



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KOAH'LI HASTALARDA REGULATUVAR
T HÜCRE DÜZEYİ**

**Dr. Gökçen ALICI SERT
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Gülçin ESKANDARI**

MERSİN-2011



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KOAH'LI HASTALARDA REGULATUVAR
T HÜCRE DÜZEYİ**

**Dr. Gökçen ALICI SERT
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Gülçin ESKANDARI**

**Bu tez, BAP-TF TTB (GAS) 2009-8 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir.**

MERSİN-2011

T E Ő E K K Ü R

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman destek ve yardımlarını yanımda hissettiğim bilgisini, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen tezimin hazırlanmasında büyük emeği geçen değerli Hocam Doç. Dr. Gülçin Eskandari'ye,

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli Hocalarım; Prof. Uğur Atik, Prof. Dr. Gürbüz Polat, Prof. Dr. Lülüfer Tamer Gümüş, Doç. Dr. Burak Çimen'e ve hocalığının yanı sıra bir ağabey yakınlığı gösteren Doç. Dr. Necati Muşlu'ya,

Tezime ait hasta grubu örneklerinin toplanması ve tezimin klinik sürecindeki katkılarından dolayı Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mukadder Çalıkoğlu'na, asistan arkadaşlarım Dr. Bahri Temüray, Dr. Nalan Göloğlu ve Dr. Cihan Yücel'e ve SFT personellerine,

Tezimin istatistik analizinde yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik Anabilim Dalından Arş. Gör. Dr. İlter Helvacı'ya,

Tezimin laboratuvar aşamasındaki katkılarından dolayı çalışma arkadaşım Cemil Gülüm'e ve uyumlu çalışma ortamı sağlayan tüm teknisyen arkadaşlarıma,

Asistanlığıma başladığım ilk günden bu yana kendimi şanslı hissettiğim ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Yaşamım süresince her zaman destek ve sevgilerini yanı başımda hissettiğim canım aileme,

Sabri ve sevgisiyle hep yanımda olduğu için sevgili eşim Gültekin Sert'e
En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Dr. Gökçen ALICI SERT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	
KOAH	
Tanım	10
Evreleme	10
Epidemiyoloji ve Prevelans	11
Risk Faktörleri	12
Patoloji	14
Patogenez	16
İnflamasyon	16
Proteaz antiproteaz dengesizliği	18
Oksidatif stres	18
Fizyopatoloji	19
Klinik	20
Tanı	20
Sistemik Etkiler	22
İMMÜN SİSTEM	22
Doğal İmmünite	23
Edinsel İmmünite	23
İmmunolojik Tolerans	24
T Hücrelerinde Santral Tolerans	25
Periferik T Lenfosit Toleransı	26
Periferik Kan Lenfosit Grupları	29
REGULATUVAR T HÜCRE	30
Regulatuvar T Hücre Sınıflaması	30
Doğal Treg Hücreleri (Natural Treg, nTreg)	30

Adaptif (İnducible) Treg Hücreler	30
Regulatuvar T Hücrelerin Moleküler Karakteristikleri	32
Regulatuvar T Hücrelerin Etki Mekanizmaları	37
Otoimmün Hastalıklarda Regulatuvar T Hücre Rolü	38
KOAH'ta İMMÜNİTE	39
KOAH'ta Doğal İmmün Sistem	39
KOAH'ta Edinsel İmmün Sistem	40
GEREÇ VE YÖNTEMLER	
Çalışma Grubu	42
Solunum Fonksiyon Testleri	42
Kullanılan Araç ve Gereçler	42
Kullanılan Reaktif ve Kitler	43
Örneklerin Toplanması	44
Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu	44
Hazırlanan Solusyonlar	45
Çalışma Prosedürü	45
Flowsitometrik Değerlendirme	46
İstatistiksel Analiz	51
BULGULAR	52
TARTIŞMA	64
SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	73
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	83
ŞEKİLLER DİZİNİ	86
TABLolar DİZİNİ	88
EKLER	
EK 1. Sağlıklı/Hasta Gönüllü Denekler İçin Bilgilendirilmiş Olur Formu Örneği	

ÖZET

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH), irreversible ve genellikle ilerleyici hava akımı kısıtlaması ile karakterize bir hastalık olup, zararlı partikül ve gazlara karşı akciğerlerde gelişen anormal inflamatuvar yanıtla ilişkilidir. Sigara içimi KOAH patogenezinde en önemli yeri tutarken, tüm sigara içenlerde KOAH gelişmemektedir. İmmün homeostazda önemli rolü olan immünmodülatör ve antiinflamatuvar etkilere sahip reglatuvar T hücrelerin (Treg) KOAH patogenezindeki rolü ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada Treg hücrelerin KOAH'taki rolünü belirlemeyi amaçladık.

Bu çalışmaya Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran GOLD 2009 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; KOAH'a karşı küresel girişim) kriterlerine göre klinik ve spirometrik olarak KOAH tanısı almış 79 stabil hasta ile sigara içen 30 ve sigara içmeyen 30 sağlıklı birey kontrol grubu olarak alındı. KOAH'lı hastalar evrelerine göre 3 gruba (hafif, orta, ağır) ayrıldı. Kontrol ve hasta gruplarında periferik kanda flow sitometri yöntemi ile CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) hücre yüzdeleri ve absolut sayı/ μ L düzeyleri ile CD4 /CD8 oranları hesaplandı.

Çalışmamızda stabil KOAH'lı hasta ve subgrupları (hafif, orta, ağır) ile kontrol grupları arasında yapmış olduğumuz karşılaştırmalarda sigara içen kontrol grubuna göre KOAH grubu ile hafif ve orta KOAH subgruplarında CD4 hücre yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterirken, bu düşüş absolut sayıda gözlenmedi. CD4/CD8 oranlarını sigara içen kontrol grubuna göre KOAH ve KOAH subgruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşük bulduk. Treg düzeylerini ise KOAH'lılarda sigara içen kontrol grubuna göre, ağır ve orta KOAH'lı hastalarda da her iki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış saptadık.

Sonuç olarak periferik kanda normal akciğer fonksiyonuna sahip sigara içenlerde Treg düzeylerinin düşük olması, KOAH hastalarında oluşan inflamasyona sekonder olarak reglatuvar T hücre düzeyinin arttığını ve KOAH'lı hastalarda Treg artış derecesinin hastalığın evresiyle ilişkilendirilebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: İnflamasyon, KOAH, Treg

ABSTRACT

COPD disease is characterized by irreversible and generally progressive airflow limitation and COPD is associated with an abnormal inflammatory response against harmful particles and gases in the lungs. Cigarette smoking is the most important role in the pathogenesis of COPD, but COPD does'nt occur in all smokers. There is a limited number of studies on the role of regulatory T cells (Treg) which has immunomodulatory, anti-inflammatory effects and important role in immun homeostasis in the pathogenesis of COPD. In this study, we aimed to determine the role of Treg cells in patients with COPD.

In this study, we studied 79 stable patients attended to Mersin University Medical Faculty Hospital, Chest Diseases Clinic, that clinical and spirometric diagnosis of COPD according to GOLD 2009 criteria and 30 smokers and 30 non-smokers healthy individuals as control groups. COPD patients were divided into 3 groups according to the stage (mild, medium, severe). In the control and patient groups, peripheral blood CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD4+CD25+FOXP3+ (Treg) percentages and absolute numbers of cells/ μ L and CD4 / CD8 ratios were investigated by flow cytometry.

In our study, we made comparison between patients with stable COPD and disease subgroups (mild, moderate, severe) with control groups. Comparison of the smoking control group with COPD and mild, moderate COPD subgroups showed a statistically significant decrease of CD4 cell percentages, but this decrease was not observed in absolute numbers. We determined statistically significantly lower CD4/CD8 ratios of COPD and COPD subgroups than the smoking control group. We observed Treg levels in COPD patients were higher than smoking control group. Treg levels in patients with severe and moderate COPD were significantly increased compared to both of control groups.

According to the finding of decreased levels of Treg in peripheral blood of smokers with normal lung function and the increased number of Treg cells in patients with COPD, we think that the increase may be secondary to inflammation and it is associated with disease severity.

Key words: COPD, Inflammation, Treg

GİRİŞ VE AMAÇ

KOAH, tam olarak geri dönüşü olmayan hava akımı kısıtlanması ile karakterize, önlenemez bir hastalıktır. KOAH'ın tipik özelliği olan yerleşik hava akımı kısıtlaması, genellikle ilerleyicidir ve zararlı partiküllere karşı akciğerlerde gelişen anormal inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir. KOAH akciğerleri etkilemekle birlikte, ciddi sistemik etkilere de yol açabilmektedir¹.

KOAH artık tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir, ayrıca giderek artan ekonomik ve sosyal yüke neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı 2002 Dünya Sağlık Raporuna göre KOAH tüm dünyada 5. ölüm nedeni olarak kabul edilmekte ve her yıl yaklaşık 2,7 milyon kişi KOAH nedeniyle ölmektedir².

Sigara KOAH gelişiminde en önemli risk faktörüdür ve hastalıktan %80-90 oranında sorumludur. Tüm sigara içicilerde %50 oranında kronik bronşit, %15-20 oranında da KOAH gelişmektedir^{3,4}.

Sigara içen ve KOAH'ı olan kişiler ile, sigara içen fakat KOAH'ı olmayan kişilerde inflamasyon açısından fark olup olmadığı, cerrahi rezeksiyon ile elde edilen akciğer örneklerinde araştırılmıştır. Sigara içen ve KOAH gelişmiş kişilerin hava yollarında, diğerlerinden farklı olarak, fazla sayıda CD8+ T lenfositler mevcuttur. Obstrüksiyonun ağır derecede olduğu KOAH hastalarında ise, asemptomatik sigara içenlerden ve hafif obstrüksiyonlu sigara içenlerden farklı olarak, nötrofiller baskındır ve hava akımı kısıtlanmasının derecesi ile korelasyon göstermektedir⁵. Sigara içimi sadece havayolları ve akciğerde inflamasyona sebep olmaz; aynı zamanda sistemik olarak hücrel ve humoral inflamasyon, oksidatif stres, vazomotor ve endotel fonksiyonlarında değişiklik, prokoagulan faktörlerde artış gibi etkilere de sebep olur⁶.

Uzun yıllar KOAH patogenezinde doğal immün yanıtın baskın bir rolü olduğu düşünülürken, edinsel immün yanıtın rolü ise görmezden gelinmiştir. Oysa son yıllarda yapılan çalışmalarda KOAH patogenezinde edinsel immüntenin katkısı olduğunu vurgulayan ciddi kanıtlar öne sürülmüştür. Edinsel immün yanıtındaki bozukluklar, immün hücrelerin (T ve B lenfositler) regülasyonunda bir defekt ya da hücre ölümü sebebiyle ortaya çıkabileceği gibi yeni antijenlerin (self veya yabancı) oluşmasıyla da meydana gelebilir. KOAH için asıl risk faktörü olan sigara kullanımı, lenfositlerin proliferasyon ve ölüm

yolaklarını değiştirir ve ortaya çıkan proteinlerin doğrudan oksidasyonuyla yeni antijenik epitoplar oluşturabilir. Viral enfeksiyonlar ve çevresel partikl kaynaklı oksidatif stres de yeni epitop gelişimine katkıda bulunabilir. Özetle KOAH'ta edinsel immün yanıtı arttıracak birçok farklı potansiyel mekanizma bulunmaktadır⁷.

2001 yılında yayınlanan Sakaguchi ve arkadaşlarının derlemesinde CD4+CD25+T hücreleri reglatuvar T hücreleri olarak adlandırılmış ve yeni bir T hücre alt grubu olarak ortaya konulmuştur. Baskılayıcı hücreler zaman içerisinde CD4+CD25+ Treg hücreleri olarak anılmaya bařlanmıřtır⁸.

Reglatuvar T hücreler periferik tolerans yoluyla otoimmunitiyi kontrol eden, antiinflamatuvar etkilere de sahip, immün reglatuvar hücrelerdir. Reglatuvar T hücreleri doğal (natural) ve adaptif Treg olarak sınıflandırılmaktadır. Ateroskleroz ve romatoid artrit gibi birçok kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta Treg regülasyonunun anormal olduğu görülmüş olmasına karşın, KOAH için aynı durumun söz konusu olup olmadığı henüz netlik kazanmamıştır. KOAH'da reglatuvar T hücrelerin rolünün anlaşılması; hastalığın patogenezinin aydınlatılmasında önemli bir rol stlenecektir⁹.

KOAH ile Treg ilişkisini ortaya koymaya yönelik az sayıda çalışma çelişkili sonuçlar içermektedir. Bu çalışmalarda özellikle örnek sayılarının az olduğu dikkat çekicidir. İnvazif yöntemler olan bronkoalveolar lavaj (BAL), bronkoskopik akciğer biyopsi materyali gibi örnekler üzerinde yapılan çalışmalarda örnek sayısı istenilen düzeyde olmamaktadır. KOAH primer olarak akciğerlerin hastalığı olmakla birlikte kaşeksi, iskelet kas disfonksiyonu, depresyon ve osteoporoz gibi akciğer dışında gerçekleşen belirtiler, KOAH'ın sistemik bir hastalık olduğunu dřndrmektedir¹⁰. Lenfositlerin inflamasyon alanından, bölgesel lenf nodlarına ve sistemik dolaşıma g bilinen bir gerektir¹¹. Bu nedenle çalışmanın periferik kanda yapılması lenfositlerin kolay izole edilebildiği noninvazif bir yöntem sağlar.

Bu alışmada, KOAH'lı hastalar ve normal akciğer fonksiyonuna sahip sağlıklı sigara içen ve hiç sigara kullanmayanlardan oluşan kontrol grubunda anahtar rolü olduğuna inanılan Treg hücreler periferik kanda bakılarak, bu hücrelerin dağılımındaki potansiyel farkları incelemeyi, ayrıca KOAH'da önemli

bir risk faktörü olduğu bilinen sigara kullanımının reglatuvar T hücre yanıtına sistemik etkisinin varlığını ortaya koymayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı

Tanım

KOAH irreversible ve genellikle ilerleyici hava akımı kısıtlaması ile karakterize bir hastalık olup, zararlı partikül ve gazlara karşı akciğerlerde gelişen anormal inflamatuvar yanıtla ilişkilidir. Temel olarak akciğerleri etkilemekle birlikte, KOAH ciddi sistemik etkilere de yol açabilen bir hastalıktır¹².

ATS (American Thoracic Society; Amerikan Toraks Derneği)'nin 1995 yılında yayınladığı Tanı ve Tedavi Rehberi'nde KOAH "kronik bronşit ve amfizeme bağlı olarak gelişen hava akımı obstrüksiyonu" olarak tanımlanmıştır. ERS (European Respiratory Society; Avrupa Göğüs Hastalıkları Topluluğu) ise aynı yıl yayınladığı Tanı ve Tedavi Rehberinde KOAH'ı "azalmış maksimum ekspiratuvar akım ile karakterize bir hastalık" olarak tanımlamıştır¹³.

Kronik bronşit, klinik bir tanım olup, akciğer tüberkülozu, bronşektazi, akciğer absesi gibi başka bir hastalığa bağlanmayan, birbirini izleyen en az iki yıl boyunca, her yıl en az üç ay devam eden öksürük ve balgam çıkarma durumudur. Amfizem ise patolojik bir tanımdır. Terminal bronşiyollerin distalindeki hava yollarının, belirgin fibrozisin eşlik etmediği duvar hasarı ile birlikte anormal ve kalıcı genişlemesidir¹⁴.

Evreleme

KOAH'ın tanısında ve sınıflamasında spirometrik ölçümler kullanılır. Tablo1'de hastalığın şiddetinin dört evreye ayrıldığı spirometrik fonksiyonel sınıflandırma görülmektedir¹².

Evre 1- Hafif KOAH: Hafif hava akımı kısıtlanması ile karakterizedir. Kronik öksürük ve balgam çıkarma semptomları olabilir, ama her zaman yoktur. Bu evrede, kişi genellikle akciğer fonksiyonlarının anormal olduğunun farkında değildir.

Evre 2-Orta KOAH: Hava akımı kısıtlanmasındaki artışla karakterizedir. Tipik olarak efora bağlı nefes darlığı vardır. Hastalar genellikle bu evrede hastalıklarının alevlenmesi nedeni ile hekime başvurmaktadırlar.

Evre 3-Ağır KOAH: Hava akımı kısıtlanmasında ağırlaşma, nefes darlığında artış, egzersiz kapasitesinde azalma, halsizlik ve hastanın yaşam kalitesinde olumsuz etki yapan tekrarlayan ataklarla karakterizedir.

Evre 4-Çok Ağır KOAH: Şiddetli hava akımı kısıtlanması ile karakterizedir. Genellikle hastalığa solunum yetersizliği ve kor pulmonale de eşlik eder. Bu evrede yaşam kalitesi çok bozulmuştur ve ataklar yaşamı tehdit edici düzeyde olmaktadır.

Tablo 1: KOAH'ın fonksiyonel sınıflandırılması.

EVRE	ÖZELLİKLERİ
1. Hafif KOAH	FEV ₁ /FVC<%70 FEV ₁ ≥ %80 (beklenen)
2. Orta KOAH	FEV ₁ /FVC<%70 %50≤FEV ₁ <%80 (beklenen)
3. Ağır KOAH	FEV ₁ /FVC<%70 %30≤FEV ₁ <%50 (beklenen)
4. Çok Ağır KOAH	FEV ₁ /FVC< %70 FEV ₁ <%30 (beklenen) ya da FEV ₁ <%50 (beklenen) artı kronik solunum yetmezliği

FEV₁: 1. saniye zorlu ekspirasyon volümü

FVC: Zorlu Vital Kapasite

Epidemiyoloji ve Prevelans

KOAH, tüm dünyada ve ülkemizde sık görülen morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir. Hastalığın prevalansı ve morbiditesi hakkındaki bilgilerimiz, hastalığın toplam yükünün ancak küçük bir kısmını temsil etmektedir. Çünkü KOAH klinik olarak belirgin hale gelinceye kadar genellikle teşhis edilememektedir¹².

40 yaş ve üzerinde KOAH prevalansı 1990–2004 yılları arasında yayımlanan çalışmaların metaanalizinde %10 olarak bulunmuş iken, son yıllarda yapılan BOLD (Burden of Obstructive Lung Disease Initiative; Akciğer Hastalıkları Yükü Girişimi) ve PLATINO (Latin American Project for the Investigation of Obstructive Lung Disease; Obstruktif Akciğer Hastalıklarını Araştırmaya Yönelik Latin Amerika Projesi) çalışmalarında bu oranın artık pek

çok ülkede %20 civarında olduğu, yaş ve sigara içme yoğunluğu ile bu oranın giderek arttığı bildirilmiştir¹⁵. 1976 yılında Ankara Etimesgut bölgesinde yapılan bir çalışmada, Türkiye’de 40 yaş üstündeki KOAH prevalansının %13,6 olduğu (erkeklerde %20,1, kadınlarda %8,2) bildirilmiştir¹⁶. BOLD çalışmasının Adana ilindeki kolunda KOAH prevalansının 40 yaş üzerinde %19,1 (erkeklerde %29,3, kadınlarda %9,9) olduğu bildirilmiştir¹⁷.

KOAH artık tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü’nün yayınladığı 2002 Dünya Sağlık Raporuna göre KOAH tüm dünyada 5. ölüm nedeni olarak kabul edilmekte ve her yıl yaklaşık 2,7 milyon kişi KOAH nedeniyle ölmektedir². Prevalansı ve mortalite hızları ülkeler arasında anlamlı farklılıklar göstermekle birlikte, hastalığın yeterince bilinmemesi, tanı konulamaması ve takip yetersizliği nedeniyle mortalite ve morbidite verilerinin güvenilirliği etkilenmektedir¹⁸.

Risk Faktörleri

Günümüzde üç risk faktörünün KOAH gelişimindeki rolü çok iyi bilinmektedir. Bunlar sigara içimi, mesleki/çevresel toz-dumana maruz kalma ve kalıtsal alfa-1 antitripsin (AAT) eksikliğidir. Bunlara ek olarak bazı risk faktörlerinin KOAH gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Tablo 2)¹².

Tablo 2: KOAH’ ta risk faktörleri.

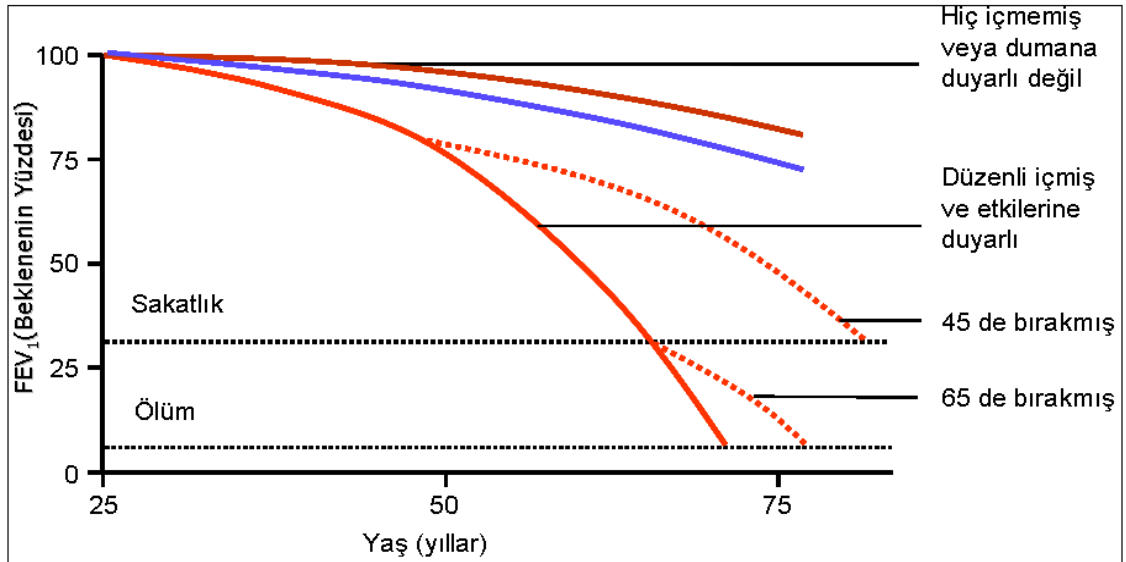
	Çevresel Faktörler	Kişiyeye Bağlı Faktörler
Kesin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sigara içimi ▪ Mesleksel toz ve dumanlar 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Genetik faktörler (alfa-1 antitripsin eksikliği)
Olası	<ul style="list-style-type: none"> ▪ İç ve dış ortam kirliliği ▪ Sosyoekonomik faktörler ▪ Beslenme; <ul style="list-style-type: none"> Yüksek tuzlu diyet Antioksidan vitaminlerin azlığı Doymamış yağ asitlerinin azlığı ▪ Solunum yolu enfeksiyonları 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diğer genetik faktörler ▪ Cinsiyet ▪ Irk ▪ Oksidatif stres ▪ Düşük doğum ağırlığı ▪ Aile öyküsü ▪ Ek hastalıklar

Sigara: Sigara KOAH gelişiminde en önemli risk faktörüdür. Amerika’da ve gelişmiş ülkelerde sigara içimi KOAH gelişiminden %80-90 oranında sorumludur. ABD’de 1980’li yıllardaki KOAH mortalitesinin erkeklerde yaklaşık

%85'i, kadınlarda %70'i sigara ile bağlantılı bulunmuştur. Tüm sigara içicilerde %50 oranında kronik bronşit, %15-20 oranında da KOAH gelişmektedir^{3,4}.

Sigara içenlerde, içmeyenlere göre akciğer fonksiyon anormallikleri, solunumsal semptomlar ve solunum sisteminin hastalıkları daha fazla görülmektedir. Sigaranın etkilerinin görülmesi, sigara içiminin yoğunluğu ve süresi ile bağlantılıdır. Sigara içimine son verilmesi ile yıllık FEV₁'deki kayıp azalmakta ve solunum semptomlarında hafifleme görülmektedir^{3,19}. Sigara içmeyen kişilerin, başkalarının içtiği sigara dumanına maruz kalması olarak tanımlanan pasif sigara içiminin KOAH gelişiminde bir faktör olabileceği bildirilmiştir²⁰. Anne ve babası sigara içen, pasif sigara dumanına maruz kalan okul çağı çocuklarında, FEV₁'de ortalama %5'lik azalma saptanmıştır. Bu azalma seviyesi düşük olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur¹⁹.

Sigara ile hava yolları kısıtlanması arasındaki ilişkiyi gösteren en önemli ve klasik çalışmalardan biri 1977'de Fletcher tarafından yayımlanmıştır. Bu çalışmaya göre sigaraya duyarlı olgularda yıllık FEV₁ kaybı sigara içmeyenlere oranla daha hızlı olmakta ve bu olgular erken yaşta solunum yetmezliğine girmektedirler (Şekil 1). İçilen miktar ve süreye bağlı olarak sigaranın bırakılması solunum fonksiyonlarında önemli oranda iyileşme sağlamaktadır²¹.



Şekil 1. FEV1, yaş ve sigara ilişkisi.

Mesleksel Toz ve Dumanlar: Mesleksel maruziyet, KOAH gelişimi için önemli risk faktörüdür. Kimyasal dumanlar, organik ve inorganik tozlarla yeterince yoğun ve uzun süre karşılaşma, sigara etkisinden bağımsız olarak hava yolu aşırı cevaplılığında, FEV₁ azalma hızında ve KOAH mortalitesinde artışa neden olur. Bu etkenlere sigaranın zararlı etkisi de eklenecek olursa KOAH gelişme riski belirgin olarak artar²². KOAH riski yüksek olan meslekler arasında; maden işçiliği (silika, kadmiyum ve kömür gibi), metal işçiliği, ulaşım sektörü ve kağıt üretiminde çalışma, çimento, tahıl ve tekstil işçiliği gelmektedir²³. Çiftçilik veya tozlu ortamı olan diğer mesleklerde çalışmak kronik bronşit gelişme riskini iki-üç kat artırırken, beraberinde sigara içimi ile bu risk altı kat artmaktadır. Silika tozu da mesleğe bağlı solunumsal toksinlerin en önemlilerindendir²².

Alfa-1 Antitripsin Eksikliği: KOAH gelişimine etkisi olduğu düşünülen birçok aday gen olmasına rağmen, sadece AAT eksikliği kanıtlanmış bir genetik etiyolojik faktördür. Konjenital AAT enzim eksikliği, serum AAT düzeylerinde belirgin azalma ve 30-40 yaşlarında amfizem gelişme riski ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır²⁴.

AAT eksikliği otozomal dominant geçişli bir hastalık olmakla birlikte, sadece genetik yatkınlıkla değil, çevresel risk faktörlerinin de etkisiyle ortaya çıkar. Proteolitik enzimlerin major inhibitörü olan AAT, karaciğer tarafından yapılan bir serum proteindir. Normal akciğerlerde bulunur ve başlıca etkisi nötrofil elastazın akciğer dokusu üzerine yıkıcı etkisini engellemektir. Eksikliği durumunda alveol duvarında harabiyet ve amfizem gelişir. Gelişen amfizem panasiner özellikte olup, genellikle akciğer tabanlarından başlar. Normal AAT düzeyi 150–350 mg/dL ve normal alleli toplumun %90-95'inde bulunan homozigot PiMM allelidir. Ciddi AAT eksikliğinin %95'inde homozigot PiZZ alleli mevcuttur ve amfizem gelişiminde halen bilinen tek genetik risk faktörüdür. Ara grupları oluşturan PiSZ heterozigotlarda ise orta derecede risk söz konusudur²².

Patoloji

KOAH, hava yolları ve akciğer parankiminin kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. KOAH'da rol oynayan temel patoloji, kronik tekrarlayan inflamasyon, havayollarının hasarlanması, yeniden yapılanma ve bu süreçte gelişen tamir mekanizmalarıdır¹².

