

T1378



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

+

**AKCİĞER TÜBERKÜLOZUNDA TGF-beta 1 VE
EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİNLERİNİN
GRANÜLOM YAPILANMASINDAKİ ROLÜ VE
ANTİTÜBERKÜLOZ TEDAVİ İLE İLİŞKİSİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Nural ÖREN

Tez Danışmanı : Doç.Dr.Gülay ÖZBİLİM

T1378/A-1

'Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 20 01.0103.02 Proje No ile Desteklenmiştir'

"Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir"

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ ANTALYA**

Antalya, 2002

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve becerilerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarıma, tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Gülay ÖZBİLİM'e, tezimin istatistiksel çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Dr. Hakan Gülkesen'e, immünohistokimyasal boyalarda büyük emek harcayan Uz. Biol. Nuran Keleş'e, diğer laboratuvar çalışanlarına ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim

Dr. Nural ÖREN
Antalya, 2002

İÇİNDEKİLER

Sayfa No :

Giriş ve Genel Bilgiler	1 - 21
Gereç ve Yöntem	22 - 27
Bulgular	28 - 58
Tartışma	59 - 73
Sonuçlar	74 - 76
Özet	77 - 78
Kaynaklar	79 - 94

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Tarihçe:

Tüberküloz, insanlık tarihinde, tanımlanan en eski hastalıklardan birisidir¹. Bu hastalığın geçmişteki varlığına ait ilk bulgular insan evriminin Neolitik Dönemine (M.Ö. 5000) kadar uzanmaktadır^{1,2}. Bu döneme ait insan iskeletlerinde Pott Hastalığına dair belirtilerin varlığı gözlenmiştir^{1,2}. Benzer bulgular firavunlara ait eski Mısır mumyalarında da saptanmıştır. Mumyalar üzerinde yapılan çalışmalarda, lezyonlardan alınan doku parçalarında “Polymerase chain reaction” (PCR) yöntemi ile Mycobacteriumlara ait DNA parçalarının varlığı gösterilmiştir^{3,4}. Ayrıca, eski Mısırda tedavi amacıyla kurulmuş sanatoryumların varlığını düşündüren bazı bulgular da vardır¹. Tüberkülozun semptomatolojisini ilk tanımlayan Hippocrates’tir^{1,5}. Tüberküloz basilinin varlığını gösteren ve onu ilk tanımlayan ise Robert Koch’tur^{1,5}. Tüberküloz Avrupa’da onyedinci yüzyıldan ondokuzuncu yüzyılın erken dönemlerine kadar olan süreçte büyük bir yayılım göstermiştir ve bu dönemde “Büyük Beyaz Veba” olarak anılmıştır¹. 1944 yılında Waksman tarafından streptomisin’in bulunması, bunu takip eden yıllarda diğer antibiyotiklerin keşfedilmesi ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesi ile birlikte “Büyük Beyaz Veba”nın insanlık için korkulacak bir hastalık olmaktan çıkarılması ve hatta tamamen yok edilmesi umutları belirdi⁶. Ancak, toplumlardaki sosyal koşulların düzeltilmemesi, “Human immunodeficiency virus” (HIV) enfeksiyonunun yaygınlaşması ve antitüberküloz ilaçlara dirençli basillerin ortaya çıkması gibi nedenlerle son birkaç onyılda tüberküloz olgularında belirgin bir artış gözlemlendi^{5,6,7}. Tüberküloz hastalığı günümüzde enfeksiyon hastalıklarına

bağlı ölüm sebepleri arasında ilk sırayı almaktadır. Dünya insan popülasyonunun yaklaşık yarısının "Mycobacterium tuberculosis" ile enfekte olduğu; her yıl 10 milyon hastalık belirtisi taşıyan yeni olgunun ortaya çıktığı ve her yıl 3 milyon kişinin bu hastalık nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir^{1,8}.

Mycobacteriumların Genel Özellikleri:

Mycobacterium grubu bakteriler aerobik, sporsuz, hareketsiz basillerdir⁹. Biyolojik, biyokimyasal ve genetik yapılarına göre 60' tan fazla türü tanımlanmıştır¹⁰. Enfeksiyon oluşturabilme özellikleri de dikkate alındığında 3 kategoride toplanabilirler¹¹:

- 1) ***Mycobacterium tuberculosis kompleksi***: Bu grupta *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum* ve *M.microti* yer alır. *M.tuberculosis*, hasta kişilerin öksürmesi sonucu oluşan enfekte damlacıkların solunması ile bulaşır ve en çok akciğerde enfeksiyon oluşturur. *M.bovis* ise hastalıklı hayvanların sütlerinin içilmesi ile bulaşır ve ilk olarak intestinal ve tonsiller lezyonlara yolaçar⁹. *M.microti* ile oluşmuş az sayıda hastalıklı olgu bildirilmiştir ve Hollanda ile İngiltere başta olmak üzere coğrafi bir bölgede sınırlıdır¹². *M. Africanum* ilk olarak maymunlardan izole edilmiştir¹³. Özellikle Afrika kıtasının bazı bölgelerinde saptanmıştır ve biyokimyasal olarak birçok farklı yapıda olabildiği belirlenmiştir¹⁴. *M.africanum*un biokimyasal yapısı ve kültürde üreme özellikleri dikkate alındığında *M. Tuberculosis* ile *M bovis* arasında bir tür olarak kabul edilmektedir¹⁵.
- 2) ***Nontüberküloz mycobacterler***: Bu gruptaki bakteriler, fırsatçı patojendirler ve AIDS gibi immunosupressif hastalıklarda enfeksiyon oluştururlar. Bu grupta *M.avium* kompleksi (*M.avium* ve *M.intracellulare*) ve *M.kansashii* yer alır¹¹.

3) *Lepra etkeni (M.leprae)*: Deri ve periferik sinirler tutan, deformitelere yol açan kronik ve ilerleyici bir hastalık oluşturur. Düşük oranda bulaşıcılık riski taşır ve günümüzde daha çok tropikal bölgelerde endemik olarak görülmektedir,^{9,11}

*M. tuberculosis*in patojenitesinde bakterinin duvarında bulunan bazı moleküllerin önemli rolleri vardır⁹. Hücre duvarında içerdiği lipit yapılar (glikolipitler ve fosfolipitler) bakterinin hidrofobik bir özellik taşımasını ve aside dirençli olmasını sağlarlar; ayrıca enfeksiyon oluşumunun ilk basamağında bu yüzey molekülleri konakçı hücreleri ile ilk kontağı kurarlar¹⁶.

*M. tuberculosis*in hücre duvarında bulunan, patogenezle ilgili bazı yapılar şunlardır:

1) **Cord faktörü** : Bir yüzey glikolipitidir ve in vitro ortamda *M. tuberculosis*in serpentin kordlar halinde üremesine neden olur⁹. Hayvan deneylerinde cord faktörünün öldürücü biçimde toksik etkisi, granülom oluşturuucu etkisi, adjuvan aktivitesi, tümör baskılayıcı ve nonspesifik enfeksiyonları önleyici etkileri olduğu gösterilmiştir¹⁶.

Farelere enjeksiyonu granümatöz tarzda yangısal bir yanıt oluşumuna neden olur ve oluşan granülom hem yabancı cisim (nonimmün) hem de hipersensitivite (immün) tipinde olabilir¹⁷. Ratların kornealarına enjekte edildiğinde, neovaskülarizasyona yolaçtığı ve sonra da granülom oluşumuna neden olduğu izlenmiştir¹⁸. Tavşanlarda kilo kaybı, karaciğer ve akciğerde granülom oluşumu, timus ve dalakta ise atrofi oluşturduğu bildirilmiştir¹⁹.

Farelerde in vivo ortamda; interlökin 1 (IL-1), interferon gamma(IFN-gamma), tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa), granüosit makrofaj-koloni stimüle edici faktör(GM-CSF), in vitro ortamda ise;

TNF-alfa, GM-CSF, kemotaktik faktör, kompleman, nitrik oksid (NO), prostoglandin E-2(PGE-2) indüksiyonu ve proteinaz kinaz C aktivasyonu oluşturduğu gösterilmiştir¹⁶.

Farelerin periton boşluğuna enjeksiyonu ile peritoneal makrofajların lizozomal enzimlerinin aktivasyonuna ve fagositoz yapıcı etkilerinin artmasına neden olduğu belirtilmiştir²⁰.

- 2) **Lipoarabinomannan(LAM)** : Gram negatif bakterilerin endotoksinine benzer yapıda bir heteropolisakkarittir. Makrofajların IFN-gamma tarafından aktivasyonunu engeller; makrofajlardan TNF-alfa salınımını uyarır ve bunun sonucu olarak ateş, kilo kaybı ve doku hasarı oluşumuna yolaçar; makrofajlardan interlökin-10(IL-10) salınımını artırır ve bu da Mycobacterlerin uyardığı T hücre çoğalmasını baskılar^{9,21}. LAM, makrofajların aktivasyonunu baskılayarak bakterilerin fagositoz yapan hücrelerin içinde yaşamasını sağlayan bir “virülans faktörü” olarak rol oynar²².
- 3) **Kompleman** : Mycobakterlerin yüzeyinde aktive olarak organizmayı opsonize eder ve makrofaj kompleman reseptörü CR 3 (Mac-1 integrin) tarafından alınımını kolaylaştırır⁹.
- 4) **M.tuberculosis ısı-şok proteini**: İnsan ısı-şok proteinleri ile aynı yapıdadır ve M.tuberculosis tarafından uyarılan otoimmün reaksiyonlarda rol aldığı düşünülmektedir⁹. Ratlarda Mycobacterial kökenli 65 kD(kilodalton) ısı-şok proteininin artrit oluşturduğu gösterilmiştir²³.

AKCİĞER TÜBERKÜLOZU

Pulmoner enfeksiyon tüberkülozun en sık görülen şekli ve en çok ölüme neden olanıdır. Klinik olarak primer ve sekonder akciğer tüberkülozundan söz edilmektedir.

Primer akciğer tüberkülozu: Klinik olarak primer odağın başlangıç odağı Ghon kompleksi olarak adlandırılır. Ghon kompleksi, genellikle üst ve alt akciğer loblarının birleşim yerinde, subplevral parankimal bir odak ve bunun direne olduğu hilus yerleşimli kazeöz lenf nodlarından oluşur. Primer enfeksiyon genellikle asemptomatik seyreder ve çoğunda fibrozis ve kalsifikasyon gelişir.

Sekonder akciğer tüberkülozu: Bazı hastalarda mycobacterler ile yeniden enfeksiyon gelişmesi; durağan hastalığın alevlenmesi veya primer hastalıktan doğrudan yaygın hastalığa geçiş görülebilir. Sekonder akciğer tüberkülozunda granülomlar genellikle bir veya her iki akciğerin apeksinde yerleşirler.

İlerleyici akciğer tüberkülozu: Aylar veya yıllarca sürebilen latent lezyonların aktivasyonu sonucunda kaviter fibrokazeöz tüberküloz, milier tüberküloz veya tüberküloz pnömonisi oluşabilir⁹.

Latent enfeksiyonun aktivasyonu immün sistemi normal kişilerde %5'ten daha az sıklıkta izlenir²⁴.

Akciğer Tüberkülozunun Patogenezi

Akciğer tüberkülozu, tüberküloz basili ile enfekte partiküllerin solunması ile başlamaktadır. Bu aşamada etkili olan bazı etmenler vardır²⁵:

1) **Enfeksiyöz partiküllerin büyüklüğü:** İn hale edilen enfeksiyöz partiküllerden sadece 1 ile 3 basil içeren, küçük boyutlu olanlar alveol boşluklarına ulaşabilirler; daha büyük boyutlular ise nazofarinkste veya

bronşiyal sistemin herhangi bir yerinde takılarak silier hareket ve öksürük yardımıyla uzaklaştırılırlar.

- 2) ***İnhale edilen basilin virulansı:*** Tüberküloz basillerinin virulansı genetik ve fenotipik yapılarına göre birbirlerinden farklıdır. Ayrıca basilin kuru ortama ve güneş ışığına maruz kalması da enfeksiyon oluşturabilme gücünü azaltır. Nemli ve karanlık ortamlarda kalan basillerin ise enfeksiyon oluşturabilme gücü daha fazladır.
- 3) ***İnhale edilen basil miktarı:*** Solunan partikül miktarı ve dolayısıyla basil miktarı ne kadar fazla olursa, fenotipik olarak enfeksiyon oluşturabilme kapasitesi güçlü basiller ile karşılaşma olasılığı da o kadar yüksek olacaktır.
- 4) ***Alveoler makrofajların basili öldürebilme kapasitesi:*** Alveoler makrofajların tüberküloz basilini öldürebilme güçleri değişkendir. Bazı alveoler makrofajlar daha fazla enzim ve mikrobisidin içerirler.

Alveollere ulaşan basiller, alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Makrofajlar, basilleri öldürebilirler veya bakteri makrofajlar içinde çoğalmasını sürdürür. Alveoler makrofajların bakterinin çoğalmasını engelleme kapasitesi sınırlıdır ve enfeksiyonun kontrol altına alınması için CD4 T lenfositler tarafından alveoler makrofajların immun aktivasyonu gereklidir. Alveoler makrofajların yanısıra dolaşımdaki monositlerden köken alan makrofajlar da bu alana gelirler. Makrofajların parçalanması ile açığa çıkan basiller, hücre artıkları, kompleman 5a (C5a) gibi kemotaktik faktörler makrofajların bu alanda birikmesine neden olurlar. Tüberkülozun bu erken döneminde hücre ölümü ve doku nekrozu oldukça azdır. 2-4 hafta sonra immün yanıt tam olarak gelişir. Oluşan immün yanıt hücre aracılı immünite ve gecikmiş tipte hipersensitivitedir²⁵.

Gecikmiş tipte hipersensitivitenin klasik örneği tüberkülin reaksiyonudur. Daha önce tüberküloza karşı duyarlılanmış kişilerde

tüberküloz basilinin protein-lipopolisakkarit yapılı bir komponentinin cilt içine enjeksiyonundan 8-12 saat sonra gelişen ve 24.-72. saatlerde en üst düzeyine ulaşan, ciltte kızarıklık, kabarıklık ve sertleşme içeren bir alan oluşumu ile belirlenen bir reaksiyondur. Morfolojik olarak granüloamatöz bir yangı gelişimi karakteristiktir.

Tüberküloz basili ile ilk karşılaşmada CD4 T lenfositler bakteriye karşı duyarlıdır ve basili tanıyabilmeleri için makrofajların yüzeyindeki class II moleküller ile ilişki kurmaları; bir başka deyişle bakterinin makrofajlar tarafından bu lenfositlere "sunulması" gerekir. Bu ilk karşılaşma sonucunda, CD4 T hücreler basile karşı duyarlılanarak T helper1 (TH₁) hücrelere dönüşürler. Bu duyarlı hücreler kan dolaşımına dönerler ve yıllarca T hücre hafıza havuzunda kalırlar. Tüberküloz basili ile tekrar karşılaşıldığında veya tüberkülin testi uygulandığında duyarlı TH₁ hücreler antijen sunan hücrelerle ilişki kurarak blast formuna dönüşürler ve proliferere olurlar. Bu olaylar sırasında TH₁ hücrelerden salınan sitokinler gecikmiş tipte hipersensitivitenin oluşumunda ve tüberküloza karşı oluşan hücresel immün yanıtta önemli roller oynarlar⁹. Bu sitokinlerden bazıları şunlardır:

İnterlökin 12 (IL-12): IL12, ilk bulunduğu natural killer (NK) hücreleri uyarıcı etkisi nedeniyle, natural killer stimüle edici faktör (NKSF) olarak isimlendirilmiştir²⁶. 2 subünitten oluşan heterodimerik bir proteindir ve intrasellüler bakteriyel, fungal, viral ve parazitik patojenlere karşı koruyucu immün yanıtta önemli bir rolü vardır^{27,28,29,30,31,32}. Primer olarak monosit/makrofajlar, polimorfonükleer nötrofiller ve dendritik hücreler tarafından enfeksiyöz bir ajanla karşılaşıldığında üretilir^{33,34,35}.

IL12, TH₁ yanıtının uyarılmasında; dolayısıyla gecikmiş tip hipersensitivitenin gelişiminde ilk basamakta yer alarak kritik bir rol oynar. Bakteri ile ilk karşılaşmada makrofajlar bakteriyi fagosite ederler ancak

organizmayı öldürebilme yetenekleri sınırlıdır. Tüberküloz basilinin fagositozu makrofajlarda IL12 üretimi ve salınımı için güçlü bir uyarıcı etki oluşturur^{29,36}. Salgılanan IL12, duyarsız CD4 helper (TH₀) hücreleri, duyarlı TH₁ hücrelere dönüştürür.

IL12 salınımı, negatif ve pozitif feedback mekanizmaları ile sıkı bir biçimde düzenlenir²⁸.

IL12'nin diğer önemli bir etkisi de T hücreleri ve NK hücrelerden IFN-gamma üretim ve salınımını uyarmasıdır³⁷. Bu etki, gecikmiş tipte hipersensitivitenin sonraki basamaklarının devamı için gereklidir.

İnterferon gamma (IFN-gamma): Gecikmiş tipte hipersensitivitede farklı etkileri olan önemli bir mediatördür. Makrofajların IL12 salınımını artırıcı yönde güçlü etkisi vardır²⁷. Uyarılan makrofajların bakteriyi fagosite etme ve öldürme gücünü artırır^{38,39}. Makrofajların yüzeylerindeki class II moleküllerin ekspresyonunu fazlalaştırır ve antijen sunumlarını kolaylaştırır⁴⁰. Platelet kökenli growth faktör (PDGF), transforming growth faktör-beta (TGF-beta) gibi polipeptid yapılı büyüme faktörlerinin salınımını gerçekleştirir⁹. IFN-gammanın makrofajların öldürücü etkisini artırması nedeniyle, tüberküloz tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür⁴¹.

Makrofajların, granülom yapısının temellerinden olan epiteloid hücrelere ve mültinükleer dev hücrelere dönüşmesinde, IFN-gammanın önemli bir rolü vardır⁹. Bu nedenle granülomatöz yangının gelişmesinde ve devamlılığının sağlanmasında ana mediatörlerden birisi ve belki de en önemlisidir.

İnterlökin-2 (IL-2):IL-2 T lenfositlerden salgılanır ve Th hücrelerinin otokrin ve parakrin yolla proliferasyonunu artırır⁹. Tüberküloz enfeksiyonu sırasında, NK hücrelerin tüberküloz basilini öldürücü etkilerini artırır^{42,43}.

IFN-gamma salınımını uyarır ve makrofajların mikrobisidal aktivitesini güçlendirir⁴⁴.

Mycobacterial antijenlere duyarsızlık gösteren olgularda, IL-2'nin defektif oluşunun etkili olduğunu düşündüren çalışmalar vardır⁴⁵.

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF-alfa): TNF-alfa, endotel hücrelerini etkileyerek prostasiklin salınımını uyararak vazodilatasyon oluşumuna katkıda bulunur; E-selektin ekspresyonunu artırarak lenfosit ve monositlerin adezyon yeteneğini güçlendirir; IL-8 gibi düşük molekül ağırlıklı kemotaktik faktörlerin salınımını artırır. Tüm bunların sonucu olarak; lenfosit ve monositlerin damar dışına çıkışını kolaylaştırır⁹.

BCG enfeksiyonu ile granülom oluşumunda ve granülomun devamlılığının sağlanmasında, otokrin ve parakrin etkilerle, merkezi bir rol oynadığı belirtilmiştir^{46,47}.

DeneySEL çalışmalarda, makrofajlar içinde M. Avium intracellulare kompleksinin çoğalmasını azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir^{48,49,50}.

GranüloMatöz Yangı

GranüloMatöz yangının tipik örneği, tüberküloz enfeksiyonudur; ancak, sarkoidozis, kedi tırnağı hastalığı, lenfogramüloma inguinale, lepra, brusella, sifiliz, bazı mikotik enfeksiyonlarda da granüloMatöz yangı oluşur. GranüloMatöz yangısal yanıt gelişmesi için temel koşul, yangıya neden olan ajanın kolayca parçalanıp yokedilemez olmasıdır. Granülom, yabancı cisim tipi ve immün granülom olmak üzere 2 tiptir. Tüberkülozda oluşan, immün granülomdur ve hücre aracılı immün yanıtın bir sonucudur. Morfolojik olarak, tüberküloz granülomunda, orta kısmında kazeifikasyon nekrozu, çevresinde makrofajların transformasyonu ile oluşan epiteloid hücreler, Langhans tipi dev hücreler, çoğunluğu lenfositler olan mononükleer yangı hücreleri ve özellikle daha eski granüloMatlarda daha

yoğun olmak üzere, granulomu çevreleyen bağ dokusu ve fibroblastlar bulunur⁹.

Granülomun yapısı, durağan bir yapı değildir; oluşumunda ve devamlılığında sitokinlerin etkileri önemlidir⁵¹.

M tuberculosis'in duvarında bulunan, muramil dipeptid ve dallı yağ asidleri gibi bazı maddelerin granümatöz bir yanıt oluşumunda etkili oldukları belirtilmiştir^{52,53}.

Granümatöz yanıtın yeterliliği ve granülomların yapılarının düzenli oluşu hastaların iyi prognoz göstermesi açısından önemlidir. Jean François Emile ve arkadaşları tarafından, BCG uygulanması ile tüberküloz enfeksiyonu gelişen çocuk hastalarda, oluşan granülomların düzenli yapıda oluşunun iyi prognozla paralel olduğu gösterilmiştir⁵⁴.

TGF-beta1, ilk olarak in vitro ortamda normal rodent fibroblastları üzerine transforme edici etkisi gösterilerek tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. TGF-beta1'in tanımlanmasından sonra, moleküler yapıları TGF-beta1'e benzeyen birçok molekül bulunmuş ve geniş bir TGF grubu tanımlanmıştır⁵⁵.

Biyolojik olarak aktif TGF-beta1, birbirine sistein-sistein disülfid bağı ile bağlı iki adet birbirine eş 12.5 kD monomerden oluşmuş 25 kD'luk homodimerik bir moleküldür⁵⁵.

TGF-beta1, genellikle hücrelerden inaktif (latent) formda salgılanır ve pH değişimleri, farklı ajanların etkisi, özellikle de plazmin gibi moleküller tarafından aktif formuna dönüştürülür⁵⁵.

TGF-beta1, plateletler, endotel hücreleri, lenfositler ve makrofajları da içeren birçok hücre tarafından üretilir ve salgılanır⁹.

TGF-beta 1'in Etkileri

TGF-beta grubunun, hücre proliferasyonu, hücre diferansiasyonu, ECM'in yapılanması, yara iyileşmesi ve immün olaylar gibi birçok konuda farklı etkileri vardır.

Hücre Proliferasyonuna Etkileri

TGF-beta'nın hem hücre kültürü ortamında ve hem de in vivo olarak hücre çoğalmasının yönlendirilmesinde etkin olduğunu gösteren birçok kanıt vardır. TGF-beta'nın fibroblastlar ve osteoblastlar gibi mezankimal kökenli hücreler üzerine mitojenik etkisi vardır^{55,56}. Buna karşın, TGF-beta epitelyal kökenli hücreler için güçlü bir büyümeyi baskılayıcı etkendir ve bu yönde etkisi olan "büyüme baskılayıcıları" arasında en etkin olanıdır^{55,57}.

TGF-beta'nın mitojenik etkileri bazı embriyonal hücre tiplerinde de gösterilmiştir⁵⁸. Ancak bu etki kültür ortamındaki değişikliklere ve hücrelerin kökenine bağlı olarak zıt yönde olabilmektedir⁵⁹.

Hücre Diferansiyasyonuna Etkileri

Primitif prekürsör hücrelerin matür hücrelere dönüşüm süreci, hücre fizyolojisinde önemli bir kontrol noktasıdır ve bazı neoplazilerin gelişiminde bu diferansiasyon sürecindeki duraklamanın rol oynadığı düşünülmektedir. TGF-beta'nın bu sürecin yönlendirilmesinde önemli etkileri vardır⁵⁵.

Birçok mezankimal kökenli hücrenin diferansiasyonunda, TGF-beta etkili bir düzenleyicidir⁵⁵. TGF-beta'nın fare preadipositlerinin olgun adipositlere dönüşümünü mitozu baskılamadan engellediği; yine aynı şekilde, hücrelerin proliferasyonunu engellemeden embriyonik miyoblastların miyositlere farklılaşmasını durdurduğu gösterilmiştir^{60,61,62}.

TGF-beta'nın embriyonik kalp organogenezinde ve akciğerin epitelyal diferansiasyonunda önemli etkileri vardır^{55,63}.

TGF-beta ve ECM Yapılanmasının Düzenlenmesi

ECM, hücreler için sadece durağan ve basit bir destek görevi gören bir yapı değildir; normal hücre fizyolojisinin devamlılığında ve hatta embriyonik ve neoplastik yapılanmada belirgin etkileri vardır.

TGF-beta, ECM'nin düzenlenmesinde yoğun etkileri olduğu bilinen en önemli etmenlerden birisidir. TGF-beta'nın ECM'e etkileri;

- 1) Matriksi oluşturan yapıların ekspresyonunu direkt olarak stimüle etmek
- 2) ECM'i yıkan proteaz düzeylerini azaltmak ve proteaz inhibitörlerini uyarmak yönündedir⁵⁵.

İnsan embriyonik akciğer fibroblast kültür ortamında, TGF-beta varlığında, Tip 1 ve Tip 3 kollajen üretiminin arttığı; fibronektin ve fibronektin reseptörü ekspresyonunun çoğaldığı belirtilmiştir^{64,65,66}.

TGF-beta 1'in doku fibroblastlarında, kollajen Tip 1 ve Tip 4 üretimini artıran en önemli düzenleyici mediatör olduğu gösterilmiştir⁶⁷.

TGF-beta 1'in mezankimal ve epitelyal hücrelerden kondroitin/dermatansülfat proteoglikanlarının ekspresyonunu ve ortama salınmasını artırır⁶⁸. Akciğer Tip II pnömositleri üzerinde de bu yönde etkileri olduğu bilinmektedir⁶⁹. Akciğer Tip II pnömositler üzerindeki diğer bir etkisi de fibronektin ekspresyonunu artırmasıdır⁷⁰.

Bleomisin ile deneysel olarak oluşturulan akciğer fibrozisinde, TGF-beta'nın fibrozisi uyaran temel etken olduğu belirtilmiş ve TGF-beta'nın miyofibroblastlar, fibroblastlar ve eozinofillerce üretildiği saptanmıştır⁷¹.

TGF-beta 1'in karaciğer fibrozisini uyarıcı etkileri olduğu; miyokard enfarktüsü sonrası gelişen fibrozis sırasında kollajen düzenlenmesini

sağladığı; progressif muskuler distrofide ECM sentezi ve birikimini arttırdığı; pulmoner adenokarsinomda santral fibrozis gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir^{72,73,74,75}.

TGF-beta ve Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, oldukça düzenli bir süreçtir ve inflamasyon, hücre proliferasyonu ve migrasyonu, anjioneogenez ve ECM proteinlerinin üretimini içerir⁷⁶.

TGF-beta 1 yara iyileşmesinde merkezi bir rol oynar. Yara iyileşmesi sırasında makrofajlar, fibroblastlar, keratinositler ve endotel hücreleri TGF-beta üretirler; ancak, özellikle yaralanmanın erken döneminde biriken plateletler TGF-beta'nın temel kaynağıdır⁷⁶.

TGF-beta'nın, yara iyileşmesi sırasında, yangı hücrelerinin kemotaksisi, anjioneogenez, ECM birikimi ve granülasyon dokusu oluşumu ve reepitelizasyon gelişmesi olaylarında önemli katkıları vardır^{77,78,79}.

Yara iyileşmesi esnasında, TGF-beta 1, fibroblastlardaki alfa düz kas aktinini artırıcı yönde etki ederek fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümüne katkıda bulunur⁸⁰.

TGF-beta 1'in, hipertrofik skar ve keloid oluşumu gibi anormal yara iyileşmesi olaylarına da katıldığı belirlenmiştir⁸¹.

TGF-beta 1 ve İmmün Sistem İlişkisi

TGF-beta 1'in immün sistem üzerinde baskılayıcı yönde etkileri olduğunu gösteren birçok kanıt vardır.

Kültür ortamında, TGF-beta 1'in T hücre reseptörü (TCR) ve IL-2 reseptörü aracılı tirozin fosforilasyonu ve retinoblastom proteininin fosforilasyonunu baskılayarak T lenfositlerin proliferasyonunu engellediği

bildirilmiştir⁸². Buna paralel bir başka çalışmada ise TGF-beta 1'in T hücrelerin DNA üretimini baskıladığı gösterilmiştir⁸³.

