

## ARAŞTIRMA MAKALESİ

Uludağ Univ., J. Fac. Vet. Med. 2018; 37 (2) 101-107  
DOI:10.30782/uluvfd.413321

# Fare Deneysel Artirit Modelinde Genetik Olarak Modifiye Toleran Dendritik Hücre Tedavisinin Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkisi

Gökçen Güvenç<sup>1</sup>, İzel Yılmaz<sup>2</sup>, Kübra Çiftçi<sup>1</sup>, Ayşenur Baş<sup>3</sup>, Esra Kaşıkçı<sup>1</sup>, Figen Ersoy<sup>3</sup>, Haluk Barbaros Oral<sup>4</sup>, Murat Yalçın<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

<sup>2</sup>Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp-İmmünoloji Anabilim Dalı Bursa.

<sup>3</sup>Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Bölümü, Bursa.

<sup>4</sup>Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı, Bursa

Gönderilme: 12.02.2018 Kabul: 12.03.2018

## Özet

Romatoid artrit (RA) kronik ağrı ve eklem hasarına sebep olan inflamatuvar bir otoimmün hastalıktır. RA patogenizde T hücre aktivasyonu önemli rol oynar. T lenfositlerin aktivasyonu için, antijen sunan hücreler tarafından sağlanan eş-uyaran sinyallerine gereksinim vardır. Eş uyaransız T hücre anerjik hale gelir. Bu çalışmada farelerde deneysel artrit modelinde oluşan T lenfositlerin aktivasyonunu inhibe etmek için, endoplazmik retikulumunda ekspresyonu hedeflenen CTLA4 (CTLA4-KDEL) ile dendritik hücreler genetik olarak modifiye edilip tolere-jenik dendritik hücre (tolDH)'lerin oluşturulması amaçlanmış ve RA oluşturulmuş hayvanlarda tolDH ile tedavinin bazı kan parametreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla farelerde kollajen ile indüklenmiş artrit modeli kullanıldı. Artrit oluşumundan sonra fareler intra artiküler olarak tolDH'ler ile tedavi edildi. Tedavi edilen grupta kontrol gruplarına kıyasla, deneysel artrit modelinin oluşturulduğu eklem kalınlığındaki artışı ve özellikle nötrofil oranında yükseliş ile seyreden akyuvar sayısındaki artışı geri döndürdüğü gözlemlendi. Sonuç olarak CTLA4-KDEL genetik modifikasyonu ile elde edilen tolDH, farelerde deneysel artiritin oluşturduğu klinik semptomları azaltırken yine deneysel artrite bağlı olarak şekillenen kan parametrelerindeki değişiklikleri de geriletmişti gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Deneysel romatoid artrit, CTLA4-KDEL gen terapisi, Toleran dendritik hücre, Kan parametreleri.

## Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease that causes chronic pain and joint destruction. T cells activation has an important role in RA pathogenesis. Activation of T lymphocytes requires the co-stimulatory signals provided by antigen-presenting cells. T-cell activation without co-stimulation results in anergy. In this study, to inhibit the activation of T lymphocytes formed in the experimental arthritis, tolerogenic dendritic cells were aimed to be obtained by the genetical modification of dendritic cells with CTLA4-KDEL overexpression in endoplasmic reticulum. Then, RA created animals treated with tolDCs and the effect of treatment on blood parameters were investigated. For this purpose, mouse collagen induced arthritis model was used. The mice with arthritis were intraarticularly treated with modified tolDCs. It was observed that the treatment group significantly reversed the increase in the joint thickness and the increase in the number of white blood cells, especially with the increase in neutrophils when compared with control groups. As a result, genetically modified tolDCs reduced the clinical symptoms of experimental arthritis and also reversed the changes in blood parameters due to experimental arthritis in mice.

Key words: Experimental rheumatoid arthritis, CTLA4-KDEL gene therapy, Tolerant dendritic cell, Blood parameters.