KOAH olgularında patolojik değişiklikler lokalizasyona göre üç gruba ayrılabilir. Bunlar, büyük (santral) hava yolları, küçük (periferik) hava yolları ve akciğer parankimine ait patolojik değişikliklerdir. İlerlemiş KOAH olgularında hava yolları ve akciğer parankimi harabiyetine sekonder olarak pulmoner vasküler sistemde, sağ kalp ve solunum kaslarında da patolojik değişiklikler ortaya çıkar²⁵.

KOAH patolojisinde gözlenen temel değişiklikler Tablo 3'de özetlenmektedir¹².

Tablo 3: KOAH'ta patolojik değişiklikler.

	İnflamatuvar hücreler	Yapısal değişiklikler
Proksimal hava yolları (Trakea, bronş ve çapı 2mm'den büyük hava yolları)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Makrofaj ▪ CD8 T lenfosit ▪ Az sayıda PMNL ▪ Eozinofil 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Goblet hücre hiperplazisi ▪ Mukus glandlarında artış ▪ Squamöz metaplazi
Periferik havayolları (çap <2mm havayolları)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Makrofaj ▪ T lenfosit CD8>CD4 ▪ B Lenfosit ▪ Fibroblast ▪ Az sayıda PMNL ▪ Eozinofil 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bronş duvarlarında kalınlaşma ▪ Peribronşiyal fibrozis ▪ İntraluminal inflamatuvar eksuda ▪ Hava yollarında daralma
Akciğer parankimi	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Makrofaj ▪ CD8 T lenfosit 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alveol duvar hasarı ▪ Alveol epitelinde apopitoz ▪ Sentrilobuler amfizem ▪ Panasiner amfizem
Vasküler yapı	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Makrofaj ▪ Lenfosit 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ İntimal kalınlaşma ▪ Endotel disfonksiyonu ▪ Düz kas hiperplazisi

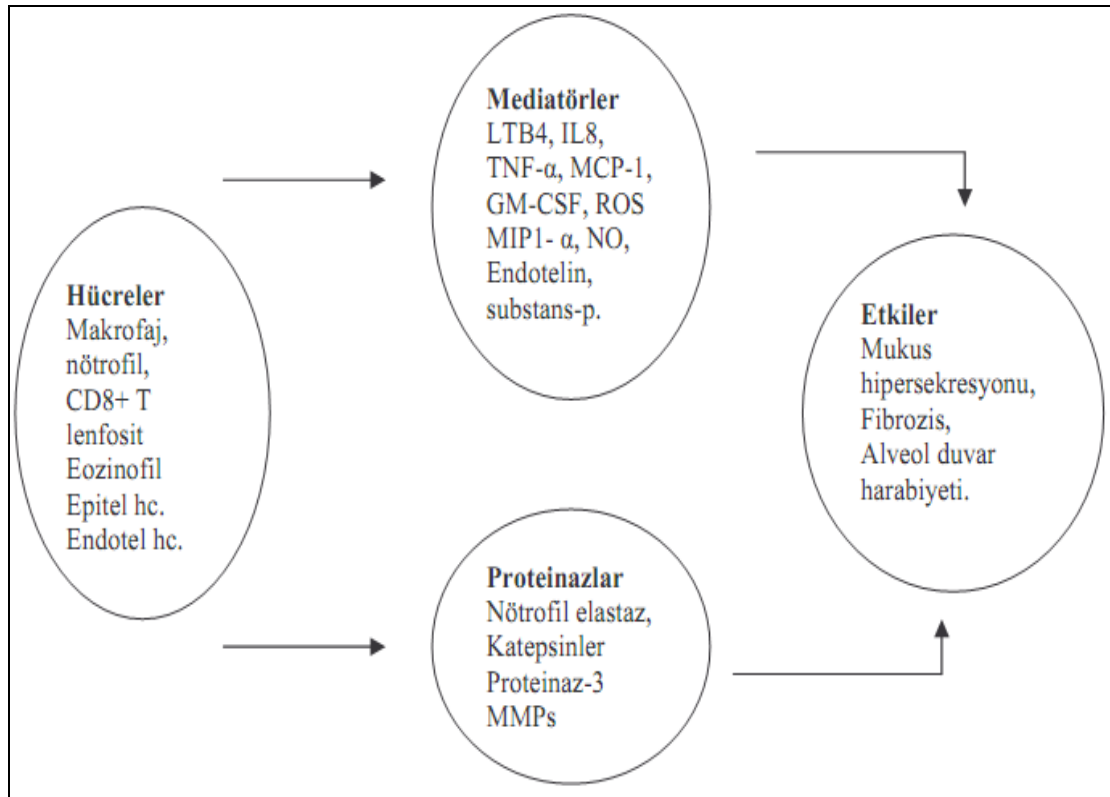
Patogenez

Hastalık gelişiminden akciğer ve havayollarında inflamatuvar hücre artışı, proteinaz/antiproteinaz dengesizliği ve oksidatif stres olmak üzere değişik patogenetik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır¹².

KOAH'ta İnflamasyon

Akciğerde İnflamasyon: KOAH'ın karakteristik özelliği, inhale edilen zararlı gaz ve partiküllere karşı akciğerlerde oluşan kronik inflamatuvar yanıtıdır. Akciğerler için normalde koruyucu olan inflamatuvar yanıtın yoğun olarak gelişmesi, akciğer harabiyetine neden olur²⁶. Akciğer periferinde oluşan kronik inflamasyon; amfizem, küçük hava yollarında daralma ve yapısal değişikliklere neden olur. Hastalık ilerledikçe, küçük hava yolları ve akciğer parankiminde oluşan inflamatuvar yanıt artmaktadır²⁷.

KOAH'lı hastaların hava yolu ve akciğer parankiminde, akciğer ve hava yolu yapısal hücreleri tarafından üretilen inflamatuvar hücreler ve mediatörler artmıştır. KOAH patogenezinde sorumlu olduğu düşünülen hücreler ve mediatörler şematik olarak şekil 2'de gösterilmiştir²⁰.



Şekil 2. KOAH patogenezinde yer alan hücreler ve mediatörler.

KOAH'da hava yolu ve akciğer parankiminde var olan inflamasyon; başlangıçta makrofaj ve T lenfosit, hastalığın ilerlemesiyle B lenfosit ve nötrofil artışı ile karakterizedir. T lenfositlerden CD4+ ve daha fazla oranda CD8+ T hücrelerinde artış vardır. Sigara içen KOAH gelişmeyen kişilerde de benzer inflamasyon izlenmektedir. Ancak KOAH'lı hastalardaki inflamasyon daha fazla olup, ataklar sırasında inflamasyon daha da artış gösterir. KOAH'ta görülen inflamasyon artışının moleküler temelleri henüz anlaşılammıştır, ancak genetik nedenler sonucu oluşabileceği düşünülmektedir²⁷.

Sigara dumanı ve diğer zararlı gaz ve partiküllerin; hava yolunda bulunan makrofajları ve hava yolu epitel hücrelerini uyardığı ve bu uyarılmış hücreler tarafından salınan kemokin ve lökotrien B4 (LTB4) gibi kemotaktik faktörlerin dolaşımdaki lökositlerin akciğerlere çekilmelerine neden olduğu ileri sürülmektedir. KOAH'taki kronik inflamatuvar süreçte CCL1 (CC kemokin ligandı-1), CCL2 (CC kemokin ligandı-2 veya monosit kemotaktik protein-1: MCP-1), CCL5 (CC kemokin ligandı-5) gibi kemokinlerin anahtar rol oynadıkları düşünülmektedir. Olasılıkla, tüm sigara içenlerde inflamatuvar olay başlamaktadır. Bununla beraber, sigara içip KOAH gelişenlerde bu inflamasyon ilerlemekte ve T, B lenfositlerin ve muhtemelen dendritik hücrelerin sitokinler ve diğer mediatörler ile etkileşime girmesiyle mevcut olan bu inflamasyon daha da karmaşıklaşmaktadır^{27,28}.

Sistemik İnflamasyon: KOAH olgularında sistemik inflamasyonun nasıl ortaya çıktığına ait bulgular oldukça yeni, az sayıda çalışma ile desteklenmektedir. Sigara dumanı ve oksidanlar bilindiği gibi sistemik damarlarda arteriosklerotik tutulumu sebep olmakta, damar endotelinin fonksiyonunu bozmaktadır. Sistemik dolaşıma geçen TNF- α (Tümör Nekroz Faktör alfa), IL-1 β (İnterlökin-1 β), IL-6 (İnterlökin-6) gibi sitokinler dolaşımdaki hücreleri akciğerlerden geçerken aktif hale getirebilirler. Ayrıca KOAH'ta var olan hipoksemi TNF- α yapımını artırır ve makrofajlardan sitokin salınımına sebep olur. Stabil KOAH olgularında sistemik dolaşımda nötrofillerin, özellikle CD8+ T lenfositler olmak üzere lenfositlerin ve monositlerin arttığı gösterilmiştir. Ataklarda tüm hücrelerin sayısı artmakta ve bunlara eosinofiller de eklenmektedir. Stabil KOAH olgularında inflamatuvar hücreler ile birlikte inflamatuvar sitokinlere de periferik dolaşımda rastlanmaktadır; TNF- α , TNF- α reseptörleri (TNFR-75, TNFR-55), IL-6, IL-8, C- reaktif protein (CRP), Fas ve

Fas-L (Fas-ligand) gibi. CRP son yıllarda üzerinde oldukça fazla çalışma yapılan bir proinflamatuvar maddedir. CRP endotel hücrelerinde ve mononükleer hücrelerde Nükleer Faktör kappa B (NF-κB)'yi aktive ederek IL-6, IL-8 ve IL-1 yapımına sebep olur²⁹.

Proteinaz-Antiproteinaz Dengesizliği

Alveol duvar harabiyeti ve ekstraselüler matriks yıkımına yol açan proteolitik enzimler ile akciğer dokusunu koruyan proteolitik enzim inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması sonucu amfizem gelişir. Bu dengesizliğe, proteinazların üretim ya da aktivitelerinin artması yanında, antiproteinazların inaktive olmaları veya üretimlerinin azalması da yol açar^{20,30}.

KOAH gelişiminde rolü olan proteinazlar; nötrofillerden salgılanan elastaz, katepsin-G, nötrofil proteinaz-3, makrofajlardan salgılanan katepsin-B, katepsin-L, katepsin-S ve her iki hücreden de açığa çıkan metalloproteinazlar (MMP) elastin ve kollajen başta olmak üzere alveol duvarının bütün ana komponentlerini yıkabilme özelliklerine sahiptirler³¹.

α-1 antitripsin, α-2 makroglobulin, sekretuar lökoproteaz inhibitör (SLPI), MMP'ın doku inhibitörleri (TIMP), sistatin-C gibi endojen antiproteinazlar ise artmış proteinaz aktivitesini inhibe ederler³².

Oksidatif Stres

KOAH'lı hastalarda oksidatif stresin arttığına ve reaktif oksijen radikallerinin KOAH patofizyolojisinde etkili olduğuna dair ciddi kanıtlar vardır³³. Reaktif oksijen radikalleri, sigara dumanında çok yoğun konsantrasyonda bulunur, ayrıca endojen olarak nötrofil ve makrofajları içeren aktif inflamatuvar hücrelerce de yapılırlar³⁴.

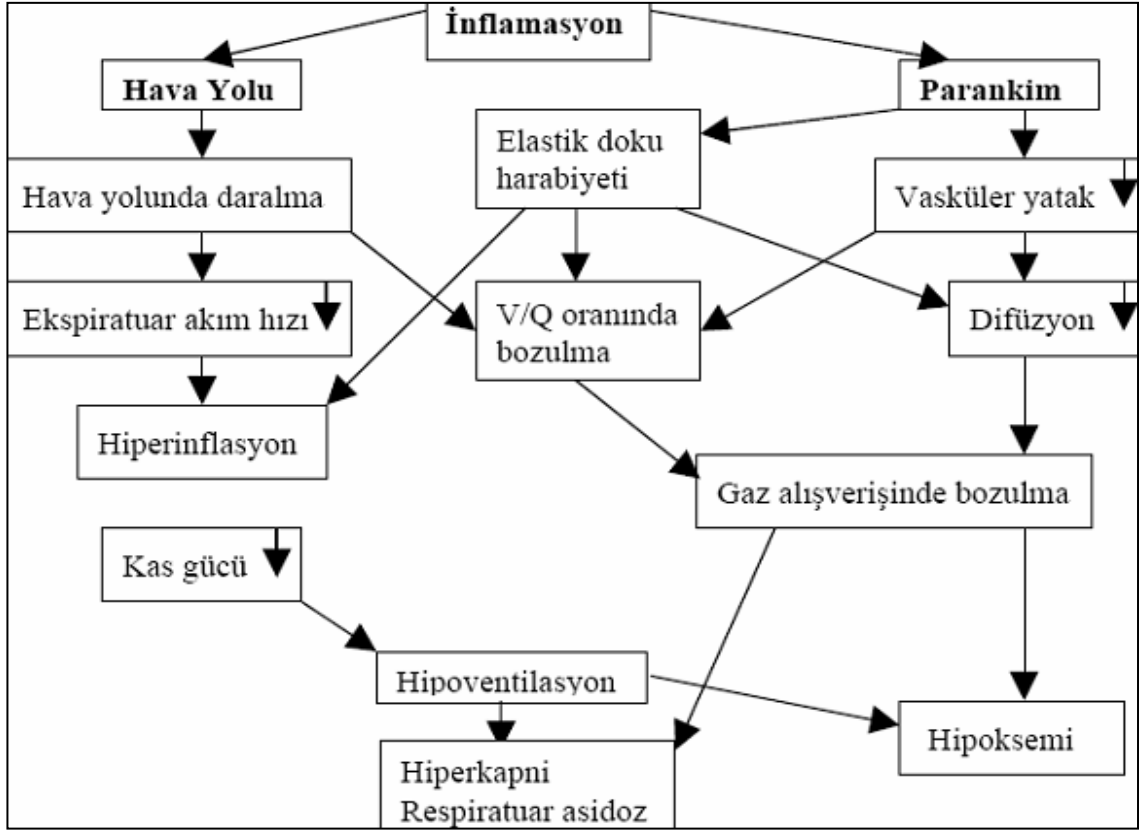
Oksidanlar protein, lipid ve nükleik asit (özellikle deoksiribonükleik asit) gibi çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girmektedirler. Bu şekilde hücre disfonksiyonu ve ölümüne yol açarlar. Akciğer dokusunda oluşturduğu direkt hasarın dışında, oksidanlar aynı zamanda MMP gibi proteazları aktive, AAT ve SLPI gibi antiproteazları inaktive ederek, proteaz/antiproteaz dengesizliğine de neden olmaktadır. Sağlıklı erişkindeki surfaktan, glutatyon ve vitamin C alveoler yüzeyi oksidanlardan korur. Vitamin C miktarının sigara içenlerde bronkoalveolar lavaj (BAL) ve plazmada düşük olduğu ve bunun da FEV1'deki azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir³⁵.

Oksidatif stres, geri dönüşümlü hava yolu daralmasında da rol alabilmektedir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit (NO), sigara dumanı ve inflamatuvar hücrelerden serbestleşen başlıca oksidanlar olup bunların dışında süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (-OH), nitrojen dioksit (NO_2) gibi oksidanlar da vardır. İzoprostan F2 alfa-3 de yine bir oksidan olup, akciğer oksidatif stresinin in-vivo biyolojik belirleyicisidir ve hidrojen peroksit ile birlikte bronkokonstrüksiyon yapabilir²⁰.

Oksidatif stres karşısında organizma kendini korumak için ksenobiyotik metabolize edici enzimlerden destek almaktadır; mikrozomal epoksit hidrolaz (mEH), glutatyon S-transferaz (GST), sitokrom p-450 gibi ksenobiyotik enzimler organizmayı doğal yollardan oksidanlar ve aromatik hidrokarbonlardan korumaya çalışır. Bilindiği gibi her sigara içende KOAH oluşmamaktadır. Genetik olarak bu enzimlerin güçlü olduğu kişiler sigaranın zararlı etkilerinden korunuyor olabilir. Bu düşüncüyü destekleyecek şekilde KOAH'lı kişilerde yapılan mutasyon çalışmalarında mEH, GST, hem oksijenaz-1 (HO-1) gibi gen mutasyonları saptanmıştır^{36,37,38}.

Fizyopatoloji

Başta sigara olmak üzere çeşitli zararlı partiküllerin inhalasyonu sonucu oluşan inflamasyona özgü patolojik değişiklikler, akciğerlerin fizyolojik davranışlarını etkiler³⁹. Hava akımı kısıtlanır ve hava hapsi görülür, gaz değişimi bozulur, mukus sekresyonları artar, pulmoner hipertansiyon ve sistemik etkiler ortaya çıkar¹². KOAH'da periferik hava yollarında akım kısıtlanması FEV₁ ve FEV₁/FVC oranında azalmaya neden olur. Ekspiryumda periferik hava yollarında rezidüel volüm artar, inspiratuvar kapasite azalır. Periferik hava yollarındaki darlık ve solunum kaslarındaki güçsüzlüğe bağlı gelişen pompa yetersizliği ventilasyonu da bozar. Pulmoner arterlerde destrüksiyon ile doku kaybı, hipoksik vazokonstrüksiyon, endotel adezyonundaki artışa bağlı trombüs oluşumu perfüzyonu etkiler. Bunların sonucu olarak ventilasyon/perfüzyon oranı bozulur. Ek olarak amfizem komponentinin varlığı, difüzyonun bozulmasına yol açar. Tüm bu olaylar KOAH'daki hipoksemi ve hiperkapninin mekanizmasını açıklamaktadır¹².



Şekil 3. KOAH'ta fizyopatolojik değişimler²⁰.

Klinik

KOAH'lı hastaların başlıca yakınmaları; öksürük, balgam çıkarma, nefes darlığı ve hırıltılı solunumdur. Hastaların çoğu erken dönemde asemptomatiktir. KOAH hastalarının çoğu semptomların ortaya çıkmasından önce en az 20 paket/yıl sigara içim öyküsü olan kişilerdir. Genellikle hekime ilk kez 50 yaş civarında başvururlar¹⁴. Hastalığın 50 yaşından önce ortaya çıkması ve ailevi olması AAT eksikliğini düşündürmelidir⁴⁰.

Tanı

Solunum Fonksiyon Testleri (SFT): Klinik bir değerlendirmeden sonra KOAH tanısından şüphelenilir, fakat kesin tanı hava akımı obstruksiyonunu ölçen spirometri cihazı ile konur. Ayrıca spirometri ile hastalığın şiddeti, seyri ve prognozu hakkında bilgi edinilebilir. KOAH'lı hastaları erken yakalayabilmek için risk faktörü olan ve kronik öksürük ve balgam yakınması olan kişilere spirometri yapılmalıdır. KOAH, ekspiratuvar akımların kısıtlandığı bir hastalıktır. Bundan dolayı spirometri ile FVC, FEV₁ ve maksimum ekspiryum ortası akım hızlarında (FEF₂₅₋₇₅) azalmalar saptanır¹².

FVC: Efor kullanılarak derin ve zorlu bir inspirasyonu takiben zorlu, hızlı ve derin bir ekspiryumla akciğerlerden çıkartılabilen gaz hacmidir. Sağlıklı kişilerde FVC ile vital kapasite (VK) arasındaki fark en fazla 200 ml'dir. Obstrüktif akciğer hastalıklarında, zorlu ekspiryum sırasında oluşan bronşiyal kollaps nedeni ile FVC ile VK arasındaki fark daha fazladır.

FEV₁: Zorlu ekspiryumun birinci saniyesi içinde akciğerlerden atılan gaz hacmidir.

FEV₁/FVC-Tiffeneau İndeksi: Erken dönemde obstrüksiyonun gösterilmesinde en önemli parametredir.

FEF₂₅₋₇₅: Zorlu ekspiryum manevrasının ortasındaki (FVC'nin %25'i ile %75'nin arasındaki) akım hızıdır. Orta ve küçük hava yollarının fonksiyonel göstergesi olarak kabul edilir. Obstrüktif akciğer hastalıklarının erken dönemlerinde bu parametre azalır.

KOAH teşhisinde unutulmaması gereken bir diğer önemli nokta da FEV₁/FVC değerinin ister pre-bronkodilatör isterse post-bronkodilatör değerleri üzerinden olsun 0.7'nin altında olması gerektiğidir¹². Bu oran 0.7'nin üzerinde ise KOAH teşhisi, istisnalar dışında kolaylıkla dışlanabilir. Bununla birlikte oranın düşük olması kesin şekilde KOAH tanısı koydurmaz. Özellikle ciddi astımlı, bronşiektazili, kistik fibrozisli, bronşiolitis obliteranslı ve akut alt solunum yolu hastalıkları geçirenlerde bu oran 0.7'nin altında bulunabilir. Astım ve KOAH ayırımını yapmada astımlı hastalardaki post-bronkodilatör FEV₁/FVC değerlerinin, ciddi astımlılar dışında, 0.7'nin üzerinde olması gerektiği kuralı diğer bir önemli değerlendirme parametresidir. Hafif KOAH'lı hastalar dışında daima düşük bulunması beklenen FEV₁ değeri (beklenen değer üzerinden <%80), KOAH'ın evrelendirmesinde, buna göre tedavi planlanmasında ve verilen tedavilerin sonuçlarının takibinde kullanılan en önemli parametredir. Standart spirometrik ölçümler arasında yer alan zirve akım hızı (PEF), FVC ve FEF₂₅₋₇₅ değerleri de genellikle FEV₁ ile uyumlu olacak şekilde KOAH'lı hastalarda düşük bulunur^{41,42}.

Bronkodilatör Yanıt (Reversibilite Testi): GOLD rehberinde KOAH'lı olgularda bir kez bronkodilatör yanıtın ölçümü önerilmektedir. KOAH'ta hava akımı obstrüksiyonu kısmen reversibldir. Bu nedenle reversibilite ölçümü KOAH'ı astımdan ayırt etmede, reversibilitenin derecesini belirlemede, hastaların kortikosteroid tedavisinden yarar görüp görmeyeceklerini tahmin

etmekte ve prognoz tayininde kullanılabilir¹². Reversibilite testi, semptomimetik veya antikolinergik ilaçların inhalasyonundan sonra FEV₁'deki değişikliği saptar. Bu amaçla bazal FEV₁ ölçümünden sonra hastaya kısa etkili β_2 -agonist (örneğin 400 µg salbutamol) inhale ettirilir. 15-20 dakika sonra FEV₁'de bazal değere göre %12 ve mutlak değerinde 200 ml artış pozitif olarak kabul edilir. KOAH'lı hastaların ancak %10-30'unda reversibilite testi pozitif bulunabilmektedir^{12,14}.

Sistemik Etkiler

KOAH'ın sistemik etkileri; sistemik inflamasyon, nutrisyonel anormallikler, iskelet disfonksiyonu ve diğer potansiyel sistemik etkiler olmak üzere 4 ana başlıkta toplanabilir (Tablo 4)⁴³.

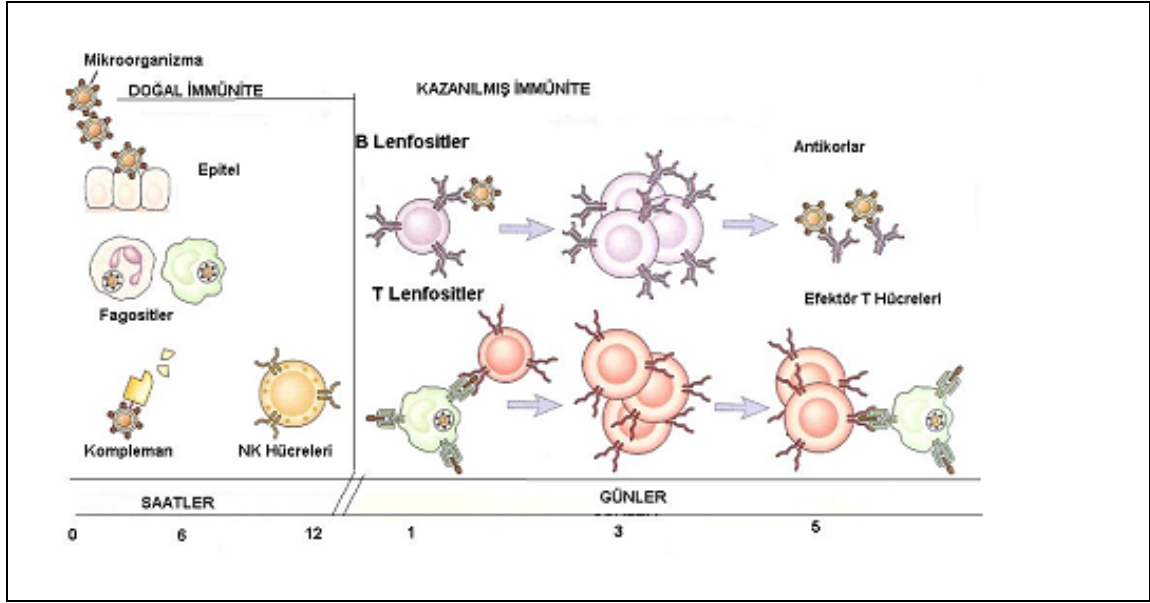
İmmün Sistem

İmmünite; hastalığa, özellikle enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç olarak tanımlanır. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına immün sistem adı verilir, bu hücrelerin ve moleküllerin enfeksiyona yol açan mikroorganizmalara karşı düzenli olarak verdikleri tepkiye de immün yanıt denir. İmmün sistemin önemi enfeksiyon hastalıklarından korunma yanında aşılama, antikor oluşumu ve tümörlere karşı savunma olarak özetlenebilir⁴².

Tablo 4: KOAH'ın sistemik etkileri.

Sistemik inflamasyon	<ul style="list-style-type: none">▪ Oksidatif stres▪ Aktive olmuş inflamatuvar hücreler▪ Sitokin ve akut faz proteinleri plazma düzeylerinde artış
Nutrisyonel anormallikler	<ul style="list-style-type: none">▪ İstirahat enerji harcamasında artış▪ Vücut kompozisyonunda değişim▪ Anormal amino asit metabolizması
İskelet kas disfonksiyonu	<ul style="list-style-type: none">▪ İskelet kas kaybı▪ Anormal yapı▪ Egzersiz kısıtlanması
Diğer potansiyel sistemik etkiler	<ul style="list-style-type: none">▪ Kardiyovasküler sistem üzerine etkiler▪ Sinir sistemi üzerine etkiler▪ İskelet sistemi üzerine etkiler

Konak savunma mekanizması, enfeksiyonlara karşı ilk koruyucu engeli oluşturan 'doğal immünite' ve sonrasında daha yavaş olarak devreye giren ancak enfeksiyonlara karşı daha etkili savunma sağlayan 'edinsel (adaptif) immüniteyi' kapsar (Şekil 4)⁴².



Şekil 4. Doğal ve edinsel immünite.

Doğal İmmünite: Tüm çok hücreli canlılar, mikroorganizmaların yol açacağı enfeksiyonlara karşı kendilerini korumak için intrinsik savunma mekanizmalarına sahiptirler. Bu savunma mekanizmaları organizmada hazır bulduklarından doğal immünite adı verilmektedir. Doğal immünitenin tüm yapı taşlarının ortak özelliği, mikroorganizmaları tanıyarak yanıt vermelerine karşın, mikroorganizma dışındaki maddelere karşı reaksiyon oluşturmamalarıdır⁴⁴.

Doğal immünitenin başlıca yapı taşları: enfeksiyonlara karşı fiziksel ve kimyasal engeli oluşturan epitel tabakası, nötrofil, monosit, makrofaj gibi fagositik hücreler, hücre içi mikroorganizmalara karşı enfekte hücreleri öldürerek ve makrofajları aktive eden interferon- γ (IFN- γ)'yı salgılayarak etkinlik gösteren natural killer (NK) hücreler, kompleman sistemi ve sitokinlerdir⁴⁴.