HIV ile enfekte kişilerde, sağlıklı kişilere göre periferal kan monositlerinde TGF-beta miktarının artmış olduğu ve bu artışın PPD'ye karşı oluşan yetersiz CD4+ lenfosit yanıtı ile korele olduğu belirlenmiştir. TGF-beta'yı nötralize edici antikorlarla T hücre yanıtının tekrar sağlandığı gösterilmiştir ve TGF-beta'nın HIV enfeksiyonunda görülen yetersiz immün yanıtın ve CD4+ lenfosit azlığından sorumlu olabileceği belirtilmiştir⁸⁴.

Kültür ortamında TGF-beta 1'in lenfokinler tarafından aktive edilen killer hücrelerin aktivitesini doza bağımlı biçimde baskıladığı ve bu baskılayıcı etkinin TNF alfa ile tersine çevrildiği saptanmıştır⁸⁵. Buna benzer bir çalışmada TGF-beta'nın lenfokinlerce aktive edilmiş killer hücrelerin yanı sıra sitotoksik T lenfositlerin de çoğalmasını azalttığı belirlenmiştir⁸⁶.

TGF-beta'nın, sitotoksik T lenfositlerin proliferasyonunu baskıladığı ancak aktivitesini değiştirmediğini ileri süren çalışmacılar da vardır⁸⁷.

Bazı tümör hücreleri tarafından üretilen TGF-beta'nın T hücreleri ve özellikle de T helper hücreleri üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiş ve bunun bazı tümörlerdeki CD4+ T helper hücrelerine özel supresyonu açıklayabileceği belirtilmiştir⁸⁸.

İn vitro ortamda TGF-beta'nın T helper hücrelerinin T helper 1 hücrelerine dönüşümünü engellediği de saptanmıştır⁸⁹.

TGF-beta'nın CD3- large granüler lenfosit fonksiyonlarını, olasılıkla tirozin fosforilasyonunu ve IL2 tarafından uyarılan transkripsiyonel kontrol faktörlerini inhibe ederek baskıladığı gözlenmiştir⁹⁰.

TGF-beta'nın, B lenfositler ve timositler üzerinde de proliferasyonu engelleyici yönde etkileri olduğu hücre kültürü ortamlarında yapılan çalışmalarla belirlenmiştir^{91,92}.

Tüberküloz ve TGF-beta İlişkisi

Tüberküloz basilinin hücre duvarına ait bazı yapıların monosit ve makrofajlarda TGF-beta üretimini artırdığına dair birçok kanıt vardır. Ayrıca tüberkülozlu hastalarda TGF-beta düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir^{93,94}.

Sağlıklı bireylerden elde edilen periferik kan monosit kültür ortamında, *M.tuberculosis*'e ait PPD'nin, monositlerde TGF-beta1 üretimini artırdığı Zahra Toossi ve arkadaşları tarafından saptanmıştır. Aynı çalışmada, *M.bovis* ait 64 kD ısı-şok proteininin ve bakteriyel lipopolisakaritin TGF-beta1 üretimine herhangi bir etkisi olmadığı gözlenmiştir⁹⁵.

Bir başka çalışmada, virulan *M.tuberculosis*'ten elde edilen LAM'un kan monosit kültüründe, monositlerde TGF-beta1 üretimini artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir⁹⁶.

M.tuberculosis ile enfekte hastalar ve onların PPD pozitifliği gösteren aynı evde yaşayan yakınlarından elde edilen kan monosit kültürüne, PPD ve *M.tuberculosis* ait 30 kD alfa antijeni uygulanması ile monositlerden TGF-beta1 sekresyonunun hasta kişilerde ev halkına göre belirgin olarak fazla olduğu saptanmıştır; TNF-alfa ve IL-10 düzeylerinde ise değişiklik izlenmemiştir⁹⁷.

Bunlara paralel bir başka çalışmada, *M.avium*-intracellulare kompleksi ile enfekte edilen makrofajlarda, bu bakteriye ait bazı proteinlerin makrofajlarda TGF-beta1 üretimi ve salınımını artırdığı belirlenmiştir⁹⁸. Aynı şekilde, monositlerin *M.tuberculosis* ile enfekte

edilmesi ile TGF-beta1 mRNA ekspresyonu ve salınımının arttığı da gösterilmiştir⁹⁹.

Aktif tüberkülozlu hastaların periferal kan kökenli monositlerinde, TGF-beta1'in sağlıklı kişilere göre belirgin olarak fazla miktarda eksprese edildiği ve spontan olarak salgılandığı belirtilmiştir. Aynı araştırmada TGF-beta mRNA ekspresyonunun da arttığı saptanmıştır⁹³.

M. tuberculosis ile enfekte akciğer tüberkülozu olgularında, X ray bulgularına göre geç dönem hastalarda, periferal kan monositlerinde TGF-beta düzeyi, erken dönem hastalarla karşılaştırıldığında daha yüksek; IFN-gamma düzeyi ise daha düşük bulunmuştur. Aynı çalışmada TGF-beta yüksekliği ile M.tuberculosis antijenlerine karşı geç dönem hastalarda belirlenen lenfoproliferatif yanıt düşüklüğünün korele olduğu belirlenmiştir⁹⁴.

Kaviter lezyonu olan akciğer tüberkülozlu olgularla, kaviter lezyonu olmayanların bronkoalveoler lavaj hücrelerindeki TGF-beta1 düzeyinde ise herhangi bir farklılık olmadığı belirtilmiştir¹⁰⁰.

TGF beta'nın makrofajlar, sitokinler ve bakteri çoğalması üzerinde de birçok etkileri olduğu belirlenmiştir.

Catherine Othieno ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, PPD pozitif kişilerden alınarak kültüre edilen periferal kan monositlerinde TGF-beta1 ve IL-10'un IFN gamma üretimini sinerjistik olarak baskıladıkları gösterilmiştir. Ortama TGF-beta1 ve IL-10'u nötralize eden antikolar eklendiğinde IFN-gamma düzeylerinin tekrar arttığı gözlenmiştir. Ayrıca TGF-beta1'in monositlerden IL-10 salınımını da artırdığı belirlenmiştir¹⁰¹.

Diğer bir çalışmada, M.avium ile enfekte edilen makrofaj kültür ortamında, TGF-beta'nın IFN-gamma ve TNF-alfa üretimini baskılayarak

bu sitokinlerin makrofajlar üzerindeki aktive edici etkilerini ortadan kaldırdığı belirtilmiştir⁹⁸.

Bunlara paralel olarak, *M.tuberculosis* ile enfekte kişilerde, PPD tarafından uyarılan IFN-gamma'nın monositler tarafından üretiminin TGF-beta'nın nötralize edilmesi ile arttığı gösterilmiştir¹⁰¹.

TGF-beta'nın, enfeksiyöz ajanlara karşı vücudun savunulmasında önemli katkıları olan hidrojenperoksit (H₂O₂) ve nitrikoksit (NO) üretimi üzerine de etkileri olduğunu gösteren bazı çalışmalar vardır^{102,103,104,105}.

Warwick-Davies J ve arkadaşları tarafından, insan monosit kültür ortamında, TGF-beta'nın monositlerde H₂O₂ üretimini baskıladığı ve monositlerin fibronektine tutunma gücünü azalttığı belirtilmiştir¹⁰².

Başka bir çalışmada, parazitler ile enfekte edilen farelerde TNF-alfa geninin aktive olduğu ve TNF-alfa üretiminin arttığı; bunun da IFN-gamma'ya bağlı NO üretimini artırdığı, TGF-beta'nın ise NO üretimini baskıladığı gözlenmiştir¹⁰³.

TGF-beta'nın makrofajlar içindeki bakteri çoğalması üzerindeki etkileri, birçok araştırmacı tarafından, çoğu hücre kültürü ortamında yapılan çalışmalarda araştırılmış ve bazıları birbiri ile çelişen önemli bulgular elde edilmiştir.

M.avium ile enfekte edilen farelerin dalaklarından elde edilen makrofajlarda ortama antiTGF-beta1 antikoru eklenmesi ile bakteri miktarının azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda, enfekte makrofajlarda TNF-alfa reseptörlerinin ekspresyonunda azalma olduğu saptanmış ve antimikrobiyal aktivite azalmasında bunun da etkili olabileceği belirtilmiştir¹⁰⁶.

Benzer bir çalışmada, *M.avium* ile enfekte farelerin peritoneal makrofajlarında, TGF-beta1'in *M.avium* çoğalmasını belirgin olarak artırdığı, TGF-beta1 antiserumu ile bakteri miktarının azaldığı

belirlenmiştir. Aynı çalışmada, süperoksit anyonu ve H₂O₂ düzeylerinde herhangi bir farklılık izlenmemiştir¹⁰⁷.

Hirsch CS ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada; PPD reaktif kişilerde, periferik kan monosit kültüründe TGF-beta'nın nötralizasyonu ile M.tuberculosis ile enfekte monositlerde bakteri miktarının azaldığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, TGF-beta'nın nötralizasyonunun T hücre blastogenezini etkilemediği saptanmıştır. Ayrıca, TGF-beta'nın nötralizasyonu sonucu IFN-gamma üretiminin de arttığı belirlenmiştir¹⁰⁸.

Diğer bir çalışmada; M.tuberculosis ile enfekte monositlerde, TGF-beta1'in nötralizasyonunun bakteri üremesini azalttığı gösterilmiş; TNF-alfa ve IFN-gamma'nın ise bakteri üremesini baskılayıcı yönde etkileri olduğu gözlenmiştir¹⁰¹.

TGF-beta'nın immün sistemi baskılayıcı oluşunu ve bakteri çoğalmasında olumsuz yönde etkilediğini gösteren bulgulara zıt yönde, bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüş bulgular da sözkonusudur. Örneğin; Goletti ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, HIV ile enfekte ve PPD pozitif olguların periferik kan monosit kültüründe IL-10 ve TGF-beta'nın nötralizasyonu sonucunda, monositler içinde HIV'nun replikasyonunun arttığı; IL-2, IL-1 beta, ve TNF-alfa'nın inhibisyonunun ise HIV replikasyonunu azalttığı belirtilmiştir¹⁰⁹. Buna karşın; TGF-beta'nın HIV replikasyonu üzerine olan etkisinin kültür ortamının durumuna göre farklılık gösterebileceğini belirleyen bulgular da vardır¹¹⁰.

Diğer bir çalışmada; M.avium ile enfekte farelerden elde edilen peritoneal makrofaj kültüründe, IFN-gamma ve TNF-alfa'nın makrofajlardaki bakteri çoğalmasında belirgin olarak baskıladığı, ancak, IL-10 veya TGF-beta'nın bakteri çoğalması üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı belirtilmiştir⁴⁸. Yine aynı yönde, monositlerdeki bakteri üremesine

IL-10 ve TGF-beta'nın etkili olmadığını belirten başka araştırmacılar da vardır^{96,111}.

TGF-beta ve ECM Elemanlarının Granüolardaki Ekspresyonu

Zahra Toossi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ana çalışmaya ek olarak, 2 adet akciğer tüberkülozu olgusunda TGF-beta1'in immunohistokimyasal ekspresyonu incelenmiş ve TGF-beta1'in özellikle Langhans tipi dev hücreler ve daha az olarak ta epiteloid histiyositlerin sitoplazmalarında eksprese edildiği görülmüştür⁹³.

Marshall ve arkadaşları tarafından 8 adet tüberküloz ve 6 adet sarkoidoz olgusuna ait cilt biyopsisinde yapılan bir çalışmada; immunohistokimyasal olarak anti human panTGF-beta ekspresyonu incelenmiş ve tüberküloz olgularında TGF-beta ekspresyonu granülomu çevreleyen ECM te ve fibroblastlarda görülmüş; granülom içinde ise saptanmamıştır. Sarkoidoz olgularında ise TGF-beta'nın tüm granüolomlar boyunca ve granüolomlar içindeki makrofajlarda ve çevredeki fibroblastlarda eksprese edildiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada Tip 1 prokollajen ve fibronektinin immunohistokimyasal ekspresyonu da değerlendirilmiştir. Tip 1 prokollajen için, tüberkülozlu olgularda fibroblast morfolojisindeki hücrelerde granülomun merkezine doğru dağınık olarak; granülom kenarlarında ise granüolomları birbirinden ayıracak biçimde pozitif boyanma izlenmiştir. Sarkoidoz sipesmenlerinde ise, Tip 1 prokollajen, tüberkülozlu olgulara göre granüolomların merkezinde ve kenarlarındaki hücrelerde daha az belirgin olarak saptanmıştır. Fibronektin ekspresyonu, hem tüberküloz ve hem de sarkoidoz granüolomları için, çevredeki matrikste ve fibroblastlarda izlenmiştir¹¹².

7 adet akciğer sarkoidozlu olgunun biyopsi materyallerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, TGF-beta 1 ekspresyonu özellikle

epiteloid hücrelerde ve daha az yoğunlukta da dev hücrelerde saptanmıştır. Ayrıca, alveoler makrofajlar, bronşiol epiteli, Tip II pnömositler ve alveoler septalardaki kapiller damarlarda hastaliksız kontrol olguları da dahil olmak üzere tüm sarkoidoz olgularında pozitif boyanma görülmüştür. Aynı çalışmada, fibronektin, alfa5beta1 fibronektin reseptörü ve TGF-beta 1'i bağlayıcı bir proteoglikan olan decorin de incelenmiş ve fibronektin ile fibronektin reseptörü epiteloid histiyositlerde, çevre dokudaki fibroblastlarda ve çok az olarak ta dev hücrelerde saptanmıştır. Çevre akciğer parankiminde ise; fibronektin ekspresyonu, alveoler kapillerlerde ve belirgin olarak ta alveoler makrofajlarda gözlenmiştir. Fibronektin reseptörü ekspresyonu ise, büyük damarları çevreleyen bağ dokusunda ve daha az olarak ta alveoler septalarda izlenmiştir¹¹³.

Sarkoidozlu 25 olguya ait scalen lenf nodüllerinde TGF-beta 1, bazı integrinler ve ECM elemanlarının immunohistokimyasal ekspresyonunun, granülom yapılarının stajeleri de dikkate alınarak, değerlendirildiği bir araştırmada; TGF-beta 1'in granülomlardaki epiteloid hücrelerde ve dev hücrelerde, matür granülomlarda daha belirgin olmak üzere, granülomların tüm stajelerinde eksprese olduğu belirlenmiştir. Ekspresyon yoğunluğunun, aktif dönemdeki granülomlarda diğer dönemlere göre daha belirgin olduğu saptanmıştır. Ayrıca TGF-beta 1 pozitifliği fibroblastlarda da izlenmiştir. Bu çalışmada, ECM elemanlarından kollajen 1, 3, 4, fibronektin, laminin, vitronektin ve tenaskin ekspresyonu değerlendirilmiştir. İmmatür granülomlarda, fibronektinin granülomların periferinde konsantrik olarak bulunduğu; aktif dönemde, kollajen 4 ve laminin dışındaki ECM elemanlarının granülomların periferinde konsantrik tarzda belirgin olarak ve granülomların içinde ve kenarlarında fibriler yapıda zayıf olarak boyandığı saptanmıştır. Granülomların fibrotik görünümde olduğu ve epiteloid hücrelerin dejenere olarak atrofiye uğradığı regresif dönemde ise

kollajen 4 ve laminin dışındaki tüm ECM elemanlarının, granülomların tamamında yaygın ve yoğun olarak varolduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu dönemde, diğer dönemlere göre fibroblastların aktif olarak proliferasyon yaptığı ve yine diğer dönemlere göre kollajen 4 ve laminin dışındaki ECM elemanlarının fibroblastlarda daha yoğun bir biçimde ekspresyon edildiği görülmüştür. Bir başka bulgu olarak, tüm ECM elemanlarının pozitif boyanma açısından, kapillerler de dahil olmak üzere, damarlarla ilişkili olduğu saptanmıştır¹¹⁴.

Maeda ve arkadaşları tarafından, plevra tüberkülozlu olgularda TGF-beta 1'in latent formunun bir komponentine karşı bir antikor kullanılarak immunohistokimyasal yöntemle yapılan çalışmada, pozitif boyanma, granülomlar çevresindeki immatür fibrotik alanlarda özellikle de mezotelyal ve fibroblastik hücrelerde izlenmiş; granülom içinde ve Langhans tipi dev hücrelerde boyanma görülmemiştir. Aynı çalışmada, plevra sıvısında ELISA yöntemi ile ölçülen TGF-beta 1 ve IFN gamma miktarları kontrol olgulara göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur¹¹⁵.

Bizim bu çalışmamızdaki amaçlarımız, akciğer tüberkülozunda, granülomlardaki ECM elemanlarının granülomların yapısına katılım oranlarını ve granülomların yapılındaki rollerini belirlemek; TGF-beta1'in granülomlarda ve akciğerin diğer alanlarındaki ekspresyon dağılımını saptamak; granülomlardaki ECM elemanlarının ekspresyon şiddeti ile TGF-beta-1 arasındaki ilişkiyi incelemek ve bunun granülomlarda ve çevre akciğer dokusundaki basil sayısı, olguların hastalık süreleri ve tedaviye verdikleri yanıt ile olası ilişkisini araştırmak; granülomların yapısal özellikleri ve nekroz miktarı ile tedaviye verilen yanıt arasında herhangi bir bağlantı olup olmadığını belirlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1985 ile 2000 yılları arasında “akciğer tüberkülozu” tanısı almış olan 43 olguya ait Hematoksilen-Eozin yöntemi ile boyanmış preparatlar ve formalin ile fikse edilerek parafine gömülü olarak saklanan akciğer doku örnekleri incelendi. Olgulara ait klinik bilgiler, hastane genel arşivindeki hasta dosyaları, patoloji arşivi ve ilgili kliniklerin arşivleri taranarak elde edilmeye çalışıldı. Böylece; hastaların yaşları, cinsiyetleri, hastalık süreleri, yeterli ilaç tedavisi alıp almadıkları, tedaviye yanıtları ve gönderilen akciğer dokusunun niteliği hakkındaki bilgiler elde edildi. Hastalık süresi, hastadaki şikayetlerin başlangıç zamanı veya tanı zamanı dikkate alınarak saptandı.

Olgularda, en az 9 aylık bir süre veya balgamda basil çıkışı negatif olana kadar uygulanan kombine ilaç tedavisi yeterli tedavi olarak kabul edildi.

Hematoksilen-eozin ile boyanmış preparatlar, kesitlerde gözlenen granülomların düzeni, granülomlardaki nekroz miktarı, alveoler makrofaj yoğunluğu ve fibrozis yönünden semikantitatif olarak değerlendirildi.

Granülom yapılarının değerlendirilmesi için, literatür taramaları sonucunda bu konuda belirlenmiş bir yöntem bulamadık ve kendi geliştirdiğimiz yöntemi kullandık. Buna göre; granülomların sınırlarının düzenliliği ve birbirleriyle birleşme eğiliminde olup olmamaları temel

kriterler olarak dikkate alındı. Sınırları düzenli olan ve birbirleriyle birleşme eğilimi göstermeyen granülomlar çoğunlukta ise 1 pozitif; düzensiz sınırlı ve birleşme eğiliminde olanlar fazla ise 2 pozitif; birbirleriyle tamamen birleşmiş ve tipik granülom yapısı izlenemeyen olgular ise 3 pozitif olarak değerlendirildi.

Nekroz miktarı genel olarak, granülomların orta kısmında ve az ise 1 pozitif; incelenen doku örneklerinin büyük çoğunluğunda ve geniş alanlarda ise 3 pozitif; bu iki kriter arasındakiler ise 2 pozitif olarak değerlendirildi.

Alveoler makrofaj yoğunluğu, alveoller içinde tek tük ve az sayıda ise 1 pozitif; alveolleri tamamen dolduracak kadar yoğun ise 3 pozitif; bu ikisi arasında kalan olgular ise 2 pozitif olarak kabul edildi.

Granülomlardaki fibrozis için değerlendirme, fibrozis miktarı gözönüne alınmaksızın, "var" veya "yok" olarak yapıldı.

Olgulara ait Hematoksilen-Eozin yöntemi ile boyanmış preparatlar incelenerek, granülom yapılarını en yoğun içeren ve olgunun karakteristiğini en iyi yansıttığı düşünülen parafin blok seçildi.

Doku örneklerinde, tüberküloz basilini ışık mikroskopunda görmek amacıyla doku kesitlerine Kinyoun boyama yöntemi uygulandı. Bu yöntem için doku örneklerinden 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler lam üzerine alındı. Doku kesitlerindeki parafini uzaklaştırmak amacıyla, alınan bu doku kesitleri 56°C'lik sıcaklıktaki etüv içinde 2 saat bekletildi ve sonra 2 kez 5'er dakika süreyle ksilol içinde tutuldu. Sonraki aşamada, dokunun hidrasyonunu sağlamak için, kesitler azalan derecelerdeki alkol ve son olarak ta distile su içinde tutuldu.

Kinyoun boyama yönteminde kullanılan solusyonlar:

Carbol fuchsin solusyonu;

Basic fuchsin	4.0 g.
Phenol crystal eriyiği	8.0 ml.
Alkol %95	20.0 ml.
Distile su	100.0 ml.

%1 Asid alkol solusyonu;

Alkol %70	1000.0 ml.
Hidroklorik asid, konsantre	10.0 ml.

Metilen mavisi stok solusyonu;

Metilen mavisi	1.4 g.
Alkol %95	100 ml.

Metilen mavisi çalışma solusyonu;

Metilen mavisi(stok)	10.0 ml.
Musluk suyu	90.0 ml.

Kinyoun boyama yönteminin aşamaları;

- 1- Deparafinize ve hidrate edilen kesitler, carbol fuchsinde 56°C'de 1 saat bekletildi.
- 2- Kesitler akan su içinde yıkandı.
- 3- Asid alkol ile, doku soluk pembe bir renk alana kadar muamele edildi
- 4- Dokular, akan su içinde yıkandı.
- 5- Karşıt boya uygulamak amacıyla, metilen mavisi çalışma solusyonunda 2 dakika bekletildi.
- 6- Artan derecelerdeki alkoller içinde bekletilerek dehidrate edildi; bir süre ışilolde bekletildi ve üzerleri lam ile kapatıldı.

Boyama sonucunda, aside dirençli bakterilerin parlak kırmızı; dokunun ise açık mavi boyanması beklendi. Kontrol amacıyla, önceden aside dirençli bakterilerin boyandığı bilinen, tüberküloz basili ile enfekte üriner sisteme ait doku örneği kullanıldı

Seçilen bloklardan elde edilen doku kesitlerine immunohistokimyasal olarak "streptoavidin-biotin kompleks yöntemi" ile rabbit antihuman fibronektin, mouse antihuman laminin, rabbit antihuman kollajen Tip 1, mouse antihuman kollajen Tip 4 ve rabbit antihuman TGF-beta 1 antikörleri uygulandı (Tablo 1).

	Klon No	Kaynak	Cod No	Dilüsyon Oranı	Pozitif Kontrol
Fibronektin	Poliklonal	Dako	A0245	1/800	Tonsil
Kollajen Tip 4	Monoklonal	Dako	M0785	1/50	Plasenta
Kollajen Tip 1	Poliklonal	Novocastra	NCL-COL-1p	1/40	Plasenta
Laminin	Monoklonal	Novocastra	NCL-Laminin	1/50	Tonsil
TGF-beta 1	Poliklonal	Santa Cruz	Cat # sc-146	1/500	Incebarsak

Tablo 1. Kullanılan antikörlerin özellikleri.

İmmunohistokimyasal yöntemle boyanacak doku kesitleri, kesitlerin lam üzerinden kaymasını ve dökülmesini önlemek için chromalium-gelatin adhesive ile kaplanmış lamalar üzerine 4-5 mikrometre kalınlığında kesilerek alındı. 56°C ısıya ayarlı etüvde yaklaşık 1.5 saat tutuldu ve ksilolde 2 kez 5'er dakika bekletilerek deparafinize edildi. Sonraki aşamada, kesitler azalan derecelerde alkol ortamlarında ve en son olarak ta distile suda bekletilerek hidrate olmaları sağlandı. Bundan sonra, doku kesitlerine antijenlerin yeniden kazanılması amacıyla, kesitler 0.01 molar ve pH6 olacak şekilde hazırlanan trisodyumsitrat solusyonu içinde sıvı düzeyi lamaların üzerini kapatacak ve kesitlerin kurummasını engelleyecek biçimde 90°C'de 10 dk. mikrodalga fırında bekletilerek, "antijen retrieval"

işlemi uygulandı. Bu işlemden sonra kesitlerin trisodyumsitrat solusyonundan çıkarılmadan kendi halinde soğuması beklendi ve streptavidin-biotin peroksidaz immunohistokimyasal boyama yöntemi, aşağıda belirtilen aşamalardan geçilerek uygulandı.

- 1- Kesitler proteolitik enzim (Proteinaz K, Dako) ile 20 dakika inkübe edildi.
- 2- Dokulardaki endojen peroksidaz enziminin blokasyonu için, kesitler %3'lük H₂O₂ solusyonu ile 10 dakika inkübe edildi. Bu işlemden sonra kesitler tamponlanmış fosfat solusyonunda 5 dakika bekletilerek yıkandı.
- 3- Primer antikorla üzerleri kaplanan doku kesitleri, TGF-beta 1 için 2 saat, diğerleri için 60 dakika kadar inkübe edildi.
- 4- Primer antikor ile enzim taşıyan antikor arasında bağlayıcılık görevi yapan Linking Reagent (Dako) ile kesitler 20 dakika inkübe edildi ve sonra tamponlanmış fosfat solusyonunda 5 dakika bekletildi.
- 5- Labelling reagent streptoavidin ile konjuge edilmiş "horseradish peroksidaz" ile dokular 20 dakika inkübe edildi ve sonra tekrar tamponlanmış fosfat solusyonunda dokular 5 dakika bekletildi.
- 6- Dokular, chromogenic substrate (DAB) ile 20 dakika inkübe edildi.
- 7- Kesitlere Hematoksilen-Eozin ile zıt boyama uygulandı ve üzerleri lamelle kapatıldı.

Tüm bu inkübasyon basamakları, oda sıcaklığında ve nemli ortamda gerçekleştirildi. Renklendirici olarak Diaminobenzidine (DAB) kullanılarak oluşan kahverengi renk reaksiyonu değerlendirildi.

Uygulanan her bir antikor için oluşan reaksiyonun şiddetini değerlendirmek amacıyla, granülomların çevresi, granülomların içi, epiteloid histiyositler, dev hücreler, lenfositler, fibroblastlar, damarlar, alveol epiteli, alveoler makrofajlar, bronşiol epiteli ve bronşiol bazal

membranı incelendi. Granülomların çevresinde ve içindeki matrikste ve hücrelerin sitoplazmalarında oluşan kahverengi reaksiyonun yoğunluğu; 1 pozitif (hafif), 2 pozitif (orta) ve 3 pozitif (şiddetli) olarak semikantitatif yöntemle değerlendirildi.

İstatistiksel yöntemler: İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS 10.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Karşılaştırmalar için, Mann-Whitney U testi ve Fisher'in kesin ki kare testi; korelasyonlar için Spearman'ın korelasyon testi kullanıldı.

BULGULAR

Klinikopatolojik Bulgular

Olgulardan 32 tanesinin yaşı belirlenebildi. Buna göre, yaş aralığı 10-72; ortalama yaş 44.5 olarak saptandı.

Cinsiyet dağılımı incelendiğinde; 29 erkek, 13 kadın olgu belirlendi; 1 olgunun ise cinsiyeti ile ilgili bilgi elde edilemedi. Erkek olgular için yaş ortalaması 43, kadın olgular için 47.8 olarak saptandı.

Olguların hastalık süreleri, 22 olguda belirlenebildi. Buna göre, en uzun hastalık süresi 12 yıl olarak saptandı. Ayrıca, 1 olguda 10 yıl olduğu, 10 olguda tanının yeni konduğu, 10 olguda hastalık süresinin 3 yıldan daha az olduğu görüldü.

Tedavi süreleri, 14 olguda saptanabildi ve 11 olgunun yeterli, 3 olgunun yetersiz ilaç tedavisi aldığı belirlendi.

Olguların ilaç tedavisine verdikleri yanıt 13 olgu için saptanabildi. Buna göre, 10 olgunun tedaviye iyi, 3 olgunun kötü yanıt verdiği belirlendi.

Makroskobik Bulgular

Olgulara ait dokulardan 23 tanesinin çeşitli büyüklüklerde akciğer biopsisi, 15 tanesinin lobektomi, 4 tanesinin pnömonektomi, 1 tanesinin de bronş biopsisi olduğu belirlendi.

Olgulara ait klinik ve makroskobik bulgular Tablo 2'de sunulmuştur.

