

TİP 1 DİYABETTE NKT HÜCRELERİNİN ROLÜ THE ROLE OF NKT CELLS IN TYPE I DIABETES

Erşahin G¹, Bilgiç S¹, Aktaş E¹, Salman F¹, Deniz G¹.

¹İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE),
İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, TÜRKİYE

Özet

Periferik kan NKT hücre seviyeleri, sitokin profili ve sitotoksik aktiviteyi incelediğimiz çalışmamızda, tip 1 diyabetin farklı dönemlerindeki hasta grupları ve non-diyabetik gruplarda NKT hücrelerinin sayı ve fonksiyon açısından özellikleri incelenerek bu hücre grubunun tip 1 diyabet patogenezi içindeki olası rolü araştırılmıştır. Tip 1 diyabet teşhis süresi 1 ay-1 yıl olan grup (Grup 1, n:5, yaş ortalaması: 31±7), teşhis süresi 1 yılın üstünde olan grup (Grup 2, n:4, yaş ortalaması: 22±8), tip 1 diyabetiklerin 1. derece non-diyabetik akrabası olan grup (Grup 3, n:7, yaş ortalaması: 30±9) sağlıklı kontrol grubu (Grup 4, n:5, yaş ortalaması: 25±5) ile karşılaştırılmıştır. Flow sitometri yöntemiyle Vα24 düzeyleri incelendiğinde, Grup 1, Grup 2, Grup 3'te Vα24 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (sırasıyla; p<0.001, p<0.01 ve p<0.05,). CD161 düzeyleri bakımından Grup 1, Grup 2 ve Grup 3, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır (p<0.001). Hücre içi IFN-γ düzeyleri Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuş (p<0.001), ayrıca CD161 ekspresyonu ile hücre içi IFN-γ seviyeleri arasında güçlü bir korelasyon saptanmıştır (r=0.78). Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te sitotoksik aktivite kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur (p<0.001, p<0.01, p<0.05, sırasıyla). Hücre içi IFN-γ seviyeleri ve CD161 ekspresyonu, sitotoksikite değerleri ile karşılaştırıldığında, anlamlı korelasyon saptanmıştır (r=0.76). CD161 ekspresyonu düşüşüne bağlı olarak gruplardaki IFN-γ düzeyindeki azalış, NK ve NKT hücrelerindeki sitotoksik aktivite ile tip 1 diyabetin tanı süresi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Tip 1 diyabetlilerin birinci derece akrabalarında kontrol grubuna göre düşük olarak saptanan NKT hücre sayı ve fonksiyonları, bu hücrelerin hastalığın prelinik süreçte etkin bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

Summary

In our study, the levels of peripheral blood NKT cells, cytokine profile and cytotoxic activity of type 1 diabetes patients with a disease duration of between 1 month-1 year (Group 1, n:5, mean age: 31±7), disease duration of more than 1 year (Group 2, n:4, mean age: 22±8) and non-diabetic relatives of type 1 diabetic patients (Group 3, n:7, mean age: 30±9) are compared to healthy control (Group 4, n:5, mean age: 25±5). Investigating ICA and anti-GAD positivity in these groups, Group 1 and Group 2 showed 100% positivity, whereas Group 3 and Group 4 did not show any positivity of these autoantibodies.

Investigating the levels of Vα24 with flow cytometry, the group with disease duration between 1 month - 1 year, the group with disease duration of more than 1 year and the group of first degree non-diabetic relatives of type 1 diabetics were found statistically decreased compared to healthy control group (p<0.001, p<0.01 ve p< 0.05, respectively). Among groups, levels of Vα24 were found statistically significant in Group 3, compared to Group 1 and Group 2 (p<0.05). Comparing the levels of CD161 in groups, Group 1, Group 2 and Group 3 are found significantly decreased compared to control group (p<0.001, p<0.001, p<0.001, respectively), and there is no significant difference was found among Group 1, Group 2 and Group 3 (p>0.05). Investigating the levels of intracytoplasmic cytokine IFN-γ in groups, Group 1, Group 2 and Group 3 was found significantly decreased compared to control group (p<0.001, p<0.001, p<0.001, respectively). A strong correlation was also found between CD161 expression and intracytoplasmic IFN-γ levels (r=0.78).

There is no statistically significance was found in the levels of Vα11 comparing study and control groups (p>0.05). Comparing intracytoplasmic IFN-γ levels and CD161 surface molecule expressions to cytotoxicity values, a significant correlation was found (r=0.76). Decrease of IFN-γ levels depending on CD161 expression, states the relationship between the diagnosis time of type 1 diabetes and cytotoxic activity of NK and NKT cells. Our results support the findings that NKT cells are decreased numerically and functionally in the early stages of type 1 diabetes. Decreasion of NKT cell numbers and functions in non-diabetic first degree relatives of type 1 diabetic patients suggests the role of preclinic progress in disease. In our study emphasizing the importance of NKT cells in the pathogenesis of type 1 diabetes, our findings state the parallelism between numerically reduction of NKT cells and release of IFN-γ and cytotoxic activity. These results state the importance of NKT cells in the early stages of the pathogenesis of type 1 diabetes.