Edinsel İmmünite: Doğal immünite birçok enfeksiyona karşı efektör olarak savaşsa da, patojenik mikroorganizmalara karşı immün yanıt oluşturmada yetersiz kalır. Enfeksiyona yol açan maddelere karşı savunma oluşturmak edinsel immün yanıtın görevidir. Edinsel immünitenin temel hücreleri olan lenfositler, mikroorganizmaların ürettiği değişik maddeleri ve enfeksiyona

yol açmayan molekülleri, yani antijenleri tanıyan reseptörler taşırlar. Edinsel immüitenin en önemli özelliği ve doğal immüiteden ayıran en önemli farkı yapısal olarak birbirinden farklı antijenlere gösterdiği özgüllük ve antijenle daha önceki karşılaşma sonucu gelişen bellektir⁴².

Edinsel immün yanıt birbirini izleyen evrelerden oluşur: antijen tanınması, lenfositlerin aktivasyonu, antijenin ortadan kaldırılması, immün yanıtın sonlandırılması ve bellek. Her evre lenfositlerin ve immün sistemin diğer parçalarının belirli reaksiyonlarını içerir. Tanıma fazı sırasında, antijene özgül naif lenfositler antijenlerin yerini bulur ve tanır. Lenfositlerin bunu takip eden aktivasyonları için iki çeşit sinyal gerekmektedir. Lenfositlerin spesifik reseptör aracılığıyla antijeni bağlaması sinyal 1'i oluşturur. Sinyal 2 ise eş uyaran moleküller aracılığıyla oluşturulmaktadır. Aktivasyon esnasında naif lenfositlerden bazıları efektör lenfositlere dönüşürler, bu hücrelerin amacı antijenleri ortadan kaldıracak maddeleri üretmektir. Effektör hücreler ve ürünleri, genelde doğal bağışıklığın da yardımıyla mikroorganizmaları elimine ederler, antijenlerin ortadan kaldırıldığı bu faza immün yanıtın efektör fazı adı verilir. Enfeksiyon temizlendikten sonra, lenfosit aktivasyonuna yol açan uyarım sona erer. Sonuç olarak, antijenler tarafından aktive edilen hücrelerin çoğu apoptoz adı verilen programlanmış hücre ölümü vasıtasıyla ortadan kalkar. İmmün yanıt ortadan kalktıktan sonra, kalan hücreler bellek hücrelerini meydana getirir ve dinlenme fazında aylar hatta yıllar boyu sağ kalabilirler, bu hücreler aynı mikroorganizmayla tekrar karşılaşma durumunda hızlı şekilde yanıt oluşturabilirler⁴².

İmmünolojik Tolerans

Normal bir immün sistemin belirgin özelliklerinden biri birçok antijene yanıt oluştururken, bireyin öz antijenlerine yanıtsız kalmasıdır. İmmünolojik tolerans, antijen ile karşılaşan lenfositlerin yanıt vermemesi olarak tanımlanabilir. Bir antijene özgül reseptörü olan lenfosit, o antijenle karşılaştığında üç farklı durum gelişebilir:

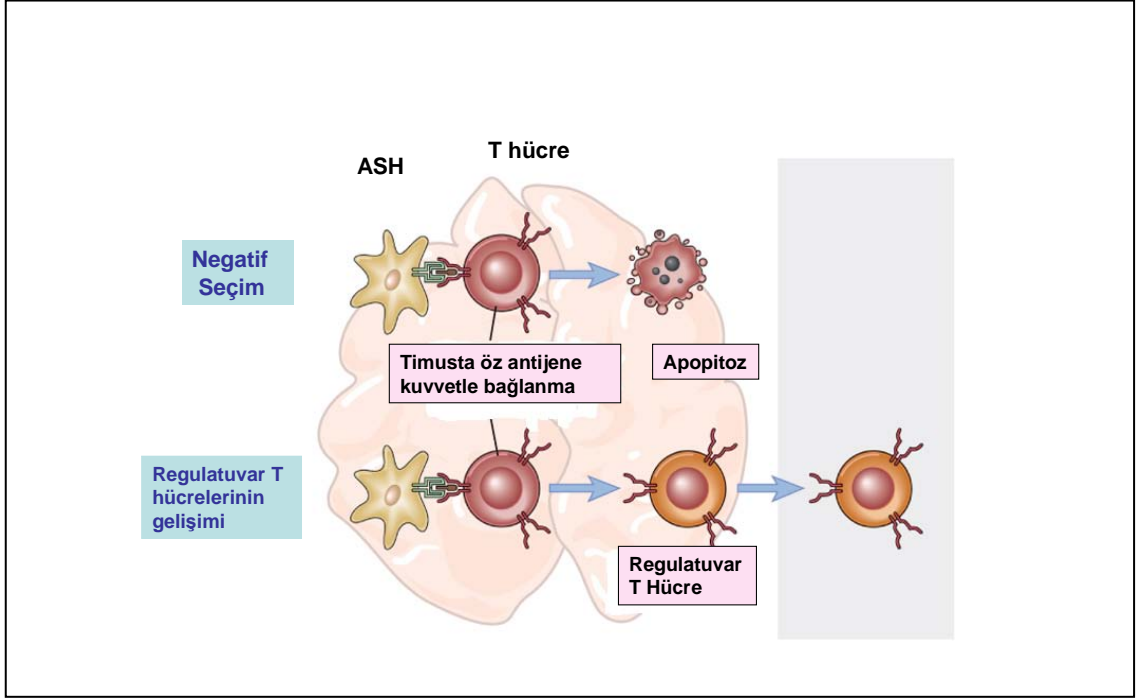
1. Lenfosit etkili konuma geçer ve immün yanıt gelişir; bu yanıtı yol açan antijen immünojen olarak tanımlanır.
2. Lenfositler işlevsel olarak etkisiz kılınır veya öldürülürler ve sonuçta o antijene tolerans gelişir; bu tip yanıtı yol açan antijen, tolerojenik olarak tanımlanır.

3. Antijene özgül lenfositler antijen yokmuş gibi davranırlar, buna yok sayma yanıtı denir⁴⁵.

Aktivasyon, tolerans ya da yok sayma yanıtı, antijene özgül lenfositin tipi, antijenin yapısı ve immün sisteme nasıl sunulduğuna göre değişmektedir. İmmün tolerans, santral tolerans olarak adlandırılan farklı öz antijenlerle daha lenfositler oluşurken sağlanabileceği gibi, olgun lenfositlerin periferik organlarda öz antijenlerle karşılaşması sonucu gelişen periferik toleransla da oluşturulabilmektedir⁴⁵. Santral tolerans lenfosit yapımından sorumlu olan, kemik iliği ve timusta bulunan, sadece öz antijenlere tolerans düzeneğidir. Bu organlarda bulunmayan öz antijenler için tolerans periferik düzeneklerle sağlanır ve sürdürülür⁴⁵.

T Hücrelerinde Santral Tolerans: Timusta gelişen T hücreleri öz veya yabancı birçok tip antijeni tanıyabilen reseptörlere sahiptir. Henüz olgunlaşmamış T hücresi öz antijenleri yüksek avidite ile tanırsa apoptoz ile ölür. Olgunlaşmamış lenfositler MHC'ye (Major Histocompatibility Complex) bağlı olarak sunulan kendi antijenlerimizle kuvvetle etkileşime girerse, bu lenfositler apoptozu tetikleyen sinyali alır ve olgunlaşmasını tamamlayamadan ölür. Bu olay negatif seçim ya da elenme şeklinde tanımlanır ve santral toleransın başlıca düzeneğini oluşturur (Şekil-5). Henüz olgunlaşmamış T lenfositleri bir antijenle iki nedenle kuvvetli etkileşime girebilir; ya o antijen timusta yüksek yoğunlukta bulunmaktadır ya da lenfositin reseptörü antijene yüksek affinite ile bağlanmaktadır⁴⁵.

Timusta öz antijenleri tanıyan bazı olgunlaşmamış T hücreleri reglatuvar hücre niteliği kazanarak periferik dokulara girerler (Şekil-5). Öz antijene bağlanan olgunlaşmamış T hücresinin negatif seçim ile silinmesini veya reglatuvar hücre olmasını neyin belirlediği henüz bilinmemektedir⁴⁵.

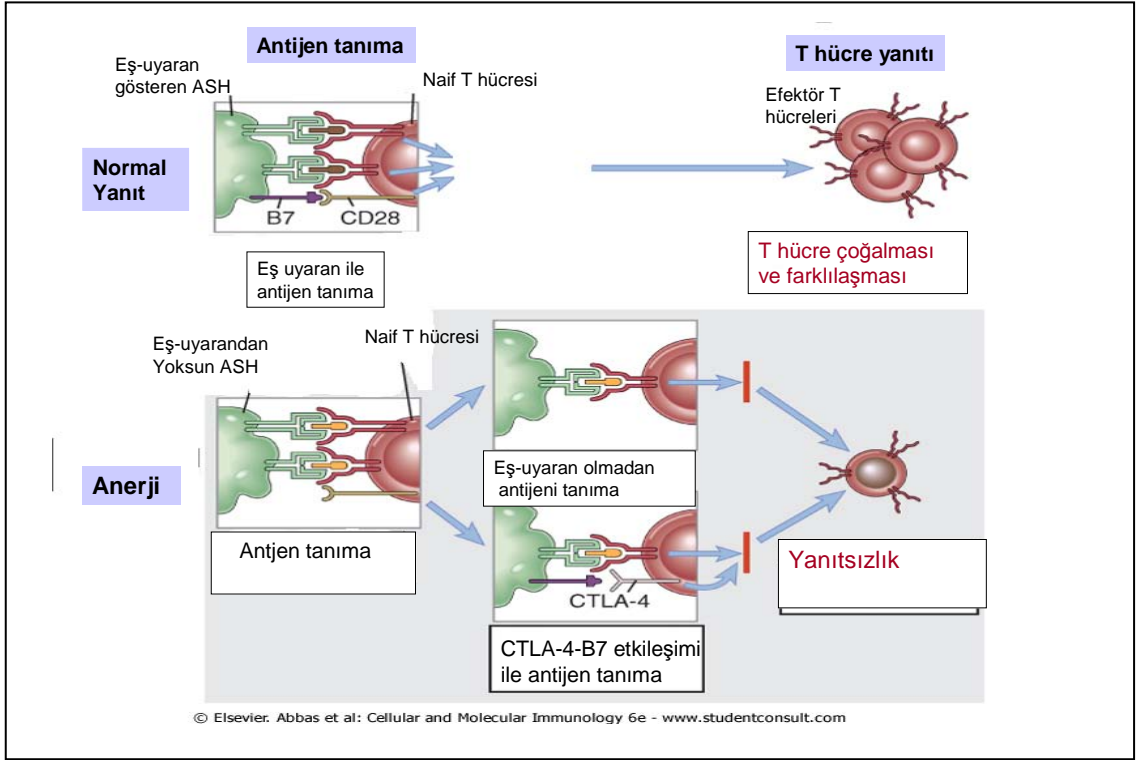


Şekil 5. Santral T hücre toleransı.

Periferik T Lenfosit Toleransı: Periferik tolerans, olgun T hücresi periferde öz antijenleri tanıdığı anda; anerji, aktivasyona bağlı hücre ölümü ya da reglatur hücrelerce gerçekleşen immün baskılama sonucu gelişir. Ayrıca bu olay otoimmüniteyi engellemede santral toleransın tamamlayıcısı olarak düşünülebilir⁴⁵.

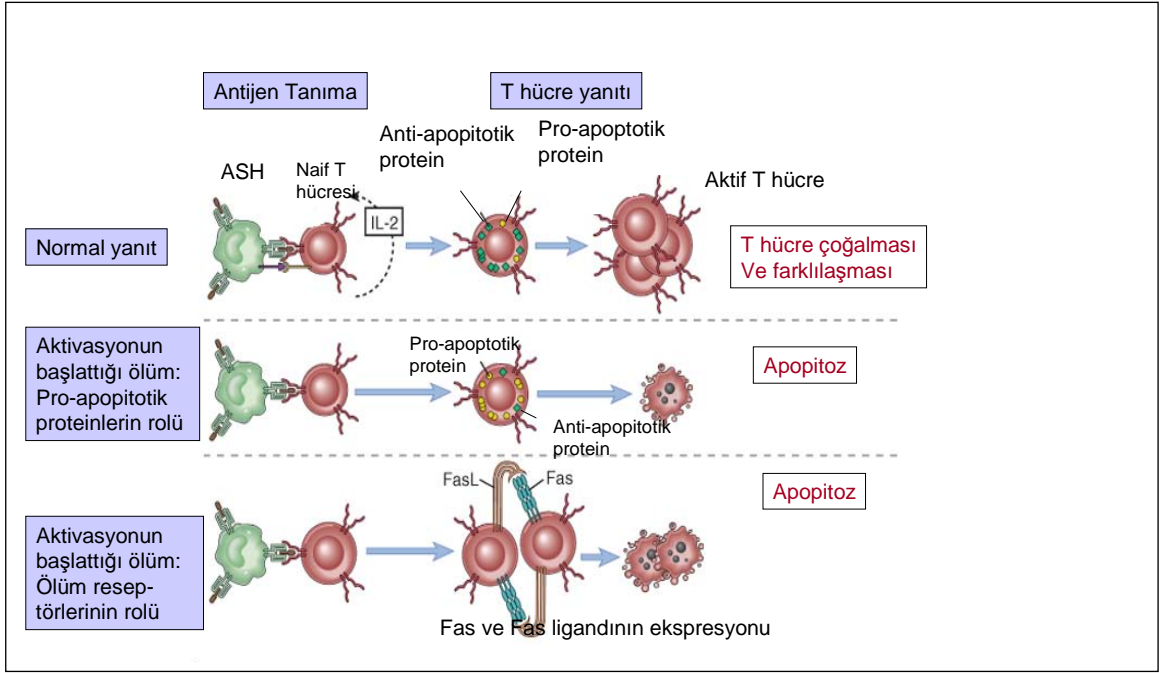
1. T Hücre Anerjisi: T hücresinin bir antijenle karşılaşmasından sonra işlevsel inaktivasyonunu tanımlar. Bu durum genellikle T hücresinin tam aktivasyonu için gerekli olan eş-uyaran yokluğuna bağlıdır. T hücrelerinin tam aktivasyonu için (çoğalma ve farklılaşma ile efektör hücrelere dönüşmesi) iki uyarıya gerek vardır. Birincisi her zaman antijen, ikinci uyarı ise antijen sunan hücrelerden (ASH) gelir ve ancak bu ikinci sinyalin de varlığıyla mikroorganizmalara yanıt gelişmektedir. Genel inanış anerjide, doku ve lenfoid organlarda bulunan ve uyarılmamış ASH'lerin B7 (Ig süperalesinde yer alan en güçlü eş uyarın moleköl) gibi ikincil sinyalleri çok az ya da hiç göstermedikleri şeklindedir (Şekil 6). Öz antijenler için reseptörü bulunan T lenfositler, bu öz antijenleri görerek, antijen reseptöründen sinyalleri alırlar (sinyal-1), fakat gerekli ikincil sinyallerin yokluğunda yanıtızlık gelişir. Bazı durumlarda öz antijenle karşılaşan T hücresi sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (CTLA-4) olarak adlandırılan bir molekölü eksprese eder. Bu moleköl B7 molekölünün yüksek afiniteli bağlacıdır ve T

hücresine yanıtı engelleyici bir sinyal gönderir. Sonuç olarak T hücre inaktivasyonu (T hücre anerjisi) oluşur (Şekil-6)⁴⁵.



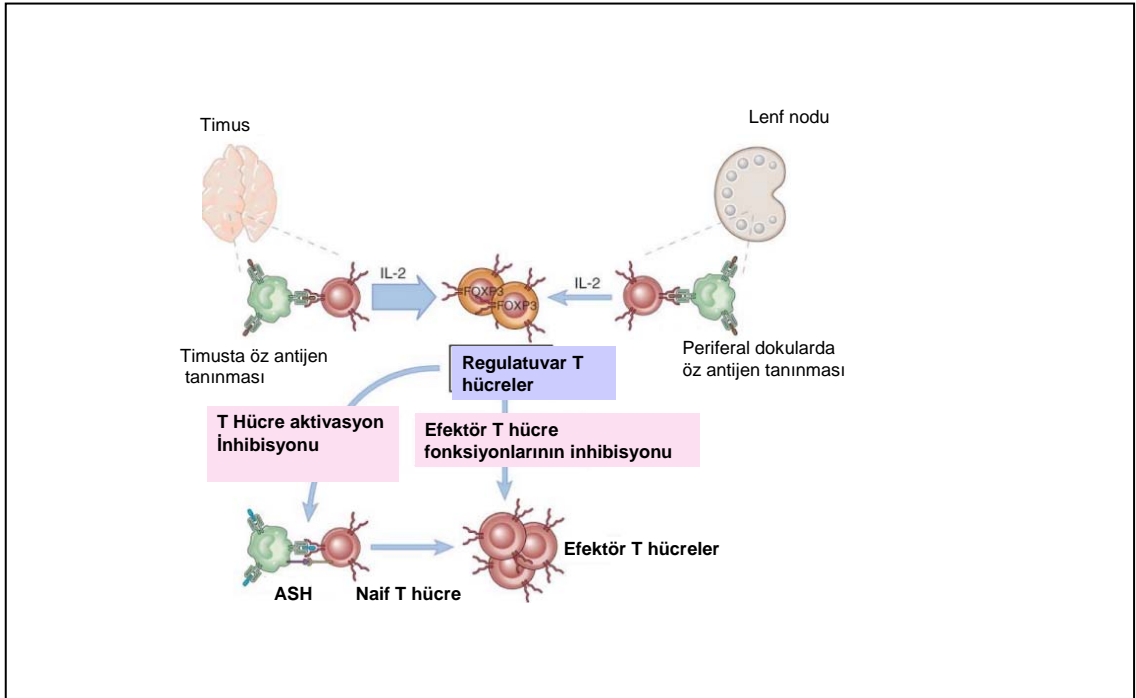
Şekil 6. T hücre anerjisi.

2. Aktivasyona Bağlı T Hücre Ölümü: T hücresi ASH'lerin sunduğu antijene IL-2 ve anti-apoptotik proteinler eksprese ederek, çoğalma ve farklılaşma ile normal yanıt verir (Şekil-7). Olgun T hücrelerinin öz antijenlerle tekrarlayan uyarımı ya da öz antijenin ikincil sinyal olmadan tanınması apoptoz yolağını tetikleyerek, bu lenfositlerin yok olması ile sonuçlanır. Bu işlem aktivasyonun uyardığı hücre ölümü olarak tanımlanır. Aktivasyonun oluşturduğu hücre ölümü için iki olası mekanizma vardır. Birincisi, CD4+ T hücreler tekrarlayan aktivasyonlarda bir ölüm reseptörü olan Fas (CD95) ve FasL birlikte eksprese etmeye başlar. Fas'ın aynı hücrede veya yakın hücrelerde FasL ile bağlanması Fas reseptörü tarafından hücre içine iletilir, kaspazların ve sitolitik enzimlerin aktivasyonu ile T hücrelerinin apoptotik ölümü ile sonuçlanır (Şekil-7)⁴⁵. Aktivasyonla oluşturulan hücre ölümü için ileri sürülen ikinci mekanizma ise, antijenle uyarılan T hücresinde öncül apoptotik proteinlerin oluşması temeline dayanır. T hücresi uyarımı öz antijense antiapoptotik moleküller oluşmamakta ve hücre apoptoza gitmektedir (Şekil 7)⁴⁵.



Şekil 7. T hücrelerinin aktivasyonla ortaya çıkan ölümleri.

3. İmmün Baskılama: Öz antijenle karşılaşmadan sonra bazı T lenfositler reglatuvar hücelere dönüşebilir ve diğer otoimmün yanıt oluşturabilecek hüceleri baskılayıcı etki gösterirler. Reglatuvar T hüceleri timusta veya periferik lenfoid organda oluşabilmektedir (Şekil 8)⁴⁵.



Şekil 8. Reglatuvar T hüceleriyle immün baskılama.

Periferik Kan Lenfosit Grupları

Lenfositler morfolojik olarak birbirine çok benzemelerine ve hatta birbirinden ayırt edilememelerine karşın, işlevsel anlamda köken aldığı dizi ve fenotip olarak birbirinden farklıdır. Periferik kanda üç sınıf lenfosit vardır, bunlar T lenfosit, B lenfosit, NK hücreleridir. Tüm lenfositler kemik iliğindeki kök hücrelerden gelişir. B lenfositler kemik iliğinde, T lenfositler timusta olgunlaşır. Olgun lenfositler yüzeylerinde taşıdıkları özgül reseptörleri tanıyan antijen ile karşılaştıklarında dolaşıma ve periferik lenfoid organlara geçerler. Günümüzde bu hücreler, monoklonal antikor panelleri ile tanınabilen yüzey proteinleri aracılığıyla birbirlerinden ayırdedilmektedir. Bu proteinlerin standart adlandırılması "CD" (cluster of differentiation; farklılaşma kümesi) sayısal tanımlamasıdır; bunlar belli bir hücre tipini tanımlamak için kullanılırlar ve bir antikor kümesi tarafından tanınırlar⁴².

Periferik kandaki lenfositlerin %60-70'i T lenfositlerden oluşur. T lenfositlerin yüzey belirteci CD3'tür ve hücrel immünitinin hücreleridir. Antijen reseptörleri peptid yapılı antijenleri tanırlar. CD4+ T hücrelerine yardımcı T hücreleri adı verilir. Bu hücreler antikor yapımı için B lenfositlere ve hücre içine alınmış mikroorganizmaların yıkımı için fagositlere yardım ederler. CD8+ T lenfositler ise sitotoksik lenfositler olarak adlandırılırlar. Bu hücreler hücre içi mikroorganizmaları ve yabancı antijenleri taşıyan hücreleri lizise uğrattırır⁴². B lenfositler periferik kan lenfositlerinin %20-30'unu oluştururlar. Yüzey belirteçleri CD19 ve CD20'dir.

Reglatuvar T hücreler T lenfositlerin bir alt kümesi olup, çoğunluğu CD4+ fenotipindedir ve yüksek düzeyde IL-2 reseptörü alfa zinciri (CD25) ekspres ederler. CD4+ T helper alt grupları Th1, Th2 ve Th17 hücrelerini içermektedir. Th1 ve Th17 hücreleri otoimmünitede önemli bir rol oynarken, Th2 hücreleri atopik hastalıklarda önemli rol oynar⁴⁶.

Reglatuvar T Hücre

Sakakura ve Nishizuka 1969 yılında çalışmalarında otoimmün hastalıklarda bir hücre tipinin etkinliğinden bahsetmişlerdir⁴⁷. Dick Gershon ise 1970 yılında bu hücre tipini baskılayıcı hücre olarak adlandırmıştır⁴⁸. 1995 yılında Sakaguchi, IL-2'nin α zinciri olarak bilinen CD25'in CD4+ T hücrelerinin

immünolojik toleranstaki rolünü göstererek, yıllarca süren bir tartışmaya açıklık getirmiş ve araştırılması gereken yeni soruları ortaya atmıştır⁴⁹.

2001 yılında yayınlanan Sakaguchi ve arkadaşlarının derlemesinde CD4+CD25+T hücreleri “Regulatuvar T hücreleri” olarak adlandırılmış ve yeni bir T hücre alt grubu olarak ortaya konulmuştur⁸. Regulatuvar T hücreler CD4+CD25+FoxP3+ olarak timustan köken alarak gelişirler ve dolaşımda T lenfositlerin %2’sinden daha azını oluştururlar⁵⁰. Vücutta gelişen otoantijenlere karşı oluşacak immün yanıtı baskılayarak, otoimmün hastalıkları engellemektedirler⁵¹.

Regulatuvar T Hücre Sınıflaması

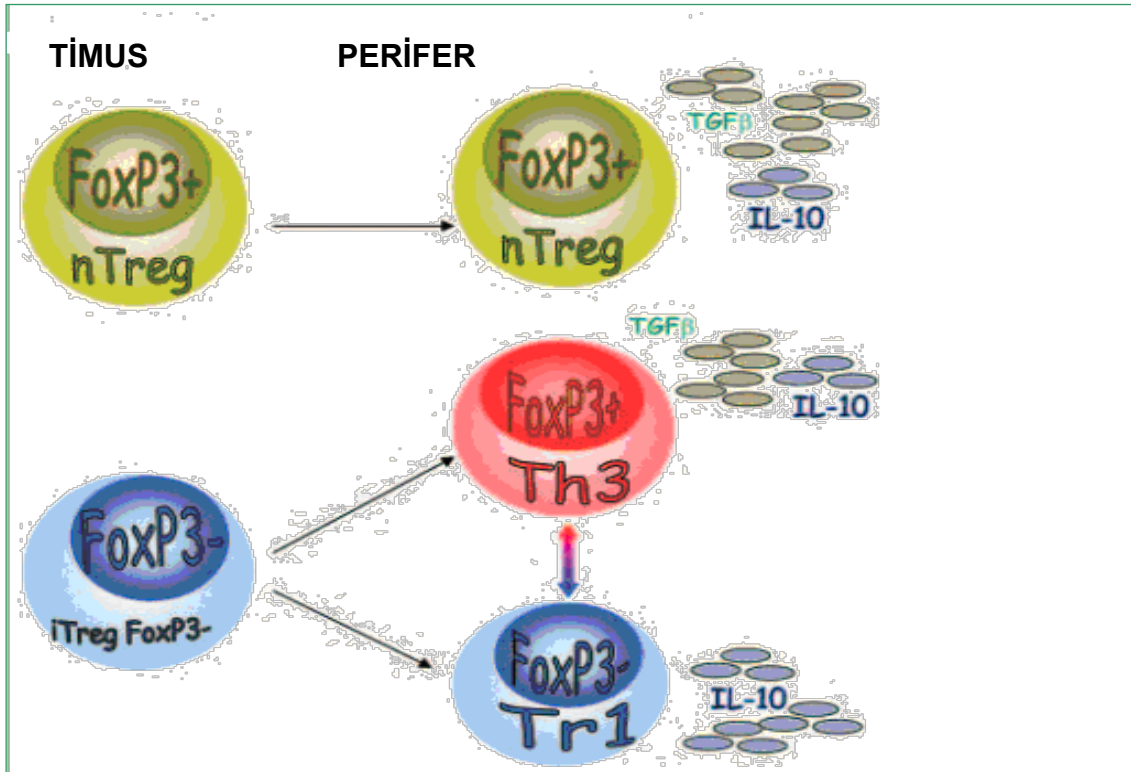
Doğal Treg Hücreleri (Natural Treg, nTreg): Timusta üretilirler. CD4+CD25+ Treg hücrelerin timustaki gelişimlerini düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Sitokin, eş uyaran moleküller ve bir grup ASH’leri içine alan çok basamaklı bir mekanizma ile self reaktif timositlerin Treg hücrelere dönüşümünde, T hücre özgünlüğünün önem taşıdığı belirtilmiştir⁵². nTreg hücreleri, CD25 yüzey ekspresyonu sayesinde tanımlanmışlardır⁴⁹ (Tablo 5). Fakat CD25, Treg hücreleri için spesifik değildir. Çünkü T helper ya da efektör T lenfositler de geçici olarak CD25 ekspresyonu yapma özelliğine sahiptir⁵³.

Son zamanlarda nTreg’ler için daha spesifik olan “transkripsiyon faktörü forkhead-box 3” (FoxP3) belirteç olarak kullanılmaktadır (Şekil-9). Transkripsiyon faktörü, Treg fonksiyonu, gelişimi ve homeostazisi için daha belirleyicidir⁵⁴.