Olgu	Yaş	Cinsiyet	Hastalık süresi	Tedavi süresi	Tedaviye yanıt	Doku örneği ve boyutları (cm.)
1.	49	Kadın	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 4x3x1,5
2.	53	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Lobektomi 14x5x2,5
3.	63	Kadın	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 2,5x1x0,4
4.	10	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 2x1,5x1
5.	-	Kadın	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Sol pnomenektomi 16x10x4
6.	-	Kadın	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Sol üst lobektomi 15x8x3
7.	-	Erkek	Yeni teşhis	Yeterli	İyi	Sağ üst lobektomi 13,5x9,5x5
8.	-	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 3,5x3x2
9.	44	Erkek	3 yıl	Yetersiz	Kötü	Sol pnomenektomi 13x11,5x6
10.	-	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Sağ alt lobektomi 10x9x8
11.	25	Erkek	1 yıl	Yetersiz	Saptanamadı	Lobektomi 12x11x3
12.	22	Erkek	1 yıl	Saptanamadı	Saptanamadı	Sol alt lobektomi 14x9x4
13.	-	-	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi
14.	67	Kadın	Yeni teşhis	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 2,5x1,8x1
15.	50	Erkek	Yeni teşhis	Yeterli	İyi	Biyopsi 7x5x2,5
16.	43	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Sağ üst lobektomi 12,5x8x4,5
17.	55	Erkek	Yeni teşhis	Yeterli	İyi	Biyopsi 3x2,5x0,6
18.	24	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Sağ üst lobektomi 14x9,5x4,5
19.	58	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 4,5x1,5x1
20.	61	Kadın	2 yıl	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 6x4x1,5
21.	56	Erkek	Yeni teşhis	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 5x2,5x0,6
22.	72	Erkek	12 yıl	Saptanamadı	Saptanamadı	Lobektomi 9x7x2,5
23.	45	Erkek	1 yıl	Saptanamadı	Saptanamadı	Lobektomi 15x13x5,5
24.	53	Erkek	Yeni teşhis	Yeterli	İyi	Biyopsi 2x1,5x1,2
25.	56	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Lobektomi 10x7x3
26.	-	Erkek	Yeni teşhis	Yeterli	Saptanamadı	Biyopsi 1x0,7x0,2
27.	28	Kadın	Yeni teşhis	Yeterli	İyi	Biyopsi 1,3x1,1x0,8
28.	55	Kadın	3 yıl	Yetersiz	İyi	Biyopsi 1,2x0,7x0,5
29.	66	Erkek	Yeni teşhis	Saptanamadı	Saptanamadı	Sağ orta ve üst lobektomi 17x10x3
30.	47	Kadın	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Sol lobektomi 18x11x5,5
31.	35	Erkek	1 yıl	Yeterli	Kötü	Biyopsi 3x2,5x1,5
32.	49	Erkek	1 yıl	Yeterli	Kötü	Biyopsi 5x4x2
33.	-	Erkek	10 yıl	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 3,5x1x0,7
34.	-	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 5x2,5x2
35.	22	Kadın	1 yıl	Yeterli	İyi	Bronş biyopsisi 0,3x0,2x0,1
36.	33	Kadın	1 yıl	Yeterli	İyi	Sağ alt lobektomi 13x9,5x4,5
37.	20	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 6,5x6x2
38.	-	Kadın	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Sağ alt lobektomi 7x7x4,5
39.	43	Erkek	Yeni teşhis	Yeterli	İyi	Sol pnomenektomi
40.	28	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 2x1,5x1,5
41.	38	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 2,5x2,5x2
42.	53	Kadın	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Sağ pnomenektomi 16x12x6
43.	-	Erkek	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	Biyopsi 4,2x2,4x1

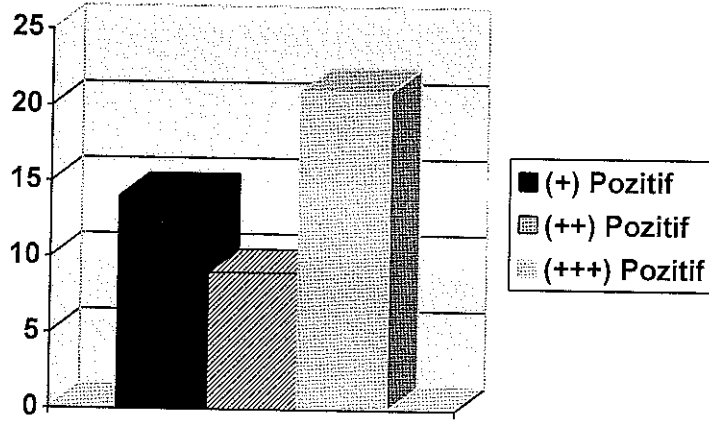
Tablo 2: Olgulara ait klinik ve makroskopik bulgular

Mikroskopik Bulgular

Mikroskopik olarak, tüm olgularda H.E. ile boyalı preparatlar ışık mikroskopunda tekrar değerlendirildi. Tüm olgularda granümatöz yangı ile uyumlu granülom yapıları izlendi (Resim 1 ve 2). Doku örnekleri, granülom yapılarının sınırlarının düzeni, granülomların birbirleriyle birleşme eğilimi, nekroz oranı, alveoler makrofaj yoğunluğu ve fibrozis miktarı açısından incelendi.

Granülom yapılarının düzeni, 23 olguda 1 pozitif, 20 olguda 2 pozitif olarak saptandı. Hiçbir olguda 3 pozitiflik izlenmedi.

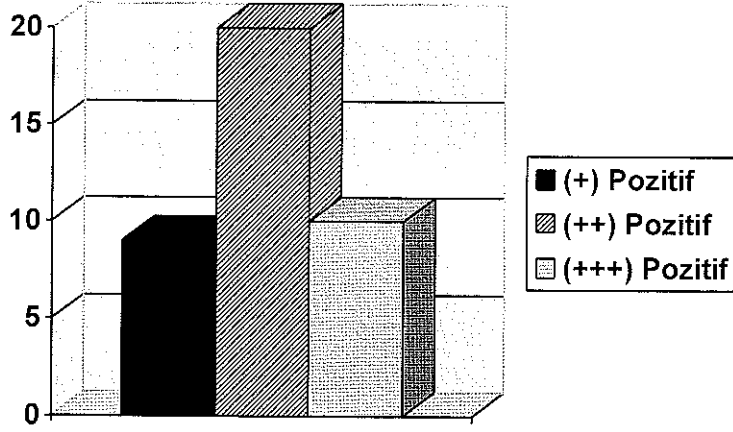
Nekroz oranı için; 13 olgu 1 pozitif, 9 olgu 2 pozitif, 21 olgu 3 pozitif olarak değerlendirildi. Granülom yapılarında nekroz içermeyen olgu saptanmadı (Şekil 1).



Şekil 1: Olguların nekroz oranına göre dağılımı

9 olguda fibrotik görünümde granülomların var olduğu görüldü; diğer 34 olguda ise fibrozis izlenmedi.

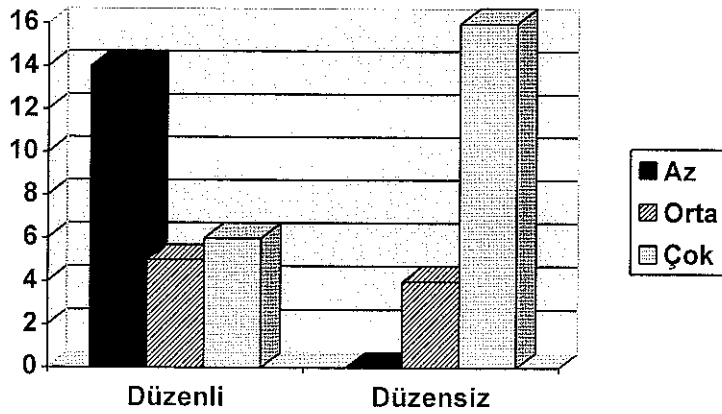
Olgulardaki alveoler makrofaj yoğunluğu, 39 olguda belirlendi. Buna göre 9 olgu 1, 20 olgu 2, 10 olgu ise 3 pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 2).



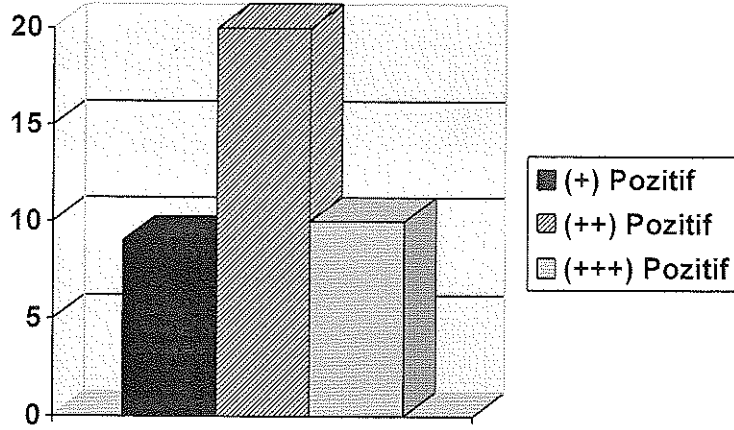
Şekil 2: Alveoler makrofaj yoğunluğu

İstatistiksel değerlendirme sonucunda; olgularda, hastalık süresi-granulom düzeni; hastalık süresi-nekroz oranları; tedaviye yanıt-yaş; tedaviye yanıt-cinsiyet; tedaviye yanıt-granülom düzeni; tedaviye yanıt-nekroz oranı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı

Olgulardaki nekroz oranı ile granülom düzensizliği arasında ise pozitif bir korelasyon olduğu belirlendi ($p = 0.001$) (Şekil 3).



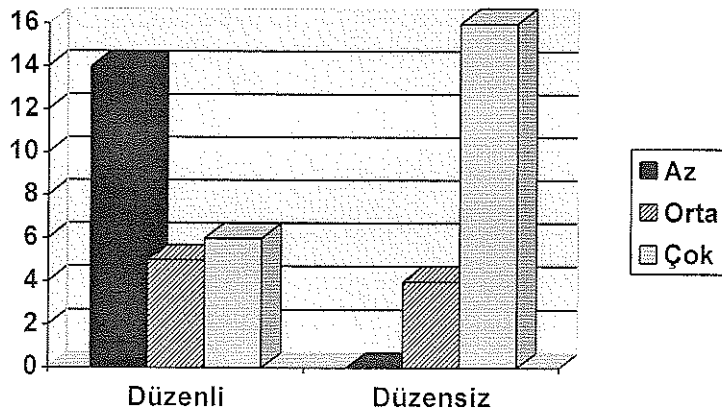
Şekil 3: Granülom yapısının düzenli olup olmamasına göre nekroz miktarının dağılımı



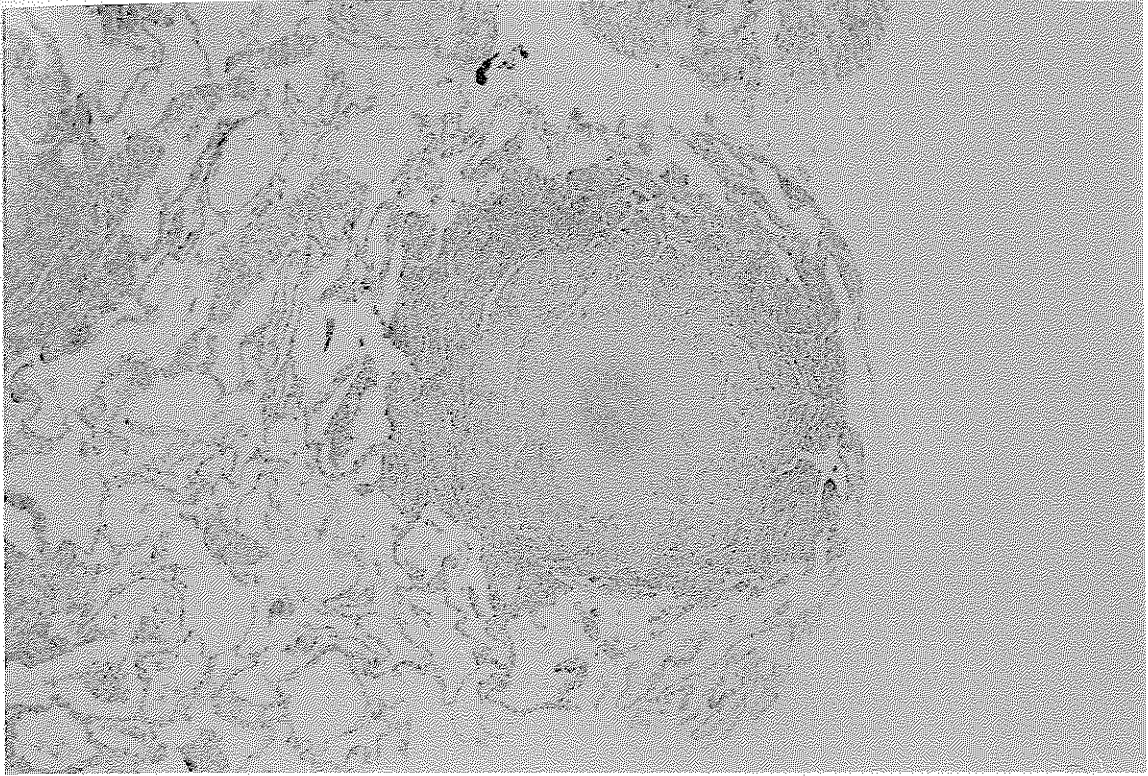
Şekil 2: Alveoler makrofaj yoğunluğu

İstatistiksel değerlendirme sonucunda; olgularda, hastalık süresi-granulom düzeni; hastalık süresi-nekroz oranları; tedaviye yanıt-yaş; tedaviye yanıt-cinsiyet; tedaviye yanıt-granülom düzeni; tedaviye yanıt-nekroz oranı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

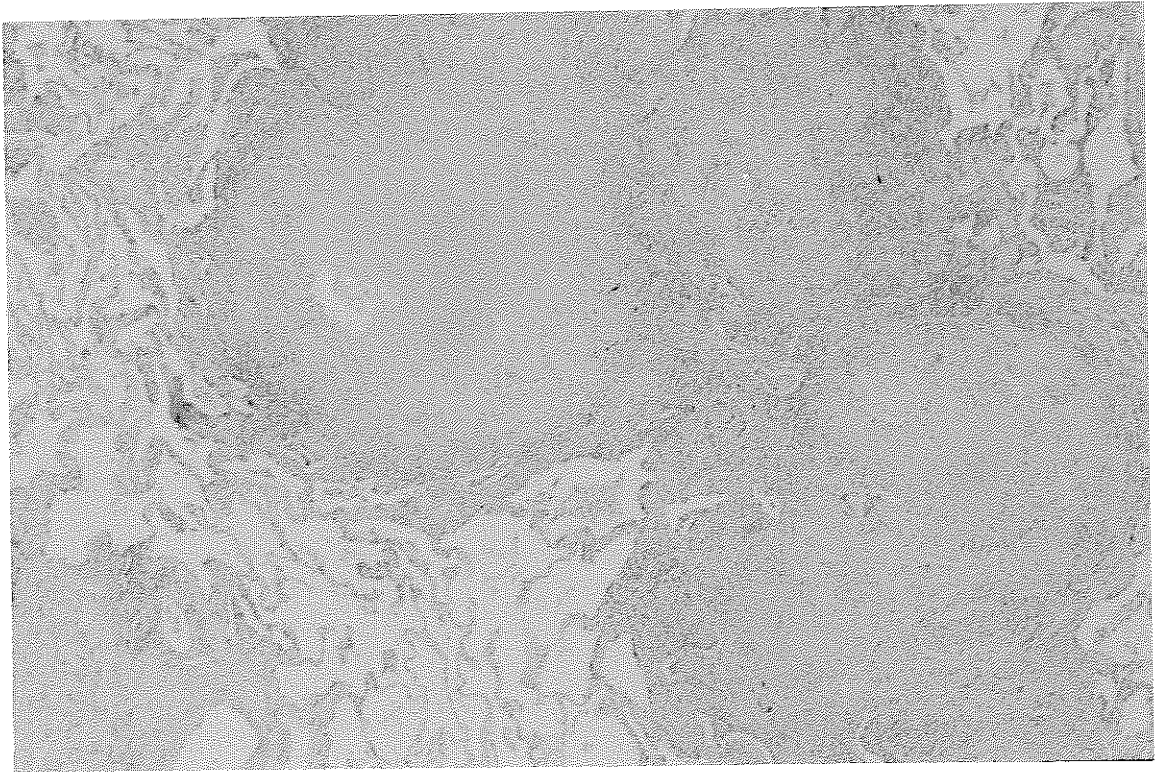
Olgulardaki nekroz oranı ile granülom düzensizliği arasında ise pozitif bir korelasyon olduğu belirlendi ($p = 0.001$) (Şekil 3).



Şekil 3: Granülom yapısının düzenli olup olmamasına göre nekroz miktarının dağılımı



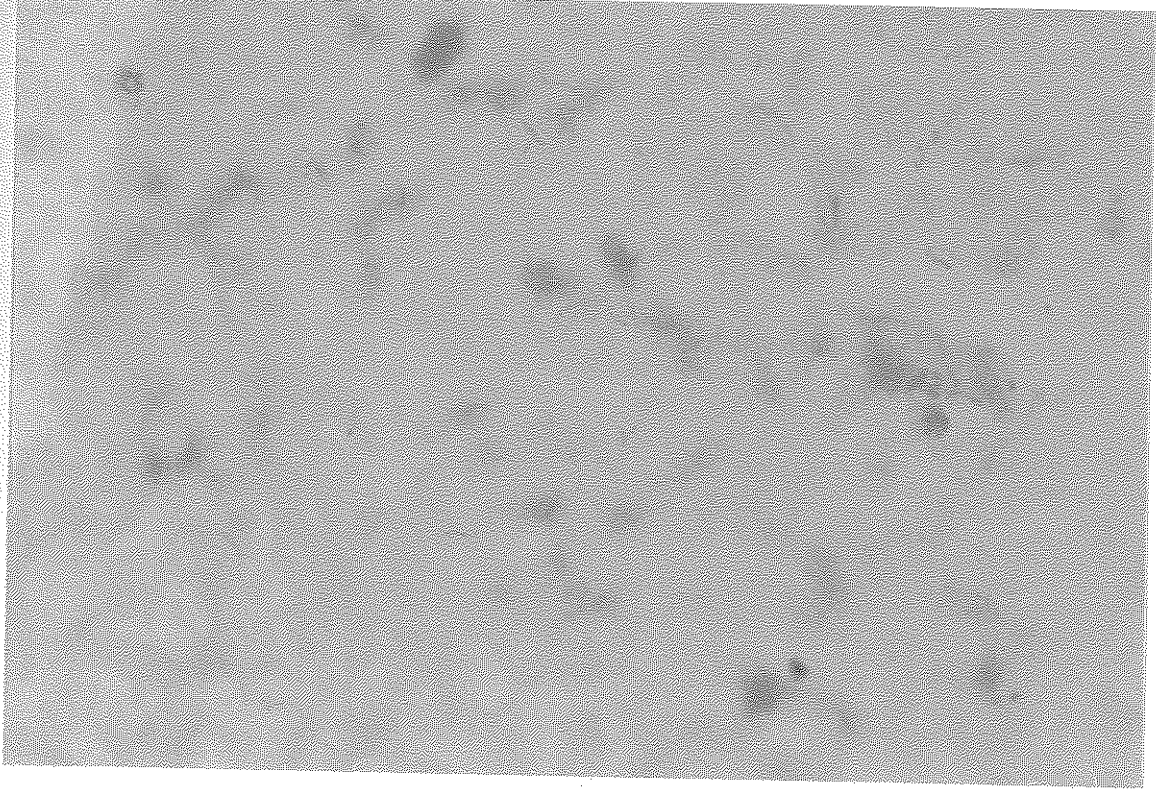
Resim 1 : Akciğer tüberkülozunda tipik granülom yapısı (HE X 4).



Resim 2: Akciğer tüberkülozunda birleşme eğilimi gösteren granülomlar (HE X4).

Histokimyasal Bulgular:

Olguların doku örneklerinde, histokimyasal olarak uygulanan Kinyoun boyama yöntemi ile, olgulardan sadece 1 tanesinde basilleri boyama başarısı sağlanabildi (Resim 3)



Resim 3 : Kazeifikasyon nekrozu içindeki tüberküloz basilleri (Kinyoun X 100)

İmmunohistokimyasal Bulgular

Fibronektin;

Granülomların çevresinde, olguların tamamında fibronektin ekspresyonu saptandı. Boyanma yoğunluğunun, olguların çoğunda şiddetli (n = 27) ve orta (n = 13) derecede olduğu gözlemlendi (Resim 4).

Granülomların içinde ise, yine çoğu olguda pozitiflik belirlenmekle birlikte, boyanma yoğunluğu, birçoğunda hafif (n = 16) ve orta (n = 16) derecede izlendi.

Epiteloid histiyositlerde, fibronektin ekspresyonu, olguların çoğunda hafif (n = 21) ve orta (n = 5) şiddette belirlendi. 13 olguda ise boyanma saptanmadı.

Langhans tipi dev hücrelerde, fibronektin ile olguların çoğunda hafif (n = 11) ve orta (n = 12) yoğunlukta pozitiflik saptandı. 17 olguda, ekspresyon izlenmedi (Resim 5).

Fibronektin ekspresyonu, granülomlar çevresindeki fibroblastlarda, çoğunluğu orta (n = 22) ve şiddetli (n = 15) derecelerde izlendi (Resim 6).

Olguların tamamında, tüm damar duvarlarında, fibronektin ekspresyonu olguların çoğunda orta derecede (n = 33) olmak üzere saptandı (Resim 7).

Bronşiol epitelinde, baskın bir boyanma şiddeti belirlenmedi. Bazı olgularda pozitiflik izlenmezken bazılarında değişen derecelerde boyanma saptandı.

Bronşiol bazal membranında, fibronektin ile pozitiflik, olguların çoğunluğunda hafif (n = 15) ve orta (n = 5) şiddette izlendi (Resim 8).

Alveol epitelinde, çoğu olguda boyanma görülmezken (n = 27), bazı olgularda hafif (n = 7) ve orta (n = 7) şiddette pozitiflik izlendi (Resim 9).

Alveoler makrofajlarda, fibronektin ekspresyonu, çoğu olguda orta (n = 22) derecede izlenirken, 1 olguda boyanma saptanmadı (Resim 9).

Boyanma özelliklerine ait bulgular Tablo 3'de gösterilmiştir.

İstatistiksel olarak, hastalık süreleri ve tedaviye verilen yanıtlar ile fibronektinin herhangi bir bölgedeki ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon görülmedi.

Olgu	G.Ç.	G.İ.	D.H.	E.H.	Fib.	Len.	Dm.	B.E.	B.B.M.	A.E.	A.M.
1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
2	+++	-	Y	Y	++	-	++	-	+	++	++
3	++	+	+	+	Y	-	++	+	Y	-	+
4	++	+	++	+	++	-	+	+	-	+	++
5	++	++	Y	Y	++	-	++	Y	Y	-	+
6	+++	++	++	++	+++	-	+++	Y	Y	+	++
7	+++	+++	++	++	+++	-	++	Y	Y	++	++
8	+++	+++	++	+	++	-	++	+++	+	++	+++
9	++	+	++	+	++	-	++	Y	Y	-	++
10	+++	++	++	++	+++	-	++	++	++	-	+++
11	+++	++	+	++	+++	-	++	Y	Y	-	+++
12	+++	++	++	+	++	-	+	Y	Y	++	++
13	++	+	+	-	+	-	++	++	+	-	++
14	++	+	++	+	++	-	+++	+	++	+	+++
15	+++	++	-	-	++	-	+	+	+	-	++
16	+++	++	-	+	++	-	++	++	+	+	++
17	+++	+	+	+	+++	-	++	Y	Y	-	++
18	+++	++	-	-	+++	-	++	+++	++	++	++
19	++	+	-	+	++	-	++	Y	Y	-	+
20	++	+	-	-	+	-	++	-	-	-	++
21	++	+	+	+	++	-	++	Y	Y	-	+
22	+++	+++	Y	Y	+++	-	++	Y	Y	-	++
23	+++	+++	-	-	+++	-	++	-	+	-	+++
24	++	+	-	+	++	-	++	Y	Y	-	++
25	+	+	-	+	-	-	++	++	++	+	++
26	+++	++	-	+	+++	-	++	+++	+	+	+++
27	+++	+	+	+	+++	-	++	Y	Y	-	++
28	++	+	-	-	++	-	+	Y	Y	-	++
29	+++	-	-	-	+++	-	++	++	+++	-	+++
30	+++	++	++	++	++	-	++	++	++	-	++
31	+++	+++	++	+++	+++	-	++	Y	Y	Y	Y
32	+++	++	-	+	+++	-	++	Y	Y	-	-
33	+++	++	-	+	+++	-	++	-	+	-	+++
34	++	+	+	-	++	-	++	-	+	-	+
35	+++	++	-	-	-	-	+++	++	+	++	+++
36	+	+	-	-	++	-	++	-	+	-	++
37	+++	++	++	+	++	-	++	+	+	-	++
38	+++	++	-	-	++	-	+	Y	Y	Y	Y
39	+++	+++	++	+	++	-	++	Y	Y	++	++
40	++	+	-	-	++	-	+	-	+	-	+
41	+++	++	+	+	++	-	++	Y	Y	+	+++
42	+++	+++	+	+	+++	-	++	-	+	-	+
43	+++	+++	+	+	++	-	++	Y	Y	-	++

Tablo 3: Olgularda izlenen fibronektin ekspresyon yoğunluğu.