İletişim bilgileri:

Sema Bilgiç Gazioğlu
İmmünoloji AD,
Deneysel Tıp Araştırma
Enstitüsü, İstanbul
Üniversitesi, İstanbul,
Türkiye
Telefon: 02124142000-
33344
Faks: 02125324171
E-mail:
sbilgic@yahoo.com

GİRİŞ

İnsüline bağımlı tip 1 diyabet (IDDM), bireyin pankreasındaki insülin üreten beta (β) hücrelerinin otoreaktif T hücreleri tarafından destrüksiyonu sonrasında gelişen otoimmün bir hastalıktır. Multifaktöriyel bir hastalık olup; genetik yatkınlık, otoimmün yanıtlar, sitokinler ve çevresel faktörler hastalığın gelişimini etkilemektedir (1). β hücrelerinin destrüksiyonunda otoreaktif T lenfositleri rol oynamaktadır. Çalışmalar, β hücre destrüksiyonunda CD4+ ve CD8+ T lenfositlerinin sorumlu olduğunu göstermekle birlikte, makrofaj ve dendritik hücrelerin de destrüksiyonda önemli rol oynayabileceğini ileri sürmektedir (2). Otoimmün hastalığı bulunan bireylerin periferik kan Doğal Öldürücü (Natural Killer, NK) hücre sayısındaki azalmaya paralel olarak son çalışmalarda bu hücrelerin fonksiyonlarında da azalma saptanmıştır. Natural Killer T (NKT) hücreleri, otoimmünitenin regülasyonundan sorumlu hücreler olup, hem NK hem de T hücreleri ile ortak özellik taşıyan $\alpha\beta$ T hücrelerinin bir alt grubudur (3, 9, 11, 18). Tip 1 diyabetin hayvan modelleriyle yapılan birçok çalışma, non obez diyabetik (NOD) farelerde NKT hücrelerinin eksikliğini göstermektedir. Son yıllarda yapılan insan çalışmalarında da benzer sonuçlar gösterilmiştir (4, 11). Günümüzde tip 1 diyabetin başlangıcı adacık hücrelerine karşı gelişen otoantikörlerin varlığının saptanması ile belirlenmekte, buna karşılık otoimmün aktivasyon ve erken doku harabiyetini yansıtabilecek yeni klinik testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla araştırılan NKT hücreleri, uyanılmalarını takiben başta yardımcı T hücresi 2 (T helper 2, Th2) tipinde bir sitokin olan İnterlökin-4 (IL-4) ve yardımcı T hücresi 1 (T helper 1, Th1) tipinde bir sitokin olan İnterferon-gamma (IFN- γ)'yı yüksek miktarda salgırlar. Çalışmalar NKT hücre sayısındaki artış ile tip 1 diyabet gelişiminde gerilemenin, bu hücre grubunun Th2 tip yanıtı indükleyerek adacık otoantijenlerine karşı yanıtın baskılanması sonucu olduğunu göstermektedir. NKT hücre transferi ile IL-4 ve/veya IL-10 bağımlı mekanizmanın devreye sokulup, tip 1 diyabetten korunmanın sağlanabileceği de ileri sürülmektedir (5, 9, 11). Farklı dönemdeki tip 1 diyabet hastalarında periferik kan NKT hücre seviyelerinin ve hücre içi sitokin düzeylerinin saptanarak, periferik kan mononükleer hücre sitotoksik aktivitesinin belirlendiği bu çalışmada, NKT hücrelerinin tip 1 diyabetteki öneminin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta Seçim Kriterleri

Çalışmamıza; tanı süresi 1 ay - 1 yıl olan tip 1 diyabetik grup (Grup 1, n:5, yaş ortalaması: 31 \pm 7, 2K-3E), tanı süresi 1 yıldan fazla olan tip 1 diyabetik grup (Grup 2, n:4, yaş ortalaması: 22 \pm 8, 1K-4E), tip 1 diyabetik hastaların non-diyabetik 1. derece akrabası (Grup 3, n:7, yaş ortalaması: 30 \pm 9, 5K-3E) ve sağlıklı kontrol grup (Grup 4, n:5, yaş ortalaması: 20 \pm 5, 3K-2E) olmak üzere toplam 20 kişi alınmıştır. Tip 1 diyabetiklerin adacık hücre antikoru (islet cell antibody, ICA) pozitifliğinin ≥ 24 JDFu ve anti-GAD antikor (Glutamic acid decarboxilase) pozitifliğinin ≥ 32 ng/ml olması, tip 1 diyabetiklerin non-diyabetik 1. derece akrabası ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerde ise bu otoantikörlerin negatif olması kriter olarak alınmıştır.

Periferik Kan mononükleer Hücreleri (PKMH) Yüzey Molekül Ekspresyonu

Kontrol ve hasta gruplarından alınan heparinli kanlardan Ficoll yoğunluk gradiyent santrifüjü ile elde edilmiş ve yüzey molekül ekspresyonu için floresan işaretli monoklonal antikörlerle boyanmıştır (Tablo 1). Bu amaçla 100 μ l hücre süspansiyonu üzerine araştırılacak antikörler uygun dilüsyonlarda eklenerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelere %2 paraformaldehit içeren PBS ilave edilerek, flow sitometri cihazı (FACSCalibur, Becton & Dickinson Corp) ile yüzey molekül ekspresyonu % olarak saptanmıştır.

Flow Sitometrik Analiz

Hücre içi Sitokin Tayini

PKMH, heparinli kandan steril şartlarda Ficoll (Sigma Chem. Co., St. Louis, MA) yoğunluk gradiyent santrifüjü yöntemiyle izole edilmiş ve Cy5 işaretli CD161⁺ (BD PharMingen San Diego, CA), fluorescein-isothiocyanate (FITC) işaretli TCR-V α 24⁺, FITC işaretli TCR-V β 11⁺ (Immunotech, A Coulter Company, France), NK ve NKT hücrelerinde hücre içi IFN- γ seviyesini saptayabilmek amacıyla 1x10⁶ hücre/ml PKMH 4 μ l PMA/İonomisin ile 4 saat stimüle edilmiş ve 10 μ l Monensin eklenerek gece boyu 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Stimülasyon sonrası kültürden alınan hücreler, bir kez fosfat tamponlu tuz (Phosphate buffered saline, PBS) ile yıkanarak hücre içi sitokin boyama aşamalarına hazırlanmıştır. Bu aşamada Caltag Permeabilizasyon kiti kullanılmıştır (Caltag, Avusturya). 100 μ l hücre süspansiyonu üzerine 100 μ l Reagent A (fiksasyon medyum) eklenerek 15 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası

hücreler bir kez PBS ile yıkanmış bunu takiben hücreler üzerine Reagent B (permeabilizasyon mediyumu) ve 10µl monoklonal antikor eklenmiştir. Monoklonal antikor olarak; anti IFN-γ-PE (Diacclone, France) kullanılmıştır.