Adaptif (İnducible) Treg Hücreler:

Tr1 iTreg Hücreler: IL10 varlığında antijen ile uyarılmış naif CD4 T helper (Th) aktivasyon sırasında CD25 eksprese ederek, Tr1 hücrelerine dönüşür. IL-10 sekresyonu yapabilen Tr1 hücreler immünsupresif fonksiyonlara aracılık eder. Tr1 hücrelerin FoxP3 negatif olduğu net olarak bilinmektedir⁵⁵ (Şekil-9), (Tablo 5).

Th3 iTreg Hücreler: İn vitro TGF beta (TGF-β) ile ~~stütle~~ edilen CD4+CD25- hücrelerin CD4+CD25+FoxP3+ hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir. Adaptif Treg hücresi olan Th3 aynı zamanda TGF-β sekresyonu ile immünsupresyon etkisi de gösterir⁵⁶ (Şekil-9), (Tablo 5).



Şekil 9. Reglatuvar T hücre alt grupları.

Tablo 5: Treg alt grupları ve özellikleri.

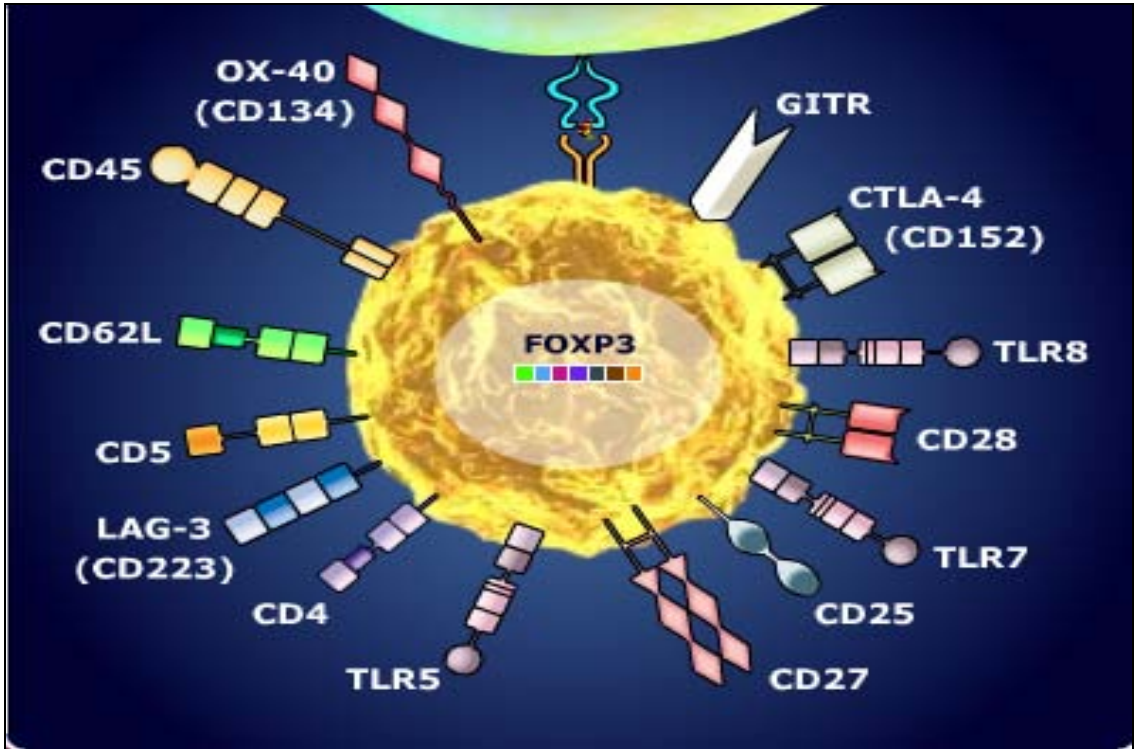
	Natural Treg		Adaptif Treg (iTreg)	
	nTreg	Tr1	Th3	
Fenotip	CD4+CD25 ^{yüksek} , CD127 ^{düşük}	CD4+CD25-	CD4+CD25+	(CD25- prekürsör kaynaklı)
Diğer markerlar	CTLA4+, GITR+, CD127 ^{düşük} , FoxP3+,	CD25 ^{düşük} , CD45RB ^{düşük} , FoxP3-	CD25 ^{düşük} , CD45RB ^{düşük} , FoxP3+	
Supresyon	Hücre-hücre etkileşimi Granzim B bağımlı mekanizma	Sitokin aracılı IL-10	Sitokin aracılı TGF-β	
Hedef hücreler	ASH Effektör T hücre	Effektör T hücre	Henüz bilinmiyor	
In vivo rol	Otoreaktif T hücre supresyonu	İnflamatuvar yanıt	İnflamatuvar yanıt	

Diğer Düzenleyici T Hücreler: IL-10 ve TGF- β üreten doğal öldürücü (NK) hücreler, $\gamma\delta$ T hücreler, timustan köken alan CD8+CD25+ T hücreler, CD8+CD28- T lenfositlerin de düzenleyici özellikleri vardır.

Regulatuvar T Hücrelerin Moleküler Karakteristikleri

CD4+CD25+ Treg hücreler CD25, CTLA-4, CD127, GITR (Glucocorticoid-Induced TNF Receptor), FOXP3, $\alpha\text{E}\beta 7$, LAG-3 (Lenfosit aktivasyon gen-3) ve PD-1'i (Programmed Death-1; programlanmış ölüm-1) kapsayan birçok aktivasyon belirteçleri ile karakterize edilir (Şekil-10)⁹.

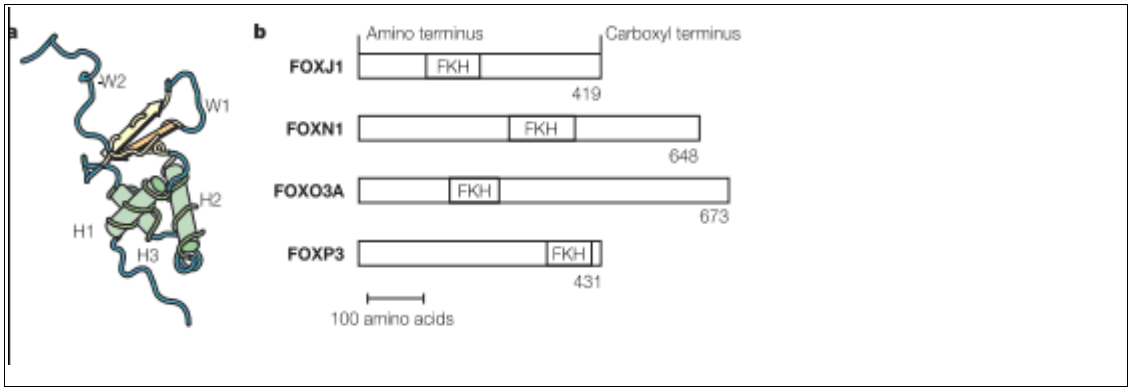
CD25 (IL-2R): Düşük afiniteli IL-2 alfa reseptörü (IL-2R α) olan CD25, 55 kD ağırlığında bir membran glikoproteinidir. Aktive olmuş T ve B hücreleri ile makrofajlarda artmış oranda bulunmaktadır. IL-2R'ü birbirine non-kovalent bağlı α , β , γ proteinlerinden oluşmuştur. CD25 T hücre aktivasyonu ile belirmektedir. IL-2R α , IL-2R β (CD122) ve γ_c (CD132) trimerik yapı T ve B hücrelerinde yüksek afiniteli IL-2 reseptör kompleksini oluşturmaktadır. CD25'in yüksek ekspresyonu CD4+CD25+ Treg hücrelerinin özelliğidir^{57,58}.



Şekil 10. Treg hücrelerin moleküler karakteristikleri.

Forkhead Box P3 (FoxP3): FoxP3, forkhead/sarmal transkripsiyon düzenleyici ailesinin bir üyesidir. Transkripsiyon düzenleyicileri RNA polimerazın DNA'ya bağlanmasına ve transkripsiyonun başlatılmasına aracılık eden

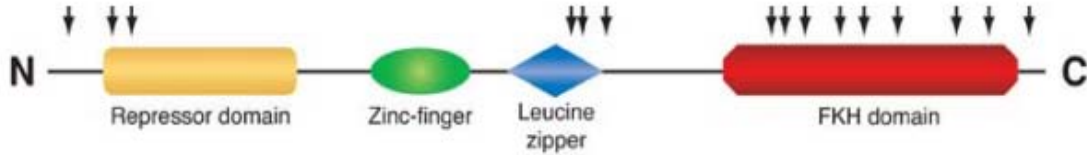
proteinlerdir. Bir transkripsiyon faktörü bir genin transkripsiyonunu hem arttırarak, hem de baskılayarak çalışabilir⁵⁹. Forkhead proteinleri fonksiyonları farklı birçok transkripsiyon faktörünün oluşturduğu bir ailedir⁶⁰. Forkhead ismi embriyosunun son halini alması için gereken “Drosophila melanogaster fork head” (FKH) gen ürününden gelmiştir⁶¹. Bundan hemen sonra karaciğere özgü bir transkripsiyon faktöründe de FKH gen ürününe çok benzer bir DNA'ya bağlanan yapının bulunması ile FKH motifi oluşturularak en ilkel organizmadan en kompleks organizmaya kadar hepsinde bulunan yeni bir transkripsiyon faktör ailesi bulunmuştur^{60,62}. Bu ailenin üyelerinin ortak özelliği DNA'ya bağlanmak için gerekli olan FKH yapısına sahip olmalarıdır. Bu yapı grubun üyeleri arasında hemen hemen benzer amino asitlere sahiptir⁶³. Son yıllardaki FOX ailesi ile ilgili bilgilerimizin artışı sonucu FOX proteinlerinin gelişimsel olayların düzenlenmesindeki önemleri anlaşılmıştır. İmmün regülasyonda rol alanlar esas olarak FOXP3, FOXN1, FOXJ1 ve FOXO ailesinin üyeleridir⁶⁰ (Şekil 11).



Şekil 11. FOX proteinleri ve kanatlı sarmal DNA bağlanan kısmı.

FoxP3, Treg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonunda önemli role sahiptir. FoxP3 fonksiyonunun bozulduğu durumlarda hem insanlarda, hem de farelerde otoimmün patolojiler gözlenmiştir. Foxp3 geni bulunmayan farelerde yoğun lenfoproliferasyon ile seyreden otoimmün bir sendrom olduğu görülmüştür. Bu farelerde CD4+CD25+T hücre popülasyonu bulunmamakta ve çok sayıda aktif otoreaktif T hücresi bulunmaktadır⁶⁴. İnsanlarda FoxP3 en az üç ayrı yapısal oluşum içerir: FKH, lösün zipper ve C2H2 çinko uzantısı (Şekil 12)⁵⁹. FKH yapısının DNA'ya bağlanmada ve nukleusa lokalizasyonunda önemli olduğu bilinmektedir. Site-directed mutagenesis çalışmalarında oluşturulan FKH yapısının karboksil ucundaki mutasyon sonucu, proteinin nukleus yerine hücrenin sitoplazmasında yer alarak fonksiyonunu yerine getiremediği

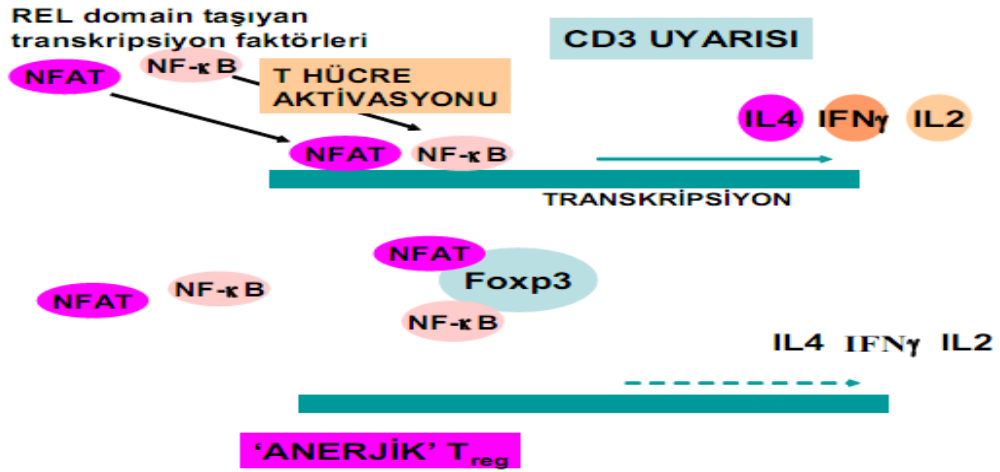
saptanmıştır. Proteinin diğer yapılarının fonksiyonları tam bilinmemektedir. Fakat diğer FOX proteinlerden elde edilen bilgiler ışığında lösün zipper yapısının proteinin üç boyutlu konformasyonunda önemli olduğu düşünülmektedir. FoxP3 proteininin amino ucunda belirgin fonksiyonel yapılar bulunmadığı düşünülmese rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalarda burada iki farklı fonksiyonel yapı bulunmuştur. Bunlardan biri 67. ve 132. amino asitler arasındaki yapı olup genel transkripsiyonel baskılamada etkili iken, 135. ve 198. amino asitler arasındaki kısım spesifik olarak NFAT (nuclear factor of activated T cells) aracılı transkripsiyonun baskılanmasında yer alır. Ayrıca FoxP3 direkt olarak NF- κ B ile de etkileşime girer, fakat etkileşim bölgesi tespit edilememiştir^{59,65}.



Şekil 12. İnsan FoxP3'ünün şematik gösterimi.

FoxP3 ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen halen transkripsiyon faktörü olarak görev almasında etkili olan moleküler mekanizmalar tam aydınlatılamamıştır. FKH yapısının FoxP3'ün karboksil ucunda 11 amino asidlik bir bölgeyi kapsamasıyla diğer FOX proteinlerinden farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu da FoxP3'ün gerçek bir transaktivasyon yapısına sahip olmadığı ve bir transkripsiyon inhibitörü olarak görev yaptığı ileri sürülmüştür⁶⁶.

Normalde NFAT'a bağlı olan IL-2 ekspresyonunun FoxP3 eksprese eden hücrelerde belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir. NFAT IL-2'nin transkripsiyonel aktivatörü olup, promotör bölgedeki NFAT bağlanma yerine FoxP3'ün bağlanması, kompetitif bir inhibisyon mekanizmasının etkili olduğunu göstermektedir. FoxP3 için diğer potansiyel bağlanma bölgeleri IL-4, TNF, GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor), Scurfy sendromu olan farelerin regülasyonu bozulan tüm sitokinlerini kodlayan genlerin promotör bölgelerinde bulunmuştur⁶⁰ (Şekil 13).



Şekil 13. FoxP3'ün immün sistemdeki etkileri.

Scurfy (sf); farelerde X'e bağlı resesif geçiş gösteren, hemizigot erkeklerde yaşamın 16-25. günleri arasında ölümlerle sonuçlanan bir mutasyona bağlı sendromdur. Aktif CD4+ T hücrelerindeki artış, multi-organ infiltrasyonu ile sonuçlanır, bu farelerde lenfosit aktivitesi kontrol edilememektedir⁶⁷. Scurfy farelerindeki sorumlu genin FoxP3 kodlayan gen olduğu bulunmuştur⁶⁴. FoxP3 kodlayan gendeki mutasyon sonucu DNA'ya bağlanacak yapısı olmayan fonksiyonel olarak inaktif, dallanmış bir protein oluşmaktadır⁶⁰.

IPEX (İmmün disregülasyon, poliendokrinopati, X'e bağlı geçiş gösteren sendrom) insanlarda erken çocukluk döneminde ortaya çıkan, fatal gidişli, resesif geçişin görüldüğü bir hastalıktır. Semptomlar önlenemeyen diyare, dermatit, insüline bağımlı diyabet, tiroidit ve anemidir⁶⁸. Deride ve gastrointestinal sistemde yoğun T hücre infiltrasyonu ve otoimmüniteye işaret edecek şekilde otoantikor düzeylerinde artış görülür. Bağlantı analizi çalışmaları sonucu bu sendromdan sorumlu genin farelerdeki scurfın geninin olduğu X kromozomunda bulunduğu gösterilmiştir. Farelerdeki scurfy sendromu ile IPEX birçok yönden benzerlik gösterir⁶⁹. Tüm bu kanıtlar FoxP3'ün immün toleransın sağlanması için gerekli olan Treg hücrelerinin gelişiminde ve düzenlenmesinde yer alan bir gen olduğunu göstermektedir. FoxP3'ün CD4+ T hücrelerindeki ekspresyonu onların Treg hücreler olarak görev alma kapasitesini belirler⁵⁹.

CD 127: γ zincirle birlikte heterodimerik IL-7 reseptörünün bir parçasıdır ve diğer sitokin reseptörlerinde de (IL-2, -4, -9, -15 ve -21) bulunur. Timositler, T ve B hücre progenitörleri, olgun T hücreler, monositler diğer bazı lenfoid ve

miyeloid hücrelerde CD127 ekspresyonu görülür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Treg hücrelerde gösterilen düşük CD127 ekspresyonu, bu hücrelerin belirlenmesinde oldukça önemlidir^{70,71}.

GITR (Glucocorticoid-Induced TNF Receptor): TNFRSF18 olarak bilinir, çoğunlukla CD4+CD25+ Treg hücrelerde eksprese edilir. Naif T hücrelerin aktivasyonla GITR ekspresyon artışı gösterdiği, bununla birlikte supresif aktiviteye sahip olmadıkları anlaşılmıştır. CTLA-4'ten farklı olarak GITR, CD4+CD25+ Treg aracılı supresyonun azaltılması için gereklidir. GITR-GITRL birleşmesi sonucu Treg supresör aktivitesinin inhibisyonu ile Teff hücre aktivasyonu gerçekleşir⁷².

Lenfosit Aktivasyon Gen-3 (LAG-3): MHC klas II ligandı LAG-3 (CD223) CD4+CD25+ Treg hücrelerde ve periferdeki indüklenebilir Treg hücrelerde eksprese edilen negatif bir düzenleyicidir. Antijen odaklı T hücre çoğalmasını farede inhibe ettiği gösterilmiştir. LAG-3 eksikliği reglatuvar aktiviteyi inhibe eder^{73,74}.

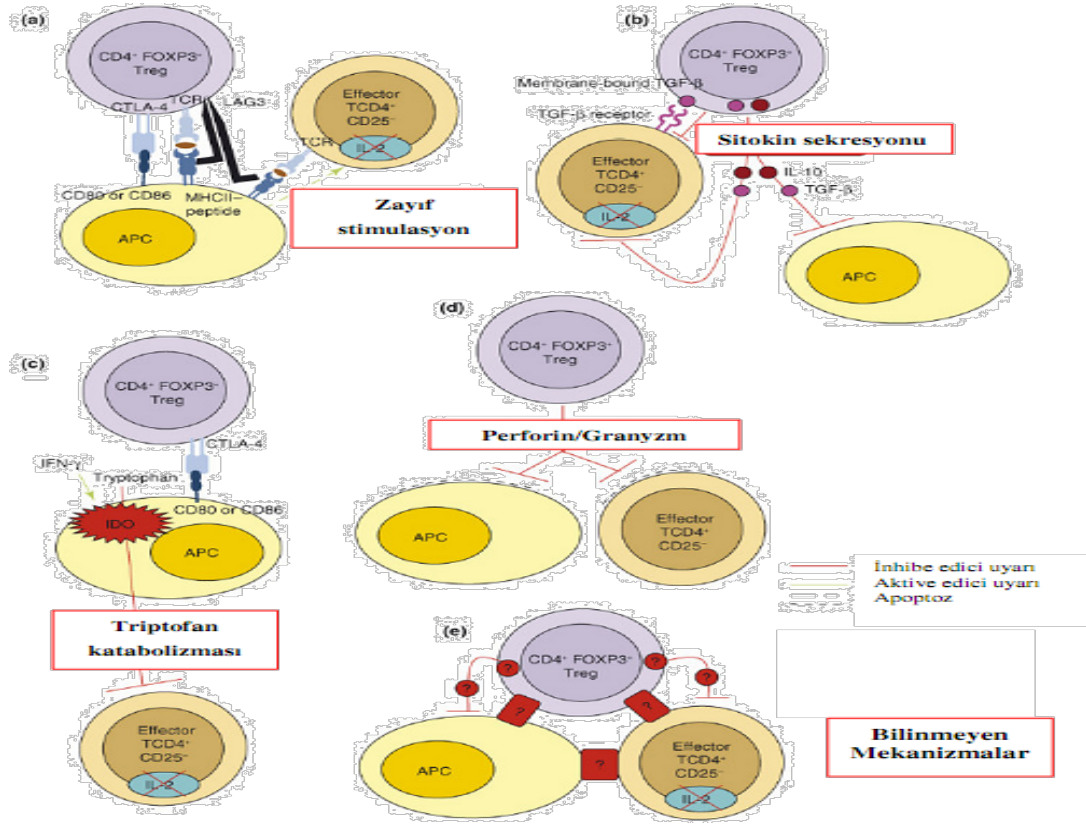
Programlanmış Ölüm Reseptörü-1 (PD-1): PD-1 CD28 ailesinin bir üyesidir, T hücrelerde eksprese edilir ve aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. PD-1 mRNA'sı hem CD4+CD25+ Treg hücrelerde, hem de anerjik T hücrelerde yüksek miktarda eksprese edilir. Periferel tolerans ve otoimmünitenin düzenlenmesinde gerekli olabilir. PD-1'den yoksun farelerde lupus-benzeri glomerulonefrit, artrit ve otoimmün dilate kardiyomiyopati geliştiği görülmüştür. Ayrıca PD-1 B hücrelerden de eksprese edilmektedir^{75,76}.

CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-Associated 4 = CD 152): Fare ve insanlarda CD4+CD25+ T hücreler CTLA-4 eksprese etmektedirler. CTLA-4 eş uyarıcı molekül olan B7 için yüksek afiniteye sahiptir, immün supresyon bu bağlanmayla gerçekleşir. CTLA-4'ün blokajı ile gerçekleşen T hücre aracılı immünitede artış gözlenir⁷⁷. CTLA-4, Ig süperailisinde yer alan ikincil sinyal moleküllerinden biridir. CTLA-4 molekülü T hücre ikincil sinyali olan CD28 molekülüne benzer bir moleküldür. Hem CD28, hem de CTLA-4 molekülleri antijen sunan hücreler üzerinde bulunan ve yine ikincil sinyal molekülleri olan B7-1 (CD80) ile B7-2 (CD86) moleküllerine bağlanır. CTLA-4 molekülü T hücrelerine inhibe edici sinyaller gönderirken, bunun aksine CD28 molekülü uyarıcı sinyaller gönderir⁷⁸.

Reglatuvar T Hücrelerin Etki Mekanizmaları

Tüm timus kökenli doğal ve indüklenmiş Treg hücreler supresif fonksiyonlarını gösterebilmek için bir TCR (T cell receptor; T hücre reseptörü) tetiklemesine ihtiyaç duyarlar. Treg hücrelerin efektör T hücre aktivasyonunu baskılamadaki mekanizması kesin ve net olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, genel anlamda hücre-hücre kontak ve sitokin aracılı olmak üzere iki yolla gerçekleştiği düşünülmektedir^{79,80}. Treg hücreler efektör T hücre proliferasyon ve interferon gama (IFN γ) üretilmesini supresyonunu direkt bu hücrelerle temas ederek gerçekleştirebilmektedir. Effektör T hücre üzerindeki CD80/CD86'nın Treg hücre yüzeyindeki CTLA-4 ile bağlanmasıyla inhibisyon gerçekleşir (Şekil 14a). Treg hücrelerin efektör T hücrelerin fonksiyonunu etkilemesinde bir başka mekanizma DC (dendritic cell; dendritik hücre) modülasyonu aracılığıyla DC üzerindeki CD80/CD86'nın Treg CTLA-4 ile bağlanmasıyla, DC'de indolamin-2,3-dioksigenaz (IDO) ekspresyonu ve aktivasyonu artar (Şekil 14c). IDO triptofan amino asidi degradasyonunda yer alan katabolik bir enzimdir. Bu nedenle triptofanın azalmasıyla T hücre proliferasyon inhibisyonu gerçekleşmektedir^{80,81,82}. Treg hücreler granzim A eksprese edebilirler. Böylece CD4+ ve CD8+ T hücreleri perforin bağımlı mekanizma üzerinden öldürebilirler (Şekil 14d). nTreg hücreler perforin/granzim apoptotik yolağını kullanırken, adaptif Treg hücreler Fas/FasL aracılığıyla bunu gerçekleştirir⁸³. İn vitro çalışmalara göre Tr1 ve Th3 hücreleri supresif aktivitelerini IL-10 ve TGF- β sitokinlerini üreterek göstermektedirler⁸⁴ (Şekil 14b).

Ayrıca Treg hücre supresif etki mekanizmalarından biri de IL-2 aracılığıyla olur. IL-2 üretiminin inhibisyonu ve/veya CD25 ile IL-2 etkileşimi sonucu yüksek miktarda tüketimi ile bunu gerçekleştirir. TCR stimülasyonundaki CD4+ ve CD8+ T hücrelerin, Treg hücre aracılı baskılanmasında her iki mekanizma da önemlidir^{85,86}.



Şekil 14. Treg'lerin etki mekanizmaları⁸⁷.

Otoimmün Hastalıklarda Reglatuvar T Hücre Rolü

Reglatuvar T hücreler, otoimmünitede otoreaktif mekanizmalar ile reglatuvar mekanizmalar arasındaki hassas dengede önemli bir komponenti oluşturmaktadır⁸⁸. Otoreaktif hücre sayısı ve fonksiyonundaki bir artış ya da reglatuvar mekanizmanın kaybıyla dengenin otoreaktif tarafa doğru kaymasına otoimmünite denir⁴⁵. İmmün sistemin bu dengesizliğinin Treg sayısında ya da fonksiyonundaki azalmanın bir sonucu olabileceği ileri sürülmektedir⁸⁹. Otoimmün hastalıklar Treg hücre sayısı veya fonksiyonundaki anormalliklere göre 6 gruba ayrılır;

- 1) Treg sayısı düşük-fonksiyonu bilinmiyor: Otoimmün poliglandüler sendrom tip 1 (APS-I), Sistemik lupus eritematozus (SLE), Kawasaki hastalığı.
- 2) Periferik kanda azalmış Treg sayısı-düşük fonksiyon: Otoimmün hepatitler
- 3) Periferik kanda düşük Treg sayısı-normal fonksiyon ve hedef organda artmış Treg sayısı-güçlü fonksiyon: İnflamatuvar barsak hastalığı, Romatoid artrit (RA)

- 4) Periferal kanda düşük Treg sayısı-normal fonksiyon ve hedef organda ciddi T hücre infiltrasyonu-düşük Treg sayısı: Primer biliyer siroz (PBS), myastenia gravis (MG)
- 5) Treg sayısı normal-düşük fonksiyon: Otoimmün poliglandüler sendrom tip II (APS-II), Tip1 DM, Multiple skleroz (MS)
- 6) Periferal kandaki yüksek Treg sayısı-artmış fonksiyon: Sarkoidoz

Bazı otoimmün hastalıklarda Treg sayısı az, fakat fonksiyonu normalken, bazılarında Treg sayısı normal ama fonksiyonu azalmıştır. Yapılacak ileri çalışmalar her hastalıkta farklı mekanizmaların açığa çıkabileceğini düşündürmektedir⁸⁸.