G.Ç.= Granülom çevresi

G.İ.= Granülom içi

D.H.= Dev hücreler

E.H.= Epiteloid histiyositler

Fib.= Fibroblastlar

Len.= Lenfositler

Dm.= Damarlar

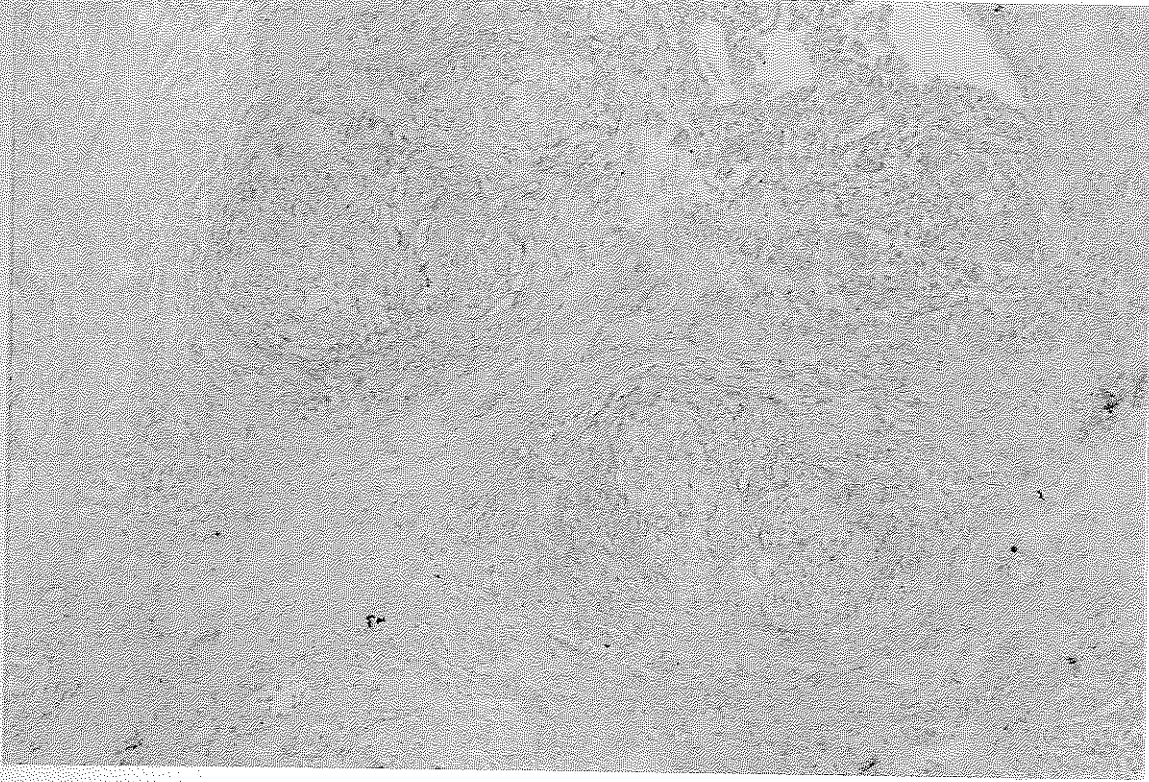
B.E.=Bronşiol epiteli

B.B.M.= Bronşiol bazal membranı

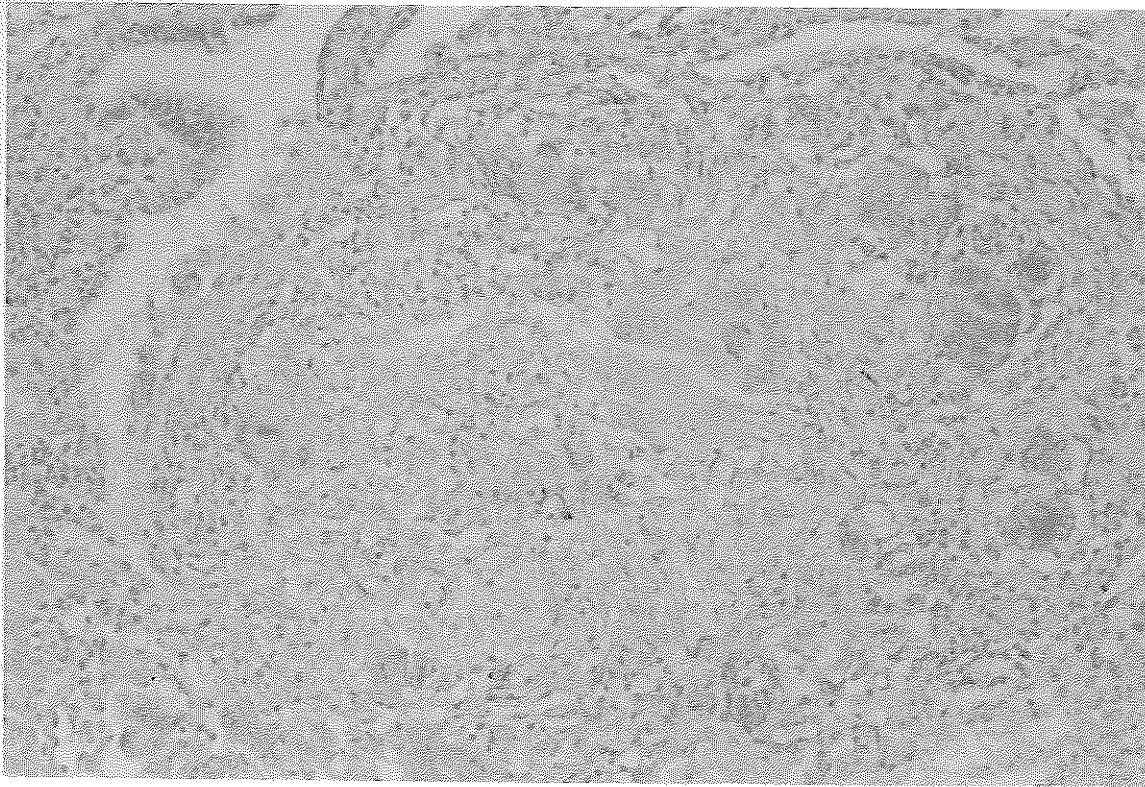
A.E.= Alveol epiteli

A.M. = Alveoler makrofajlar

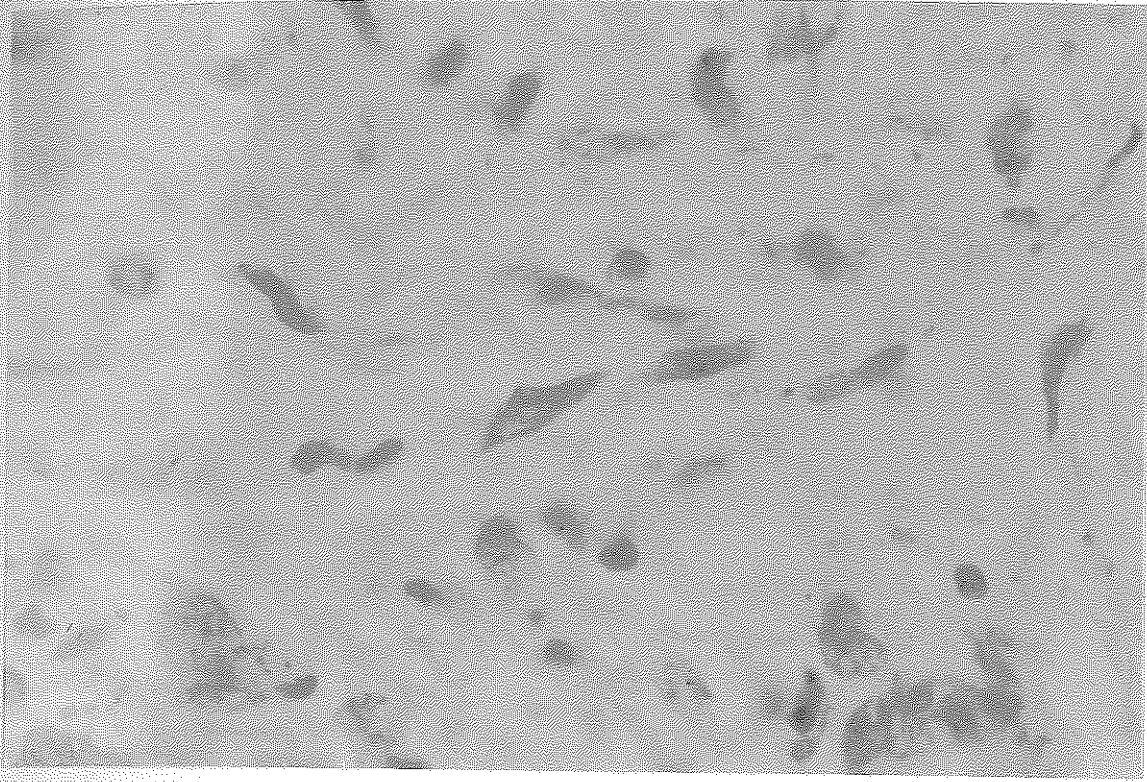
Y= Kesitte yok



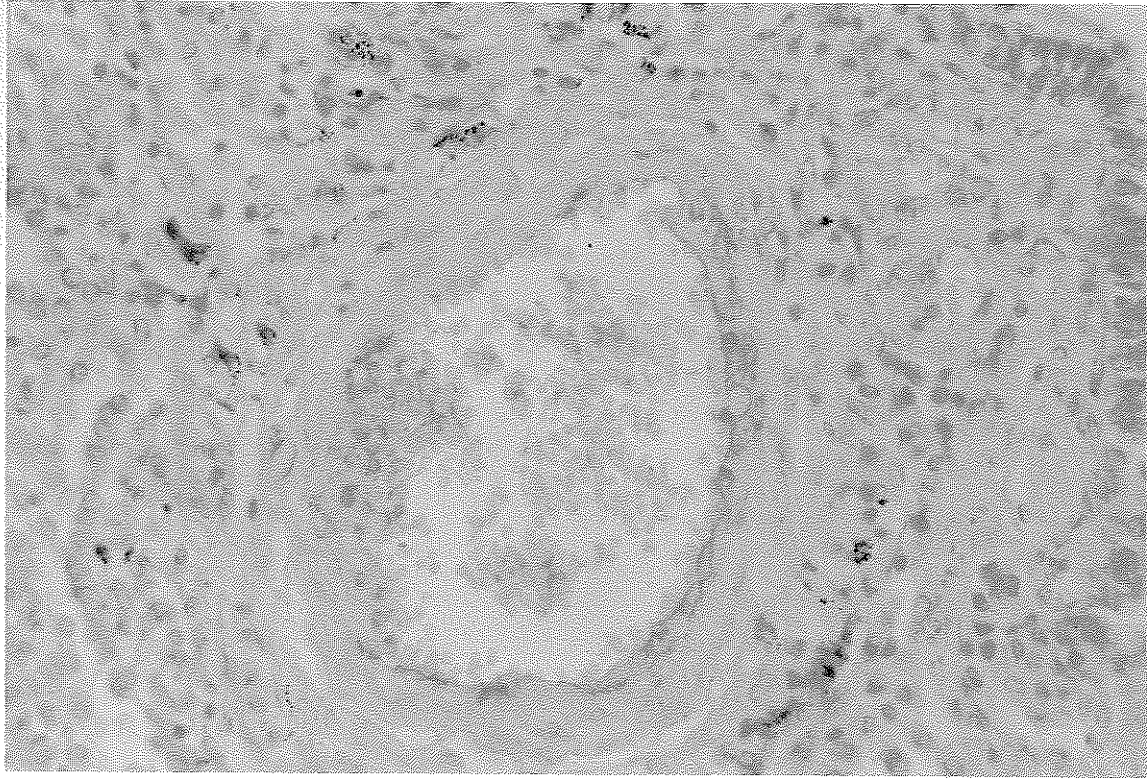
Resim 4 : Granülömlar çevresinde fibronektin immünoreaktivitesi (Fibronektin X4)



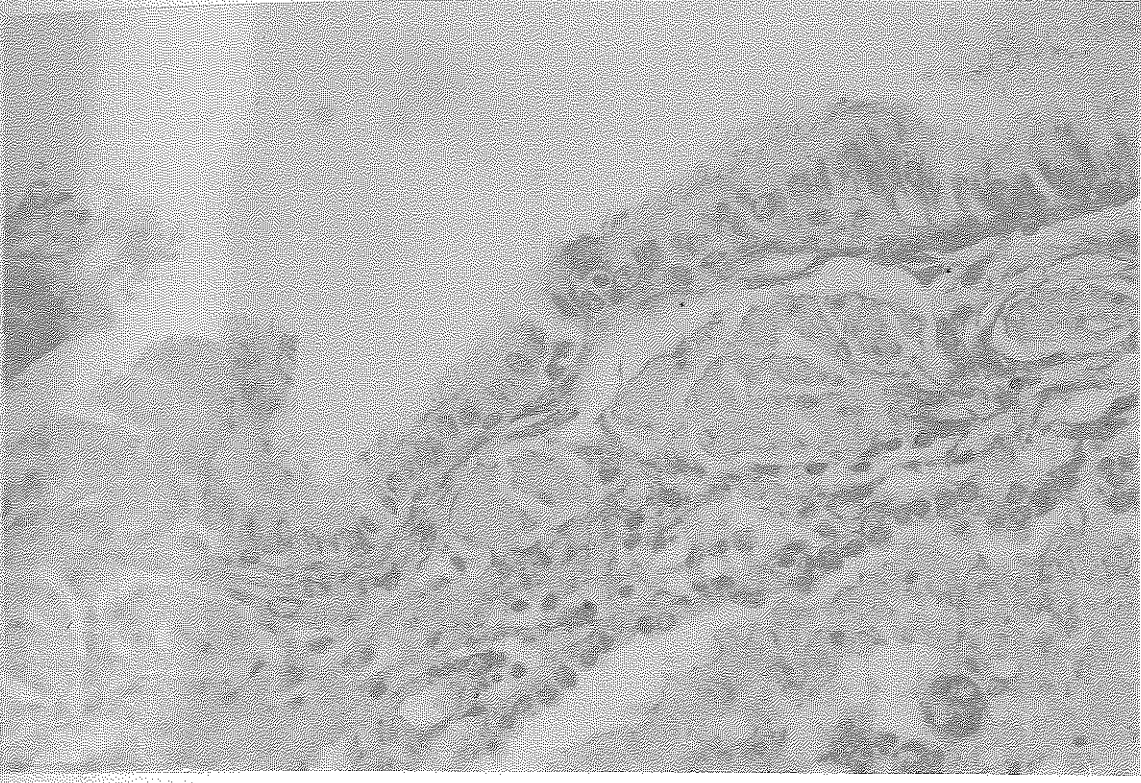
Resim 5: Dev hücreler ve epiteloid histiyositlerde fibronektin immünoreaktivitesi (Fibronektin X20).



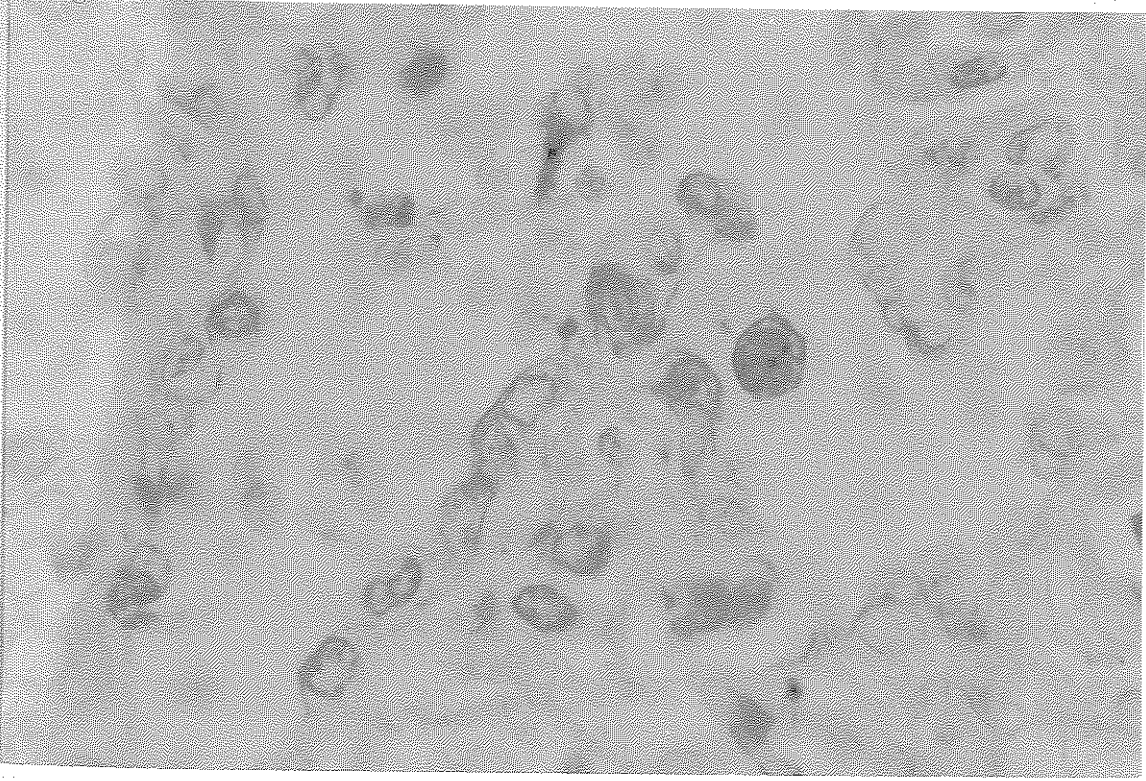
Resim 6: Granülomlar çevresindeki fibroblastlarda fibronektin immünoreaktivitesi (FibronektinX100).



Resim 7: Damar duvarında fibronektin pozitifliği (FibronektinX40).



Resim 8 : Bronşiol bazal membranında fibronektin pozitifliği (FibronektinX40).



Resim 9: Alveol epiteli ve alveoler makrofajlarda fibronektin immünoreaktivitesi (FibronektinX100).

Laminin;

Granülom çevresinde, laminin pozitifliği, olguların çoğunda hafif yoğunlukta ($n = 19$) izlenirken; önemli bir kısmında pozitif reaksiyon saptanmadı ($n = 18$). Laminin için yoğun boyanma hiçbir olguda görülmedi. 6 olguda ise orta şiddette reaksiyon görüldü (Resim 10).

Granülom içinde ise, olguların büyük çoğunluğunda laminin ekspresyonu izlenmedi ($n = 35$). Reaksiyon izlenen olgularda, ekspresyon şiddetinin hafif veya orta şiddette olduğu görüldü ($n = 8$).

Laminin için epiteloid histiyositler ve dev hücrelerde birkaç olgu dışında boyanma saptanmadı.

Fibroblastlarda, laminin ekspresyonu bazı olgularda, hafif ve orta şiddette saptandı ($n = 17$).

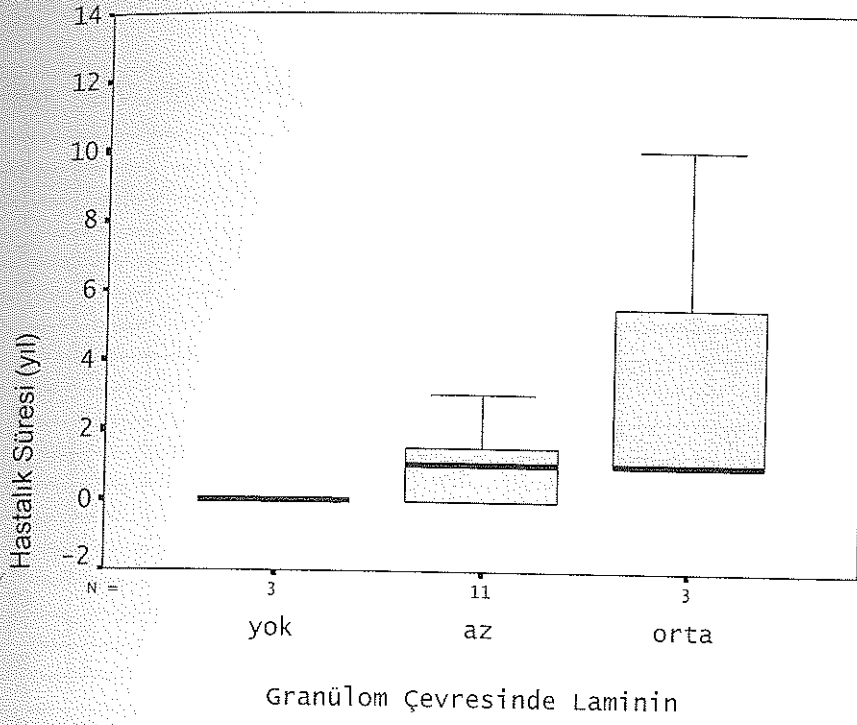
Damarlar için, tüm olgularda, orta ($n = 26$) ve şiddetli ($n = 17$) yoğunlukta boyanma görüldü (Resim 10).

Bronşiol epitelinde, birkaç olguda hafif ve orta derecede laminin ekspresyonu bulunurken bronşiol bazal membranında olguların bir kısmında hafif yoğunlukta pozitiflik saptandı.

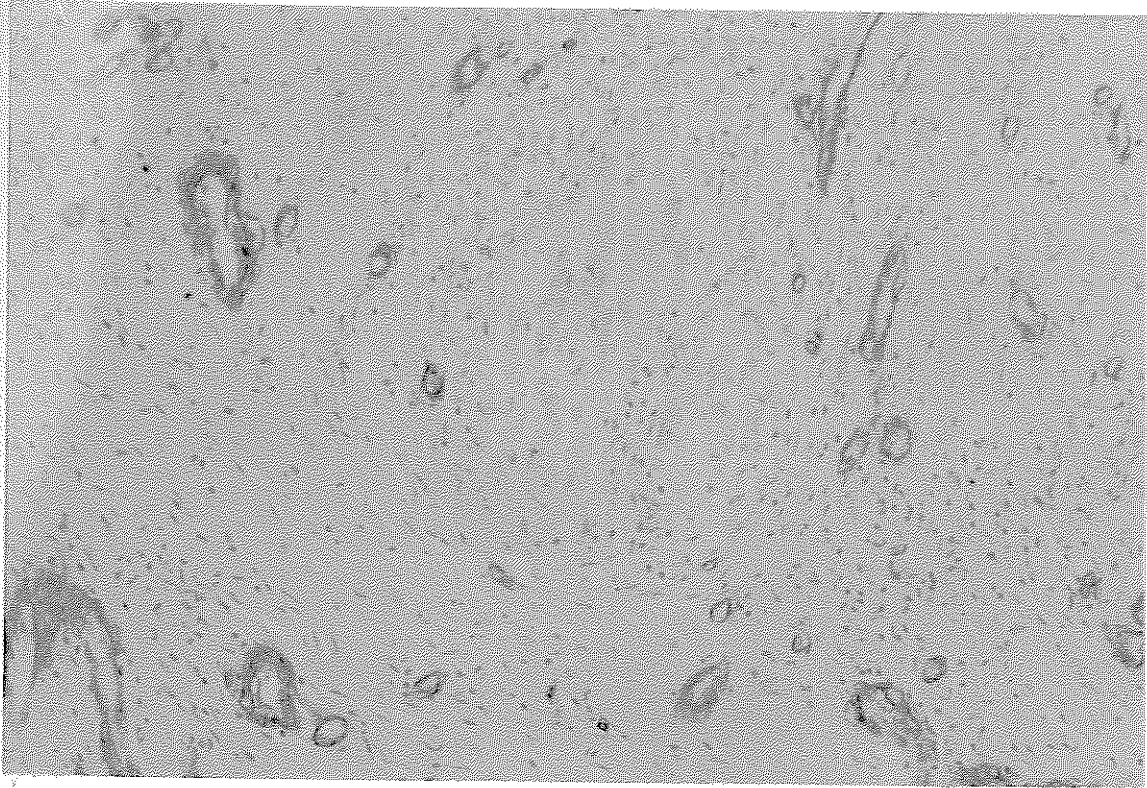
Alveol epiteli ve alveoler makrofajlarda, olguların çoğunda boyanma görülmedi.

Boyanma özelliklerine ait bulgular Tablo 4'de gösterilmiştir.

İstatistiksel olarak, laminin ekspresyonu ile tedaviye verilen yanıt arasında herhangi bir anlamlı ilişki saptanmadı. Buna karşın hastalık süreleri ile granülomların çevresindeki ve içindeki laminin ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlendi ($p = 0.029$ ve $p = 0.030$) (Şekil 4).



Şekil 4: Hastalık süresine göre granülom çevresinde laminin boyanma şiddeti. Her bir kutu % 25- 75 arasını, Kutuların ortasındaki kalın çizgi ortancayı, İnce yatay çizgiler maksimum değeri temsil etmektedir.



Resim 10: Granülom kenarındaki matrikste hafif, damarlarda yoğun laminin immünoreaktivitesi (LamininX20).

Olgu	G.Ç.	G.İ.	D.H.	E.H.	Fib.	Len.	Dm.	B.E.	B.B.M.	A.E.	A.M.
1	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-
2	-	-	Y	Y	-	-	+++	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	++	Y	Y	-	-
5	-	-	Y	Y	+	-	++	Y	Y	-	-
6	+	+	-	-	-	-	++	Y	Y	-	-
7	+	-	-	-	+	-	++	Y	Y	-	-
8	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	+++	Y	Y	-	-
10	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
11	++	-	-	++	++	-	++	Y	Y	-	-
12	+	-	-	-	++	-	+++	-	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-
17	+	-	-	-	-	-	+++	Y	Y	-	-
18	+	-	-	-	-	-	+++	-	+	-	-
19	-	-	-	-	-	-	++	Y	Y	-	-
20	+	-	-	-	-	-	++	+	-	-	++
21	-	-	-	-	-	-	++	Y	Y	-	-
22	+	+	Y	Y	-	-	++	Y	Y	-	-
23	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
24	-	-	-	-	++	-	++	Y	Y	-	-
25	+	+	-	-	-	-	+++	+++	+	+	+++
26	+	-	++	+	++	-	++	++	+	-	+
27	-	-	-	-	+	-	++	Y	Y	-	+
28	-	-	-	-	-	-	++	Y	Y	-	-
29	+	-	-	-	++	-	+++	-	+	-	-
30	+	-	-	-	+	-	+++	-	+	-	-
31	++	+	-	-	+	-	+++	Y	Y	Y	Y
32	++	++	-	-	++	-	+++	Y	Y	-	-
33	++	+	-	-	++	-	+++	-	-	-	-
34	+	-	-	-	++	-	+++	+	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	+++	++	+	+	+++
36	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
37	+	-	-	-	+	-	+++	Y	Y	-	-
38	-	-	Y	Y	-	-	++	Y	Y	-	-
39	++	++	-	-	+	-	+++	Y	Y	-	-
40	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
41	+	-	-	-	+	-	++	Y	Y	-	-
41	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-
43	++	+	-	-	++	-	+++	Y	Y	-	-

Tablo 4: Olgularda izlenen laminin ekspresyon yoğunluğu.

Tip 4 Kollajen;

Granülomlar çevresinde, olguların çoğunda hafif (n = 15) ve orta (n = 21) şiddette pozitif reaksiyon izlendi (Resim 11).

Granülomlar içinde, kollajen 4 için çoğu olguda hafif (n = 20) ve orta (n = 5) yoğunlukta pozitiflik izlenirken, bir grup olguda kollajen 4 ekspresyonu görülmedi (n = 17). Şiddetli derecede reaksiyon ise 1 olguda saptandı.

Epiteloid histiyositler ve Langhans tipi dev hücrelerde olguların hiçbirinde kollajen 4 pozitifliği saptanmadı.

Granülom çevresindeki fibroblast görünümündeki hücrelerde, olguların önemli bir kısmında hafif (n = 11) ve orta (n = 13) yoğunlukta pozitif reaksiyon görüldü (Resim 12).

Damarlardaki kollajen 4 ekspresyonu, doku kesitlerindeki hemen hemen tüm damarlarda orta (n = 16) ve yoğun (n = 27) derecelerde izlendi (Resim 13).

Bronşiol epiteli, alveol epiteli ve alveoler makrofajlarda, birkaç olgudaki hafif derecede pozitif reaksiyon dışında, olguların çoğunda reaksiyon görülmedi.

Bronşiol bazal membranında bir grup olguda hafif ve orta derecede pozitiflik saptandı (n = 13) (Resim 14).

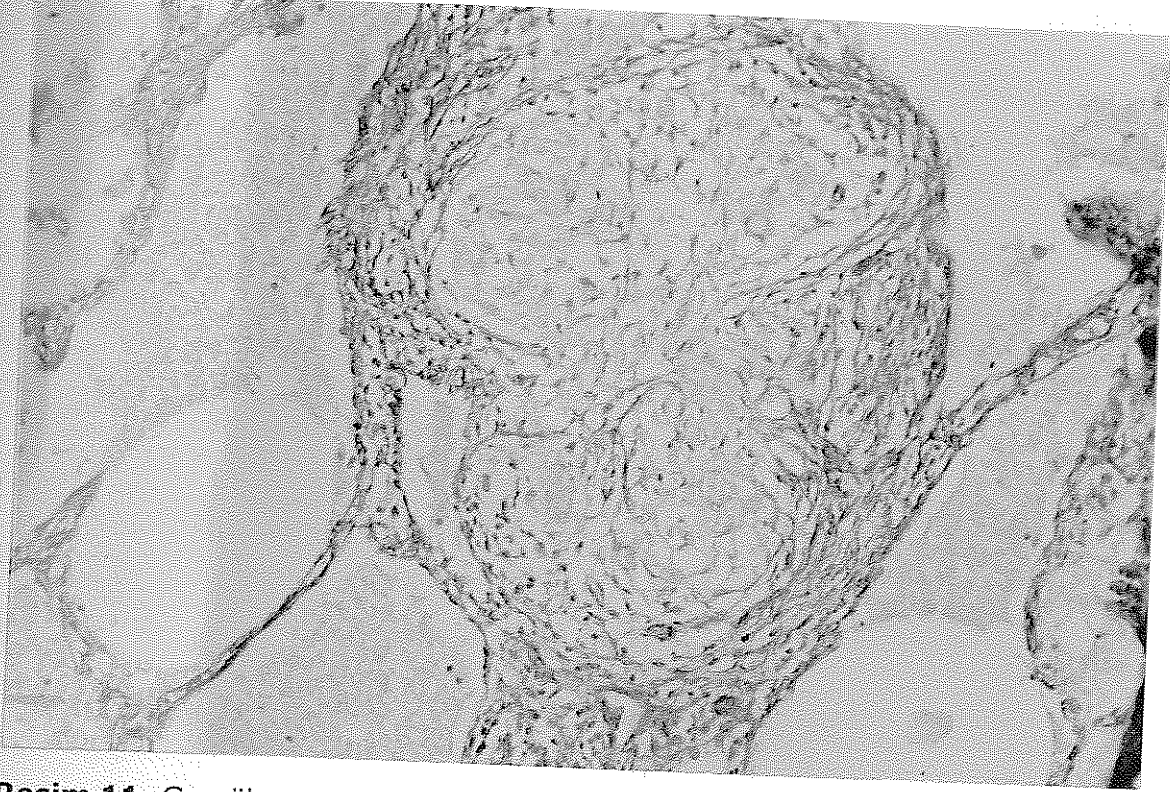
Boyanma özelliklerine ait bulgular Tablo 5'de gösterilmiştir.

İstatistiksel olarak, hastalık süresi ve tedaviye verilen yanıt ile kollajen 4 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki izlenmedi.