Sitotoksosite Tayini

Hedef Hücre Olarak K562'lerin BrdU ile İşaretlenmesi

Sitotoksosite tayini için Cellular DNA Fragmentation ELISA kiti (Roche Molecular Biochemicals, Germany) kullanılmıştır. Hedef hücre olarak eritromiyeloid lösemi hücre özelliği gösteren K562 hücre serisi kullanılmıştır. Steril şartlarda K562 hücreleri bir kez PBS ile 1300 rpm'de 5 dakika yıkanmıştır. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 1 ml RPMI-1640'lı medyum ilave edilmiştir. Hücreler 24 kuyulu kültür plağının 1 kuyusuna alınmış ve son konsantrasyon 10mM olacak şekilde BrdU (5'-Bromo-2'-deoxy-uridine) işaretleme solüsyonu ile 37°C'de steril şartlarda gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

PKMH İzolasyonu

PKMH, EDTA'lı kandan steril şartlarda Ficoll (Sigma Chem. Co., St. Louis, MA) yoğunluk gradiyent santrifüjü ile ayrılmıştır. Bu amaçla her bireyden 10ml EDTA'lı tüpe kan alınmış ve kan 1:2 (Ficoll:kan) Ficoll üzerine yayılarak oda ısısında 1800 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında hücreler gradiyent farkına göre, eritrositler en dipte, PKMH'lerin bulunduğu interfaz tabakası ortada ve plazma en üstte olacak şekilde ayrılmıştır. İnterfazdan toplanan PKMH'ler 2 kez PBS ile 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve efektör hücre olarak kullanılmak üzere Neubauer hemositometresinde hücre sayımı yapılmıştır.

Sitotoksosite Tayini

Kültür mediyumundaki BrdU işaretli hücrelerden, 4x10⁶ hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa her bir hasta için 2'li kuyucuklar halinde 100'er µl pipetlenmiştir. PKMH hücrelerinin de ilavesi sonucu kuyularda efektör/hedef (E/T) hücre oranı 25:1 ve 50:1 olacak şekilde ayarlanmıştır. DNA fragmanlarının spontan salınımını belirlemek için negatif kontrolün ölçüldüğü kuyulara yalnızca medyum içinde K562 hücreleri, DNA fragmanlarının maksimum salınımını belirlemek için pozitif kontrolün ölçüldüğü kuyulara ise efektör hücreler yerine %1'lik Triton X-100 (Merck, Germany) içeren 100µl bidistile su eklenmiştir. Plak %5 CO₂'li ortamda 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası plak 10 dakika, 1300 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kuyucuklardaki supernatant gödelere toplanmış ve enzyime (ELISA) analizi için 1 gün -20°C'de saklanmıştır.

ELISA Tayini

aiama solüsyonu ile kaplanmış 96 kuyucuklu düz tabanlı ELISA plağa aktarılarak 90 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. Kuyucukların yıkama solüsyonu ile yıkanmasının ardından plak mikrodalgada (Arçelik MD500, Türkiye) 500W'ta 5 dakika irradiyasyona maruz bırakılmıştır. Plağın -20°C'de 10 dakika soğutulmasının ardından her kuyucuğa 100µl konjugat solüsyonu (anti-BrdU-POD) eklenmiş ve 90 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. Plağın yıkama solüsyonu ile yıkanmasının ardından kuyucuklara 100µl substrat solüsyonu (Tetramethylbenzidine, TMB) eklenmiştir. Plak karanlık ortamda çalkalayıcıda renk gelişimi gerçekleşene kadar inkübe edilmiştir. Kuyucuklara 25µl durdurucu solüsyon (%95 H₂SO₄) eklenip çalkalayıcıda 1 dakika inkübe edilmiş ve optik dansite (OD) 450nm'de ELISA okuyucusunda (Bio-tek Instruments EL_x 800) okunmuştur.

% sitotoksik aktivitenin değerlendirilmesinde;
Deney – Spontan salınım

$$\frac{\text{Deney} - \text{Spontan salınım}}{\text{Maksimum salınım} - \text{Spontan salınım}} \times 100$$

Maksimum salınım – Spontan salınım

değerleri her bir örnek için 25:1 ve 50:1 E:T oranları için ayrı ayrı hesaplanmış, aradaki değişim sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Gruplardan elde edilen sonuçlar, her bir grubun aritmetik ortalaması ve her bir ortalama değer için standart sapması alınarak hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki farklar Mann Whitney U testi ve korelasyon testi kullanılarak değerlendirilmiş ve 0.05'ten küçük p değerleri (p<0.05) istatistiksel olarak anlamlı ve r= 0-0,30 bağıntı olmadığı, r= 0,41-0,50 zayıf bağıntı, r= 0,51-0,75 orta güç bağıntı, r= 0,76-0,85 güçlü bağıntı, r= 0,86-0,95 çok güçlü bağıntı ve r= 0,96-1 tam bağıntının varlığı şeklinde kabul edilmiştir.

