiligo
	Fokal vitiligo
	Mukozal vitiligo
Jeneralize vitiligo	Vitiligo vulgaris
	Akrofasiyal vitiligo
	Karma vitiligo
Universal vitiligo	

- **Segmental vitiligo:** Dermatomal veya dermatomu andıran unilateral dağılımda, genişleme göstermeyen stabil maküler lezyonlarla karakterizedir. Olguların %50'den fazlasında poliyozis görülür. Bu tipin erken başlangıçlı olma eğilimi vardır. Diğer tiplerden farklı olarak, tiroid hastalığı veya diğer otoimmün hastalıklarla ilişkili değildir. Patogenezinden nöral peptitlerin değişmesi sorumlu tutulmaktadır (11).
- **Fokal vitiligo:** Genellikle tek veya sınırlı alanda dağılım sergileyen, az sayıdaki makülle karakterizedir. Lezyonlar en sık trigeminal sinirin innerve ettiği alanda sıklıkla boyun ve gövdede tutulum gösterir. Segmental dağılım bulunmamaktadır. Bu form çocuklarda daha sık görülür (3, 4).
- **Mukozal vitiligo:** Sadece mukozal yüzeylerde yerleşim gösteren vitiligo formudur (11).
- **Jeneralize vitiligo vulgaris:** En sık görülen formudur. Genellikle simetrik yerleşimli, geniş amelanotik yamalarla karakterizedir (3).
- **Akrofasiyal vitiligo:** Parmak uçları ve periorifisyal bölgelerde pigment kaybı ile karakterize formdur (11).
- **Karma vitiligo:** Segmental vitiligo ile beraber diğer vitiligo tiplerinden birinin birlikte olduğu formdur (4).

Vitiligoda deri dışı tutulum ve ilişkili sendromlar: Melanositler; epidermis bazal tabaka, kıl bulbusu, gözde retina pigment epiteli ve uveal doku (iris, siliar cisim, ve koroid), kulakta stria vaskularis ile beyinde leptomeninkste bulunur (14). Bazı otörler bu anatomik lokalizasyondaki melanositlerin hasarlanması sonucu Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) ve Allezzandrini sendromunun ortaya çıktığını ileri sürmektedir. Vitiligolu hastalarda nadiren (% 5) iris ve retinal pigment anomalilerine rastlanabilir. Üveit, vitiligo ile ilişkili en önemli oküler tutulumdur. Koroid anormallikler, oküler anormalliklere göre daha sık (% 30) görülür (3). Üveitin en ciddi formu VKH sendromunda izlenir. Bu sendrom üveit, aseptik menenjit, otik tutulum, poliozis ve vitiligonun birlikte görüldüğü multisistemik bir hastalıktır. Allezzandrini sendromu; burun, yanak, üst dudak ve çenede vitiligo lezyonları, saçlı deri, kaş ve kirpiklerde beyazlaşma ile karakterize unilateral görsel değişikliklerin eşlik ettiği bir sendromdur (3, 4).

2.1.5. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Vitiligoda tanı çoğunlukla klinik bulgularla konur. Bununla birlikte tanıda güçlük yaşanan olgularda ayırıcı tanıya gitmek için deri biyopsisi gerekir (68). Biyopsi örneklerinin hem lezyonlu hem de lezyonsuz deriyi içermesi önerilir. Böylelikle melanositlerin sayısı, epidermis içindeki melanin miktarı gibi tanısal özelliklerin lezyonlu (pigment kaybı bulunan) ve lezyonsuz (normal pigmente) örnekler arasında kıyaslanması mümkün olur (69). Işık ve elektron mikroskopik incelemelerde vitiligoda saptanan temel değişiklikler; bazal tabakada melanositlerde kayıp veya sayısında belirgin azalma, melanosit ve keratinosit vakuolizasyonu, dış kök kılıfında melanositlerin görülmemesi veya migrasyonu, sinirlerde dejeneratif değişiklikler ile T lenfositler, melanofajlar, histiyositler ve eritrositlerin dermal infiltrasyonudur (70). Aktif-yaygın vitiligoda epidermal ve dermal değişiklikler durağan hastalığa göre daha belirgindir (71). Melanosit ve ürünlerinin ışık mikroskobu altında gösterilmesini sağlayan özel boyama metotları vardır. Fonksiyonel melanosit yıkımına bağlı pigment kaybı; Fontana-Masson (FM) gümüş boyası kullanılarak en iyi şekilde ortaya konabilir (72). DOPA reaksiyonu (Bloch reaksiyonu) tirozinaz aktivitesi hakkında bilgi verir. Vitiliginöz derinin histokimyasal değerlendirmesinde DOPA + melanositlerin tamamının ortadan kalkmış olduğunun görülmesi kesin tanıyı sağlar (73). Vitiligo histopatolojik bulguları erken-ilerleyen evre ile stabil veya uzun süredir stabil lezyon olmak üzere farklılıklar gösterir (69, 74, 75).

Erken evre vitiligo lezyonlarında; yüzeysel perivasküler lenfosit infiltrasyonu görülür. Bu görüntü derinin inflamatuvar likenoid ve spongiotik hastalıkları ile karıştırılabilir. Seri kesitlerde lezyonun aktif kenarından incelemeler yapılırsa, melanositlerin yakınında lenfositler görülür (76). Epidermal bazal tabakada melanin içeriği azalmış ya da tamamen kayıptır (77).

Stabil vitiligo lezyonunda; bazal tabakada pigmentasyon kaybı dışında epidermiste bir anormallik gözlenmez. Bazal tabakada DOPA + melanositlerin olmadığı görülür. Vitiligo makülünün kenarında melanositler normalden büyüktür ve uzun dendritik bağlantıları melanozomlarla doludur (78). Dağınık yüzeysel perivasküler infiltrat olabilir ancak infiltrat uzun süreli lezyonlarda kaybolur (77).

2.1.6. LABORATUVAR BULGULARI

Vitiligoda tanı çoğunlukla klinik ile konur ancak tanıda zorlanılan bazı hastalarda ayırıcı tanıya gitmek için deri biyopsisi gerekir (68). Vitiligo ve diğer otoimmün hastalıkların birlikteliği ve soygeçmişte % 32 oranında otoimmün hastalık öyküsü bulunması nedeniyle tiroid uyarıcı hormonu (TSH), antinükleer antikor (ANA) ve tam kan sayımını içeren rutin tarama testleri ile şüpheli olgularda antitiroglobulin ve antitiroid peroksidaz antikor (APA) incelemesi yapılmalıdır. APA özellikle otoimmün tiroid hastalığı için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir belirteçtir (3, 11).

2.1.7. TANI ve AYIRICI TANI

Vitiligo maküllerinin tipik tebeşir beyazı rengi ile klinik olarak fark edilmesi kolay olmakla birlikte bazı olgularda tinea versikolor, piebaldizm, Ito'nun hipomelanozu, idiyomatik guttat hipomelanozis, progresif maküler hipomelanoz, sarkoidoz ve mikozis fungoidesin hipopigmente varyantı ile ayırıcı tanısı gerekli olabilir. Direkt mantar tetkiki, Wood ışığı ile muayene ve histopatolojik inceleme tanı ve ayırıcı tanıda önemli katkı sağlar (3).

2.1.8. TEDAVİ

Vitiligo hastaları için farklı hedeflere yönelik tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Tedavilerin büyük kısmında derideki pigmentasyonun geri kazanılması amaç edinilmiştir. Her tedavinin kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Tüm vitiligo hastaları için uygun olabilecek tek ve ideal bir tedavi bulunmamaktadır. Bu nedenle tedavi; hastanın tedavi beklentisi, klinik özellikleri, önceki tedavilere verdiği yanıt ile tedavi yönteminin etkinlik ve güvenilirlik düzeyi dikkate alınarak her hasta için özgün şekilde planlanmalıdır (1, 3, 11).

Vitiligo psikolojik olarak çok yıkıcı bir hastalık olabilir. Vitiligo hastalarının tedavisinde multidisipliner bir yaklaşım faydalı olabilir ve tedavi sürecinin başlangıcında dermatoloji yaşam kalitesinin ölçülmesi, psikolojik veya psikiyatrik danışmanlık gerekli olabilir (11).

Geliştirilen yeni etyopatogenetik bakış açısıyla varolan tedavi yöntemleri yerlerini korurken yeni ve daha verimli tedavi yöntemleri geliştirilmeye devam edilmelidir (1).

Vitiligo tanısı yeni konmuş hastaların çoğunluğu genel olarak tedaviye daha iyi yanıt verirken özellikle hastalık süresi uzun olan olguların bir kısmı gerek yanıtızsızlık gerekse de lezyonların kendilerinde kozmetik kaygı kaynağı olmayışı nedeniyle tedavi uygulanmasını istememektedir (48). Bu nedenle hastanın beklentileri mutlak sorgulanmalıdır (79).

Vitiligo tedavilerinin çeşitli yanıt oranları vardır ve yan etkileri azaltmak ve daha iyi repigmentasyon yanıtı elde edebilmek için rotasyonel tedavi kullanmak önerilir (11). Dirençli olgularda ise kombinasyon tedavileri uygulanması gerekli olabilir. Vitiligoda için tedavi seçenekleri şu şekilde özetlenebilir:

1- Medikal Tedaviler: Vitiligo lezyonları vücut yüzey alanının % 20'sinden azını tutuyor ise topikal, % 20'sinden fazlasını tutuyor ise sistemik tedavilerin seçilmesi genel olarak kabul görmüş bir ilkedir (11).

Kortikosteroidler: Vitiligo tedavisinde kullanılmakta olan medikal tedavi ajanları; topikal ve sistemik kortikosteroidler, topikal kalsipotriol, ve nispeten yeni geliştirilen immünomodülatörler olarak sıralanabilir. Topikal kortikosteroidler (TKS) ilk basamakta en yaygın kullanılan tedavi ajanları olup 1950'lerden beri her tipteki vitiligo tedavisinde antiinflamatuvar ve immunmodulatör etkilerinden faydalanmak üzere kullanılmaktadır (77). Yüzdeki lezyonların en iyi yanıt verdiği, boyun, parmaklar ve topukta düşük yanıt verdiği bilinmektedir (80). TKS'ler uygulama bölgesinde dermal atrofi, telanjiektazi, akne, hipertrikoz, göz basıncında artışa neden olabilir (11, 83). Ciddi yan etkileri nedeniyle sistemik KS kullanımı ise genellikle önerilmez (11).

Kalsipotriol: Melanositleri ve keratinositleri uyararak melanin üretimini stimüle ettiği veya immünomodulatör etki gösterdiği üzerinde durulmaktaysa da monoterapi olarak kullanımı önerilmemektedir (11, 81, 82).

Topikal Kalsinörin İnhibitörleri: 2002 yılından beri vitiligo tedavisinde kullanılmaktadır (83). Takrolimus ve pimekrolimusun T hücre aktivasyonunu inhibe ettiği ve IL-2-3-4-5-10 ile granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, TNF- α ve IFN- γ inhibisyonunu sağladığı üzerinde durulmaktadır. Özellikle melanosit proliferasyonunu ve melanogenezi inhibe etme ve melanositlerde interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ekspresyonunu arttırarak T lenfosit kaynaklı yıkımı arttırma yeteneğine sahip olan TNF- α 'nın inhibisyonu ile vitiligo tedavisinde etkili olduğu belirtilmiştir (84-86). Başta atrofi gelmek üzere TKS tedavisinde görülen potansiyel yan etkileri göstermemeleri avantajlarıdır (83). TKS yan etkilerine

duyarlı vücut alanlarında (yüz, fleksural alanlar, genital bölge) kullanımları önceliklidir (87).

2- Foto(kemo)terapi ve Lazerler:

Fotokemoterapi: UVA ışını ile birlikte verilen topikal/oral psoralen (8-metoksi-psoralen, 5 metoksi-psoralen) UVA (PUVA) tedavisinin; tirozinaz fonksiyonu ve melanogenez uyarımı yaparken, melanositik antijen ekspresyonu ve immunitiyi baskılayarak etkili olduğu ve vitiligoda kullanımının MÖ 1550’li yıllara kadar uzandığı bilinmektedir (11, 83). UV radyasyonu; interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), sitokin reseptörleri (IL-R 1-2) ve büyüme faktörü reseptörlerini kapsayan hücre yüzeyi moleküllerin üretimini ve fonksiyonlarını düzenleyicidir, deriyi infiltre eden T hücrelerinin apoptozunu indükler (17). Günümüzde topikal PUVA uygulaması geçerliliğini korurken, dar bant UVB (DBUVB) tedavisinin sistemik PUVA tedavisine göre yan etkilerinin daha az olduğu bilinmektedir (79).

Fototerapi: DBUVB vitiligoda birçok hasta için halen ilk seçenektir (66). Yaygın vitiligo hastalarında, DBUVB topikal PUVA'dan daha etkilidir (sırasıyla % 67 ve 46 yanıt oranı) (88). Fototerapi; klasik tedavilerde yanıtız olgularda, yaygın lezyonlarda veya yaşam kalitesini ileri derecede etkileyen lokalize lezyonlarda önerilmektedir (66). DBUVB'nin PUVA'ya göre daha az eritem ve kserozis oluşturması, oral tedavi ve göz koruması gerektirmemesi, normal deri ve perilezyonel sınırdaki belirgin pigmentasyon oluşturmaması, çocuk ve gebelerde güvenle kullanılabilmesi gibi avantajları vardır. Karsinojenik potansiyelinin daha düşük olduğu ileri sürülmüştür (89).

Foto(kemo)terapi uygulamaları doğal güneş ışığı ile gerçekleştirilebileceği gibi (PUVASOL), çeşitli kombinasyonlar (fenilalanin-PUVA, kelin-PUVA, kalsipotriol-PUVA/DBUVB, minoksidil-PUVA), klasik metotlar dışında alternatif uygulama yöntemlerini (banyo PUVA, türban PUVA, krem-PUVA vb.) de içermektedir (7, 83).

Lazer uygulamaları: Vitiligoda yaygın olmasa da başarılı sonuçlar bildirilen lazer uygulamalarının başlıcaları: “Excimer” ve Helyum-Neon lazerlerdir (83, 90, 91).

3- Cerrahi tedaviler: Kısmi (“split”) kalınlıkta deri greftleri, emme bülü greftleme, mini greftleme (tam kalınlıklı/küçük greft epidermis ve süperfisyal/mid dermis greftlemesi), melanosit/keratinosit kültürü greftlemesi, melanosit kültürü süspansiyonu greftlemesi, epidermal kültür greftleme ve saç folikülü greftlemesi olarak sayılabilir (81). Cerrahi tedavi: medikal tedaviye yanıtız kalmış, lokalize,

akral yerleşimli olmayan vitiligosu olan, Koebner fenomeni ve keloid öyküsü bulunmayan, progresyon göstermeyen (12 ay), ve minigraft testi pozitif olan 12 yaş üzeri olgular için uygundur (4, 92, 93).

4- Depigmentasyon Yapıcı Ajanlar: Bu tedavi genellikle vücudun % 50'sinden fazlasında yaygın depigmente yamaları olan vitiligolu hastalarda, yüz veya ellerde repigmentasyon elde edilemeyen veya repigmentasyon istemeyip, tek ton bir deri görünümüne kavuşmak isteyen erişkin hastalarda uygulanmaktadır (66). Hidrokinonun monobenzil eteri (monobenzon) ABD ve Avrupa'da yaygın vitiligolu hastalardaki rezidüel normal derinin depigmentasyonu amacıyla piyasada bulunan tek ajandır (11) . Geri dönüşsüz bir işlem olduğundan hasta onayı gereklidir.

5- Güneşten Koruyucular ve Kamuflej Kozmetikler: Güneşten koruyucular fotohasarı engelleyerek Koebner fenomeni gelişimini önler. Ayrıca vitiliginöz lezyonlarla lezyonsuz deri arasında oluşacak ton farkını azaltarak kozmetik görünüme katkı sağlar (11). Özellikle yüz, boyun ya da ellerde pigmentsiz kalan alanlar klasik makyaj malzemeleri, bronzlaştırıcı ürünler ya da diğer topikal boyalarla kapatılabilir (66).

6- Alternatif ve Adjuvan Tedaviler: Geniş hasta serilerinde kullanılmadığından henüz etkinlikleri ile ilgili yeterli tecrübe bulunmayan, farklı tedavi hedefi olan, ajanları içeren heterojen bir gruptur. Bu grupta: beslenme önerileri, vitamin-mineral desteği, psödokatalaz, prostaglandin analogları, insan plasental ekstresi, 5-florourasil, statinler, levamizol, fenitoin, polipodyum lökomatas ekstresi, siklofosfamid, siklosporin ve biyolojik ajanlar (etanersept, infliksimab, adalimumab, efalizumab) yer almaktadır (1, 11, 21, 81, 83, 94-102).

2.1.9. KLİNİK SEYİR ve PROGNOZ

Vitiligo hastaları, çoğunlukla bahar-yaz aylarında özellikle güneşe maruz kalan alanlarda, tutulan ve tutulmayan deri rengi arasındaki karşıtlığın artması sonucu depigmente yamaların farkına varırlar. Vitiligonun seyri öngörülemez; doğal seyri genellikle yavaş progresyon şeklindedir. Yeni depigmente maküllerin gelişmesi veya önceden var olan lezyonların merkezden perifere genişlemesi şeklinde yayılır ve bu durum “aktif vitiligo” olarak değerlendirilir (4, 17). *Njoo ve ark.* tarafından lezyonların seyrini takip etmek için “Vitiligo Hastalık Aktivite Skoru” (VIDA: “Vitiligo Disease Activity Score”) adı verilen bir hastalık aktivitesi değerlendirme skorlaması geliştirilmiştir. VIDA skorlaması; hastadan alınan

anamneze dayanır ve vitiligo lezyonlarında son 6 hafta-1 yıl arasında gözlenen değişiklikler dikkate alınarak -1 / +4 arasında değişen 6 farklı skoru içerir. VIDA skorlaması ölçütleri Tablo 2’de sunulmaktadır (103).

Tablo 2. Vitiligo Hastalık Aktivite Skoru (VIDA) skorlaması ölçütleri.

VIDA Skoru	Açıklama
+4	Son 6 hafta içinde aktif-yeni lezyon öyküsünün varlığı
+3	Son 3 ay içinde aktif-yeni lezyon öyküsünün varlığı
+2	Son 6 ay içinde aktif-yeni lezyon öyküsünün varlığı
+1	Son 1 yıl içinde aktif-yeni lezyon öyküsünün varlığı
0	En az 1 yıldır stabil lezyon öyküsünün varlığı
-1	Spontan repigmentasyon öyküsünün varlığı

2.2. OTOİMMÜNİTE VE ÖZ (“SELF”) TOLERANS

İmmün sistemin temel görevi egzojen patojenler (virüs, bakteri, mantar, parazit vb) ile endojen patolojilere (tümörler vb) karşı dayanıklı ve etkili yanıt ortaya koyabilmektir. Bu yıkıcı yanıt sadece patojenler değil, konakçının kendi dokularında da hasar oluşturabileceğinden kontrol altında olmalı ve konakçının kendi doku elemanlarına karşı immün tolerans oluşturabilmelidir (104).

İmmüniteyi düzenleyen başlıca mekanizmalar santral tolerans ve periferik tolerans mekanizmalarıdır. Bu iki mekanizmanın da fonksiyon görmemesi durumunda organizmanın kendi dokularına karşı yönelen kontrolsüz immün yanıt ile otoimmün ve inflamatuvar süreçlerin ortaya çıkmasına imkan tanınacaktır (105).

Santral tolerans: Santral lenfoid organlarda gerçekleşir. Santral toleransta olgunlaşmamış lenfositler MHC'ye bağlı olarak sunulan öz (“self”) antijenleriyle, kuvvetle etkileşime girerse bu lenfositler apoptozu tetikleyen sinyallerle karşılaşır ve T lenfositler olgunlaşmasını tamamlayamadan apoptoza uğrayarak (klonal delesyona uğrar) ortadan kaldırılır. Bu sürece “negatif seçim” adı verilir. Böylelikle perifere çıkan T lenfositlerinin periferdeki öz antijenlere karşı tepki vermesi dolayısıyla otoimmün sürecin başlatılması engellenmiş olur (104). Bir transkripsiyon faktörü olan Otoimmün regülatuar proteinin (AIRE'nin) timusta öz proteinlerin hücre yüzeyinde ekspresyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu gendeki mutasyonların nadir bir otoimmün hastalık olan Otoimmün poliendokrinopati kandidiazis ektodermal distrofi'ye (APECED'e) yol açtığı gösterilmiştir. Santral tolerans mekanizmalarından; hem antijenik peptidi, MHC sınıf I antijenleri üzerinden algılayan öze tepkili (“self” reaktif) CD8+ T hücreleri hem de MHC sınıf II antijenleri üzerinde algılayan öze tepkili CD4+ T hücreleri etkilenir. Timusta negatif seçime uğrayan T hücrelerini apoptoza hangi sinyallerin yönelttiği bilinmemektedir. Santral tolerans ilkeleri B lenfosit hücreleri için de benzer şekilde ilerler. B lenfositler, kemik iliğindeki gelişimleri sırasında öz antijenleri tanımları halinde apoptozu tetikleyen sinyallere maruz kalırlar veya reseptör özgüllüğü yeniden düzenlenir ki böylelikle matür B hücre reseptör repertuarı öz antijenlerle etkileşime girmez (106).

Periferik Tolerans: Santral lenfoid organlar dışındaki, periferik lenfoid dokularda öz antijenlere tepkili matür lenfositlerin varlığında o antijene karşı immün yanıtın

önlenmesinde rol alan tolerans mekanizmasıdır. Periferik tolerans, olgun T hücresi periferde öz antijenleri tanıdığı anda devreye girer. Periferik tolerans; T lenfosit ölümü, işlevsel yanıtsızlık (anergi) ve düzenleyici T (Treg) hücreleri tarafından öze tepkili lenfositlerin fonksiyonlarının baskılanması yolu ile gerçekleşir. Periferik tolerans otoimmüniteyi engellemede santral toleransın tamamlayıcısı olarak düşünülebilir (106).