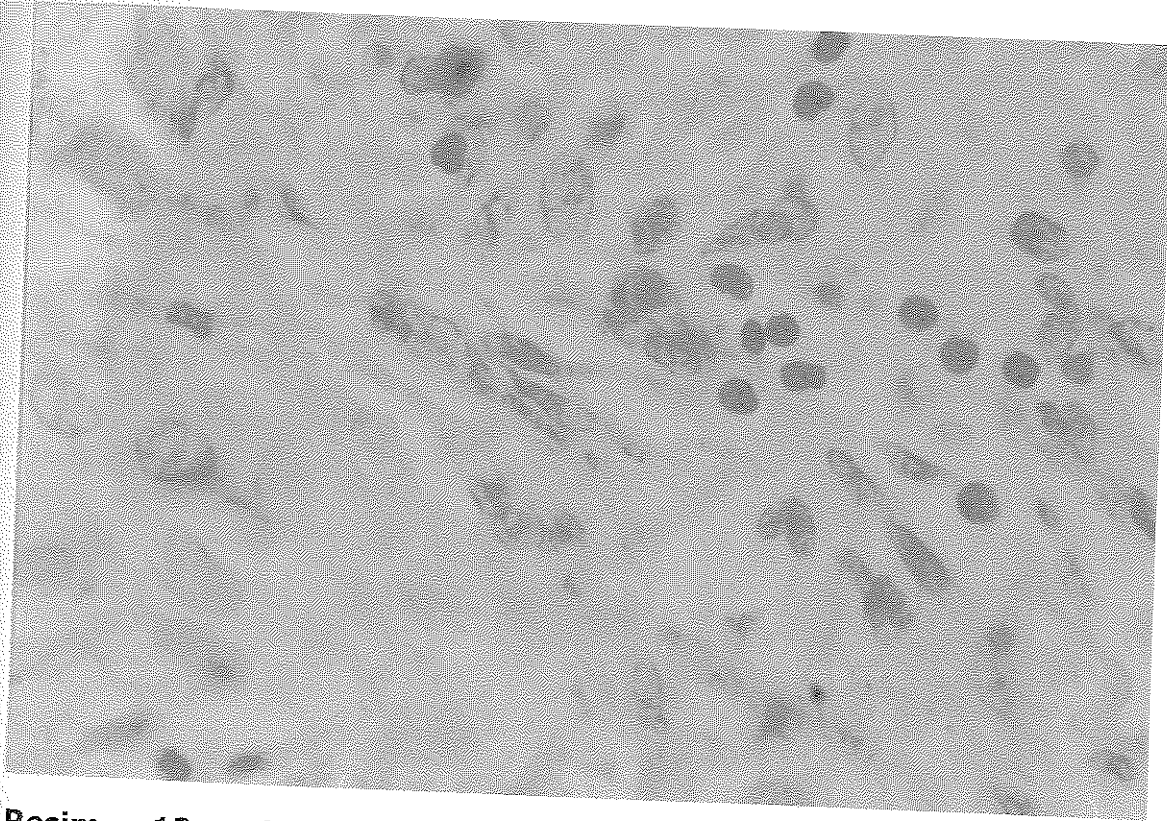
Kollajen 4'ün bronşiyol epitelindeki ekspresyon şiddeti hafif derecede ve az sayıda olguda pozitif olarak saptandı.

Olgu	G.Ç.	G. İ.	D.H.	E.H.	Fib.	Len.	Dm.	B.E.	B.B.M.	A.E.	A.M.
1	+	+	-	-	-	-	+++	-	++	-	-
2	++	-	Y	Y	++	-	+++	-	Y	-	-
3	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
4	+	-	-	-	Y	-	++	Y	Y	-	-
5	+++	-	Y	Y	++	-	+++	Y	Y	++	-
6	++	+	-	-	++	-	+++	Y	Y	+	+
7	++	++	-	-	++	-	++	Y	Y	-	-
8	+++	++	-	-	+++	-	+++	Y	Y	+	+
9	++	+	-	-	+	-	+++	Y	Y	-	-
10	++	+	-	-	+	-	++	-	++	-	-
11	-	-	-	-	-	-	++	Y	Y	++	-
12	+	-	-	-	+	-	+++	Y	Y	+	-
13	-	-	-	-	-	-	+++	-	Y	Y	-
14	+	-	-	-	-	-	++	-	Y	Y	-
15	++	++	-	-	-	-	+++	-	++	-	-
16	++	+	-	+	++	-	+++	-	++	-	+
17	++	+	-	-	-	-	++	-	Y	+	+
18	+	-	-	-	+	-	+++	-	+	-	-
19	++	+	-	-	+	-	++	-	Y	-	-
20	+	-	-	-	Y	-	+++	-	Y	-	-
21	+	-	-	-	Y	-	+++	+	++	+	+
22	++	+	Y	-	++	-	++	Y	Y	-	-
23	++	++	-	-	++	-	++	Y	Y	-	-
24	+	-	-	-	Y	-	++	Y	Y	-	-
25	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
26	++	+	-	-	-	-	+++	-	Y	Y	-
27	++	+	-	-	-	-	+++	Y	Y	-	-
28	+	-	-	-	+	-	+++	Y	Y	-	-
29	++	-	-	-	++	-	+++	-	++	-	-
30	++	+	-	-	++	-	+++	-	++	-	-
31	++	+	-	-	++	-	+++	Y	Y	Y	Y
32	++	+	-	-	++	-	+++	Y	Y	-	-
33	++	+	-	-	+	-	+++	-	++	-	-
34	+	++	-	-	++	-	+++	-	+	-	-
35	+	+	-	-	Y	-	++	+	+	-	-
36	+	+	-	-	Y	-	+++	-	+++	-	-
37	+	-	-	-	+	-	+++	Y	Y	-	-
38	++	+	-	-	+	-	++	Y	Y	Y	Y
39	++	-	-	-	++	-	+++	Y	Y	-	-
40	+	+	-	-	Y	-	++	-	++	-	-
41	+	+	-	-	+	-	++	Y	Y	-	-
42	++	+	-	-	+	-	+++	Y	Y	-	-
43	+++	+++	-	-	-	-	+++	Y	Y	-	-

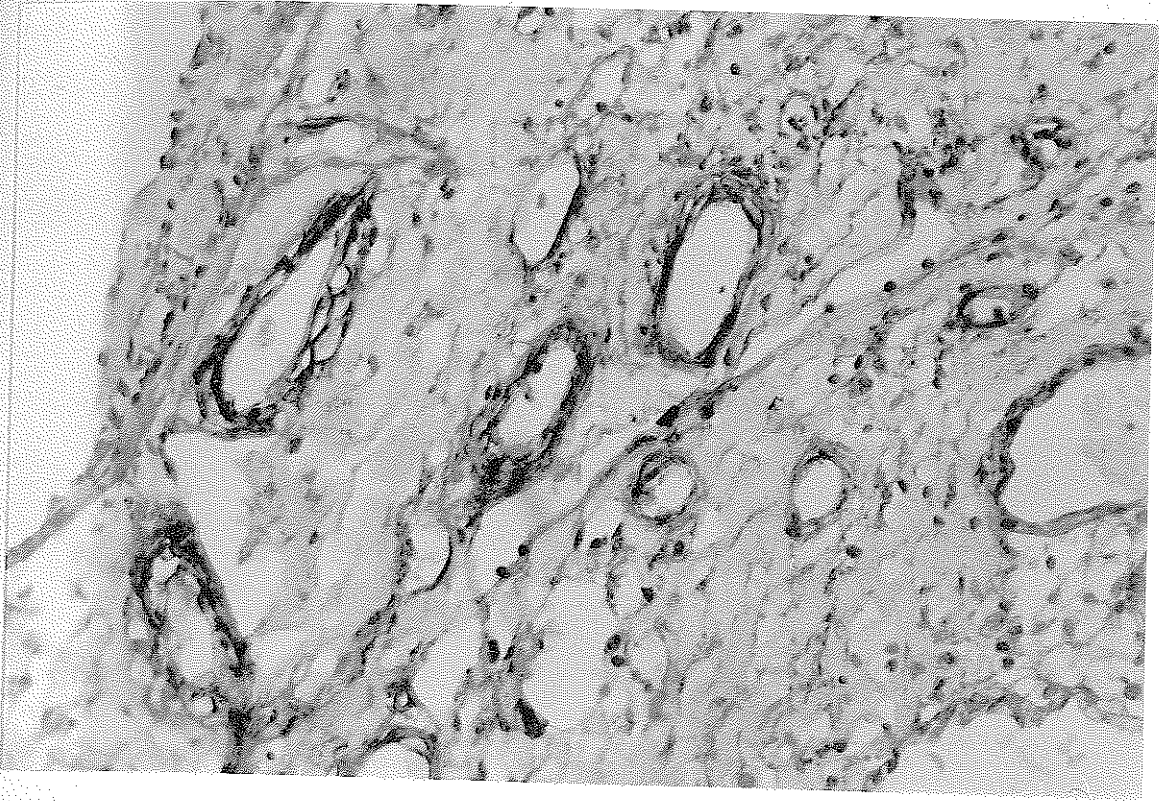
Tablo 5: Olgularda izlenen kollajen 4 ekspresyon yoğunluğu.



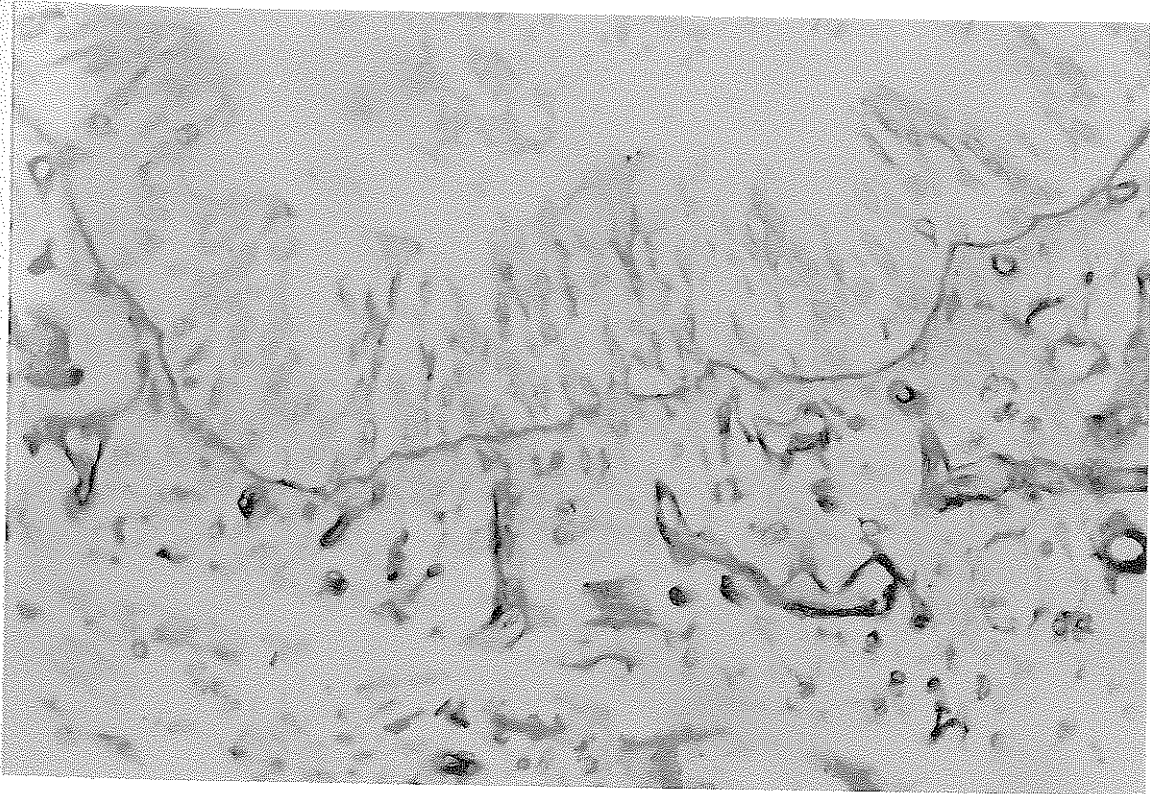
Resim 11 :Granülom çevresinde ve içinde kollajen 4 immünoreaktivitesi (Kollajen4X20).



Resim 12: Granülomlar çevresindeki fibroblastlarda kollajen 4 immünoreaktivitesi (Kollajen 4x100).



Resim 13 :Damar duvarlarında kollajen 4 pozitifliği (Kollajen 4X40).



Resim 14: Bronşiol bazal membranında kollajen 4 pozitifliği (Kollajen4X40).

Tip 1 Kollajen;

Granülomlar çevresinde kollajen 1 pozitifliği, tüm olgularda izlenirken reaksiyon şiddetinin, olguların çoğunluğunda orta (n = 16) ve şiddetli (n = 21) yoğunlukta olduğu belirlendi (Resim 15).

Granülomların içinde ise, yoğunluk şiddeti çoğu olguda hafif (n = 19) ve orta (n = 15) derecede saptandı.

Kollajen 1 pozitifliği, epitelooid histiyositlerde bir grup olguda hafif (n = 6) ve orta (n = 1) yoğunlukta izlenirken; dev hücrelerde de benzer şekilde hafif (n = 6) ve orta (n = 1) derecede saptandı.

Granülomlar çevresindeki fibroblastlarda, çoğu olguda orta (n = 20), bazılarında ise hafif (n = 5) ve şiddetli (n = 6) derecelerde pozitiflik belirlendi (Resim 16).

Kollajen 1 ekspresyonu, damarlarda olguların büyük çoğunluğunda, orta (n = 20) ve şiddetli (n = 21) yoğunlukta olmak üzere tüm damarlarda saptandı (Resim 17).

Kollajen 1, bronşiol epitelinde, birkaç olguda değişken boyanma şiddetlerinde izlendi. Aynı şekilde bronşiol bazal membranlarında da bir grup olguda farklı ekspresyon derecelerinde saptandı.

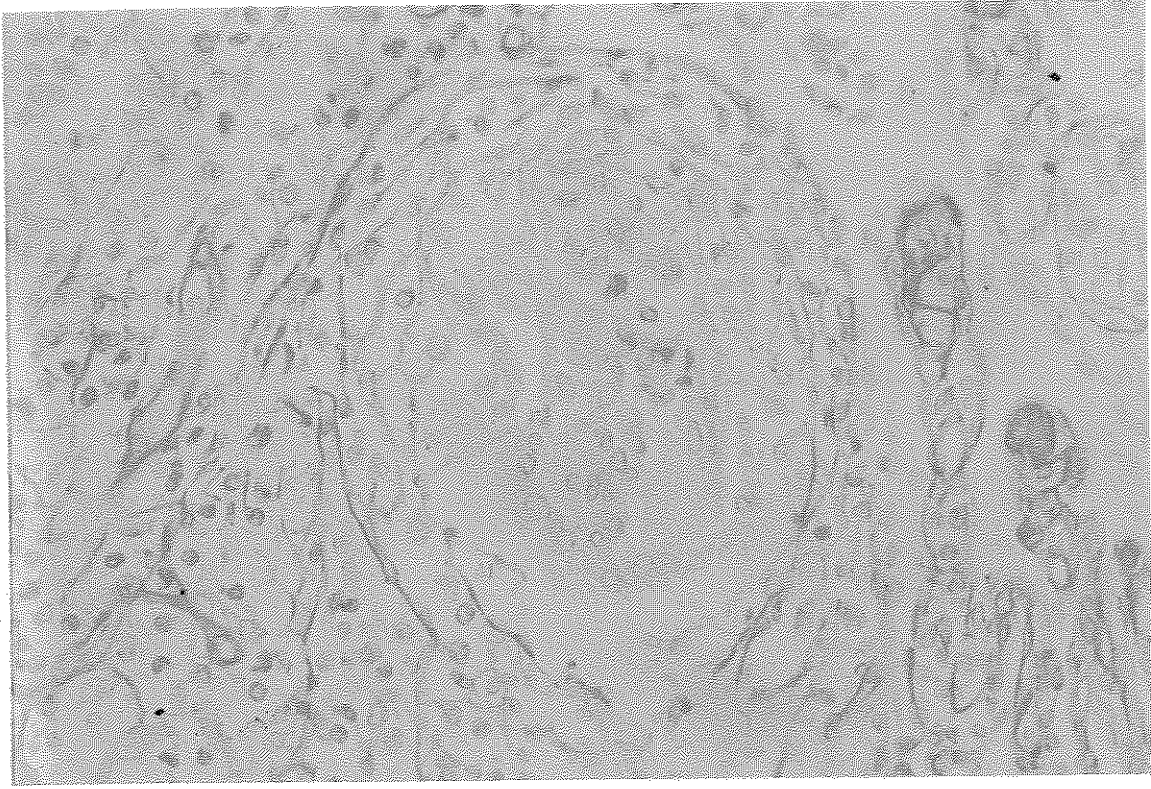
Kollajen 1 için, alveol epitelinde ve alveoler makrofajlarda birkaç olgudaki hafif ve orta dereceli boyanma dışında pozitiflik saptanmadı.

Boyanma özelliklerine ait bulgular Tablo 6'da gösterilmiştir.

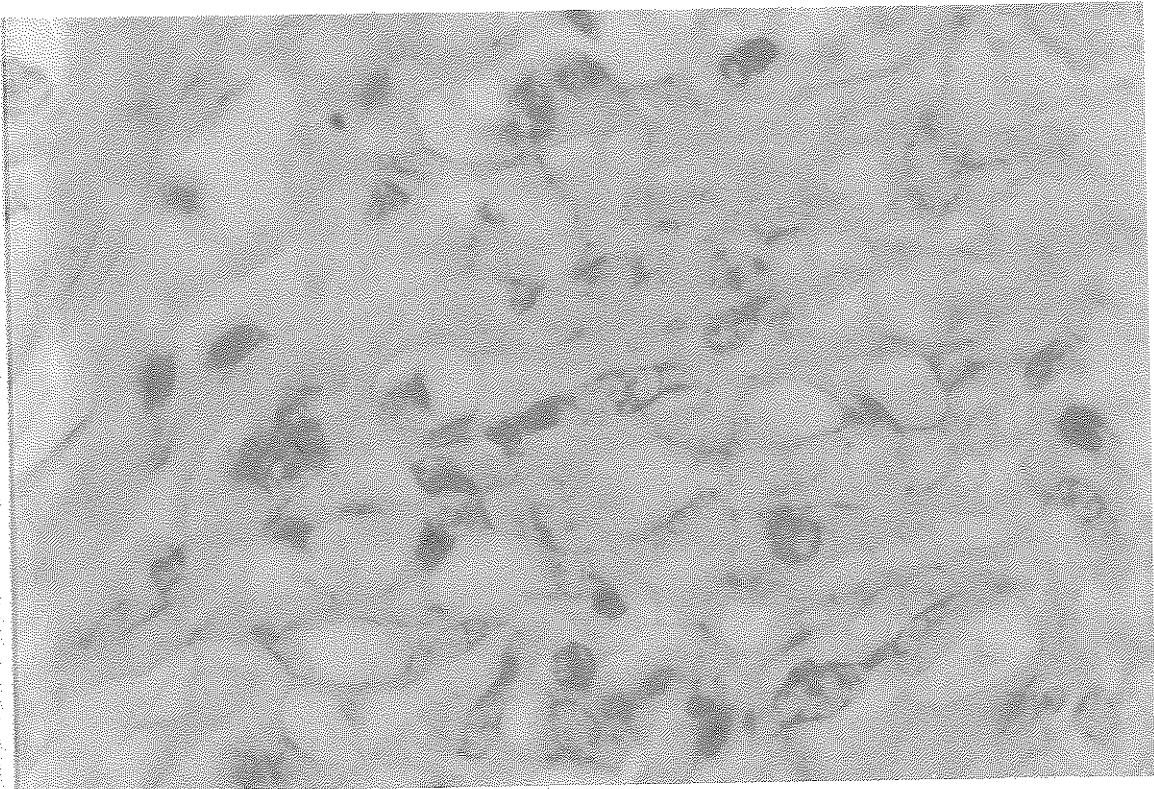
İstatistiksel olarak, hastalık süreleri ve tedaviye verilen yanıtlar ile kollajen 1 ekspresyonları arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunmadı.

Olgu	G.Ç.	G.İ.	D.H.	E.H.	Fib.	Len.	Dm.	B.E.	B.B.M.	A.E.	A.M.
1	++	+	-	-	Y	-	+++	-	++	+	-
2	+++	++	Y	Y	++	-	+++	+	++	-	-
3	++	+	-	-	++	-	++	Y	Y	-	-
4	+	-	-	-	Y	-	++	Y	Y	-	-
5	+++	-	Y	Y	Y	-	+++	Y	Y	-	-
6	+++	++	+	+	+++	-	+++	Y	Y	-	-
7	++	+	-	-	++	-	+++	Y	Y	+	+
8	+++	++	-	-	++	-	+++	Y	Y	-	-
9	++	+	-	-	++	-	++	Y	Y	-	-
10	++	+	-	-	+	-	++	-	Y	-	-
11	+	-	-	-	+	-	++	Y	Y	-	-
12	++	+	-	-	+	-	++	Y	Y	++	+
13	++	+	-	-	+	-	++	Y	Y	-	-
14	++	+	-	-	++	-	++	-	+	-	-
15	+++	+++	-	-	++	-	+++	-	+	-	-
16	+++	++	-	-	++	-	+++	-	Y	-	-
17	+++	+	-	-	++	-	++	-	Y	-	-
18	++	+	-	-	++	-	++	+++	+	-	-
19	++	+	+	+	Y	-	++	Y	Y	+	++
20	+++	++	-	-	Y	-	++	+	++	-	+
21	+	-	-	-	Y	-	+	-	+	-	-
22	+++	++	Y	Y	+++	-	++	Y	Y	-	-
23	+++	+++	-	-	++	-	+++	-	++	-	-
24	++	++	-	-	Y	-	+++	Y	Y	-	-
25	++	+	+	++	++	-	++	+	-	-	-
26	+++	++	-	-	++	-	+++	-	Y	++	+++
27	+++	++	-	-	++	-	+++	Y	Y	-	-
28	+	-	-	-	++	-	++	-	Y	-	-
29	+++	+	-	-	++	-	++	-	++	-	-
30	+++	++	+	+	+++	-	+++	++	+++	-	-
31	+++	++	++	+	+++	-	++	Y	Y	Y	Y
32	+++	++	-	-	+++	-	++	Y	Y	+	+
33	++	+	+	+	++	-	+++	+	+	+	++
34	++	+	+	+	+	-	+++	-	-	-	-
35	+	+	-	-	Y	-	+++	+++	+++	-	-
36	++	+	-	-	Y	-	++	-	-	-	-
37	+++	++	-	-	++	-	+++	-	Y	-	-
38	+++	++	-	-	Y	-	++	Y	Y	Y	Y
39	+++	+++	-	-	+++	-	+++	Y	Y	-	-
40	+	+	-	-	Y	-	+	-	-	-	-
41	++	+	-	-	Y	-	+++	Y	Y	-	-
42	+++	++	-	-	++	-	+++	Y	Y	-	-
43	+++	+++	-	-	++	-	+++	Y	Y	-	-

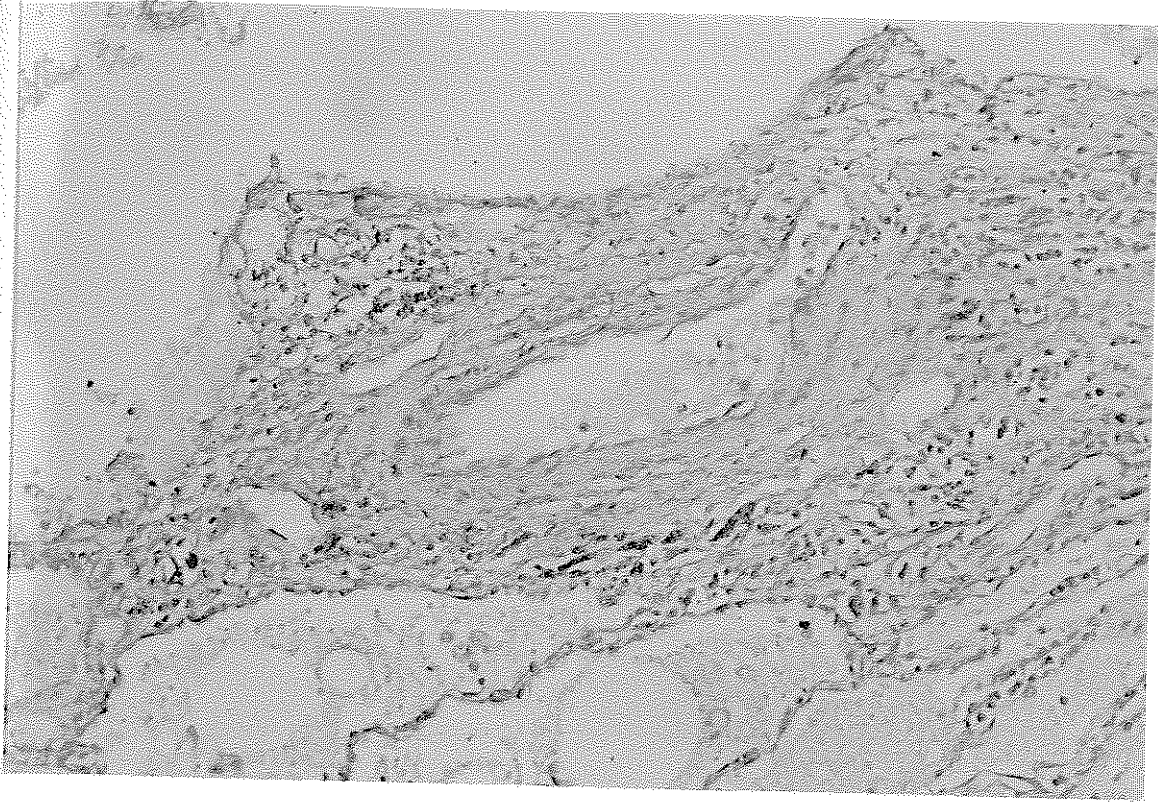
Tablo 6: Olgularda izlenen kollajen 1 ekspresyon yoğunluğu.



Resim 15 :Granülom yapısında kollajen 1 immünoreaktivitesi (Kollajen1X20).



Resim 16: Granülom çevresindeki fibroblastlarda kollajen 1 immünoreaktivitesi (Kollajen1X100).



Resim 17: Damar duvarında kollajen 1 pozitifliği (Kollajen1X20).

TGF-beta 1;

Granülomlar çevresindeki matrikste, birkaç olgudaki hafif ve orta yoğunluktaki pozitiflik (n = 9) dışında TGF-beta 1 ekspresyonu görülmedi.

Granülomlar içinde, az sayıda olguda TGF-beta 1 pozitifliği hafif ve orta şiddette (n = 5) izlendi.

Epiteloid histiyositlerde, bir grup olguda hafif (n = 16) ve orta (n = 13) şiddette TGF-beta 1 pozitifliği izlenirken; dev hücrelerde de aynı şekilde hafif (n = 13) ve orta (n = 13) yoğunlukta pozitif reaksiyon görüldü (Resim 18).

Granülomlar çevresindeki fibroblastlarda, bazı olgularda, hafif (n = 12) ve orta (n = 8) yoğunlukta pozitif reaksiyon saptandı (Resim 19).

Damar endotel hücrelerinde, TGF-beta 1 ekspresyonu bir grup olguda hafif (n = 14) ve birkaç olguda orta (n = 7) derecede izlenirken diğerlerinde görülmedi.

Bronşiyol epitelinde, bir grup olguda hafif (n = 5) ve orta (n = 12) şiddette pozitiflik saptanırken; bronşiyol bazal membranında hiçbir olguda reaksiyon görülmedi (Resim 20).

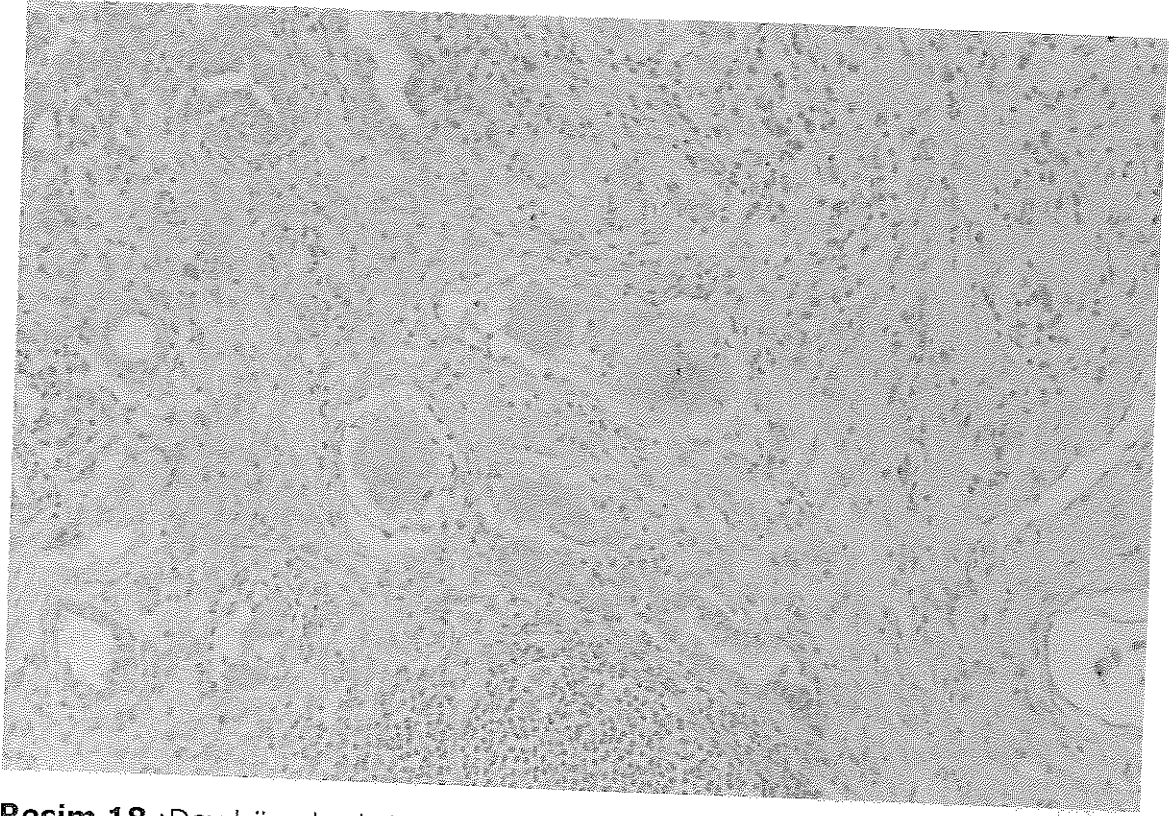
TGF-beta 1 pozitifliği, alveol epitelinde, bir grup olguda hafif (n = 12) ve orta (n = 13) şiddette izlendi (Resim 21).

Alveoler makrofajlarda, olguların çoğunda hafif (n = 5), orta (n = 22) ve şiddetli (n = 5) derecelerde TGF-beta 1 ekspresyonu saptandı (Resim 22).

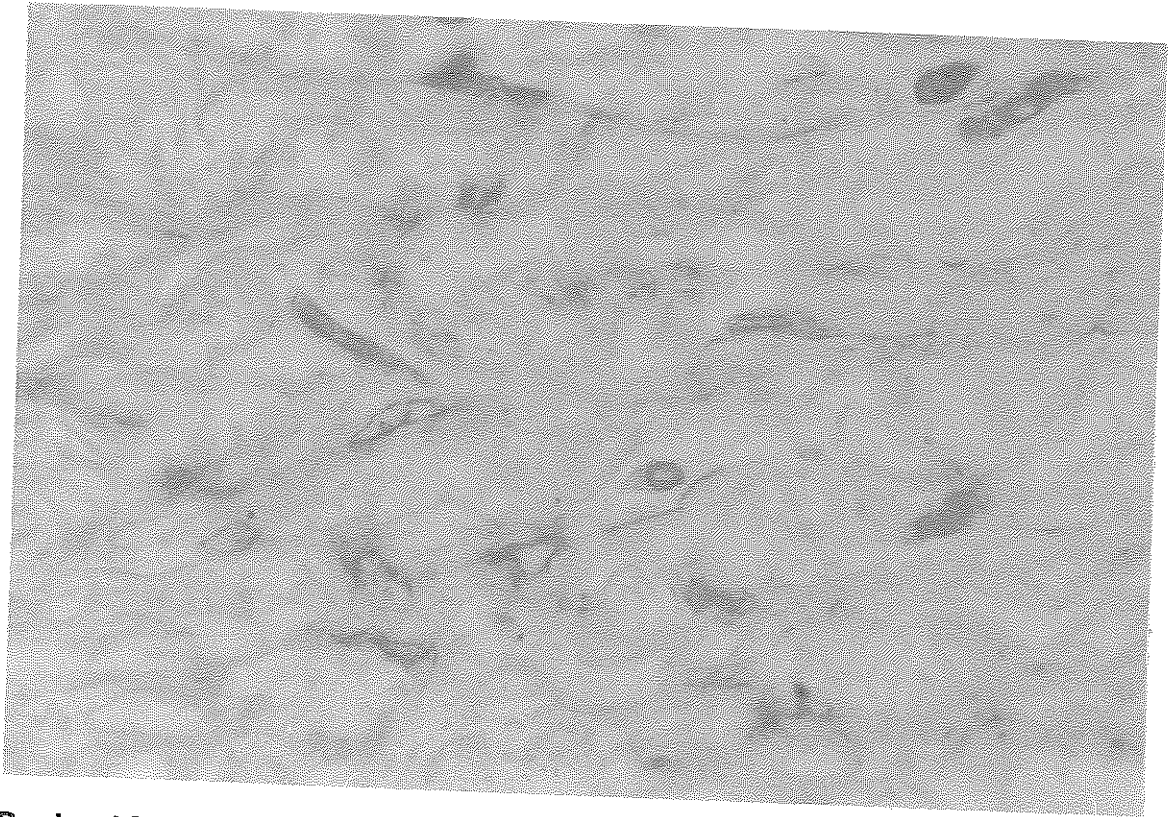
Boyanma özelliklerine ait bulgular Tablo 7'de gösterilmiştir.

Olgu	G.Ç.	G. İ.	D.H.	E.H.	Fib.	Len.	Dm.	B.E.	B.B.M.	A.E.	A.M.
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
2	-	-	Y	Y	-	-	++	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	++	+	+	-	-	-	-	++	++
5	-	-	Y	Y	-	-	-	Y	Y	-	-
6	+	-	++	++	++	-	++	Y	Y	++	+++
7	-	-	+	+	-	-	-	Y	Y	+	+
8	++	++	+	++	++	-	++	-	-	+	++
9	-	-	++	++	+	-	+	Y	Y	++	++
10	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
11	-	-	+	+	+	-	+	++	-	++	++
12	-	-	++	++	+	-	+	+	-	+	++
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	++	+	-	-	+	+	-	+	++
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	++	++	++	-	+	++	-	+	+++
17	-	-	++	++	+	-	+	-	-	++	++
18	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
19	-	-	+	+	-	-	-	Y	Y	++	++
20	-	-	-	+	-	-	-	++	-	++	++
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	++	-	++	++	+++	-	++	++	-	++	+++
23	++	++	+++	++	+++	-	++	++	-	+	++
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	+	+	-	-	-	++	-	+	+++
26	-	-	++	+	++	-	++	++	-	-	+++
27	-	-	+	+	+	-	+	Y	Y	++	++
28	-	-	-	-	-	-	-	Y	Y	-	-
29	-	-	-	-	+	+	+	++	-	++	++
30	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	++
31	-	-	++	++	+	+	+	Y	Y	Y	Y
32	+	+	+	+	+	-	+	Y	Y	+	++
33	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	++
34	-	-	+	-	-	+	-	++	-	-	+
35	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++
36	-	-	++	++	-	++	-	++	-	-	-
37	-	-	++	++	++	-	++	++	-	-	++
38	+	+	-	-	++	-	-	Y	Y	Y	Y
39	+	-	-	+	+	-	+	Y	Y	-	-
40	-	-	-	-	-	-	+	+++	-	+	++
41	-	-	++	++	+	-	+	Y	Y	+	++
42	++	++	+	+	++	-	-	-	-	-	++
43	-	-	+	++	++	-	+	Y	Y	++	++

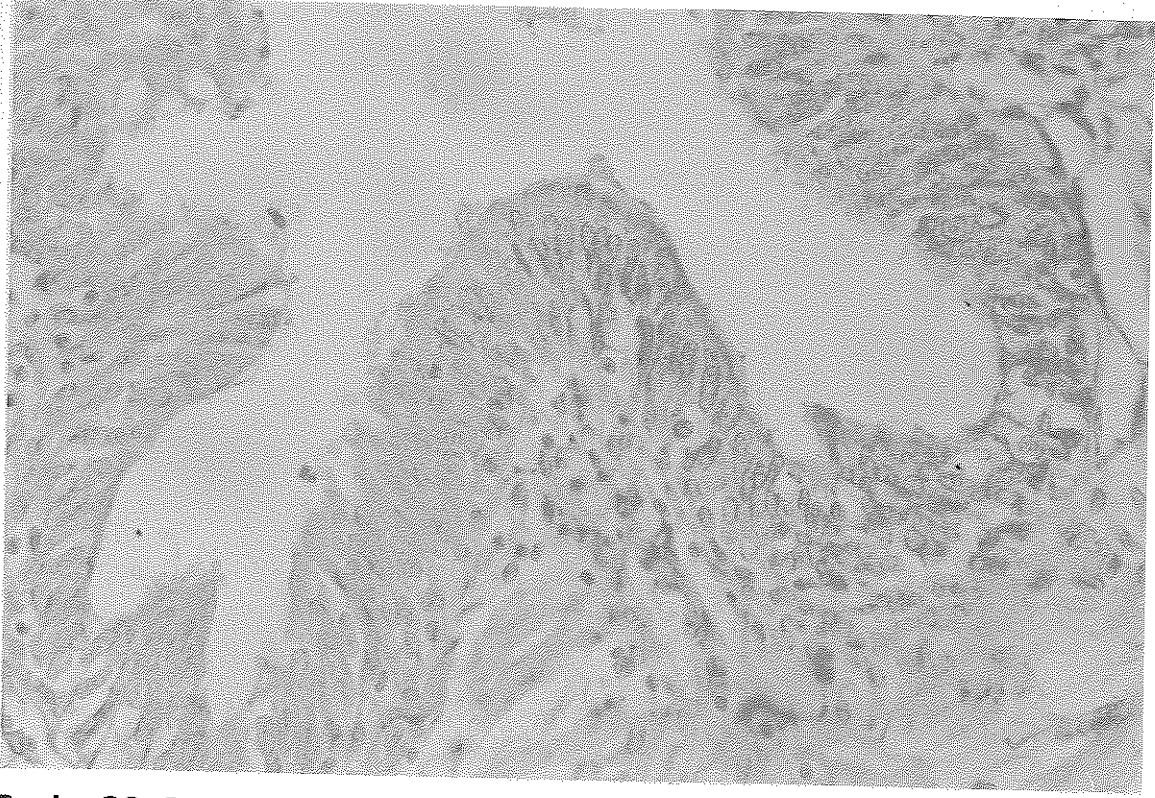
Tablo 7: Olgularda izlenen TGF-beta1 ekspresyon yoğunluğu



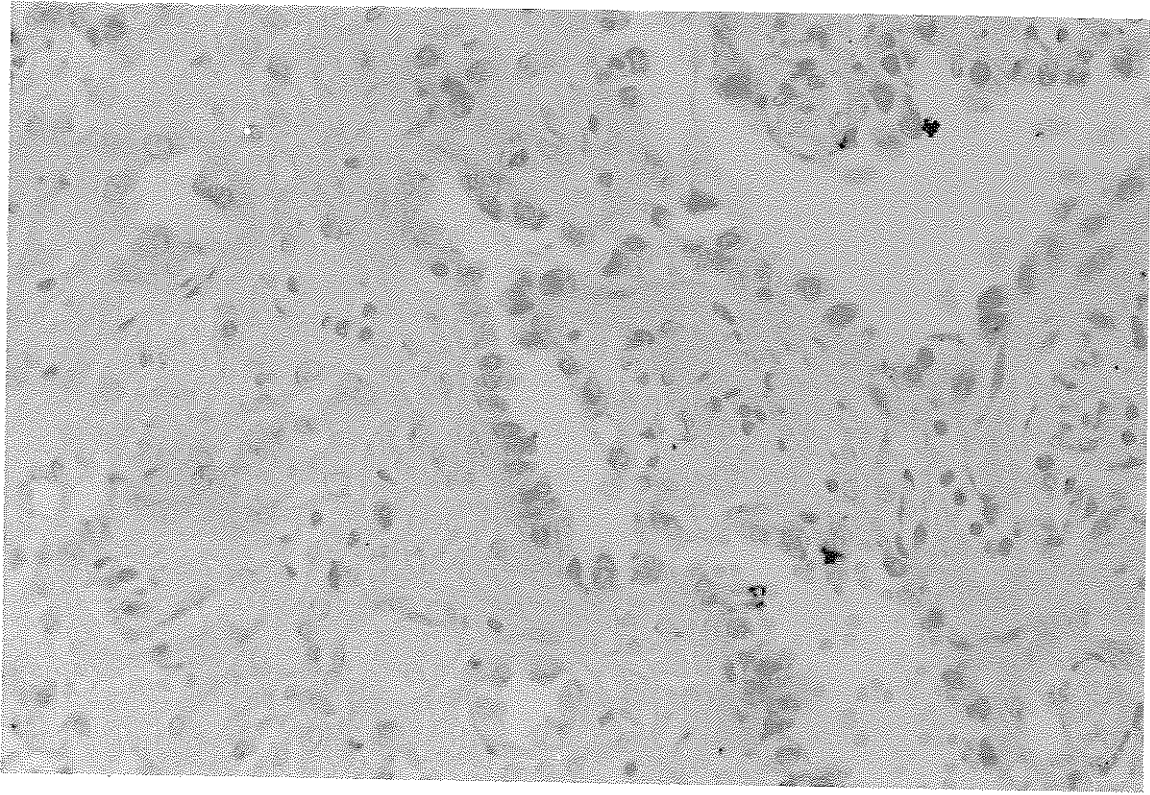
Resim 18 :Dev hücrelerde TGF-beta1 immünoreaktivitesi (TGF-beta1X20).



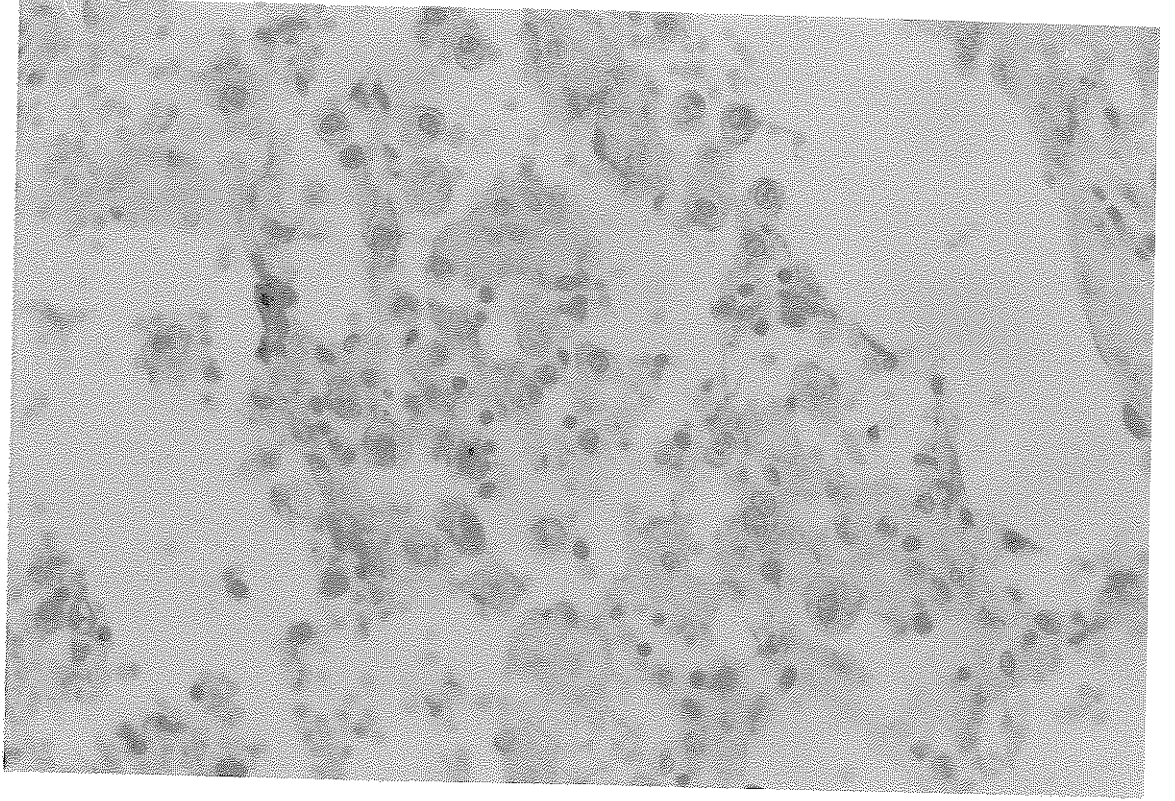
Resim 19:Granülom çevresindeki fibroblastlarda TGF-beta1 immünoreaktivitesi (TGF-beta1X100).



Resim 20 :Bronşiol epitelinde TGF-beta1 immünoreaktivitesi (TGF-beta1X40)

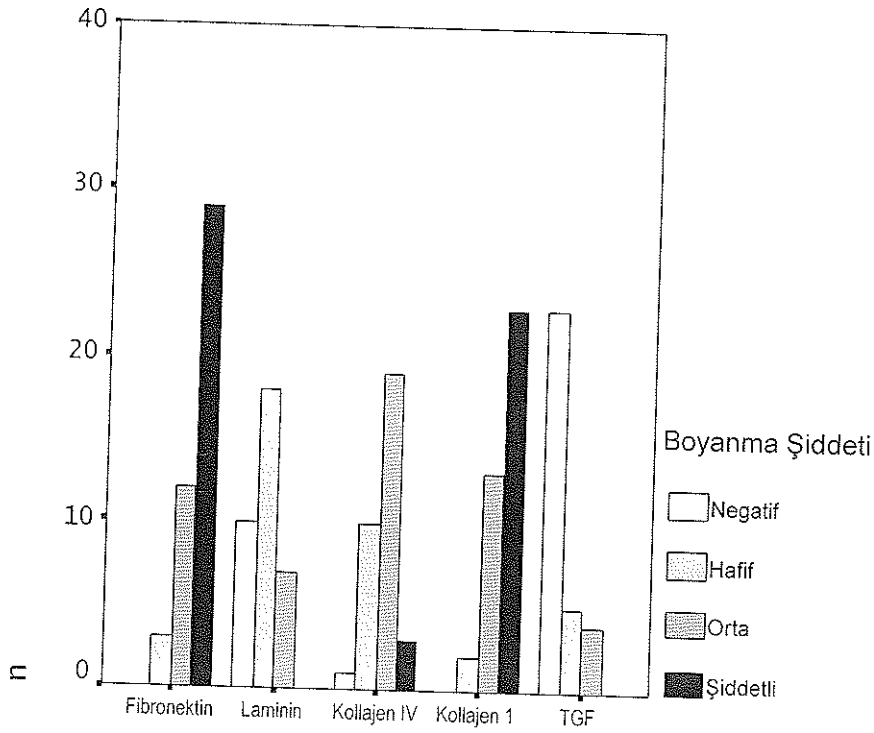


Resim 21: Alveol epitelinde TGF-beta1 pozitifliği (TGF-beta1X40).



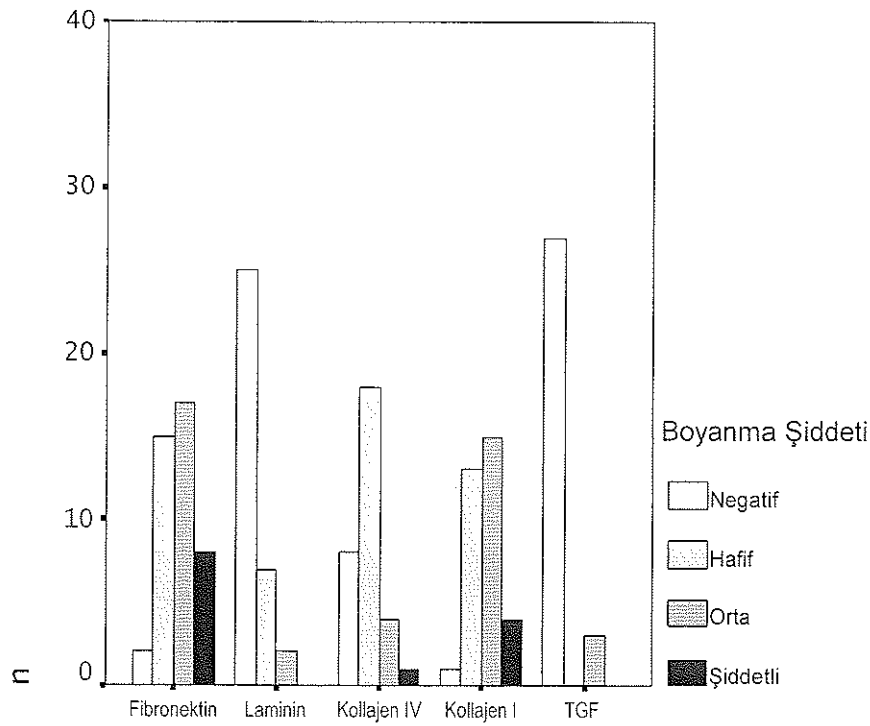
Resim 22 :Alveoler makrofajlarda TGF-beta1 pozitifliği (TGF-beta1X40).

İstatistiksel olarak, granülomlar çevresindeki ECM elemanları arasındaki ilişki incelendiğinde; granülomlar çevresindeki fibronektin ekspresyon yoğunluğu ile kollajen 4 ($p = 0.020$) ve kollajen 1 ekspresyon yoğunluğu ($p = 0.000$) arasında ve ayrıca kollajen 4 ile kollajen 1 yoğunlukları ($p = 0.001$) arasında pozitif bir korelasyon saptandı (Şekil 5).



Şekil 5: Granülomlar çevresindeki ECM elemanlarının yoğunluk dağılımı.

Granülomlar içindeki ECM elemanlarının birbirleriyle olan ilişkileri için, istatistiksel olarak; granülomlar içindeki fibronektin ekspresyon yoğunluğu ile granülomlar içindeki laminin ($p = 0.044$), kollajen 4 ($p = 0.025$) ve kollajen 1 yoğunlukları ($p = 0.004$) arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlendi. Ayrıca, granülomlar içindeki kollajen 4 ile kollajen 1 ekspresyon yoğunlukları da birbirleriyle korele bulundu ($p = 0.019$) (Şekil 6).



Şekil 6: Granülomlar içindeki ECM elemanlarının yoğunluk dağılımı

Granülomların çevresi ve iç kısmı arasında, ECM elemanlarının dağılımı açısından, her bir ECM elemanının kendisi ile, yani fibronektin ile fibronektin ($p = 0.000$), laminin ile laminin ($p = 0.000$), kollajen 1 ile kollajen 1 ($p = 0.000$) ve kollajen 4 ile kollajen 4 ($p = 0.002$) arasında pozitif korelasyon saptandı.

Fibroblastlardaki ECM elemanlarının ekspresyonu ile granülomlardaki ECM elemanlarının yoğunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde; istatistiksel olarak, fibroblastlardaki fibronektin ile granülomlar çevresindeki ($p = 0.000$), granülomlar içindeki ($p = 0.002$) ve epiteloid histiyositlerdeki ($p = 0.000$) fibronektin ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon izlendi. Aynı şekilde, fibroblastlardaki laminin ekspresyonu ile granülomlar çevresindeki laminin yoğunluğu ($p = 0.000$); fibroblastlardaki kollajen 4 ile granülomlar çevresindeki kollajen 4 ekspresyonu ($p = 0.003$); fibroblastlardaki kollajen 1 ile granülomlar çevresindeki kollajen 1 ($p = 0.004$) ve granülomlar içindeki kollajen 1 ($p = 0.037$) ekspresyonları birbirleriyle korele bulundu.

Epiteloid hücrelerdeki fibronektin ekspresyonu ile granülomlar çevresindeki ve içindeki fibronektin ekspresyonları arasında da anlamlı bir korelasyon belirlendi ($p = 0.000$ ve $p = 0.001$).

Dev hücrelerdeki fibronektin ekspresyonu ile granülomlar çevresindeki ve içindeki fibronektin yoğunluğu birbiri ile korele bulundu.

Fibronektin için, dev hücreler ve epiteloid histiyositlerdeki ekspresyonları arasında da pozitif korelasyon saptandı ($p = 0.000$).

Alveol epitelindeki fibronektin ekspresyonu ile bronşiol epiteli ve alveoler makrofajlardaki fibronektin ekspresyonları da korele bulundu ($p = 0.019$ ve $p = 0.045$). Benzer şekilde bronşiol epiteli ile alveoler makrofajlardaki fibronektin ekspresyonları arasında da korelasyon izlendi ($p = 0.029$).

Bronşiol epitelindeki fibronektin ve kollajen 1 ekspresyonları da korele bulundu ($p = 0.033$).

Olguların hastalık süreleri ile granülom yapılarının içerdiği ECM elemanlarının yoğunlukları arasında, istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı ilişki saptanmadı.

Granülomlardaki ECM elemanlarının yoğunluğu ile ilaç tedavisine verilen yanıt ta istatistiksel olarak ilişkisiz bulundu.

TGF-beta 1 ile granülomlardaki ECM elemanları arasındaki ilişki incelendiğinde; granülomlar çevresinde izlenen TGF-beta 1 ekspresyon yoğunluğu ile granülomlar çevresindeki kollajen 1 ve granülomların iç kısmındaki kollajen 1 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak paralel bir ilişki izlendi ($p = 0.010$ ve $p = 0.006$). Benzer şekilde, granülomlar içindeki fibronektin yoğunluğu ile granülomlar çevresi ve içindeki TGF-beta 1 ekspresyonları arasında pozitif bir korelasyon saptandı ($p = 0.004$ ve $p = 0.005$).

Ayrıca granülomlar içindeki kollajen 4 yoğunluğu ile granülomlar içindeki TGF -beta 1 ekspresyonu da paralel bulundu ($p = 0.041$).

Granülomlardaki laminin ile TGF-beta 1 ekspresyonları arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık izlenmedi.

Fibroblastlardaki TGF-beta 1 ekspresyon yoğunluğu ile granülomlar çevresindeki ve içindeki fibronektin; fibroblastlardaki fibronektin ve granülomlar içindeki kollajen 1 yoğunlukları da birbiri ile korele bulundu ($p = 0.001$; $p = 0.001$; $p = 0.019$; $p = 0.010$).

Epiteloid hücrelerdeki TGF -beta 1 ekspresyonu ile ECM elemanlarının ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğinde; granülomlar çevresindeki ve içindeki fibronektin; epiteloid histiyositlerdeki fibronektin ve dev hücrelerdeki fibronektin ekspresyonları ile epiteloid histiyositlerdeki TGF- beta 1 ekspresyonu arasında istatistiksel bir korelasyon saptandı ($p = 0.027$; $p = 0.013$; $p = 0.014$; $p = 0.030$).

TGF-beta-1'in dev hücreler ve epiteloid histiyositlerdeki ekspresyon şiddeti de birbiri ile korele bulundu ($p = 0.000$).

TARTIŞMA

Tüberküloz, insanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarından birisidir. Enfeksiyon hastalıklarının etkenlerinin tanımlanması, oluşum mekanizmalarının belirlenmesi ve hastaların tedavilerinin sağlanması yönünde yüzlerce yıldır yapılan çalışmalar sonucunda, tüberküloz hastalığının oluşum mekanizmasını belirlemede ve bu hastalığın tedavisini sağlamada elde edilen başarılar küçümsenemeyecek düzeydedir. Ancak, tüm bu başarılarla karşın tüberküloz hastalığı varoluşunu devam ettirmiştir ve günümüzde de toplumlar için, ekonomik kayıplara ve insan ölümlerine yolaçan önemli bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Yakın geçmişe kadar sağlık hizmetleri yetersiz ve ekonomik yönden zayıf ülkeler için daha büyük bir sorun iken, son yıllarda, AIDS hastalığının yaygınlaşması ve antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkması ile gelişmiş ülke toplumları için de önemli bir sorun olarak gündeme gelmiştir.

Tüberküloz enfeksiyonuna karşı insan vücudunda oluşan yangısal yanıt, granülomatöz yangı ile sonuçlanan T hücre aracılı gecikmiş tipte reaksiyondur.

Tüberkülozda oluşan granülomlarda, orta kısımda kazeifikasyon nekrozu, nekroz çevresinde epiteloid histiyositler, Langhans tipi dev hücreler, lenfositler, en dışta da fibroblastlar ve bağ dokusu yer almaktadır. Granülomatöz yangı, tüberkülozdan başka, sarkoidozis, kedi tırmığı hastalığı, lenfogranüloma inguinale, lepra, brusella, sifiliz ve bazı mikotik enfeksiyonlarda da oluşmaktadır.

Granülomatöz yangının oluşum mekanizmasına dair birçok şey bilinmesine karşın, halen tam olarak açıklanamayan birçok yönü vardır. Granülomatöz yangı oluşumunda temel koşul, yangıya neden olan ajanın vücudun savunma sistemleri tarafından kolayca parçalanamaması ve yokedilememesidir. Oluşan yangısal reaksiyon, durağan değildir; oluşumunda ve devamlılığının sağlanmasında sitokinlerin etkileri önemlidir.

Tüberküloza karşı vücudun savunulmasında ve hastalığın sınırlandırılmasında, T lenfositlerin aracılık ettiği, makrofajların aktivasyonu, epiteloid histiyositlerin ve dev hücrelerin oluşumu ile karakterize, granülom gelişimi ile sonuçlanan hücresel immün yanıt temel mekanizmadır. Bu hücresel immün yanıtta ek olarak, ECM elemanlarının da granülom oluşumunda ve tüberküloz enfeksiyonunun sınırlandırılmasında yoğun katkıları vardır.

Granülomatöz yangıda, ECM elemanlarının granülomlardaki ekspresyonunu ve granülom yapılanmasındaki rolünü belirlemek amacıyla yapılmış az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların çoğunluğu da sarkoidozisli olgularda yapılmıştır.

Sarkoidozis, nedeni bilinmeyen, kazeifikasyon nekrozu içermeyen granülom oluşumu ile karakterize, sistemik bir hastalıktır. Sarkoidoziste en sık etkilenen organ, akciğerlerdir. Akciğer tutulumunun ön planda oluşu, granülomların kazeifikasyon nekrozu içermemesi dışında yapısal olarak tüberküloz granülomlarına benzerliği ve immünolojik anormalliklerin varlığı sarkoidozis'in tüberküloz hastalığı ile birçok ortak yönü olduğunu göstermektedir. Tüberküloz ile sarkoidozis arasındaki tüm bu ortak yönlerin varlığı ve granülomatöz yangı gelişmesi için vücudun savunma mekanizmaları tarafından tam olarak yokedilemeyen bir etkenin gerekliliği, sarkoidozisin nedeninin Mycobacteriumlar olabileceğini düşündürmüştü ve

araştışıcıların bu yönde çalışmalar yapmalarına yolaçmıştır. PCR tekniği kullanılarak, sarkoidozisli dokularda Mycobacteriumlara ait DNA dizilerinin varlığının gösterilmesi temeline dayanan bu araştışmalarda birbiri ile çelişen sonuçlara ulaşılmıştır. H. Helmut ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştışmada, akciğer sarkoidozisli 35 olgunun 11'inde Mycobacteriumlara ait DNA dizilerinin varlığı saptanmıştır ve bazı sarkoidozis olgularında Mycobacteriumların etken olabileceği ileri srlmřtir¹¹⁶.

M.L.Wilsher ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, sarkoidozisli olguların akciğer dokularında Mycobacteriumlara ait DNA dizisi, yine PCR yöntemi ile aranmış; ancak varlığı gsterilememiřtir¹¹⁷. Bu araştışıcılar, sarkoidoziste Mycobacteriumların etken olmadığı sonucuna varmışlardır.

Benzer bir çalışmada, Ikuo Ishige ve arkadaşları, sarkoidozisli olguların lenf nodüllerinde Mycobacteriumlardan daha çok Propionibacterialara ait DNA dizilerinin varolduğunu PCR yöntemi ile belirlemişler ve sarkoidozisin Propionibacterilerle, Mycobacteriumlardan daha fazla ilişkili olabileceğini bildirmiřlerdir¹¹⁸.

Tüm bu çelişkili sonuçlara karşın, sarkoidozis ile tüberkülozis arasında klinik, histolojik ve immünolojik özellikler açışından birçok ortak yön vardır.

Sarkoidozisteki granülom yapılarında ECM elemanlarının dağılımını ve iyileşmedeki rolünü belirlemeye yönelik çalışmalar, tüberküloz enfeksiyonundaki hastalığı sınırlandırma ve iyileşme mekanizmalarında ECM elemanlarının rolünü belirlemede yol gösterici olabilir. Sarkoidoziste iyileşme olayı genellikle granülomlarda fibrozis ve hyalinizasyon gelişimi ile oluşmaktadır ve bu süreç interstisyel pulmoner fibrozis ile sonuçlanabilmektedir. Akciğer tüberkülozunda da bağ dokusu artışı ve

fibrozis gelişimi enfeksiyonun sınırlanmasında önemli bir rol oynuyor olabilir.

ECM, lokal olarak salgılanan ve hücreler çevresindeki boşluklarda toplanarak hücreleri bir ağ gibi saran makromoleküllerden oluşur. ECM hücreler için sadece bir destek yapı olmaktan öte birçok işlevi vardır. Hücreleri çevreleyen ECM, bu hücreler ile doğrudan ve sürekli bir ilişki içindedir ve hücrelerin çoğalma, hareket ve farklılaşma gibi birçok fonksiyonunu direk olarak etkiler. Hücreler üzerindeki doğrudan etkileri dışında; yumuşak dokuların turgorunu sağlayan su, kemik dokuların yapısına katılan mineraller, hücre çoğalmasını kontrol eden büyüme faktörleri gibi birçok eleman için rezervuar görevi görür. Bunlardan başka; morfogenezis, yara iyileşmesi ve hatta tümör invazyonu ve metastaz gibi birçok olaya doğrudan katılır⁹.

ECM'in granülomatöz yangının oluşumuna katılımını ve yangının sınırlandırılmasındaki rolünü belirlemek için yapılmış az sayıda araştırma vardır. Sarkoidozis ve tüberkülozis gibi granülomatöz hastalıklarda, akciğerde irreversible skar oluşumu oldukça sık görülen bir olaydır. Her iki hastalık da, T lenfosit ve makrofaj aktivasyonu, gecikmiş tipte hipersensitivite reaksiyonu ve inflammatuar sitokinlerin varlığı ile karakterizedir. Kronik yangıdan fibrozis gelişimine doğru gidişte, interlökin-1-beta (IL-1-beta), TNF-alfa, TGF-beta ve platelet derived growth factor (PDGF) gibi bazı sitokinlerin katkıları vardır. TNF-alfa'nın, pulmoner fibrozis gelişimi, granülom oluşumu ve devamlılığının sağlanması olaylarında katkıları olduğu fare ve insanlarda gösterilmiştir. TGF-beta ve PDGF'nin, doku onarımının sağlanmasında önemli katkıları vardır. Ancak, aşırı miktarda bulduklarında ortadan kaldırılamayan yangı ve fibrozis gelişimine neden olabilirler. Tüberküloz ve sarkoidoziste,

kronik yangıdan fibrozise gidişte TGF-beta ve PDGF'nin katkıları olduğuna dair birçok kanıt vardır¹¹².

TGF-beta grubunu oluşturan sitokinler, ECM'in düzenlenmesi ve yara iyileşmesinde yoğun etkileri olduğu bilinen en önemli etmenlerdendir. TGF-beta, ECM'i oluşturan yapıların ekspresyonunu doğrudan uyararak ve ECM'i yıkan proteazların düzeylerini azaltarak ve aynı zamanda proteaz inhibitörlerini stimüle ederek ECM düzenlenmesine katkıda bulunur. TGF-beta'nın, birçok farklı dokulardaki fibroblastlarda farklı kollajen tiplerinin üretimini artırdığı; fibronektin ve fibronektin reseptörü ekspresyonunu çoğalttığı; bazı mezankimal ve epitelyal hücrelerden kondroitin/dermatan sülfat proteoglikanlarının salınımını artırdığı; bleomisine bağlı gelişen akciğer fibrozisinde temel uyarıcı etken olduğu; yara iyileşmesi sırasında yangı hücrelerinin kemotaksisi, anjioneogenez, ECM birikimi, granülasyon dokusu gelişimi, reepitelizasyon, fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümü gibi birçok olayda merkezi bir rol oynadığı saptanmıştır.

Granülomatöz yangıda ECM elemanlarının rolü ve TGF-beta'nın etkilerini araştırmak için yapılmış az sayıda araştırma vardır.

Zahra Toossi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; tüberkülozlu hastalardan elde edilen kan monositlerinden oluşan kültür ortamında, spontan TGF-beta salınımının kontrol olarak kullanılan sağlıklı bireylerinkine göre belirgin olarak artmış olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, TGF-beta 1 mRNA'sının ekspresyonunun tüberkülozlu olguların monositlerinde, kontrollere göre artmış olduğu da saptanmıştır. Bu araştırmacılar, kan monositlerindeki TGF-beta artışının Mycobacteriumlara ait hücresel elemanların uyarısı sonucu olduğunu ve bu TGF-beta artışının tüberkülozda T hücre yanıtının baskılanmasına yolaçabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, akciğer dokusu elde edilebilen 2 olguda immunohistokimyasal olarak TGF-beta 1'in

granülomlardaki ekspresyonu da araştırılmış ve TGF-beta 1'in özellikle Langhans tipi dev hücreler ve daha az olarak ta epiteloid histiyositlerin sitoplazmalarında eksprese edildiği görülmüştür. Araştırmacılar, dev hücrelerin ve epiteloid histiyositlerin kan monositlerinden köken aldığını belirtmişler ve yerel alveoler makrofajlardan çok monositlerin TGF - beta'nın kaynağı olduğunu ileri sürmüşlerdir⁹³.

Biz de araştırmamızda, akciğer tüberkülozundaki granülomlarda TGF-beta 1'in epiteloid histiyositler ve Langhans tipi dev hücrelerde hafif ve orta şiddette eksprese olduğunu saptadık. Langhans tipi dev hücreler ile epiteloid histiyositlerde, TGF-beta 1 ekspresyon şiddeti açısından bir farklılık izlenmedi ve ekspresyonun birbiri ile korele olduğu saptandı (p = 0.000). TGF-beta-1 ekspresyonunun, dev hücreler ve epiteloid histiyositlerde eşit ve korele oluşu, her iki hücrenin aynı kökenden geldiğini destekleyen bir bulgu olarak değerlendirilebilir. Bizim araştırmamızda, TGF-beta 1 ekspresyonu alveoler makrofajlarda olguların çoğunluğunda orta derecede, bir kısmında ise hafif ve şiddetli derecelerde olmak üzere hemen hemen tüm olgularda izlendi. Bu bulgu Zahra Toossi ve arkadaşlarının öne sürdükleri bulgular ile çelişmektedir ve T hücre baskılanmasında alveoler makrofajlarca eksprese edilen TGF-beta 1'inde bu olayda rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Maeda ve arkadaşları tarafından, plevra tüberkülozu olan 5 olguya ait biyopsi örneklerinde, TGF-beta 1'in latent formunun bir komponentine karşı kullanılan antikor ile immunohistokimyasal yöntemle yapılan çalışmada, pozitif reaksiyon, granülomlar çevresindeki immatür fibrotik alanlarda ve özellikle de mezotelyal ve fibroblastik hücrelerde izlenmiştir. Araştırmacılar, granülomlar içinde TGF-beta 1 için pozitif reaksiyon saptamamışlardır. Aynı çalışmada, plevra sıvısında ELISA yöntemi ile ölçülen TGF-beta 1 ve IFN gamma düzeyleri kontrol olgulara göre belirgin

olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgularla, araştırmacılar, plevral tüberkülozda TGF-beta 1'in ana kaynağının mezotel hücreleri ve fibroblastlar olduğunu, normal plevrada TGF-beta 1'in çok az üretildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, plevral tüberküloz olgularında, TGF-beta'nın doku onarımı ve plevral fibrozis gelişiminde önemli bir rolü olabileceğini bildirmişlerdir¹¹⁵.

Bizim çalışmamızda, TGF-beta 1 ekspresyonu granülomlar çevresindeki fibroblastlarda, olguların çoğunda orta şiddette olmak üzere birçok olguda izlendi. Bu durum, fibroblastların granümatöz yangıda TGF beta 1 üretimine katıldıklarını göstermektedir. Maeda ve arkadaşlarının tersine, biz TGF-beta 1 ekspresyonunu dev hücreler ve epiteloid histiyositlerde de izledik.

Marshall ve arkadaşları tarafından 8 adet tüberküloz ve 6 adet sarkoidoz olgusuna ait cilt biyopsisinde yapılan bir çalışmada; immunohistokimyasal olarak anti human panTGF-beta ekspresyonu incelenmiş ve tüberküloz olgularında TGF-beta ekspresyonu granülomu çevreleyen ECM te ve fibroblastlarda görülmüş; granülom içinde ise saptanmamıştır. Sarkoidoz olgularında ise TGF-beta'nın tüm granülomlar boyunca ve granülomlar içindeki makrofajlarda ve çevredeki fibroblastlarda eksprese edildiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada Tip 1 prokollajen ve fibronektinin immunohistokimyasal ekspresyonu da değerlendirilmiştir. Tip 1 prokollajen için, tüberkülozlu olgularda fibroblast morfolojisindeki hücrelerde granülomun merkezine doğru dağınık olarak; granülom kenarlarında ise granümları birbirinden ayıracak biçimde pozitif boyanma izlenmiştir. Sarkoidoz spesmenlerinde ise, Tip 1 prokollajen, tüberkülozlu olgulara göre granümların merkezinde ve kenarlarındaki hücrelerde daha az belirgin olarak saptanmıştır. Fibronektin ekspresyonu, hem tüberküloz ve hem de sarkoidoz granümları için,

çevredeki matrikste ve fibroblastlarda izlenmiştir. Aynı çalışmada, tüberküloz basili ile kontak öyküsü olan 36 olgu ve sağlıklı 12 olguya PPD testi uygulanmış ve aralıklı biopsilerle Tip 1 prokollajen, fibronektin ve alfa düz kas aktinindeki değişimler immunohistokimyasal yöntemle incelenmiştir. Tip 1 prokollajen için, hücresel boyanma ve matriks boyanmasında birinci günden itibaren orta derecede ancak belirgin olarak artış gözlenmiş ve bu artışın ondördüncü günde maksimuma ulaştığı saptanmıştır. Fibronektin artışı, hücrelerde birinci günden üçüncü güne kadar belirgin olarak izlenmiş ve bundan sonra sabit olarak kalmıştır. Matrikste ise fibronektin artışı altıncı günden sonra izlenmiştir. Alfa düz kas aktini artışı birinci günden onuncu güne kadar izlenmiştir¹¹².

Bu çalışma sonucunda araştırmacılar, Tip 1 prokollajen artışının yeni kollajen yapımının bir göstergesi olduğunu; fibronektin üretiminin, granülom oluşumunda önemli olan hücre migrasyonu ve granülomun devamlılığının sağlanmasında katkıları olduğunu; granülomlarda lokal fibrotik sürecin TGF-beta üretimi ile sağlanıyor olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, TGF-beta'nın Mycobacterium tuberculosis'in makrofajlar içindeki çoğalmasını artırıcı etkisi ve diğer sitokinlerle oluşturulan makrofaj aktivasyonunu engelleyici etkilerini göz önüne alarak TGF-beta'nın fibrozis oluşumuna katkısı ile oluşan yararlı etkisinin, bakterinin vücut tarafından tamamen öldürüldükten sonra ortaya çıkabileceğini ileri sürmüşlerdir.

A.H.Limper ve arkadaşları tarafından 7 adet akciğer sarkoidozlu olgunun biyopsi materyallerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, TGF-beta 1 ekspresyonu özellikle epitelooid hücrelerde ve daha az yoğunlukta da dev hücrelerde saptanmıştır. Ayrıca, alveoler makrofajlar, bronşiol epiteli, Tip II pnömositler ve alveoler septalardaki kapiller damarlarda hastaliksız kontrol olguları da dahil olmak üzere tüm

sarkoidozis olgularında pozitif boyanma görülmüştür. Aynı çalışmada, fibronektin, alfa5beta1 fibronektin reseptörü ve TGF-beta 1'i bağlayıcı bir proteoglikan olan decorin de incelenmiş ve fibronektin ile fibronektin reseptörü epitelooid histiyositlerde, çevre dokudaki fibroblastlarda ve çok az olarak ta dev hücrelerde saptanmıştır. Çevre akciğer parankiminde ise; fibronektin ekspresyonu, alveoler kapillerlerde ve belirgin olarak ta alveoler makrofajlarda gözlenmiştir. Fibronektin reseptörü ekspresyonu ise, büyük damarları çevreleyen bağ dokusunda ve daha az olarak ta alveoler septalarda izlenmiştir¹¹³.

Katsunori Shigehara ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sarkoidozlu 25 olguya ait scalen lenf nodüllerinde TGF-beta 1, bazı integrinler ve ECM elemanlarının immunohistokimyasal ekspresyonunun, granülom yapılarının stajeleri de dikkate alınarak, değerlendirildiği bir araştırmada; TGF-beta 1'in granülomlardaki epitelooid hücrelerde ve dev hücrelerde, matür granülomlarda daha belirgin olmak üzere, granülomların tüm stajelerinde eksprese olduğu belirlenmiştir. Ekspresyon yoğunluğunun, aktif dönemdeki granülomlarda diğer dönemlere göre daha belirgin olduğu saptanmıştır. Ayrıca TGF-beta 1 pozitifliği fibroblastlarda da izlenmiştir. Bu çalışmada, ECM elemanlarından kollajen 1, 3, 4, fibronektin, laminin, vitronektin ve tenaskin ekspresyonu değerlendirilmiştir. İmmatür granülomlarda, fibronektinin granülomların periferinde konsantrik olarak bulunduğu; aktif dönemde, kollajen 4 ve laminin dışındaki ECM elemanlarının granülomların periferinde konsantrik tarzda belirgin olarak ve granülomların içinde ve kenarlarında fibriler yapıda zayıf olarak boyandığı saptanmıştır. Granülomların fibrotik görünümde olduğu ve epiteoid hücrelerin dejenere olarak atrofiye uğradığı regresif dönemde ise kollajen 4 ve laminin dışındaki tüm ECM elemanlarının, granülomların tamamında yaygın ve yoğun olarak varolduğu

belirlenmiştir. Ayrıca bu dönemde, diğer dönemlere göre fibroblastların aktif olarak proliferasyon yaptığı ve yine diğer dönemlere göre kollajen 4 ve laminin dışındaki ECM elemanlarının fibroblastlarda daha yoğun bir biçimde ifade edildiği görülmüştür. Bir başka bulgu olarak, tüm ECM elemanlarının pozitif boyanma açısından, kapillerler de dahil olmak üzere, damarlarla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu araştırmacılar, sarkoidozisteki fibrozis gelişim mekanizmasının tam olarak anlaşılmasını sağladığını, ancak TGF-beta 1'in sarkoid granülomlarının regresyonunda ve fibrozis gelişiminde önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca granülom oluşumunda, fibronektin ile alfa5beta1 integrin arasındaki etkileşimin de önemli olabileceğini bildirmişlerdir¹¹⁴.

Bizim çalışmamızda, granülomlardaki ECM elemanlarının ekspresyonu değerlendirildiğinde, granülomlar çevresinde ve içinde en yoğun ekspresyon fibronektin için saptandı. Kollajen Tip 1 ekspresyonu, fibronektin kadar olmasa da ona yakın bir yoğunlukta izlendi. Kollajen Tip 4 için orta derecede bir ekspresyon yoğunluğu belirlendi. En az boyanma ise lamininde görüldü. Laminin için gözlenen minimal ekspresyon yoğunluğunun daha çok damarlar ile ilişkili olduğu izlenimi edinildi.

Granülom yapısına katılan ECM elemanlarından en yoğun olarak fibronektin'in izlenmesi, granülom gelişiminde diğer ECM elemanlarına göre fibronektin'in daha yoğun katkıları olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca bizim çalışmamızda dev hücrelerde ve epiteloid histiositlerde fibronektin ekspresyonunun saptanmış olması; diğer ECM elemanlarının ise birkaç olgudaki hafif boyanma dışında izlenmemesi bu düşüncüyü desteklemektedir. Bu bulgular, daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarla da uyumludur.

Granülomlar çevresindeki fibronektin, kollajen 1 ve kollajen 4; granülomlar içindeki fibronektin, kollajen 1, kollajen 4 ve laminin

arasındaki korelasyon ve ayrıca granülomların çevresi ve içindeki elemanların kendi kendileri ile istatistiksel korelasyon göstermesi, ECM elemanlarının granülom oluşumuna birlikte katıldıklarını ve belki de aynı etkenler tarafından yönlendirildiklerini göstermektedir.

ECM elemanlarının granülomların çevresinde bulunan fibroblastlardaki ekspresyonu incelendiğinde; en yoğun ekspresyon, fibronektin ve kollajen 1 için saptandı. En zayıf boyanma yoğunluğu ise lamininde gözlemlendi. İstatistiksel olarak, fibroblastlardaki fibronektin ekspresyonu ile granülomlar çevresindeki ve granülomlar içindeki fibronektin pozitifliği arasındaki paralellik; dev hücreler ve epiteloid histiyositlerdeki fibronektin ile granülomlar çevresinde ve içindeki fibronektin arasındaki korelasyon, fibronektin'in kökeninin bu hücreler olduğunu doğrulayan bir durum olarak değerlendirildi. Aynı korelasyon diğer ECM elemanları için de saptandı.

Tüm ECM elemanlarının, granülomlar çevresindeki ve akciğerin diğer alanlarındaki damarlarda pozitif boyanma gösterdiği izlendi. ECM elemanlarının, kazeifikasyon nekrozu içeren alanlarda da damarları yansıtabilecek şekilde eksprese olduğu dikkati çekti.

ECM elemanlarının alveoler makrofajlardaki ekspresyonları incelendiğinde hemen hemen tüm olgularda, fibronektin'in alveoler makrofajlarda pozitif boyanma gösterdiği görüldü. Bu durum, A.H.Limper ve arkadaşları tarafından akciğer sarkoidozisi olgularında yapılan çalışmada da gözlemlenmiştir¹¹³. Diğer ECM elemanları için, alveoler makrofajlarda az sayıda olguda pozitiflik izlendi.

Fibronektin, ECM matriks içinde yer alan, adhesive glikoproteinlerden birisidir. Fibronektin'in ECM'teki primer rolü, hücrelerin matrikse tutunmasını sağlamaktır. Fibronektin, fibroblastlar, monositler, endotel hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilir⁹. Alveoler

makrofajlar, fibronektin için potansiyel bir kaynaktır¹¹⁹. Alveoler makrofajlarda, fibronektin üretiminin ve spontan salınımının bazı viral hastalıklarda arttığı gösterilmiştir¹²⁰. Bronkoalveoler lavaj sıvısında bulunan fibronektin'in, terminal hava yollarındaki mikroorganizmalar ve partiküllerin temizlenmesinde bir opsonin olarak görev yaptığı ve bronkoalveoler defansta önemli olabileceği bildirilmiştir¹²¹. Ayrıca, *Staphylococcus aureus*'un alveoler makrofajlar tarafından alınımını fibronektin'in artırdığı belirlenmiş ve fibronektin'in *S.aureus* için non-immün bir opsonin olarak temel bir rol oynadığı ileri sürülmüştür¹²². Alveoler makrofajlardan salgılanan fibronektin'in pulmoner fibrozis gelişiminde rol oynayabileceği bazı araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür¹²³. M.A.Spiteri ve arkadaşları tarafından, akciğer sarkoidozisli olgularda, farklı antijenik özellikleri olan; yüksek miktarda fibronektin içeren; fagositoz kapasitesi ve lizozomal enzim aktivitesi fazla olan bir alveoler makrofaj alt tipi belirlenmiştir. Bu makrofaj alt tipinin, bronkoalveoler lavajda, normal bireylere göre sarkoidozis'li olgularda daha yüksek oranda bulunduğunu saptamışlar ve sarkoidozis'e spesifik olan bu makrofaj tipinin hastalığın gidişini belirlemede önemli olabileceğini belirtmişlerdir¹²⁴.

Biz de çalışmamızda alveoler makrofajlarda, fibronektin ekspresyonunu saptadık. Ancak, alveoler makrofajlardaki fibronektin ekspresyonu ile hastaların tedaviye verdikleri yanıt arasında herhangi bir istatistiksel ilişki saptamadık. Aynı şekilde, diğer ECM elemanları ile de tedaviye yanıt arasında ilişki izlemedik. Bu sonuçta, tedaviye verilen yanıt ile ilgili bilgileri az sayıda olguda elde edebilmiş olmamızın etkisi olabileceği gibi, gerçekten de bu iki parametre ilişkisiz olabilir.

Buna karşın, alveoler makrofajlarda, fibronektin için önemli oranda ekspresyon saptanması, bu durumun akciğer tüberkülozunda önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, ECM elemanları için, bazı olguların bronşiol epiteli ve alveol epitelinde, daha çok fibronektin ve kollajen 4 için, hafif ve orta şiddette bir boyanma paterni gözlemlendi. Bronşiol bazal membranlarında da ECM elemanlarının ekspresyonu saptandı.

TGF-beta, birçok hücre tarafından üretilen ve insan organizmasında çeşitli işlevleri olan bir maddedir. TGF-beta'nın tüberküloz enfeksiyonu ve granülomatöz yangı oluşumu üzerinde çok çeşitli etkilerinin olabileceğini gösteren birçok kanıt vardır.

Bizim çalışmamızda, TGF-beta 1'in granülomlardaki ekspresyonunu incelediğimizde; granülomların çevresi ve içindeki matrikste bazı olgularda hafif ve orta şiddette bir ekspresyon izledik. Granülomlarda, TGF-beta 1 için en yoğun pozitifliği epiteloid histiyositler ve Langhans tipi dev hücrelerde saptadık. Granülomlar çevresinde yer alan fibroblastlarda da birçok olguda TGF-beta 1 ekspresyonu olduğunu belirledik. Akciğer'in diğer alanlarında ise, en yoğun ekspresyonu alveoler makrofajlarda saptadık. Ayrıca birçok olguda, damar endoteli, bronşiol epiteli ve alveol epitelinde TGF-beta 1 ekspresyonu olduğunu izledik.

Granülomlar çevresindeki, granülomlar içindeki, fibroblastlardaki, dev hücreler ve epiteloid histiyositlerdeki TGF-beta 1 ekspresyonları ile granülomların yapısına katılan bazı ECM elemanlarının yoğunlukları arasında izlediğimiz paralellikler, TGF-beta 1'in tüberküloz granülomlarına ECM elemanlarının katılımında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, TGF-beta 1'in çeşitli dokularda, bağ dokusu artışı ve fibrozis gelişimini uyarıcı etkileri ile de uyumludur. TGF-beta 1 ekspresyonları ile laminin arasında ise herhangi bir korelasyon saptamadık. Bunun nedeni,

laminin ekspresyonunun granülomlarda çok az oluşu ve daha çok damarlar ile ilişkili olarak izlenmesi olabilir.

TGF-beta 1'in T hücre fonksiyonlarını baskılayıcı etkileri olduğunu; Mycobacteriumların makrofajlar içinde üremesini artırdığını ve makrofajların bakteriyi öldürme kapasitesini azalttığını gösteren birçok çalışma vardır.

Bizim araştırmamızın amaçlarından birisi de, TGF-beta 1'in akciğer tüberkülozundaki dokularda bakteri miktarı üzerindeki olası etkilerini belirlemektir. Ancak, aside dirençli bakteri boyama yöntemi ile, sadece 1 olguda bakterileri boyama başarısı sağlayabildik.

Çalışmamızda, boyama yöntemi olarak, Kinyoun yöntemini uyguladık ve daha önce başarılı boyanma sağlanmış üriner sistem tüberkülozlu bir olguya ait parafin bloğa gömülü doku örneğini pozitif kontrol olarak kullandık. Boyama yönteminin her uygulandığında, kontrol olarak kullandığımız doku örneğinde bakteriler boyandı. Bu durum, yöntemi doğru uyguladığımızı göstermektedir.

A.Mert ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, milier tüberkülozlu olgularda, olguların %37'sinde aside dirençli basil varlığı balgam ve bronkoalveoler lavajda saptanmış; olguların %90'ında bakteri kültürde üretilmiştir. Dokuda ise hiçbir olguda boyanma izlenmemiştir¹²⁵. Bu durum, bizim çalışmamızda da saptandığı gibi, akciğer dokusunda, aside dirençli bakteri boyama yönteminin başarı şansının düşük olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın diğer bir amacı da, olguların hastalık süreleri ve tedaviye verdikleri yanıt ile granülomların yapısal özellikleri ve TGF-beta 1 ekspresyonu arasındaki ilişkileri belirlemektir. İstatistiksel değerlendirme sonucunda; olgularda, hastalık süresi- granülom düzeni; hastalık süresi- nekroz oranları; tedaviye yanıt-yaş; tedaviye yanıt-cinsiyet; tedaviye yanıt-

granülom düzeni; tedaviye yanıt-nekroz oranı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ayrıca TGF-beta 1'in granülomlardaki ve akciğerin diğer alanlarındaki ekspresyon yoğunlukları ile tedaviye verilen yanıt arasında bir paralellik gözlenmedi. Bu parametreler arasında herhangi bir ilişki olmayabileceği gibi, hastaların hastalık süreleri ve tedaviye verdikleri yanıtlar hakkında elde ettiğimiz bilgilerin yetersiz oluşu da anlamlı bir ilişki saptayamayışımızın nedeni olabilir. Tedaviye verilen yanıt ile granülom düzeni arasındaki ilişki açısından, Jean François Emile ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma dikkate değerdir⁵⁴. Bu çalışmada, BCG uygulanan ve nedeni bilinmeyen yaygın bir BCG enfeksiyonu tablosu gelişen, bilinen herhangi bir immün yetmezliği bulunmayan çocuk hastalar incelenmiştir. Doku örneklerinde, 2 tip granülom yapısı izlenmiştir. Tip 1 veya tüberküloid olarak nitelenen granülomlarda; kazeifikasyon nekrozu içeren, lenfositler ve fibrozis ile çevrili epiteloid histiyositler ve dev hücrelerden oluşan düzenli bir yapı izlenmiştir. Aside dirençli basil çok az sayıda saptanmış veya hiç izlenmemiştir. Tip 2 veya lepramatoid olarak nitelenen granülomlarda ise; makrofajlar ve polimorfonükleer lökositlerden oluşan yaygın bir infiltrasyon saptanmış, dev hücre ya çok az izlenmiş veya hiç görülmemiştir. Makrofajların sitoplazmalarında çok sayıda bakteri bulunduğu görülmüştür. Araştırmacılar Tip 1 granülom yapısı bulunduran olgularda prognozun iyi; Tip 2 olanlarda ise kötü olduğunu belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızdaki tüm olgularda, granülom yapıları bu çalışmadaki Tip 1 granülom yapısı ile uyumlu olarak belirlenmiş ve ayrıca, bir başka bulgu olarak da, granülomlardaki nekroz miktarı ile granülom düzensizliği arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Bu korelasyon granülomların düzensizleşmesi, birbirleriyle birleşme eğilimleri ve bunların sonucu olarak kavitasyon gelişiminde, kazeifikasyon nekrozunun temel neden olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, akciğer tüberkülozlu 43 olgu ele alındı. Olgular klinikopatolojik bulgular, histokimyasal olarak aside dirençli bakteri boyama yöntemi ve immünohistokimyasal olarak TGF-beta 1, fibronectin, laminin, kollajen Tip 1, kollajen Tip 2 immünoreaktivitesi yönünden değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda şu bulgular elde edildi:

- 1- Akciğer tüberkülozundaki granülomların yapısına çalışmamızda yer alan ECM elemanlarından tümünün katıldığı belirlendi.
- 2- Granülomların yapısına en yoğun katılım gösteren ECM elemanının fibronectin olduğu saptandı.
- 3- Granülomların yapısına en az katılım gösteren ECM elemanının laminin olduğu ve laminin ekspresyonunun daha çok damarlarla ilişkili olduğu gözlemlendi.
- 4- Granülomlarda izlenen ECM elemanlarının yoğunluklarının birbirleriyle paralellikler göstermesi, ECM elemanlarının granülom oluşumuna birlikte katıldıklarını ve bu katılımın aynı etkenler tarafından yönlendirildiğini gösteren bir bulgu olarak değerlendirildi.
- 5- ECM elemanlarının tümünün fibroblastlardan köken aldığını ve ayrıca fibronectin için dev hücreler, epiteloid histiyositler ve alveoler makrofajların da kaynak olabileceğini düşündüren bulgular elde edildi.
- 6- Alveoler makrofajlarda fibronectin ekspresyonunun yoğun olarak izlenmesi, bu durumun akciğer tüberkülozunun patogeneğinde

önemli olabileceğini düşündürdü. Ancak, bu bulgu ile olguların tedaviye verdikleri yanıtlar arasında istatistiksel bir ilişki belirlenemedi.

7- Çalışmamızda yer alan tüm ECM elemanlarının damarların yapısına katıldığı belirlendi.

8- TGF-beta 1 ekspresyonu granülomların çevresinde ve iç kısmındaki matrikste, epiteloid histiyositlerde, Langhans tipi dev hücrelerde ve fibroblastlarda; akciğerin diğer alanlarında ise, en yoğun alveoler makrofajlarda olmak üzere damar endotel hücreleri, bronşiol epiteli ve alveol epitelinde saptandı.

9- Granülomların yapısına katılan epiteloid hücreler ve dev hücrelerdeki TGF-beta 1 ekspresyonunun korele oluşu bu iki tip hücrenin kökenlerinin aynı olduğunu destekleyen bir bulgu olarak değerlendirildi.

10- Granülomların içinde ve çevresindeki matrikste, fibroblastlarda, dev hücrelerde ve epiteloid histiyositlerdeki TGF-beta 1 ekspresyonu ile granülomların yapısına katılan bazı ECM elemanları arasındaki paralellikler TGF-beta 1'in tüberküloz granülomlarına ECM elemanlarının katılımını yönlendirici etkileri olabileceğini gösteren bir bulgu olarak değerlendirildi.

11- Aside dirençli bakteri boyama yönteminin akciğer tüberkülozunda basilleri göstermek için etkili bir yöntem olmadığı saptandı.

12- TGF-beta 1'in akciğer tüberkülozundaki ekspresyonu ile dokulardaki basil miktarı arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı, aside dirençli bakteri boyama yöntemi ile 1 olgu dışında basillerin gösterilememesi nedeniyle, değerlendirilemedi.

13- Olguların hastalık süreleri ve tedaviye verdikleri yanıtlar ile hastaların yaşı, cinsiyeti, granülomların düzeni ve granülomlardaki nekroz oranları arasında istatistiksel bir ilişki saptanamadı.

14- TGF-beta 1'in granülomlardaki ve diğer alanlardaki ekspresyon şiddeti ile olguların tedaviye verdikleri yanıtlar arasında istatistiksel anlamlılık gösteren herhangi bir ilişki belirlenemedi.

15- Granülomlardaki nekroz oranları ile granülomların düzensiz oluşu arasında bir paralellik olduğu saptandı. Bu durum, akciğer tüberkülozunda granülomlardaki kazeifikasyon nekrozunun; granülomların düzensizleşmesinin, birbirleri ile birleşme eğilimlerinin ve sonuç olarak da kavitasyon gelişiminin nedeni olabileceği yönünde değerlendirildi.

ÖZET

Tüberküloz enfeksiyonu, Mycobacterium grubu bakteriler tarafından oluşturulan, gecikmiş tipte hipersensitivite ve hücrel immün yanıt oluşumuna yol açan, granümatöz yangı gelişimi ile karakterize bir hastalıktır. Granümatöz yangı gelişmesine yol açan etkenlerin ortak özelliği, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolayca yok edilemeyen ajanlar olmalarıdır. Granümatöz yangı oluşmasında hücrel immün yanıtın temel öğeleri olan T lenfositler, makrofajlar ve bunlardan salgılanan sitokinlerin önemli rolleri vardır.

ECM, dokuların fizyolojik iskeletini oluşturan; yara iyileşmesi, hücrelerin çoğalması, hareketi ve farklılaşması gibi birçok olaya katkıları olan, aktif bir yapıdır. ECM'in granümatöz yangı gelişmesinde ve hastalığın sınırlandırılmasında önemli katkıları vardır.

ECM elemanlarının üretilmesini etkileyen birçok faktör vardır. TGF-beta 1, ECM üzerinde önemli etkileri olan polipeptid yapılı bir büyüme faktörüdür. TGF-beta 1'in, fibroblastlarda ECM elemanlarının üretimini artırdığı; fibrozis gelişimini uyardığı; yara iyileşmesinde merkezi bir rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir.

TGF-beta 1'in tüberküloz enfeksiyonunda, ECM elemanlarını artırarak yangıyı sınırlayıcı bir rolü olabileceği gibi, immün sistemi baskılayarak, bakterilerin makrofajlar içindeki çoğalmasını artırıcı yönde etkileri de olabileceği saptanmıştır.

Biz, çalışmamızda akciğer tüberkülozundaki granülom yapılarına ECM elemanlarının katılım oranını belirlemeyi; TGF-beta 1'in granülomlardaki ve akciğerin diğer alanlarındaki ekspresyonunu

saptamayı; TGF-beta 1 ile ECM elemanları arasındaki olası ilişkiyi göstermeyi; hastaların, tedaviye verdikleri yanıt ile TGF-beta 1 ve ECM elemanlarının ekspresyon miktarları arasında bir bağlantı olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamızda, akciğer tüberkülozlu 43 olguya ait doku örnekleri, granülomların düzeni ve nekroz oranları; aside dirençli bakteri miktarı; granülomlarda ve çevre dokudaki kollajen 1, kollajen 4, fibronektin, laminin ve TGF-beta 1 ekspresyonlarını belirlemek amacıyla incelendi. Bakterileri göstermek için histokimyasal olarak Kinyoun boyama yöntemi, ECM elemanları ve TGF-beta 1 için ise İmmünohistokimyasal yöntemler kullanıldı. Elde edilen bulguların, birbirleriyle ve olguların antitüberküloz tedaviye verdikleri yanıt ile olan ilişkileri incelendi.

Sonuç olarak, ECM elemanlarının granülomların yapısına katıldıkları; TGF-beta 1 ile granülomların yapısına katılan ECM elemanları arasında paralellik olduğu belirlendi ve TGF-beta 1'in granülomlara katılan ECM elemanları üzerinde etkili olabileceği düşünüldü. Kinyoun boyama yöntemi ile 1 olgu dışında bakteri boyanması sağlanamadı. Olguların tedaviye verdikleri yanıtlar ile granülomların düzeni, ECM elemanlarının granülomlardaki miktarı ve TGF-beta 1 ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki belirlenemedi.

KAYNAKLAR

- 1- Ellner JJ. "Immune Dysregulation in Human Tuberculosis." *J Lab Clin Med* 1986;108:142-9
- 2- Formicola V, Milanesi Q, Scarsini C. "Evidence of Spinal Tuberculosis at the Beginning of the Fourth Millennium BC from Arene Candide Cave Liguria, Italy)." *Am J Phys Anthropol* 1987; 72(1): 1-6
- 3- Nerlich AG, Haas CJ, Zink A, et.al. "Molecular Evidence for Tuberculosis in an Ancient Egyptian Mummy." *The Lancet* 1997; 350 (8): 1404
- 4- Virginia Morell "Mummy Settles TB Antiquity Debate." *Science* 1994; 263 (25): 1686-7.
- 5- Das RK. "Tuberculosis – Historical Landmarks." *J Indian Med Assoc* 2000;98(3):112-4
- 6- Mc Dermott LJ, Glassroth J, Mehta JB, et.al. "Tuberculosis. Part I." *Dis Mon* 1997; 43 (3): 113-80
- 7- Telzak EE. "Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus Infection." *Med Clin North Am* 1997; 81 (2):345-60
- 8- Grange JM, Zumla A. "Paradox of the Global Emergency of Tuberculosis." *Lancet* 1999;353:996
- 9- Cotran RS, Kumar V, Collins T. "Infectious Diseases" In: *Robbin's Pathologic Basis of Disease*. 6.ed W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania 1999
- 10- Tomioka H. "Bacteriology of mycobacteria: taxonomic and morphological characteristics." *Nippon Rinsho* 1998;56(12):3001-7

- 11- Kitamura S, Shibuya Y. "Classification and concept of mycobacterial infections ." Nippon Rinsho 1998;56(12):3036-40
- 12- Van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE, et.al. "Diagnosis of Mycobacterium microti infections among human by using novel genetic markers." J Clin Microbiol 1998;36(7):1840-5
- 13- Thorel MF. "Isolation of Mycobacterium africanum from monkeys." Tubercle 1980;61(2):101-4
- 14- Frothingham R, Strickland PL, Bretzel G, et.al. "Phenotypic and genotypic characterization of Mycobacterium africanum isolates from West Africa." J Clin Microbiol 1999;37(6):1921-6
- 15- Frottier J, Eliaszewicz M, Arlet V, et.al. "Infections caused by Mycobacterium africanum." Bull Acad Natl Med 1990;174(1):29-33
- 16- Yano I. "The 72 nd Annual Meeting Education Lecture. Cord factor." Kekkaku 1998;73(1):37-42
- 17- Yamagami H, Matsumoto T, Fujiwara N, et.al. "Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of Mycobacterium tuberculosis induces foreign body and hypersensitivity type granulomas in mice." Infect Immun 2001;69(2):810-5
- 18- Saita N, Fujiwara N, Yano I, et.al. "Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of Mycobacterium tuberculosis induces corneal angiogenesis in rats." Infect Immun 2000;68(10):5991-7
- 19- Hamasaki N, Isowa K, Kamada K, et.al. "In vivo administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits." Infect Immun 2000;68(6):3704-9

- 20- Yarkoni E, Wang L, Bekierkunst A. "Stimulation of macrophages by cord factor and by heat-killed and living BCG." *Infect Immun* 1977;16(1):1-8
- 21- Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, et.al. "Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure." *J Immunol* 1992;15;149(2):541-7
- 22- Chan J, Fan XD, Hunter SW, et.al. "Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages." *Infect Immun* 1991;59(5):1755-61
- 23- Van Eden W, Hogervorst EJ, van der Zee R, et.al. "The mycobacterial 65 kD heat-shock protein and autoimmune arthritis." *Rheumatol Int* 1989;9(3-5):187-91
- 24- Vanham G, Toossi Z, Hirsch CS, et.al. "Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy." *Tuber Lung Dis* 1997;78(3&4):145-58
- 25- Arthur M, Dannenberg Jr. "Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis." *Rev Infec Dis* 1989;11(2):S369-78
- 26- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et.al. "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." *J Exp Med* 1989;170(3):827-45
- 27- Fulton SA, Cross JV, Toossi Z, et.al. "Regulation of Interleukin-12 by Interleukin-10, Transforming Growth Factor-beta, Tumor Necrosis Factor-alfa, and Interferon-gamma in Human Monocytes Infected with Mycobacterium tuberculosis H37Ra." *J Infect Dis* 1998;178:1105-14

- 28- Trinchieri G. "Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma)." *Curr Opin Immunol* 1997;9(1):17-23
- 29- Fulton SA, Johnsen JM, Wolf SF, et.al. "Interleukin-12 production by human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis." *Infect Immun* 1996;64(7):2523-31
- 30- Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, et.al. "IL-12 protect mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*." *Clin Exp Immunol* 1996;104(2):208-14
- 31- Orange JS, Biron CA. "An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections." *J Immunol* 1996;156(3):1138-42
- 32- Mahanty S, Ravichandran M, Raman U, et.al. "Regulation of parasite antigen-driven immune responses by interleukin-10 (IL-10) and IL-12 in lymphatic filariasis." *Infect Immun* 1997;65(5):1742-7
- 33- D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, et.al. "Production of natural killer cell stimulatory factor (Interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells." *J Exp Med* 1997;176(5):1387-98
- 34- Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, et.al. "Interleukin-12 production by polymorphonuclear leukocytes." *Eur J Immunol* 1995;25(1):1-5
- 35- Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. "Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*." *J Immunol* 1997;159(2):635-43

- 36- Scheicher C, Mehlig M, Dienes HP, et.al. "Uptake of microparticle-adsorbed protein antigen by bone marrow derived dendritic cells results in upregulation of interleukin-1 alpha and interleukin-12 p40/p35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation." *Eur J Immunol* 1995;25(6):1566-72
- 37- Chehimi J, Starr SE, Frank I, et.al. "Natural killer (NK) cell stimulatory factor increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and human immunodeficiency virus infected patients." *J Exp Med* 1992;175(3):789-96
- 38- Denis M. "Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates." *Cell Immunol* 1991;132(1):150-7.
- 39- Flesch IE, Kaufmann SH. "Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages." *Infect Immun* 1988;56(6):1464-9
- 40- Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies WA, et.al. "Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers." *J Immunol* 1998;161(9):4882-93
- 41- Condos R, Rom WN, Schluger NW. "Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol." *Lancet* 1997;349(9064):1513-5
- 42- Kawase I, Brooks CG, Kuribayashi K, et.al. "Interleukin 2 induces gamma-interferon production: participation of macrophages and NK-like cells." *J Immunol* 1983;131(1):288-92

- 43- Denis M. "Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells toward Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes." *Cell Immunol* 1994;156:529-36
- 44- Wahl SM, Mc Cartney-Francis N, Hunt DA, et.al. "Monocyte interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 augmentation of microbicidal activity." *J Immunol* 1987;139(4):1342-7
- 45- Toossi Z, Kleinhenz ME, Ellner JJ. "Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis." *J Exp Med* 1986;163(5):1162-72
- 46- Kindler V, Sappino AP, Grau GE, et.al. "The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection." *Cell* 1989;56(5):731-40
- 47- Kindler V, Sappino AP. "The beneficial effects of localized tumor necrosis factor production in BCG infection." *Behring Inst Mitt* 1991 Feb;(88):120-4
- 48- Sano C, Sato K, Shimizu T, et.al. "The modulating effects of proinflammatory cytokines interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor -alpha (TNF-alpha), and immunoregulating cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-beta), on anti-microbial activity of murine peritoneal macrophages against Mycobacterium avium-intracellulare complex." *Clin Exp Immunol* 1999;115:435-42
- 49- Bermudez LE, Young LS. "Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of Mycobacterium avium complex." *J Immunol* 1988;140(9):3006-13

- 50- Appelberg R, Sarmiento A, Castro AG. "Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in the host resistance to mycobacteria of distinct virulence." *Clin Exp Immunol* 1995;101(2):308-13
- 51- Roach DR, Briscoe H, Baumgart K, et.al. "Tumor necrosis factor (TNF) and a TNF-mimetic peptide modulate the granulomatous response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in vivo." *Infect Immun* 1999;67(10):5473-76
- 52- Emori K, Tanaka A. "Granuloma formation by synthetic bacterial cell wall fragment: Muramyl dipeptide." *Infect Immun* 1978;19(2):613-20
- 53- Emori K, Nagao S, Shigematsu N, et.al. "Granuloma formation by muramyl dipeptide associated with branched fatty acids, a structure probably essential for tubercle formation by *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* 1985;49(1):244-49
- 54- Emile JF, Patey N, Altare F, et.al. "Correlation of granuloma structure with clinical outcome defines two types of idiopathic disseminated BCG infection." *J Pathol* 1997;181:25-30
- 55- Pelton RW, Moses HL. "The Beta-Type Transforming Growth Factor." *Am Rev Respir Dis* 1990;142:S31-5
- 56- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. "Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone." *J Biol Chem* 1987;262(6):2869-74
- 57- Tucker RF, Shipley GD, Moses HL, et.al. "Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type transforming growth factor." *Science* 1984;226(4675):705-7

- 58- Anzano MA, Roberts AB, Sporn MB. "Anchorage-independent growth of primary rat embryo cells induced by platelet-derived growth factor and inhibited by type-beta transforming growth factor." *J Cell Physiol* 1986;126(2):312-8
- 59- Graycar JL, Miller DA, Arrick BA, et.al. "Human transforming growth factor- beta 3: recombinant expression, purification, and biological activities in comparison with transforming growth factors-beta 1 and - beta 2." *Mol Endocrinol* 1989;3(12):1977-86
- 60- Ignatz RA, Massague J. "Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(24):8530-4
- 61- Massague J, Cheifetz S, Endo T, et.al. "Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation." *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(21):8206-10
- 62- Olson EN, Sternberg E, Hu JS, et.al. "Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor." *J Cell Biol* 1986;103(5):1799-805
- 63- Potts JD, Dagle JM, Walder JA, et.al. "Epithelial -mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta 3." *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(4):1516-20
- 64- Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, et.al. "Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta 1 and TGF-beta 3." *Am J Physiol* 1999;276(20):L814-24
- 65- Raghu G, Masta S, Meyers D, et.al. "Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor beta." *Am Rev Respir Dis* 1989;140:95-100

- 66- Roberts CJ, Birkenmeier TM, McQuillan JJ, et.al. "Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts." *J Biol Chem* 1988;263(10):4586-92
- 67- Grande JP, Melder DC, Zinsmeister AR. "Modulation of collagen gene expression by cytokines: Stimulatory effect of transforming growth factor-beta 1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV." *J Lab Clin Med* 1997;130:476-86
- 68- Bassols A, Massague J. "Transforming growth factor-beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans." *J Biol Chem* 1988;263(6):3039-45
- 69- Maniscalco WM, Campbell MH. "Transforming growth factor-beta induces a chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan in alveolar type II cells." *Am J Physiol* 1994;266:L672-80
- 70- Maniscalco WM, Sinkin RA, Watkins RH, et.al. "Transforming growth factor-beta modulates type II cell fibronectin and surfactant protein C expression." *Am J Physiol* 1994;267:L569-77
- 71- Zhang K, Flanders KC, Phan SH. "Cellular localization of Transforming growth factor-beta expression in Bleomycine-induced pulmonary fibrosis." *Am J Pathol* 1995;147:352-61
- 72- Kanzler S, Lohse AW, Keil A, et.al. "TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis." *Am J Physiol* 1999;276(39):G1059-68
- 73- Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, et.al. "Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats." *J Lab Clin Med* 2000;135:316-23

- 74- Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, et.al. "Expression of Transforming Growth Factor-beta1 and its relation to endomysial fibrosis in Progressive Muscular Dystrophy." *Am J Pathol* 1994;144:221-6
- 75- Asakura S, Kato H, Fujino S, et.al. "Role of Transforming Growth Factor-beta1 and Decorin in development of central fibrosis in pulmonary adenocarcinoma." *Hum Pathol* 1999;30:195-8
- 76- Yang L, Qiu CX, Ludlow A, et.al. "Active Transforming Growth Factor-beta in Wound repair." *Am J Pathol* 1999;154:105-11
- 77- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et.al. "Transforming growth factor type beta induces monocytes chemotaxis and growth factor production." *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(16):5788-92
- 78- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et.al. "Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro." *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(12):4167-71
- 79- Clark RA, McCoy GA, Folkvord JM, et.al. "TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event." *J Cell Physiol* 1997;170(1):69-80
- 80- Arora PD, Narani N, McCulloch CAG. "The compliance of collagen gels regulates Transforming Growth Factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts." *Am J Pathol* 1999;154:871-82
- 81- Chodon T, Sugihara T, Igawa HH, et.al. "Keloid derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine Transforming Growth Factor-beta1 can abrogate this resistance." *Am J Pathol* 2000;157:1661-9

- 82- Ahuja SS, Paliogianni F, Yamada H, et.al. "Effect of Transforming Growth Factor-beta on early and late activation events in human T cells." *J Immunol* 1993;150:3109-18
- 83- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, et.al. "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." *J Exp Med* 1986;163(5):1037-50
- 84- Kekow J, Wachsman W, McCutchan JA, et.al. "Transforming growth factor beta and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection." *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(21):8321-5
- 85- Espevik T, Figari IS, Ranges GE, et.al. "Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-beta1) and recombinant human tumor necrosis factor-alpha reciprocally regulate the generation of lymphokine-activated killer cell activity. Comparison between natural porcine platelet-derived TGF-beta 1 and TGF-beta 2, and recombinant human TGF-beta 1." *J Immunol* 1988;140(7):2312-6
- 86- Mule JJ, Schwarz SL, Roberts AB, et.al. "Transforming growth factor beta inhibits the in vitro generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells." *Cancer Immunol Immunother* 1988;26(2):95-100
- 87- Ranges GE, Figari IS, Espevik T, et.al. "Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* 1987;166(4):991-8
- 88- Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, et.al. "Transforming growth factor beta induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to

- immunosuppression in the tumor bearing state." J Immunol 1991;146(3):1077-82
- 89- Swain SL, Huston G, Tonkonogy S, et.al. "Transforming growth factor beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype." J Immunol 1991;147(9):2991-3000
- 90- Orthaldo JR, Mason AT, O'Shea JJ, et.al. "Mechanistic studies of transforming growth factor beta inhibition of IL-2 dependent activation of CD3- large granular lymphocyte functions. Regulation of IL-2R beta (p75) signal transduction." J Immunol 1991;146(11):3791-8
- 91- Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, et.al. "Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes." J Immunol 1986;137(12):3855-60
- 92- Ristow HJ. "BSC-1 growth inhibitor/type beta transforming growth factor is a strong inhibitor of thymocyte proliferation." Proc Natl Acad Sci USA 1986;83(15):5531-3
- 93- Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, et.al. "Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions." J Immunol 1995;154:465-73
- 94- Dlugovitzky D, Bay ML, Rateni L, et.al. "In vitro synthesis of interferon-gamma, interleukin-4, transforming growth factor-beta and interleukin-1- beta by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: Relationship with the severity of pulmonary involvement." Scand J Immunol 1999;49:210-17

- 95- Toossi Z, Young TG, Averill LE, et.al. "Induction of transforming growth factor beta1 by purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis." *Infect Immun* 1995;63(1):224-8
- 96- Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, et.al. "Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis." *Infect Immun* 1996;64(2):399-405
- 97- Hirsch CS, Hussain R, Toossi Z, et.al. "Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen driven blastogenesis and interferon gamma production." *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;16(8):3193-8
- 98- Bermudez LE. "Production of transforming growth factor beta by Mycobacterium avium-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN-gamma." *J Immunol* 1993;150:1838-45
- 99- Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, et.al. "Enhancement of intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in human monocytes by transforming growth factor-beta 1." *J Infect Dis* 1994 Nov;170(5):1229-37
- 100- Somoskovi A, Zissel G, Zipfel PF, et.al. "Different cytokine patterns correlate with the extension of disease in pulmonary tuberculosis." *Eur Cytokine Netw* 1999;10(2):135-42
- 101- Othieno C, Hirsch CS, Hamilton BD, et.al. "Interaction of Mycobacterium tuberculosis-induced transforming growth factor-beta 1 and interleukin-10." *Infect Immun* 1999;67(11):5730-5
- 102- Warwick-Davies J, Lowrie DB, Cole PJ. "Selective deactivation of human monocyte functions by TGF-beta." *J Immunol* 1995;155(6):3186-93

- 103- Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, et.al. "Nitric oxide: cytokine regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens." *Immunol Lett* 1994;43(1-2):87-94
- 104- Owens MW, Milligan SA, Grisham MB. "Inhibition of rat pleural mesothelial cell nitric oxide synthesis by transforming growth factor-beta1." *Inflammation* 1996;20(6):637-46
- 105- Kwon OJ. "The role of nitric oxide in the immune response of tuberculosis." *J Korean Med Sci* 1997;12(6):481-7
- 106- Champs J, Young LS, Bermudez LE. "Production of TNF-alpha, IL-6 and TGF-beta, and expression of receptors for TNF-alpha and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection." *Immunology* 1995,84:549-54
- 107- Denis M, Ghadirian E. "Transforming growth factor beta (TGF-beta1) plays a detrimental role in the progression of experimental *Mycobacterium avium* infection; in vivo and in vitro evidence." *Microbial Pathogenesis* 1991;11:367-72
- 108- Hirsch CS, Ellner JJ, Blinkhorn R, et.al. "In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta." *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(8):3926-31
- 109- Goletti D, Weissman D, Jackson RW, et.al. "The in vitro induction of Human Immunodeficiency Virus (HIV) replication in purified protein derivative-positive HIV-infected persons by recall antigen response to *Mycobacterium tuberculosis* is the result of a balance of the effects of endogenous interleukin-2 and proinflammatory and antiinflammatory cytokines." *J Infect Dis* 1998;177:1332-8

- 110- Shukla RR, Kumar A, Kimmel PL. "Transforming growth factor beta increases the expression of HIV-1 gene in transfected human mesangial cells." *Kidney Int* 1993;44(5):1022-9
- 111- Shiratsuchi H, Hamilton B, Toossi Z, et.al. "Evidence against a role for interleukin-10 in the regulation of growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes." *J Infect Dis* 1996;173(2):410-7
- 112- Marshall BG, Wangoo A, Cook HT, et.al. "Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis." *Thorax* 1996;51:1253-61
- 113- Limper AH, Colby TV, Sanders MS, et.al. "Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta1 in the nonnecrotizing granulomas of pulmonary sarcoidosis." *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:197-204
- 114- Shigehara K, Shijubo N, Hirasawa M, et.al. "Immunolocalization of extracellular matrix proteins and integrins in sarcoid lymph nodes." *Virchows Arch* 1998;433:55-61
- 115- Maeda J, Ueki N, Ohkawa T, et.al. "Local production and localization of transforming growth factor-beta in tuberculous pleurisy." *Clin Exp Immunol* 1993;92:32-8
- 116- Helmut H, Popper MD, Huberta Klemen, et.al. "Presence of Mycobacterial DNA in Sarcoidosis." *Human Pathology* 1997;28(7):796-800
- 117- Wilsher ML, Menzies RE, Croxson MC. "Mycobacterium tuberculosis DNA in tissues affected by sarcoidosis." *Thorax* 1998;53:871-4

- 118-Ishige I, Usui Y, Takemura T, et.al. "Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis." *Lancet* 1999;354:120-3
- 119-Sinkin RA, LoMonaco MB, Finkelstein JN, et.al. "Increased fibronectin mRNA in alveolar macrophages following in vivo hyperoxia." *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7(5):548-55
- 120-Cordier G, Cozon G, Greenland T, et.al. "In vivo activation of alveolar macrophages in ovine lentivirus infection." *Clin Immunol Immunopathol* 1990;55(3):355-67
- 121-Villiger B, McDonald JA. "Fibronectin: an important component of bronchoalveolar defense?" *Schweiz Med Wochenschr* 1983;113(3):102-3
- 122-Oishi K, Yamamoto M, Yoshida T, et.al. "Opsonic activity of plasma fibronectin for *Staphylococcus aureus* by human alveolar macrophages: inefficacy of trypsin sensitive staphylococcal fibronectin receptor." *Tohoku J Exp Med* 1986;149(1):95-102
- 123-Kinsella MB, Smith EA, Miller KS, et.al. "Spontaneous production of fibronectin by alveolar macrophages in patients with scleroderma." *Arthritis Rheum* 1989;32(5):577-83
- 124-Spiteri MA, Clarke SW, Poulter LW. "Alveolar macrophages that suppress T-cell responses may be crucial to the pathogenetic outcome of pulmonary sarcoidosis." *Eur Respir J* 1992;5(4):394-403
- 125-Mert A, Bilir M, Ozaras R, et.al. "Miliary tuberculosis: Clinical manifestations, diagnosis and outcome in 38 adults." *Respirology* 2001;6(3):217-24