BULGULAR

Hücre içi sitokin düzeyleri

Vα24 Düzeyleri

Tip 1 diyabet tanı süresi 1 ay-1 yıl (Grup 1), tanı süresi >1 yıl (Grup 2) ve tip 1 diyabetik hastaların non-diyabetik 1. derece akrabalarında (Grup 3), Vα24 düzeyleri incelendiğinde, Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Vα24 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0.001, p<0.01 ve p<0.05, sırasıyla) (Grafik 1). Gruplar kendi aralarında

karşılaştırıldığında $V\alpha 24$ düzeyleri açısından Grup 1 ve Grup 2 arasında anlamlı bir fark saptanmamasına karşılık ($p>0.05$), tip 1 diyabetik hastaların non-diyabetik 1. derece akrabalarında (Grup 3), $V\alpha 24$ düzeyleri Grup 1 ve Grup 2'ye göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). $V\alpha 24$ düzeyleri CD161 ve IFN- γ düzeyleri ile karşılaştırıldığında, CD161 ve IFN- γ düşüklüğü ile aralarında pozitif korelasyon saptanmıştır ($r=0.74$)

CD161 Düzeyleri

Tip 1 diyabet tanı süresi 1 ay-1 yıl (Grup 1), tanı süresi >1 yıl (Grup 2) ve tip 1 diyabetik hastaların non-diyabetik 1. derece akrabalarında (Grup 3) CD161 düzeyleri incelendiğinde, CD161 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$) (Grafik 2). Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 kendi aralarında karşılaştırıldığında CD161 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.5$).

Hücre içi IFN- γ Düzeyleri

Tip 1 diyabet tanı süresi 1 ay-1 yıl (Grup 1), tanı süresi >1 yıl (Grup 2) ve tip 1 diyabetik hastaların non-diyabetik 1. derece akrabalarında (Grup 3) hücre içi IFN- γ düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$) (Grafik 3). CD161 ekspresyonu ile hücre içi IFN- γ düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon saptanmıştır ($r=0.78$). CD161 ekspresyonu düştükçe gruplardaki IFN- γ düzeyinde de düşmektedir.

V β 11 Düzeyleri

V β 11 düzeyleri açısından incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır. V β 11 düzeyleri, CD161 ve IFN- γ ile ($p>0.05$, $r=0.15$) ve $V\alpha 24$ düzeyleri ise V β 11 düzeyleri ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ($r=0.18$).

Sitotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Sitotoksik aktivite değerlendirilmesinde E:T oranlarını 1:25 ve 1:50 olarak belirlediğimiz çalışmamızda; 1:25'den 1:50'ye olan % değişim Grup 1'de $\%101 \pm 24$, Grup 2'de $\%109 \pm 22$, Grup 3'te $\%133 \pm 23$, sağlıklı kontrol grubunda ise $\%142 \pm 10$ olarak saptanmıştır (Grafik 4).

Tip 1 diyabet tam süresi 1 ay-1 yıl olan hastalarda (Grup 1), tip 1 diyabet tam süresi >1 yıl olan hastalarda (Grup 2) ve tip 1 diyabetik hastaların non-diyabetik 1. derece akrabalarında (Grup 3) sitotoksik aktivite incelendiğinde, her üç grupta da kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.05$). Sitotoksite değerleri

CD161 yüzey ekspresyonu ve hücre içi IFN- γ düzeyleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ($r=0.76$) saptanmış, CD161 ve IFN- γ düzeylerindeki artışa paralel olarak sitotoksik aktivite değerlerinde de bir artış gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Tip 1 diyabet, pankreas adacıklarında insülin üreten β hücrelerinin destrüksiyonu sonucu gelişen otoimmün bir hastalıktır. Bir veya daha fazla β hücre otoantijenlerine karşı T hücre aracılı otoimmün saldırı neticesinde Langerhans β hücreleri harabiyete uğratılmaktadır. (6, 7, 8, 10). Çalışmamız tip 1 diyabetikler, tip 1 diyabetli hastaların birinci derece non-diyabetik akrabaları ve sağlıklı kontrol grubunda yapılmıştır. Tip 1 diyabetli hastalar erken dönem (diyabet tam süresi 1 ay ile 1 yıl arasında olan) ve ileri dönem (diyabet süresi 1 yıldan fazla olan) olarak 2 grupta değerlendirilmiştir.

Tip 1 diyabetik hastaların serumunda adacık hücre antijenlerine karşı gelişmiş antikorların (ICA, anti-GAD) varlığı tamda belirleyicidir (12, 13, 14, 15, 16, 17). De Block ve ark. 171 tip 1 diyabetli hasta ile yaptıkları çalışmada ICA ve anti-GAD antikorlarını sırasıyla $\%46.2$ ve $\%64.9$ olarak saptamışlardır (19). Sera ve ark. ise, yeni tanı konmuş 73 tip 1 diyabet hastasında otoantikör prevalanslarını anti-GAD antikorları için $\%71$, ICA için ise $\%62$ oranında bulmuşlardır (20).

Tip 1 diyabetik hastaların NKT hücre seviyesi açısından bakıldığında literatürde birbiriyle çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bir kardeşi tip 1 diyabetik ikiz/üçüz kardeşlerde Wilson ve ark. mn yaptığı çalışmada tip 1 diyabetiklerin CD4 CD8- (double negative, DN) T hücrelerinde $V\alpha 24$ TCR pozitifliğini incelenmiştir. Araştırmacıların NKT hücrelerinin sayı ve fonksiyonca yetersiz olduğunu gösterdikleri çalışmada, ikiz/üçüz kardeşlerden tip 1 diyabetik kardeşin periferik kanında CD4- CD8- NKT hücre sayısının diyabetik olmayan kardeşine kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada IL-4 ve IFN- γ salınım açısından da tip 1 diyabetik kardeş ile diyabetik olmayan kardeş arasında farklılık gözlenmiştir. Diyabetik kardeşlerde sadece IFN- γ salınımına karşılık, diyabet gelişmemiş kardeşlerde IL-4 ve IFN- γ salınımı da gösterilmiştir (21). 54 tip 1 diyabetik ve bunların non-diyabetik birinci dereceden 12 akrabasını araştırdıkları bir çalışmada Kukreja ve ark. CD3 $^+$ V $\alpha 24^+$ V $\beta 11^+$ T hücrelerini incelemiş ve 31 yeni tanı konmuş tip 1 diyabetik hastada ve uzun dönem tip 1 diyabetiklerde NKT hücre sayısını kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptamışlardır ($p<0.0001$).