## Giriş

Romatoid artrit (RA) bir çok eklemde sinoviyal dokuları etkileyen kronik, inflamatuvar bir hastalıktır. RA sinoviyal dokusunda infiltrat fibroblast-benzeri sinoviyositler, makrofajlar, T hücreleri, B hücreleri, plazma hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreleri bulunmaktadır (Tak ve ark., 2000). Semptomlar ortaya çıktığı zaman inflame sinoviyada kronik hastalığın histopatolojik özellikleri oturmuş olduğu için inflamatuvar sürecin ne zaman ve nasıl başladığı tam olarak bilinmemektedir (Tak, 2001). Bununla beraber hastalığın klinik olarak saptandığı evrede, inflamatuvar hücrelerin hastalık bölgesinde birikimi, bölgede tutulması ve proliferasyonunun, romatoid sinoviyada hücre birikiminin artmasına sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca, bozulmuş apoptoz da romatoid sinoviyal dokudaki hiperplaziyi arttırabilir. Bu duruma bağlı olarak sinoviyadaki artan hücresel yük, hem inflamatuvar hücrelerin bölgeye göçüne hem de alandaki hücrelerin tutulmasını sağlayan immünolojik faktörlere bağlıdır (Buckley, 2003).

RA'da, T hücre aktivasyonu antijene özgül immün yanıtta oldukça önem taşımaktadır. T hücre reseptörü aracılı sinyaller, T hücre yanıtının özgülüğünün belirleyen bir etkileşim olmasına rağmen, eş-uyaran sinyalleri optimal T hücre aktivasyonun sağlanmasında asıl olan faktördür (Gimmi ve ark., 1991; Harding ve ark., 1992). Sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA4) aktif T lenfositlerde ifade edilir (Linsley ve ark., 1991). Bu molekül T hücre aktivasyonunu T hücre veya anerinin indüksiyonu yoluyla kapatır (Linsley ve ark., 1992).

Farelerde kollajen ile indüklenen artrit modeli, RA ile hem immünolojik hem de patolojik özellikleri açısından benzerlik gösteren bir modeldir (Trentham ve ark., 1977; Wooley ve ark., 1985; Wooley, 1988; Guvenç ve ark., 2018). Bu nedenle bu model RA patogenezi incelemek için kullanılabilir. Bu çalışmada farelerde kollajen ile indüklenen artrit modelinde oluşan T lenfositlerin aktivasyonunu inhibe etmek için, endoplazmik retikulumunda ekspresyonu hedeflenen CTLA4 (CTLA4-KDEL) ile dendritik hücreler genetik olarak modifiye edilip tolerejenik dendritik hücre (tolDH)'lerin oluşturulması amaçlanmış ve RA oluşturulmuş hayvanlarda tolDH ile tedavinin bazı kan parametreleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

## Materyal ve Metot

### Hayvanlar

Çalışmada 6-8 haftalık, 28-35 gram ağırlığa sahip erkek 24 adet Balb/c ırkı fare kullanıldı. Fareler, Uludağ Üniversitesi, Deneysel Hayvan Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlandı ve aynı merkezde deneyler kontrollü iklim koşullarında (20-24 °C çevre ısısı, % 50-60 nem, 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık döngüsü), sürekli kuru yem ile beslenerek enfeksiyondan uzak ve veteriner hekim kontrolünde 4-6 hayvan bir kafeste olacak şekilde barındırıldılar. Hayvanlar spesifik patojen free olacak şekilde özel kafes sistemleri içerisinde barındırıldılar. Tüm yapılan uygulamalar, Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) onayladığı (2014-06/04) prosedürlerle gerçekleştirildi.

### Artritli fare modelinin oluşturulması ve değerlendirilmesi

Balb/c farelerde daha önce tanımladığımız (Guvenç ve ark., 2018) kollajen ile indüklenmiş artrit modeli kullanılarak artrit modeli oluşturuldu. Modele göre; fareler sevofluarane (%2-4/%100 O<sub>2</sub>) ile anestezi edildiler. Anestezi altında "0" ıncı günde, 25 G'lık iğneye sahip 10 µl'lik Hamilton enjektör kullanılarak 0,1 M asetik asit içinde sulandırılmış 2 mg/ml son konsantrasyona sahip kollajen (Sigma Aldrich Co, Katalog No: C7806) farelerin arka ayak eklemi içerisine 10 µl olacak şekilde enjekte edildi. İntraartiküler (i.a.) kollajen enjeksiyonundan hemen sonra 100 µl Freund Complete Adjuvant farelerin sırt bölgesine subkutan olarak enjekte edildi. Fareler kafeslerine geri konuldu ve anesteziden çıkmaları beklendi. Bu ilk immünizasyondan 2 hafta sonra immünizasyonun artırılması için aynı hayvanlara aynı enjeksiyonlar aynı yolla yine anestezi altında uygulandı. Son immünizasyondan sonra artrit oluşması için 1 hafta süre ile beklendi. Artrit modeli oluşturulmayan kontrol grubundaki hayvanlara aynı zamanlama ve yine aynı yollarla Kollajen ve Freund Complete Adjuvant yerine PBS aynı hacimde uygulandı.