KOAH'ta İmmünite

KOAH'ta Doğal İmmün Sistem

Solunum Epiteli: Hem küçük hem de büyük havayollarında doğal immün yanıtın ilk hücreleri solunum epitel hücreleridir. Solunum epiteli aynı zamanda mikrobiyal patojenler ve inhale edilen toksinler (tütün ürünleri, sigara gibi maddeler) için doğal bir bariyer olup, epitelde yer alan hücrelerin akciğerlerde immün yanıtı başlatma ve yönetmede çok önemli rol oynadığı, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur⁹⁰. Bir miktar sigara içimi sonrasında bile, epitel hücrelerinde yapısal değişiklikler meydana gelir ve bu değişiklikler sonucunda bariyer fonksiyonunu kaybeder. Muko-siliyer klirens azalır ve skuamoz metaplazi meydana gelir⁹¹. Solunum epitel hücrelerinin toll-like reseptör ailesinin (TLRs) birkaç üyesini salgıladığı rapor edilmiştir. TLRs ailesi, patojen kaynaklı bileşikler doğuştan tanıma ve sıklıkla KOAH alevlenmeleri ile ilişkili olan bakteriyel/viral enfeksiyonlara pro-inflamatuvar immün yanıt verilmesinde önemli rol oynama gibi işlevlere sahiptir⁹².

Alveolar Makrofajlar: KOAH'ta inflamatuvar yanıtın temel hücreleridir. Doku hasarı olan bölgeye infiltre olan makrofaj sayısı ile hastalık progresyonu arasında güçlü bir ilişki olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Biriken makrofajlar birçok proinflamatuvar mediyatörü de salgılar^{93,94}. MMP-9/12 gibi metalloproteazların artmış salınımı ile makrofajlar, amfizemde gözlenen doku yıkımına direkt olarak katkıda bulunurlar⁹⁵. Ayrıca alveolar makrofajlar salgıladıkları kemokinler ile inflamasyon bölgesine diğer immün hücre gruplarını çekebilir. Makrofajlardan IL-8 salınımının arttığı bildirilmiştir. IL-8, proteaz sekresyonu ile doku yıkımını arttıran nötrofillerin infiltrasyonuna neden olur.

Makrofajlar CXCL9 (CXC ligandı-9), CXCL10, CXCL11 gibi kemokinlerin salınımı ile de T hücre infiltrasyonuna yol açabilir^{30,96} (Şekil 15).

Dendritik Hücreler: Doğal immün yanıtın "sentinel" (bekçi) hücreleridir ve antijen sunan hücreler olarak doğal ile kazanılmış immün sistemler arasında kritik bir rol alırlar. Hem insanlar, hem de hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarla kronik sigara maruziyeti sonucu akciğerlerde dendritik hücrelerin maturasyon durumu incelenmiştir. Bazı vakalarda KOAH'la ilişkili olarak matür dendritik hücrelerin sayısında artış saptanırken, bazılarında ise matür dendritik hücre ve T hücrelerinin stimülatör kapasitelerinde azalma saptanmıştır^{97,98}. Bir kemokin reseptörü olan CCR6 (CC kemokin reseptör-6) ekspresyonu, dokuya infiltre olan proinflamatuvar dendritik hücrelerle ilişkilidir. KOAH hastalarının akciğer dokusunda CCR6 ligandı olan CCL20 (CC kemokin ligandı-20) düzeylerinde belirgin artış gösterilmiştir⁹⁹. Adaptif immün yanıtta katkıları yanında dendritik hücreler, makrofajlar gibi MMP-12 ekspresyonu ile KOAH'taki doku yıkımı ile de ilişkili olabilirler¹⁰⁰.

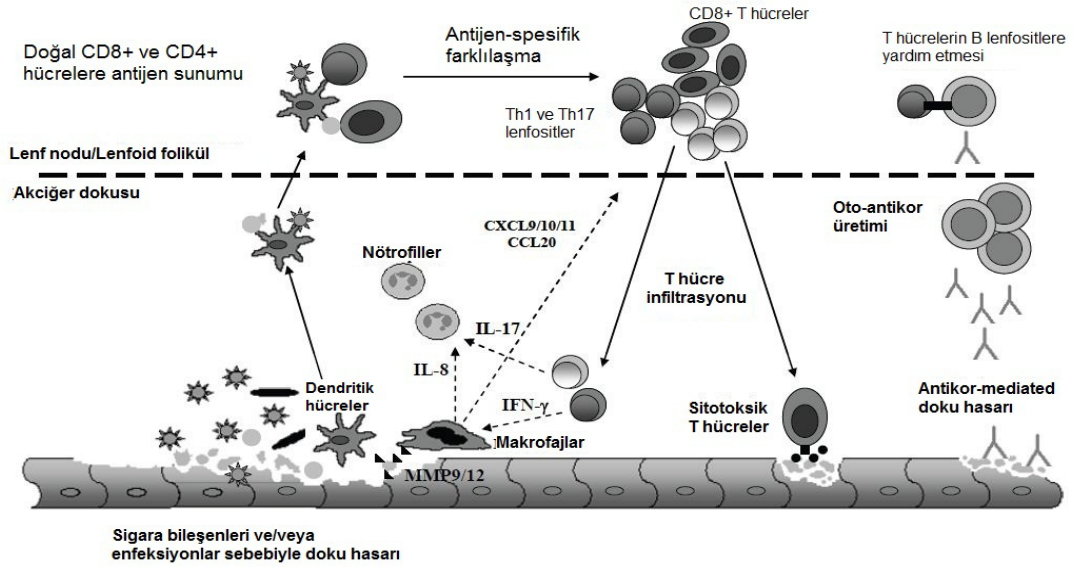
KOAH'ta Edinsel İmmün Sistem

T hücreler: KOAH'taki kronik pulmoner inflamasyonun özelliği, aktive olmuş T hücreler, özellikle de CD8+ sitotoksik T hücre infiltrasyonudur¹⁰¹. Uzun süre sigara dumanına maruz bırakılmış farelerde, maruziyetin sonlandırılmasına rağmen CD8+ T hücre infiltrasyon varlığı gösterilmiştir¹⁰². Etektör CD8+ T hücre fonksiyonlarının etkilerinin temel sonucu, hedef hücrelerde FasL ya da perforin/granzim bağımlı bir mekanizma ile gelişen apoptozisdir. Amfizematöz akciğer dokusunda doku yıkımı ve apoptozis ile T hücre infiltrasyonu arasında bir korelasyon bulunmuştur¹⁰³.

B Hücreler: KOAH'ta T hücrelerinin rolü gün geçtikçe daha iyi anlaşılırken, yakın zamanda yapılmış çalışmalarda B hücrelerinin ve oto-antikör üretiminin önemli olduğuna da dikkat çekilmektedir. CD4+ T hücreleri, B hücrelerinin antikör salınımına yardımcı olarak humoral immüniteye katkı sağlamaktadır. KOAH hastalarındaki amfizematöz akciğer yapısında, CD4+ T hücreler ve B hücrelerin birlikte yer aldığı, germinal merkez içeren lenfoid follikül oluşumu gösterilmiştir. B hücrelerinin bulunduğu follikül sayısının, hastalığın ciddiyeti ile direkt ilişkili olduğu bulunmuştur¹⁰⁴.

Özetle tütün içiminin indüklediği doku hasarı, makrofaj ve dendritik hücreler gibi doğal immünite hücrelerinin inflamasyon bölgesine gelmelerine ve

aktivasyonlarına yol açar. Hem sigara içerisindeki bileşikler, hem de hasarlanmış dokudan kaynaklanan endojen moleküller drene oldukları lenf nodlarında dendritik hücrelerce naif T hücrelerine antijen olarak sunulurlar. Antijen spesifik T hücre aktivasyonu makrofaj kaynaklı kemokine yanıt olarak inflamasyon bölgesine göç eden CD4+, CD8+ T hücrelerinin oligoklonal proliferasyonuna yol açar. Bu bölgeye infiltre olan T helper hücreler (Th1 ve Th17) spesifik sitokinlerin salınımı ile inflamatuvar yanıtı daha da artırır. Bu spesifik sitokinlerin sekresyonu nötrofil infiltrasyonu, makrofaj aktivasyonu, CD8 sitotoksik T hücre yanıtını ve aktive olmuş B hücrelerinden otoantikor üretimini uyarır (Şekil 15)¹⁰⁵.



Şekil 15.KOAH'taki immün yanıtın genel bir şekli.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Grubu

Bu çalışmada; Mart 2010-Ocak 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran GOLD 2009 kriterlerine göre klinik ve spirometrik olarak KOAH tanısı almış, 40 yaş üzeri, halen sigara içen veya bırakmış 79 hasta (10 kadın, 69 erkek) bilgilendirilmiş olur formu alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Hastalara sosyo-demografik özelliklerini, sigara içme öykülerini, ek hastalık varlığını içeren bir anket formu uygulandı. Son 2 ay içinde atak geçiren, sistemik steroid kullanan ve aktif enfeksiyonu bulunan KOAH'lı hastalar çalışmaya alınmadı.

Kontrol grubu olarak 40 yaş üzeri sigara içen 30 (17 erkek, 13 kadın), sigara içmeyen 30 (10 erkek, 20 kadın) klinik ve spirometrik olarak sağlıklı bulunan bireyler bilgilendirilmiş olur formu alındıktan sonra çalışmaya alındı.

Tüm gruplarda astım, egzema, alerjik rinit, malignensi, otoimmün hastalık öyküsü olan bireyler çalışma dışı bırakıldı.

Bu çalışma Helsinki Deklarasyonu özelliklerine göre yapılmış ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Solunum Fonksiyon Testleri

Hastalara ATS kriterlerine uygun olarak Vmax22 SENSOR MEDICS marka spirometre cihazı ile Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğinde solunum fonksiyon testi üç kez yapıldıktan sonra en iyi test kaydedildi. Bronkodilatasyon testinde ise hava haznesi ile 4 puff salbutamol (400 µgr) inhalasyonunu takiben 15 dakika sonra FEV₁/FVC (%), FEV₁ (% L), FVC (% L) değerleri ölçüldü.

GOLD 2009'a göre KOAH evrelendirmesi yapıldı. Buna göre postbronkodilatör FEV₁/FVC <%70 olanların, FEV₁'i >%80 evre 1 (Hafif), FEV₁ % 50-80 arasında ise evre 2 (Orta) , FEV₁ %30-50 arasında ise evre 3 (Ağır), FEV₁ <%30 ise evre 4 (İleri) KOAH olarak kabul edildi. Çalışmamızda evre 3 ve evre-4 Ağır-İleri evre olarak birlikte gruplandırıldı.

Kullanılan Araç ve Gereçler

Akım sitometri cihazı

Santrifüj cihazı

+ 4⁰C Buzdolabı

BD Facs Calibur

Nüve NF 800

Electrolux

Otomatik ayarlanabilir pipet (2-20 µL)	Eppendorf
Otomatik ayarlanabilir pipet (20-100 µL)	Gilson Pipetman
Otomatik ayarlanabilir pipet (200-1000 µL)	Gilson Pipetman
Pastör pipeti (0,5-3mL)	Citotest
Plastik pipet ucu (sarı, mavi)	LP Italiana SPA
Falkon 12x75mm, 5ml polistren tüp	BD (352054)
Falkon 17x120mm, 15ml polipropilen konik tüp	BD (352097)

Kullanılan Reaktif ve Kitler

Tablo 6: Kullanılan reaktif ve kitler.

	İsim	Katalog No.
1.	BD Pharmingen™ CD4 FITC	BD-555346
2.	BD Pharmingen™ CD3 / CD19 (FITC/PE)	BD-342404
3.	BD Pharmingen™ CD4 / CD8 (FITC/PE)	BD-342407
4.	BD Pharmingen™ FOXP3 (SCURFIN, IPEX, JM2) PE	BD-560046
5.	BD Pharmingen™ CD25 (PERCP-CY 5,5)	BD-560503
6.	BD Simultest γ_1/γ_{2a} (FITC/PE)	BD-342409
7.	BD Pharmingen™ FOXP3 Fix/Perm Buffer Set	BD-560098
8.	BD CellWASH	BD-342409
9.	BD Pharmingen™ Pharmingen Stain Buffer (FBS) (500 mL)	BD-554656
10.	BD Vacutainer CPT™ (4 mL) sodyum sitratlı fikollü tüp	BD-362781

Kullanılan antikolar:

CD3: T lenfositleri

CD19: B lenfositleri

CD4: T helper lenfositleri

CD8: T sitotoksik lenfositleri

CD4/CD25/FoxP3: Regulator T lenfositleri belirlemek için kullanıldı.

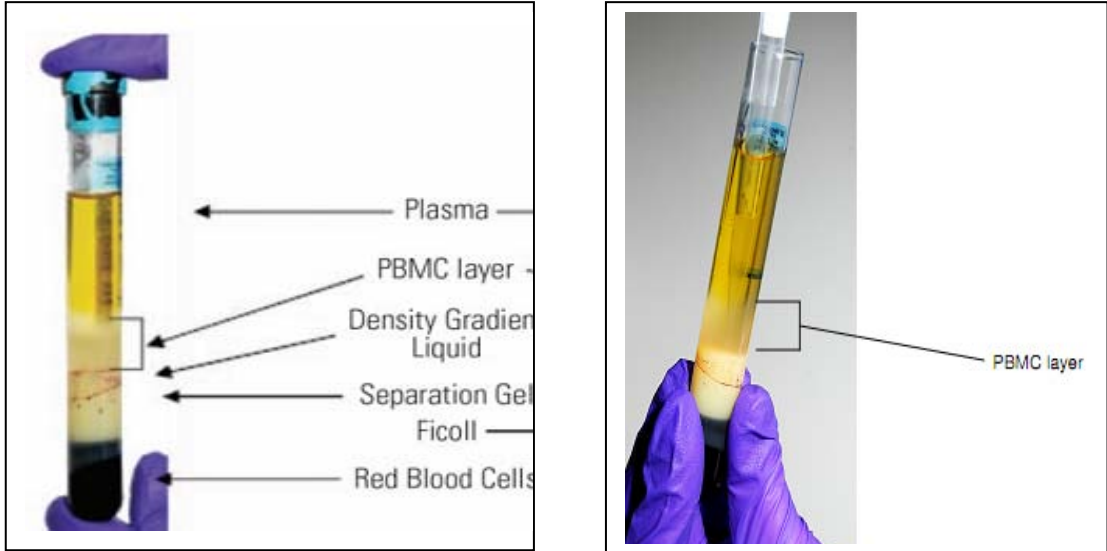
Örneklerin Toplanması

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin periferik venöz kanları BD (Becton Dickinson) Vacutainer CPT™ (4 mL) sodyum sitratlı fikollü tüplere alındı. Analizler aynı gün içerisinde Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında BD FACS Calibur flow sitometri cihazında gerçekleştirildi.

Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Fikollü tüplere alınan kan örneklerinin örnek tüpünün içerisindeki antikoagulan maddeyle (sodyum sitrat) yeterince temas edebilmesi için kan alınır alınmaz 8-10 defa alt üst edilerek karıştırıldı.

Fikol yüksek derecede dallanmış yapıda olup, büyük kütleli, sulu çözeltilerde kolaylıkla çözünebilen hidrofilik bir polisakkarittir. Fikollü tüpe alınan kan örneği 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Dansite gradient santrifüj temel prensibine dayanan bu yöntemle tüpün üstünde kalan plazma tabakası tüpten uzaklaştırılıp ardından separasyon jelinin üzerindeki beyaz renkli mononükleer hücre tabakası pipet yardımıyla alınarak falkon tüpüne ayrıldı. Flow sitometrik analiz öncesi hücre sayısı 10 milyon/ml olacak şekilde BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) ile dilüe edildi.



Şekil 16. PBMC (Peripheral blood mononuclear cell; periferik kan mononükleer hücre) izolasyonu.

Hazırlanan Solusyonlar: Human FoxP3 Buffer Set; Human FoxP3 Buffer A ve Human FoxP3 Buffer B olmak üzere iki adet tampon solusyonundan oluşmaktadır.

Human FoxP3 Buffer A (x10): 1/10 oranında distile suyla dilue edilerek her bir hasta örneği için 2,5 mL %10'luk Buffer A hazırlandı.

Human FoxP3 Buffer B (x50): %10'luk Buffer A ile 1/50 oranında Buffer B dilüe edilerek, her bir hasta örneği için 0,5 mL Buffer C hazırlandı.

Çalışma Prosedürü

Her bir kan örneğinin çalışılmasında sırasıyla aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. Tamponlar oda ısısına getirildi. Yukarıda anlatıldığı gibi Buffer A ve Buffer C solusyonları hazırlandı.
2. Dört ayrı falkon tüpüne (12x75mm) monoklonal antikorlar uygun miktarlarda kondu.
1 nolu tüpe 15 µL Simultest γ_1 / γ_{2a} (FITC/PE) yüzey boyama negatif kontrolü
2 nolu tüpe 15 µL CD3 / CD19 (FITC/PE)
3 nolu tüpe 15 µL CD4 / CD8 (FITC/PE)
4 nolu tüpe 15 µL CD4 FITC, 5 µL CD25 (PERCP-CY 5,5) monoklonal antikor boyaları pipetlendi.
3. Mononükleer hücre izolasyonu yapılarak hazırlanan örnekten her bir falkon tüpüne 100'er µL ilave edildi. Tüpler vortekslenerek 20 dakika karanlıkta oda ısısında bekletildi.
4. 1, 2, 3, nolu tüplerin içine 2 mL cell wash, 4 nolu tüpün içerisine ise 2 mL FBS eklenip, vortekslendi. 1200 rpm'de (250 x g) 10 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj edilen her bir tüp tek hamlede hızlıca ters çevrilerek cell wash ve FBS uzaklaştırıldı. Tüpleri düz çevirmeden tüpün çevresinde kalan fazla sıvı gazlı bezle alındı.
6. Bu işlemlerin ardından 1, 2 ve 3 nolu tüplerde yüzey boyama işlemi tamamlanmış olup 300 µL cell wash ilave edilerek buzdolabında bekletildi. Sitoplazmik boyanın ardından flowsitometri cihazında analiz edildi.
7. Bu aşamadan sonra 4 nolu tüple çalışmaya devam edildi. Hücrelerin fiksasyonunu sağlamak amacıyla 2 mL %10'luk Buffer A solusyonu ilave edilip vortekslendi. 10 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi.

8. 5 dakika 1680 rpm'de (500 x g) santrifüj edildi. Santrifüj edilen her bir tüp tek hamlede hızlıca ters çevrilerek Buffer A uzaklaştırıldı. Tüpü düz çevirmeden tüpün çevresinde kalan fazla sıvı gazlı bezle alındı.
9. 2 mL FBS ilave edilip vortekslendi. 1680 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüp tek hamlede hızlıca ters çevrilerek FBS uzaklaştırıldı. Tüpü düz çevirmeden tüpün çevresinde kalan fazla sıvı gazlı bezle alındı.
10. Hücreleri permeabilize edebilmek için 500 µL Buffer C ilave edilip vortekslendi. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.
11. İnkübasyonun ardından 2 mL FBS ilave edilip, vortekslendi. 1680 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra FBS uzaklaştırıldı.
12. 11. basamak tekrar edildi.
13. 15 µL FOXP3 (Scurfin, IPEX, JM2) PE monoklonal antikoru ilave edilip vortekslendi. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.
14. 2 mL FBS ilave edilip vortekslendi. 1680 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra FBS uzaklaştırıldı.
15. 500 µL FBS ilave edilip vortekslendi. Bu işlemlerin ardından 4 nolu tüpün intrasitoplazmik boyama işlemi tamamlanmış oldu.

Daha önce yüzey boyaması yapılan 1,2,3 nolu tüplerle birlikte intrasitoplazmik boyanan 4 nolu tüp yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanıp örnekler flow sitometri cihazı BD FACS Calibur Flow Cytometer (BD Biosciences) ve BD CellQuest Pro Version The Premier Acquisition and Analysis Software'i kullanılarak değerlendirildi.

Flowsitometrik Değerlendirme

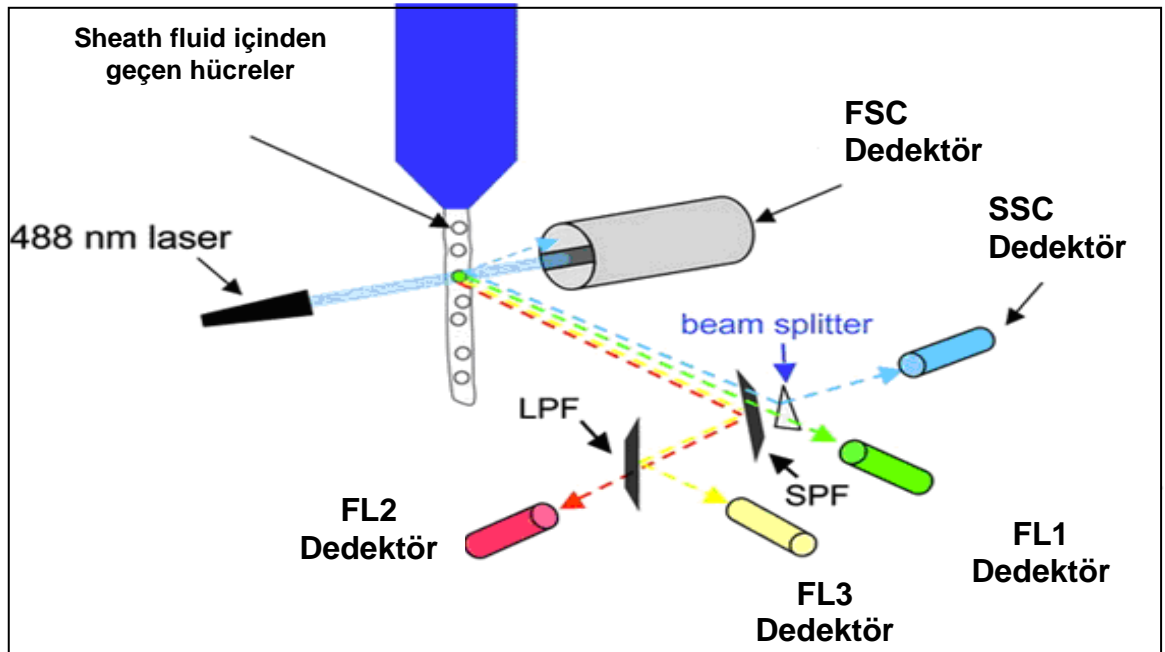
Prensip

Flow sitometri birçok sistemin birleşmesinden oluşmuştur. Bunlar; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), ışık kaynağı (laser kaynağı), sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik ve elektrik sinyal), ve bilgisayardan (data toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) oluşur.

Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) gibi florokrom maddelerle konjuge olmuş monoklonal antikolarla işaretlenmiş hücreler süspansiyon halinde hava basıncı ile sheath fluid içinden geçirilir. Sheath fluid içindeki sıvının akışı çok hızlı olduğundan yüksek bir basınç oluşturur ve bu basınç ile hücreler cam veya kuartzdan yapılmış (flow chamber) akış kabine

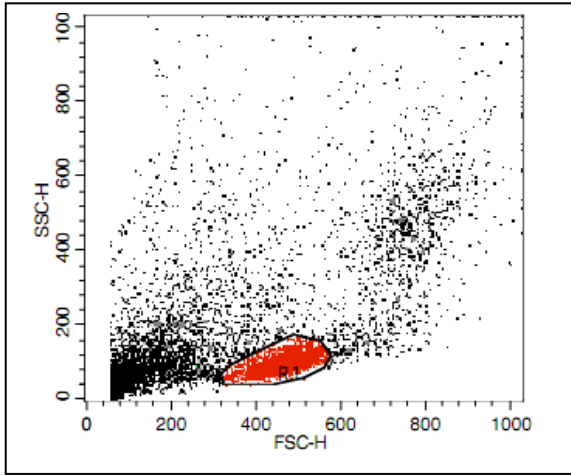
gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı, hücrelerin tek sıra halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak; argon iyonu, kripton, helium-kadmium, helium-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları kullanılır. İşaretlemede kullanılan prob lar lazer kaynağıyla eksite olup, farklı bir dalga boyunda emisyon gösterirler ve bu sayede dedekte edilebilirler. Genellikle lazer kaynağı olarak Argon iyonu kullanılır ve FITC, PE, propidium iodide (PI) gibi florokrom maddelerin 488 nm’de eksitasyonu sağlanır. Hücreye bağlı florokrom lazer ışığı ile belli bir dalga boyunda aktiflenir ve bu enerjiyle farklı bir dalga boyunda ışın yayar. İleri ve yana olan ışık saçılımına göre hücre boyutu, iç yapısı hakkında, prob bağlanma yoğunluğuna göre de antijenik özellikleri hakkında bilgi edinilir. Aktiflenme sonucu açığa çıkan floresan fotodiodlarla toplanır, Photo Multiply Tubes (PMT’s) ile elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve sonuçlar bilgisayara aktarılır¹⁰⁶.

Flow sitometri cihazında bulunan dedektör ve filtreler: FSC (Forward Scatter Channel; ileri saçılım kanal) dedektörü; hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. SSC (Side Scatter Channel; yana saçılım kanal) dedektörü hücre granül içerikleri hakkında bilgi verir. Floresan Filtreler ve dedektörler; değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler, florokromla işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri veya sitokin ve DNA gibi intraselüler moleküller hakkında bilgi verir¹⁰⁶ (Şekil 17).



Şekil 17. Flow sitometrinin şematik gösterimi.

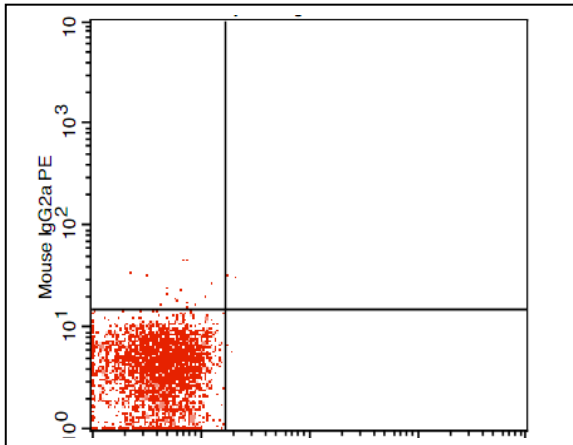
Değerlendirmede öncelikle önden saçılım (Forward Scatter: FSC) ve yandan saçılım (Side Scatter: SSC) histogramında hücrelerin büyüklük ve granül içeriklerine göre bilgisayar ortamına yansıtılıp lenfositler, diğer periferik kan hücrelerinden karakteristik görünüm ve yerleşim yerleri esas alınarak ayrıldı ve lenfosit kapısı (gating) belirlendi. Alınan kapı içerisinde 10.000 hücre saydırıldı. FSC/SSC histogramında lenfosit popülasyonu kapılandırılmış ve çalışmalar bu popülasyonda yapılmıştır (Şekil 18). Lenfosit kapısında CD3, CD19, CD4 ve CD8 yüzdeleri değerlendirildi, ayrıca CD4 kapısı alınarak (Şekil-22) CD4+CD25+FoxP3+ %'si (Treg) değerlendirildi.



Region	Events	% Gated	% Total
R1	3476	34.76	34.76
R2	2	0.02	0.02

Şekil 18. İşaretli alan total PBMC (peripheral blood mononuclear cell= periferik kan mononükleer hücre) içindeki lenfositlerin yüzdesini göstermektedir

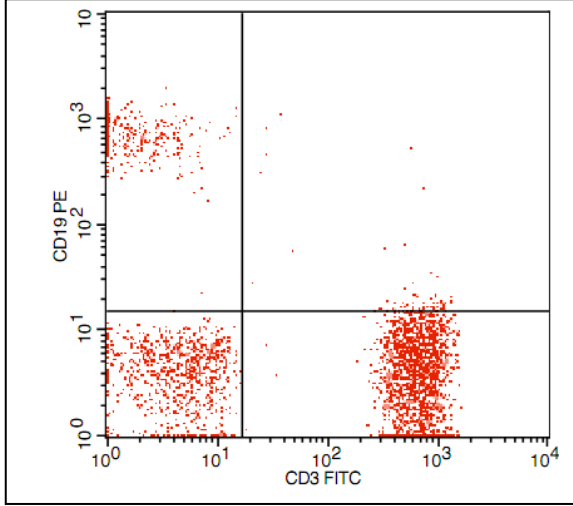
Hücrelerde otofloresan ya da özgün olmayan bağlanmadan kaynaklanan zemin boyanmasının tespit edilip, nonspesifik boyanmayı elimine etmek için yüzey negatif kontrol kullanıldı (Şekil 19).