Benzer şekilde birinci dereceden akraba grubunda ICA pozitif olan 9 kişide de NKT hücre seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p<0.02$). Aynı çalışmada CD3+ ve CD4+ T hücre, IFN- γ salınımı incelendiğinde yeni teşhis ve uzun dönem tip 1 diyabetiklerde IFN- γ salınımı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük (sırasıyla; $p<0.02$ ve $p<0.03$), ICA pozitif akraba grubundaki 3 kişide IFN- γ salınımı kontrole göre anlamlı derecede düşük saptanırken, 4 kişide normal değerlerde bulunmuştur (22).

Tip 1 diyabetiklerin farklı dönemlerinde NKT hücrelerinde V α 24 seviyelerini incelediğimiz çalışmamızda; erken dönem tip 1 diyabetli grupta Grup 1 ve geç dönem tip 1 diyabet Grup 2'deki NKT hücreleri için spesifik anti-TCR monoklonal antikor, V α 24 seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.01$). Tip 1 diyabetli grup kendi arasında karşılaştırıldığında, diyabet süresi 1 yılın altında olan grupta anlamlılık saptanmasa da, V α 24 düzeyleri diyabet süresi daha uzun olan gruba göre daha düşük bulunmuştur. Non-diyabetik iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında, tip 1 diyabetli hastaların birinci derece yakınlarında kontrol grubuna göre V α 24 değerleri anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Çalışmamızda tip 1 diyabetin farklı klinik dönemlerindeki hastaların, non-diyabetik akraba ve sağlıklı kontrolün hücre içi IFN- γ düzeyleri incelendiğinde, tip 1 diyabetli grupta tanı süresi 1 ay-1 yıl arasında olan Grup 1, tanı süresi 1 yıldan fazla olan Grup 2 IFN- γ seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak saptanmıştır ($p<0.001$). Tip 1 diyabetli grup kendi arasında karşılaştırıldığında, diyabet süresi 1 yılın altında olan grupta anlamlılık saptanmasa da, IFN- γ düzeyleri diyabet süresi daha uzun olan gruba göre daha düşük bulunmuştur. Non-diyabetik iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında, tip 1 diyabetli hastaların birinci derece yakınlarında kontrol grubuna göre IFN- γ değerleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Sağlıklı bireylerdeki incelemelerinde Peter T. L. ve ark. TCR aktivasyonunda bir eş-uyaran (ko-stimülator) olan CD161 molekülünün, yüksek yoğunluk ve frekansta DN NKT altgrubu tarafından eksprese edildiğini ve CD56 molekülünün her iki altgrupta da pozitif olduğunu saptamışlardır (23). Çalışmamızda bir NK hücre belirteci olan ve NKT hücrelerinin çoğunluğunda eksprese edilen CD161 yüzey molekül ekspresyonu incelendiğinde, tip 1 diyabetli grupta Grup 1 ve Grup 2'deki diyabetikler, kontrole kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Tip 1 diyabetli grup kendi arasında karşılaştırıldığında, diyabet süresi 1 yılın altında olan grupta anlamlılık saptanmasa da,

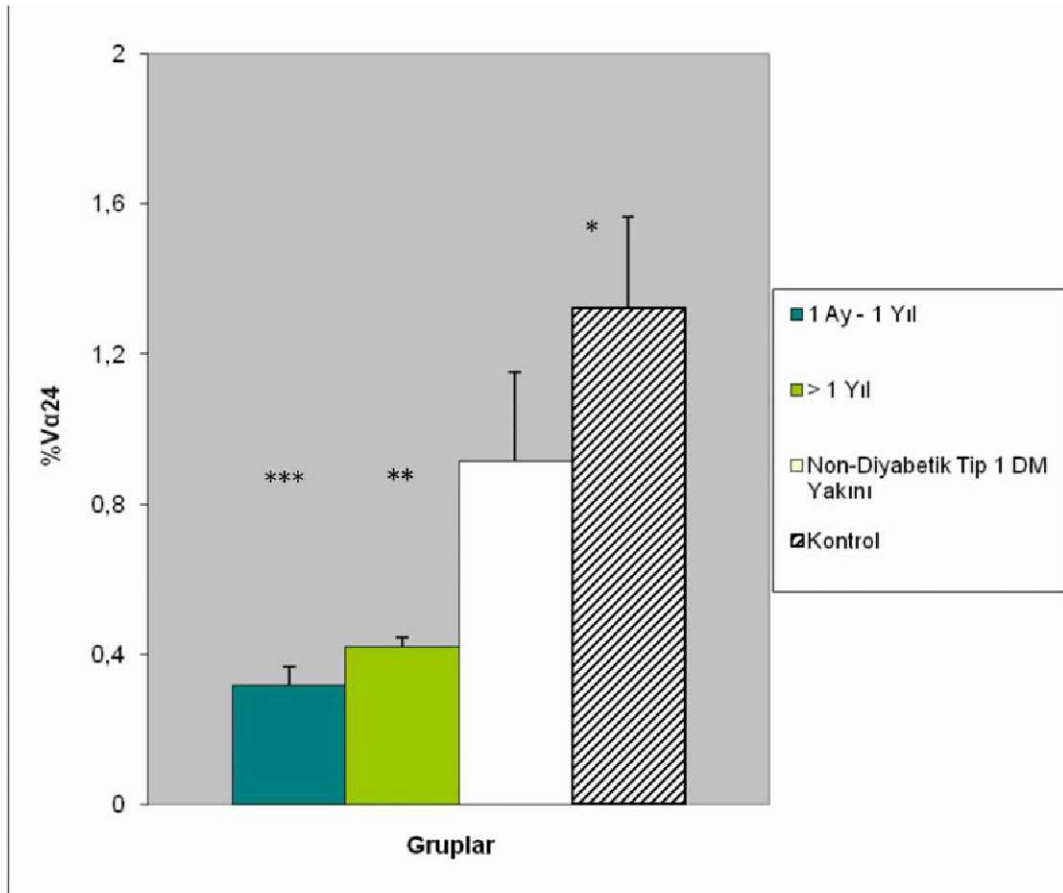
CD161 düzeyleri diyabet süresi daha uzun olan gruba göre daha düşük bulunmuştur. Non-diyabetik iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında, tip 1 diyabetli hastaların birinci derece yakınlarında kontrol grubuna göre CD161 değerleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları destekleyen yönde tip 1 diyabetli hastalarda NKT hücrelerindeki azalma ve hem NK hem de NKT hücrelerindeki defekte bağlı olarak gelişen IFN- γ salınımindaki düşüşle paralellik gösteren çalışmaların aksine çalışmalar da bulunmaktadır.