Hayvanlarda artrit oluşumu kumpas yardımı ile ayak kalınlıklarının en ve boy ölçümlerinin ortalaması alınarak değerlendirildi.

### CTLA4-KDEL gen tedavisi için dendritik hücrelere gen transferi

Fare CTLA4 geni pCMV/Hygro memeli ekspresyon plazmitinden (Sino Biological Incl., Pekin, Çin) 5' ve 3' ucunda uygun restriksiyon dizileri bulunan primerler kullanılarak

amfliye edildikten sonra pCMV/myc/ER (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) plazmitine klonlandı bu modifiye CTLA4 geni CTLA4-KDEL olarak adlandırıldı. Daha sonra CTLA4-KDEL uygun restriksiyon enzimleri ile kesilip amplifiye edilip LeGo-iG2 lentivirüs sistemine klonlandı ve LeGo-iG2'ye klonlanan CTLA4-KDEL gen plazmitini bulunduran lenti-virüsler üretildi.

Fare dentritik hücreleri Son ve ark.'nın (2002) daha önce tanımladıkları metoda uygun olarak 4 ayrı farenin kemik iliğinden izole edildi. Metoda göre kemik iliğinden izole edilen dentritik hücreler, %10 fetal sığır serumu, 50  $\mu$ M 2-ME, 0,1 mM non-esensiyel aminoasitler, 2 mM L-glutamin, 100  $\mu$ g/mL penisilin, 100 IU/mL streptomisin, 20ng/mL fare GM-CSF ve fare IL-4 içeren komplekt besiyeri olan RPMI-1640'da kültüre edildiler. Kültüre edilen dentritik hücreler fare CTLA4-KDEL geni içeren lentivirüsler ile enfekte edilerek dentritik hücrelerin CTLA4-KDEL transfeksiyonu sonucu modifiye tolDH elde edildi.

### Deney Protokolü

Fareler, artirit oluşturulmamış kontrol (RA-, n=4); artirit oluşturulmuş kontrol (RA+, n=6); artirit oluşturulmamış modifiye tolDH (RA-, n=4); ve artirit oluşturulmuş modifiye tolDH (RA+, n=6) olmak üzere dört gruba ayrıldılar. Kontrol RA- ve kontrol RA+ grubundaki hayvanlar i.a. olarak 10  $\mu$ l PBS ile modifiye tolDH RA- ve modifiye tolDH RA+ grubundaki hayvanlar ise 10  $\mu$ l hacminde yaklaşık 13600 modifiye tolDH ile tedavi edildi. Tedaviden sonra 3 hafta süre ile haftalık olarak hayvanların eklem kalınlıkları ölçüldü. 3. hafta sonunda hayvanlardan sevoflurane anestezisi altında intraorbital olarak 1 ml kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Toplanan kan örneklerinde aynı gün içerisinde kan parametreleri ölçümleri gerçekleştirildi.

### Kan parametrelerinin ölçülmesi

Toplanan kan örneklerinden hematokrit (Hct), hemoglobin (Hb), alyuvar sayısı, akyuvar sayısı ve formül lökosit değerlerine bakıldı. Alyuvar sayımı için Hayem eriyiği ile 200 kez sulandırılan, akyuvar sayımı için Türk eriyiği ile 10 kez sulandırılan kan örneklerinden Thoma lamında alyuvar ve akyuvar sayımı yapıldı. Hct değeri, mikrohematokrit yöntem ile, Hb miktarı, Sahli metodu ile kolorimetrik olarak tespit edildi. Formül lökosit değerleri; kan örneklerinden hazırlanan frotilerde May Grünwald-Giemsa karışık boyama yöntemi kullanılarak belirlendi.