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	16	0.46	0.16
UR	2	0.06	0.02
LL	3456	99.42	34.56
LR	2	0.06	0.02

Şekil 19. Negatif kontrol dot plot görüntüsü.

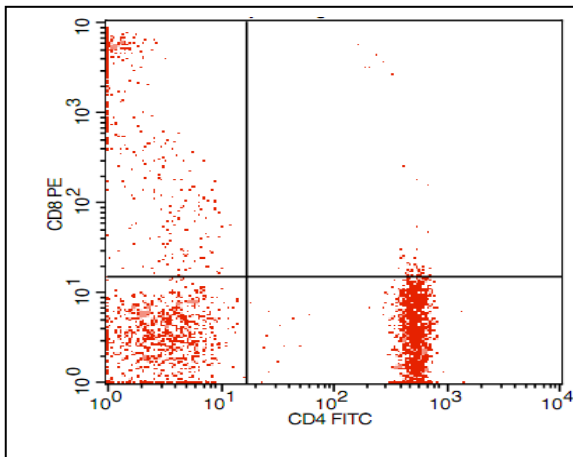
Lenfosit kapısı üzerinde CD3-FITC'e karşı CD19-PE parametreleri kullanılarak oluşturulan floresans dot plot görüntüsünde CD3 ve CD19 ekspresyon oranları değerlendirildi (Şekil-20).



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	328	10.37	3.28
UR	63	1.99	0.63
LL	861	27.23	8.61
LR	1910	60.40	19.10

Şekil 20. Sağ alt (LR); total lenfositler içindeki T lenfosit (CD3+) ve sol üst (UL); total lenfositler içindeki B lenfosit (CD19+) hücrelerinin yüzdesini göstermektedir.

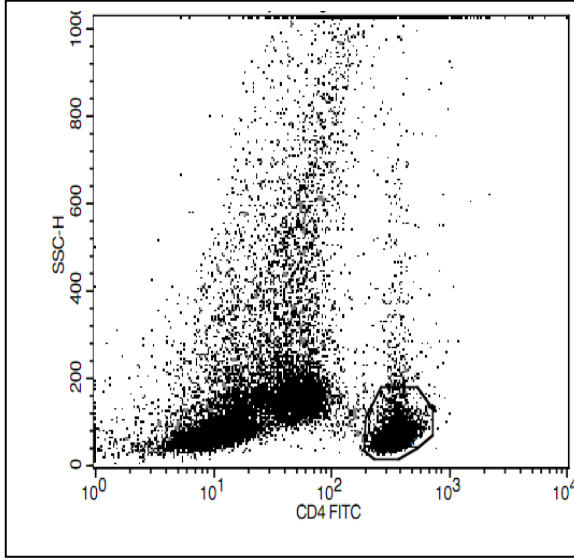
Lenfosit kapısı üzerinde CD4-FITC'e karşı CD8-PE parametreleri kullanılarak oluşturulan floresans dot plot görüntüsünde CD4 ve CD8 ekspresyon oranları değerlendirildi (Şekil-21).



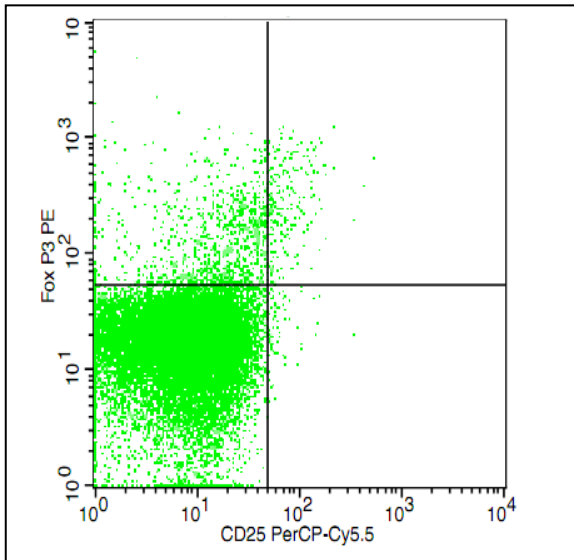
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	688	21.18	6.88
UR	48	1.48	0.48
LL	900	27.70	9.00
LR	1613	49.65	16.13

Şekil 21. Sağ alt (LR); total lenfositler içindeki CD4+ ve sol üst (UL); total lenfositler içindeki CD8+ hücrelerinin yüzdesini göstermektedir.

CD4-FITC'nin ışığa verdiği fluorensansa karşı SSC kullanılarak oluşturulan dot plotta CD4 ekspresyonu değerlendirildi (Şekil 22). CD4 kapısı kullanılarak CD25-PERCP-CY5,5'e karşı FoxP3-PE parametreleri kullanılarak oluşturulan fluorensans dot plot görüntüsünde CD25 ve FoxP3 ekspresyonları değerlendirildi. CD4 kapısında 25.000 hücre saydırıldı. CD4 pozitif hücrelerde CD4+CD25+FoxP3+ ekspresyonları yüzde değer olarak saptandı (Şekil.23).



Şekil 22. İşaretli alan PBMC içindeki CD4+ T lenfositleri göstermektedir.



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1006	3.95	1.10
UR	237	0.93	0.26
LL	24145	94.83	26.39
LR	73	0.29	0.08

Şekil 23. Sağ üst (UR); CD4+CD25+FoxP3+ Treg hücrelerin yüzdesini göstermektedir.

Bütün bu değerlendirmelerin ardından kan sayım sonuçlarından yararlanılarak her bir parametre için aşağıdaki formül uygulanarak absolut sayı/ μL cinsinden sonuçların hesaplanması aşağıda verilen formülle gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Absolut sayı}/\mu\text{L} = \frac{\text{Lökosit sayısı} \times \% \text{lenfosit} \times \% \text{antikor pozitifliği}}{10.000}$$

İstatistiksel Analiz

Çalışmamıza tek yönlü varyans modeli uyarınca oluşturulan Power Analiz sonucuna göre %80 ve 0.05 Tip 1 hata seviyesinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark elde edebilmek için, her gruba en az 25 birey dahil edilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences version) paket programı kullanıldı. Ölçümlerin normal dağılıma uygunluğunu test etmek için Shapiro Wilk testi kullanıldı. Cinsiyet ve gruplar (KOAHA, sigara içen kontrol, sigara içmeyen kontrol) arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık ilişkisi olup olmadığını belirlemek için Pearson Ki-Kare analizi yapıldı. En az iki grup (KOAHA, sigara içen kontrol, sigara içmeyen kontrol) arasında ölçüm ortalamaları açısından fark olup olmadığını belirlemek için ANOVA testi yapıldı; en az iki grup arasında fark olan ölçümler için bu farklılığın hangi gruplarda olduğunu belirlemek için de çoklu karşılaştırma testlerinden TukeyHSD yapıldı. Aynı işlem KOAHA evreleri (hafif, orta, ağır) karşılaştırılmasında da yapıldı. KOAHA evreleri açısından yapılan karşılaştırmalarda normal dağılım göstermeyen iki ölçüm karşılaştırılırken Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Cinsiyet ve subgrup ortalama karşılaştırmaları için parametrik olan Student t testi kullanıldı. Grup ve yaş değişkeninin ölçümler üzerindeki etkilerini birlikte değerlendirmek için Univariate (tek değişkenli) Genel Doğrusal Model kullanıldı. Sonuçlar için $p < 0.05$ anlamlılık değeri olarak belirlendi. Sonuçların grafik ile gösteriminde Error markerlı Bar grafikleri kullanıldı.

BULGULAR

Bu çalışma 15/05/2009 tarih ve 5/108 no'lu Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul izni alındıktan sonra 2009-2011 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran GOLD 2009 kriterlerine göre klinik ve spirometrik olarak KOAH tanısı almış, 40 yaş üzeri, halen sigara içen veya bırakmış 79 hasta (10 kadın, 69 erkek) alındı. KOAH hastaları evresine göre üç gruba ayrıldı: ağır KOAH 25 (24 erkek, 1 kadın) orta KOAH 28 (26 erkek, 2 kadın) hafif KOAH 26 (20 erkek, 6 kadın) hastadan oluşmaktaydı. Kontrol grubu olarak 40 yaş üzeri sigara içen 30 (17 erkek, 13 kadın), sigara içmeyen 30 (10 erkek, 20 kadın) klinik ve spirometrik olarak sağlıklı bulunan bireyler çalışmaya alındı. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarını oluşturan olguların cinsiyete göre dağılımları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Grupların cinsiyete göre dağılımı.

GRUP		Cinsiyet		Toplam
		Erkek	Kadın	
HASTA	Sayı	69	10	79
	Yüzde (%)	87,34	12,66	100
KONTROL (Sigara içen sağlıklı)	Sayı	17	13	30
	Yüzde(%)	56,66	43,34	100
KONTROL (Sigara içmeyen sağlıklı)	Sayı	10	20	30
	Yüzde(%)	33,33	66,67	100

Türkiye'de KOAH prevalansının erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Çalışmamız cinsiyete göre bu prevalansa uygun dağılım göstermektedir.

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarını oluşturan olguların yaş ortalamasına göre dağılımı Tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8. Grupların yaş ortalamasına göre dağılımı.

Grup	Yaş ortalaması	Standart Sapma	Sayı
Hasta	63,49	9,17	79
Kontrol (Sigara içen)	52,40	10,34	30
Kontrol (Sigara içmeyen)	53,93	11,62	30

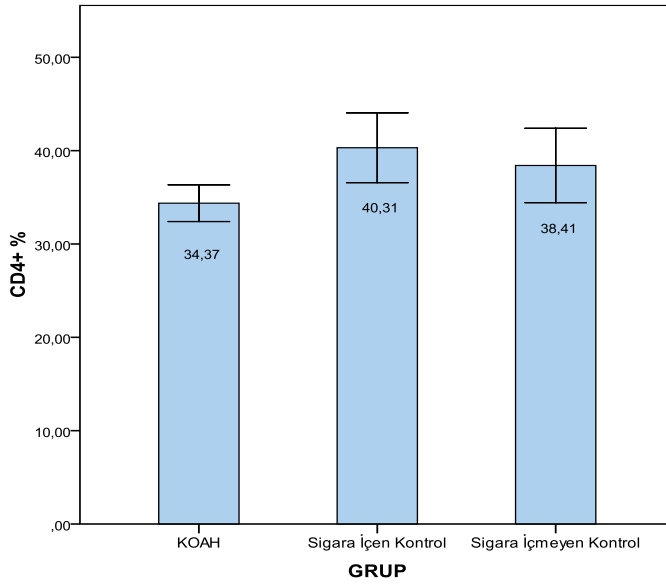
Hasta ve kontrol gruplarının flow sitometrik sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Hasta ve kontrol gruplarının sonuçlarının karşılaştırması.

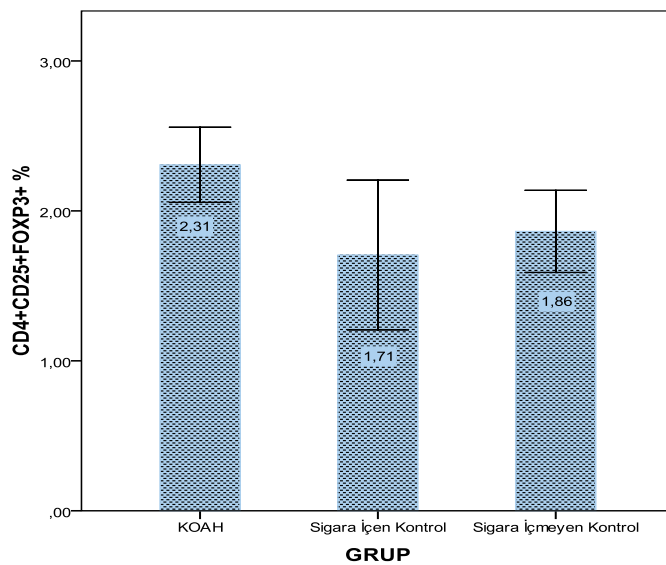
CD marker	KOAH (Ort±SS)	Sigara İçen K. (Ort±SS)	Sigara içmeyen K. (Ort±SS)	P değerleri
CD3+ %	60,00±12,85	60,25±11,90	59,60±13,21	a: 0,996 b: 0,988 c: 0,979
CD3 (absolut sayı/µL)	1347,46±608,34	1369,74±561,52	1338,84±583,77	a: 0,983 b: 0,997 c: 0,978
CD19+ %	6,12±4,01	8,04±5,48	7,06±3,47	a: 0,092 b: 0,560 c: 0,645
CD19 (absolut sayı/µL)	139,77±124,60	176,18±120,65	155,60±88,02	a: 0,317 b: 0,803 c: 0,774
CD4+ %	34,37±8,68	40,31±10,17	38,41±10,83	a: 0,012 b: 0,121 c: 0,720
CD4 (absolut sayı/µL)	750,47±301,49	905,40±372,09	871,47±424,42	a: 0,097 b: 0,237 c: 0,924
CD8+ %	35,54±9,60	31,25±8,87	32,23±9,68	a: 0,091 b: 0,235 c: 0,916
CD8 (absolut sayı/µL)	805,52±389,60	701,94±302,87	714,03±350,79	a: 0,384 b: 0,473 c: 0,991
CD4+ / CD8+	1,06±0,49	1,46±0,71	1,33±0,65	a: 0,006 b: 0,085 c: 0,681
CD4+CD25+FoxP3+%	2,30±1,10	1,70±1,35	1,86±0,74	a: 0,032 b: 0,148 c: 0,845
CD4/CD25/FoxP3 (absolut sayı/µL)	51,12±30,30	34,67±17,67	39,98±18,51	a: 0,010 b: 0,113 c: 0,706

a: KOAH-Sigara içen kontrol, b: KOAH-Sigara içmeyen kontrol, c: Sigara içen kontrol-Sigara içmeyen kontrol

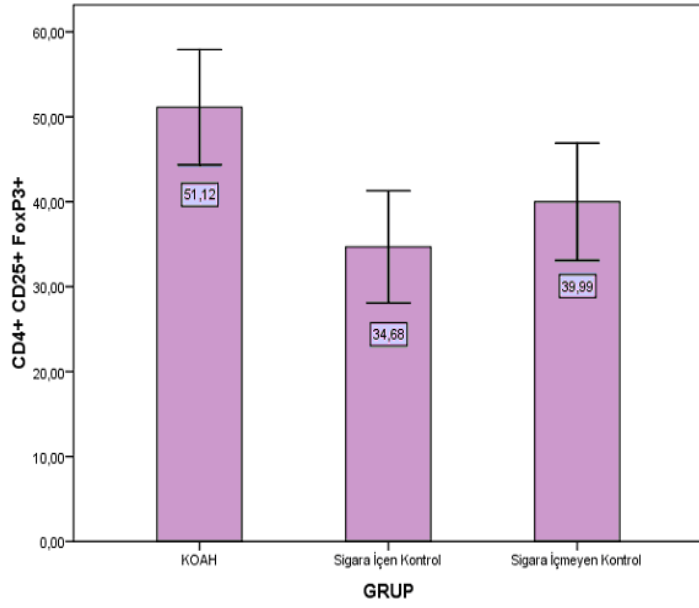
KOAH'lı hastalarda CD4%'si sigara içen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuşken, bu durum absolut sayı/ μ L düzeylerinde gözlenmemiştir ($p=0,012$, $p=0,097$). CD4+CD25+FoxP3+ hücre düzeyleri de her iki değerlendirmede de aynı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p=0,032$, $p=0,010$). Ayrıca hasta grubunda CD4/CD8 oranı sigara içen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük bulunmuştur ($p=0,006$). Parametreler açısından grup ortalamaları Şekil 24, 25, 26, 27'de gösterilmiştir.



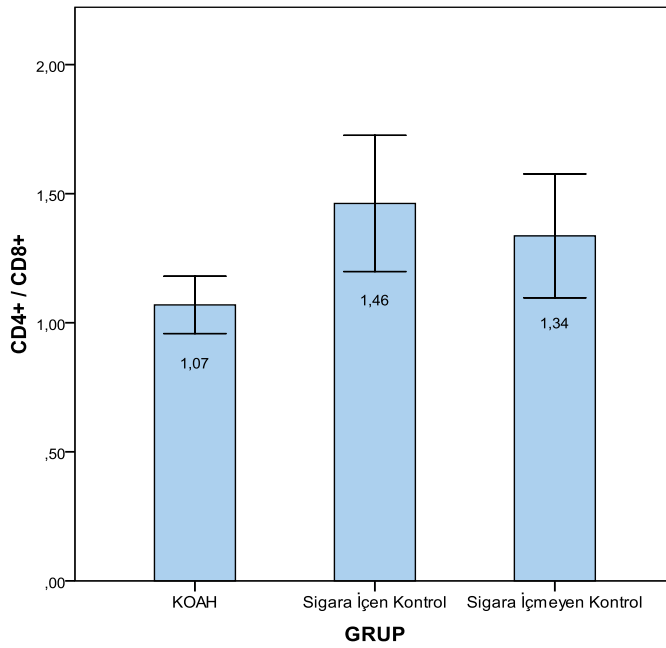
Şekil 24. Hasta ve kontrol grubunda CD4+% ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 25. Hasta ve kontrol grubunda Treg% ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 26. Hasta ve kontrol grubunda Treg hücre düzeylerinin absolut sayı/µL ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 27. Hasta ve kontrol grubunda CD4/CD8 oranının error bar grafiği.

Hasta grubunda sonuçların evreler arası karşılaştırması Tablo 10'da gösterilmiştir. Evreler arası karşılaştırmalar sonucunda bakılan parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır.

Tablo 10. KOAH evreler arası sonuçların karşılaştırması.

CD marker	KOAH (Evre)	Ort±SS	P değeri
CD3+ %	Hafif (n=26)	59,53±13,21	0,096
	Orta (n=28)	56,65±12,97	
	Ağır-ileri (n=25)	64,25±11,57	
CD3 (absolut sayısı/μL)	Hafif	1238,41±495,56	0,409
	Orta	1341,33±652,26	
	Ağır-ileri	1467,75±663,57	
CD19+ %	Hafif	4,80±3,39	0,069
	Orta	7,39±4,77	
	Ağır-ileri	6,06±3,31	
CD19 (absolut sayısı/μL)	Hafif	100,19±61,75	0,056
	Orta	180,71±161,13	
	Ağır-ileri	135,09±82,39	
CD4+ %	Hafif	33,65±9,29	0,723
	Orta	34,00±8,80	
	Ağır-ileri	35,52±8,10	
CD4 (absolut sayısı/μL)	Hafif	692,04±271,65	0,474
	Orta	769,41±272,32	
	Ağır-ileri	790,04±359,67	
CD8+ %	Hafif	35,75±10,45	0,824
	Orta	34,68±8,77	
	Ağır-ileri	36,30±9,88	
CD8 (absolut sayısı/μL)	Hafif	743,64±338,01	0,617
	Orta	840,16±440,79	
	Ağır-ileri	831,07±386,65	
CD4+ / CD8+	Hafif	1,06±0,56	0,758
	Orta	1,06±0,47	
	Ağır-ileri	1,07±0,45	
CD4+CD25+FoxP3+%	Hafif	1,97±0,90	0,169
	Orta	2,52±1,15	
	Ağır-ileri	2,40±1,19	
CD4/CD25/FoxP3 (absolut sayısı/μL)	Hafif	41,79±23,40	0,149
	Orta	57,19±29,54	
	Ağır-ileri	54,02±35,85	

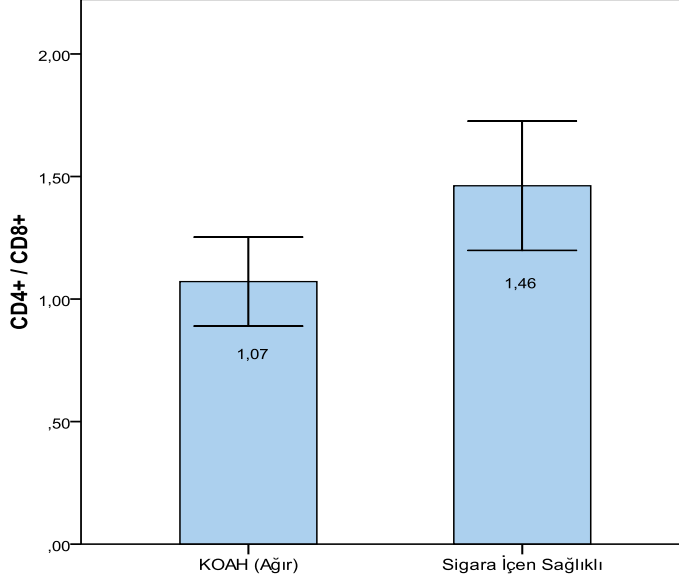
KOAH evrelendirmesiyle oluşturulan her bir subgrup ile kontrol grupları arasında istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı. Öncelikle ağır KOAH subgrubuyla, sigara içen ve içmeyen kontrol grubu karşılaştırıldı (Tablo 11).

Tablo 11. Ağır KOAH'lı hastalar ile sigara içen ve içmeyen kontrol grupları sonuçlarının karşılaştırması.

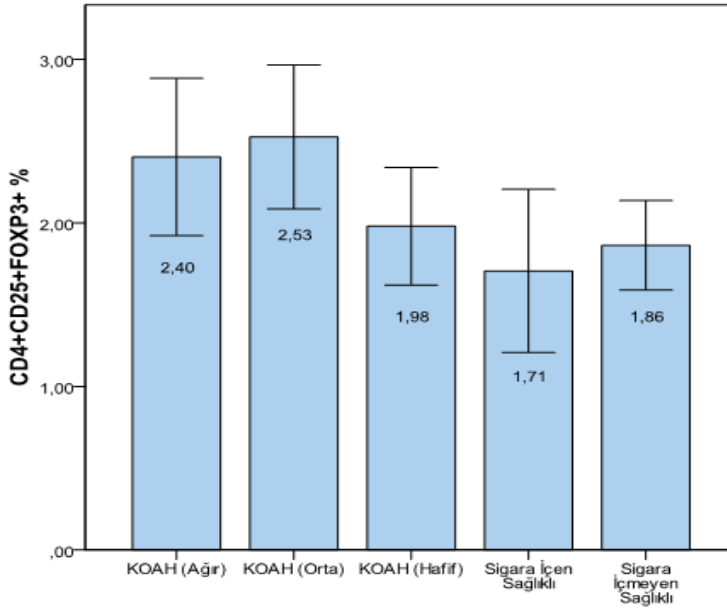
CD marker	KOAH (Ağır) (Ort±SS)	Sigara İçen K. (Ort±SS)	Sigara içmeyen K (Ort±SS)	P değerleri
CD3+ %	64,25±11,57	60,25±11,90	59,60±13,21	a: 0,215 b: 0,176
CD3 (absolut sayı/μL)	1467,75±663,57	1369,74±561,52	1338,84±583,77	a: 0,819 b: 0,709
CD19+ %	6,06±3,31	8,04±5,48	7,06±3,47	a: 0,106 b: 0,286
CD19 (absolut sayı/μL)	135,09±82,39	176,18±120,65	155,60±88,02	a: 0,284 b: 0,727
CD4+ %	35,52±8,10	40,31±10,17	38,41±10,83	a: 0,063 b: 0,276
CD4 (absolut sayı/μL)	790,04±359,67	905,40±372,09	871,47±424,42	a: 0,518 b: 0,719
CD8+ %	36,30±9,88	31,25±8,87	32,23±9,68	a: 0,051 b: 0,130
CD8 (absolut sayı/μL)	831,07±386,65	701,94±302,87	714,03±350,79	a: 0,357 b: 0,428
CD4+ / CD8+	1,07±0,45	1,46±0,71	1,33±0,65	a: 0,017 b: 0,091
CD4+CD25+FoxP3+%	2,40±1,19	1,70±1,35	1,86±0,74	a: 0,048 b: 0,046
CD4/CD25/FoxP3 (absolut sayı/μL)	54,02±35,85	34,67±17,67	39,98±18,51	a: 0,013 b: 0,096

a: Ağır KOAH-Sigara içen kontrol, b: Ağır KOAH-Sigara içmeyen kontrol

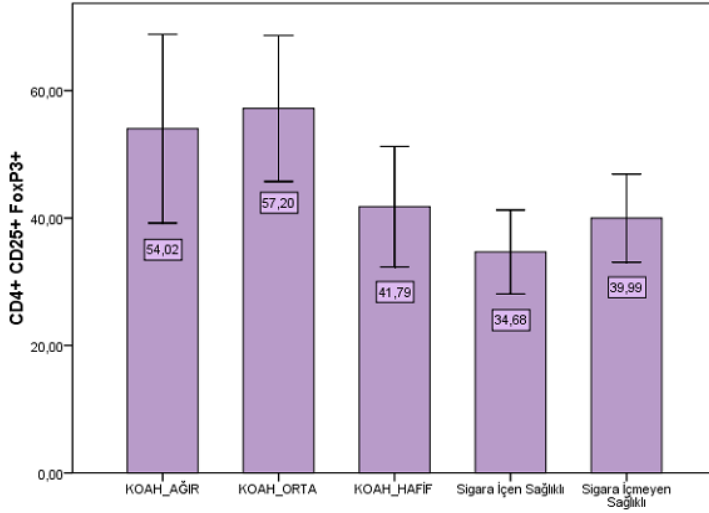
CD4/CD8 oranı ağır KOAH'lı hasta grubunda sigara içen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur (p=0,017). CD4+CD25+FoxP3+% 'si hasta grubunda hem sigara içen, hem de sigara içmeyen kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuşken (p=0,048, p=0,046), absolut sayı/μL düzeylerinde ise sadece sigara içen kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik bulunmuştur (p=0,013). Grup ortalamaları Şekil 28, 29, 30'da gösterilmiştir.



Şekil 28. Ağır KOAH'lı hasta ve kontrol grubunda CD4/CD8 oranının error bar grafiği.



Şekil 29. Ağır, orta, hafif evre KOAH'lı hasta ve kontrol grubu Treg % ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 30. Ağır, orta, hafif evre KOAH ve kontrol gruplarında Treg hücre absolut sayı/μL ortalamalarının error bar grafiği.

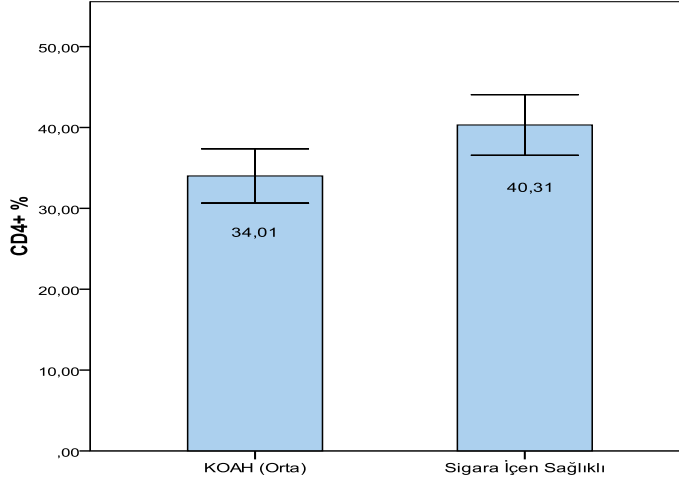
Orta KOAH subgrubuyla (n=28), sigara içen ve içmeyen kontrol grupları karşılaştırıldı (Tablo 12). Orta KOAH'lı hastalarda CD4%'si sigara içen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük bulunmuşken, bu durum absolut sayı/μL düzeylerinde gözlenmemiştir (p=0,015, p=0,334). CD4+CD25+FoxP3+ hücre düzeyleri de hem yüzde hem de absolut sayı/μL değerlendirmelerinde sigara içen ve içmeyen kontrol gruplarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,017, p=0,012, p=0,001, p=0,012). Hasta grubunda CD4/CD8 oranı sigara içen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur (p=0,018).