Çalışmamızda tip 1 diyabetik ve non-diyabetik gruplarda sitotoksik aktiviteyi değerlendirdiğimizde, Grup 1 ve Grup 2'de sitotoksik aktivite kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.01$). Tip 1 diyabetli grup kendi arasında karşılaştırıldığında, diyabet süresi 1 yılın altında olan grupta anlamlılık saptanmasa da, sitotoksik aktivite diyabet süresi daha uzun olan gruba göre daha düşük bulunmuştur. Non-diyabetik iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında, tip 1 diyabetli hastaların birinci derece yakınlarında kontrol grubuna göre sitotoksik aktivite anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). CD161 ekspresyonu ile hücre içi IFN- γ düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon bulduğumuz çalışmamızda bulgularımız, tip 1 diyabetin tam süresi azaldıkça NK ve NKT hücrelerindeki sitotoksik aktivite düşüşünü açıklamaktadır. Sonuç olarak, tip 1 diyabetli hastalarda NKT hücre sayısı ve fonksiyonları ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmakla birlikte bulgularımız, tip 1 diyabet patogenezinde NKT hücrelerinin önemini vurgulamaktadır. Çalışmamızda, tip 1 diyabetin erken döneminde saptanan NKT hücre sayısındaki düşüş, IFN- γ salınımı ve sitotoksik aktivite ile tip 1 diyabetin tam süresi ile korele olup, birinci yıldan itibaren otoimmün aktivitenin azalması ile de paralellik göstermektedir. Çalışmanın diğer önemli bir bulgusu da, non-diyabetik tip 1 diyabetiklerin birinci derecede akrabalarında non-diyabetik kontrol grubuna göre V α 24, IFN- γ , CD161 ve sitotoksitenin daha düşük bulunmasıdır. Bu da, tip 1 diyabetin patogenezinde genetik yapının önemini ve/veya hastalığın uzun süreli asemptomatik prelinik süreçten geçtiğini göstermektedir. Elde edilen bulgular NKT hücrelerinin prelinik ve erken klinik dönemdeki etkin rolünü kanıtlamaktadır. Bu çalışma ve yapılacak ileri çalışmalar NKT hücre sayısı ve fonksiyonlarının, tip 1 diyabette prelinik ya da klinik süreçte progresyon gösteren yeni bir belirteç olabileceği hususundaki umutlarımızı arttırmaktadır.

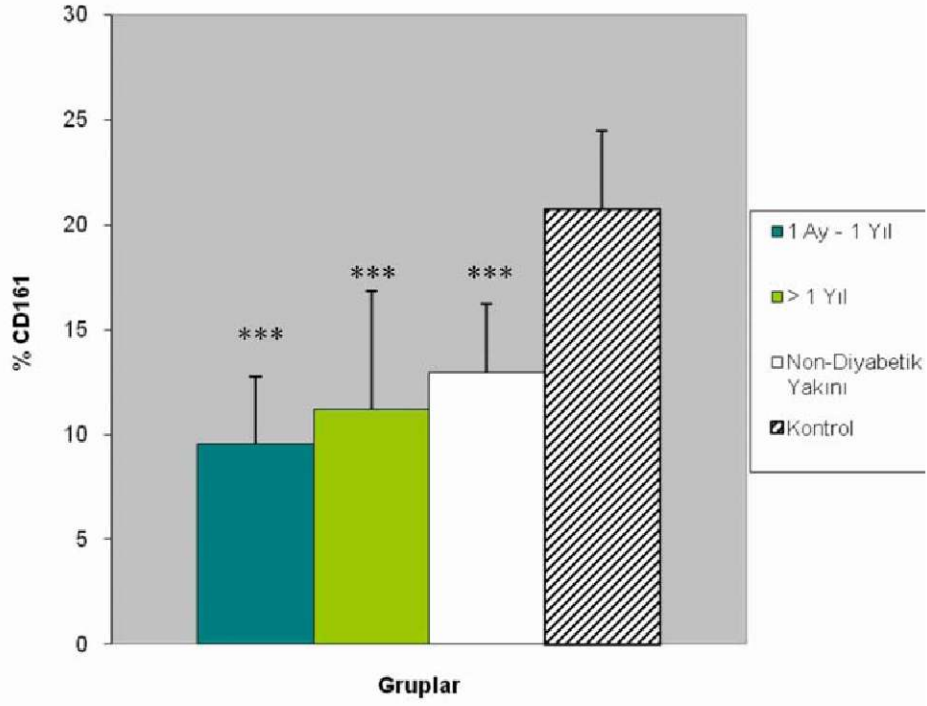
Tablo 1. PKMH yüzey molekül ekspresyonu tayininde kullanılan antikorlar