### İstatistiki değerlendirme

Çalışmadaki tüm sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ANOVA ve takiben uygun post hoc Benforoni testi ile yapıldı. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde p değerinin 0,05'den küçük olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

Kollajen ile indüklenmiş artirit oluşturulmadan önce farelerin arka ayak eklem kalınlıkları  $2,24 \pm 0,02$  mm (n=20) olarak ölçüldü. İkinci immünizasyondan hemen önce sonra eklem kalınlıkları  $2,78 \pm 0,02$  mm (n=10) ve tedavi yapılmadan hemen önce ise  $2,80 \pm 0,03$  mm (n=10) kalınlığa ulaştı. Kollajen ile indüklenmiş artirit modeli, farelerin eklem kalınlıklarını ilk immünizasyonun yapıldığı güne göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) bir şekilde ortama 0,56 mm artışa sebep oldu (Tablo 1). Kontrol RA- grubundaki PBS ile tedavi edilen ve modifiye tolDH (RA-) grubundaki modifiye tolDH terapisi alan farelerin eklem kalınlıklarında deney boyunca istatistiksel olarak anlamlı (p>0.05) bir değişiklik gözlenmedi (Tablo 1). Kontrol RA+ grubundaki farelerin eklem kalınlıkları ilk immünizasyonu takip eden haftalar boyunca anlamlı olarak (p<0.05) artış gösterdi (Tablo 1). Kontrol amaçlı PBS tedavisi farelerin eklem kalınlıklarında bir değişiklik oluşturmadı ve kontrol RA- ve modifiye tolDH (RA-) grubundaki farelerin eklem kalınlıklarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha kalın olarak gözlendi (p<0.05, Tablo 1). Modifiye tolDH (RA+) grubundaki farelerin eklem kalınlıkları ilk immünizasyonu takiben modifiye tolDH tedavisinin yapıldığı haftaya kadar anlamlı olarak (p<0.05) artış gösterdi (Tablo 1). Bu gruptaki hayvanlara i.a. olarak yapılan modifiye tolDH tedavisi farelerin eklem kalınlıklarında anlamlı olarak küçülmeye sebep oldu (p<0.05, Tablo 1).

Tablo 1. Modifiye tolDH tedavisinin kollajen ile indüklenmiş deneysel RA modelinde eklem kalınlıkları üzerine etkisi.

Haftalar	Kontrol (RA-) (mm)	Kontrol (RA+) (mm)	Modifiye tolDH (RA-) (mm)	Modifiye tolDH (RA+) (mm)
0 (I. İmmünizasyon)	2,18 $\pm$ 0,03	2,28 $\pm$ 0,03	2,25 $\pm$ 0,06	2,25 $\pm$ 0,03
2 (II. İmmünizasyon)	2,18 $\pm$ 0,06	2,80 $\pm$ 0,03*	2,23 $\pm$ 0,06	2,76 $\pm$ 0,03*
3 (Tedavi)	2,24 $\pm$ 0,04	2,83 $\pm$ 0,03*	2,28 $\pm$ 0,08	2,77 $\pm$ 0,04*
4	2,23 $\pm$ 0,05	2,93 $\pm$ 0,03*	2,28 $\pm$ 0,03	2,64 $\pm$ 0,04**
5	2,25 $\pm$ 0,04	2,98 $\pm$ 0,04*	2,29 $\pm$ 0,04	2,62 $\pm$ 0,04**
6	2,28 $\pm$ 0,03	2,99 $\pm$ 0,05*	2,23 $\pm$ 0,13	2,61 $\pm$ 0,04**

Değerler 4-6 farenin ortalama  $\pm$  standart hatası şeklinde verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler ANOVA'yı takiben Bonferroni testi ile yapıldı. \*, p<0.05, RA+ grupların RA- gruplara göre anlamlı farkını; +, p<0.05, Modifiye tolDH (RA- grubunun Kontrol (RA+) grubuna göre anlamlı farkını göstermektedir.