Otoimmün hastalıklarının başlaması ve yayılmasındaki en önemli faktörlerin Treg üretimindeki aksaklık ve inflamasyonu baskılayan mekanizmalardaki yetersizlik olduğu düşünülmektedir (42). Periferik tolerans bariyerinin aşılması ve otoreaktif T hücre aktivasyonu ile gerçekleşen doku yıkımı, otoimmün hastalıklara yol açmaktadır. Normal şartlarda birçok otoreaktif T hücresi timusta santral tolerans süreci ile delesyona uğrar. Geri kalan otoreaktif T hücreleri ise periferik sistemde birincil mediyatör görevinde olan Foxp3+ düzenleyici T hücrelerinin yer aldığı periferik tolerans mekanizmalarıyla kontrol altında tutulurlar (107). Otoimmün hastalıkların bu son tolerans bariyerinin de işlev kaybı ile geliştiği ileri sürülmektedir. Otoimmün hastalığı olmayan kişilerde de otoreaktif T hücrelerinin olduğu gözlemlenmiştir (108). Bu sebeple otoimmün hastalıkların başlatılmasında otoreaktif T hücreleri ve baskılayıcı Treg hücreleri arasında devam eden savaşın durumu kritik önem taşır.

2.3. DÜZENLEYİCİ (REGÜLATUVAR) T HÜCRELERİ (Treg HÜCRELERİ)

2.3.1. TANIM ve TARİHÇE

Düzenleyici (“regulatory”) T hücreleri (Treg hücreleri) esas olarak Foxp3+ (“Forkhead box protein 3”) CD25+ CD4+ fenotipi sergileyen bir T hücre alt grubudur. Güncel veriler, bu hücrelerin bireyin kendisine ait olan, öz (“self”) antijenlerine immün cevap oluşturmaması ve immün homeostazisin sağlanarak idame edilmesinde rol aldıklarını göstermektedir (104).

İlk kez 1970’li yıllarda, yabancı veya öz antijenlerine karşı immün cevap gelişimini baskılayan T hücreleri tanımlanmıştır. 1995 yılında *Sakaguchi ve ark.* periferik CD4+ T hücrelerinin % 5-10’unu oluşturan, yüksek düzeyde IL2 reseptörü-alfa zinciri (IL-2R α) diğer isimlendirmeleriyle CD25, TAC veya p55 antijenini eksprese eden farklı bir T hücre popülasyonunu ortaya çıkarmışlardır (104, 109). IL-2R α ’nın, IL-2R β ve IL-2R γ zincirleri ile kovalent olmayan bağlanma göstererek

yüksek afiniteli IL-2 reseptörünü oluşturduğu, aktifleşmiş T ve B hücreleri ile makrofajlardan da kaynaklandığı bilinmektedir (106). 1998'de *Shevach ve ark.* ile *Sakaguchi ve ark.* CD4+CD25+ T hücrelerinin immün baskılayıcı fonksiyonlarını daha iyi tanımlamışlar, CD25'in bu hücreler için güvenilir bir yüzey belirteci olduğunu ve fonksiyonlarının ortaya konmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu hücrelerin immün uyarım karşısında anejrik kaldıklarını, aktifleşmiş CD4+ T hücrelerinin proliferasyonunu ve IL-2 üretimlerini, hücre-hücre teması bağımlı bir mekanizma aracılığıyla baskılayabildiklerini *in vitro* olarak göstermişlerdir. Bu gelişmeleri takiben immün baskılayıcı özellikteki bu hücrelere düzenleyici T hücresi adı verilmiştir. 2000-2003 yılları arasında Treg hücrelerinin bir diğer yüzey belirteci olan sitotoksik T lenfosit antijeni-4 (CTLA-4) ekspresyonu gösterdikleri saptanmıştır ancak bu belirtecin diğer aktifleşmiş T hücreleri tarafından da ifade edildiği belirlenmiştir (104). *Schubert ve ark.* 2001 yılında T reg hücrelerinde Foxp3'ün varlığını ortaya koymuşlar ve T hücre aktivasyonunu düzenleyen bir inhibitör transkripsiyon faktörü olarak tanımlamışlardır (110). Daha sonraki çalışmalarda CD4+CD25+ T hücrelerinin tercihli olarak eksprese ettikleri CTLA-4, CD25 ve glukortikoidle indüklenen tümör nekroz faktörü reseptörü (GITR) genlerinin Foxp3'ün direkt kontrolü altında olduğu belirtilmiştir (111). Bu bulgular Foxp3'ün, Treg popülasyonunun gelişimi ve immün düzenleyici fonksiyon kazanmaları açısından vazgeçilmez olan ana kontrol geni olduğunu düşündürmüştür (104, 106).

2.3.2. T_{reg} HÜCRELERİ ALT GRUPLARI ve FONKSİYONLARI

Treg hücreleri esas olarak CD4+ T hücrelerinin bir alt gurubudur ve bu popülasyonunun % 5-10'unu oluşturur (112). Bununla birlikte sınırlı yayında Foxp3 ekspresyonu yapan CD8+ ve doğal öldürücü (NK) Treg fonksiyonu yürüten hücrelerin varlığından söz edilmektedir (113).

Treg hücreleri bir transkripsiyon faktörü olan Foxp3 ekspresyonu sergileyen heterojen bir grup hücre popülasyonudur (59). Treg hücreleri fenotipik özellikleri esas alınarak iki temel alt gruba ayrılmıştır:

1- Doğal düzenleyici T hücreleri (nTreg): Doğal olarak T hücre olgunlaşması sırasında timusta belirli miktarda oluşturulan IL-2R α (CD25) eksprese eden; CD4+CD25+Foxp3+ T hücreleridir (114, 115).

2- İndüklenebilen (adaptif) düzenleyici T hücreleri (iTreg): Periferik lenfoid organlarda, CD25- öncüllerinden, ortamdaki uyarım sonrası CD4+CD25+Foxp3+

fenotipi kazanan naif T hücreleridir (116). IL-2 ve TGF- β ile indüklenen iTreg hücreleri, nTreg hücrelerinden farklı olarak, naif CD4⁺ T hücrelerinden oluşurlar ve bellek belirteçlerini geliştirebilmek için ek uyarılara gereksinim duyarlar (113). iTreg hücreleri bir kez uyarılınca Foxp3, CTLA-4, TGF- β ve IL-10 eksprese ederler (112).

Kalıtımsal TGF- β 1, CTLA-4 ve Foxp3 eksikliği olan farelerin tamamında “Fatal Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom” geliştiği gözlenmiştir. IL-2 eksikliği olan farelerde de çoklu organ otoimmün hastalığının olduğu bilinmektedir. IL-2 ve TGF- β iT_{reg} hücrelerinin indüklenmesi için ortamda mutlak bulunmalıdır. Bu sitokinlerin her ikisi de nTreg ile iTreg hücrelerinin ve bu hücrelerce eksprese edilen Foxp3’ün idame edilmesi için gereklidir (113). İstisnai olarak bağırsakla ilişkili lenfoid dokularda (GALT: “Gut-associated lymphoid tissues”) retinoik asit IL-2’nin yerine geçebilmektedir (117). IL-2 Treg hücrelerinin Foxp3 ekspresyonlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan TGF- β ’yı üretmesini veya aktive etmesini sağlar (113). TGF- β ’nın Foxp3⁺ iTreg’leri indükleyebilmesi için CTLA-4 gereklidir (118).

nTreg ve iTreg hücrelerinin antijenik özgülükleri, gelişimleri için ihtiyaç duydukları faktörler (T hücre reseptörü uyarımı ve ko-stimulasyon gereksinimleri gibi) ve immün baskılayıcı aktiviteleri açısından önemli farklılıkları vardır (Tablo 3). Bu farklar adaptif immün cevapta iki hücre grubunun ayrı fonksiyonları yürütmekte olduğu olasılığını kuvvetlendirmektedir (113).

nTreg hücreleri asıl olarak timusta eksprese edilen öz antijenlere cevap olarak gelişirler, iTreg hücreleri ise esas olarak periferik lenfoid organlarda DH’ler tarafından sunulan periferik antijenlere cevap olarak gelişirler (113). nTreg hücreleri; oluşumları için güçlü T hücre reseptörü (THR) uyarımının yanı sıra timusta CD28 eş-uyarımına (ko-stimulasyonuna) gereksinim duyarlar (119). CD28 eksikliği olan farelerde nTreg hücrelerinin belirgin derecede azaldığı görülmüştür (120). CD4⁺,CD25⁻ T hücrelerin periferde Foxp3⁺ CD25⁺ iTreg hücrelerine dönüşümleri sırasında gereksinim duyulan THR uyarımı optimal düzeyin altında, daha zayıftır ve gelişen hücre topluluğu az sayıda hücre bölünmesi gerçekleştirir (121). Buna karşın iTreg hücreleri oluşumları için, antijen sunan hücreler (ASH’ler) tarafından eksprese edilen B7 molekülü aracılı eş-uyarana gereksinim gösterirler (122). Optimal düzeyin altındaki CD28 eş-uyarımı iTreg hücre oluşumunu kolaylaştırmada yeterli etki sağlarken, inhibitör CTLA-4 eş-uyarımı iTreg hücre

oluşumu için mutlak bir gereksinimdir (118). CTLA-4 eksikliği olan farelerde iTreg hücre oluşumunun gerçekleşmediği gösterilmiştir (123).

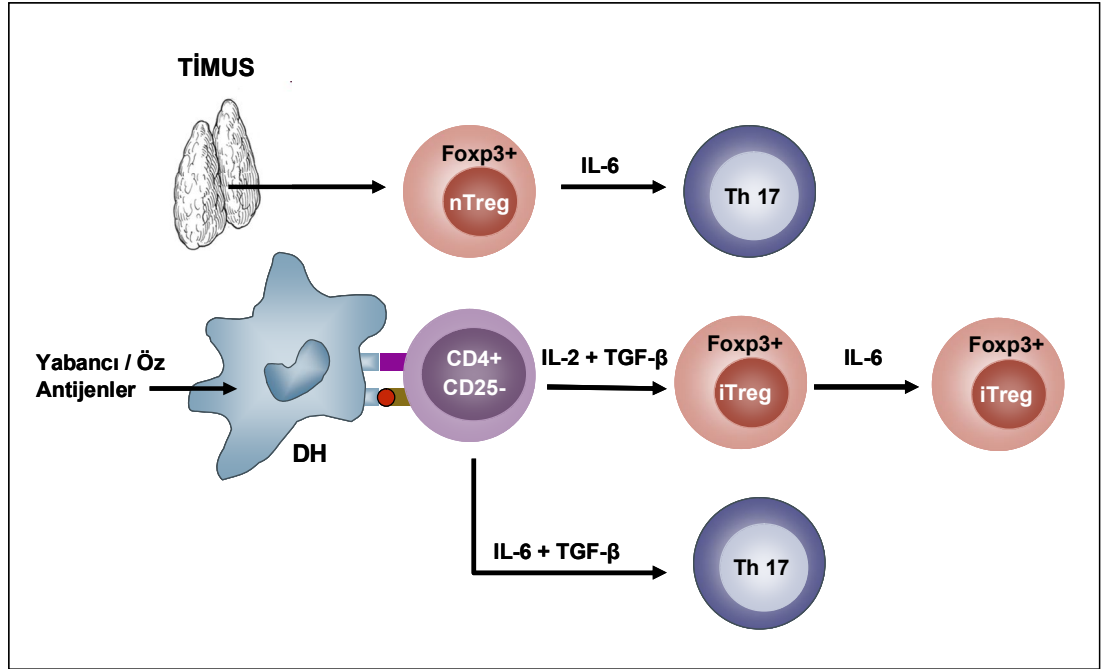
IL-6; nTreg hücrelerini Th17 hücrelerine dönüştürebilirse de, iTreg hücreleri bu sitokine dirençlidir. Böylece iTreg hücreleri inflamasyon alanlarında baskılayıcı fonksiyonunu yerine getirmeye devam edebilir (Şekil 2). nTreg ile iTreg hücreleri arasındaki bu farkın iTreg hücrelerinin nTreg hücrelerine oranla belirgin derecede azalmış IL-6 reseptörü (CD126) ekspresyonu göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (113). IL-6 hemen tüm multinükleer hücreler tarafından üretilen bir sitokindir ve birçok otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalığın patogeneğinde suçlanmıştır (124). Sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıklarda DH'ler tarafından üretilen IL-6'nın Treg aktivitesini bloke ettiği bildirilmiştir (125). Tümör nekroz faktörü (TNF)-reseptörü (TNFR) süper ailesinin bir üyesi olan Ox40 hem nTreg hem de iTreg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonu üzerinde negatif olarak düzenleme yapmaktadır (113).

Tablo 3. Doğal ve indüklenmiş CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücrelerin temel özellikleri (113).

	Doğal Düzenleyici T hücreleri (nT_{reg})	İndüklenmiş Düzenleyici T hücreleri (iT_{reg})
Temel antijenik özgüllük	Öz antijenler	Yabancı antijenler
Oluşum		
IL-2 ve TGF- β ile indüklenme gereksinimi	Yoktur	Vardır
CD28'e bağımlılık	Vardır	Yoktur
CTLA-4'e bağımlılık	Yoktur	Vardır
İdame		
IL-2 ve TGF- β gereksinimi	Vardır	Vardır
Stabilite		
IL-6 etkisiyle IL-17 oluşturan hücrelere dönüşüm	Vardır	Yoktur
Diğer hücrelerin IL-17 oluşturmalarını engelleme	Yoktur	Vardır
Baskılama		
IL-6'nın baskılayıcı aktivite üzerine blokajı	Vardır	Yoktur

CTLA-4:sitotoksik T-lenfosit antijeni 4, IL: interlökin, TGF: transforme edici büyüme faktörü.

Şekil 2. Doğal ve indüklenmiş düzenleyici T hücrelerinin oluşumları ve sitokinlerle olan ilişkileri (126).



Th17: T_{yardımcı}17, DH: Dendritik hücre, TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü- β , IL-10: İnterlökin-10, IL-6: İnterlökin-6, IL-2: İnterlökin-2.

Antijen sunan DH'ler nTreg'lerin ve olasılıkla iTreg'lerin ana hedefleridir (127, 128). Olgunlaşmamış DH'ler immünojenik ve tolerojenik alt setlere dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Tolerojenik DH'ler Foxp3+ CD4+ CD25+ düzenleyici T hücrelerini (iTreg hücrelerini) uyarırlar. Bu iTreg hücrelerinin oluşturduğu TGF- β ve IL-10 başka olgunlaşmamış DH'leri tolerojenik olmak üzere indükler. DH'lerin ürettiği retinoik asitin, (*ex vivo*) IL-2 ile aynı fonksiyonu yerine getirerek daha fazla iTreg oluşturmak üzere TGF- β tarafından olağan CD4+CD25- hücrelerin indüklemesini sağladığı da gösterilmiştir (113) (Şekil 2). Böylelikle Treg hücreleri DH'lerin immünojenik potansiyellerini azaltmaktadır (129,130). Tolerojenik DH'ler ise konvansiyonel CD4+CD25- hücrelerini Foxp3+ antijene spesifik Treg hücresi haline gelmek üzere indükler ve pozitif geri besleme döngüsünü tamamlar. Bu sürekli geri besleme döngüsü otoimmüniteyi önler (113).

Mikrobiyal enfeksiyonlar gibi çevresel tetikleyicilerin varlığında ise patojenin ortadan kalkmasına kadar DH dengesi tolerojenikten immünojenik yöne kayar. Enfeksiyonun adjuvan-benzeri etkisi sonucu potansiyel öz-antijenlere reaktif, patojenik efektör T hücrelerinin (Teff) aktifleşmesine izin verilir. Enfeksiyon ortadan kalktığında ve TGF- β ile IL-2 yeniden üretildiğinde homeostatik dengenin

bu öz-antijenlere reaktif, patojenik T eff hücrelerinin aktivitelerinin sonlandırılması için tolerojenik yöne geri dönmesi gerekmektedir. Ancak genetik yatkınlığı olan bireylerde ve çevresel tetikleyiciler bulunduğunda immünolojik döngü hem immünojenik DH'leri hem de zararlı öz-antijenlere reaktif Teff hücrelerin dominansını devam ettirir. Bu patolojik kısır döngü ve kronik otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasından kontrolsüz T hücresi reaktivitesi sorumludur. Tolerojenik DH'ler mevcut nTreg hücreleri ve iTreg hücrelerinin genişlemesine de yol açabilir. Buna karşın Teff hücre-DH etkileşimleri, daha fazla Teff hücresi indükleyebilen immünojenik DH'lerin oluşmasını sağlar. Kararlı durumda tolerojenik döngü baskındır, ama mikrobik enfeksiyonlarda veya otoimmün hastalıklarda immünojenik olgun DH'ler ve proinflamatuvar Teff hücreler bu koruyucu döngüye baskın çıkar (113).

Foxp3 sadece Treg fenotipini yansıtan bir belirteç olmakla kalmaz, birçok genin ekspresyonunu belirleyicisidir ve Foxp3 mutasyonları ciddi otoimmün hastalıklara neden olabilir (131, 132). Foxp3 mutasyonunun önce kepekli ("scurfy") mutant farede X'e bağlı resesif otoinflamatuvar hastalığa daha sonra da insanda "İmmün disregülasyon-poliendokrinopati-enteropati-X'e bağlı sendrom" kısaca IPEX olarak isimlendirilen fatal otoimmün/inflamatuvar bir hastalığa neden olduğu ortaya konmuştur. IPEX sendromunun; çoklu endokrin organ otoimmün hastalığı (Tip I Diyabetes mellitus, tiroidit vb.), inflamatuvar barsak hastalığı, şiddetli alerjik dermatit, besin alerjisi ve fatal enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (105).

T hücrelerinden fakir doku ortamı gibi belirli şartların varlığında Foxp3 ekspresyonu sergileyen nTreg hücrelerinin Foxp3 ekspresyonlarını kayb ettikleri gösterilmiştir. Böylelikle dokuda belli oranda Foxp3 (-) T hücreleri (Ex-Treg: Foxp3 ekspresyonunu kaybetmiş T hücreleri) ortaya çıkar. Foxp3'ün Treg hücrelerinden düşük yoğunlukta ekspresyonu Treg hücrelerinin immünosupresif aktivitesini zayıflatmakla kalmaz aynı zamanda potansiyel efektör aktivitelerin açığa çıkmasını sağlar. Ex-Treg hücreleri ortama IL-2 sunma özelliği taşır. IL-2 Foxp3 ekspresyonunun idamesinde rol oynayan bir faktör olduğundan diğer Treg hücrelerinin Foxp3 ve dolayısıyla düzenleyici fonksiyonunu korumasını da sağlar (132). Foxp3 ekspresyonunu yitirmiş ex-Treg hücreleri otoimmüniteye katkı sağlıyor olabilir. Bununla birlikte fizyolojik şartlar altında Foxp3 ekspresyon kaybı ve Treg hücre fonksiyon kaybının tüm Foxp3 + Treg hücreleri içinde büyük ölçüde gerçekleştiğine dair ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Dolaşımdaki Treg hücrelerinin büyük bir oranı deriye yönlenecek şekilde ayarlanmıştır. Kemokin ligand (CCL)-22, CCL-17 ve kemokin reseptör (CCR)-4 ayrıca CCL-1ve onun reseptörü CCR-8 de Treg hücrelerini deriye yönlendiren kimyasal çekim sürecinde yer alırlar (133). Vitiligo hastalarında dolaşımdaki Treg hücre miktarı normal iken deride bulunmaması Treg hücrelerinin deriye yönlendirmesinde bir başarısızlık olması şeklinde açıklanabilir (57). *Klarquist ve ark.* çalışmalarında vitiligo hastalarında, dolaşımdaki Treg hücresi miktarı yeterli olmasına rağmen deride T reg hücrelerinin azalmış olduğunu ve azalmış CCL-22 ekspresyonunun bu duruma eşlik ettiğini gözlemişlerdir (57).

CD4+ CD25+ Treg hücrelerinin delesyonunun otoimmün hastalıkla sonuçlandığı farelerde de gözlenmiştir. Üç günlük farelerde timektomi ile Treg delesyonu sağlanmış ve Treg hücrelerinin adaptif transferi ile çoklu organ otoimmün hastalıkların engellendiği görülmüştür (134-136).

Treg hücrelerinin nasıl fonksiyon gösterdiği henüz tam olarak anlaşılmamıştır. *In vitro* testlerle yürütülen çalışmalarda, Treg hücrelerinin patolojik T hücrelerinin (Teff) aktivasyonunu engelleyebildikleri bildirilmiştir. Bu tür testler kullanıldığında birkaç otoimmün hastalık bulunan kişilerden izole edilen Treg hücrelerinin sağlıklı bireylerden izole edilenlere kıyasla Teff hücrelerini engelleme fonksiyonunun düşük kapasiteli olduğu gösterilmiştir (137).

Treg aracılı baskılamada birden çok mekanizmanın rol aldığı belirlenmesine rağmen bu mekanizmaların herbirinin *in vivo* şartlarda göreceli katkısının ne olduğu belirsizliğini korumaktadır (138). Foxp3+ Treg hücrelerinin nasıl supresyon yaptığı birkaç teori ile açıklanmıştır (132).