Tablo 12. Orta KOAH subgrubu ile sigara içen ve içmeyen kontrol grupları sonuçlarının karşılaştırması.

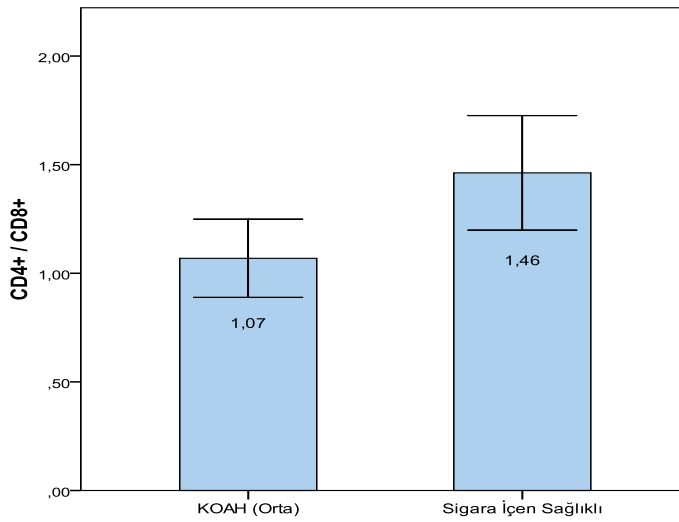
CD marker	KOAH (Orta) (Ort±SS)	Sigara İçen K. (Ort±SS)	Sigara içmeyen K (Ort±SS)	P değerleri
CD3+ %	56,65±12,97	60,25±11,90	59,60±13,21	a: 0,275 b: 0,395
CD3 (absolut sayı/µL)	1341,33±652,26	1369,74±561,52	1338,84±583,77	a: 0,982 b: 1,000
CD19+ %	7,39±4,77	8,04±5,48	7,06±3,47	a: 0,629 b: 0,765
CD19 (absolut sayı/µL)	180,71±161,13	176,18±120,65	155,60±88,02	a: 0,990 b: 0,729
CD4+ %	34,00±8,80	40,31±10,17	38,41±10,83	a: 0,015 b: 0,096
CD4 (absolut sayı/µL)	769,41±272,32	905,40±372,09	871,47±424,42	a: 0,334 b: 0,536
CD8+ %	34,68±8,77	31,25±8,87	32,23±9,68	a: 0,146 b: 0,318
CD8 (absolut sayı/µL)	840,16±440,79	701,94±302,87	714,03±350,79	a: 0,329 b: 0,396
CD4+ / CD8+	1,06±0,47	1,46±0,71	1,33±0,65	a: 0,018 b: 0,081
CD4+CD25+FoxP3+%	2,52±1,15	1,70±1,35	1,86±0,74	a: 0,017 b: 0,012
CD4+CD25+FoxP3 (absolut sayı/µL)	57,19±29,54	34,67±17,67	39,98±18,51	a: 0,001 b: 0,012

a: Orta KOAH-Sigara içen kontrol b: Orta KOAH-Sigara içmeyen kontrol

Grup ortalamaları Şekil 29, 30, 31, 32'de gösterilmiştir.



Şekil 31. Orta KOAH'lı hasta ve sigara içen kontrol grubunda CD4+%’si ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 32. Orta KOAH'lı hasta ve sigara içen kontrol grubunda CD4/CD8 oranlarının error bar grafiği.

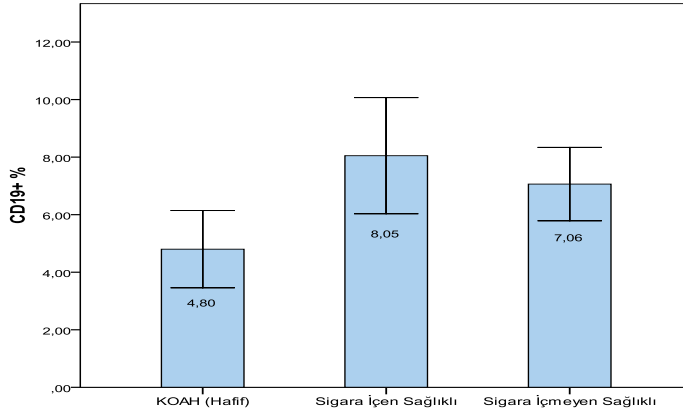
Hafif KOAH subgrubuyla (n=26), sigara içen ve içmeyen kontrol grupları karşılaştırıldı (Tablo 13).

Tablo 13. Hafif KOAH subgrubu ile sigara içen ve içmeyen kontrol grupları sonuçlarının karşılaştırması.

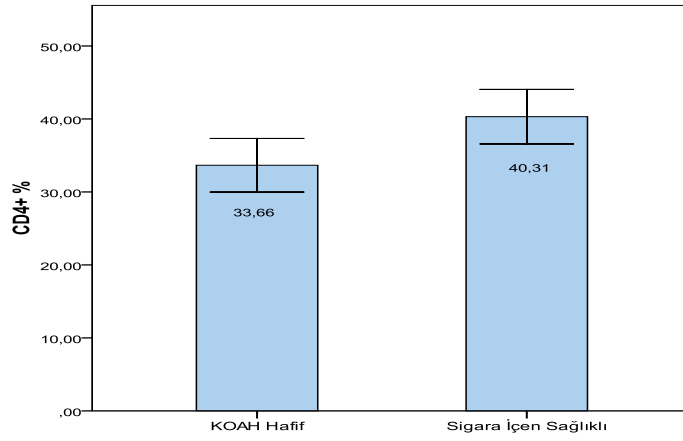
CD marker	KOAH (Hafif) (Ort±SS)	Sigara İçen K. (Ort±SS)	Sigara içmeyen K (Ort±SS)	P değerleri
CD3+ %	59,53±13,21	60,25±11,90	59,60±13,21	a: 0,832 b: 0,984
CD3 (absolut sayı/µL)	1238,41±495,56	1369,74±561,52	1338,84±583,77	a: 0,648 b: 0,775
CD19+ %	4,80±3,39	8,04±5,48	7,06±3,47	a: 0,012 b: 0,017
CD19 (absolut sayı/µL)	100,19±61,75	176,18±120,65	155,60±88,02	a: 0,022 b: 0,124
CD4+ %	33,65±9,29	40,31±10,17	38,41±10,83	a: 0,014 b: 0,086
CD4 (absolut sayı/µL)	692,04±271,65	905,40±372,09	871,47±424,42	a: 0,081 b: 0,165
CD8 %	35,75±10,45	31,25±8,87	32,23±9,68	a: 0,087 b: 0,196
CD8 (absolut sayı/µL)	743,64±338,01	701,94±302,87	714,03±350,79	a: 0,885 b: 0,940
CD4 / CD8	1,06±0,56	1,46±0,71	1,33±0,65	a: 0,027 b: 0,106
CD4+CD25+FoxP3+%	1,97±0,90	1,70±1,35	1,86±0,74	a: 0,387 b: 0,601
CD4+CD25+FoxP3 (absolut sayı/µL)	41,79±23,40	34,67±17,67	39,98±18,51	a: 0,379 b: 0,938

a: Hafif KOAH-Sigara içen kontrol b: Hafif KOAH-Sigara içmeyen kontrol

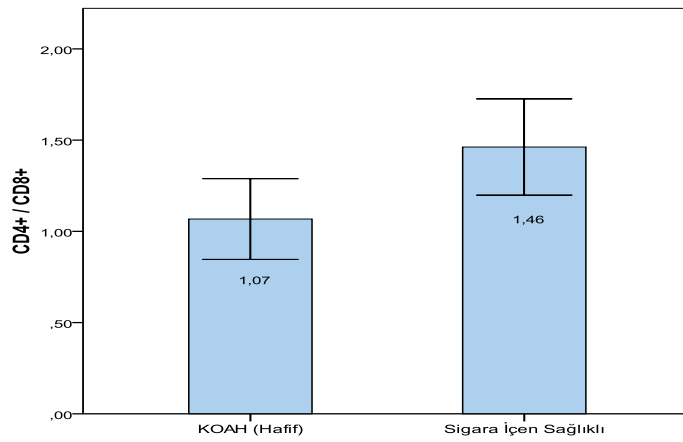
CD19%'si hasta grubunda hem sigara içen, hem de içmeyen kontrol gruplarına göre düşük bulunmuşken ($p=0,012$, $p=0,017$), absolut sayı/µL cinsinden yapılan değerlendirmelerde sadece sigara içen kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0,022$). Hafif KOAH'lı hastalarda CD4%'si sigara içen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuşken, bu durum absolut sayı/µL düzeylerinde gözlenmemiştir ($p=0,014$, $p=0,086$). Ayrıca CD4+/CD8+ oranı hasta grubunda sigara içen kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p=0,027$). Treg düzeylerinde ise anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Grup ortalamaları Şekil 33, 34, 35'de gösterilmiştir.



Şekil 33. Hafif KOAH'lı hasta ve kontrol gruplarında CD19+%'si ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 34. Hafif KOAH'lı hasta ve kontrol grubunun CD4+%'si ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 35. Hafif KOAH'lı hasta ve kontrol grubunun CD4/CD8 oranı ortalamalarının error bar grafiği.

TARTIŞMA

KOAH yakın gelecekte prevelansının daha da artacağı düşünölen önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. İnsanların hayat kalitesini düşören ve sağlık harcamaları açısından oldukça büyük miktarda maliyet getiren ciddi bir halk sağlığı problemidir. KOAH patogenezi tam olarak anlaşılamadığından, tedavi seçenekleri kısıtlı ve çoğunlukla semptomatiktir. GOLD KOAH'ı zararlı partiköl ve gazlara bağlı olarak akciğerlerde görölen anormal ve ilerleyici inflamatuvar yanıt olarak tanımlar. Şu ana kadar birçok çalışma bu anormal inflamatuvar yanıtı karakterize etmeye çalışmıştır. Ancak çalışmalardan elde edilen sonuçlar hastalığın şiddetine (hafif, orta, ağır), kontrol gruplarının tipine (sigara ićen sağlıklı, sigara ićmeyen sağlıklı), örneğin alındığı yere (periferal kan, BAL, akciğer dokusu), akciğerden alınan örneğin alındığı bölgeye (büyük, küçük havayolları, alveolar boşluk), beraberinde akciğeri ilgilendiren başka bir hastalık varlığına ve çalışılan hücre tiplerine göre çeşitlilik göstermektedir. Sonuçlardaki farklılıklar, potansiyel olarak katkı sağlamakla birlikte KOAH inflamasyonunu anlamamızı güçleřtirmektedir⁷.

Çalışmamızda stabil KOAH'lı hasta ve subgrupları (hafif, orta, ağır) ile kontrol grupları arasında yapmış olduğumuz karşılaştırmalarda CD3 hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır. CD19%'lerinde ise sadece hafif KOAH'lı hasta grubunda her iki kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu gözlenmiştir. CD19 (absolut sayı/ μ L) düzeyi ise sadece sigara ićen kontrol grubuna göre hafif KOAH'lı grupta düşük bulunmuştur (Tablo 13).

Periferik kanda yapılan bir çalışmada bizim sonuçlarımıza benzer şekilde KOAH'lılar ve kontrol grupları (sigara ićen ve ićmeyen sağlıklı) arasında CD3 ve CD19 hücreler açısından anlamlı farklılık bulunmazken, yine periferik kanda yapılan bir diğer çalışmada CD3 hücrelerin KOAH'lı grupta kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır. CD19 hücrelerde ise böyle bir fark saptamamışlardır^{107,108}. Smyth ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, değişik pulmoner endikasyonlar nedeniyle bronkoskopi yapılan hastalardan alınan BAL örneklerinde CD3 hücreleri KOAH'lılarda kontrollere göre anlamlı yüksek bulunmuřtur¹⁰⁹. Benzer bir sonuç bronş biyopsi örneklerinde O'Shaughnessy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da elde edilmiřtir¹¹⁰.

KOAH'lılarda lokal doku inflamasyonu gösteren BAL ve biyopsi örneklerinde saptanan anlamlı CD3 T lenfosit artışının spesifik moleküler mekanizmaları henüz çok iyi anlaşılammıştır. Araştırmacılar tarafından sigara ve/veya sigara ürünlerinden bazılarının direkt uyarıcı etkisi ya da inflamatuvar yanıt sonucu ortaya çıkma ihtimali üzerinde durulmuştur. KOAH'lı hastalarda inflamasyon sonucu lokal artışı saptanan CD3 T lenfositlerin, bizim çalışmamızda da gösterildiği gibi sistemik inflamasyonu gösteren periferik kana aynı oranda yansımadığını öne sürebiliriz.

Çalışmamızda sigara içen kontrol grubuna göre KOAH grubu, hafif ve orta KOAH subgruplarında CD4 hücre yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterirken, bu düşüş absolut sayıda gözlenmemiştir. CD8 hücre yüzdelerinin ise istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte özellikle ağır subgrupta olmak üzere KOAH'lılarda her iki kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. CD4 azalması ve CD8 artışına paralel olarak da CD4/CD8 oranları sigara içen kontrol grubuna göre KOAH ve KOAH subgruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur (Tablo 9, Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13).

Zhu ve arkadaşları periferik kanda CD4 T hücrelerin KOAH'lılarda normal kişilere göre bizim çalışmamıza benzer şekilde azaldığını, CD8 T hücrelerinde de anlamlı fark olmadığını ve istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte CD4/CD8 oranında azalma olduğunu göstermişlerdir¹¹¹. Domagala-Kulawik ve arkadaşlarının orta ve hafif KOAH'lı hasta ve sağlıklı gönüllülerin periferik kanlarında yaptıkları çalışmada CD8 T hücreleri KOAH'lı hastalarda sağlıklı gruba göre anlamlı yüksek bulurken, paralel olarak da CD4/CD8 oranını hasta grubunda anlamlı düşük bulmuşlardır¹⁰⁸. Periferik kanda yapılan bir başka araştırmada CD4 ve CD8 açısından bir farklılık saptanmazken, diğer bir çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak CD4/CD8 oranlarının sigara içmeyen kontrollere göre KOAH hastalarında arttığını, sigara içen kontrollerde ise daha da arttığını saptamışlardır (sırasıyla 1.7, 2.3 ve 3.1). Aynı çalışma grubunda BAL'da bu oranın KOAH'lılar (0.6) ve sigara içenlerde (1.2) düştüğünü, sigara içmeyenlerde ise bir düşüş görülmediğini belirtmişlerdir^{107,109}.

KOAH hastalarında küçük ve büyük havayollarında, akciğer parankiminde artmış CD8 T lenfosit varlığını gösteren, özellikle BAL ve akciğer dokusunda yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur^{101,109,112}. Roos-Engstrand ve

arkadaşlarının BAL'da yaptıkları çalışmada stabil KOAH hastalarında sigara içmeyen sağlıklılara göre daha yüksek ve aktif CD8 T lenfositler saptanmıştır. Yine aynı çalışmada KOAH grubu sigara içen ve sigarayı bırakalı 5 yıldan uzun süre geçmiş eski sigara içenler olarak, CD8 sayı ve aktivasyonları açısından kıyaslandığında bir fark saptanamamıştır. Bunun üzerine CD8 artış ve aktivasyonunun sigarayla ilişkili olmadığı, KOAH'ın kronik immun yanıtla ilişkilendirilebileceği ileri sürülmüştür¹¹². Saetta ve arkadaşlarının lokalize pulmoner lezyonlar nedeniyle cerrahi müdahale uygulanan KOAH'lı hastalar ile sigara içen sağlıklı olgularda cerrahi doku örneklerini inceleyerek yapmış oldukları çalışmada; KOAH grubunda periferik hava yollarında CD8 T lenfositlerin ve düz kas alanının artmış olduğunu göstermişlerdir¹⁰¹. Bronşial biyopsi ve akciğer doku örneklerinde yapılan diğer çalışmalarda da benzer şekilde KOAH'lılarda CD8 artışı saptanmıştır^{103,110}.

Barcelo ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise KOAH patogenezinde anahtar rolleri olduğuna inanılan CD4 ve CD8 T lenfositlerin maturasyon ve aktivasyon markerları (CD45RA, CD45R0 ve CD28) incelenmiştir. BAL'da KOAH hastalarında sigara içen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksek CD8CD45RA ve daha düşük CD8CD45R0 yüzdeleri saptanmıştır. KOAH hastalarında gözlenen bu yüksek CD8CD45RA T lenfositlerin maturasyon-aktivasyon aşamasında son noktaya ulaştıkları ve daha yüksek oranda doku hasarı yapabilme potansiyellerinin bulunduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca KOAH varlığı aranmaksızın sigara içen bireylerde içmeyenlere göre CD8CD28 oranının daha düşük olduğu ve sigara içiminin T lenfositlerde CD28 down regülasyonu ile bu maturasyona katkı sağladığı öne sürülmüştür¹¹³.

Sigara içen KOAH'lılar ve sigara içen asemptomatikler arasındaki inflamatuvar hücre infiltratındaki tek önemli farkın KOAH'lılarda, esas olarak CD8 olmak üzere, T hücre artışı yönünde olduğu yukarıda da değinilen değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca sigara içen KOAH'lıların hava yollarında az miktarda CD4 T hücre sayısında da bir artış olmakla beraber, CD4/CD8 oranının tersine döndüğü gösterilmiştir. Bu durum sigara içen KOAH'lılarda gözlenirken, hava akımı kısıtlaması olmayan sigara içenlerde saptanamamıştır²⁷.

BAL ve akciğer dokusunda görülen artmış CD8 T hücre infiltrasyonu ve bizim çalışmamızda da saptanan azalmış CD4/CD8 oranının, yapılan birkaç

çalışma dışında periferik kanda görülmemesi, CD8 infiltrasyonunun sistemik dolaşıma yansıyan kısmının lokal inflamasyondaki kadar belirgin olmadığını düşündürmektedir. Bizim çalışmamızdaki hasta sayısının diğer çalışmalara kıyasla fazla olması periferik kanda da bu sonucun alınmasında etkin olduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan solunum yollarında ve akciğer parankiminde görülen artmış CD8 düzeylerinin KOAH'ı olan ve olmayan sigara içenleri birbirinden ayırdetmekte önemli bir immunolojik bulgu olduğu sonucu ağırlık kazanmaktadır. Çalışmamızda en yüksek CD4/CD8 oranı, sigara içmeyen sağlıklı grupta istatistiksel açıdan anlamlı fark oluşturmamakla birlikte, normal akciğer fonksiyonuna sahip sigara içen grupta saptanmıştır. Bu sonuç doğrultusunda KOAH gelişimiyle periferik kanda CD4/CD8 azalmasının paralellik gösterdiğini ileri sürebiliriz. Ayrıca periferik kan CD4/CD8 oranındaki yüksekliğin sigara içenlerde KOAH'tan koruyucu bir etkisi mi var sorusunu gündeme getirebiliriz.

Treg hücreler CD8 ve CD4 T hücre fonksiyonlarını baskılayarak immün reaksiyonları düzenlerler. KOAH'lıların akciğerlerindeki Treg'lerin supresif etkileri hakkında çok fazla bilgi mevcut değildir. Yapılan çalışmalar KOAH'da edinsel immünitinin kontrolünde önemli olan Treg hücrelerin rolünü göstermeyi amaçlamıştır. KOAH'da immünmodulator faktörlerin ortaya konması KOAH patogenezinin anlaşılmasında önemli bir rol üstlenecektir.

Çalışmamızda Treg düzeylerini CD4+CD25+FoxP3+ hücrelerin yüzdelerini ve absolut sayı/ μ L miktarlarını inceleyerek belirledik. KOAH ve kontrol grupları karşılaştırmasında KOAH'lılarda sigara içen kontrol grubuna göre hem yüzde, hem de absolut sayı açısından istatistiksel olarak anlamlı (sırasıyla $p=0,032$, $p=0,010$) düzeyde artış bulduk. Aynı zamanda ağır ve orta KOAH'lı hastalar ile sigara içen (sırasıyla % $p=0,048$, $p=0,017$; absolut sayı $p=0,013$, $p=0,001$) ve içmeyen (sırasıyla % $p=0,046$, $p=0,012$; absolut sayı $p=0,096$, $p=0,012$) kontrol grupları arasında da Treg düzeyleri açısından anlamlı artış saptadık. Bu artış sadece ağır KOAH ile sigara içmeyen kontrol grubu arasında absolut sayıda gözlenmemiştir. Hafif KOAH'lı hasta grubunda ise böyle bir artışa rastlamadık. Diğer taraftan normal akciğer fonksiyonuna sahip sigara içenlerde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, Treg düzeyinin sigara içmeyenlere göre düşük olduğunu (sırasıyla %1.7, 34.67/ μ L ve %1.86, 39.98/ μ L) saptadık. (Tablo 9, Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13)

Periferik kanda yapılan bir çalışmada CD4+CD25^{parlak} ekspresyonunun bizim çalışmamızdan farklı olarak KOAH'lı grupta sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğunu, ancak CD4+CD25+CTLA4+ hücre düzeylerinin ise bu durumdan farklı olarak KOAH'lı grupta anlamlı yüksek olduğunu (p=0.014) göstermişlerdir¹⁰⁸. Periferik kanda yapılan diğer çalışmalarda KOAH'lılar ile kontrol grupları arasında Treg düzeyleri açısından istatistiksel anlamlı farklılık bulamamışlardır^{109,113,114}.

Biz çalışmamızı diğer çalışmalara kıyasla daha fazla hasta ve kontrol grubunda gerçekleştirdik. KOAH'lı hasta popülasyonunun fazla olması, gruplar arasında farklılıkların saptanmasında analizlerin gücünü artırmaktadır. İnvazif yöntemler olan BAL, bronkoskopik akciğer biyopsi materyali gibi örnekler üzerinde yapılan çalışmalarda örnek sayısı istenilen düzeyde olmamaktadır. Hasta ve kontrol grubu sayımızın fazla olması, Treg açısından periferik kanda anlamlı sonuçlar elde etmemizi sağlamıştır. Ayrıca astım, egzema ve alerjik rinit gibi alerjik hastalıklar, malignensi ve otoimmün hastalıkları çalışma dışı bırakmış olmamız da Treg hücrelerin değerlendirilmesinde oldukça önem taşımaktadır.

BAL'da yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylere kıyasla KOAH'lılarda bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde daha yüksek Treg düzeyleri saptanmıştır. Düşük CD27 ekspresyonu yapan CD4+CD25+ hücreler daha az potent reglatuvar hücreler olarak bilinmektedir. KOAH hastaları ile sigara içenlerin BAL ve periferik kanlarında CD4+CD25+ hücrelerde CD27 ekspresyonu karşılaştırıldığında BAL'da azalmış CD27 ekspresyonu olduğunun görülmesiyle, sigara içenlerin solunum yollarındaki Treg hücrelerin fonksiyonel olarak daha az potent olduğu ileri sürülmüştür. Negatif reglatuvar kapasitenin bir göstergesi olarak KOAH hastaları ve sigara içenlerde periferik kana oranla BAL içinde CD4+ hücrelerde daha yüksek seviyelerde CTLA4 ekspresyonu saptanmıştır. Her iki grupta da benzer ekspresyon düzeylerinin gözlenmesi ile birlikte, solunum yollarında obstruksiyon olan içicilerde Treg hücrelerinin regülasyon yeteneğinin yetersiz olduğu ihtimalini desteklediğini ve bu durumun sonuçta CD8 otoreaktif hücre aracılı inflamasyonun ilerlemesine neden olacağını ileri sürmüşlerdir¹⁰⁹. Ancak bu çalışmada hem normal akciğer fonksiyonuna sahip sigara içenlerde, hem de KOAH hastalarında benzer CD27 ve CTLA4 ekspresyonlarının gözlenmesine rağmen, sadece KOAH'lılarda Treg

hücrelerinin regulasyon yeteneğinin yetersiz olduğu görüşünü savunmaları tartışmaya açık bir konudur.

Roos-Engstrand ve arkadaşları BAL'da CD4+CD25^{parlak} hücrelerin KOAH ve sigara içen kontrol grubunda içmeyen kontrol grubuna göre artmış olduğunu, sigara içen kontrol grubunda bu artışın KOAH grubundaki artıştan daha belirgin olduğunu görmüşlerdir. Sigarayı bırakanlar ile hala içmekte olan KOAH'lılar kıyaslandığında Treg düzeylerinin sigarayı bırakan grupta daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda da hem sigaranın, hem de KOAH'ın Treg hücre düzeyini artırıcı yönde etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir¹¹². BAL'da yapılan bir başka çalışmada ise sigara içmeyen ve içen kontrol grupları karşılaştırıldığında sigara içenlerde önemli Treg artışını göstermişlerdir. Bu durumu KOAH'lılarda görmeyip, sigara kullanımının KOAH'lı hastalarda normal Treg yanıtını baskılayabileceğini ileri sürmüşlerdir¹¹³.

Plumb ve arkadaşları akciğer kanseri şüphesi nedeniyle cerrahi rezeksiyon yapılan akciğer dokusu lenfoid foliküllerinde Treg hücrelerin oranlarını CD4+FoxP3+'liğine bakarak incelemişlerdir. KOAH'lı hastaların foliküllerindeki CD4+FoxP3+ hücre oranlarını, sigara içen ve içmeyenlerle karşılaştırdıklarında, bizim periferik kanda bulduğumuz sonuca benzer şekilde anlamlı yüksek bulmuşlardır. Bu artışın KOAH'lı hastaların foliküllerindeki artmış immunolojik aktivitenin göstergesi olabileceğini düşünmüşlerdir. Sigara içen ve içmeyenlerin folikülleri arasında ise yine bizim periferik kan sonuçlarına benzer şekilde Treg açısından anlamlı fark bulamamışlardır¹¹⁵. Bir başka doku çalışmasında ise küçük hücreli olmayan periferik solid karsinom düşünülerek akciğer rezeksiyonu yapılan normal akciğer fonksiyonlu sigara içenler ve KOAH'lılarda, sigara içmeyenlere göre büyük havayollarında artmış sayıda Treg hücresi saptamışlardır. Yine aynı çalışmada KOAH hastalarında, asemptomatik sigara içenler ve içmeyenlere göre küçük havayollarında hava akımı obstrüksiyonu ile negatif korelasyon gösteren Treg hücre azalması saptamışlardır. Tüm sigara içen hastaların büyük havayollarında artmış Treg hücrelerinin sigaranın direkt uyarıcı etkisiyle veya tütün maruziyetiyle gelişen inflamatuvar yanıt sonucu ortaya çıkma ihtimali üzerinde durmuşlardır. KOAH hastalarında büyük havayollarında FoxP3+ T hücre sayısı artarken, küçük havayollarında bu hücrelerin azalmasının ilgi çekici olduğunu, bunun olası sebeplerinden birinin

büyük ve küçük havayollarındaki antijen ya da epitop miktarlarının farklılığı olabileceğini ileri sürmüşlerdir¹¹⁶.

Çalışma grubuna dahil edilen hasta ve kontrol sayıları, çalışılan örnek, beraberinde bulunan hastalık durumu ve çalışma yöntem farklılıkları gibi nedenlerle KOAH hastalarındaki Treg düzeyleri ile ilgili sonuçlar birbiriyle çelişmekle birlikte, oluşan genel kanı KOAH hastalarında Treg düzeylerinin arttığı yönündedir. Bu artışın efektör T hücre artışını baskılayacak düzeyde olmadığı için aslında KOAH hastalarında göreceli Treg eksikliği olduğunu ileri sürenler yanında, artan Treg hücrelerinin reglatuvar potansiyellerinin düşük olduğunu ileri sürenler de bulunmaktadır^{109,117}. Bizim çalışmamızın sonuçları en azından periferik kanda KOAH'lı hastalarda Treg düzeylerinin yüksek olduğu, bu yüksekliğin derecesinin hastalığın evresiyle ilişkilendirilebileceği, tam tersine normal akciğer fonksiyonuna sahip sigara içenlerde ise Treg düzeylerinin düşük olduğunu göstermiştir.