Artirit oluşturulmayan kontrol (RA-) ve modifiye tolDH (RA-) grubundaki farelerin ve artirit oluşturulan kontrol (RA+) ve modifiye tolDH (RA+) grubundaki hayvanların Hct, Hb miktarı ve alyuvar sayılarında anlamlı bir fark elde edilmedi ( $p>0.05$ , Tablo 2). Bununla birlikte artirit oluşturulmuş kontrol (RA+) grubundaki farelerin akyuvar sayısında, artirit oluşturulmayan kontrol (RA-) ve modifiye tolDH (RA-) grubundaki farelerin ve artirit oluşturulan modifiye tolDH (RA+) grubundaki modifiye tolDH tedavisi alan hayvanların akyuvar sayısına göre anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ( $p<0.05$ , Tablo 2).

Tablo 2. Modifiye tolDH tedavisinin bazı kan parametresi üzerine etkisi.

	Kontrol (RA-)	Kontrol (RA+)	Modifiye tolDH (RA-)	Modifiye tolDH (RA+)
Htc %	30,5 ± 0,5	29,4 ± 1,9	29,4 ± 1,9	32,0 ± 1,3
Hb gr/dl	11,4 ± 0,6	11,0 ± 0,5	11,4 ± 1,4	11,6 ± 0,4
Alyuvar 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	6,4 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,5 ± 0,2
Akyuvar 10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup>	7,9 ± 1,0	13,3 ± 0,7*	8,2 ± 0,9	6,7 ± 0,2

Değerler 4-6 farenin ortalama ± standart hatası şeklinde verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler ANOVA'yı takiben Bonferroni testi ile yapıldı. \*,  $p<0.05$ , Kontrol (RA+) grubunun diğer gruplara göre anlamlı farkını göstermektedir.

Formül lökosit sonuçlarına göre, tüm gruplardaki hayvanların eozinofil ve bazofil yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 3). Modifiye tolDH (RA+) grubundaki hayvanların nötrofil yüzdesinin ve kontrol (RA+) grubundaki farelerin lenfosit yüzdesinin, diğer gruptaki farelerin yüzde değerlerine göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi ( $p<0.05$ , Tablo 3). Modifiye tolDH (RA+) grubundaki farelerin diğer gruplardaki farelere göre daha fazla monosit yüzdesine ve kontrol (RA+) grubundaki farelerin de diğer gruplardaki farelere göre daha fazla nötrofil yüzdesine sahip olduğu belirlendi ( $p<0.05$ , Tablo 3).

Tablo 3. Modifiye tolDH tedavisinin akyuvar formülü üzerine etkisi.

	Kontrol (RA-)	Kontrol (RA+)	Modifiye tolDH (RA-)	Modifiye tolDH (RA+)
Nötrofil (%)	26,00 ± 4,0	32,60 ± 1,4 <sup>x</sup>	25,50 ± 3,5	13,75 ± 1,3*
Eozinofil (%)	2,00 ± 1,0	2,60 ± 0,7	2,00 ± 1,0	2,86 ± 0,7
Bazofil (%)	0,00 ± 0,0	0,40 ± 0,4	0,00 ± 0,0	0,13 ± 0,1
Lenfosit (%)	68,00 ± 6,0	60,00 ± 3,3*	69,50 ± 0,5	67,88 ± 2,2

Değerler 4-6 farenin ortalama ± standart hatası şeklinde verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler ANOVA'yı takiben Bonferroni testi ile yapıldı. \*,  $p<0.05$ , Modifiye tolDH (RA+) grubunun diğer gruplara göre Nötrofil %'si açısından anlamlı farkını göstermektedir; <sup>x</sup>,  $p<0.05$ , Kontrol (RA+) grubunun diğer gruplara göre Nötrofil %'si açısından anlamlı farkını göstermektedir; \*,  $p<0.05$ , Kontrol (RA+) grubunun diğer gruplara göre Lenfosit %'si açısından anlamlı farkını göstermektedir; x,  $p<0.05$ , Modifiye tolDH (RA+) grubunun diğer gruplara göre Monosit %'si açısından anlamlı farkını göstermektedir.