Treg hücrelerinin immün sistem üzerindeki düzenleyici etkileri:

- 1- *Antijen sunan DH ile reaktif T hücreleri arasındaki temasın inhibisyonu* (105). DH'leri antijen sunduğunda; ortamda Treg hücreleri bulunuyor ise bu hücreler, antijen spesifik naif T hücrelerine göre daha baskın olarak DH'lere bağlanma gösterir. Böylelikle DH ile ancak uzun süreli bağlanma gerçekleştirdiğinde bellek fonksiyonu gösterebilen reaktif T hücrelerinin immün fonksiyonu engellenmiş olur (105).
- 2- *CTLA4 bağımlı mekanizma:* CTLA-4 bir T hücre yüzey molekülüdür ve hücrenin apoptozundan sorumludur. T hücre aktivasyonunu negatif olarak düzenler ve CTLA-4 mutasyonları T hücre aracılı otoimmün hastalıkların

gelişimine katkıda bulunur (26). Foxp3+CD25+CD4+ doğal Treg hücreleri yüksek düzeyde CTLA-4 ekspresyonu yaparlar (132). CTLA-4'ün monoklonal antikorlarca bloke edilmesi sağlıklı farelerde organ spesifik otoimmün hastalıklar ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (139,140). Foxp3'ün ilgili gene bağlanarak CTLA-4 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Hepsinden önemlisi Treg hücrelerinde CTLA-4 ekspresyonundan yoksun olan farelerin bir çeşit otoimmün hastalık kabul edilebilecek lenfoproliferasyon gösterdikleri ve Foxp3'den yoksun farede olduğu gibi aşırı immünoglobulin (Ig) E üretimi görüldüğü bildirilmiştir (141). Bu verilerin ışığı altında CTLA-4 aracılı supresyonun, ASH fonksiyonları üzerinde baskılayıcı, düzenleyici etkisinin olduğu düşünülmekte ve bu supresyonun temel mekanizma olabileceği savunulmaktadır (132).

- 3- *IL-2 bağımlı mekanizma:* Treg hücrelerinin, çoğalması ve yaşaması için ekzojen IL-2'ye yüksek derecede bağımlıdır. IL-2 veya IL-2 reseptörünün eksikliği Treg sayısında azalmaya ve Foxp3 eksikliğinde görülene benzer şekilde ciddi sistemik lenfoproliferasyon ve otoimmüniteye neden olmaktadır (105).
- 4- *Ekstrasellüler ATP yıkımı:* ATP, hasarlı veya aktive hücrelerden salınabilir ve immün reaksiyonları artırır. Treg hücrelerinin, ekstrasellüler ATP'nin lokal konsantrasyonlarını azaltan ekstrasellüler enzimleri ürettiği üzerinde durulmaktadır (105, 130).
- 5- *Sitokinler:* TGF- β , IL-10, IL-35 ve galektin-1 gibi immünsüpresif sitokinler Treg hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarına katkı sağlar (132). Treg hücreleri, inhibitör sitokinlerin tek kaynağı olmamalarına rağmen Treg hücrelerinden salınan sitokinlerin *in vivo* Treg inhibitör fonksiyonuna çok büyük katkıları olduğu düşünülmektedir (142). Bununla birlikte Treg kaynaklı sitokinlerin otoimmün hastalık üzerinde *in vivo* düzenleyici etkisi kesin olarak bilinmemektedir (143, 144). *In vivo* gözlemlere dayanarak; TGF- β , IL-10 ve IL-35 gibi inhibitör sitokinlerin Treg fonksiyonuna birincil derecede katkıda buldukları ortaya konmuştur (138).
- 6- *Sitotoksik moleküller:* Granzim ve perforin aracılı mekanizma ile ASH ve bunlara yanıt veren T hücrelerinin apoptotik ölümü yolu ile de Treg hücreleri baskılayıcı fonksiyonlarını yerine getirebilirler (105, 132).

Treg hücre fonksiyonunda etkili olan tüm bu faktörlere rağmen Foxp3+ Treg hücrelerce oluşturulan supresyon mekanizmasının temel parçasını neyin oluşturduğu cevaplanmayı beklemektedir (132).

İnterlökin-10 (IL-10): İlk kez 1988 yılında tanımlanmış, 260 aminoasitten oluşan bir sitokindir (109). T_{yardımcı} (Th) tip 2 (Th2) hücrelerinden salgılanarak Th1 hücrelerinin ürettiği sitokinleri inhibe eder. IL-10 Th2 hücrelerine ek olarak makrofajlar, dendritik hücreler, B lenfositler, keratinositler, mast hücreleri ve Treg hücreleri ve T_{yardımcı} (Th) 17 hücrelerinden de salınır. IL-10, T hücrelerini ve ASH'i hedef alarak immunoregülasyona aracılık eder (145). Düzenleyici aktivitesini önemli ölçüde ASH üzerinden gerçekleştirmektedirler (146). Makrofaj ve DH inhibisyonu yapan IL-10, proinflamatuvar sitokinleri ve ASH'den kemokin ekspresyonunu sınırlayarak doğal ve hücre aracılı immunitiyi kontrol eder (145, 147). Ayrıca CD4+ T hücrelerinin aktivasyonunu, proliferasyonunu ve sitokin üretimini sınırlar (145). IL-10 etkilerini hem myeloid hem de lenfoid hücreler üzerinde gösterebilir (148). Makrofaj ve DH'lerdeki MHC sınıf II moleküllerini ve ko-stimulatörlerin ekspresyonunu inhibe eder. Bu etkileri nedeni ile IL-10 hücre aracılı immun yanıtı sonlandırır ve T hücre aktivasyonunu inhibe eder. Aktifleşmiş makrofaj ve DH'lerden IL-12 üretimini inhibe eder. IL-12, IFN- γ üretimi için bir stimulatör ve hücre içi mikroorganizmalara karşı hücre aracılı immun cevabın indükleyicisidir (147). İlginç bir şekilde IL-10 yetersizliği taşıyan farelerde, TGF- β eksikliği yaşayan farelerdekinin aksine, ani otoimmün cevaplar görülmemektedir. Semptomlar, inflamasyonun ortaya çıkışından sonra görülür. IL-10 yetersizliği olan farelerde intestinal mikroorganizmalara karşı reaksiyon veren makrofajların aktivasyonunda bozukluk sonucu inflamatuvar bağırsak hastalığı geliştiği gözlenmiştir (147, 149, 150).

Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β): Homodimerik yapıda, 112 aminoasitten oluşan embriyogenez, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis, adezyon ve invazyonda anahtar rol oynayan bir sitokindir (109). TGF- β 'nın başlıca kaynakları; Treg hücreleri dahil T hücreleri ve makrofajlardır (147). TGF- β 'nın; TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere 3 izoformu tanımlanmıştır (151). İmmün sistem hücreleri başlıca TGF- β 1 sentezler. İmmün sistemdeki temel etkisi; lenfositlerin ve diğer lökositlerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe etmektir.

TGF- β , nötrofiller ve endotel hücrelerini de etkileyerek proinflamatuvar sitokinlerin etkilerine büyük ölçüde karşı koyar. IL-2 üretimini baskılayarak CD4 hücreleri üzerinde proliferasyonu önleyici etki gösterir ve hücre siklus inhibitörlerini artırma yönünde düzenler. Th1 ve Th2 hücrelerinin farklılaşmasını direkt olarak inhibe edebilir. Makrofajların aktivasyonunu ve onların proinflamatuvar sitokin üretme yeteneğini inhibe eder. DH'lerin maturasyonunu önler ve DH tarafından MHC sınıf II ekspresyonunu azaltarak T hücrelerine antijen sunumunu engeller (126). Böylece TGF- β , immün ve inflamatuvar cevabı çok yönlü olarak baskılamış olur (147). TGF- β 1 gen eliminasyonu yapılmış farelerde kontrolsüz inflamatuvar lezyonlar ve lenfoproliferasyon meydana geldiği görülmüştür (147).

Th17 olarak adlandırılan ve IL17 üreten Th hücrelerinin farklılaşmasında TGF- β 'nın önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. TGF- β 'nın T hücrelerinin *in vitro* antijen uyarımı ile Foxp3 ekspresyonu ve Treg hücre farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir (152).

TGF- β 'nın Treg üzerinde hem hücre içinde hem hücre dışında düzenleyici etkilerinin olduğu belirlenmiştir (153, 154). Bu veriler TGF- β 'nin iTreg hücrelerinin indüksiyonunu sağlayarak periferik toleransı koruduğu ve periferde Treg hücrelerinin sürekliliğini sağladığı şeklinde yorumlanmaktadır (142).

İnterlökin-35 (IL-35): yeni keşfedilmiş heterodimerik sitokin olup Foxp3+ hücreler tarafından üretilir ve Treg fonksiyonuna yardımcı olur (155). Yeni tanımlanan bir sitokin olduğundan IL-35 in hangi aşamalarda etkili olduğu tam olarak bilinmemektedir (142).

Treg ve Th17 hücreleri arasındaki ilişki: Naif CD4+ hücrelerin Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerine dönüştükleri bilinmektedir. Th1 hücreleri IFN- γ ve tümör nekroz faktörü (TNF) – β üretirken, Th2 ler IL-4, IL-5 ve IL-13 ; Th17 hücreleri IL-17 ve IL-6 sentezlerler (156, 157). Yeni geliştirilen bir hipoteze göre Treg ve Th2 lardan Th17 veya Th1 e doğru gelen yanıtların çarpıklaşması neticesinde otoimmün hastalıklarının gelişimi ve ilerleyişi görülür (158).

Th17 hücreleri proinflamatuvar hücre topluluğu olup, IL-17 üretirler. Son çalışmalarda TGF- β ve IL-6 uygunluğu durumunda Th17 nin gelişimine giden birkaç yol olabileceğinden bahsedilmektedir (42). IL-17'nin romatoid artrit, sistemik lupus eritamatozus, psöriazis, multipl skleroz, sistemik skleroz, kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi kronik otoimmün inflamatuvar hastalıklarda fazla üretimi söz

konusudur (156, 157). *Jandus ve ark.* vitiligo (n=5) hastalarda Th17'nin otoimmün hastalıkların patogenezi ile olan ilişkisini araştırmış, periferik kanda Th17 düzeyinde artış gösterememişlerdir (42).

IL-6 ve TGF- β kombinasyonunun farelerde nTreg hücrelerini IL-17 üretmek üzere Th17 oluşumunu indükleyebildiği gösterilmiştir (113) (Şekil 2). Foxp3+CD4+CD25+ Treg hücreleri tarafından üretilen TGF- β IL-6'yı bu hücrelerin bazılarını Th17 hücrelerine çevirmek üzere etkinleştirir (113). nTreg hücreleri IL-17 üreten hücrelere dönüşürlerse yalnızca immün cevabın ilerlemesine izin vermemekle kalmayacaklar, enfeksiyon yerine nötrofil mobilizasyonuna da katkıda bulunacaklardır. Daha sonra patojenin eradikasyonu, ortaya çıkan TGF- β ile indüklenmiş iTreg'ler yalnızca antijene spesifik cevabı sonlandırmakla kalmayacaklar, aynı zamanda spesifik olmayan şekilde uyarılan Teff hücrelerinin de ortaya çıkmasını önleyeceklerdir (113).

Treg hücrelerinin disfonksiyonu: Otoimmün süreçte; efektör T hücrelerini baskılamada yetersiz kalan Treg hücrelerinin başarısızlık nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Treg hücrelerinin immün düzenleyici kontrolünün kaybında önemli olabilecek üç mekanizma üzerinde durulmaktadır (142) :

I- Otoimmün hastalıklara yatkın bireylerdeki kalıtsal sebeplerle T reg hücre sayısındaki düşüş ve/veya Treg hücrelerinin fonksiyonelliklerini yitirmeleri

II- Kronik inflamasyon neticesinde Treg baskılayıcı fonksiyonun yitirilmesi, bozulması ve başka bir fonksiyona dönüşümü

III- Teff hücrelerinin agresif olmaları ve regülasyona karşı itaat etmemeleri

Treg hücrelerin sayı ya da fonksiyonel olarak azalmaları yani efektör-regülatuar dengesindeki efektör lehine bozulma, bazen faydalı da olabilmektedir. Örneğin letal malarya enfeksiyonu modellerinde Treg hücre deplesyonunun immün restorasyon nedeniyle parazitemiyi ortadan kaldırdığı ve ölümleri engellediği, gösterilmiştir (159, 160). HIV enfeksiyonlarında da Treg deplesyonu ile daha güçlü bir (anti- HIV) CD4+ hücre cevabı elde edilebilmiştir (161, 162). HCV enfeksiyonlarında Treg hücre sayısının sağlıklı kontrol gruplarından daha yüksek olduğu ve Treg deplesyonu ile daha güçlü bir anti-HCV CD8+ hücre cevabı elde edildiği bildirilmiştir (163). Çeşitli viral, bakteriyel ya da paraziter enfeksiyonlarda aşırı Treg hücre yanıtı ise efektör hafıza yanıtının inhibisyonu ve reaktivasyonlarla sonuçlanabilmektedir (159).

Birçok anti-tümör aşular, öz peptitlere karşı reaktiviteyi arttırma amaçlı olduğu için, T reg hücreleri tümöre karşı oluşun etkinliği engelleyebilir. Aslında, insanlarda ve ilişkili fare modellerinde de gösterildiği gibi Treg hücrelerinin deplesyonu otoimmunité gelişme riskini artırırken anti-tümör yanıtı genişletmek için de bir araç olduğu öne sürülmüştür (164). Gp100 ve MART-1'i de içeren melanoma farklılaşma antijenlerine karşı aşılanmış farelerde, Treg deplesyonuna tüylü derinin depigmentasyonu eşlik etmektedir (165). Bu verilere göre Treg yokluğunda melanosit farklılaşma antijenlerine reaktif T hücreler melanositlere karşı engellenemez bir yanıt göstermektedir (57).

3. HASTALAR, GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. ETİK KURUL VE PROJE DESTEK ONAYI BİLGİLERİ

Bu tez çalışması 22.04.2010 tarihinde 2010/B026 numarası ile Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi (KÜTF) İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Danışma Kurulu Başkanlığı tarafından değerlendirmeye alınarak yazılı olarak onaylanmış, 10.06.2010 tarihinde 2010/22 proje numarası ile Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmesi uygun bulunmuştur. Çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak tamamlanmıştır.

3.2. HASTA SEÇİMİ ve HASTA GRUBU MATERYALLERİ

Bu araştırma, onay alınmasını takiben, Mayıs 2010 – Kasım 2011 tarihleri arasında Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi (KÜTF), Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı polikliniğinde yürütülmüştür.

Çalışmaya KÜTF, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı polikliniğe başvurarak vitiligo klinik tanısı almış ve KÜTF Patoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilen değerlendirmeye histopatolojik olarak vitiligo tanısı önceden doğrulanmış olan hastalar davet edilmiştir. Vitiligo hastaları; çalışma hakkında bilgi verildikten ve onam formunu imzalandıktan sonra hasta grubuna dahil edilmişlerdir.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri olarak: (i) Erişkin yaş grubunda olmak (18 yaş üzeri), (ii) Çalışma öncesi klinikopatolojik olarak vitiligo tanısı almış olmak, (iii) Çalışma bilgilendirilmiş onam formunu imzalayarak çalışmaya katılmaya rıza göstermiş olmak, şartları aranmıştır.

Çalışma dışı bırakılma kriterleri olarak : (i) Çalışmaya katılmaya rıza göstermemiş olmak dikkate alınmıştır.

Hasta grubunu; yaşları 18-70 yıl arasında değişen 17'si kadın, 13'ü erkek olmak üzere toplam 30 gönüllü, erişkin, vitiligolu olgu oluşturmuştur. Hastaların anamnezinden; yaş, cinsiyet, hastalık süresi, hastalık başlangıç yaşı, hastalık başlangıcı sırasında stres varlığı, eşlik eden otoimmün hastalık ve diğer hastalık öyküsü öğrenilmiştir. Soygeçmiş sorgulamasında; vitiligo ve diğer otoimmün hastalıklar ile sistemik hastalık öyküsü bulunup bulunmadığı belirlenmiştir. Dosya özetleri çıkarılan ve çalışma kapsamına alınan hastaların dermatolojik muayeneleri tekrarlanmış, Wood ışığı altında vitiligo lezyonlarının yaygınlığı değerlendirilmiştir. Hastalık aktivitesi belirlenmek üzere VIDA skorlaması yapılarak kaydedilmiştir.

Hasta grubu çalışma materyali olarak vitiligo tanı aşamasında lezyonlu-lezyonsuz deri alanlarından fonksiyonel melanosit yoğunluğunu karşılaştırmak amacıyla alınmış olan ve KÜTF Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı arşivinde yer alan, rutin biyopsi örneklerine ait parafin bloklardan hazırlanan kesitler kullanılmıştır.

Hasta grubuna ait lezyonlu ve lezyonsuz deri alanı içeren materyaller; CD4, CD25, Foxp3, TGF- β ve IL-10'un doku dağılımı araştırılmak ve gruplar arası karşılaştırma yapılmak üzere KÜTF Patoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarında ilgili parametrelere ait kitler kullanılarak standart immünohistokimyasal yöntemle hazırlanmıştır. KÜTF Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi tarafından gerçekleştirilen immünohistopatolojik değerlendirme sonucu elde edilen hasta ve kontrol grubu verileri arasında istatistiksel karşılaştırma yapılmıştır.

3.3. KONTROL GRUBU MATERYALLERİ

Kontrol grubu materyalleri olarak, KÜTF Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı arşivinde yer alan, 30 adet benign melanositik nevüs eksizyon materyalline ait parafin bloklardan hazırlanan, (perilezyonel) normal deri alanı içeren kesitler kullanılmıştır. Kontrol grubu materyalleri de CD4, CD25, Foxp3, TGF- β ve IL-10'un doku dağılımı araştırılmak ve hasta grubu ile karşılaştırma yapılmak üzere KÜTF Patoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarında ilgili parametrelere ait kitler kullanılarak standart immünohistokimyasal yöntemle boyanmıştır. Tüm kesitler KÜTF Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi ile birlikte histopatolojik değerlendirilmiş elde edilen verilerle istatistiksel karşılaştırma yapılmıştır.

3.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM ve İMMÜNOHİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

3.4.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

Hastalara ait KÜTF Patoloji Bölümü arşivinde yer alan deri biyopsi örnekleri çalışmayı yürüten patoloji bölümü öğretim üyesi tarafından tekrar gözden geçirildi. Her hastadan histolojik kriterleri karşılayan parafin doku blokları histopatolojik incelemeye alındı. İlgili parafin doku bloklarında; CD4, CD25, Foxp3, IL-10 ve

TGF- β ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak belirlemek amacıyla 4 μ m kalınlığında kesitler hazırlanarak poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Standart streptavidin-biotin immünoperoksidaz metodu ile ilgili antikorlar uygulandı (Tablo 3.4.1).

Tablo 4. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikorlar.

ANTİKOR	AÇIKLAMA	İSİM	FİRMA VE KATALOG NO	ŞEHİR/ÜLKE
Anti-CD4	T _{yardımcı} lenfositler için belirteç	Mouse Monoclonal CD4 Antibody	Abbiotec 251723	San Diego
Anti-Foxp3*	Düzenleyici T lenfositler için belirteç	Rabbit Monoclonal (SP97) Foxp3 Antibody, prediluted	Abcam 99964	Cambridge
Anti-CD25	Düzenleyici T lenfositler için belirteç	Mouse Monoclonal CD25(HI25a) Antibody	Abbiotec 250957	San Diego
Anti-IL-10	Düzenleyici T hücre aktivitesini gösteren sitokin	Rabbit Polyclonal IL-10 Antibody	Abbiotec 250713	San Diego
Anti-TGF-β	Düzenleyici T hücre aktivitesini gösteren sitokin	Rabbit Polyclonal TGF- β Antibody	Abbiotec 250876	San Diego

*Not: Foxp3 Antibody Rabbit Polyclonal (Abbiotec, 250655, San Diego) kiti ile yapılan immünohistokimyasal boyanma gerçekleştirilmediğinden çalışmada kullanılamamıştır.

3.4.1.1. CD4 immünohistokimyasal boyama yöntemi :

İmmünohistokimya için primer antikor olarak CD4 antikorunu (CD4 Antibody, Mouse monoclonal, Abbiotec, San Diego) kullanıldı. Optimal dilüsyon olarak 1/50 oranında hazırlandı.

İmmünohistokimyasal inceleme için seçilen parafin bloklardan 4 μ m kalınlığında üçer adet kesit adeziv lama alındı. Preparatlar 1 gece boyunca 37 °C'de etüvde bekletildi, ertesi gün 60 °C'de 20 dakika etüvde bekletildi, 2 kez ksilende 10'er dakika, 2 kez de alkolde 5'er dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. Daha sonra kesitler distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma aşaması için preparatlar sitratlı tampon (pH 8) solüsyonu içerisinde 23 dakika süreyle 98 °C'de

PT modüle (Labvision) alındı. Modülden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla % 3 hidrojen peroksit 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra distile su ile yıkanan preparatlar Sequenza Manuel boyama istasyonuna (Shandon Scientific Limited, Astmoor, UK) dizildi. Yıkama solüsyonu olarak fosfat tampon solüsyonu (PBS) kullanıldı. 2 kez yıkandıktan sonra 5 dakika protein blok solüsyonu (Sensitek HRP-Anti-Polyvalent, ScyTek Laboratories) ile protein blokajı yapıldı. Sonra PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra primer antikor olan CD4 antikoruna damlatılarak oda ısısında 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kez PBS ile yıkanan preparatlar Biotin içeren sekonder antikor (Sensi Tek Anti-polyvalent, Biotinylated Antibody) ile 45 dakika inkübe edildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra Streptavidin (Sensi Tek HRP) damlatılıp 45 dakika beklendi. Tekrar 2 kez PBS ile yıkanmanın ardından preparatlara 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) (AEC Chromogen/Substrate Bulk Pack, ScyTek Laboratories) damlatıldı ve 15 dakika süre ile bekletildi. 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilin (Merck Mayer's hemalum solution for microscopy) damlatılıp 5 dakika beklenerek karşıt boyama yapıldı. İki kez PBS ile ve sonrasında 5 dakika süre ile akan musluk suyu altında yıkandı. Yıkanan preparatlar 2 defa alkole batırılıp çıkarıldı. Kuruduktan sonra ksilen ile kapatıldı.

3.4.1.2. CD25 (IL-2R α) immünohistokimyasal boyama yöntemi :

İmmünohistokimya için primer antikor olarak CD25(H125a) monoklonal antikor (CD25 [H125a] Antibody, Mouse monoclonal, Abbiotec, San Diego) kullanıldı. Optimal dilüsyon olarak 1/100 oranında hazırlandı.