Monoklonal Ab	Spesifitesi	İzotip
CD161	NK ve NKT hücreler	IgG1
Anti-TCR V α 24	NKT hücreleri	IgG1
Anti-TCR V β 11	NKT hücreleri	IgG2a

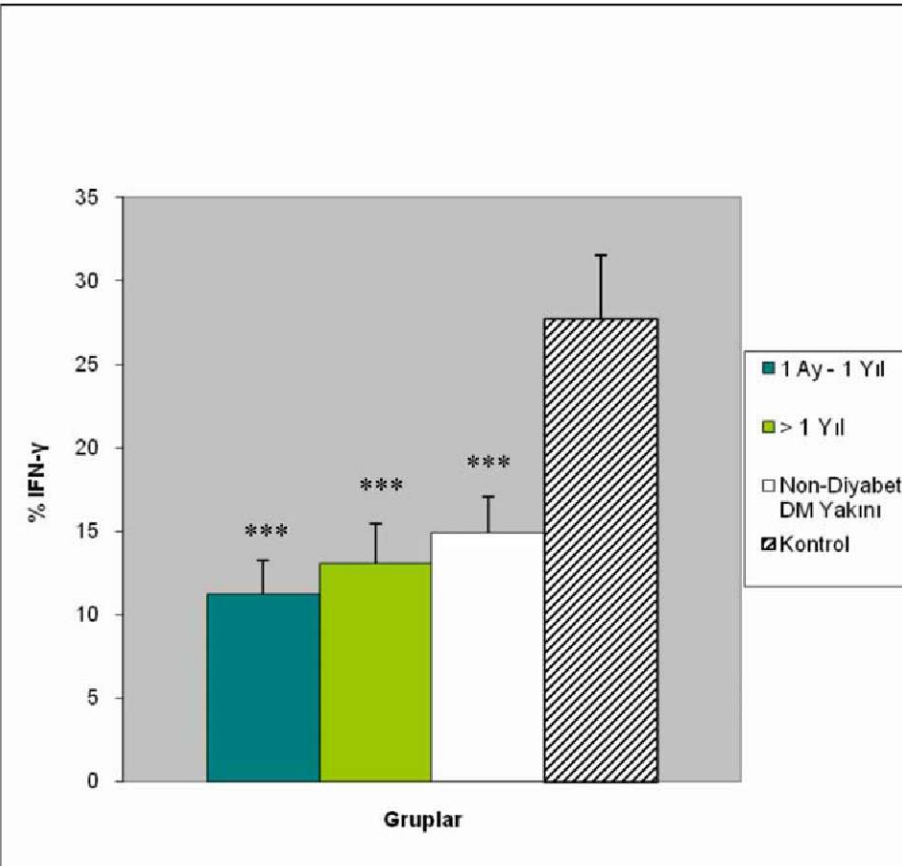


Grafik 1: Çalışma ve kontrol gruplarında V α 24 düzeyleri (%)