## Tartışma ve Sonuç

Çalışmada, kollajen ile indüklenmiş deneysel RA modeli ile farelerin eklem kalınlıklarında kontrole göre anlamlı bir kalınlaşma olduğu ve i.a olarak modifiye tolDH tedavisinin bu kalınlaşmayı anlamlı ölçüde geriletmediği gözlemlenmiştir. Yine ne RA oluşturulması ne de modifiye tolDH tedavisinin uygulanması, farelerin Hct, alyuvar sayısı ve Hb miktarlarında bir değişiklik oluşturmazken, deneysel olarak RA oluşturulması hayvanların akyuvar sayısını anlamlı olarak artırdığı ve i.a olarak modifiye tolDH tedavisinin bu artışı geriletmediği bulunmuştur. RA oluşturulan farelerde gözlenen nötrofil artışı modifiye tolDH tedavisi ile gerilerken, modifiye tolDH tedavisi farelerde monosit sayısında artışa sebep olmuştur.

RA, eroziv eklem hasarını içeren simetrik eklem yangısı ile karakterize, sistemik otoimmün bir hastalıktır (Sodhi ve ark., 2015). RA tedavisinde; ağrının hafifletilmesi, eklem şişkinliğinin azaltılması, eklem hasarının geri döndürülmesi veya yavaşlatılması ve eklem fonksiyonunun geri kazanılması amaçlanır (Patel ve ark., 2015). Metotretksat tek başına veya glikokortikoidler ile kombine olarak geleneksel RA tedavisinde kullanılan en önemli ajan olmakla beraber, RA'nın tam olarak tedavi edilmesi ya da hastalarda fiziksel rahatlamayı sağlayarak yaşam kalitesinin artırılması açısından yeterli değildir (Pincus ve ark., 2010). Bu sebeple RA tedavisinde, T hücrelerine yönelik tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir (Levent ve ark., 2002). RA patogenezinde T hücre aktivasyonu immün yanıtın oluşmasında önem taşımaktadır (Gimmi ve ark., 1991; Harding ve ark., 1992). T hücre aktivasyonunun sağlanmasında, T hücreden eksprese edilen CD28 ile antijen sunan hücrelerden eksprese edilen eş uyaran molekül olan CD80/86 etkileşimi gerekmektedir. Ayrıca, T hücrelerde eksprese edilen CTLA4'ün antijen sunan hücrelerdeki CD80/86'ya yüksek afinite ile bağlanması durumunda, CD28'in CD80/86'ya bağlanması engellenir ve eş-uyaran sinyali bloke edilir (Lenschow ve ark., 1992; Linsley ve ark., 1992). Bu çalışmada yeni bir tedavi yaklaşımı olarak CTLA4-KDEL geni aktarılmış dendritik hücrelerin yüzeyinde CD80/86 ifadesi engellenerek modifiye tolDH üretilmesi sonucu tolerans indüklenmesiyle otoimmün yanıt baskılanması sağlanarak RA'nın oluşturduğu klinik semptomların hafifletilmesi sağlanmıştır.

Çalışmada artirit oluşturulan farelerde (kontrol RA+) alyuvar sayısı ve Hb miktarında bir azalma eğilimi görülse

de gruplar arasında önemli bir fark bulunmadı. Bu azalma eğilimi modifiye tolDH tedavisi yapılan hayvanlarda geri döndü. Yapılan çalışmalarda, kronik artrite sahip hayvanlarda alyuvar sayısında ve Hb miktarında azalma olduğu ve bu azalmanın, hastalığa bağlı olarak eritropoetin miktarındaki azalmadan, yeni alyuvarların kolay yıkımından ve retikuloendotelial sistem ve sinovial dokuda anormal demir depolanmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Mowat, 1971; Singh ve ark., 2003).

RA'da antijen varlığına karşı immün sistemin uyarılmasından dolayı akyuvar sayısında ılımlıdan ortalamaya kadar değişen bir artış vardır (Kshirsagar ve ark., 2014). Çalışmada lokal olarak kollajen ile artrit indüklenmesi ile bağlantılı olarak akyuvar sayısında artış görülmüş olup bu bulgular daha önce Sumanth ve ark.'nın (2012) raporları ile uyum sağlamaktadır. Akyuvar sayısında modifiye tolDH tedavisi yapılan farelerde önemli bir azalma görülmesi artrit oluşturduğu antijene karşı immün yanıtın tedavi ile baskılanmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir.