İmmünohistokimyasal inceleme için seçilen bloklardan 4 μ m kalınlığında üçer adet kesit adeziv lama alındı. Preparatlar 1 gece boyunca 37 °C'de etüvde bekletildi, ertesi gün 60 °C'de 20 dakika etüvde bekletildi, 2 kez ksilende 10'er dakika, 2 kez de alkolde 5'er dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. Daha sonra kesitler distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma aşaması için preparatlar sitratlı tampon (pH 8) solüsyonu içerisinde 23 dakika süreyle 98 °C'de PT modüle (Labvision) alındı. Modülden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla % 3 hidrojen peroksit 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra distile su ile yıkanan preparatlar Sequenza Manuel boyama istasyonuna (Shandon Scientific Limited, Astmoor, UK) dizildi. Yıkama solüsyonu olarak fosfat tampon solüsyonu (PBS)

kullanıldı. İki kez yıkandıktan sonra 5 dakika protein blok solüsyonu (Sensitek HRP-Anti-Polyvalent, ScyTek Laboratories) ile protein blokajı yapıldı. Sonra PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra primer antikor CD25 (monoklonal) antikorunu damlatılarak oda ısısında 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kez PBS ile yıkanan preparatlar Biotin içeren sekonder antikor (Sensi Tek Anti-polyvalent, Biotinylated Antibody) ile 45 dakika inkübe edildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra Strep-AB kompleks (Sensi Tek HRP) damlatılıp 45 dakika beklendi. Tekrar 2 kez PBS ile yıkanmanın ardından preparatlara 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) (AEC Chromogen/Substrate Bulk Pack, ScyTek Laboratories) damlatıldı ve 15 dakika süre ile bekletildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen (Merck Mayer's hemalum solution for microscopy) damlatılıp 5 dakika beklenerek karşıt boyama yapıldı. İki kez PBS ile ve sonrasında 5 dakika süre ile akan musluk suyu altında yıkandı. Yıkanan preparatlar 2 defa alkole batırılıp çıkarıldı. Kuruduktan sonra ksilen ile kapatıldı.

3.4.1.3. Foxp3 immünohistokimyasal boyama yöntemi:

İmmünohistokimya için primer antikor olarak Foxp3 antikorunu (Rabbit Monoclonal [SP97] Foxp3 antibody, prediluted, Abcam, ab99964, Cambridge) kullanıldı.

İmmünohistokimyasal inceleme için seçilen bloklardan 4 µm kalınlığında üçer adet kesit adeziv lama alındı. Preparatlar 1 gece boyunca 37 °C'de etüvde bekletildi, ertesi gün 60 °C'de 20 dakika etüvde bekletildi, 2 kez ksilende 10'er dakika, 2 kez de alkolde 5'er dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. Daha sonra kesitler distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma aşaması için preparatlar sitratlı tampon (pH 8) solüsyonu içerisinde 23 dakika süreyle 98 °C'de PT modüle (Labvision) alındı. Modülden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla % 3 hidrojen peroksit 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra distile su ile yıkanan preparatlar Sequenza Manuel boyama istasyonuna (Shandon Scientific Limited, Astmoor, UK) dizildi. Yıkama solüsyonu olarak fosfat tampon solüsyonu (PBS) kullanıldı. İki kez yıkandıktan sonra 5 dakika protein blok solüsyonu (Sensitek HRP-Anti-Polyvalent, ScyTek Laboratories) ile protein blokajı yapıldı. Sonra PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra primer antikor olan Foxp3 antikorunu damlatılarak oda ısısında 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kez PBS ile yıkanan preparatlar

Biotin içeren sekonder antikor (Sensi Tek Anti-polyvalent, Biotinylated Antibody) ile 45 dakika inkübe edildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra Strep-AB kompleksi (Sensi Tek HRP) damlatılıp 45 dakika beklendi. Tekrar 2 kez PBS ile yıkanmanın ardından preparatlara 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) (AEC Chromogen/Substrate Bulk Pack, ScyTek Laboratories) damlatıldı ve 15 dakika süre ile bekletildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen (Merck Mayer's hemalum solution for microscopy) damlatılıp 5 dakika beklenerek karşıt boyama yapıldı. İki kez PBS ile ve sonrasında 5 dakika süre ile akan musluk suyu altında yıkandı. Yıkanan preparatlar 2 defa alkole batırılıp çıkarıldı. Kuruduktan sonra ksilen ile kapatıldı.

3.4.1.4. TBG- β immünohistokimyasal boyama yöntemi:

İmmünohistokimya için primer antikor olarak TGF- β antikoru (TGF- β 1 Antibody, Rabbit polyclonal, Abbiotec, San Diego) kullanıldı. Optimal dilüsyon olarak 1/200 oranında hazırlandı.

İmmünohistokimyasal inceleme için seçilen bloklardan 4 μ m kalınlığında üçer adet kesit adeziv lama alındı. Preparatlar 1 gece boyunca 37 °C'de etüvde bekletildi, ertesi gün 60 °C'de 20 dakika etüvde bekletildi, 2 kez ksilende 10'ar dakika, 2 kez de alkolde 5'er dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. Daha sonra kesitler distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma aşaması için preparatlar sitratlı'lı tampon (pH 8) solüsyonu içerisinde 23 dakika süreyle 98 °C'de PT modüle (Labvision) alındı. Modülden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla % 3 hidrojen peroksit 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra distile su ile yıkanan preparatlar Sequenza Manuel boyama istasyonuna (Shandon Scientific Limited, Astmoor, UK) dizildi. Yıkama solüsyonu olarak fosfat tampon solüsyonu (PBS) kullanıldı. İki kez yıkandıktan sonra 5 dakika protein blok solüsyonu (Blocking Reagent-ultra v blok, Labvision) ile protein blokajı yapıldı. Sonra PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra primer antikor olan TGF- β antikoru damlatılarak oda ısısında 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kez PBS ile yıkanan preparatlar Biotin içeren sekonder antikor (Sensi Tek Anti-polyvalent, Biotinylated Antibody) ile 45 dakika inkübe edildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra Strep-AB kompleksi (Sensi Tek HRP) damlatılıp 45 dakika beklendi. Tekrar 2 kez PBS ile yıkanmanın ardından preparatlara 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) (AEC Chromogen/Substrate Bulk Pack, ScyTek Laboratories) damlatıldı ve 15 dakika süre ile bekletildi. 2 kez

PBS ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen (Merck Mayer's hemalum solution for microscopy) damlatılıp 5 dakika beklenerek karşıt boyama yapıldı. İki kez PBS ile ve sonrasında 5 dakika süre ile akan musluk suyu altında yıkandı. Yıkanan preparatlar 2 defa alkole batırılıp çıkarıldı. Kuruduktan sonra ksilen ile kapatıldı.

3.4.1.5. IL-10 immünohistokimyasal boyama yöntemi:

İmmünohistokimya için primer antikor olarak IL-10 antikorunu (IL-10 Antibody, Rabbit Polyclonal, Abbiotec, San Diego) kullanıldı. Optimal dilüsyon olarak 1/400 oranında hazırlandı.

İmmünohistokimyasal inceleme için seçilen bloklardan 4 µm kalınlığında üçer adet kesit adeziv lama alındı. Preparatlar 1 gece boyunca 37 °C'de etüvde bekletildi, ertesi gün 60 °C'de 20 dakika etüvde bekletildi, 2 kez ksilende 10'er dakika, 2 kez de alkolde 5'er dakika bekletilerek deparafinizasyon tamamlandı. Daha sonra kesitler distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma aşaması için preparatlar sitratlı litampon (pH 8) solüsyonu içerisinde 23 dakika süreyle 98 °C'de PT modüle (Labvision) alındı. Modülden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla % 3 hidrojen peroksit 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra distile su ile yıkanan preparatlar Sequenza Manuel boyama istasyonuna (Shandon Scientific Limited, Astmoor, UK) dizildi. Yıkama solüsyonu olarak fosfat tampon solüsyonu (PBS) kullanıldı. İki kez yıkandıktan sonra 5 dakika protein blok solüsyonu (Blocking Reagent-ultra v blok, Labvision) ile protein blokajı yapıldı. Sonra PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra primer antikor olan IL-10 antikorunu damlatılarak oda ısısında 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kez PBS ile yıkanan preparatlar Biotin içeren sekonder antikor (Sensi-Tek Anti-polyvalent, Biotinylated Antibody) ile 45 dakika inkübe edildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra Strep-AB kompleksi (Sensi Tek HRP) damlatılıp 45 dakika beklendi. Tekrar 2 kez PBS ile yıkanmanın ardından preperatlara "3-Amino-9-Ethylcarbazole" (AEC) (AEC Chromogen/Substrate Bulk Pack, ScyTek Laboratories) damlatıldı ve 15 dakika süre ile bekletildi. İki kez PBS ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen (Merck Mayer's hemalum solution for microscopy) damlatılıp 5 dakika beklenerek karşıt boyama yapıldı. İki kez PBS ile ve sonrasında 5 dakika süre ile akan musluk suyu altında yıkandı. Yıkanan preparatlar 2 defa alkole batırılıp çıkarıldı. Kuruduktan sonra ksilen ile kapatıldı.

3.4.2. İMMÜNOHİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ:

Hazırlanan kesitler, ışık mikroskobu altında çalışmayı yürüten KÜTF Patoloji AD öğretim üyesi olan tek bir patolog tarafından değerlendirmeye alındı. IL-10, TGF β , için epidermisdeki keratinositler ve dermisteki mononükleer inflamatuvar hücre infiltratı üzerinde değerlendirme yapıldı. CD4, CD25 ve Foxp3 için epidermisteki boyanma spesifik olmayan çapraz reaksiyon olarak değerlendirildi ve bu nedenle istatistiksel değerlendirmeye epidermisteki boyanma dahil edilmedi. Dermiste mononükleer hücrelerce sergilenen Foxp3 boyanma paterninin, nükleer veya intranükleer \pm perinükleer olması özelliği arandı.

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanmış kesitlerde izlenen doku ekspresyon yoğunluğunu belirtmek için semikantitatif yöntemle 0 – 3 arasında; 0, 1, 2, 3 olarak isimlendirilen patolojik skorlama sistemi oluşturuldu. Patolojik skor her bir kesitte 10 adet mikroskobik alanda (x400 büyütmede) yapılan boyanmış hücre sayımının ortalaması alınarak (global değerlendirilmesi yapılarak) belirlendi. Mikroskobik alanda (x400 büyütmede) toplam hücre sayısının 1/3'ünde boyanma varsa skor 1; 1/3-2/3 arasında boyanma var ise skor 2; 2/3'den fazla boyanma var ise skor 3, boyanma yok ise: skor 0 olarak kabul edildi.

3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi “Statistical Packages for the Social Sciences” (SPSS) versiyon 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) for Windows programında yapılmıştır. Değerlendirmelerde; kontrol ve hasta gruplarının yaş açısından karşılaştırmasında Student's t testi, hem lezyonlu hemde lezyonsuz bölge için immünokimyasal parametrelerin karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi, hasta grubunda lezyonlu ve lezyonsuz bölge karşılaştırmalarında Wilcoxon testi kullanılmıştır. Hasta grubunda; lezyonlu ve lezyonsuz deri örnekleri için VYA (vücut yüzey alanı) , VIDA (Vitiligo hastalık aktivite skoru) skoru ve hastalık süresi ile immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişkiler Spearman Rank Korelasyon Analizi ile yapıldı

Tanımlayıcı değerler olarak sayı, yüzdelik ve ortalama \pm standart sapma (ort \pm SS) değerleri verilmiştir. Anlamlılık sınırı 0.05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışma; 30 vitiligo hastasına ait lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları içeren 30'ar doku örneği içeren hasta grubu ile KÜTF Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı arşivinde yer alan benign nevüs eksizyon materyallerindeki normal deri alanlarını içeren 30 doku örneğinden oluşan kontrol grubu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hasta grubunda yer alan vitiligolu olguların yaşları 18 ile 63 yıl ($41,03 \pm 2.69$ yıl) arasında değişmekte olup, hasta ve kontrol gruplarında cinsiyet dağılımı, 13 erkek (% 43.30) ve 17 kadın (% 56.70) olgu olacak şekilde eşitlendi. Yaş ortalaması açısından; kontrol grubu (40.06 ± 12.87 yıl) ile hasta grubu ($41,03 \pm 2.69$ yıl) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0.788$, student's t test). Hasta grubunda vitiligo başlangıç yaşı ortalaması $34,06 \pm 14.72$ yıl (ortanca: 33.00 yıl) olarak belirlendi. Hastalık süresi ortalaması 83.80 ± 104.13 ay (ortanca: 36.00 ay) olarak hesaplandı.

Hasta grubunun özgeçmiş sorgulamasında; 14 olguda (% 46.70) vitiligo dışında ikinci bir otoimmün hastalığın mevcut olduğu öğrenildi. Hasta grubu otoimmün hastalık profili; 4 olguda (% 13.30) otoimmün tiroid hastalığı, 6 olguda (% 20) tip II diyabetes mellitus, 3 olguda (% 10) alopesi areata, 6 olguda (% 20) pernisiyöz anemi, 1 olguda (% 3.33) romatoid artrit ile 1 olguda (% 3.33) sistemik lupus eritamatozus ve 1 olguda (% 3.33) gonadal atrezi öyküsüyle belirlendi. Vitiligolu hastaların % 16.70'sinde ek dermatolojik hastalık öyküsü vardı. İki olguda (% 6.70) rozase, 2 olguda (% 6.70) kontakt dermatit, 1 olguda (% 3.30) kserozis tanısı olduğu öğrenildi. Hasta grubunda; 7 olguda (% 23.33) vitiligoya eşlik eden sistemik hastalık öyküsü mevcuttu. Üç olguda hipertansiyon (% 16.67), 1 olguda astım (% 6.67), 1 olguda hiperlipidemi (% 3.33), 2 olguda koroner arter hastalığı (% 6.67) öyküsü bulunmaktaydı. Vitiligolu hastalara ait anamnezde % 66.70 ($n=20$) oranında vitiligo başlangıcı ile eş zamanlı travmatik yaşam olayı öyküsü (bir yakınının kaybı, trafik kazası, hastalık, eşten ayrılma vb.) olduğu belirtildi. Vitiligolu olguların % 46.70'sinde ($n=14$) ailesel vitiligo öyküsü olduğu belirlendi. Hastaların soygeçmişleri sorgulandığında ailede vitiligo dışı otoimmün hastalık öyküsü veren 14 olgu (% 46.70) olduğu saptandı (Tablo 5). Bu 14 olgunun % 26.67'si otoimmün tiroid hastalığı, % 33.33'ü tip II diyabetes mellitus, % 10'ununda

alopesi areata olduğu öğrenildi. Olguların % 36.67'sinde (n=11) Koebner fenomeni pozitifliği mevcuttu.

Tablo 5. Vitiligolu hasta grubuna ait özellikler

Hasta Özellikleri	ort±SS	n	%
Cinsiyet dağılımı: Kadın/Erkek	-	17/13	56.70-43.30
Yaş dağılımı: 18-63 yıl arasında	41.03±2.69yıl	-	-
Hastalık başlangıç yaşı	34.06±14.72yıl	-	-
Hastalık süresi	83.80±104.13ay	-	-
Ek otoimmün hastalık öyküsü varlığı	-	14	46.70
Ailede otoimmün hastalık öyküsü varlığı	-	14	46.70
Ek dermatolojik hastalık öyküsü varlığı	-	5	16.70
Ailede vitiligo öyküsü varlığı	-	14	46.70
Koebner fenomeni pozitifliği	-	11	36.67
Vitiligo başlangıcında travmatik yaşam olayı öyküsü varlığı	-	20	66.70
Vitiligoya eşlik eden sistemik hastalık öyküsü varlığı (hipertansiyon, astım, hiperlipidemi)	-	7	23.33

ort±SS: ortalama±Standart Sapma, n=hasta sayısı

Hasta grubunun dermatolojik değerlendirmesi sonucu, vitiligo klinik tipleri açısından sınıflandırılma yapıldığında 27 olguda (% 90) jeneralize vitiligo, 3 olguda (% 10) ise universal vitiligo izlendi. Jeneralize vitiligo olgularının % 53.30'u (n=16) vitiligo vulgaris, % 36.70'i (n=11) akrofasiyal tipteydi (Tablo 6).

Tablo 6. Hasta grubunun vitiligo klinik tiplerine göre dağılımı.

Vitiligo klinik tipi	Alt tipi	n	%
Lokalize vitiligo	Unilateral vitiligo	-	-
	Fokal vitiligo	-	-
	Mukozal vitiligo	-	-
Jeneralize vitiligo	Vitiligo vulgaris	16	53.30
	Akrofasiyal vitiligo	11	36.70
	Karma vitiligo	-	-
Universal vitiligo		3	10

n: hasta sayısı

Hastalarda vitiligo aktivitesini belirlemek için gerçekleştirilen VIDA (“Vitiligo Disease Activity Score”) skorlaması sonuçları Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. Hasta grubunun VIDA skorlarına göre dağılımı

VIDA Skoru	n	%
+4	21	70.03
+3	2	6.66
+2	1	3.33
+1	2	6.66
0	4	13.32
-1	0	0

n: hasta sayısı

Vitiligolu hastalara ait; lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinden oluşturulan hasta alt grupları ile sağlam deri örneklerinden oluşturulan kontrol grubu arasında immünohistokimyasal parametrelerin (CD4, CD25, Foxp3, IL-10, TGF- β) ekspresyonu açısından yapılan değerlendirme sonuçları Tablo 8-12’de ayrı ayrı sunulmaktadır.

İMMÜNOHİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI:

CD4 ekspresyonu:

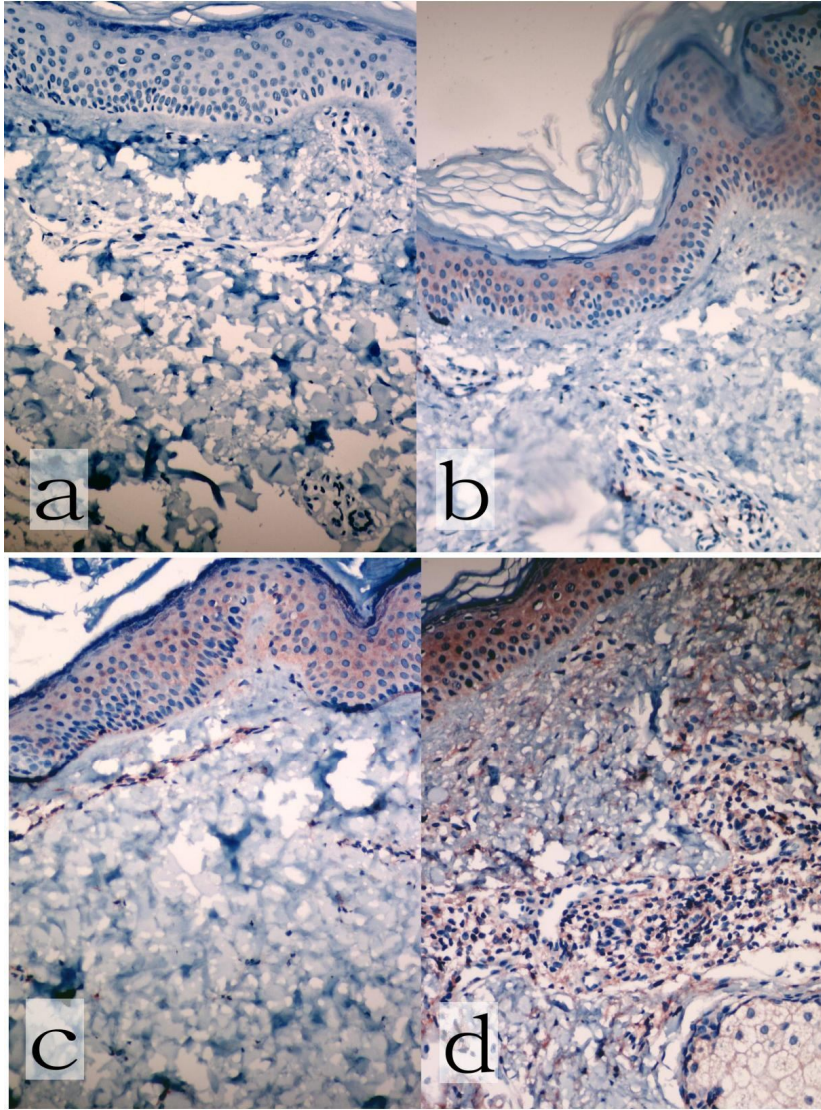
Hasta grubundaki lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları ile kontrol grubundaki normal deri alanlarının immünohistopatolojik değerlendirmesi sonucu dermiste CD4 eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait

örnek immunohistopatolojik görünümle Şekil 3’de gösterilmektedir. Hasta ve kontrol gruplarına ait CD4 ekspresyon skorları Tablo 8’de özetlenmiştir.

- Hasta grubunda lezyonlu deri örneklerinde CD4 ekspresyon skoru ort±SS: 1.00±0.88.
- Hasta grubunda lezyonsuz deri örneklerinde CD4 ekspresyon skoru ort±SS: 1.00±0.85.
- Kontrol materyallerinde CD4 ekspresyon skoru ort±SS: 2.00±1.06.

- Lezyonlu deride lezyonsuz deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, her iki alt grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.557).
- Lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p=0.030).
- Lezyonsuz deride kontrol deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p=0.010).

Sonuç olarak; dermiste CD4 ekspresyonu düzeyi ortalaması lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur.



Şekil 3. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin CD4'e ait immünohistopatolojik görünüşleri: İmmünohistopatolojik değerlendirme sonucu dermiste CD4 ekspresyon eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek görünüşler sunulmaktadır.

- a.** Patolojik skor: 0, x200, (Hasta no: 2),
- b.** Patolojik skor: 1, x200,(Hasta no: 22),
- c.** Patolojik skor: 2, x200,(Hasta no: 27),
- d.** Patolojik skor: 3, x200, (Hasta no: 14).

Tablo 8. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde CD4 için gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.

İmmüno- histokimyasal Parametre	HASTA GRUBU						P değeri ⁴	KONTROL GRUBU			P değeri ⁵	P değeri ⁶
	LEZYONLU DERİ ÖRNEĞİ			LEZYONSUZ DERİ ÖRNEĞİ				Patoloji Skoru	% (n)	ort±SS		
	Patoloji Skoru ¹	% (n) ²	ort±SS ³	Patoloji Skoru	% (n)	ort±SS						
CD4 Dermis	0	23.30 (7)	1.00 ± 0.88	0	33.30 (10)	1.00 ± 0.85	0.557	0	16.70 (5)	2.00 ± 1.06	0.030	0.010
	1	53.30 (16)		1	40 (12)			1	26.70 (8)			
	2	13.30 (4)		2	23.30 (7)			2	30 (9)			
	3	10 (3)		3	3.30 (1)			3	26.70 (8)			

¹ **Patoloji Skoru:** 0; boyanma yok, 1; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3' ünden az, 2; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3-2/3'ü arasında, 3; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 2/3'ünden fazla.

² **n:** olgu sayısı.

³ **ort±SS:** Ortalama± standart sapma.

⁴ **p değeri:** Hasta grubunda lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin her iki alt grup arasında karşılaştırılması. Lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin ortalama değerleri **Wilcoxon** testi ile karşılaştırılmıştır.

⁵ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonlu deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U** testi kullanılmıştır.

⁶ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonsuz deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U** testi kullanılmıştır.

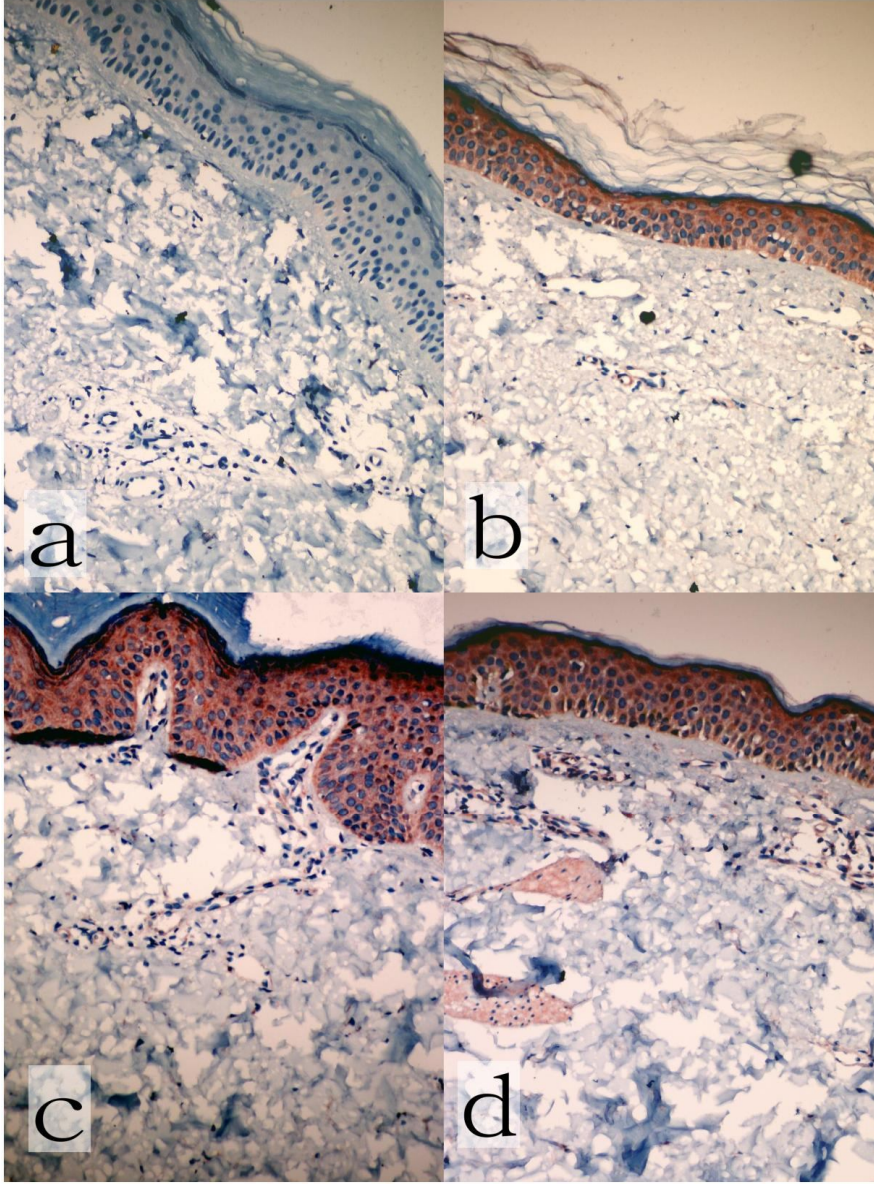
Dermiste CD25 ekspresyonu

Hasta grubundaki lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları ile kontrol grubundaki normal deri alanlarının immünohistopatolojik değerlendirmesi sonucu dermiste CD25 eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek immünohistopatolojik görünümler Şekil 4’de gösterilmektedir. Hasta ve kontrol gruplarına ait CD25 ekspresyon skorları Tablo 9’da özetlenmiştir.

- Hasta grubunda lezyonlu deri örneklerinde CD25 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 2.00 ± 1.00 .
- Hasta grubunda lezyonsuz deri örneklerinde CD25 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 2.00 ± 1.10 .
- Kontrol materyallerinde CD25 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 1.00 ± 0.88 .

- Lezyonlu deride lezyonsuz deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, her iki alt grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.169$).
- Lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre daha yüksek düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.017$).
- Lezyonsuz deride kontrol deri örneklerine göre daha yüksek düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.001$).

Sonuç olarak; dermiste CD25 ekspresyonu düzeyi ortalaması lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.



Şekil 4. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin CD25'e ait immünohistopatolojik görünümleri: İmmünopatolojik değerlendirme sonucu dermiste CD25 eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek görünümler sunulmaktadır.

- a. Patolojik skor: 0, x200, (Hasta no: 4),
- b. Patolojik skor: 1, x200, (Hasta no: 19),
- c. Patolojik skor: 2, x200, (Hasta no: 10),
- d. Patolojik skor: 3, x200, (Hasta no: 20).

Tablo 9. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde CD25 için gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.

İmmüno- histokimyasal Parametre	HASTA GRUBU						p değeri ⁴	KONTROL GRUBU			p değeri ⁵	p değeri ⁶
	LEZYONLU DERİ ÖRNEĞİ			LEZYONSUZ DERİ ÖRNEĞİ				Patoloji Skoru	%	ort±SS		
	Patoloji Skoru ¹	% (n) ²	ort±SS ³	Patoloji Skoru	% (n)	ort±SS						
CD25 Dermis	0	16.7 (5)	2.00 ± 1.00	0	20 (6)	2.00 ± 1.10	0.169	0	40 (12)	1.00 ± 0.88	0.017	0.001
	1	26.7 (8)		1	6.7 (2)			1	23.3 (7)			
	2	36.7 (11)		2	40 (12)			2	36.7 (11)			
	3	20 (6)		3	33.3 (10)			3	0 (0)			

¹ **Patoloji Skoru:** 0; boyanma yok, 1; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3' ünden az, 2; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3-2/3'ü arasında, 3; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 2/3'ünden fazla.

² **n:** olgu sayısı.

³ **ort±SS:** Ortalama± standart sapma.

⁴ **p değeri:** Hasta grubunda lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin her iki alt grup arasında karşılaştırılması. Lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin ortalama değerleri **Wilcoxon** testi ile karşılaştırılmıştır.

⁵ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonlu deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

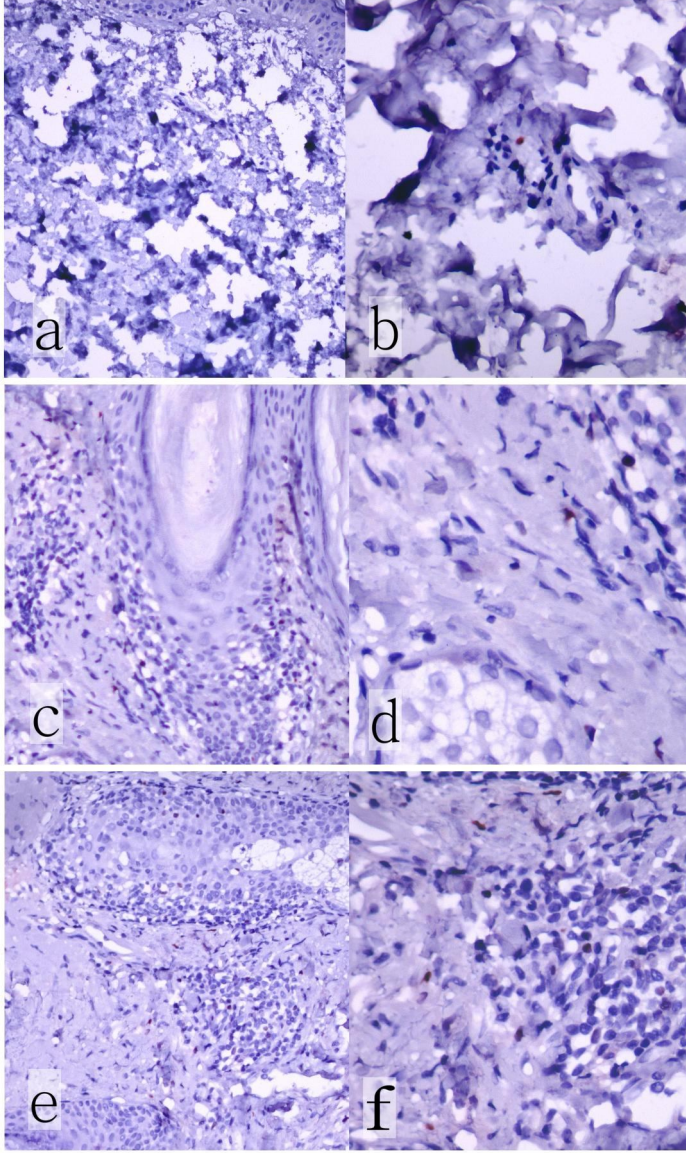
⁶ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonsuz deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

Dermiste Foxp3 ekspresyonu:

Hasta grubundaki lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları ile kontrol grubundaki normal deri alanlarının immünohistopatolojik değerlendirmesi sonucu dermiste Foxp3 eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek immünohistopatolojik görünümler Şekil 5’de gösterilmektedir. Hasta ve kontrol gruplarına ait Foxp3 ekspresyon skorları Tablo 10’da özetlenmiştir.

- Hasta grubunda lezyonlu deri örneklerinde Foxp3 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 0.00 ± 0.72 .
- Hasta grubunda lezyonsuz deri örneklerinde Foxp3 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 1.00 ± 0.69 .
- Kontrol materyallerinde Foxp3 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 2.00 ± 0.79 .
- Lezyonlu deride lezyonsuz deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, her iki alt grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.004$).
- Lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.003$).
- Lezyonsuz deride kontrol deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.900$).

Sonuç olarak; dermiste Foxp3 ekspresyonu düzeyi ortalaması lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre ve lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük iken lezyonsuz deri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte düşük olduğu bulunmuştur.



Şekil 5. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin Foxp3'e ait immünohistopatolojik görünüşleri: İmmünopatolojik değerlendirme sonucu dermiste Foxp3 eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek görünüşler sunulmaktadır.

- a. Patolojik skor: 0, x200, (Hasta no: 3),
- b. Patolojik skor: 1, x200, (Hasta no: 6),
- c. Patolojik skor: 2, x200, (Hasta no: 4),
- d. Patolojik skor: 2, x400, (Hasta no: 4),
- e. Patolojik skor: 3, x200, (Hasta no: 30),
- f. Patolojik skor: 3, x400, (Hasta no: 30).

Tablo 10. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde Foxp3 için gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.

İmmüno- histokimyasal Parametre	HASTA GRUBU						p değeri ⁴	KONTROL GRUBU			p değeri ⁵	p değeri ⁶
	LEZYONLU DERİ ÖRNEĞİ			LEZYONSUZ DERİ ÖRNEĞİ				Patoloji Skoru	%	ort±SS		
	Patoloji Skoru ¹	% (n) ²	ort±SS ³	Patoloji Skoru	% (n)	ort±SS						
Foxp3 Dermis	0	66.7 (20)	0.00 ± 0.727	0	20.0 (6)	1.00 ± 0.69	0.004	0	33.3 (10)	2.00 ± 0.79	0.003	0.900
	1	26,7 (8)		1	53.3 (16)			1	30.0 (9)			
	2	3,3 (1)		2	26.7 (8)			2	23.3 (7)			
	3	3,3 (1)		3	0 (0)			3	13.3 (4)			

¹ **Patoloji Skoru:** 0; boyanma yok,1; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3' ünden az, 2; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3-2/3'ü arasında, 3; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 2/3'ünden fazla .

² **n:** olgu sayısı.

³ **ort±SS:** Ortalama± standart sapma.

⁴ **p değeri:** Hasta grubunda lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin her iki alt grup arasında karşılaştırılması. Lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin ortalama değerleri **Wilcoxon** testi ile karşılaştırılmıştır.

⁵ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonlu deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

⁶ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonsuz deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

Epidermiste IL-10 ekspresyonu

Hasta grubundaki lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları ile kontrol grubundaki normal deri alanlarının immünohistopatolojik değerlendirmesi sonucu epidermiste IL-10 eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek immunohistopatolojik görünümler Şekil 6'da gösterilmektedir. Hasta ve kontrol gruplarına ait IL-10 ekspresyon skorları Tablo 11'de özetlenmiştir.

- Hasta grubunda lezyonlu deri örneklerinde IL-10 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 2.00 ± 0.66 .
- Hasta grubunda lezyonsuz deri örneklerinde IL-10 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 2.00 ± 0.64 .
- Kontrol materyallerinde IL-10 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 2.00 ± 0.69 .

- Lezyonlu deride lezyonsuz deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki alt grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.000$).
- Lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.041$).
- Lezyonsuz deride kontrol deri örneklerine göre daha yüksek düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.345$).

Sonuç olarak; epidermiste IL-10 ekspresyonu düzeyi ortalaması lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük ve lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük iken lezyonsuz deri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yüksek olduğu bulunmuştur.

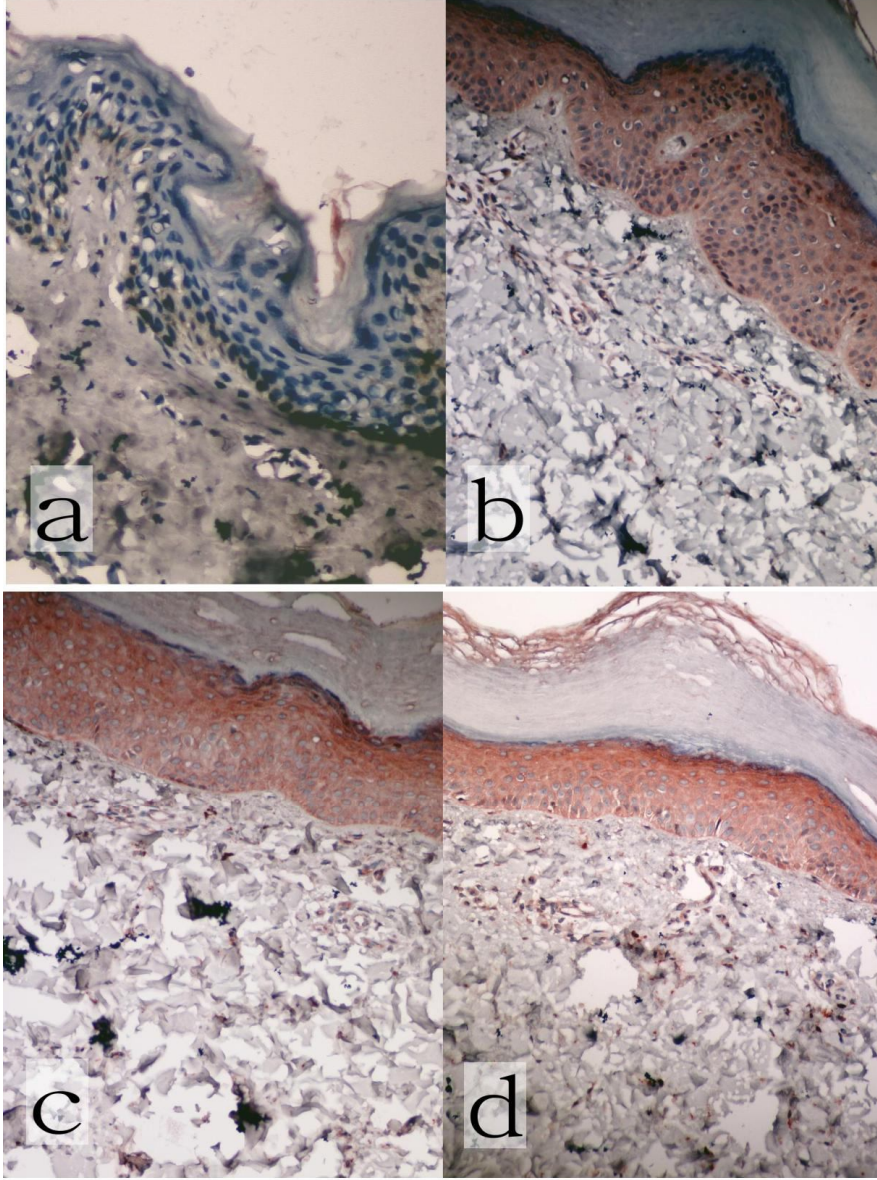
Dermiste IL-10 ekspresyonu

Hasta grubundaki lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları ile kontrol grubundaki normal deri alanlarının immünohistopatolojik değerlendirmesi sonucu dermiste IL-10 eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek immunohistopatolojik görünümler Şekil 6'da gösterilmektedir. Hasta ve kontrol gruplarına ait IL-10 ekspresyon skorları Tablo 11'de özetlenmiştir.

- Hasta grubunda lezyonlu deri örneklerinde IL-10 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 1.50 ± 0.71 .
- Hasta grubunda lezyonsuz deri örneklerinde IL-10 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 2.00 ± 0.61 .
- Kontrol materyallerinde IL-10 ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 2.00 ± 0.86 .

- Lezyonlu deride lezyonsuz deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki alt grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.001$).
- Lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.000$).
- Lezyonsuz deride kontrol deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.033$).

Sonuç olarak; dermiste IL-10 ekspresyonu düzeyi ortalaması lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur.



Şekil 6. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin IL-10'a ait immünohistopatolojik görünüşleri: İmmünopatolojik değerlendirme sonucu epidermis ve dermiste IL-10 eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek görünüşler sunulmaktadır.

- a. Patolojik skor: 0, x200, (Hasta no: 11),
- b. Patolojik skor: 1, x200, (Hasta no: 3),
- c. Patolojik skor: 2, x200, (Hasta no: 16),
- d. Patolojik skor: 3, x200, (Hasta no: 17).

Tablo 11. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde IL-10 için epidermis ve dermiste gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.

İmmüno- histokimyasal Parametre	HASTA GRUBU						p değeri ⁴	KONTROL GRUBU			p değeri ⁵	p değeri ⁶
	LEZYONLU DERİ ÖRNEĞİ			LEZYONSUZ DERİ ÖRNEĞİ				Patoloji Skoru	% (n)	ort±SS		
	Patoloji Skoru ¹	% (n) ²	ort±SS ³	Patoloji Skoru	% (n)	ort±SS						
IL-10 Epidermis	0	0 (0)	2.00 ± 0.66	0	0 (0)	2.00 ± 0.64	0.000	0	0 (0)	2.00 ± 0.69	0.041	0.345
	1	46.7 (14)		1	13.3 (4)			1	23.3 (7)			
	2	43.3 (13)		2	56.7 (17)			2	53.3 (16)			
	3	10 (3)		3	30 (9)			3	23.3 (7)			
IL-10 Dermis	0	13.3 (4)	1.50 ± 0.71	0	3.3 (1)	2.00 ± 0.61	0.001	0	6.7 (2)	2.00 ± 0.86	0.000	0.033
	1	36.7 (11)		1	10 (3)			1	6.7 (2)			
	2	50 (15)		2	73.3 (22)			2	40 (12)			
	3	0 (0)		3	13.3 (4)			3	46.7 (14)			

¹ **Patoloji Skoru:** 0; boyanma yok, 1; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3' ünden az, 2; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3-2/3' ü arasında, 3; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 2/3' ünden fazla.

² **n:** olgu sayısı.

³ **ort±SS:** Ortalama± standart sapma.

⁴ **p değeri:** Hasta grubunda lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin her iki alt grup arasında karşılaştırılması. Lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin ortalama değerleri **Wilcoxon** testi ile karşılaştırılmıştır.

⁵ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonlu deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

⁶ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonsuz deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

Epidermiste TGF-β ekspresyonu

Hasta grubundaki lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları ile kontrol grubundaki normal deri alanlarının immünohistopatolojik değerlendirmesi sonucu epidermiste TGF-β eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek immünohistopatolojik görünümler Şekil 7’de gösterilmektedir. Hasta ve kontrol gruplarına ait TGF-β ekspresyon skorları Tablo 12’de özetlenmiştir.

- Hasta grubunda lezyonlu deri örneklerinde TGF-β ekspresyon skoru ort±SS: 2.00±0.77.
- Hasta grubunda lezyonsuz deri örneklerinde TGF-β ekspresyon skoru ort±SS: 2.00±0.71.
- Kontrol materyallerinde TGF-β ekspresyon skoru ort±SS: 0.00±0.67.

- Lezyonlu deride lezyonsuz deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki alt grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.001).
- Lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre daha yüksek düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.000).
- Lezyonsuz deride kontrol deri örneklerine göre daha yüksek düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.000).

Sonuç olarak: epidermiste TGF-β ekspresyonu düzeyi ortalaması lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

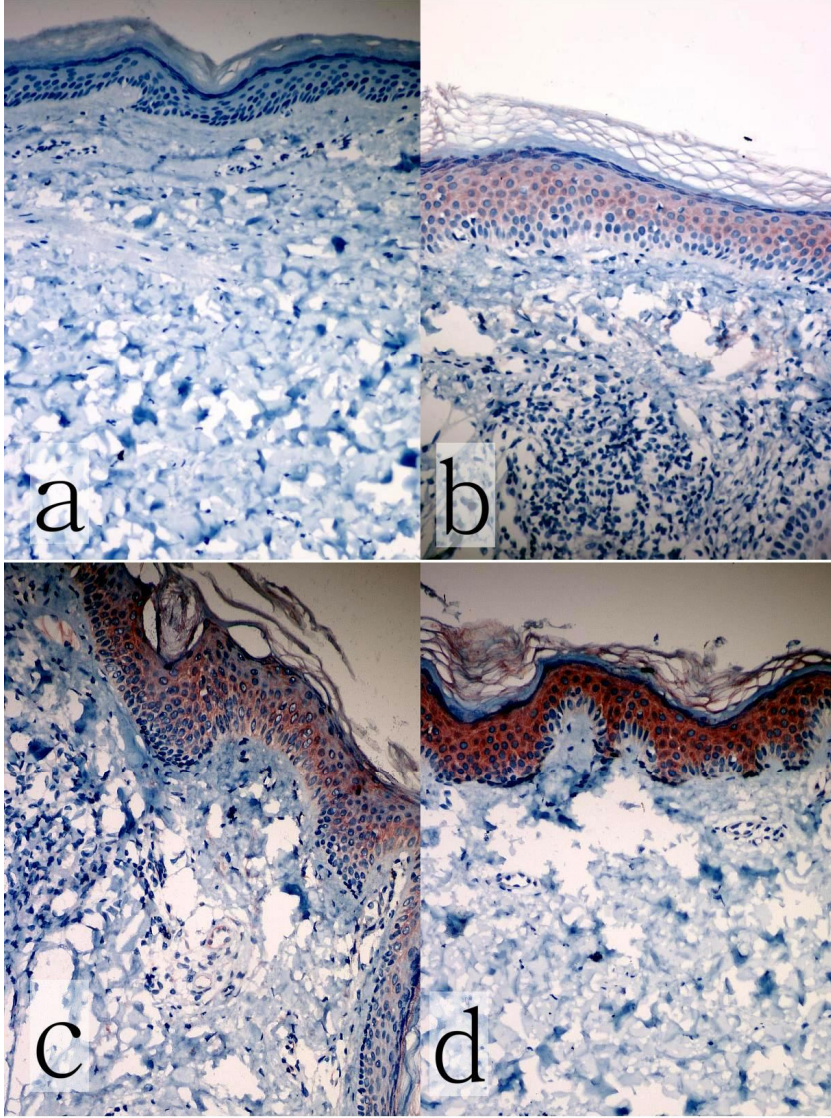
Dermiste TGF-β ekspresyonu

Hasta grubundaki lezyonlu ve lezyonsuz deri alanları ile kontrol grubundaki normal deri alanlarının immünohistopatolojik değerlendirmesi sonucu dermiste TGF-β eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek immünohistopatolojik görünümler Şekil 7’de gösterilmektedir. Hasta ve kontrol gruplarına ait TGF-β ekspresyon skorları Tablo 12’de özetlenmiştir.

- Hasta grubunda lezyonlu deri örneklerinde TGF-β ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 0.00 ± 0.58 .
- Hasta grubunda lezyonsuz deri örneklerinde TGF-β ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 0.00 ± 0.92 .
- Kontrol materyallerinde TGF-β ekspresyon skoru $ort \pm SS$: 0.00 ± 0.18 .

- Lezyonlu deride lezyonsuz deri örneklerine göre daha düşük düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki alt grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.019$).
- Lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre daha yüksek düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.044$).
- Lezyonsuz deride kontrol deri örneklerine göre daha yüksek düzeyde ekspresyon saptanmıştır, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.001$).

Sonuç olarak; dermiste TGF-β ekspresyonu düzeyi ortalaması lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.



Şekil 7. Hasta grubuna ait vitiligo lezyonlu deri örneklerinin TGF- β 'ya ait immünohistopatolojik görünümüleri: İmmünopatolojik değerlendirme sonucu epidermis ve dermiste TGF- β eksprese eden hücrelerin yoğunluğu dikkate alınarak yapılan patolojik skorlamaya ait örnek görünümler sunulmaktadır.

- a. Patolojik skor: 0, x200, (Hasta no: 1),
- b. Patolojik skor: 1, x200, (Hasta no: 2),
- c. Patolojik skor: 2, x200, (Hasta no: 13),
- d. Patolojik skor: 3, x200, (Hasta no: 25).

Tablo 12. Hasta grubu; lezyonlu ve lezyonsuz deri alt grupları ile kontrol grubuna ait örneklerde TGF- β için epidermis ve dermiste gerçekleştirilen immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması.

İmmüno- histokimyasal Parametre	HASTA GRUBU						p değeri ⁴	KONTROL GRUBU			p değeri ⁵	p değeri ⁶
	LEZYONLU DERİ ÖRNEĞİ			LEZYONSUZ DERİ ÖRNEĞİ				Patoloji Skoru	%	ort \pm SS		
	Patoloji Skoru ¹	% (n) ²	ort \pm SS ³	Patoloji Skoru	% (n)	ort \pm SS						
TGF- β Epidermis	0	6.7 (2)	2.00 \pm 0.77	0	0 (0)	2.00 \pm 0.71	0.001	0	53.3 (16)	0.00 \pm 0.67	0.000	0.000
	1	36.7 (11)		1	13.3 (4)			1	36.7 (11)			
	2	46.7 (14)		2	40 (12)			2	10 (3)			
	3	10 (3)		3	46.7 (14)			3	0 (0)			
TGF- β Dermis	0	80 (24)	0.00 \pm 0.58	0	60 (18)	0.00 \pm 0.92	0.019	0	96.7 (29)	0.00 \pm 0.18	0.044	0.001
	1	13.3 (4)		1	23.3 (7)			1	3.3 (1)			
	2	6.7 (2)		2	10 (3)			2	0 (0)			
	3	0 (0)		3	6.7 (2)			3	0 (0)			

¹**Patoloji Skoru:** 0; boyanma yok,1; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3' ünden az, 2; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 1/3-2/3'ü arasında, 3; boyanma mononükleer hücre infiltratının (inflamatuvar hücrelerin) 2/3'ünden fazla.

² **n:** olgu sayısı.

³ **ort \pm SD:** Ortalama \pm standart sapma.

⁴ **p değeri:** Hasta grubunda lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin her iki alt grup arasında karşılaştırılması. Lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinin ortalama değerleri **Wilcoxon** testi ile karşılaştırılmıştır.

⁵ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonlu deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

⁶ **p değeri:** Kontrol grubu-Lezyonsuz deri örneklerinin karşılaştırması. **Mann-Whitney U testi** kullanılmıştır.

Hasta grubu, vitiligo dışı ek otoimmün hastalık öyküsü olanlar (n=14, % 46.70) ve olmayanlar (n=16, % 53.30) olmak üzere iki alt gruba ayrıldığında; bu alt gruplar arasında hem lezyonlu hem de lezyonsuz deri örneklerinde CD4, Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β ekspresyonları açısından anlamlı fark saptanmadı (Tablo 13).

Hasta grubu, Koebner fenomeni pozitif olanlar (n=11, % 36.67) ve olmayanlar (n=19, % 63.33) olmak üzere iki alt gruba ayrıldığında; bu alt gruplar arasında lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinde CD4, Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β ekspresyonları açısından anlamlı fark saptanmadı (Tablo 13).

Hasta grubu, ailede vitiligo dışı otoimmün hastalık öyküsü olanlar (n=14, % 46.7) ve olmayanlar (n=16, % 53.3) olmak üzere iki alt gruba ayrıldığında; bu alt gruplar arasında lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinde CD4, Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β ekspresyonları açısından anlamlı fark saptanmadı (Tablo 13).

Hasta grubunda; lezyonlu ve lezyonsuz deri örnekleri için VYA, VIDA skoru ve hastalık süresi ile immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişkiler değerlendirildi. VYA ve hastalık süresi artarken lezyonlu ve lezyonsuz deride CD4 düzeyinde anlamlı bir azalma görülürken, VIDA skoru artışı ile CD4 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 14). VYA, VIDA skoru ve hastalık süresi artışı ile lezyonlu ve lezyonsuz deride Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 14).

Tablo 13. Hasta grubunda; otoimmün hastalık varlığı ve ailede otoimmün hastalık öyküsü varlığı, Koebner fenomeninin varlığı açısından oluşturulan alt gruplar arasında immünohistokimyasal parametrelerin lezyonlu ve lezyonsuz deri örnekleri dikkate alınarak gerçekleştirilen istatistiksel karşılaştırması.

	p değerleri													
	CD4		CD25		FOXP3		IL10				TGFβ			
	L	NL	L	NL	L	NL	L		NL		L		NL	
						EP	DER	EP	DER	EP	DER	EP	DER	
Kişisel otoimmün hastalık varlığı Var/Yok (n=14/16)	0.120	0.918	0.580	0.822	0.334	0.608	0.637	0.580	0.886	0.580	0.077	1.00	0.759	0.886
Ailede otoimmün hastalık varlığı Var/Yok (n=14/16)	0.984	0.984	0.448	0.984	0.353	0.313	0.240	0.984	0.498	0.294	0.257	1.000	0.400	0.377
Koebner fenomeni pozitifliği Var/Yok (n=11/19)	0.328	0.525	0.641	0.350	0.966	0.268	0.611	0.672	0.703	0.966	0.145	0.933	0.933	0.372

Tablo 14. Hasta grubunda; lezyonlu ve lezyonsuz deri örnekleri için VYA (vücut yüzey alanı) , VIDA(Vitiligo hastalık aktivite skoru) skoru ve hastalık süresi ile immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişkiler.

	CD4		CD25		FOXP3		IL10				TGFβ			
	L	NL	L	NL	L	NL	L		NL		L		NL	
							EP	DER	EP	DER	EP	DER	EP	DER
VYA artışı ile ilişki varlığı(r/p)	-0.408/ 0.025	-0.218/ 0.248	0.204/ 0.279	0.001/ 0.994	-0.099/ 0.601	0.116/ 0.542	0.023/ 0.905	0.186/ 0.324	-0.086/ 0.650	0.152/ 0.424	-0.169/ 0.373	-0.187/ 0.322	-0.146/ 0.441	-0.145/ /0.444
VIDA skoru artışı ile ilişki varlığı (r/p)	0.325/ 0.079	0.297/ 0.111	-0.001/ 0.995	0.171/ 0.365	0.327/ 0.077	0.201/ 0.288	-0.236/ 0.210	-0.205/ 0.277	-0.171/ 0.366	-0.285/ 0.126	-0.142/ 0.455	0.192/ 0.308	0.258/ 0.168	0.280/ 0.134
Hastalık süresinin artışı ile ilişki varlığı (r/p)	- 0.396/ 0.030	-0.141/ 0.459	0.094/ 0.620	0.060/ 0.753	-0.152/ 0.421	-0.268/ 0.152	0.211/ 0.263	0.008/ 0.968	0.108/ 0.571	0.266/ 0.156	-0.175/ 0.356	-0.170/ 0.370	-0.176/ 0.351	-0.209/ 0.268

*r: Korelasyon katsayısı, p: anlamlılık düzeyi

5. TARTIŞMA

Vitiligo; fonksiyonel melanosit kaybı ile ilerleyen, amelanotik maküler lezyonlarla karakterize, sık karşılaşılan bir deri hastalığıdır. Etiyopatogenezi henüz aydınlatılmamış olan vitiligoda en geçerli hipotez otoimmün hipotezdir. Segmental olmayan vitiligonun otoimmün hastalıklar ile birliktelik göstermesi ve hastaların serumlarında çok çeşitli organa özgü otoantikörlerin saptanması bu hipotezi destekleyen önemli kanıtlardır (17,18). Vitiligoda, melanositlere karşı CTL aracılı sitotoksik yanıtın gerçekleştiği iyi bilinmektedir (1). Sağlıklı bireylerin dolaşımında da melanozomal antijenlere yönelik CTL gözlenmesine rağmen vitiligo lezyonlarının ortaya çıkmaması dikkat çekicidir (57).

Treg hücrelerinin tanımlanmasını takiben bu hücrelerin, otoimmün ve inflamatuvar hastalığın ortaya çıkmasını engellediği ileri sürülmüştür (132). Treg hücrelerinin eksikliğinin atopik dermatit, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların gelişimi ile sonuçlandığını düşündüren çalışma verileri bulunmaktadır (48, 132, 166). Günümüzde; vitiligo patogenezinde suçlanan melanositlere yönelik sitotoksik CD8+ T hücre fonksiyonlarının, Treg hücrelerinin baskılayıcı kontrolünden çıkması sonucu ortaya çıktığı iddia edilmektedir (17). Bununla birlikte Treg hücrelerinin vitiligodaki rolünü destekleyen bilimsel kanıtlar oldukça sınırlıdır.

Çalışmamızda; vitiligolu hastalara ait lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinde Treg hücre popülasyonunun varlığı standart immünohistokimyasal boyama yöntemiyle araştırılmıştır. Otoimmün hipotezin paralelinde, vitiligolu deride Treg yoğunluğunun, normal deri kontrol örneklerinden düşük olup olmadığı ortaya konmaya çalışılmıştır ve vitiligoda Treg hücrelerinin dokudaki yoğunluğu Foxp3 ekspresyonu esas alınarak belirlenmiştir. Treg hücrelerinin immün düzenleyici fonksiyonlarını yürütmesinde önemli rolü olan sitokinleri: IL-10 ve TGF- β 'nın dokudaki ekspresyonu da değerlendirmeye alınmıştır. Araştırılan diğer parametreler Treg hücreleri tarafından da eksprese edilen CD25 ve CD4 yüzey belirteçleri olmuştur.

Vitiligoda Treg hücrelerinin etyopatogenezdeki rolünü ortaya çıkarmaya yönelik olan sınırlı sayıdaki çalışmaların büyük kısmı Treg ile ilişkili olan sitokinlerin (IL-10 ve TGF- β) doku ekspresyonunu ELISA veya immünohistokimyasal yöntemle değerlendiren çalışmalardır (42, 167-169). Sadece bir kontrollü çalışmada vitiligolu deride Treg ve ilişkili kemokin reseptörlerinin yoğunluğu ile beraberinde dolaşımdaki periferel kan mononükleer hücre (PBMC) havuzundaki Treg yoğunluğu araştırılmıştır (57). Çalışmamız; Treg hücresi ve ilişkili sitokinlerin vitiligolu derideki ekspresyon yoğunluğunun birarada çalışılmış olması bakımından önem kazanmaktadır.

Klarquist ve ark. sınırlı sayıdaki vitiligolu hasta deri örneği (n lezyonel: 7, n perilezyonel: 7, n lezyonsuz: 8) ve kontrol deri örnekleri (n lentigo maligna: 4, n yenidoğan-normal-deri: 5, n erişkin-normal-deri: 5) üzerinde, çift (“double”) immünohistokimyasal boyama (CD3 ve Foxp3 ile birlikte boyama) yöntemi ile gerçekleştirdikleri çalışmaları sonucunda vitiligolu deride Foxp3 ekspresyonunun düşük düzeyde olduğunu dolayısıyla; Treg hücrelerinin dokuyu infiltre eden tüm T hücre popülasyonu arasında, kontrol örneklerle karşılaştırıldığında (% 42-57); belirgin düşük (% 2-7) olduğunu saptamışlardır (57). Treg hücrelerindeki azalma sadece vitiligo lezyonlu bölgede değil aynı zamanda lezyonsuz ve lezyon çevresindeki sağlam deri alanında da saptanmıştır (57). Aynı çalışmada, vitiligolu hastaların, periferel kan mononükleer hücreleri (PBMC) içindeki Treg yoğunluğunun ise normal kontrollerden farklı olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç vitiligolu hastaların dolaşımdaki Treg hücrelerinin sayısında bir azalma olmadığını ve Th hücre proliferasyonunu inhibe etme yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. Bu durum; Treg hücrelerini deriye yönlendiren süreçte bir sorun olduğunu düşündürmüştür. *Klarquist ve ark.* çok parametrelili çalışmalarında, vitiligo hastalarının derisindeki azalmış Treg miktarının yanı sıra bu hücreleri deriye yönlendirdiği düşünülen CCL22 ekspresyonunda azalmanın da eşlik ettiğini ortaya koymuşlardır. Kontrol grubuna göre CCL22 ekspresyonu % 43 oranında belirgin düşük olarak rapor edilmiştir (57).

Çalışmamızda vitiligo lezyonlu deride dermisteki Treg hücrelerinin de içinde bulunduğu T_{yardımcı} hücre popülasyonunun temel yüzey belirteci olan CD4 ekspresyonunda lezyonsuz deriye göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen azalma tespit ettik. Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise hem lezyonlu hem lezyonsuz deride CD4 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. Treg hücresinin bir yüzey belirteci olan CD25 ekspresyon düzeyi hem epidermis hem de dermiste lezyonsuz deride lezyonlu deriye göre daha yüksekti. Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CD25 düzeyi, vitiligoda lezyonlu ve lezyonsuz deride hem epidermis hemde dermiste istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksekti. CD25; Treg hücrelerinin dışında, aktifleşmiş T hücresi, aktifleşmiş B hücresi ve oligodendrositlerce de eksprese edilen bir transmembran proteini olduğundan, bu sonucun CD25'in Treg hücelere özgü bir belirteç olmamasından kaynaklandığı şeklinde yorumlandı. Çift immünohistokimyasal boyama (CD25 ve Foxp3) yöntemin kullanılmamış olması Treg hücresi kaynaklı CD25 ekspresyonunun ayırt edilmesini sınırlandırmıştır.

Çalışmamızda ayrıca Treg hücresine özgü bir transkripsiyon faktörü olan Foxp3 ekspresyonu; vitiligolu lezyonlu deride, lezyonsuz deriye göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük tespit edildi. Vitiligolu hastaların hem lezyonlu hem lezyonsuz doku örnekleri sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Foxp3 ekspresyonunun kontrol örneklerinden daha düşük düzeyde olduğu belirlendi. Foxp3 ekspresyonundaki düşüklüğün lezyonlu deri normal deri karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu buna karşın lezyonsuz derisi ile kontrol grubu karşılaştırması istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptandı. Foxp3 ekspresyonu ile ilgili bu sonuçlar dokudaki Treg hücre yoğunluğunun göstergesi olduğundan, vitiligo lezyonlarında Treg hücre popülasyonundaki azalmanın, depigmente lezyonların ortaya çıkması sürecinde patogeneze sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda çift immünohistokimyasal boyama yapılmadığından *Klarquist ve ark.*'nin çalışma verileri ile direkt karşılaştırma olanağı bulunmamakla birlikte hasta grubumuzda Treg hücelere özgü bir belirteç olan Foxp3 ekspresyon

düzeyinin lezyonlu deri ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde düşük bulunması *Klarquist ve ark.* nin çalışma sonuçları ile paralellik sergilemektedir.

Çalışmamızda vitiligolu deri örneklerindeki Treg ekspresyon düzeyi ile VYA, VIDA skoru ve hastalık süresi artışı ile immunohistokimyasal parametreler arasında korelasyon izlenmemiştir. Diğer çalışmalarda bu parametrelerle ilgili yeterli veri bulunmadığından karşılaştırılamamıştır, geniş hasta serileri üzerinde ileri çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

Otoimmünite patogenezinde önemli olan sitokinlerin depigmentasyon sürecinde de etkili oldukları gösterilmiştir (157, 169). Treg hücreleri tarafından üretilen önemli bir immün regülatuar sitokin olan TGF- β 'nın serum düzeylerinin vitiligolu hastalarda önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (42, 167). Ancak TGF- β 'daki azalma ve vitiligo patogenezinde yer alan Treg hücrelerindeki disfonksiyon arasındaki ilişki hala gösterilememiştir (167).

Başak ve ark. nin, 40 vitiligo hastası üzerinde ELISA yöntemi ile yürüttükleri çalışmalarında; serum TGF- β seviyesi kontrol grubuna oranla vitiligolu grupta anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Fakat serum IL-6, IL-10 ve TNF- β düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aradaki farkın istatikselsel olarak anlamsız olduğu sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada hastalık süresi arttıkça serum IL-10 seviyesinin azaldığı ve TGF- β seviyelerinin otoimmün hastalık geçmişi olan hastalarda olmayanlara oranla daha yüksek olduğu görülmüştür (42). TGF- β ve IFN- γ düzeylerinin de Koebner fenomeni pozitif hastalarda Koebner fenomeni negatif olanlara göre yüksek olduğu saptanmıştır (42).

Tu ve ark. nin, 46 segmental olmayan vitiligolu hasta ve 25 kontrol grubu üzerinde, serum ve CD4+CD25+ hücre kültürü süpernatantları kullanarak ELISA yöntemiyle gerçekleştirdikleri çalışmalarında; aktif vitiligosu olan hastalara ait örneklerde, serum TGF- β 1 düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük düzeyde olduğunu belirlemişlerdir. Aynı çalışmada serum TGF- β 1 düzeyi ile vitiligolu

hastalarda tutulan vücut yüzey alanı (VYA) yüzdesi arasında negatif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (167).

Moretti ve ark., çalışmalarında vitiligolu (n=15) ve sağlıklı kontrol (n=5) grubundaki bireylerin epidermis örneklerinde çeşitli sitokinlerin [Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), kök hücre faktörü (SCF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), IL-6, TNF-alfa ile birlikte TGF- β] ekspresyonlarını immünohistokimyasal yöntemle araştırmışlardır. Bu çalışmada; epidermiste TGF- β 'nın minimal düzeyde (<% 10) olduğu, serum TGF- β seviyelerinin bütün klinik tipteki vitiligolarda kontrol gruplarına göre önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada lezyonel deride epidermiste IL-6 ve TNF- α seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (169).

Çalışmamızda, vitiligolu lezyonsuz epidermis ve dermiste, lezyonlu deriye göre TGF- β düzeyinde anlamlı bir yükseklik bulunmuştur. Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında vitiligolu deride kontrol grubuna göre TGF- β düzeyinde belirgin yükseklik tespit edilmiştir. Bu yükseklik; TGF- β sentezleyen diğer T hücreleri veya makrofaj vb. kaynaklı olabilir. TGF- β , Th 17 hücrelerine dönüşümde de rol oynadığından vitiligo patogenezindeki etkisi Th17 hücreleri üzerinden gerçekleşiyor olabilir. Treg hücrelerinin immün düzenleyici fonksiyonları sadece TGF- β sitokini üzerinden gelişmemekte, bunun dışındaki pek çok mekanizma da sergileyebilmektedir. Çalışmamızda vitiligolu deride TGF- β düzeyinde yükseklik bulunması önceki çalışma sonuçları (42, 167, 169) ile tezat oluştursa da bu durumun; Treg hücresinin, vitiligonun otoimmün patogenezinde, dokudaki yetersizliğine bağlı olası rolünü dışlayamayacağı düşündürmüştür.

Çalışmamızda *Başak ve ark.*'nin bulgularının aksine vitiligolu hastaların lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinde, otoimmün hastalık öyküsü olanlar ve olmayanlar ile Koebner fenomeni pozitif olanlarla negatif olanlar arasında TGF- β ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca çalışmamızda *Başak ve ark.*'nin belirttiği gibi vitiligolu lezyonlu ve lezyonsuz deride vitiligo VYA yüzdesi ile TGF- β doku düzeyi arasında anlamlı bir korelasyon

saptanmamıştır. Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak bu parametrelerin dışında VIDA skoru, ailede otoimmün hastalık öyküsü bulunması, hastalık başlangıç yaşı ve hastalık süresi de değerlendirmeye alınmıştır ancak TGF- β ekspresyonu ile aralarında korelasyon izlenmemiştir. Bu konuda daha geniş hasta örnekleri içeren gruplar üzerinde yürütülecek çalışmalara ihtiyaç olduğu görünmektedir.

Vitiligolu hastalardaki IL1- β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin sağlıklı kontrol gruplarına göre önemli ölçüde yüksek olduğu kanıtlanmıştır (170). *Swope ve ark.* (171) araştırmalarında IL1- α , TNF- α ve IL-6 nin melanosit proliferasyonunu inhibe ettiğini görmüşlerdir. Bir başka çalışma serum IL-6'nın fokal ve genel vitiligo tiplerinde arttığını göstererek, IL-1 β , IL-8 ve TNF- α seviyelerinde bozulma olmamasına rağmen, IL-6 nin vitiligo patogenezindeki immünolojik aktivitelerde önemli rol oynayabileceğini öne sürmüştür (172, 173).

Grimes ve ark., çalışmalarında, IL-4 ve IL-10'un vitiligoda doku seviyelerini araştırmışlar, hasta ve kontrol grupları arasında IL-4 seviyesinin benzer olduğunu fakat IL-10 seviyesinin hasta grubunda daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Yazarlar, hastalık sürecinin uzamasıyla IL-10 seviyesinin düştüğünü belirlemişler ve bu sitokinin inhibitör fonksiyonunun hastalığın sürekli olduğu durumlarda azalabileceğini ileri sürmüşlerdir. Perilezyonel ve lezyonel vitiligolu hasta derisinde, TNF- α , IFN- γ ekspresyonunun sağlıklı doku örneklerine oranla önemli ölçüde yüksek olduğu bulmuşlardır (173).

Taher ve ark. nin yaptığı bir diğer çalışmada ise vitiligolu hastaların (n=20) derilerinde topikal takrolimus tedavisi sonrasında vitiligo lezyonlarında IL-10 ekspresyonunda artış gözlenmiştir (168).

Çalışmamızda; IL-10 düzeyinde vitiligolu lezyonsuz epidermis ve dermiste lezyonlu deriye göre anlamlı bir yükseklik saptanmıştır. Sağlıklı kontrol grubunda ise IL-10, epidermis ve dermiste lezyonlu deriye göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda lezyonsuz deri ve kontrol grubu arasında epidermiste anlamlı fark bulunmazken dermiste bu fark anlamlıydı ve

lezyonsuz deri dermisinde IL-10 düzeyinde kontrol grubuna göre düşüklük mevcuttu. Bu veriler vitiligo patogenezinde Treg yetersizliğinin, IL-10 düzeyinde düşüklüğe neden olarak etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Grimes ve ark.'nin aksine çalışmamızda hastalık sürecinin uzaması ile lezyonlu ve lezyonsuz deride hem epidermis hem de dermiste IL-10 düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptamadık. Ayrıca çalışmamızda, Koebner fenomeninin varlığı, kişisel veya ailede otoimmün hastalık öyküsü varlığı, VIDA skoru, hastalık süresi ve etkilenen VYA ile IL-10 ekspresyon düzeyi arasında da korelasyon izlenmemiştir.

Çalışmamız immün tolerans ve homeostazisin sürdürülmesinde önemli rol oynayan Treg hücrelerinin fonksiyonlarında ve/veya miktarındaki azalmanın sitokinlerle (özellikle IL-10 ile) birlikte vitiligo etyopatogenezindeki rolünü araştıran az sayıdaki çalışmadan biridir. Bu çalışmadan elde edilen temel veri vitiligolu deride Foxp3 ekspresyonu dolayısıyla Treg hücre yoğunluğunun ve IL-10 düzeyinin normalden düşük olduğudur. Bu temel veriler; olasılıkla IL-10 eksikliği ile ilişkili Treg fonksiyon yetersizliğinin vitiligo patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada etik nedenlerle, vitiligolu hastalara ait sadece lezyonlu ve lezyonsuz deri örnekleri içeren arşiv kesitleri değerlendirmeye alınmıştır. Perilezyonel alanlar ise bu bölgeye ait doku örneği bulunmadığından değerlendirme dışı kalmış, çalışmamızda sınırlayıcı faktör olmuştur.

Bundan sonraki çalışmalarda vitiligolu hastaların dokularında Treg hücre fonksiyonları ile ilintili olan IL-35, IL-6, IL-2 ve CD 28'in ekspresyonlarının araştırılması vitiligo-Treg hücre ilişkisinin aydınlanmasına katkı sağlayabilir. Vitiligo etyopatogenezinde suçlanan mikrobiyal enfeksiyonların (CMV, EBV gibi) DH'lerin tolerojenik-immunojenik dengesinde sapmalar oluşturması veya DH lerin tolerojenik dengeyi yeniden sağlayamaması durumunda Treg hücrelerinin sürece iştirak ederek otoimmün olayları başlatması olasıdır. Ayrıca DH ile Foxp3 ilişkisinin

ortaya konmasının vitiligoda Treg hücrelerinin rolüne daha fazla açıklık getireceğini ve yeni tedavi alternatifleri doğurabileceğini düşünüyoruz. Geniş hasta serileri üzerinde gerçekleştirilecek kontrollü çalışmaların vitiligo patogeneğinde Treg hücrelerinin rolünü daha net ortaya koyacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Bu çalışma; 30 vitiligo hastasına ait lezyonlu ve lezyonsuz deri alanlarından 30'ar doku örneği içeren hasta grubu ile KÜTF Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı arşivinde yer alan benign nevüs eksizyon materyallerindeki normal deri alanlarını içeren 30 doku örneğinden oluşan kontrol grubu üzerinde standart immünohistokimyasal yöntemle gerçekleştirilmiştir. Hasta grubunda yer alan vitiligolu olguların; yaşları 18-63 yıl arasında değişmekte olup, 13'ü erkek, 17'si kadındır. Vitigolu hastaların 16'sı vitiligo vulgaris, 11'i akrofasiyal vitiligo, 3'ü universal vitiligo tipinde olup çalışma grubunda segmental vitiligo olgusu yer almamaktadır.
- 2- Vitiligolu hastaların lezyonlu deri örnekleri, lezyonsuz deri örnekleri normal kontrol örnekleriyle CD4 ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; dermiste CD4 ekspresyonu düzeyi lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur.
- 3- Vitiligolu hastaların lezyonlu deri örnekleri, lezyonsuz deri örnekleri normal kontrol örnekleriyle CD25 ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; dermiste CD25 ekspresyonu düzeyi lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. CD25 ve Foxp3 çift immünohistokimyasal boyama yöntemi Treg hücresi kaynaklı CD25 ekspresyonunun ayırt edilmesi konusunda daha fazla veri sağlayabilir.
- 4- Vitiligolu hastaların lezyonlu deri örnekleri, lezyonsuz deri örnekleri normal kontrol örnekleriyle Foxp3 ekspresyon düzeyleri açısından

karşılaştırıldığında; dermiste Foxp3 ekspresyonu düzeyi lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre ve lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük iken lezyonsuz deri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte düşük olduğu bulunmuştur. Bu veriler Treg hücrelerinin vitiligolu dokuda yetersiz sayıda oluşunun vitiligo patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

5- Vitiligolu hastaların lezyonlu deri örnekleri, lezyonsuz deri örnekleri normal kontrol örnekleriyle IL-10 ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; epidermiste IL-10 ekspresyonu düzeyi lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük ve lezyonlu deride kontrol deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük iken lezyonsuz deri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yüksek olduğu bulunmuştur. Dermiste IL-10 ekspresyonu düzeyi lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar Vitiligo patogenezinde Treg ile ilişkili olarak IL-10 doku düzeylerindeki azalmanın katkısını ortaya koymaktadır.

6- Vitiligolu hastaların lezyonlu deri örnekleri, lezyonsuz deri örnekleri normal kontrol örnekleriyle TGF- β ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; epidermiste TGF- β ekspresyonu düzeyi lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Dermiste TGF- β ekspresyonu düzeyi lezyonlu deri örneklerinde lezyonsuz deri örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düşük ve hasta alt grup doku örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu alanda daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

- 7- Hasta grubunda vitiligo dışında kişisel veya ailesel otoimmün hastalık öyküsü olanlar ve olmayanlar arasında hem lezyonlu hem de lezyonsuz deri örneklerinde CD4, Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β ekspresyonları açısından anlamlı fark saptanmadı.
- 8- Hasta grubu, Koebner fenomeni pozitif olanlar ve olmayanlar arasında lezyonlu ve lezyonsuz deri örneklerinde CD4, Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β ekspresyonları açısından anlamlı fark saptanmadı.
- 9- Hasta grubu, vitiligo VYA tutulum oranı ile CD4, Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.
- 10- Hasta grubuna ait vitiligo hastalık süresi ile CD4, Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.
- 11- Hasta grubu VIDA skoru ile CD4, Foxp3, CD25, IL-10 ve TGF- β ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.
- 12- Vitiligo ile Treg hücre doku düzeyleri, fonksiyonları ve diğer sitokinlerle olan ilişkisini kanıtlayacak veriler halen yetersizdir. Treg hücrelerinin vitiligo patogenezindeki rolünü daha detaylı bir şekilde ortaya koyacak geniş kapsamlı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- 1- Westerhof W, d'Ischia M. Vitiligo puzzle: the pieces fall in place. *Pigment Cell Res* 2007; 20 (5): 345–59.
- 2- Nordlund JJ. Vitiligo: a review of some facts lesser known about depigmentation. *Indian J Dermatol* 2011; 56: 180-9.
- 3- Halder R, Taliaferro S. Vitiligo. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, et al, eds: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008; 616-22.
- 4- Ortonne JP. Vitiligo and other disorders of hypopigmentation. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds: *Dermatology*. 2nd. ed. Spain: Mosby Elsevier, 2008; 913-20.
- 5- Picardo M, Taïeb A: Epidemiology, Definitions and Classification. In: Picardo M, Taïeb A, eds: *Vitiligo*. Berlin: Springer–Verlag, 2010; 13-24.
- 6- Panda AK. The medicohistorical perspective of vitiligo. *Bull Ind Hist Med*. 2005; 35: 41-6.
- 7- Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65: 473-91.
- 8- Schwartz RA, Janniger CK. Vitiligo. *Cutis* 1997; 60: 239-44.
- 9- Prasad PV, Bhatnagar VK. Medico-historical study of “Kilasa” (vitiligo/leucoderma) a common skin disorder. *Bull Indian Hist Med Hyderabad* 2003; 33: 113-27.
- 10- Donata SR, Kesavan M, Austin SR Clinical trial of certain ayurveda medicines indicated in vitiligo. *Ancient Sci of life*. 1990; 4: 202–206
- 11- Hadler RM, Chappell JL. Vitiligo Update. *Semin Cutan Med Surg*. 2009; 28: 86-92.
- 12- Arıcan Ö, Koç K, Kutluk R, Ersoy L. Vitiligolu hastalarda serum vitamin B12 ve folik asit düzeyleri. *T Klin Dermatoloji*. 2003; 13: 4-10.
- 13- Liu JB, Li M, Yang S, Gui JP, Wang HY, Du WH, Zhao XY, Ren YQ, Zhu YG, Zhang XJ. Clinical profiles of vitiligo in China: an analysis of 3742 patients. 2005; 30(4): 327-331.

- 14- Dessinioti C, Stratigos AJ, Rigopoulos D, Katsambas AD. A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. *Exp Dermatol* 2009; 18: 741–9.
- 15- Walker AS, Li L, Haass NK, Herlyn M. Melanocytes: From Morphology to Application. *Skin Pharmacol Physiol* 2009; 22: 114–21.
- 16- Minwalla L, Zhao Y, Le Poole IC, Wickett RR, Boissy RE. Keratinocytes play a role in regulating distribution patterns of recipient melanosomes in vitro. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 341-7.
- 17- Ongenaes K, Van Geel N, Naeyaert J. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 90-100.
- 18- Halder RM, Nandedkar MA, Neal KW: Pigmentary disorders in pigmented skins. In: Halder RM, eds. *Dermatology and Dermatological Therapy of Pigmented Skin*. New York: Informa Healthcare, 2006; 116-9.
- 19- Casp CB, She JX, McCormack WT. Genetic Association of the Catalase Gene (CAT) with Vitiligo Susceptibility. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 62-6.
- 20- Onay H, Pehlivan M, Alper S, ozkinay F, Pehlivan S. Might there be a link between mannose binding lectin and vitiligo? *Eur J Dermatol* 2007; 17: 146-148.
- 21- Middelkamp- Hup MA, Bos JD, Rius-Diaz F. Treatment of vitiligo vulgaris with narrow-band UVB and oral *Polypodium leucotomos* extract: A randomized double blind placebo-controlled study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21: 942-50.
- 22- Cantón I, Akhtar S, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, Blomhoff A, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH. A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. *Genes Immun* 2005; 6: 584–7.
- 23- Blomhoff A, Kemp EH, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Husebye ES, Akselsen HE, Lie BA, Undlien DE. CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases. *Pigment Cell Res* 2004; 18: 55–8.
- 24- Spritz AR. Journal Compilation The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 271–8.
- 25- Zhang XJ, Chen JJ, Liu JB. The genetic concept of vitiligo. *J Derma Sci* 2005; 39: 137-46.
- 26- Kemp EH, Waterman EA, Weetman AP. Immunological pathomechanisms in vitiligo. *Expert Rev Mol Med* 2001; 3: 1-22.
- 27- Orecchia GE, Hann ESK, Nordlund JJ. *Neural pathogenesis in vitiligo*. London: Blackwell Science, 2000; 142.

- 28- Tu C, Zhao D, Lin X. Levels of neuropeptide-Y in the plasma and skin tissue fluids of patients with vitiligo. *J Dermatol Sci* 2001; 27: 178-82.
- 29- Cucchi ML, Frattini P, Santagostino G, Orecchia G. Higher plasma catecholamine and metabolite levels in the early phase of nonsegmental vitiligo. *Pigment Cell Res* 2000; 13: 28-32.
- 30- Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Gutlich M, Lemke KR, Rodl W, Swanson NN, Hitzemann K, Ziegler I. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 1994; 263: 1444-6.
- 31- Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Buttner G, Swanson N, Korner C, Ehrke C. Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 14-8.
- 32- Le Poole L, Wijngaard CV, Smit R, Oosting NMP, Westerhof J and Pavel. Catechol-o-methyl transferase in vitiligo. *Arch Dermatol Res* 1994; 286: 81-6.
- 33- Schallreuter KU, Wood JM, Ziegler I, Lemke KR, Pittelkow MR, Lindsey NJ, et al. Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226: 181-92.
- 34- Hazneci E, Karabulut AB, Öztürk C, Batcioğlu K, Doğan G, KaracaS, Eşrefoğlu M. A comparative study of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and nitrate levels in vitiligo patients. *Int J Dermatol*. 2005; 44: 636-640.
- 35- Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC, Tobin DJ, Marshall HS, Panske A, Panzig E, Hibberts NA. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999; 4: 91-6.
- 36- Grimes PE, Sevall JS, Vojdani A. Cytomegalovirus DNA identified in skin biopsy specimens of patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35: 21-6.
- 37- Akbayir N, Gukdemir G, Mansur T, Sökmen M, Gündüz S, Alkim C, Barutcuoglu B, Erdem L. Is there any relationship between hepatitis C virus and vitiligo? *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 815-7.
- 38- Niamba P, Traore A, Taieb A. Vitiligo in a black patient associated with HIV infection and repigmentation under antiretroviral therapy. *Ann Dermatolo Venereol* 2007; 134: 272-3.
- 39- Braun-Falco O, Plewig G, Wolf HH, Burgdorf WHC. Disorders of melanin pigmentation. In: *Dermatology*, 2th edh, Berlin: Springer Verlag, 2000; 1013-42.

- 40- Steel KP, Davidson DJ, Jackson JJ. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel factor (ckit ligand) is a survival factor. *Development* 1992; 115: 1111–9.
- 41- Abdel Naser MB, Wollina U, El Okby M, El Shiemy S. Psoralens plus ultraviolet A irradiation-induced lentiginosities arising in vitiligo: involvement of vitiliginous and normal appearing skin. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 380–2.
- 42- Basak P, Adiloglu A, Ceyhan AM, Tas T, Akaya VB. The role of helper and regulatory T cells in the pathogenesis of vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2009; 60: 256–60.
- 43- Schallreuter KU, Lemke R, Brandt O, Schwartz R, Westhofen M, Montz R, Berger J. Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. *Dermatology* 1994; 88: 269–75.
- 44- Grimes PE, Hadler MH, Jones C, Chakrabarti SG, Enterline J, Minus HR, Kenney JA Jr. Autoantibodies and their clinical significance in a black vitiligo population. *Arch Dermatol* 1983; 119: 300–3.
- 45- Hegedus L, Heidenheim M, Gervil M, Hjalgrim H, Hoier Madsen M. High frequency of thyroid dysfunction in patients with vitiligo. *Acta Derm Venereol* 1994; 74: 120–23.
- 46- Beterle C, Caretto A, De Zio A, Pedini B, Veller-Fornasa C, Cecchetto A, Accordi F, Peserico A. Incidence and significance of organ-specific autoimmune disorders (clinical, latent, or only autoantibodies) in patients with vitiligo. *Dermatologica* 1985; 171: 419–23.
- 47- Palermo B, Campanelli R, Garbelli S. Specific cytotoxic T lymphocyte responses against Melan A/Mart1, tyrosinase and gp100 in vitiligo by the use of major histocompatibility complex/peptide tetramers: The role of cellular immunity in the etiopathogenesis of vitiligo. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 326–32.
- 48- Oyarbide-Valencia K, van den Boorn JG, Denman CJ, Li M, Carlson JM, Hernandez C, Nishimura MI, Das PK, Luiten RM, Le Poole IC. Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 486–92.
- 49- Bystryn JC. Immune mechanisms in vitiligo. *Clin Dermatol* 1997; 15: 853–61.
- 50- Naughton GK, Reggiardo D, Bystryn JC. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15: 978–81.
- 51- Honda Y, Okubo Y, Koga M. Relationship between levels of soluble interleukin-2 receptors and the types and activity of vitiligo. *J Dermatol* 1997; 24: 561–3.

- 52- Yeo UC, Yang YS, Park KB, Sung HT, Jung SY, Lee ES, Shin MH. Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor in vitiligo patients. *J Dermatol Sci* 1999; 19: 182-8.
- 53- Ahn SK, Choi EH, Lee SH, Won JH, Hann SK, Park YK. Immunohistochemical studies from vitiligo-comparison between active and inactive lesions. *Yonsei Med J* 1994; 35(4): 404-10.
- 54- Al Badri AMT, Todd PM, Garioch JJ, et al. An immunological study of cutaneous lymphocytes in vitiligo. *J Pathol* 1993; 170: 149–55.
- 55- Janjic BM, Lu G, Pimenov A, Whiteside TL, Storkus WJ, Vujanovic NL. Innate Direct Anticancer Effector Function of Human Immature Dendritic Cells. I. Involvement of an Apoptosis-Inducing Pathway. *J Immunol* 2002; 168: 1823–30.
- 56- Lu B, Wang L, Medan D, et al. Regulation of Fas (CD95)-induced apoptosis by nuclear factor-kappaB and tumor necrosis factor- α in macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: 831-8.
- 57- Klarquist J, Denman CJ, Hernandez C, Wainwright DA, Strickland FM, Overbeck A, Mehrotra S, Nishimura MI, Le Poole IC. Reduced skin homing by functional Treg in vitiligo. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2010; 23: 276-286.
- 58- Norris DA, Horikawa T, Morelli JG. Melanocyte destruction and repopulation in vitiligo. *Pigment Cell Res* 1994; 7: 193-203.
- 59- Kim, JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007; 8: 91–7.
- 60- Andersen MH, Schrama D, Straten PT, Becker JC. Cytotoxic T Cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 32–41.
- 61- van den Wijngaard R, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole C, Tigges B, Westerhof W, Das P. Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA⁺ T cells at the perilesional site. *Lab Invest* 2000; 80: 1299–1309.
- 62- Huang CL, Nordlund JJ, Boissy R. Vitiligo: a manifestation of apoptosis? *Am J Clin Dermatol* 2002; 3: 301-8.
- 63- Cui J, Chen D, Misfeldt ML, Swinfard RW, Bystryn JC. Antimelanoma antibodies in swine with spontaneously regressing melanoma. *Pigment Cell Res* 1995; 8: 60-3.
- 64- Lamont SJ, Smyth JR Jr. Effect of bursectomy on development of a spontaneous postnatal amelanosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1981; 21: 407-11.

- 65- Le Poole IC, Das PK, Van den Wijngaard RM, Bos JD, Westerhof W. Review of the etiopathomechanism of vitiligo: a convergence theory. *Exp Dermatol* 1993; 2: 145-53.
- 66- Gawkrödger DJ, Ormerod AD, Shaw L, Mauri-Sole I, Whitton ME, Watts MJ, Anstey AV, Ingham J, Young K. Therapy Guidelines and Audit Subcommittee, British Association of Dermatologists; Clinical Standards Department, Royal College of Physicians of London; Cochrane Skin Group; Vitiligo Society. *Br J Dermatol*. 2008;159:1051-76.
- 67- Karıncaoğlu Y, Doğan G. Vitiligo: Etyopatogenez, Klinik ve tedavi. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2001; 21: 200-09.
- 68- Wolff K, Johnson RA, Surmond D. Pigmentary disorders. In: Fitzpatrick's color atlas and synopsis of clinical dermatology. 5th ed. McGraw-Hill, New York. 2005; 336-43.
- 69- Ackerman AB, Chongchinant N, Sanchez J, et al. Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases. An algorithmic method based on pattern analysis, 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997; 268-70.
- 70- Atili VR, Atili SK. Lichenoid inflammation in vitiligo – a clinical and histopathologic review of 210 cases. *Int J Dermatol* 2008; 47: 663-9.
- 71- Hann SK, Park YK, Lee KG et al. Epidermal changes in active vitiligo. *J Dermatol* 1992; 19: 217-22.
- 72- Murphy FG. Histology of the skin. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B. Eds. *Lever's histopathology of the skin*, 9th ed. Philadelphia: Lipincott Williams& Wilkins, 2005; 16-7.
- 73- Yaghoobi R, Omidian M, Bagherani N. Vitiligo: areview of the published work. *J Dermatol* 2011; 38: 419-31.
- 74- Hann SK, Kim YS, Yoo JH, Chun YS. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 589-96.
- 75- Mosher DB, Fitzpatrick TB, Ortonne JB, et al. Normal skin color and general considerations of pigmentary disorders. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB (eds), *Dermatology in general medicine*. 5th edn. New York: McGraw-Hill, 1999; 936-44.
- 76- Weedon D, Strutton G Disorders of pigmentation. *Skin pathology*, 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 2002; 321-341.
- 77- Aslanian FP, Filgueira A, Cuzzi T and Vergier B. Histopathology. In: Vitiligo, Picardo M, Taïeb A. (Eds.). Berlin: Springer-Verlag, 2010; 25-32.

- 78- Spielvogel RL, Kantor GR. Pigmentary disorders of the skin. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, et al (eds), *Lever's histopathology of the skin*. 8th ed. Philadelphia: Lipincott-Raven, 1997; 617–23.
- 79- Özpoyraz M, Acar MA. Pigmentasyon bozuklukları. In: Tüzün Y, Gürer MA, et al (eds), *Dermatoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2008; 1445-528.
- 80- Cockayne S, Messenger AG, Gawkrödger D: Vitiligo treated with topical corticosteroids: Children with head and neck involvement respond well. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 964-5.
- 81- Sehgal VN, Srivastava G. Vitiligo treatment options: an evolving scenario. *J Dermatol Treat* 2006; 17: 262-75.
- 82- Goktas EO, Aydin F, Senturk N, Canturk MT, Turanli AY. Combination of narrow band UVB and topical calcipotriol for the treatment of vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006; 20: 553–7.
- 83- Picardo M, Taïeb A. Therapy. In: *Vitiligo*, Picardo M, Taïeb A. (Eds.). Berlin: Springer–Verlag, 2010; 319-446.
- 84- Grimes PE, Morris R, Avaniss-Aghajani E, et al. Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 52–61.
- 85- Kang HY, Choi YM. FK506 increases pigmentation and migration of human melanocytes. *Br J Dermatol* 2006; 155: 1037–40.
- 86- Lan CC, Chen GS, Chiou MH, et al. FK506 promotes melanocyte and melanoblast growth and creates a favourable milieu for cell migration via keratinocytes: possible mechanisms of how tacrolimus ointment induces repigmentation in patients with vitiligo. *Br J Dermatol* 2005; 153: 495–8.
- 87- Mayoral FA, Vega JM, Stavisky H, et al. Retrospective analysis of pimecrolimus cream 1% for treatment of facial vitiligo. *J Drugs Dermatol* 2007; 6: 517–21.
- 88- Felsten LM, Alikhan A, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part II: treatment options and approach to treatment. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65:493-514.
- 89- Menchini G, Tsourelli-Nikita E, Hercogova J. Narrow-band UV-b micro-phototherapy: a new treatment for vitiligo. *J Eur Acad Dermatol* 2003; 17: 171-7.
- 90- Esposito M, Soda R, Costanzo A, et al. Treatment of vitiligo with the 308 nm excimer laser. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 133-7.

- 91- Lan CC, Wu CS, Chiou MH, Hsieh PC, Yu HS. Low-Energy Helium-Neon Laser Induces Locomotion of the Immature Melanoblasts and Promotes Melanogenesis of the More Differentiated Melanoblasts: Recapitulation of Vitiligo Repigmentation InVitro. *Journal of Investigative Dermatology* 2006; 126: 2119–26.
- 92- Kovacs SO. Vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 1998; 38: 647–666.
- 93- Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD. Regulation of melanogenesis-controversies and new concepts. *Exp Dermatol* 2008; 17: 395-404.
- 94- Moore AY. Clinical applications for topical 5-fluorouracilin the treatment of dermatological disorders. *J Dermatolog Treat*. 2009; 20(6): 328-35.
- 95- Schallreuter K, Moore J, Behrens-Williams S, Panske A, Harari M. Rapid initiation of repigmentation in vitiligo with dead sea climatotherapy in combination with pseudocatalase. *Int J Dermatol* 2002; 41: 482-3.
- 96- Nordlund JJ, Collins CE, Rheins LA. Prostaglandin E2 and D2 but not MSH stimulate the proliferation of pigment cells in the pinnal epidermis of the DBA/2 mouse. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 433-7.
- 97- Pal P, Mallick S, Mandal SK, Das M, Dutta AK, Datta PK, Bera R, Bhadra R. A human placental extract: in vivo and in vitro assessments of its melanocyte growth and pigment-inducing activities. *Int J Dermatol* 2002; 41: 760-7.
- 98- Sethi S, Mahajan BB, Gupta RR, Ohri A. Comparative evaluation of theraputic efficacy of dermoabrasion, dermoabrasion combined with topical 5% 5-fluorouracil cream, and dermoabrasion combined with topical placentrex gel in localized stable vitiligo. *Int J Dermatol* 2007; 46: 875–9.
- 99- Namazi MR. Statins: novel additions to the dermatologic arsenal? *Exp Dermatol* 2004; 13: 337–9.
- 100- Noel M, Gagné C, Bergeron J, et al. Positive pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitor on vitiligo. *Lip Health Dis* 2004; 3: 7–11.
- 101- Agarwal S, Ramam M, Sharma VK, Khandpur S, Pal H, Pandey RM. A randomized placebo-controlled double-blind study of levamisole in the treatment of limited and slowly spreading vitiligo. *Br J Dermatol* 2005; 153: 163–6.
- 102- Namazi MR. Phenytoin as a novel anti-vitiligo weapon. *J Autoimmun Dis* 2005; 2: 11.
- 103- Njoo MD, Das PK, Bos JD, Westerhof W. Association of the Koebner phenomenon with disease activity and therapeutic responsiveness in vitiligo vulgaris. 1999; 135: 407-13.

- 104- Miyara M, Sakaguchi S. Regulatory T cells and the Control of Auto-Immunity: From day 3 Thymectomy to FoxP3+ Regulatory T Cells. In: Jiang S, ed. *Regulatory T Cells and Clinical Application*. New York: Springer-Verlag, 2008; 3-7.
- 105- Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Twomodes of immunesuppression by Foxp3(+) regulatoryTcellsunder inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011; 23: 424-30.
- 106- Abbas AK, Lichtman AH. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 2nd. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2004; 161-76.
- 107- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 8-27.
- 108- Hellings N, Baree M, Verhoeven C, D'hooghe MB, Medaer R, Bernard CC, Raus J, Stinissen P. T-cell reactivity to multiple myelinantigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res* 2001; 63: 290–302.
- 109- Burmester GR, Pezzutto A. *Color Atlas Of Immunology*. Stuttgart: Thieme Medical Publishers, 2003; 271-84.
- 110- Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 37672–9.
- 111- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-61.
- 112- Nizar S, Copier J, Meyer B, Smith MB, Galustian C, Kumar D, Dalglish A. T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? *Br J Cancer* 2009; 100: 1697 – 703.
- 113- David A, Horwitz, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta–induced Foxp3(+) CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Immunol* 2008; 29: 429-35.
- 114- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531–62.
- 115- Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212: 60-73.
- 116- Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253–7.

- 117- Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007; 204: 1775-85.
- 118- Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol* 2006; 176: 3321-9.
- 119- Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 2005; 6: 152-62.
- 120- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431-40.
- 121- Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; 6: 1219-27.
- 122- Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SL, Kosiewicz MM. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med* 2005; 201: 127-37.
- 123- Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2004; 34(11): 2996-3005.
- 124- Kishimoto T. Interleukin-6 and its receptor in autoimmunity. *J Autoimmun* 1992; 5: 123-32.
- 125- Horwitz DA, Gray JD. The interaction of T cells with cells of the innate immune system and B cells in the pathogenesis of SLE. In: Wallace DJ and Hahn BH. Eds. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; 133-60.
- 126- Zheng SG. The Critical Role of TGF-beta1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Int J Clin Exp Med* 2008; 1: 192-202.
- 127- Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2006; 203: 505-11.

- 128- Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, Santamaria P, Locksley RM, Krummel MF, Bluestone JA. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 2006; 7: 83-92.
- 129- Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1538-43.
- 130- Mahnke K, Ring S, Johnson TS, Schallenberg S, Schönfeld K, Storn V, Bedke T, Enk AH. Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2117-26.
- 131- Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 2007; 445: 936-40.
- 132- Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11: 7-13.
- 133- Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The Majority of Human Peripheral Blood CD4+CD25highFoxp3+Regulatory T Cells Bear Functional Skin-Homing Receptors. *J Immunol* 2006; 177: 4488–94.
- 134- Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184: 387-96.
- 135- Laurie KL, Van Driel IR, Gleeson PA. The role of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells in the induction of autoimmune gastritis. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 567-73.
- 136- Suri-Payer E, Amar AZ, McHugh R, Natarajan K, Margulies DH, Shevach EM. Post-thymectomy autoimmune gastritis: fine specificity and pathogenicity of anti-H/K ATPase-reactive T cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 669-77.
- 137- Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 203-16.
- 138- Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523–32.
- 139- Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295–302.

- 140- Takahashi T, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303–10.
- 141- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 271–5.
- 142- Betini M, Vignali DAA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 612–8.
- 143- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-9.
- 144- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S: Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 770-4.
- 145- Wilke CM, Wei S, Wang L, Kryczek I, Kao J, Zou W. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 1529-41.
- 146- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683-765.
- 147- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007; 287-8.
- 148- Mosser DM, Zhang X: Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008; 226: 205-18.
- 149- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W: Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-74.
- 150- Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M: The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* 1998; 187: 571-8.
- 151- Zu X, Zhang Q, Cao R, Liu J, Zhong J, Wen G, Cao D. Transforming growth factor- β signaling in tumor initiation, progression and therapy in breast cancer: an update. *Cell Tissue Res* 2011, Aug 16 (e-baskı). *Erişim Tarihi: 14.09.2011*
- 152- Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007; 26: 579-91.

- 153- Tran DQ. TGF- β : the sword, the wand, and the shield of FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*. 2011; 22: 1–9.
- 154- Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY: Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 2006; 25: 441-54.
- 155- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA: The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450: 566-9.
- 156- Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of Thelper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32-46.
- 157- Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev* 2007; 6(3): 169-75.
- 158- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24: 677-88.
- 159- Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunol* 2005; 6: 353 -60.
- 160- Hisaeda H, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med* 2004; 10: 29-30.
- 161- Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004; 78: 2454-9.
- 162- Kinter AL, Hennessey M, Bell A, et al. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4⁺ and CD8⁺ HIV specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 2004; 200: 331-43.
- 163- Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003; 38: 1437-48.
- 164- Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang A, Dahm P, Chao N, Gilboa E, Vieweg J. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 3623-33.
- 165- Suttmuller RP, Van Duivenvoorde LM, Van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T

cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001; 194: 823-32.

166- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 345-352.

167- Tu CX, Jin WW, Lin M, Wang ZH, Man MQ. Levels of TGF- β (1) in serum and culture supernatants of CD4(+)CD25 (+) T cells from patients with non-segmental vitiligo. *Arch Dermatol Res* 2011; 303: 1154-8.

168- Taher ZA, Lauzon G, Maguiness S, Dytoc MT, Analysis of interleukin-10 levels in lesions of vitiligo following treatment with topical tacrolimus. *Br J Dermatol* 2009; 161: 654-9.

169- Moretti S, Spallanzani A, Amato L, Hautmann G, Gallerani I, Fabiani M, Fabbri P. New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 87-92.

170- Feldmann M, Brennan FM, Maini R. Cytokines in autoimmune disorders. *Int Rev Immunol* 1998; 17: 217-28.

171- Swope VB, Abdel-Malek Z, Kassem LM, Nordlund JJ. Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 180-5.

172- Tu CX, Gu JS, Lin XR. Increased interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor levels in the sera of patients with non-segmental vitiligo. *J Dermatol Sci* 2003; 31: 73-8.

173- Grimes PE, Morris R, Avaniss-Aghajani E, Soriano T, Meraz M, Metzger A. Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 51: 52-61.

8. EKLER

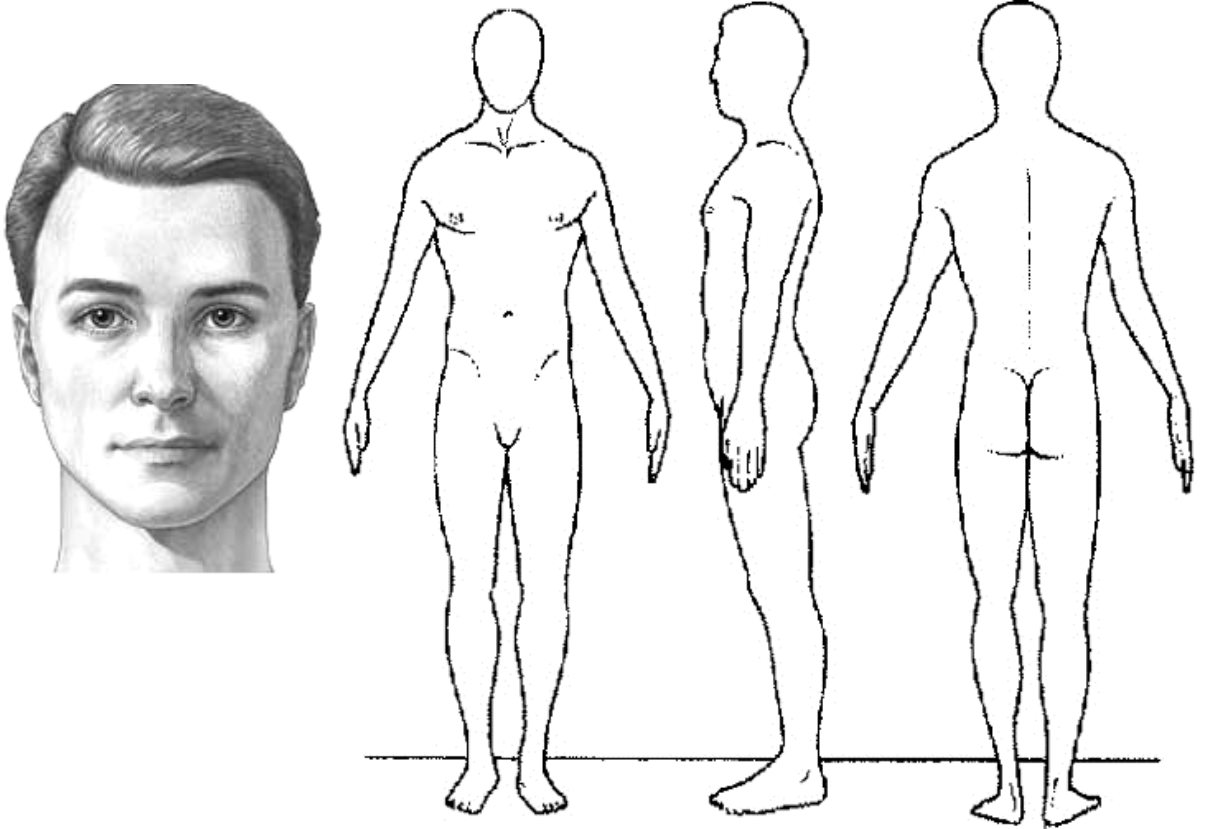
8. 1. K.Ü.T.F. DERMATOLOJİ AD VİTİLİGOLU HASTA TAKİP FORMU

Vitiligolu hastalarda düzenleyici T hücrelerinin varlığının immünohistokimyasal yöntemle araştırılması

Dr. Mehtap KIDIR – Dr. Ayşe Anıl KARABULUT

Adı Soyadı:	Yaşı :	Cinsiyeti:
Mesleği :	Memleketi :	Medeni durumu:
Adres:	Tel : 0318-	
	Cep:	
Polikliniğe başvuru tarihi :	Dosya No :	
<u>YAKINMA/ÖYKÜ:</u> Hastalık süresi: Başlangıç yaşı: Ne kadar süredir stabil olduğu? <u>ÖZGEÇMİŞ :</u> <u>Dermatolojik hastalık öyküsü:</u> <u>Eşlik eden hastalık öyküsü:</u> -Diyabet : - Tiroid hastalığı: -Alopesi areata: -Lupus eritematozus: -Romatoid Artrit: -Gonodal atrezi: -Pernisiyöz anemi: -Poliglandüler endokrinopati:		
<u>SOYGEÇMİŞ :</u> Ailede vitiligo öyküsü : Otoimmün hastalık öyküsü: -Diyabet : -Tiroid hastalığı: -Alopesi areata: -Lupus eritematozus : -Romatoid artrit: -Diğer:		
Dermatolojik hastalık öyküsü:		

DERMATOLOJİK MUAYENE:



Koebner fenomeni: ()

VİTİLİGO TİPİ:

-LOKALİZE

Fokal

Unilateral

Mukozal

-JENERALİZE

Vulgaris

Akrofasiyal

Miks

VIDA (Vitiligo Disease Activity Score) Skoru:

- 4+ son 6 hafta içinde aktif-yeni lezyon (+)
3+ son 3 ay içinde aktif-yeni lezyon (+)
2+ son 6 ay içinde aktif-yeni lezyon (+)
1+ son 1 yıl içinde aktif-yeni lezyon (+)
0 en az 1 yıldır stabil
-1 spontan repigmentasyon

Görüntüleme ()

HASTA TAKİP BİLGİLERİ:

8.2. ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Değerli Hastamız,

VİTİLİGO hastalığı halk dilindeki karşılığı ile “ALA” hastalığıyla ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Bahsi geçen bu araştırmanın ismi “Vitiligolu hastalarda düzenleyici T hücrelerinin varlığının immünohistokimyasal yöntemle araştırılması”dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bununla birlikte bu araştırmaya katılıp katılmamakta tamamen serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmayla elde etmek istediğimiz bilgi; vitiligo hastalığının nasıl gelişmiş olduğuna dair bir açıklamadır. VİTİLİGO ya da ALA hastalığı deriye renk veren melanin pigmenti üretimini sağlayan melanosit isimli hücrelerin yıkımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Vücutta değişken boyutta deri alanlarını kaplayan, genişleyebilen, beyaz leke oluşumu ile karakterli olan ‘ALA’ hastalığının oluşumundan deri dokusunda bulunan ve bağışıklık sistemine ait bazı hücrelerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Düzenleyici ya da “Regülatuar” T hücreleri olarak adlandırılan bu hücrelerin beyaz lekelerin bulunduğu lezyonlu deri dokusunda azalmış olması olasıdır. Çalışmamızda deri biyopsisi örneklerinde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle bu hücrelerin varlığının araştırılması planlanmaktadır. Bu çalışmaya onay vermeniz durumunda sizden ek bir biyopsi örneği alınmayacaktır. VİTİLİGO hastalığı tanısını koymak için ilk başvurunuzda sizden alınmış olan lezyonlu-lezyonsuz deri biyopsisi örneklerine ek boyama işlemi yapılarak bu hücrelerin görünür olması sağlanacak ve dağılımı incelenecektir. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji ve Patoloji Anabilim Dallarının ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısına katkı sağlayacaktır.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Doç.Dr.Ayşe Anıl Karabulut veya Dr Mehtap KIDIR tarafından değerlendirilecek, öykü ve muayene bulgularınız kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. Araştırmanın süresi yaklaşık iki yıldır ve 18-70 yaş arası 30 vitiligolu

hasta bu çalışmaya dahil edilecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığımız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve kabul ya da reddettiğiniz takdirde size uygulanan olağan VİTİLİGO tedavisinde herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahibsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dr.Mehtap KIDIR tarafından Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji ve Patoloji Anabilim Dalları'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Mehtap KIDIR'ı 0318 2252485-2318 (iş) veya 05055677091 (cep) no'lu telefonlardan ve Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fak. Dermatoloji Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar

getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Katılımcının

Adı, soyadı:

Adres/Tel:

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres/Tel:

İmza

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres/Tel:

İmza