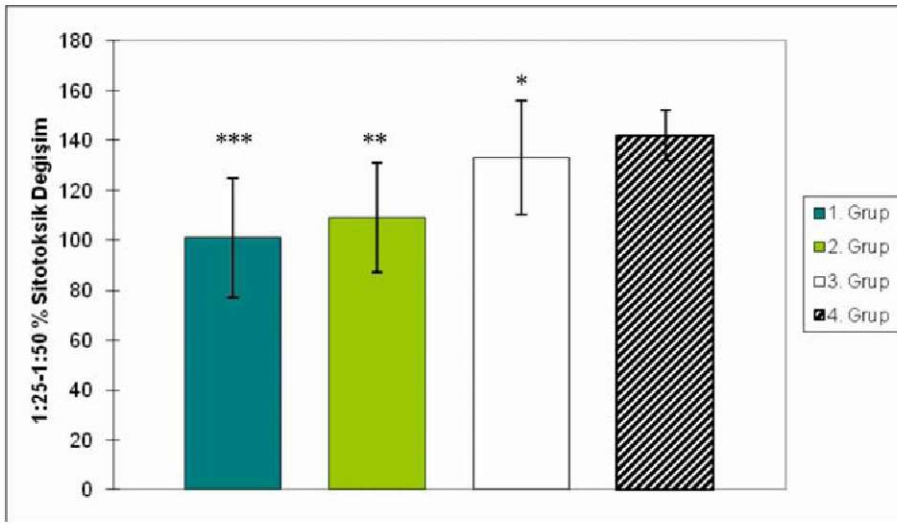
*p<0.05,
**p<0.01 ve
***p<0.001



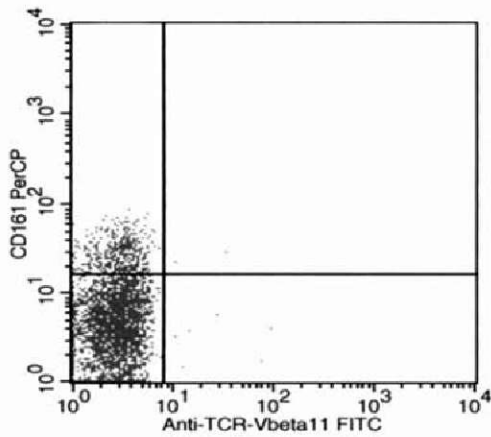
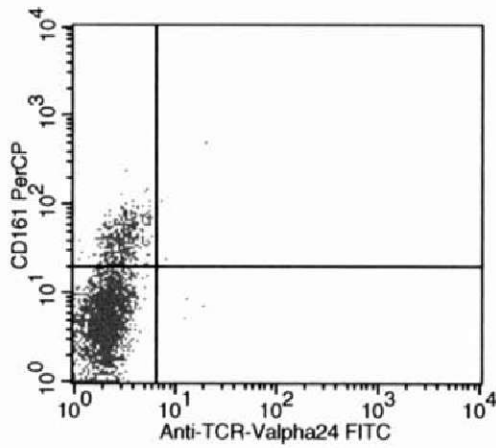
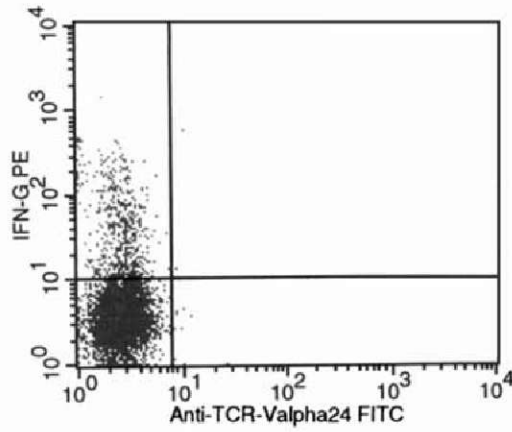
Grafik 2: Çalışma ve kontrol gruplarında CD161 düzeyleri (%)
 ***p<0.001



Grafik 3: Çalışma ve kontrol gruplarında IFN-γ düzeyleri (%)
 ***p<0.001



Grafik 4:
Gruplarda 1:25-1:50
% sitotoksik değişim
* $p < 0.05$,
** $p < 0.01$ ve
*** $p < 0.001$



Şekil 1: Grup 2' ye ait sitokin ve NKT hücre seviyeleri

KAYNAKLAR

1. Ou D, Metzger D, Wang X, Pozzilli P, Tingle A. β -Cell Antigen-Specific CD56+ NKT Cells From Type 1 Diabetic Patients: Autoaggressive Effector T Cells Damage Human CD56+ β Cells by HLA-Restricted and Non-HLA-Restricted Pathways. *Human Immunology* 2002; 63:256-270.
2. Lee M, Chang I, Kim S. Death effectors of β -cell apoptosis in type 1 diabetes. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004; 82-89
3. French A, Yokohama W. Natural Killer Cells and Autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:8-14.
4. Poulton L, Baxter A. Clinical application of NKT cell assays to the prediction of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17:429-435.
5. Hammond K, Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 2003; 15:683-689.
6. Falcone M, Sarvetnick N. Cytokines that Regulate Autoimmune Responses. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11:670-676.
7. Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of β cell damage. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2004; 27-32.
8. Hammer J, Sturniolo T, Sinigaglia F. HLA klas II peptide binding specificity and autoimmunity. *Advanced in Immunology* 1997; 66:67-100.
9. Sharif S, Arreaza G, Zucker P, Delovitch T. Regulatory Natural Killer T cells Protect against Spontaneous and Recurrent Type 1 Diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2002; 958:77-88.
10. Beyan H, Buckley L. R, Yousaf N, Londei M, Leslie R. D. G. A role for innate immunity in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19:89-100.
11. Sharif S, Arreaza G, Zucker P, Mi Q, Delovitch T. Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells. *J Mol Med* 2002; 80:290-300.
12. Tip 1 Diyabet Patogenezi, Klinik Özellikleri ve İzleme Ölçütleri, *Diabetes Mellitus 2000*: Prof. Dr. Candeğer Yılmaz Prof. Dr. M. Temel Yılmaz Prof. Dr. Şazi İmamoğlu. Gri Tasarım, İstanbul, 2000; 30-31.
13. Botazzo GF, Florin Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune poliendocrine deficiency. *Lancet* 1974; 1100-1103.
14. Srikanta S, Gonda OM, Rabizadch D, Soeldner JS, Eisenbarth ES. First degree relatives of patients with Type-1 diabetes mellitus islet antibodies and abnormal insulin secretion. *N Engl J Med* 1985; 313:461-464.
15. Daw K, Powers AC. Two distinct glutamic acid decarboxylase auto-antibody specificities in IDDM target different epitopes. *Diabetes* 1995; 44:216-220.
16. Yu I, Gianani R, Eisenbarth GS. Quantitation of glutamic acid decarboxylase autoantibody levels prospectively evaluated relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1995; 38:1353-1357.
17. Roll U, Ziegler AG. Combined antibody screening for improved prediction of IDDM-modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105:1-4.
18. Deniz G. Katil İnhibitör ve Aktivatör Reseptörler: Deniz G, Direskeneli SG (editörler). İmmünolojide Gelişmeler-IV. Erka Matbaa, İstanbul, 2004; 83-92.
19. De Block, De Leeuw IH, Roman RP, Winnock F, Van Gaal LF. Gastric parietal cell antibodies are associated with glutamic acid decarboxylase-65 antibodies and HLA DQA1* 0501-DQB1*0301 haplotype in Type 1 diabetes mellitus. *Belgian Diabetes Registry. Diab Med* 2000; 17:618-622.
20. Sera Y, Kawasaki E, Agabeyru N, Nagataki S, Matsuura N, Eguchi K. Autoantibodies to multiple islet autoantigens in patients with abrupt onset Type 1 diabetes and diabetes diagnosed with urinary glucose screening. *J Autoimmun* 1999; 13:257-265.
21. Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balb SP, Strominger JL, Hafler DA. Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes 1998; *Nature* 391:117-181.
22. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S. Multiple immuno-regulatory defects in type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 2002; 109:11-140.
23. Peter T L, Amy Putnam, Kamel Benlagha, Luc Teyton, Peter A Gottlieb and Albert Bendelac. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 2002; 110:793-800.