RA'da; nötrofiller, lenfositler, monositler ve monositlerden dönüşen makrofaj ve dentritik hücreler otoimmün reaksiyonun oluşmasında rol alırlar (Mellado ve ark., 2015). Nötrofiller inflamasyon bölgesine ilk ulaşan hücreler olup sitokin ve kemokin mediatörler salgılayarak, lenfosit ve monosit gibi diğer immün hücrelerin bölgeye göçünü sağlarlar (Cascao ve ark., 2010). Böylece nötrofiller otoimmün reaksiyonun başlatılmasında rol alarak RA'da patojenik savunma için anahtar rol oynarlar. Çalışmada oluşturulan RA modelinde farelerin artan akyuvar sayısında nötrofil yüzde oranının yüksek olarak belirlenmesi devam eden otoimmün reaksiyona karşı nötrofillerin aldığı immün yanıt görevinden kaynaklı olarak yorumlanabilir. Kontrol RA (+) grubunda periferik lenfosit oranındaki düşüklük, kronik RA oluşumuna bağlı olarak lenfositlerin yoğun bir şekilde inflamasyon bölgesine infiltrasyon göstermesinden kaynaklanabilir. Çünkü RA hastalarında hem hasar görmüş eklem dokusu içerisinde hem de sinovial doku içerisindeki lenfosit doku benzeri yapılara kandan yoğun lenfosit infiltrasyonu olduğu bilinmektedir (Koo ve ark., 2013). Yine Duclos ve ark.'nın (1982) yaptıkları çalışmada RA'lı hastalarda kanda lenfosit sayısını sağlıklı olanlara göre daha az bulurken, sinoviyal sıvı içerisindeki lenfosit sayısını RA'lı hastalarda daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. RA'ya bağlı inflamatuvar olaylarda tam kan sayımı parametrelerinde özellikle nötrofil sayısında artış izlenirken, lenfosit sayılarında azalma görülmektedir (Kil-

ic ve ark., 2016). Çalışmada i.a. yolla yapılan modifiye tolDH tedavisi RA'nın neden olduğu nötrofil oranındaki artışı ve lenfosit oranındaki azalış bulgularını bir iyileşme belirteci olarak da geri döndürmüştür. Ayrıca, modifiye tolDH tedavisi yapılmış farelerde diğer farelere göre daha yüksek oranda monosit yüzdesine sahip oldukları gözlenmiştir. Monositlerin genel olarak inflamasyon esnasında inflamasyon dokusuna göç ederek makrofaj ve dentritik hücrelere dönüştükleri böylece immün yanıtta rol aldıkları ve ayrıca monositlerin iyileşme döneminde artış gösterdiği bilinmektedir. Modifiye tolDH tedavisine bağlı olarak monosit artışı da iyileşmeye bağlı olarak gözlenmiş olabilir. Cemil ve ark.'ın (2016) yaptıkları çalışmada RA'ya benzeyen diğer bir otoimmün hastalık olan Psoriasis'li hastalara biyolojik ajan tedavisi sonrasında kan monosit sayısında artış bulduklarını rapor etmişlerdir. Bu raporlar çalışmada elde edilen verileri destekler niteliktedir.

Sonuç olarak farelerde kollajen ile artrit indüklenmesi, eklemde antijene karşı immün yanıtın oluşmasına bağlı olarak; klinik anlamda eklemlerde kalınlaşma/şişme ve kan parametrelerinde özellikle nötrofil oranında olmak üzere akyuvar sayısında artma ve yine alyuvar sayısında ve Hb miktarında azalmaya bağlı anemiye doğru ilerleyen değişikliklere sebep olmuştur. Lokal olarak i.a. modifiye tolDH tedavisi eklemlerde oluşan antijene karşı oluşan immün reaksiyonu azaltarak, gözlenen hem klinik hem de kan parametrelerindeki değişiklikleri geriletmiştir.

## Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK (114S354) tarafından desteklenmiştir

## Kaynaklar

Buckley CD. Why does chronic inflammatory joint disease persist? Clin Med, 3: 361-366, 2003.

Cascao R. Rosario HS. Souto-Carneiro MM. Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. Autoimmun Rev, 9: 531-535, 2010.

Cemil BÇ. Ataş H. Psoriasis hastalarında biyolojik tedavinin sistemik inflamatuvar belirteçler ve plateletcrit üzerine etkisi. Dicle Univ Tıp Fakul. Derg, 43: 477-483, 2016.

Duclos M. Zeidler H. Liman W. Pichler WJ. Rieber P. Peter

- HH. Characterisation of blood and synovial fluid lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis and other joint diseases by monoclonal antibodies (OKT series) and acid alpha-naphthyl esterase staining. *Int J Rheumatol*, 2: 75-82, 1982.
- Gimmi CD. Freeman GJ. Gribben JG. Sugita K. Freedman AS. Morimoto C. Nadler LM. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 6575-6579, 1991.
- Güvenç G. Karacay M. Akkoc A. Ciftci K. Oral HB. Yalcin M. A new protocol for collagen-induced local arthritis model in Balb/c mice. *Türk J Immunol*, 2018 (Baskıda).
- Harding FA. McArthur JG. Gross JA. Raulat DH. Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, 356: 607-609, 1992.
- Kilic E. Rezvani A. Toprak AE. Erman H. Ayhan SK. Poyraz E. Ozaras N. Romatoid artritite nötrofil/lenfosit ve platelet/lenfosit oranlarının değerlendirilmesi. *Dicle Univ Tıp Fakul Derg*, 43: 241-247, 2016.
- Koo J. Kim S. Jung WJ. Lee YE. Song GG. Kim KS. Kim MY. Increased lymphocyte infiltration in rheumatoid arthritis is correlated with an increase in T<sub>H</sub>1-like cells in synovial fluid. *Immune Netw*, 13: 240-248, 2013.
- Kshirsagar AD. Panchal PV. Harle UN. Nanda RK. Shaikh HM. Anti-inflammatory and antiarthritic activity of anthraquinone derivatives in rodents. *Int J Inflamm*, 2014: 690596, 2014.
- Lenschow DJ. Zeng Y. Thistlethwaite JR. Montag A. Brady W. Gibson MG. Linsley PS. Bluestone JA. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science*, 257: 789-792, 1992.
- Levent Ö. Ataman Ş. Romatoid artrit tedavisinde yeni yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2: 124-42, 2002.
- Linsley PS. Brady W. Urnes M. Grosmaire LS. Damle NK. Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*, 174: 561-569, 1991.
- Linsley PS. Wallace PM. Johnson J. Gibson MG. Greene JL. Ledbetter JA. Singh C. Tepper MA. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science*, 257: 792-795, 1992.
- Mellado M. Martinez-Munoz L. Cascio G. Lucas P. Pablos JL. Rodriguez-Frade JM. T cell migration in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*, 6: 384, 2015.
- Mowat AG. Hematologic abnormalities in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 1: 195-219, 1971.
- Patel MG. Pundarikakshudu K. Anti-arthritic activity of a classical Ayurvedic formulation Vatari Guggulu in rats. *J Tradit Complement Med*, 6: 389-394, 2015.
- Pincus T. Cronstein B. Braun J. Methotrexate - the anchor drug - an introduction. *Clin Exp Rheumatol*, 28: 1-2, 2010.
- Singh B. Bani S. Gupta DK. Chandan BK. Kaul A. Anti-inflammatory activity of 'TAF' an active fraction from the plant *Barleria prionitis* Linn. *J Ethnopharmacol*, 85: 187-193, 2003.
- Sodhi A. Naik S. Pai A. Anuradha A. Rheumatoid arthritis affecting temporomandibular joint. *Contemp Clin Dent*, 6: 124-127, 2015.
- Son YI. Egawa S. Tatsumi T. Redlinger RE. Jr. Kalinski P. Kanto T. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods*, 262: 145-157, 2002.
- Sumanth M. Anusha and Swetha S. Elucidation of mechanism of anti-arthritic action of Arthosansar - a polyherbal formulation. *Indian J Traditional Knowledge*, 11: 704-713, 2012.
- Tak PP. Is early rheumatoid arthritis the same disease process as late rheumatoid arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 15: 17-26, 2001.
- Tak PP. Bresnihan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum*, 43: 2619-2633, 2000.

Trentham DE. Townes AS. Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 146: 857-868, 1977.

Wooley PH. Luthra HS. Griffiths MM. Stuart JM. Huse A. David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule. *J Immunol*, 135: 2443-2451, 1985.

Wooley PH. Collagen-induced arthritis in the Mouse. *Methods Enzymol*, 162: 361-373, 1988.