Doku çalışmalarında akciğerdeki malignite durumunun immünolojik olayları tetikleyerek kanserin doğrudan Treg düzeylerini etkileyebileceği düşünülmektedir. Ancak bu tip çalışmalarda hem büyük, hem de küçük havayolları değerlendirilmesinde kullanılacak tek yöntem cerrahi spesmenlerdir. Akciğer kanserli hastaların incelenmesinde kanserli bölge etrafından alınan dokuların tümü derinlemesine incelenerek ve kontrol grubu da kanserli hastalardan oluşacak şekilde ayarlanarak immünolojik değerlendirme açısından uygun olmayan bu durum uygun hale getirilmeye çalışılmaktadır.

Diğer çalışmalarda KOAH evrelendirilmesi yapılmadan genel olarak stabil orta evre KOAH hastaları çalışmaya alınırken, biz çalışmamızda KOAH hastalarını evrelerine göre gruplara ayırarak Treg hücre değerlendirmesi yaptık. Hastalığın evrelerinin farklı olması kliniğe yönelik yapılan immünolojik değerlendirmeleri kolaylaştırmaktadır. Ağır ve orta evre KOAH'lılarda Treg hücre düzeyi artışının hafif evrede görülmemesi, bize hastalığın ilerlemesiyle Treg artışı arasında korelasyon olduğunu düşündürmüştür. Ağır ve orta KOAH'ı olanlarda reglatuvar T hücre düzeylerinin periferik kanda yüksek olarak saptanması iki durumu düşündürmektedir. Bunlardan birincisi reglatuvar T hücre düzeyi yüksek olanlarda sigara gibi çevresel bir faktörün de eklenmesi sonucunda KOAH gelişmesidir, ki bu durumda hafif KOAH olgularında da Treg düzeylerini yüksek olarak saptamamız gerekirdi. Diğeri ise daha da muhtemel

olanı, KOAH'da oluşan inflamasyona sekonder olarak reglatuvar T hücre düzeyinin yükselmesidir. Hava akımı kısıtlanması olmayan sigara içenlerde reglatuvar T hücre düzeyinin düşük olması, bu kişilerin CD4/CD8 oranlarında azalma olmaması ile paralellik göstermektedir. Bu kişilerde akciğerde inflamasyondan sorumlu olan efektör CD8 T hücre artışının olmaması, reglatuvar T hücre artışına da gerek olmadığını düşündürmektedir. Diğer taraftan KOAH hastalarının akciğerlerinde saptanan lokal efektör CD8 T hücre artışı reglatuvar T hücre artışını da tetikleyebilir. KOAH uzun dönem sigara içen kişilerin sadece küçük bir kısmında ortaya çıkmakta ve hastalığa duyarlılık, kişiler benzer yaş ve sigara kullanım öykülerine sahip olsalar dahi oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu da KOAH'ta efektör CD8 T hücre artışı ve CD4/CD8 oranında azalmaya yol açan başka immunolojik mekanizmaların olabileceğini düşündürmektedir.

Bu konuda kesin yargıya ulaşmak için inflamasyonu değişik boyutlarda lokal ve sistemik olarak inceleyen çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz. Bizim çalışmamızın da KOAH patogeneğinde adaptif immünite ve Treg hücrelerin rolünün anlaşılmasında yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Periferik kanda KOAH hastaları ile normal akciğer fonksiyonuna sahip sigara içen ve sigara içmeyen kontrol grupları arasında CD3+, CD19+, CD4+ ve CD8+ hücre sayıları açısından anlamlı farklılık bulunmaması, bazı çalışmalarda bildirilen KOAH'lı hastalardaki lokal efektör CD8 T lenfosit artışının sistemik dolaşıma yansımadağını düşündürmektedir.
2. CD4/CD8 oranları sigara içen kontrol grubuna göre KOAH ve KOAH subgruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Bu azalmanın, istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte CD4 T lenfosit azalması ve CD8 T lenfosit artışından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Diğer yandan normal akciğer fonksiyonuna sahip sigara içenlerde CD4/CD8 oranının değişmemesi, sigara içenlerde bu durumun KOAH'tan koruyucu bir etkisi mi olduğu sorusunu düşündürmektedir.
3. Periferik kanda KOAH grubunda Treg düzeyi sigara içen kontrol grubuna göre daha yüksek saptanmıştır. Bu artış hastalığın ağır ve orta KOAH subgruplarında gözlenirken, hafif subgrupta gözlenmemiştir. Bu bulgu hastalığın ilerlemesiyle Treg artışı arasında bir korelasyon olduğunu düşündürmektedir.
4. KOAH, normal akciğer fonksiyonuna sahip sigara içenler ve sigara içmeyen kontrol gruplarından elde ettiğimiz veriler bize artan Treg sayısının sürece sekonder olarak geliştiğini düşündürmektedir.
5. Bu sonuçlar KOAH patogenezinde efektör CD8 T hücre artışı ve CD4/CD8 oranında azalmaya yol açan başka immunolojik mekanizmaların olabileceğini düşündürmektedir.
6. Bu çalışmanın sadece periferik kanda yapılmış olması ve beraberinde Treg aktivitesini gösteren sitokin düzeylerinin belirlenmemiş olması çalışmanın kısıtlı yönlerini oluşturmaktadır.
7. KOAH patogenezinde immün sistemin rolüyle ilgili kesin yargıya ulaşmak için inflamasyonu değişik boyutlarda lokal ve sistemik olarak inceleyen çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Celi BR, MacNee W et al. Standarts for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23:932-46.
2. Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet* 2004; 364:613-20.
3. Shapiro SD, Snider GL. Obstructive diseases. In: Nadel JA, Murray JF. *Textbook of Respiratory Medicine*. 4. Ed., Philadelphia: Curtis Center, 2005:1115-53.
4. Marvisi M, Civardi G. Chronic Obstructive Pulmonary Disease beyond Cigarette Smoke. *Respiration* 2005; 72:575-76.
5. Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:17-20.
6. Mannino DM, Watt G, Hole D. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:627-43.
7. Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58:832-34.
8. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD4+ CD25+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182: 18-32.
9. Liu H, Leung BP. CD4+CD25+ Regulatory T Cells In Health And Disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2008; 33: 519-24.
10. Agusti A: Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: what we know and what we don't know (but should) *Proc Am Thorac Soc*. 2007; 4(7):522-25.
11. Lehmann C, Wilkening A, Leiber D, et al. Lymphocytes in the bronchoalveolar space reenter the lung tissue by means of the alveolar

epithelium, migrate to regional lymph nodes, and subsequently rejoin the systemic immune system. Anat Rec 2001; 264(3):229-36.

12. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global strategy for diagnosis, management and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease updated 2009 (www.goldcopd.com).
13. American Thoracic Society-European Respiratory Society position paper. Standards for the diagnosis and management of patients with COPD. 1-222.
14. Toraks Derneği Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Tanı ve Tedavi Rehberi. Toraks Dergisi 2000; 1(2):1-25.
15. Talamo C, de Oca MM, Halbert R, et al. Diagnostic labeling of COPD in five Latin American cities. Chest 2007; 131:60-67.
16. Baykal Y. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı üzerinde epidemiyolojik bir araştırma. Tüberküloz ve Toraks 1976; 24:3-18.
17. Kocabaş A, Hancioğlu A, Türkyılmaz S ve ark. Prevalence COPD in Adana, Turkey (BOLD-Turkey Study). Proceedings of the American Thoracic Society 2006; 3 (Abstrac Issue):A543.
18. Kocabaş A. KOAH Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri. Bilgiç H, Karadağ M, Umut S, Erdinç E. Tanımdan Tedaviye Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı, 6, Bursa: Galenos Yayıncılık 2008; 10-22.
19. J. Anto, P. Vermeire. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 2001; 17:982-84.
20. Gülbay BE, Acıcan T. Patogenez ve İnflamasyon. In: Saryal SB, Acıcan T. (Ed.) Güncel bilgiler ışığında Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı; Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi 2003: 21-33.
21. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. Br Med J 1977; 1:1645-48.
22. Samurkaşoğlu B. KOAH, Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri. In Saryal SB, Acıcan T (ed): Güncel Bilgiler Işığında KOAH. Ankara bilimsel tıp yayınevi, 2003:9-20.
23. Erdinç E, Erk M, Kocabaş A ve ark. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı tanı ve tedavi rehberi. Uçan S (Ed.). 1. Cilt, ek 2. Toraks Derneği Yayını, Ağustos 2000:1-25.

24. Wiedemann HP, Stoller JK. Lung disease due to α -1 antitrypsin deficiency. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 1996; 2:155-60.
25. Tashkın DP, Altose MD, Bileecker ER et al. The Lung Health Study: airway responsiveness to inhaled methacholine in smokers with mild to moderate airflow limitation. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:301-10.
26. MacNee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonar Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:258-66.
27. Barnes PJ, Cosio MG. Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 2006; 38:130-158.
28. Skrepnek GH, Skrepnek SV. Epidemiology, Clinical and Economic Burden and Natural History of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma. *The American Journal of Managed of Care* 2004; 10:129-38.
29. Yıldırım N. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Patogenezi. İn: Umut S, Erdinç E (ed) Tanımdan Tedaviye Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı. *Toraks Kitapları Sayı 6. Türk Toraks Derneği Yayınları*, 2008: 36-59.
30. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672–688.
31. Stockley RA. The role of proteinases in the pathogenesis of chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:109-113.
32. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med*,1999; 160:549-52.
33. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stres in chronic obstructive pulmonary disease. *Oxidative Stress Study Group. Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:341-57.
34. Hansel T, Barnes P, Eds. *An Atlas of Chronic Obstructive Pulmonary Disease COPD*. London, New York, Parthenon Publishing Group, 2004.
35. Voelkel NF, Tudor R. *Chronic Obstructive Lung Disease*. Chest London. 2002;117:376-79.
36. Smith CAD, Harriso DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susseptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350:630-33.

37. He JQ, Juan J, Connect JE, et al. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to rapid decline in lung function smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:323-328.
38. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000; 66:187-95.
39. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 2003; 52:1210-14.
40. Tetikkurt C. KOAH'ta klinik. In: Umut S, Yıldırım N; eds. *Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı*. İstanbul 2005: 71-73.
41. Günen H. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığında Klinik Bulgular ve Tanısal Yaklaşım. In: Umut S, Erdinç E (ed) *Tanımdan Tedaviye Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı*. Toraks Kitapları Sayı 6. Türk Toraks Derneği Yayınları, 2008: 83-93.
42. Camcıoğlu Y. İmmün Sisteme Giriş. In: Camcıoğlu Y, Deniz G (ed). *Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları*. 1. baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2007: 1-21.
43. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 347-60.
44. Badur S. Doğal Bağışıklık. In: Camcıoğlu Y, Deniz G (ed). *Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları*. 1. baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2007:21-41.
45. Yeğin O. İmmünolojik Tolerans ve Otoimmünite. In: Camcıoğlu Y, Deniz G (ed). *Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları*. 1. baskı. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007:161-177.
46. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008 September 1; 112(5):1557-69.
47. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969;166:753-55.

48. Gershon RK, Kondo K. Cellinteractions in the induction of tolerance: the rol of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18:723-37.
49. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-64.
50. Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev.* 2006; 212:217-37.
51. Ohata J, Miura T, Johnson TA, et al. Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts. *Arthritis rheum* 2007; 56:2947-56.
52. Lio CW, Hsieh CS. Becoming self-aware: the thymic education of regulatory T cells. *Current Opinion in Immunology* 2010; 23:1-7.
53. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, et al. Activation-induced FoxP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* 2007; 19:345-54.
54. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299:1057-61
55. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immun. Rev.* 2001;182: 68-79.
56. Huber S, Schramm C, Lehr HA, et al. Cutting Edge: TGFb signaling is r equired for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.* 2004; 173(11):6526-31.
57. Furtado GC, de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interkeukin 2 signaling is required for CD4 (+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 2002 ; 196(6): 851-7.
58. Aktaş E. Lökosit yüzey molekülleri. Yılmaz MT, Deniz G, Yıllar G. (ed). *Flowsitometri ve Tıpta Kullanımı.* 2. baskı. İstanbul: Bilmedya Grup, 2004: 31-43.
59. Ziegler SF. FOXP3: of mice and man. *Ann Rev Immunol* 2006; 24: 209-26.
60. Coffe PJ, Burgering MT. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev* 2004; 4:889-99.

61. Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 1989; 57:645-58.
62. Lai E, Prezioso VR, Smith E, et al. HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* 2000; 14:142-46.
63. Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the HNF-3/ forkhead DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 1993; 364:412-420.
64. Brunkow ME. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy Mouse. *Nature Genet* 2001; 27:68-73.
65. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:5138-43.
66. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin(FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; 276:37672-79.
67. Blair PJ. CD4+CD25+ T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol* 1994; 153: 3764-74.
68. Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev* 2005; 203:156-164.
69. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused mutations of FOXP3. *Nature Genet* 2001; 27:20-1.
70. Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N et al. Interleukin-7: Physiological roles and mechanism of action. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999; 10:41-60
71. Vrabelova Z, Hrotekova Z, Hladikova Z, et al. CD 127 and FoxP3+ Expression on CD25+CD4+ T Regulatory Cells upon Specific Diabetogenic Stimulation in High-risk Relatives of Type 1 Diabetes Mellitus Patients. *Scand J. Immunol.* 2008 April; 67(4): 404-10.

72. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 2002; 3:135-42.
73. Huang CT, Workman CJ, Flies D et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21: 503-13.
74. Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DA. Cutting edge: Molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J. Immunol.* 2002; 169: 5392-5.
75. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23:515-48.
76. Okazaki T, Iwai Y, Honjo T. New regulatory co-receptors: Inducible co-stimulator and PD-1. *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14:779-82.
77. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19:225-52.
78. Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, et al. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol*, 1999; 29:3596-602.
79. Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. *Immunology*, 2008; 123:40-44.
80. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*, 2007:89195.
81. Sorensen RB, Berge-Hansen L, Junker N, et al. The immune system strikes back: cellular immune responses against indoleamine 2,3-dioxygenase. *Plos One*, 2009; 4:6910.
82. Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT, et al. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC Cancer*, 2009; 9:231.
83. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005; 174:1783-6.

84. Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 2006; 80: 458-70.
85. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164: 183-90.
86. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells. *Int Immunol* 1998;10:1969-80.
87. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 2007; 13(3):108-16.
88. Torgerson TR. Regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Springer Semin Immun* 2006; 28:63-76.
89. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cell: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunological reviews* 2008; 223:371-90.
90. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*. 2004; 23:327-33.
91. Araya J, Cambier S, Markovics JA, et al. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J Clin Invest*. 2007;117:3551-62.
92. Iwamura C, Nakayama T. Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008; 8:7-13.
93. Tetley TD. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest*. 2002; 121:156-59.
94. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:1666-72.
95. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283(4):867-73.
96. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165:1404-09.

97. Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, et al. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 30:202-211.
98. Robbins CS, Franco F, Mouded M, Cernadas M, Shapiro SD. Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice. *J Immunol.* 2008; 180:6623-28.
99. Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, et al. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 998-1005.
100. Bracke K, Cataldo D, Maes T, et al. Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;138:169-79.
101. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:822-826.
102. Motz GT, Eppert BL, Sun G, et al. Persistence of lung CD8 T cell oligoclonal expansions upon smoking cessation in a mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *J Immunol.* 2008;181:8036-43.
103. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J.* 2001;17:946-53.
104. Gosman MM, Willemse BW, Jansen DF, et al. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J.* 2006; 27:60-4.
105. Stefanska AM, Walsh PT. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Evidence for an Autoimmune Component. *Cell Mol Immunol.* 2009; 6(2):81-6.
106. Gazioğlu S. Flowsitometrinin tarihçesi, çalışma metodolojisi. Yılmaz MT, Deniz G, Yıllar G. (ed). *Flowsitometri ve Tıpta Kullanımı.* 2. baskı. İstanbul: Bilmedya Grup, 2004:1-11.
107. Kim WD, Kim WS, Koh Y, et al. COPD Subsets in a Subgroup of Patients With Abnormal Peripheral Blood T-Lymphocyte. *Chest* 2002;122:437-44

108. Domagała-Kulawik J, Hoser G, Dabrowska M, et al. CD4+CD25+ Cells in Systemic Inflammation in COPD. *Scandinavian Journal of Immunology* 2011; 73:59-65
109. Smyth LJC, Starkey C, Vestbo J et al. CD4-Regulatory Cells in COPD Patients. *Chest* 2007;132:156-163
110. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, et al. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T-lymphocytes with FEV₁. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:852–857
111. Zhu X, Gadgil AS, Givelber R, et al. Peripheral T Cell Functions Correlate with the Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Immunol* 2009; 182:3270-77
112. Roos-Engstrand E, Ekstrand-Hammarström B, Pourazar J, et al. Influence of Smoking Cessation on Airway T Lymphocyte Subsets in COPD. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2009; 6:112-120
113. Barcelo B, Pons J, Ferrer JM et al. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2008; 31: 555-62
114. Lee SH, Goswami S, Grudo A, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nature medicine* 2007; 13: 567-69
115. Plumb J, Smyth LJC, Adams HR et al. Increased T-regulatory cells within lymphocyte follicles in moderate COPD. *Eur Respir J* 2009; 34:89-94
116. Isajevs S, Taivans I, Strazda G, et al. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur Respir J* 2009; 33:61-67
117. Plumb J, Smyth LJC, Singh D. Role of Regulatory T-cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annals of Respiratory Medicine* 2009.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AAT	: Alfa-1 Antitripsin
APS	: Autoimmune Polyendocrine Syndrome Otoimmün Poliendokrin Sendrom
ASH	: Antijen Sunan Hücre
ATS	: American Thoracic Society (Amerikan Toraks Derneği)
BAL	: Bronkoalveoler Lavaj
BOLD	: Burden of Obstructive Lung Disease Initiative (Akciğer Hastalıkları Yükü Girişimi)
CCL	: CC kemokin ligandı
CCR	: CC kemokin reseptör
CD	: Cluster of Differentiation (Farklılaşma Kümesi)
CRP	: C- Reaktif Protein
CTLA-4	: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4)
CXCL	: CXC Ligandı
DC	: Dendritic Cell (dendritik hücre)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ERS	: European Respiratory Society (Avrupa Göğüs Hastalıkları Topluluğu)
Fas-L	: Fas-Ligand
FEV₁	: Forced Expiratory Volume (1. saniye zorlu ekspirasyon volümü)
FEV₁/FVC	: Zorlu ekspirasyon 1. saniyedeki volümünün zorlu vital kapasiteye oranı
FEF₂₅₋₇₅	: Forced expiratory flow 25–75% Zorlu ekspirasyon akım hızı 25–75%
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FKH	: Fork head
FoxP3	: Forkhead-box 3
FSC	: Forward Scatter Channel (İleri saçılım kanal)

FVC	: Forced Vital Capacity (Zorlu Vital Kapasite)
GITR	: Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Glukortikoid indükleyen tümör nekroz faktör reseptörü
GM-CSF	: Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor Granülosit/makrofaj koloni stimüle edici faktör
GOLD	: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (Kronik obstrüktif akciğer hastalığına karşı küresel girişim)
GST	: Glutasyon S Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HO-1	: Hem oksijenaz-1
IDO	: İndolamin dioksijenaz
IFN-γ	: İnterferon- γ
IL	: İnterlökin
IL-2Rα	: IL-2 alfa reseptörü
IPEX	: İmmundisregulasyon, poliendokrinopati, enteropati, X linked sendrom
iTreg	: İnducible Treg (Adaptif Treg)
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LAG	: Lenfosit aktivasyon gen
LTB₄	: Lökotrien B ₄
LR	: Lower right (Sağ alt)
MCP-1	: Monosit kemotaktik protein-1
mEH	: Mikrozomal Epoksit Hidrolaz
MG	: Myastenia Gravis
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MMP	: Metalloproteinaz
MS	: Multiple Skleroz
NFAT	: Nuclear Factor of Activated T cells
NF-κB	: Nuclear Faktör kappa B
NK	: Natural Killer (Doğal Öldürücü)
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrojen dioksit
nTreg	: Natural Treg (Doğal Treg)
O₂⁻	: Süperoksit anyonu

-OH	: Hidroksil radikali
PBMC	: Peripheral blood mononuclear cell (Periferik kan mononükleer hücre)
PBS	: Primer biliyer siroz
PD-1	: Programmed Death 1 (Programlanmış Ölüm-1)
PE	: Phycoerythrin
PEF	: Peak Expiratory Flow (Zirve Akım Hızı)
PI	: Propidium Iodide
PLATINO	: Latin American Project for the Investigation of Obstructive Lung Disease (Obstruktif Akciğer Hastalıklarını Araştırmaya Yönelik Latin Amerika Projesi)
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
PMT's	: Photo Multiply Tubes
RA	: Romatoid Artrit
RNA	: Ribonükleik Asit
sf	: Scurfy
SFT	: Solunum Fonksiyon Testi
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
SLPI	: Sekretuvar Lökoproteaz İnhibitörü
SSC	: Side Scatter Channel (Yana saçılım kanalı)
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences Version
TCR	: T Cell Receptor (T hücre reseptörü)
TGF-β	: Transforming Growth Factor- β
Th	: T helper
TIMP	: Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
TLRs	: Toll-Like Reseptör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör alfa reseptörü-75
TNFRSF	: Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily
Treg	: Reglatuvar T hücre
UL	: Upper left (Sol üst)
UR	: Upper right (Sağ üst)
VK	: Vital Kapasite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller		Sayfa No
Şekil 1	(FEV1, yaş ve sigara ilişkisi)	13
Şekil 2	(KOAH patogenezinde yeralan hücreler ve mediatörler)	16
Şekil 3	(KOAH'ta fizyopatolojik değişimler)	20
Şekil 4	(Doğal ve edinsel İmmünite)	23
Şekil 5	(Santral T hücre toleransı)	26
Şekil 6	(T hücre anerjisi)	27
Şekil 7	(T hücrelerinin aktivasyonla ortaya çıkan ölümleri)	28
Şekil 8	(Reglatuvar T hücreleriyle immün baskılama)	28
Şekil 9	(Reglatuvar T hücre alt grupları)	31
Şekil 10	(Treg hücrelerin moleküler karakteristikleri)	32
Şekil 11	(FOX proteinleri ve kanatlı sarmal DNA bağlanan kısmı)	33
Şekil 12	(İnsan FoxP3'ünün şematik gösterimi)	34
Şekil 13	(FoxP3'ün immun sistemdeki etkileri)	35
Şekil 14	(Treg'lerin etki mekanizmaları)	38
Şekil 15	(KOAH'taki immün yanıtın genel bir şekli)	41
Şekil 16	(Mononükleer hücre izolasyonu)	44
Şekil 17	(Akım sitometrinin şematik gösterimi)	47
Şekil 18	(PMBC içindeki lenfositlerin yüzdesi)	48
Şekil 19	(Negatif kontrol dot plot görüntüsü)	48
Şekil 20	(Total lenfositler içindeki CD3+ ve CD19+ hücrelerin %'si)	49
Şekil 21	(Total lenfositler içindeki CD4+ ve CD8+ hücrelerin %'si)	49
Şekil 22	(PBMC içindeki CD4+ T lenfositler)	50
Şekil 23	(CD4+CD25+FOXP3+ hücrelerin %'si)	50
Şekil 24	(Hasta ve kontrol grubunda CD4+%'leri)	54

Şekil 25	(Hasta ve kontrol grubu CD4+CD25+FOXP3+%’leri)	54
Şekil 26	(Hasta ve kontrol grubu Treg absolut sayı/ μ L ortalamaları)	55
Şekil 27.	(Hasta ve kontrol grubunda CD4/CD8 oranı)	55
Şekil 28	(Ağır KOAH’lılar ve kontrol grubunda CD4/CD8 oranı)	58
Şekil 29	(Ağır, orta, hafif evre KOAH’lılar ve kontrol grubunda CD4+CD25+FOXP3+% ortalamaları)	58
Şekil 30	(Ağır, orta, hafif KOAH’lılar ve kontrol grubunda Treg absolut sayı/ μ L ortalamaları)	59
Şekil 31	(Orta KOAH’lılar ve kontrol grubunda CD4+%’leri)	61
Şekil 32	(Orta KOAH’lılar ve sigara içen kontrol grubunda CD4/CD8 oranları)	61
Şekil 33	(Hafif KOAH’lılar ve kontrol gruplarında CD19+%’leri)	63
Şekil 34	(Hafif KOAH’lılar ve kontrol grubunun CD4+%’leri)	63
Şekil 35	(Hafif KOAH’lılar ve kontrol grubunun CD4/CD8 oranı)	63

TABLolar DİZİNİ

Tablolar		Sayfa No
Tablo 1	(KOAH'ın fonksiyonel sınıflandırılması)	11
Tablo 2	(KOAH' ta risk faktörleri)	12
Tablo 3	(KOAH'ta patolojik değişiklikler)	15
Tablo 4	(KOAH'ın sistemik etkileri)	22
Tablo 5	(Treg alt grupları ve özellikleri)	31
Tablo 6	(Kullanılan reaktif ve kitler)	43
Tablo 7	(Grupların cinsiyete göre dağılımı)	52
Tablo 8	(Grupların yaş ortalamasına göre dağılımı)	52
Tablo 9	(Hasta ve kontrol gruplarının sonuçlarının karşılaştırması)	53
Tablo 10	(KOAH evreler arası sonuçların karşılaştırması)	56
Tablo 11	(Ağır KOAH'lı hastalar ile sigara içen ve içmeyen kontrol grupları sonuçlarının karşılaştırması)	57
Tablo 12	(Orta KOAH sub grubu ile sigara içen ve içmeyen kontrol grupları sonuçlarının karşılaştırması)	60
Tablo 13	(Hafif KOAH sub grubu ile sigara içen ve içmeyen kontrol grupları sonuçlarının karşılaştırması)	62

EK 1.

SAĞLIKLI/HASTA GÖNÜLLÜ DENEKLER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU ÖRNEĞİ
Hekimin Açıklaması

KOAH hastalığıyla ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “KOAH’lı Hastalarda Reglatuvar T Hücre Düzeyi”dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı diliyoruz. Ancak bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, KOAH’lı hastalarda reglatuvar T hücre düzeyini belirlemektir. Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Göğüs Hastalıkları ve Biyokimya Anabilim Dallarının ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu araştırmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Dr. Bahri TEMURAY veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edileceksiniz ve bulgular kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu araştırmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda bu araştırmayı yapabilmek için kolunuzdan 10 ml (1-2 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Alınan kanda CD3, CD25, Fox P3, gibi maddelerin miktarı ölçülecektir.

Kan alınması sırasında iğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Bu araştırmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Araştırmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine araştırmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Sağlıklı/Hasta Gönüllü Denek Beyanı

Sayın Dr. Gökçen ALICI SERT tarafından Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya katılımcı (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam, hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine, bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma ile ilgili bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda, herhangi bir saatte, Dr.Gökçen ALICI SERT'i 3374300/1530 numaralı iş telefonundan veya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

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

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırmada katılımcı

(denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.
İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Sağlıklı/hasta gönüllü denek

Adı, soyadı:

Adres:

Telefon numarası:

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Telefon numarası:

İmza:

Sağlıklı/hasta gönüllü denek ile görüşen hekim

Unvanı, adı, soyadı:

Adresi:

Telefon numarası:

İmza: