

T.C.  
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
Biyokimya Anabilim Dalı

KRONİK OBSTRUKTİF AKCİĞER HASTALIĞI OLAN VE  
SİGARA KULLANAN BİREYLERDE MANNOZ BİNDİNG  
LEKTİN POLİMORFİZMİ, SERUM MANNOZ BİNDİNG LEKTİN  
KONSANTRASYONU, CD4,CD8 ORANLARI VE TOLL LİKE  
RESEPTÖR -2 EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Gürol Şahin ULUTAŞ

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Fatma TANELİ

Manisa, 2009

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini aktarıırken verdikleri emek, gösterdikleri sevgi ve anlayıştan dolayı değerli hocalarım, Prof. Dr. Zeki ARI, Doç. Dr. Ahmet VAR, Doç. Dr. Cevval ULMAN, Doç. Dr. Ece ONUR'a, tez hocam ve danışmanım Doç. Dr. Fatma TANELİ'ye,

Asistanlığım boyunca aynı ortamı paylaştığım, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve her zaman en içeten desteklerini arkamda hissettiğim asistan arkadaşlarım; Dr. Özlem GÜNAY, Dr. Metin DEMİR, Dr. Nesrin ÖZLEN, Dr. Derya GÜLEÇ, Dr. Esat KILIÇ, Dr. Ferda Doğan BOZYİĞİT, Dr. Nurser ARİFOĞLU, Dr. Mehmet ÇALKAN, Dr. Ferhunde PULULAR, Dr.Soner ERDİN, Dr. Aysun BİLGİ, Dr. Sezen IRMAK ve Dr. Turgut AKTAŞ'a,

Biyolog Gülay GÜLER'e ve tüm klinik biyokimya laboratuvarı çalışanlarına,

Tezimin örnek toplanması aşamasındaki katkı ve desteklerinden dolayı Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Aylin Özgen ve Dr. Cemile Çetinkaya' ya,

Yaşantımın her anında sevgi ve destekleriyle yanımda olan anneme, babama ve kardeşime,

Gösterdiği kararlı destek ile uzmanlık sınavını kazanmama neden olan ve asistanlığım boyunca özveri, sabır ve sevgisi ile bu günlere gelmemdeki en önemli etken sevgili eşim Münevver'e ve canım oğlum Onat'a, birlikte geçirecekken nöbetlerde ve ders çalışırken geçen zamana değmiş olması dileği ile...

En içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

**Dr.Gürol Şahin ULUTAŞ**

İzmir, 2009

## KISALTMALAR

<b>APC:</b>	Antigens presenting cells (Antijen sunan hücreler)
<b>CRD:</b>	Carbohydrate recognition domain (Karbonhidrat tanıma alanı)
<b>CI:</b>	Güven aralığı
<b>CV:</b>	Korelasyon katsayısı
<b>EDTA:</b>	Etilen diamin tetra asetikasit
<b>ELISA:</b>	Enzim immün sorbant assay
<b>FEV<sub>1</sub>:</b>	Birinci saniye zorlu ekspiratuar hacim
<b>FVC:</b>	Zorlu vital kapasiteye
<b>GOLD:</b>	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	İnterferon- $\gamma$
<b>IL-1:</b>	İnterlökin 1
<b>KOAH:</b>	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
<b>LRR:</b>	Leucine-rich repeat (Lösin-zengin tekrar alanı)
<b>MASP:</b>	MBL-ilgili serin proteaz
<b>MBL:</b>	Mannose binding lectin
<b>MHC:</b>	Major histokompatibilite kompleks
<b>OR:</b>	Odds oranı
<b>PAMP:</b>	Patojen ilişkili moleküler patternler
<b>PRR:</b>	Pattern Recognition Receptors (Pattern tanıyıcı reseptörler)
<b>RT-PCR:</b>	Real time polimeraz zincir reaksiyonu
<b>TCR:</b>	T cell receptor (T hücre reseptör)
<b>Th1-2:</b>	T helper tip 1-2
<b>TIR:</b>	Toll/IL-1 reseptör
<b>TLR:</b>	Toll-like reseptörler
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tümör nekrozis faktör- $\alpha$

## İÇİNDEKİLER

<b>I. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1- 2</b>
<b>II. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3-19</b>
<b>II.1.Kronik obstruktif Akciğer hastalığı</b>	<b>3</b>
<b>II.1.1. Tanım</b>	<b>3</b>
<b>II.1.2. Epidemiyoloji</b>	<b>3</b>
<b>II.1.3. KOAH'da risk faktörleri</b>	<b>4</b>
<b>II.1.4. Patoloji</b>	<b>5</b>
<b>II.1.5. Klinik özellikler ve tanı</b>	<b>5</b>
<b>II.2.MBL</b>	<b>7</b>
<b>II.3.TLR</b>	<b>12</b>
<b>II.4.CD4 –CD-8</b>	<b>18</b>
<b>III. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>20-26</b>
<b>III.1. Araç ve Gereçler</b>	<b>20</b>
<b>III.2. Yöntem</b>	<b>20</b>
<b>III.2.1.Çalışma Grupları</b>	<b>20</b>
<b>III.2.2. Çalışma Düzeni</b>	<b>21</b>
<b>III.2.3. Solunum Fonksiyon Testi</b>	<b>21</b>
<b>III.2.4. Kan örneklerinin Alınması</b>	<b>22</b>
<b>III.2.5. MBL Polimorfizimi</b>	<b>22</b>
<b>III.2.5.1. DNA Ekstraksiyon İşlemi</b>	<b>22</b>
<b>III.2.5.2. MBL Real Time PCR</b>	<b>23</b>
<b>III.2.6. Serum MBL Düzeyi</b>	<b>24</b>
<b>III.2.7. TLR 2</b>	<b>25</b>
<b>III.2.8. CD 4, CD 8</b>	<b>26</b>
<b>III.3. İstatistiksel Analiz</b>	<b>26</b>
<b>IV. BULGULAR</b>	<b>27-44</b>
<b>V. TARTIŞMA</b>	<b>45-55</b>
<b>VI. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>56-57</b>
<b>VII. ÖZET</b>	<b>58</b>
<b>VIII. İNGİLİZCE ÖZET</b>	<b>59-60</b>
<b>IX. KAYNAKLAR</b>	<b>61-73</b>

## I.GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) tüm dünyada önemli mortalite ve morbidite nedenidir. KOAH'ta başlıca risk faktörü sigara içimidir. Sigara hava yolunda epitelyum yüzeyinde oksidan hasara yol açarak inflamasyonu başlatır. İnflamasyonda rolü olan başlıca hücreler makrofajlar, T lenfositleri ve nötrofillerdir. Son yıllarda KOAH'ta hava yolları, alveoller ve pulmoner damarlarda artmış sayıda CD8+ T hücre olduğu gösterilmiş ve bu hücrelerin akciğer fonksiyonunun azalmasıyla da ilişkisi saptanmıştır. Şiddetli KOAH'ta CD4+ T hücreleri de artmaktadır. Sigara içimi periferik kanda T lenfosit subtiplerini değiştirmektedir.

Doğal bağışıklıkta anahtar rol oynayan ve bir akut faz reaktanı olan Mannose binding lectin (MBL) karaciğerde sentezlenir ve mikroorganizmaların yüzeyindeki mannoz içeren glikokonjugatlara bağlanarak kompleman sistemini aktive eder. MBL ilişkili kompleman yolağı daha önce romatizmal kalp hastalığında, kronik böbrek yetmezliğinde, diyabetik nefropatide ve astımlı hastalarda incelenmiştir. Ayrıca MBL bağlandığı bakteriyi opsonize ederek fagositozuna yol açar. MBL genindeki (MBL2) tek nükleotid polimorfizminin fonksiyonel etkisinin serum MBL seviyesi olduğu bilinmektedir. Düşük serum MBL düzeylerinin çocuklarda solunum yolları enfeksiyonları frekansında artışa ve pnömoniye neden olduğu, yetişkinlerde de SLE ve invaziv pünömokokal hastalık riski ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.

Toll-like reseptörler (TLR) birçok patojene karşı doğal immun cevabın oluşmasını sağlarlar. TLR, "patojen ilişkili moleküler patternler" (Pathogen Associated Molecular Patterns: PAMP) ile bağlandığında, intrasitoplazmik domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olarak antimikrobiyal

protein ve inflamatuvar sitokinler sentezlenir. KOAH'lı hastalarda ve sigara içenlerde TLR-2 ekspresyonunun azaldığı ileri sürülmektedir.

Çalışmamızda KOAH hastalarında ve/veya sigara kullanan bireylerde, MBL polimorfizmi, serum MBL konsantrasyonu, serum CD4+ ve CD8+T hücre oranları ile CD4/CD8 oranı ve monositlerdeki TLR-2 ekspresyonu parametreleri incelenerek, bu parametrelerin hastalara klinikte uygulanan solunum fonksiyon testleriyle karşılaştırılarak ve sağlıklı kontrol grubu ile de kıyaslanarak KOAH hastalarında ve sigara içen bireylerde bu parametrelerin akciğer patolojisinin klinik bir belirteci olarak olası kullanımının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## **II. GENEL BİLGİLER**

### **II.1.Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı**

#### **II.1.1.Tanım**

KOAH tam olarak geri dönüşü olmayan hava akımı sınırlanması ile karakterize klinik bir durumdur. Yerleşik hava akımı sınırlanması, genellikle ilerleyicidir ve akciğerlerde zararlı partiküllere ve gazlara karşı gelişen anormal inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir. KOAH'ta kronik hava akımı sınırlanmasının nedeni akciğerde oluşan inflamasyonun yol açtığı parankim harabiyeti (amfizem) ve küçük hava yollarında başlıca inflamasyon ve fibrozisin (obstrüktif bronşiyolit veya küçük hava yolu hastalığı) yol açtığı obstrüksiyondur. Amfizem ve bronşiyolitin hava akımı obstrüksiyonuna katkısı ve derecesi kişiden kişiye göreceli olarak farklılık göstermektedir (1).

#### **II.1.2. Epidemiyoloji**

KOAH tüm dünya ülkelerinde önemli mortalite ve morbidite neden olan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2004 yılında güncellenmiş 2002 raporuna göre KOAH 2001 yılında dünya genelinde önde gelen ölüm nedenleri içinde beşinci sırada yer almaktadır (2). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1988-1994 yılları arasında yürütülen oldukça kapsamlı ulusal bir araştırma olan NHANES III araştırmasında 25-75 yaş arasındaki kişilerde KOAH prevalansı %16 olarak saptanmıştır (3). Türkiye'de 1976 yılında Etimesgut bölgesinde yapılan bir çalışmada, 40 yaş üstündeki KOAH

prevalansının %13,6 olduğu (erkeklerde %20,1 kadınlarda %8,2) bildirilmiştir (4).

2003-2004 yılları arasında Adana ilinde yapılan BOLD çalışmasında KOAH prevalansı 40 yaş üstünde %19,2 (erkeklerde %29,3, kadınlarda %9,9) olarak bulunmuştur (5).

2000 yılında Sağlık Bakanlığı ve Dünya Sağlık Örgütü'nün birlikte yürüttüğü Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkililik Çalışmasında KOAH Türkiye'de 3. ölüm nedeni olarak bulunmuştur (6).

### **II.1.3. KOAH'da risk faktörleri**

KOAH'ta başlıca risk faktörü sigara içimidir. Ancak sigara içimi tek risk faktörü değildir. Organik ve inorganik tozlar, hava kirliliği, akciğer enfeksiyonları, akciğerlerin gelişimine ait bozukluklar, alfa1-antitripsin eksikliği gibi genetik faktörler diğer önemli risk faktörleridir (1).

KOAH patogeneğinde en iyi incelenmiş başlıca genetik risk faktörü; dolaşımdaki major serin proteaz inhibitörü olan alfa -1 antitripsinin kalıtsal eksikliğidir (7).

Sigara içen bireylerde yüksek oranda solunum bulguları ve akciğer fonksiyon bozuklukları gözlenmektedir. Sigara içen kişilerin sigara içmeyenlere göre daha yüksek yıllık, 1. saniye zorlu ekspiratuar hacim (FEV<sub>1</sub>) düşüş oranına ve KOAH mortalitesine sahip olduğu bilinmektedir (1). Sigara içen kişilerin tümünde KOAH gelişmemesi ise kalıtsal faktörlerin de bireysel riskleri değiştirdiğini bize düşündürmektedir (8). Gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalar göstermiştir ki günümüzde KOAH prevalansı kadınlar ve erkeklerde hemen hemen eşittir bu durum olasılıkla, yıllar içinde sigara içiminin cinsiyet ayrımı gözetmemesi yönünde değişen paterninin kliniğe yansımasıdır (3,9). KOAH gelişme riski ile sosyoekonomik düzey arasında ters orantılı bir ilişki olduğuna dair bulgular da mevcuttur (10).

Çocukluk çağında sık ve şiddetli geçirilen solunum yolu enfeksiyonları, akciğer solunum fonksiyon parametrelerinde azalmaya ve yetişkin çağda solunumsal semptomlara neden olabilir (1). Özellikle respiratuvar sinsitiyal



virüs ve adenovirüsün, yetişkin dönemde kronik solunumsal semptomlara ve akciğer fonksiyonlarında anormalliklere neden olduğu gösterilmiştir (11).

#### **II.1.4. Patoloji**

KOAH'taki karakteristik patolojik değişiklikler proksimal havayollarında, periferik hava yollarında, akciğer parankiminde ve damarlarında meydana gelmektedir (12).

Patolojik değişiklikler akciğerin değişik bölümlerindeki spesifik inflamatuvar hücrelerdeki artış ile karakterize kronik inflamasyonu ve bu inflamasyon ile birlikte tekrarlayan yıkım ve onarım sonucu oluşan yapısal değişiklikleri içerir. KOAH hastalarının solunum yollarındaki inflamasyon; sigara dumanı gibi kronik iritanlara, solunum yollarının normal inflamatuvar yanıtının aşırı artışından oluşuyor gibi görünmektedir. Bu artışın mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır (1).

Bazı kişilerde sigara içicisi olmadığı halde KOAH gelişmektedir, bu hastalardaki inflamatuvar yanıtın doğası bilinmemektedir (13). Akciğerdeki inflamasyon, oksidatif stres ve akciğerdeki proteinaz artışı ile birlikte daha da artmaktadır. Bu mekanizmalar KOAH'taki karakteristik patolojik değişikliklere öncülük etmektedir. İnflamasyonun ve periferik hava yollarının daralmasının en önemli sonucu FEV<sub>1</sub>'de meydana gelen azalma iken, azalan gaz transferi amfizemin parankimal yıkımının sonucu ortaya çıkmaktadır (1).

FEV<sub>1</sub> ve 1. saniye zorlu ekspiratuvar hacminin, zorlu vital kapasiteye (FVC) (FEV<sub>1</sub>/FVC) oranında görülen azalma ve muhtemelen KOAH'ın karakteristiği olan FEV<sub>1</sub>'deki hızlı düşüş; akciğerlerdeki inflamasyonun, fibrozisin ve küçük hava yollarındaki eksudanın yoğunluğu ile ilişkilidir (14).

#### **II.1.5. Klinik özellikler ve tanı**

KOAH'ın karakteristik bulguları kronik ve ilerleyici dispne, öksürük ve balgam çıkarmaktır. Hastalarda hava akımı sınırlaması gelişmesinden önce uzun yıllar boyunca kronik öksürük ve balgam üretimi görülebilmektedir. Bu

durum sigara içenler ve KOAH için riskli olan diğer bireylerde hastalığın henüz büyük sağlık problemleri oluşturmadan tanınması için benzersiz bir fırsat yaratmaktadır. Tüm bu bulguların aksine KOAH, belirgin hava akımı sınırlaması, kronik öksürük ve balgam üretimi olmadan da gelişebilmektedir (1).

Hastalık tanısında semptomlar ve/veya risk faktörlerinin varlığı önemli olmakla beraber tanının spirometri ile doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca spirometri ile hastalığın şiddeti, seyri ve prognozu hakkında bilgi edinilebilmektedir. Spirometri tanı için gereklidir ve aynı zamanda KOAH'taki patolojik değişikliklerin şiddetinin tanımlanmasında yarar sağlamaktadır. Hastalığın şiddeti basit spirometrik sınıflandırmayla (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) GOLD evrelemesine göre dört dereceye ayrılır (Tablo1). Sınıflandırma için evrelere özel spirometrik eşik değerleri kullanılır (post-bronkodilatör FEV<sub>1</sub>/FVC oranı < 0.70 ya da FEV<sub>1</sub> < % 80, 50, ya da 30 ) (1).

**Tablo 1:** KOAH' ta spirometrik GOLD sınıflandırması (1).

I. Derece: HAFİF	FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70 FEV <sub>1</sub> ≥ % 80 üzeri
II. Derece: ORTA	FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70 50% ≤ FEV <sub>1</sub> < %80 arası
III. Derece: AĞIR	FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70 30% ≤ FEV <sub>1</sub> < % 50 arası
IV. Derece: ÇOK AĞIR	FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70 FEV <sub>1</sub> < %30

Randomize yapılan bir çalışmada post-bronkodilatör FEV<sub>1</sub>/FVC'nin, bütün yaş gruplarında 0,70'i aştığı bulunmuştur (15). Bronkodilatör testi sonrası FEV<sub>1</sub>/FVC ≤ 0,7 olması, tam olarak geri dönüşlü olmayan hava akımı kısıtlanmasının varlığını göstererek KOAH tanısını koydurur. KOAH'ın şiddeti post-bronkodilatör (pb) %FEV<sub>1</sub> düzeyine göre hafif (%80 üzeri), orta (%50-80 arası), ağır (%30-50 arası) ve çok ağır (%30 altında) olarak sınıflandırılmaktadır.

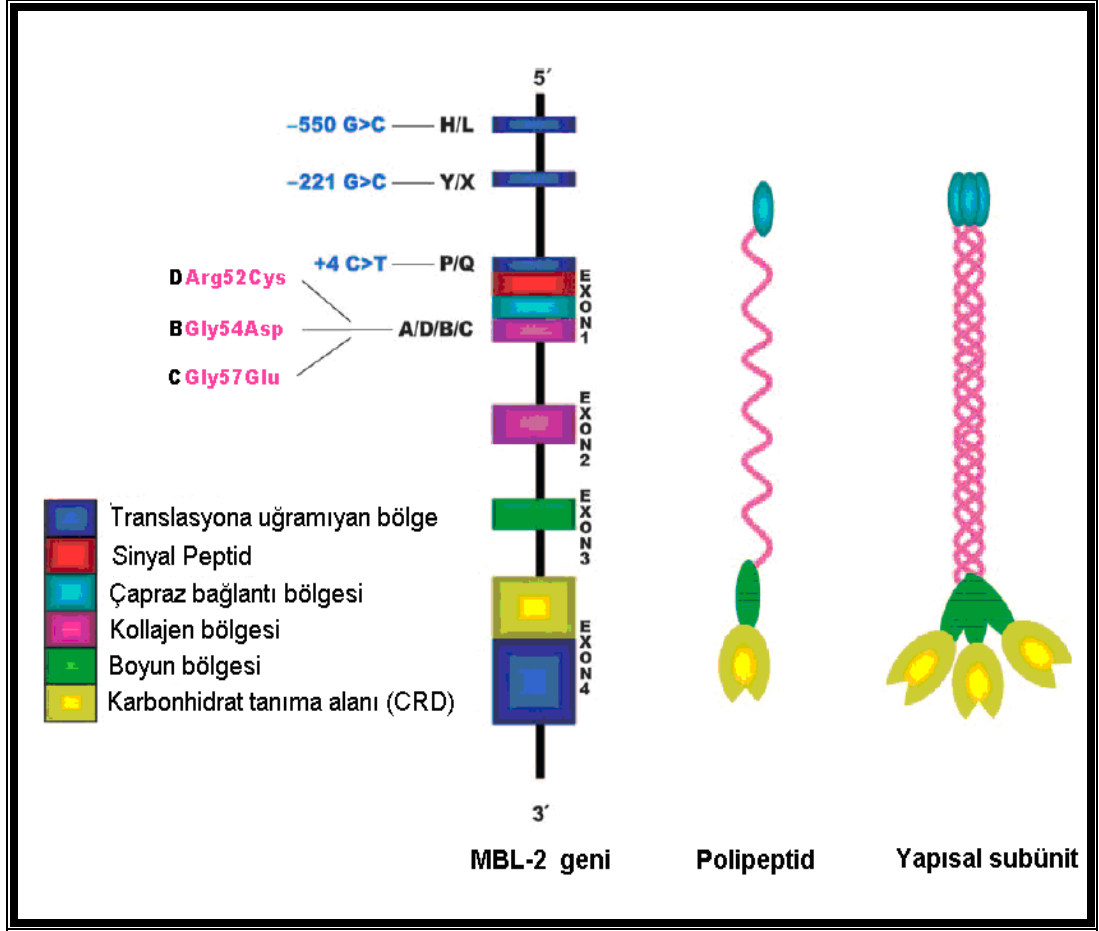
KOAH'ta semptomların akut alevlenmesine sık rastlanılmaktadır. Alevlenmeler, semptom artışından, solunum yetmezliği ve ölüme kadar değişen farklı ağırlık derecelerinde seyretmekte olup, KOAH'ta morbidite, mortalite ve progresyonun önemli nedenidir (16).

## **II.2.MBL**

MBL hem kollajen bölgeleri, hem de lektin alanları içeren ve kollektinler adı verilen protein ailesinin bir üyesidir. MBL'nin protein yapısı oldukça iyi araştırılmıştır (17). Diğer önde gelen kollektinler yapısal karakteristikleri MBL'ye benzeyen sürfaktan protein A ve sürfaktan protein D' dir. Sürfaktan protein A ve sürfaktan protein D' baskın olarak akciğerlerde ve diğer mukozal yüzeylerde bulunur. (18).

MBL hepatositler tarafından sentezlenen, karbonhidrat bağlayan bir proteindir. Patojenlerin hücre duvarlarındaki tekrarlayan mannozlara veya diğer oligosakkaridlere bağlanır (19-20). Mikroorganizmalara bağlanan MBL multimerlerinde konformasyonel değişiklikler meydana gelir (21). Aynı zamanda MBL bir akut faz reaktanıdır (21-22) ve inflamatuvar stimulusla üretimi artar (22). Yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylerde ortalama serum MBL konsantrasyonu 800-1000 ng/ml düzeyinde bulunmuştur (23).

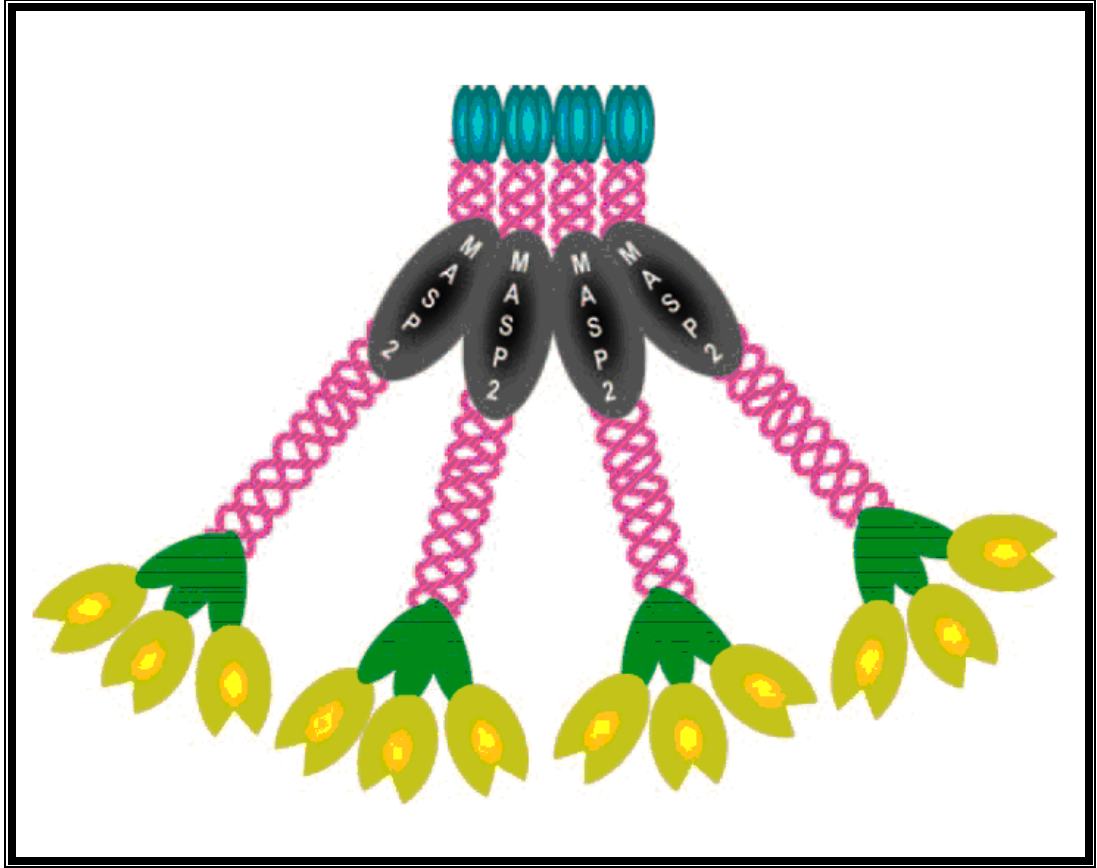
MBL proteini birbirinin aynısı polipeptit zincirlerinden oluşmuş 32 kD ağırlığında bir multimerdir. Her zincir MBL-2 geninin farklı exonları tarafından kodlanan dört ayrı bölge içerir (Şekil 1 ve 2) (17).



**Şekil 1:** İnsan MBL 2 geni ve kodladığı proteinin yapısı (17).

Her zincirin kalsiyum-bağlı “karbonhidrat tanıma alanı” (carbohydrate recognition domain: CRD) içeren C-terminal bölgesi, kısa bir  $\alpha$  helikal hidrofobik boyun bölgesi, kollajen bölgesi ve sisteinden zengin N-terminal bölgesi bulunur (24). Üç polipeptid zinciri kollajen bölgesinde, hidrofobik etkileşimler ve sisteinden zengin N-terminal bölgesindeki zincir içi disülfid bağları tarafından stabilize edilen üçlü bir heliks oluşturur(17).

Serumda MBL dimerden heksamere kadar değişen sayılarda oligomerlerden oluşur. Proteinin mikroorganizmalara etkili olarak bağlanma ve komplemanı aktive etme yeteneği tetramer ve daha yüksek sayıda oligomer varlığına bağlı görünmektedir (şekil 2)(17).



**Şekil 2:** Tetramer formundaki insan MBL'si. Yapısal subünitler N-terminal bölgesinde disülfid bağları ile çapraz bağlar oluşturmuştur. MASP-2 molekülünün her birinin kollajen bölgesindeki menteşe noktası yakınına bağlandığı düşünülmektedir (17).

Her biri CRD, bir kalsiyum iyonunu bağlar, bu durum mannoz, N asetil D glukozamin, N asetil mannozamin, fukoz ve glikoz gibi spesifik şekerlerin, 3- ve 4- hidroksil grupları ile koordinasyon bağı oluşturmasına imkan verir (25-27). Her yapısal subunitdeki üç CRD, birbirlerinden 45 Å'lik sabit bir aralık ile ayrılır (27). Yapısal subünitelerin kümeler halinde toplanması MBL'nin mikrobiyal yüzeylerdeki tekrarlayan şeker gruplarına bağlanmasına izin veren düz bir platform sağlar.

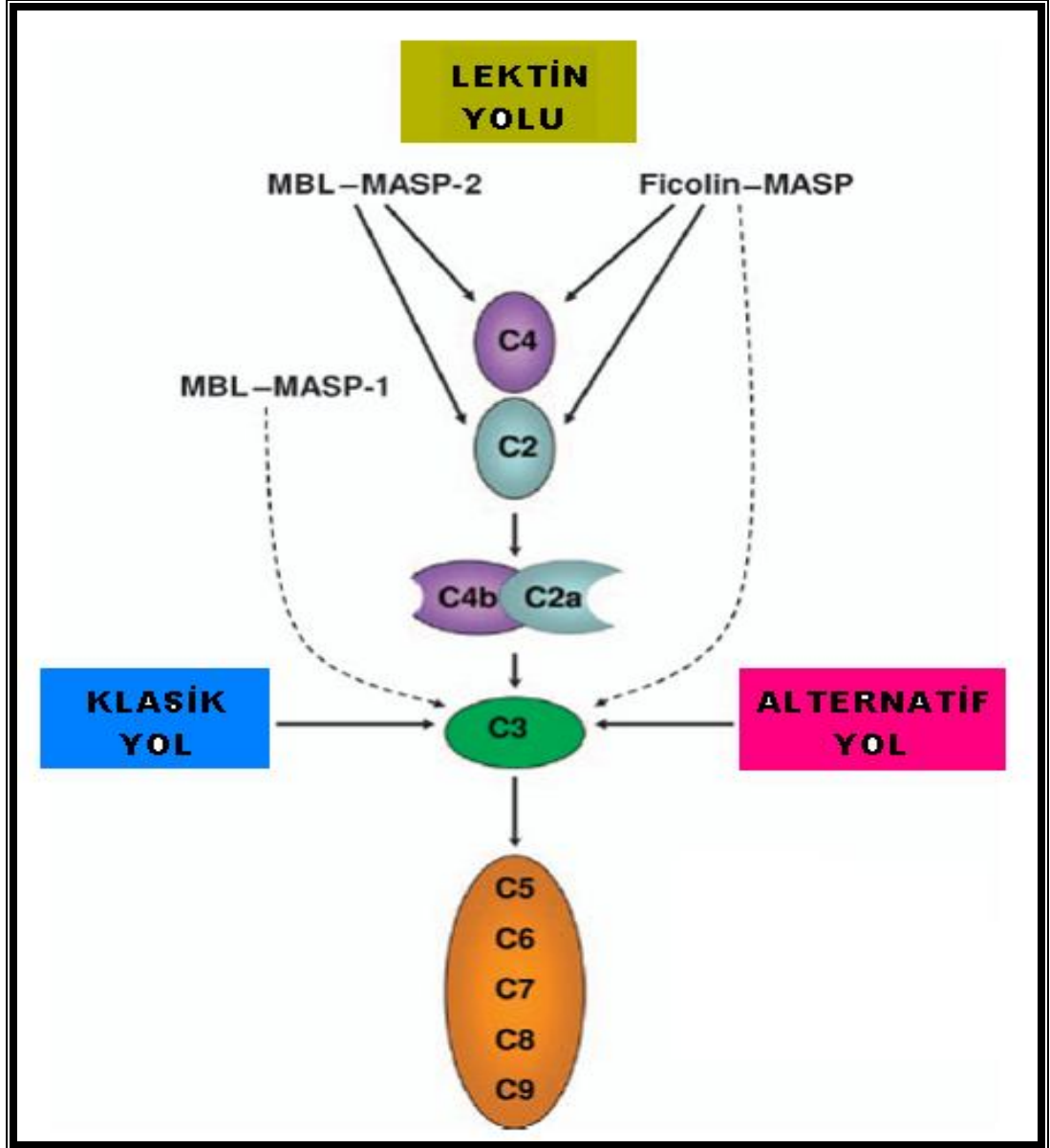
MBL, doğuştan olan bağışık sisteminin önemli bir örnek-tanım molekülüdür. Öncelikle, organizmanın kendine ait olanla, olmayanı ayırmasını sağlamak için, mikroorganizmaların yüzeyindeki özel şeker

gruplarını tanıır ve bağlanır. Aynı zamanda fosfolipitler, nükleik asitler ve glikolize olmayan proteinlere de bağlanabilir (28). MBL'nin, bakteriler, virüsler, mantarlar ve tek hücreli canlıların oluşturduğu geniş bir alanda seçicilik göstermeden rastgele bağlandığı gösterilmiştir(17).

MBL'nin konak savunmasında bir rolü bulunduğu ve komplemanın klasik yolunu aktive edebildiği ilk kez 1987'de Ikeda ve arkadaşları tarafından dile getirilmiştir (29). Günümüzde MBL'nin komplemanı antikordan ve C1'den bağımsız bir biçimde, çoğunlukla "MBL yolu" diye adlandırılan değişik bir üçüncü yol ile aktif hale getirdiği anlaşılmıştır (Şekil 3). Bu fonksiyonel aktivite, aslında MBL'nin dolaşımında bir grup "MBL-İlgili serin proteaz" (MBL-associated serine proteases: MASP) ile ilişkide olduğunu yansıtmaktadır(17).

1992'de, Matsushita ve Fujita serumda, klasik yol aktivasyonu ile ilişkili ve C3 konvertaz (C4bC2a) oluşturduğu düşünülen yeni bir kompleman enziminin varlığını göstermiştir (24). Daha sonra bu duruma MASP-2'nin aracılık ettiği bulunmuştur (30). Günümüzde orijinal enzimin MASP-1 olduğu ve C3'ü doğrudan aktif hale getirebildiği bilinmektedir. Sonradan, sMAP ya da Map19 olarak adlandırılan, MASP-2'in küçük ve ayrı olarak sentezlenen bir parçası daha belirlenmiştir (31,32), ayrıca fonksiyonu bilinmeyen üçüncü bir MASP (MASP-3) tanımlanmıştır (33).

1968'de, Miller ve arkadaşları yinelenen ağır enfeksiyonları, gelişme geriliği ve ishali olan bir çocukta, plazmada fagositozla ilgili bir kusur olduğunu bildirmişlerdir (34). Ekmek mayası ile yapılan invitro çalışmalar çocuğun plazmasında bir opsonizasyon yetersizliği olduğunu göstermiştir. 1981'deki çalışmalar serumda maya yüzeylerinde daha az C3b biriktiğini göstererek opsonizasyon eksikliğinin kompleman sisteminden kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır (35). Ancak 1989'da opsonik defektin düşük mannose-binding protein düzeyleri ile ilişkisi bulunmuş (36) ve aynı yıl MBL geni keşfedilmiştir (37,38).



**Şekil 3:** Komplemanın aktivasyon yolları ve MBL'nin komplemanı lektin yolu ile aktivasyonu (17).

MBL, 10. kromozomdaki MBL2 geni tarafından kodlanmaktadır (21). MBL geni "kromozom 10q11.2–21" bölgesinde olup ve 4 ekzonu mevcuttur (39). Exon-1, sinyali peptidi, sisteinden zengin N-terminal bölgesini ve glisinden zengin kollajen bölgesinin bir kısmını kodlamaktadır. Exon-2, kollajen bölgesinin kalan kısmını kodlarken, Exon-3 "boyun" bölgesi olarak bilinen kıvrımlı helical yapıyı kodlar. Exon-4 ise küresel biçimli CRD' yi kodlar.

MBL geninin “promoter” bölgesi, MBL proteinin kopyalanmasını etkileyen birtakım düzenleyici öğeleri içermektedir (17) (Şekil 1).

Serum MBL konsantrasyonunu etkileyen 5 adet tek nükleotid polimorfizmi mevcuttur (40). MBL geninde exon 1 bölgesinde 52, 54 ve 57. kodonlarda meydana gelen ve sırasıyla D, B ve C varyantları olarak adlandırılan nokta mutasyonların düşük MBL düzeylerine neden olduğu bilinmektedir (41). Bu mutasyonlar, amino asit yer değiştirmelerine neden olarak proteinin normal yapısının bozulmasına ve bunun sonucunda da MBL’de enzimatik bozunma ve fonksiyonel eksikliğe yol açarlar (42).

Varyant alleler nedeniyle, serum MBL düzeyleri düşmektedir. Normal allel A olarak isimlendirilir. Kodon 54’de glisinle aspartik asidin yer değiştirmesi sonucu meydana gelen varyant allel B; Kodon 57’de glutamik asidin glisinle yer değiştirmesi sonucu meydana gelen varyant allel C, Kodon 52’deki arjininle sisteinin yer değiştirmesi sonucu meydana gelen varyant allel D olarak isimlendirilmektedir (43,44).

MBL-2 geninin “promoter” bölgesindeki –221 ve –550 pozisyonundaki varyantların serum MBL konsantrasyonuna önemli bir etkisi vardır. Y ve H genotipleri yüksek MBL aktivitesi gösterirken ve X ve L genotipleri düşük MBL aktivitesi gösterir (41). HY, LY ve LX haplotiplerinin sırasıyla yüksek, orta ve düşük plazma MBL düzeyleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (44).

### **II.3.TLR**

TLR ailesi bakteriler, virüsler, mantarlar ve tek hücreli canlıları kapsayan patojenlerin moleküler paternlerini tanıyan reseptörlerin büyük bir sınıfını oluşturmaktadır (45).

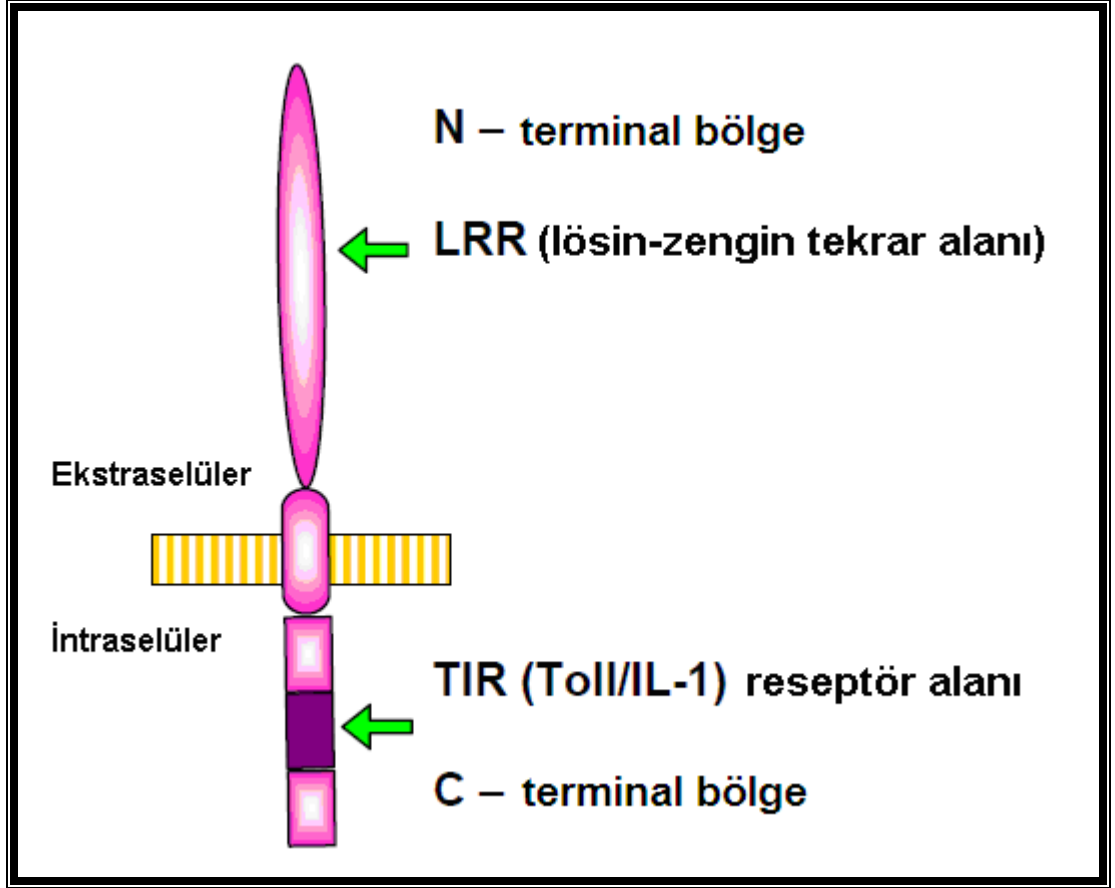
Memelilerde patojenik enfeksiyonlara karşı koruyucu bağışıklık, doğuştan olan ve kazanılmış bağışıklık olarak ikiye bölünmüştür. Doğuştan olan bağışık yanıt, ev sahibinde bir ilk savunma engeli olarak gelişmiştir ve nonspesifik bağışık yanıttır; görevi acil olarak istilacıları hızlıca yok etmek veya sınırlamaktır (46).



Kazanılmış bağışıklık; T (Hücrese) ve B (Humoral) hücrelerinin aracılık ettiği bağışık yanıtları kapsayan bir ikinci hat savunmasıdır. Bu bağışıklık spesifiktir, sadece patojenleri hedefler ve tekrar enfeksiyonlarına karşı uzun bir bağışıklık hafızasına sahiptir.

Antijenik uyarım sonrası T hücreleri; antijen affinitesine, immun sinapstaki co-sitimülasyona ve ortamdaki sitokine bağlı olarak T helper tip 1 (Th1), T helper tip 2 (Th2) ya da düzenleyici T hücrelerine farklılaşır. Th1 hücreleri, hem intraselüler enfeksiyonları kontrol ederler, hem de inflamatuvar hastalıklarla da ilişkilidirler. Th2 hücreleri ise extraselüler parazit enfeksiyonlarına karşı ev sahibini korurken aynı zamanda alerjik yanıtlar için de sorumludurlar (47-48).

Bir patojenin doğuştan ve kazanılmış bağışık yanıtı nasıl tetiklediği ve T hücre farklılaşmasını ve fonksiyonunu neyin belirlediği her zaman immunologlar için ilgi odağı olmuştur TLR'in tanımlanması bu alana yeni cevaplar getirmiştir (46). İnterlökin 1 (IL-1) reseptörler süper ailesine ait proteinlerin bir grubu olan insan TLR'leri, tip 1 transmembran proteindir ve yapısı; bir extraselüler lösin-zengin tekrar alanı (leucine-rich repeat: LRR) ve bir intraselüler karboksi-terminal Toll/IL-1 reseptör (TIR) alanı ile karakterizedir (49-50) (Şekil 4).



**Şekil 4:** İnsan TLR' sinin yapısı (50).

Toll ilk olarak, *Drosophila*'da meyve sineklerinde fungal enfeksiyona karşı konak savunmasının parçası olarak tanımlanmıştır (51). Şimdiye kadar insanlarda en azından 11 tane TLR keşfedilmiş (Tablo 2) ve bunlar doğuştan olan bağışık yanıtın major başlatıcısı olarak ayrıntılı olarak incelenmiştir (52-53). Bununla birlikte TLR'nin doğrudan veya dolaylı olarak özellikle T hücre fonksiyonları aracılığı ile kazanılmış bağışık yanıtını da uyardığı gösterilmiştir (54).

TLR	LİGAND
TLR1	Soluble factors of <i>Neisseria meningitidis</i> cell wall
	Triacylated lipopeptides (G+, G- bacteria), 19 kDa lipoprotein (mycobacteria)
	Lipoarabinomannan (mycobacterial cell wall)
	Outer-surface protein – OspA ( <i>Borrelia burgdorferi</i> )
TLR2	Peptidoglycan, lipoteichoic acids (G+ bacteria)
	Phenol-soluble modulín ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )
	Di- and triacylated lipopeptides, lipoproteins (many pathogens)
	Outer-membrane porins ( <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>H. pylori</i> )
	Outer-surface protein – OspA ( <i>Borrelia burgdorferi</i> )
	Lipoarabinomannan (mycobacterial cell wall glycolipid)
	Zymosan (yeast)
	Protozoan cell membrane glycolipids ( <i>Trypanosoma cruzi</i> )
	Wild-type H protein (measles virus)
	HSV-1, CMV envelope proteins
Atypical LSP ( <i>L. interrogans</i> , <i>P. gingivalis</i> )	
Host HSP70	
TLR3	Viral and host double-stranded RNA (dsRNA)
	Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C))
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS) – G- bacteria
	Fusion protein of RSV (respiratory syncytial virus)
	Murine mammary tumour virus (MMTV)
	Moloney murine leukaemia virus (MMLV)
	Taxol (plant antitumour agent)
	Extravascular fibrinogen/fibrin (host)
	Oligosaccharide fragments of hyaluronan (host)
Extra domain A of fibronectin (host)	
TLR5	Polysaccharide fragments of heparan sulphate (host)
	Heat-shock protein 60 – HSP60 (host, <i>Ch. pneumoniae</i> )
	Heat-shock protein 70 – HSP70 (host)
	Flagellin
	Diacylated lipopeptides ( <i>Mycoplasma fermentans</i> )
TLR6	Zymosan (yeast)
	Imidazoquinolines (imiquimod, resiquimod, loxoribine, bropirimine)
TLR7	Viral single-stranded RNA (ssRNA) (influenza virus, vesicular stomatitis virus)
TLR8	Guanosine and uridine-rich ssRNA oligonucleotides (HIV-1)
	Unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (bacteria)
TLR9	Viral genomic DNA (HSV-2)
	TLR10 ???
TLR11	Uropathogenic bacteria. <i>Toxoplasma gondii</i>

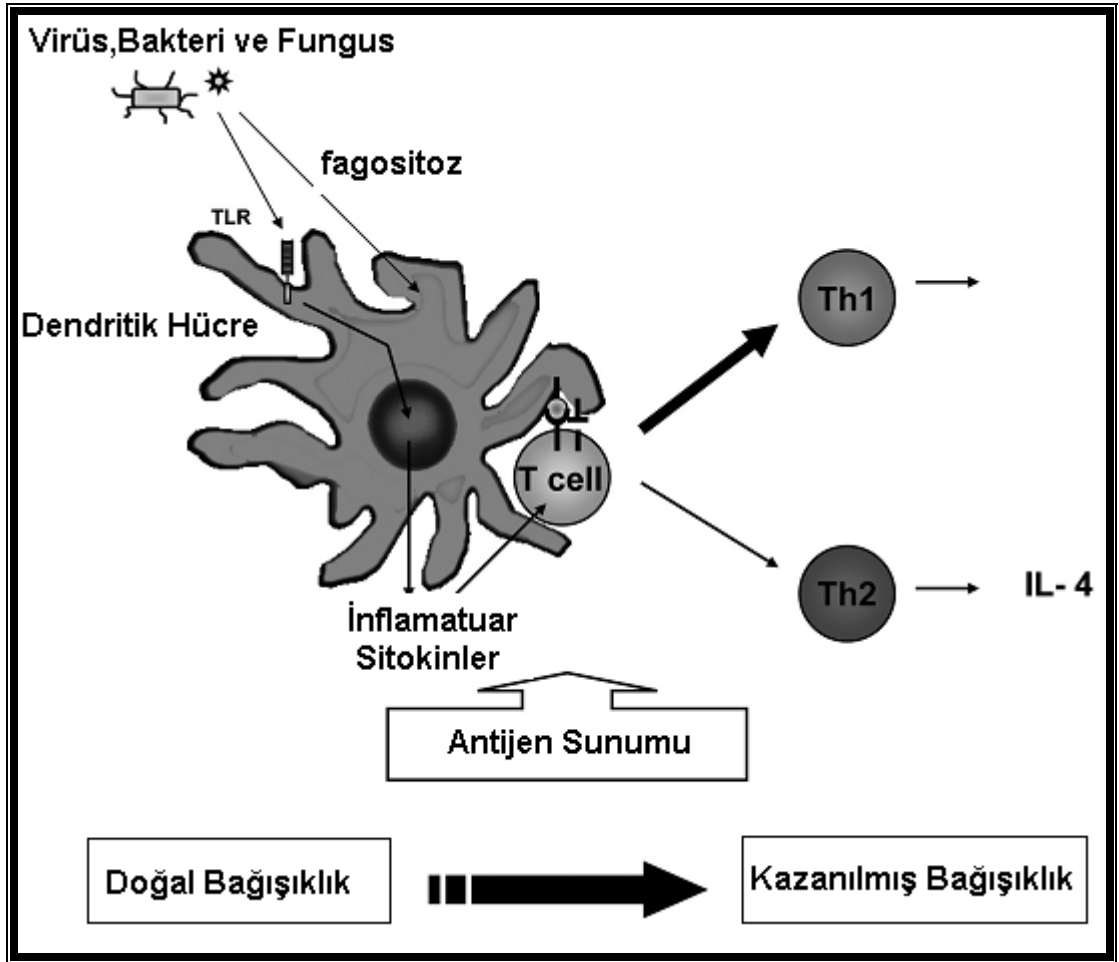
**Tablo 2:** TLR' ler ve ligandları (50).

Doğal bağışıklığın hücreleri gram negatif bakterilerin lipopolisakkarit kısımları gibi mikrobiyal komponentler tarafından aktive edilen makrofajlar ve dendritik hücrelerden oluşur (55). Doğuştan olan bağışıklığın aktif hale gelmesi, antijene spesifik kazanılmış bağışıklığın gelişmesinde önemli bir adımdır (55). Doğuştan olan bağışık sistemde patojenlere ilk yanıt, organizmaların geniş bir kesiminde bulunan ve PAMP'ları bağlayan "pattern tanıyıcı reseptörler" (Pattern Recognition Receptors: PRR) tarafından başlatılmaktadır (55). Geniş bir çeşitlik ve karmaşık varyasyonlar gösteren PAMP'ları büyük bir seçicilikle tanıyan TLR'ler PRR'lerin en önemli ailesini oluşturmaktadır (55).

Kromozomal yerleşmesi, genomik yapısı ve amino asit sıralaması temel alınarak, insan TLR'leri beş gruba ayrılabilir: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, ve TLR9 (50). TLR2 grubu; TLR1, TLR2, TLR6 ve TLR10'nu içerir, TLR9 grubu ise TLR7, TLR8 ve TLR9'dan oluşmaktadır. TLR3, TLR4, ve TLR5 grupları ise sadece birer üyeden oluşmaktadır (50).

Üzerinde en çok çalışılan TLR'den birisi olan TLR2 gram-pozitif bakterilerden kaynaklanan lipoproteinler, lipopeptidler, peptidoglikanlar ve lipoteikoik asidi içeren PAMP'leri tanır (55). TLR2 aynı zamanda mikobakteriden kaynaklanan lipoarabinomannanı (56), *Staphylococcus*'tan kaynaklanan fenol-soluble modulin'ni (57), fungus'tan kaynaklanan zymosan'ı (58) ve *Trypanosoma cruzi*'den kaynaklanan glikozilfosfatidilinositol'u (59) tanır. Fungusların tanınması; aktivasyonu  $\beta$ -glukan ligandlar tarafından arttırılan lektin reseptör ailesinin üyeleriyle TLR2'nin işbirliğini gerektirebilir (60). Şaşırtıcı şekilde, TLR2 ekspresyonu ve aktivitesinin, tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve glukokortikoidler gibi pro- ve anti-inflamatuvar moleküllerin işbirliği ile düzenlendiği gösterilmiştir (61). TLR, PAMP ile bağlandığında, intrasitoplazmik domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olmaktadır. Bunun sonucu olarak antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler sentezlenmektedir. Dendritik hücrelerin maturasyonu ve antijen sunum kapasitesindeki artışla da doğal bağışık yanıt, kazanılmış bağışık yanıtı uyarmaktadır (62).

Enfeksiyonları önlemek için doğal bağışık yanıt, TLR'ler ve antijen sunumu aracılığı ile kazanılmış bağışıklık sürecini aktive eder (55). TLR'ler ile patojenleri tanıyıp fagosite eden dendritik hücreler ve makrofajlar; sitokin salgılayıp ve major histokompatibilite kompleks (MHC) aracılığıyla da antijen sunmaktadır (55). T hücreleri kazanılmış bağışık yanıtın düzenlenmesinde sitokinler ve antijen sunumu aracılığı ile aktive olur ve Th1 ya da Th2 hücrelerine farklılaşmaktadır (55) (Şekil 5).



**Şekil 5:** TLR'nin doğal ve kazanılmış bağışık yanıtındaki rolü (55).

## II.4.CD4 –CD-8

Kazanılmış bağışıklığın primer kan hücreleri T ve B lenfositleridir. T ve B hücreleri yüzeylerindeki antijen-spesifik reseptörleri sayesinde hedef antijenleri için benzersiz özgüllük sağlarlar (63). T hücrelerinin antijenik peptidleri tanımaları için, bu peptidlerin hücre yüzey proteinleri MHC sınıf I veya sınıf II kapsamında sunulmalıdır (64).

T lenfositleri periferik kandaki lenfositlerin çoğunluğunu oluşturur ve yüzeylerindeki T hücre reseptör (T cell receptor: TCR) molekülleriyle kolaylıkla tanınırlar (63).  $\alpha\beta$  TCR molekülleri MHC sınıf I veya sınıf II proteinleri kapsamında sunulan antijenlere özgü peptidleri tanır. T hücreleri yüzeyindeki  $\alpha\beta$  TCR molekülleri ile kendi içlerinde CD4+ T hücreleri ve CD8+ T hücrelerini içeren değişik alt gruplara ayrılır. CD4+ T hücreleri hücrel ve humoral bağışık yanıtın düzenlenmesinde aktif rol oynar. Diğer grup olan CD8+ T hücreleri intraselüler patojenlerle enfekte hücrelere karşı sitotoksik etkilidir (63).

Kazanılmış bağışıklıkta en az iki tip 'memory T' hücresi aktiftir. Bunlardan 'effector memory' hücreleri kısa ömürlüdürler ve agresif biçimde hedef dokuya göç ederek patojeni yok ederler. Adına 'central memory' hücreler denen diğer alt grup T hücreleri immunolojik hafızada görevlidir ve patojenlerin girebildiği çevrelere göçme paternlerine sahiptirler (65).

T hücreleri henüz timustayken CD4 ya da CD8 hücre yüzey markırı eksprese eden T hücre alt guruplarına ayrılır. İlk önce fenotipik olarak tanımlanan bu hücre guruplarının fonksiyonları daha sonra anlaşılmıştır. Başlangıçta bu T hücreleri 'helper' (CD4) hücreler ve 'süpresör' (CD8) hücreler olarak düşünülürken daha sonra CD8 hücreleri 'sitotoksik' T hücreleri olarak tanımlanmıştır (66).

CD4+ ve CD8+ molekülleri, T hücreleri ve antijen sunan hücreler (antigens presenting cells: APC) arasındaki etkileşimde koreseptörler olarak hizmet eder. Yüzeylerinde CD4+ molekülleri taşıyan T hücreleri yüzeylerinde sınıf II molekülleri taşıyan APC'lere bağlanır ve T hücresi ile APC'nin arasındaki etkileşimi stabilize etme görevini görür. CD8+ molekülleri de sınıf I

molekülleri taşıyan APC'lere bağlanır ve CD8 T hücresi ile APC'nin arasındaki etkileşimi stabilize etme görevini üstlenir (63).

Nativ CD4'+ veya CD8+ T hücreleri, APC tarafından aktif hale getirildiği zaman, değişik fonksiyonlara sahip farklı alt kümelere farklılaşmaya maruz kalırlar (68). CD4+ T hücrelerinin sitokin salgılayan APC'ler tarafından oluşturulan başlıca iki alt kümesi vardır:Th1 ve Th2 (63).

Th1 hücreleri APC'nin IL-2 salgılamasıyla oluşur. T hücreleri, yüksek düzeyde interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ve IL-2 üreten "efektör" hücrelerine farklılaşır. Th1, makrofajları ve sitotoksik T hücrelerini aktif hale getirmekte etkin olan sitokinler INF- $\gamma$  ve TNF- $\beta$ 'yı üreterek hücrel bağışıklık sistemine destek olur (68).

Buna karşın nativ CD4+ T hücreleri IL-4 salınımını stümüle eden dendritik hücreler (DC) tarafından aktive edilerek Th2 olarak adlandırılan "efektör" T hücrelerine farklılaşır. Th2 hücrelerinin aktivasyonu humoral bağışık yanıtın gelişmesini destekler (68). Th2 lenfositleri B lenfositlerinin antikor üreten formuna farklılaşmasına ve aktive olarak antikor üretmesine etkileri olan IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 'ü sekrete ederler (63).

CD4+ T hücrelerinin başka bir ailesi olan ve "Treg" diye adlandırılan hücrelerin diğer T lenfositlerin yanıtlarını baskıladığı yakın zamanda gösterilmiştir (69).

### III. GEREÇ VE YÖNTEM

#### III.1. Araç ve Gereçler

<b>Santrifüj</b>	Hettich Rotina 35 R / Soğutmalı (Germany) Hettich mikro 200 / Soğutmalı (Germany)
<b>Otomatik pipetler</b>	Socorex Acura 825 (Switzerland)
<b>Derin dondurucu</b>	Nuaire Ultralow Freezer (-80°C)
<b>Derin dondurucu</b>	Vestel Lotus 465 HGE A (-20°C)(Türkiye)
<b>Vorteks</b>	Yellowline (USA)
<b>Benmari:</b>	Nüve BM 402 (0-99°C) (Türkiye)
<b>Elisa okuyucu</b>	Biotek ELx800 (Biotek Instruments.USA)
<b>Flow Sitometri</b>	Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA)
<b>RT-PCR</b>	LightCycler 1.5 (Roche, Switzerland)

#### III.2. Yöntem

##### III.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

**Grup 1:** KOAH tanısı almış sigara içmeyen hastalar

**Grup 2:** KOAH tanısı almış aktif sigara içenler

**Grup 3:** Sigara içen solunum fonksiyon testi normal olan sağlıklı gönüllü bireyler

**Grup 4:** Kontrol Grubu, sigara içmeyen tamamen sağlıklı gönüllü bireyler, çalışma gruplarımızı oluşturmuştur



### **III.2.2. Çalışma Düzeni**

Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı ile birlikte yürütülmüştür. Çalışmada olgularımız 4 grupta incelenmiştir. Grup 1'de KOAH tanısı almış ve sigara içmeyen 20 kişi (50-80 yaş), Grup 2'de KOAH tanısı almış ve aktif sigara içen 20 kişi (24-75 yaş), Grup 3'de sigara içen solunum fonksiyon testi normal olan gönüllülerden 20 kişi (21-46 yaş) ve Grup 4'de de sağlıklı gönüllülerden oluşan 20 kişi (31-61 yaş) kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Hastalar, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran kişilerden seçildi. KOAH hastalarından stabil dönemdekiler çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamızda dışlanma kriteri olarak enfektif alevlenme atağı geçirenler, sistemik steroid tedavisi alanlar ve başka sistemik hastalığı ya da enfeksiyonu olanlar çalışma dışında bırakılmıştır. Tüm hasta grupları ve kontrol grubundan çalışmanın başında toplam 1 kez kan örneği [1 adet antikoagülan içermeyen tüp, 1 adet etilen diammin tetra asetik asit (EDTA) içeren tüp] alındı. GRUP 1, 2 ve 3'e Göğüs Hastalıkları Polikliniğinde solunum fonksiyon testi uygulanmıştır. Antikoagülan içermeyen tüpe alınan kan örneğinden serum MBL analizi, EDTA içeren tüpe alınan kan örneğinden ise MBL polimorfizm analizi, serum CD4, CD8 düzeyleri ve CD14+ monositlerdeki TLR 2 düzeyleri incelenmiştir.

Tüm katılımcılar, çalışma konusunda bilgilendirilerek kendilerine rızalarının alındığına dair bilgilendirilmiş onay formları imzalatılmıştır. Çalışma yerel etik kurul onayı alındıktan sonra başlatılmıştır.

### **III.2.3. Solunum Fonksiyon Testi**

Solunum fonksiyon testleri Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğinde; Master Scope marka spirometri cihazı ve Teknikel firmasının Lab Maneger bilgisayar yazılımı ile hasta guruplarına tek bir uygulayıcı tarafından uygulanmıştır.

### **III.2.4. Kan Örneklerinin Alınması**

Tüm hasta grupları ve kontrol grubundan çalışma başlangıcında bir kez olmak üzere 1 adet antikoagülan içermeyen tüpe, 1 adet EDTA içeren tüpe olmak üzere toplam 2 tüp venöz kan örneği alındı. Düz kan örnekleri, 30 dakika içerisinde + 4°C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve serum örnekleri toplu olarak MBL analizi yapılmak üzere ependorf tüplerine ayrılarak -80°C'de saklandı. Tam kan örneklerinden ise aynı gün içinde en kısa sürede lökosit CD4+, CD8+ T lenfosit alt grupları ve CD14+ monositlerdeki TLR2 ekspresyonu flow sitometri yöntemi ile çalışıldı. Kalan EDTA'lı kan örnekleri -20 °C'de biriktirildikten sonra lökosit genomik DNA'sı, hazır DNA ekstraksiyon kiti ile ayrılıp daha sonra real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği ile MBL genotipi çalışılmak üzere -20 °C'de saklandı.

### **III.2.5. MBL Polimorfizimi**

#### **III.2.5.1. DNA Ekstraksiyon İşlemi**

Hasta örneklerinden lökosit genomik DNA'sının ekstraksiyonunda hazır ticari "High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)" kullanıldı. Ekstraksiyon kanı olarak EDTA'lı vakumlu tüplere alınmış ve -20 °C'de saklanmış kan örnekleri kullanıldı. Ekstraksiyon işleminin basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Kit içinden çıkan liyofilize Proteinaz K, 4,5 ml distile su eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.
2. İnhibitör Removal Buffer içine 20 ml etanol eklenerek ve Wash Buffer içine 80 ml etanol eklenerek kullanıma hazırlandı.
3. 1,5 ml'lik ependorf tüplerine 200 µl kan örneği konuldu.
4. Örnekler üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K eklenerek iyice karıştırıldı ve 72 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. Her tüpe 100 µl isopropanol eklenip pipetle karıştırıldı.

6. Örnek sayısı kadar kolektör tüp içine filtre tüpü yerleştirildi
7. Hazırlanan örnekler kolektör tüplere aktararak 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi ve kolektör tüpler atılarak filtreli tüpler yeni kolektör tüplere aktarıldı.
8. Yeni kolektör tüplerin her birine 500 µl İnhibitör Removal Buffer eklenip 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi ve kolektör tüpler atılarak filtreli tüpler yeni kolektör tüplere aktarıldı.
9. Her tüpe 500 µl wash buffer eklenip 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi ve kolektör tüpler atılarak filtreli tüpler yeni kolektör tüplere aktarıldı.
10. Her tüpe 500 µl wash buffer eklenip 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi ve kolektör tüplerdeki sıvı dökülüp tekrar 13000 devirde 10 saniye santrifüj edildi.
11. Kolektör tüpleri atılarak filtreli tüpler 1,5 ml'lik ependorf tüplerine konuldu.
12. Her tüpe önceden ependorf tüplerine bölünerek hazırlanmış ve 72 °C'de bekleyen elution buffer'dan 200 µl eklenip 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
13. Filtre atılıp, tüpün dibine süzölmüş olan içinde DNA bulunan filtrat kullanıma hazır hale geldi. Ekstraksiyon sonrası DNA'lar numaralandırılarak -80°C' de RT-PCR işlemine kadar saklandı.

### **III.2.5.2. MBL Real Time PCR**

MBL polimorfizmi için hastalardan alınan EDTA'lı periferik kan örneklerinden ekstrakte edilen DNA 'lar kullanıldı. DNA örneklerinden RT-PCR tekniği kullanılarak MBL polimorfizmi tespit edildi.

Real-Time PCR tekniği için Roche Applied Science LightCycler 1.5 Instrument (Roche Instrument Center AG, Rotkreuz, Switzerland) cihazı ve LightCycler Software 3.5.3 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanıldı.

Çalışmada pozitif kontrol olarak Coriell DNA bankasından temin ettiğimiz (NA6993) heterozigot varyanta sahip olduğumu bildiğimiz bir DNA örneği kullanıldı. Böylece örneklerimiz ile pozitif kontrolümüzün verdiği melting piklerini karşılaştırarak elde edilen sonuçların MBL genine ait hangi varyantlar olduğunu saptandı.

RT-PCR primerleri olarak TIB MOLBIOL GmbH ( Eresburgstraße 22-23 D-12103 Berlin).firmasına yaptırılan pirimerler kullanıldı:

- MBP(Mannose binding lectin primeri)S. CATCAACGGCTTCCCAGGC
- MBP\_R: TGGGCTGGCAAGACAAGTATTAG
- Florasan Labeled probe: CAGCCCAACACGTACCTGGTTCCCCCT
- Anchor Probe: TTCTTCCTTGGTGCCATCACGCCCA

PCR master miksi, primerlerin her biri kapiller başına 0,5 pmol/µl (µM) olacak şekilde, probe konsantrasyonları 0,15 pmol/µl (µM) olacak şekilde, Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu 3mM olacak şekilde, LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics,Germany. Katalog no: 03 003 248001) enzim miksi 2µl konsantrasyonda olacak şekilde ve son reaksiyon hacmimiz 20 µl olacak şekilde ayarlanarak hazırlandı.

LightCycler protokolünde 95<sup>0</sup>C de 10 dakikalık bir pre-inkübasyonun ardından 45 siklus olacak şekilde; 95<sup>0</sup>C 10 saniye, 60<sup>0</sup>C 20 saniye, 72<sup>0</sup>C 15 saniye amplifikasyon programı uygulandı. 60<sup>0</sup>C de florometrik bir tek (single) okuma yaptırıldı. Ardından 1 siklus 95<sup>0</sup>C de 0 saniye, 40<sup>0</sup>C de 30 saniye ve 95<sup>0</sup>C de 0 saniye 0,1<sup>0</sup>C/saniye sıcaklık artışıyla sürekli (continuous) floresan okuma yaptırıldı. Son olarak da cihazı koruma amaçlı soğutma için 40<sup>0</sup>C de 30 saniye bekletildi.

Veriler LightCycler Software 3.5.3 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak olgularımızda A,B,C ve D allel varyantları değerlendirildi.

### **III.2.6. Serum MBL analizi.**

Serum MBL konsantrasyonları, enzim immün sorbant assay (ELISA) yöntemi ile hazır ticari "MBL Oligomer ELİSA Kit" (Bio Porto Diagnostics,

Gentofte, Denmark ) kullanılarak analiz edildi. Çalışmada negatif kontrol olarak içinde 1 ml'sinde <1 arbitrary unit (AU) değerinde MBL bulunan "MBL oligomer deficient serum" (Bio Porto Diagnostics, Gentofte, Denmark) ile pozitif kontrol olarak da 1 ml'sinde 1000 arbitrary unit (AU) değerinde MBL bulunan "MBL standart serum" (Bio Porto Diagnostics, Gentofte, Denmark) hazır kontrol serumları kullanıldı.

Kullandığımız kitin intra assay korelasyon katsayıları (CV) 2279 ng/ml konsantrasyonda CV: % 3,6 iken 28,4 ng/ml konsantrasyonda CV: % 3,8 olarak saptanmıştır. İnter assay korelasyon katsayıları ise 2310 ng/ml konsantrasyonda CV: % 9,2 ve 29,7 ng/ml konsantrasyonda CV: % 4,3 olarak saptanmıştır. Kitin çalışma aralığı <2 ng/ml ile 4443 ng/ml arasındadır.

Çalışmanın yıkama aşamaları Biotek ELx50 (Biotek Instruments, USA) otomatik ELISA yıkayıcıda yapılmış, örneklerin absorbansları Biotek ELx800 (Biotek Instruments, USA) otomatik mikropleyt okuyucu ile 450 nm'de okutulmuştur. Örnek absorbanslarından örnek konsantrasyonları KC junior bilgisayar programı ile hesaplanmıştır.

### **III.2.7. TLR 2**

CD 14 pozitif monositlerde TLR2 ekspresyonuna bakmak için BD Pharmingen Alexa Flour 488 Mouse Anti-Human CD 282 (BD Biosciences, USA) ve BD Pharmingen PE Mouse Anti-Human CD 14 (BD Biosciences, USA) antikoları kullanıldı. Negatif kontrol olarak BD Pharmingen Alexa Flour 488 Mouse IgG1  $\kappa$  Isotype Control (BD Biosciences, USA) ve BD Pharmingen PE Mouse IgG2a  $\kappa$  Isotype Control (BD Biosciences, USA) kullanıldı.

Hastalara ait tam kan örneklerindeki eritrositler Immunoprep Reagent System (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA) reaktifleri kullanılarak, Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA) cihazında lizis edilerek, örnekler flow sitometri cihazında çalışmak üzere hazırlandı.

Antikor ve negatif kontrol eklenmiş EDTA'lı tam kan örnekleri ön işlem tamamlandıktan sonra Cytomics FC 500 (Beckman CoulterInc. Fullerton, CA,

USA) flow sitometri cihazında analiz edildi. Elde edilen verilerin analizi CXP Cytometer 2.2 (Beckman CoulterInc. Fullerton, CA, USA) bilgisayar yazılımı kullanılarak yorumlandı.

### **III.2.8. CD 4, CD 8**

Hastalara ait EDTA'lı tam kan örneklerinde CD4+ ve CD8+ T lenfosit oranına bakmak için IO Test CD4-FITC/CD8-PE (Immunotech SAS, Beckman Coulter Company ,Marsille Cedex, France) antikorları kullanıldı. Negatif kontrol olarak CD4/CD8 kombine kontrol IgG1 FITC/PE/PC5 (Immunotech SAS, Beckman Coulter Company, Marsille Cedex, France) izotipik kontrol kullanıldı.

Hastalara ait tam kan örneklerindeki eritrositler Immunoprep Reagent System (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA) reaktifleri kullanılarak, Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA) cihazında lizis edilerek, örnekler flow sitometri cihazında çalışmak üzere hazırlandı.

Antikor ve negatif kontrol eklenmiş kan örnekleri ön işlem tamamlandıktan sonra Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA) flow sitometri cihazında çalışıldı. Elde edilen verilerin analizi CXP Cytometer 2.2 (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA) bilgisayar yazılımı ile yapıldı.

### **III.3. İstatistiksel Analiz**

Çalışmanın istatikselsel analizinde SPSS 10.0 paket programı kullanıldı. Parametrelere ait verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında; tek yönlü varyans analizi (oneway ANOVA) testi ve farklılığa neden olan grubun saptanmasında Post Hoc karşılaştırma (least significant difference) LSD testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Ki-Kare parametreler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde ise Pearson korelasyon testi kullanıldı. Grupların MBL genotipi ile MBL düzeyi arasındaki ilişki lojistik regresyon analizi ile Odds oranları (OR) ve %95 güven aralıkları (CI) hesaplanarak değerlendirildi.

#### IV. BULGULAR

Çalışmaya aldığımız olguların çalışma başlangıcındaki demografik bilgileri ve yapılan solunum fonksiyon testi sonucu elde edilen değerleri Tablo 3'de verilmiştir. Grup 1 hastalarında yaş aralığı 50-80 yaş, Grup 2 hastalarında 24-75 yaş, Grup 3 olgularında 21-46 yaş ve Grup 4'de 31-61 yaş olarak saptanmıştır.

**Tablo 3:** Olguların bazal demografik ve spirometrik bulguları.

	Grup 1 KOA (n=20)	Grup 2 Sigara + KOA (n=20)	Grup 3 Sigara (n=20)	Grup 4 Kontrol (n=20)	p değeri
Yaş (yıl)*	64,6±7,4	58,6±12	29,7±7,2	47,4±6,3	<0,001
Cinsiyet(K/E)	2/18	0/20	9/11	10/10	-
Sigara* (paket/yıl)	0	52,2±24,7	11,9±10,4	0	<0,001
FEV <sub>1</sub> (%)*	52,05±17,7	52,55±19,3	100,20±8,1	-	<0,001
FEV <sub>1</sub> ( L)*	1,50±0,57	1,68±0,76	3,73±1,12	-	<0,001
FVC (%)*	67,7±17,3	70,6±21,7	103,5±10,4	-	<0,001
FVC (L)*	2,46±0,74	2,80±1,01	4,40±1,07	-	<0,001
FEV <sub>1</sub> / FVC*	58,08±12,5	56,87±11,06	82,24±6,30	-	<0,001

\*Değerler mean ± Standard deviasyon (SD) olarak verilmiştir.

\*\*p< 0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızdaki hasta gruplarından Grup 1 ve Grup 2 deki KOAH hastalarının GOLD sınıflamasına göre yapılan klinik evrelemesi Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4:** KOAH hastalarının GOLD sınıflamasına göre dağılımı.

GOLD sınıflaması	Grup 1	Grup 2
	KOAH(n=20)	Sigara +KOAH(n=20)
GOLD I FEV <sub>1</sub> ≥ % 80	2	1
GOLD II 50% ≤ FEV <sub>1</sub> < %80	10	12
GOLD III 30% ≤ FEV <sub>1</sub> < % 50	15	5
GOLD IV FEV <sub>1</sub> < %30	3	4

1. Ki kare testi ile grupların kadın, erkek oranları birbirinden farklı bulunmuştur (p<0,001)
2. Tek yönlü varyans analizi (oneway ANOVA) ve Post Hoc karşılaştırma testi (least significant difference) LSD ile tüm grupların yaşları birbirinden farklı bulunmuştur (p<0,001).
3. Sipirometrik bulguların [FEV<sub>1</sub>(%),FEV<sub>1</sub> (L),FVC(%), FVC (L),FEV<sub>1</sub>/FVC] hepsi için tek yönlü varyans analizi ile gruplar arasında anlamlı fark vardır (p<0,001).Post Hoc karşılaştırma yöntemi LSD ile hangi gruplar arasında anlamlı fark olduğu incelenmiştir:
  - a. KOAH ve sigara için KOAH gruplarında; FEV<sub>1</sub> (%), FEV<sub>1</sub> (L), FVC (%), FVC (L), FEV<sub>1</sub>/FVC parametrelerinde gruplar arasında anlamlı fark ( p>0,05 ) saptanmamıştır.

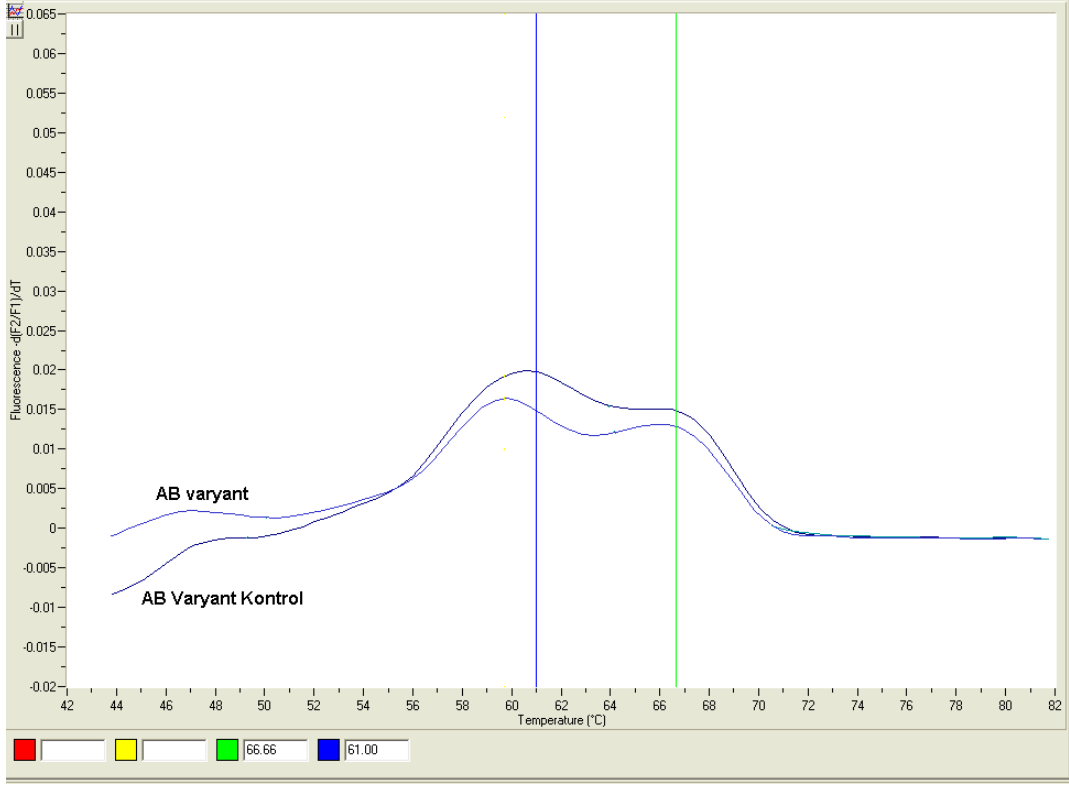


- b. Aynı parametreleri için KOAH ve sigara içen sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında bulgular KOAH grubunda daha düşük olarak saptanmış ve tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ) fark saptanmıştır.
- c. Sigara içen KOAH ve sigara içen sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında sigara içen KOAH grubunda spirometrik tüm bulgular daha düşük ve tüm parametreler için istatistiksel anlamlı ( $p<0,001$ ) fark bulunmuştur.
4. Sigara içme (paket/yıl) parametresi sigara içen KOAH ve sigara içen sağlıklı bireyler grupları kıyaslandığında istatistiksel anlamlı fark ( $p<0,001$ ) gözlenmiştir.

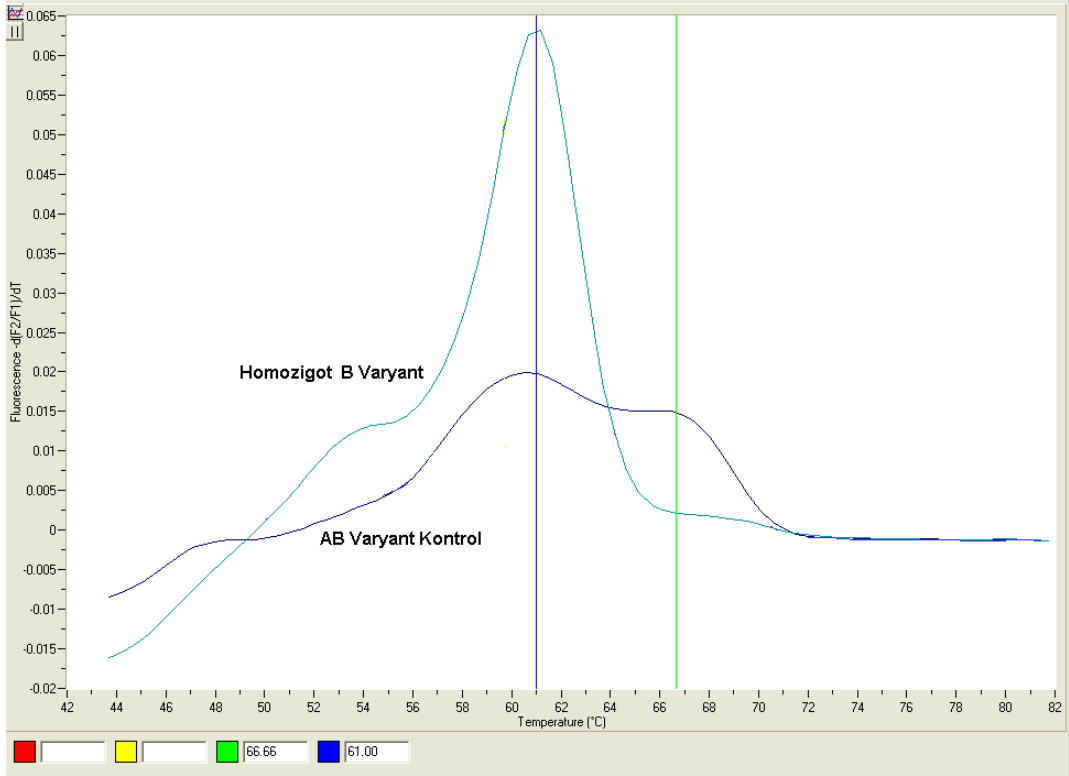
Çalışmamızda bulduğumuz MBL polimorfizimleri ve bunların gruplara göre dağılımı Tablo 5'te, saptanan heterozigot AB varyant alleli, homozigot B varyant alleli ve homozigot D varyant allele ait RT-PCR analiz grafikleri sırasıyla Şekil 6-7-8'de gösterilmiştir..

**Tablo 5:** Çalışma gruplarında saptanan MBL polimorfizm insidansı.

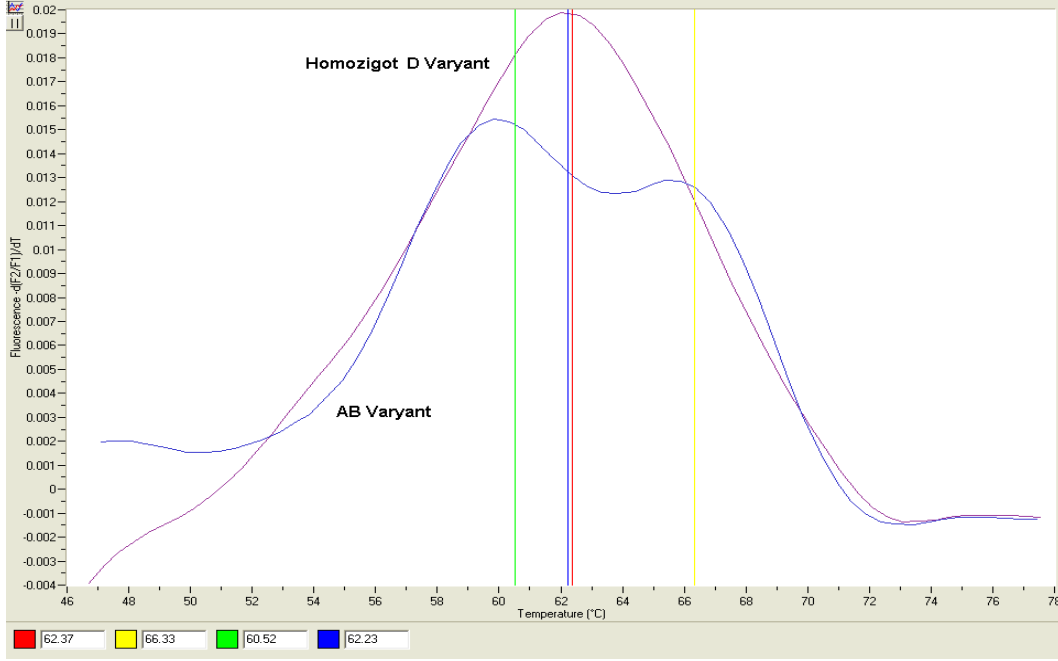
Varyant	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Toplam
	KOAH	Sigara + KOAH	Sigara	Kontrol	
	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)	
AB	15	18	15	18	66
D	5	1	4	2	12
B	0	1	1	0	2



**Şekil 6:** RT PCR analizinde heterozigot AB varyant polimorfizmi.



**Şekil 7:** RT PCR analizinde homozigot B varyant polimorfizmi.



**Şekil 8:** RT PCR analizinde homozigot D varyant polimorfizmi,

Heterozigot AB varyant alleli, homozigot B varyant alleli ve homozigot D varyant allellinin RT-PCR analizindeki Melting Temperature ( $T_m$  C°) dereceleri Tablo 6’da verilmiştir.

**Tablo 6:** Çalışmamızda RT PCR analizinde elde ettiğimiz allellerin Melting Temperature ( $T_m$  C°) dereceleri.

Locus	Allel	$T_m$ (C°)
MBL2 Ekzon 1	A	66,6
	B	61
	D	62,23

Günümüzde serum MBL düzeyleri için eşik değeri belirlenmesi halen tartışmalıdır. Bizim çalışmamızda serum MBL düzeyi için eşik değer olarak 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml ve 300 ng/ml baz alınıp MBL polimorfizmleri ile kıyaslanmıştır (sırasıyla Tablo 7-14) Farklı polimorfizmlerin MBL düşüklüğü açısından risk oluşturup oluşturmadığı tek yönlü Odds oranları (OR) ve %95 güven aralıkları (CI) hesaplanarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 7:** Serum MBL eşik değeri olarak 50 ng/ml alındığında; deneklerin MBL polimorfizmlerine göre dağılımı.

MBL polimorfizmi	Pozitif serum MBL>50 ng/ml	Negatif serum MBL düzeyi ≤ 50	TOPLAM
AB varyant	63(%95,5)	3(%4,5)	66(%100)
D varyant	11(%91,7)	1(%8,3)	12(%100)
B varyant*	-	2(%100)	2(%100)

\*B varyantı yalnızca iki kişi olması nedeni ile riski çok yüksek, güven aralığı çok geniş olması nedeni ile analiz dışı bırakılmıştır.

A/B varyantla karşılaştırıldığında, D varyantına sahip olmak, düşük serum MBL için (eşik değeri olarak 50 ng/ml alındığında) istatistiksel olarak anlamlı bir risk oluşturmamaktadır (  $p=0,590$ ) (OR =1,9 , %95 CI=0,182-20,059).

**Tablo 8:** Serum MBL düzeyi için eşik değeri 50 ng/ml alındığında; çalışma gruplarındaki 50 ng/ml'nin üzerindeki pozitif ve 50 ng/ml'nin altındaki negatif hastaların dağılımı.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Serum MBL (ng/ml)	KOAH	Sigara + KOAH	Sigara	Kontrol
	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)
Pozitif serum MBL>50 ng/ml	18	19	17	20
Negatif serum MBL ≤ 50 ng/ml	2	1	3	0

**Tablo 9:** Serum MBL eşik değeri olarak 100 ng/ml alındığında; deneklerin MBL polimorfizmlerine göre dağılımı.

MBL polimorfizmi	Pozitif MBL>100 ng/ml	Negatif MBL ≤ 100 ng/ml	TOPLAM
AB varyant	61 (%92,4)	5 (%7,6)	66 (%100)
D varyant	10 (%83,3)	2 (%16,7)	12 (%100)
B varyant*	-	2 (%100)	2 (%100)

\*B varyantı yalnızca iki kişi olduğundan riski çok yüksek, güven aralığı çok geniş olması nedeni ile analiz dışı bırakılmıştır.

A/B varyantla karşılaştırıldığında, D varyantına sahip olmak, düşük serum MBL için (eşik değeri olarak 100 ng/ml alındığında) 2,44 kat risk oluşturmaktadır (OR=2,44 , %95 CI=0,41-14,33). Bu risk istatistiksel olarak anlamsızdır (p=0,324).

**Tablo 10:** Serum MBL düzeyi için eşik değeri 100 ng/ml alındığında; çalışma gruplarındaki 100 ng/ml'nin üzerindeki pozitif ve 100 ng/ml altındaki negatif hastaların dağılımı.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Serum MBL (ng/ml)	KOAH	Sigara + KOAH	Sigara	Kontrol
	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)
Pozitif serum MBL>100 ng/ml	17	18	17	19
Negatif serum MBL ≤ 100 ng/ml	3	2	3	1

**Tablo 11:** Serum MBL eşik değeri olarak 200 ng/ml alındığında; deneklerin MBL polimorfizmlerine göre dağılımı.

MBL polimorfizmi	Pozitif MBL > 200 ng/ml	Negatif MBL ≤ 200 ng/ml	TOPLAM
AB varyant	59 (%89,4)	7 (%10,6)	66 (%100)
D varyant	9 (%75)	3 (%25)	12 (%100)
B varyant*	-	2 (%100)	2 (%100)

\*B varyantı yalnızca iki kişi olması nedeni ile riski çok yüksek, güven aralığı çok geniş olması nedeni ile analiz dışı bırakılmıştır.

A/B varyantla karşılaştırıldığında, D varyantına sahip olmak, düşük serum MBL için (eşik değeri olarak 200 ng/ml alındığında) istatistiksel olarak anlamlı bir risk oluşturmamaktadır ( $p=0,184$ ) (OR=2,81, %95 CI= 0,61-12,89).

**Tablo 12:** Serum MBL düzeyi için eşik değeri 200 ng/ml alındığında; çalışma gruplarındaki 200 ng/ml'nin üzerindeki pozitif ve 200 ng/ml'nin altındaki negatif hastaların dağılımı.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Serum MBL (ng/ml)	KOAH	Sigara + KOAH	Sigara	Kontrol
	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)
Pozitif serum MBL>200 ng/ml	16	18	16	18
Negatif serum MBL ≤ 200 ng/ml	4	2	4	2

**Tablo 13:** Serum MBL eşik değeri olarak 300 ng/ml alındığında MBL polimorfizmlerine göre incelenmesi.

MBL polimorfizmi	Pozitif MBL>300 ng/ml	Negatif MBL ≤ 300 ng/ml	Toplam
AB varyant	57(%86,4)	9(%13,6)	66 (%100)
D varyant	9(%75)	3(%25)	12 (%100)
B varyant*	-	2 (%100)	2 (%100)

\*B varyantı yalnızca iki kişi olduğundan riski çok yüksek, güven aralığı çok geniş olması nedeni ile analiz dışı bırakılmıştır.

A/B varyantla karşılaştırıldığında, D varyantına sahip olmak, düşük serum MBL için (eşik değeri olarak 300 ng/ml alındığında) istatistiksel olarak anlamlı bir risk oluşturmamaktadır ( $p=0,324$ ) (OR=2,11, %95 CI= 0,47-9,30).

**Tablo 14:** Serum MBL düzeyi için eşik değeri 300 ng/ml alındığında; çalışma gruplarındaki pozitif ve negatif hastaların dağılımı.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Serum MBL (ng/ml)	KOAH (n=20)	Sigara + KOAH (n=20)	Sigara (n=20)	Kontrol (n=20)
Pozitif serum MBL> 300 ng/ml	15	18	15	18
Negatif serum MBL ≤ 300 ng/ml	5	2	5	2

Sonuç olarak p değerini en düşük olarak saptadığımız 200 ng/ml değerinin, serum MBL düzeyi için eşik değer olarak alınması bizim çalışma sonuçlarımıza göre en anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızdaki serum MBL konsantrasyonları ve bunların gruplara göre dağılımı ile gruptaki minimum ve maksimum MBL konsantrasyon değerleri Tablo 15'te gösterilmiştir. Hasta grupları arasında serum MBL değerleri açısından tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ile anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,424).

**Tablo 15:** Çalışma gruplarında serum MBL düzeyi dağılımı.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	
	KOAH	Sigara + KOAH	Sigara	Kontrol	p değeri
	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)	
Serum MBL (ng/ml)*	2103±1311	2324±1001	1746±1142	2040±879	0,424
Minimum	<50	<50	<50	70	-
Maximum	3558	3554	3087	3006	-

\*Değerler mean ± Standard deviasyon (SD) olarak verilmiştir.

\*\*p< 0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca AB varyant alleli taşıyanlardaki serum MBL konsantrasyonları ile minimum ve maksimum değerlerinin gruplara göre dağılımı Tablo 16'da verilmiştir.



**Tablo 16:** Çalışma gruplarında yalnızca AB alleli taşıyan olgularda serum MBL düzeyi dağılımı.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	
	KOAH	Sigara + KOAH	Sigara	Kontrol	p değeri
	(n=15)	(n=18)	(n=15)	(n=18)	
Serum MBL (ng/ml)*	2425±1115	2450±893	1748±1222	2097±906	>0.05
Minimum	<50	99	<50	70	
Maximum	3558	3554	3087	3006	

\*Değerler mean ± Standard deviasyon SD olarak verilmiştir.

\*\*p< 0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızdaki CD14+ monositlerdeki TLR-2 ekspresyon oranları ve bunların gruplara göre dağılımı ile gruplardaki minimum ve maksimum TLR-2 ekspresyon oranları Tablo 17’de gösterilmiştir

**Tablo 17:** CD 14+ monositlerdeki TLR-2 ekspresyonunun çalışma gruplarındaki dağılımı.

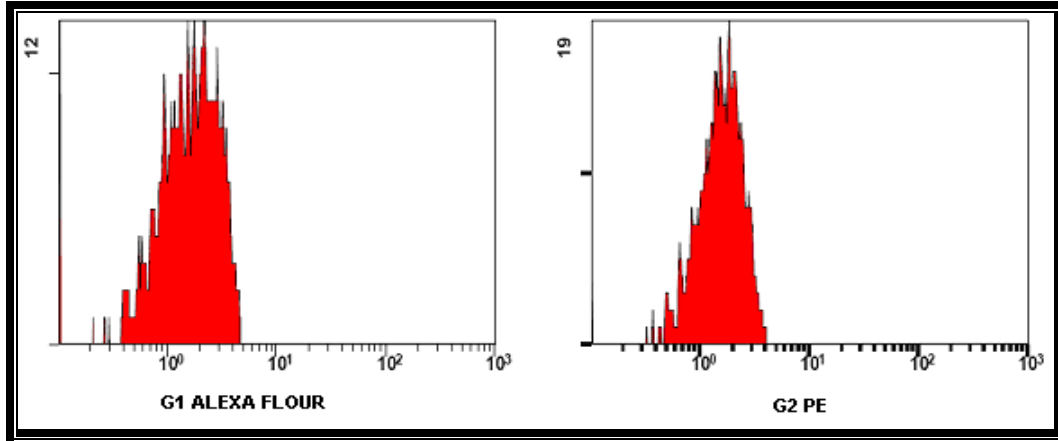
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	
	KOAH	Sigara + KOAH	Sigara	Kontrol	p değeri
	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)	
TLR-2 ekspresyonu (%)	56,41±24,49	64,47±22,93	64,18±23,47	51,82±24,79	0,269

\*Değerler mean ± Standard deviasyon SD olarak verilmiştir.

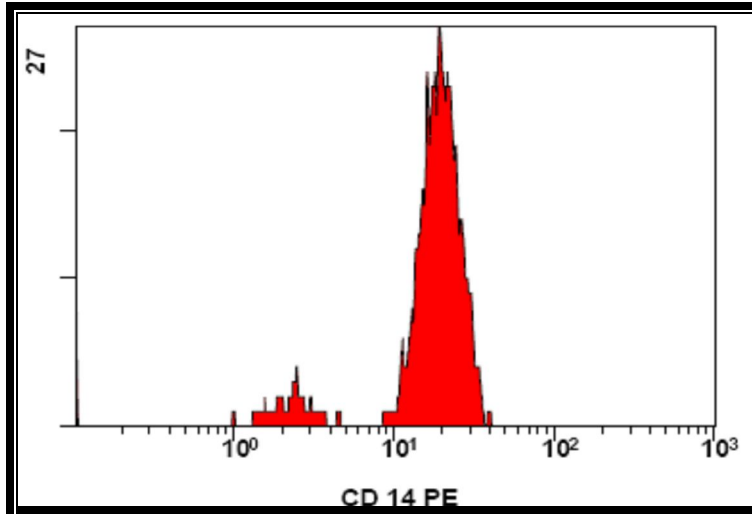
\*\*p< 0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Hasta grupları arasında TLR ekspresyonunun açısından tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ile anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,269).

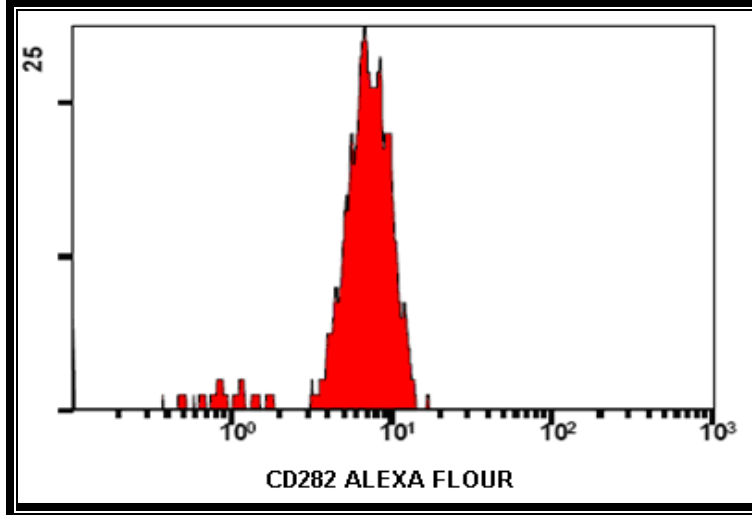
Ayrıca CD14+ monositler ve TLR-2 ekspresyonun flow sitometri cihazındaki analizlerinde elde edilen izotipik kontrol, TLR-2 ve CD14+ hücrelere ait histogramlar sırasıyla Şekil 9-10-11 de verilmiştir.



**Şekil 9:**Flow sitometri TLR2 (Alexa Flour IgG1 κ) ve CD14 (PE IgG2a κ) için izotipik kontrol histogramları.



**Şekil 10:** Flow sitometri CD14+ monosit ekspresyon histogramı.



**Şekil 11:** Flow sitometri TLR2 (CD 282) ekspresyon histogramı.

Hasta grupları arasında serum CD4+ T hücre ve CD8+ T hücre yüzdeleri ve CD4/CD8 oranı dağılımı Tablo 18 gösterilmiştir. Bu parametrelerin değerleri açısından gruplar arasında tek yönlü varyans analiz ile anlamlı bir fark (sırasıyla  $p=0,396$ ,  $p=0,486$ ,  $p=0,310$ ) bulunmamıştır

**Tablo 18:** Serum CD4+ T hücre ve CD8+ T hücre yüzdeleri ve CD4/CD8 oranlarının çalışma gruplarındaki dağılımı.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	
	KOAH	Sigara + KOAH	Sigara	Kontrol	p değeri
	(n=20)	(n=20)	(n=20)	(n=20)	
CD 4 (%)*	33,72±10,9	33,31±14,15	38,64±12,79	38,83±15,59	0.396
CD 8 (%)*	29,21±12,08	25,76±9,85	25,23±7,89	24,88±9,06	0.486
CD4 / CD8*	1,41±0,74	1,33±0,47	1,58±0,56	1,65±0,64	0.310

\* Değerler mean ± Standard deviasyon (SD) olarak verilmiştir.

\*\*  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Gruplar arasında yaş ve cinsiyete göre düzeltilmiş verilerin kıyaslamak amacıyla kovaryans analizi yapılmıştır. Yine gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (karşılaştırılan her parametre için  $p>0,05$ ).

Çalışma gruplarında CD4, CD8 ve CD4/CD8 parametrelerinin erkek ve kadınlar arasında dağılımı Tablo 19'da gösterilmiştir. Cinsiyetler arasındaki farkı değerlendirmek amacıyla Student's T testi analizi yapılmıştır ve CD4 değerleri ( $p=0,002$ ) ve CD4/CD8 oranları ( $p=0,0001$ ) için cinsler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

**Tablo 19:** Tüm deneklerdeki serum CD4+ T hücre ve CD8+ T hücre yüzdeleri ve CD4/CD8 oranlarının erkek ve kadınlar arasındaki dağılımı.

	Erkek (n=59)	Kadın (n=21)	p değeri
CD4 (%) <sup>*</sup>	33,44±11,96	43,66±14,86	0,002 <sup>**</sup>
CD8 (%) <sup>*</sup>	27,36±10,20	23,19±8,03	0,094
CD4/CD8 <sup>*</sup>	1,32±0,50	1,98±0,65	0,0001 <sup>**</sup>

\* Değerler mean ± Standard deviasyon (SD) olarak verilmiştir

\*\*  $p< 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

CD4, CD8 ve CD4/CD8 parametrelerinin yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 20'de verilmiştir. Yaş grupları arasında fark olup olmadığının değerlendirilmesi için tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) uygulanmıştır. CD4/CD8 oranı yaş gruplarına göre sınırda anlamsız ( $p=0,064$ ), diğer parametreler yaş gruplarına göre incelendiğinde ise istatistiksel olarak anlamsız olarak ( $p>0.05$ ) saptanmıştır.

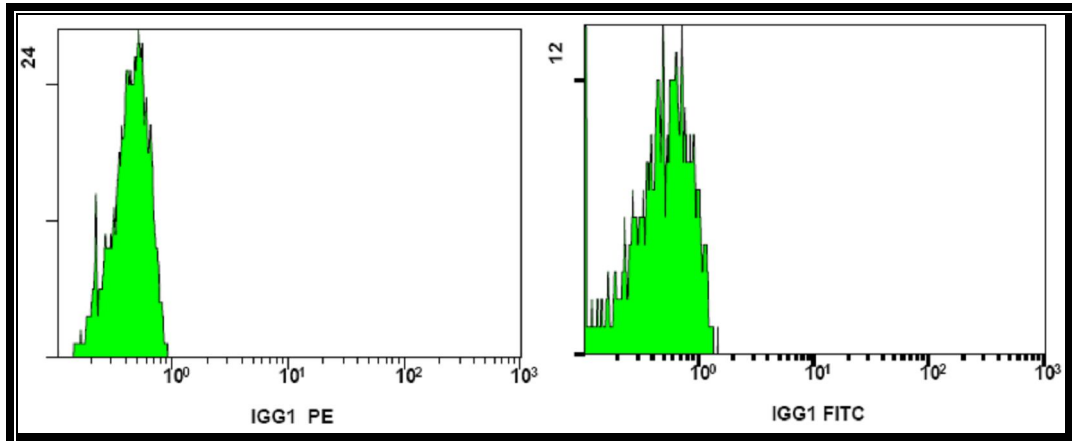
**Tablo 20:** Tüm deneklerdeki serum CD4+ T hücre ve CD8+ T hücre yüzdeleri ve CD4/CD8 oranlarının yaş grupları arasındaki dağılımı

	49≤ yaş (n=36)	Yaş 50-64 (n=27)	Yaş ≥ 65 (n=17)	p değeri
CD4 (%)*	37,43±13,89	38,11±13,26	30,21±11,86	0,122
CD8 (%)*	25,11±8,45	25,61±8,98	29,75±13,07	0,253
CD4/CD8*	1,56±0,61	1,59±0,61	1,18±0,56	0,064

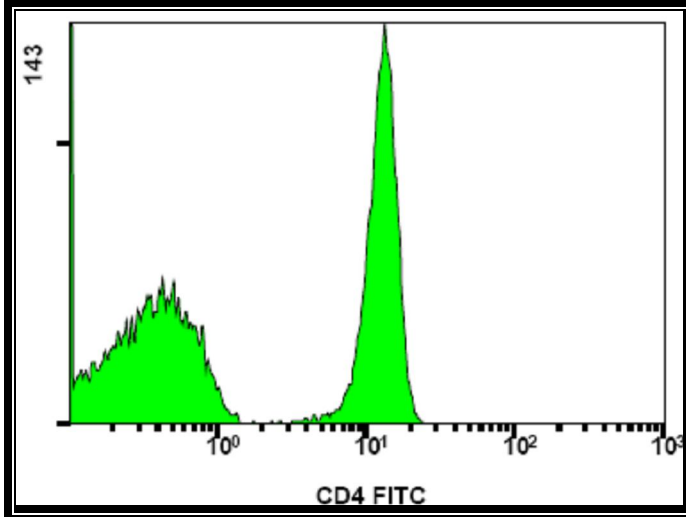
\* Değerler mean ± Standard deviasyon (SD) olarak verilmiştir

\*\* p< 0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

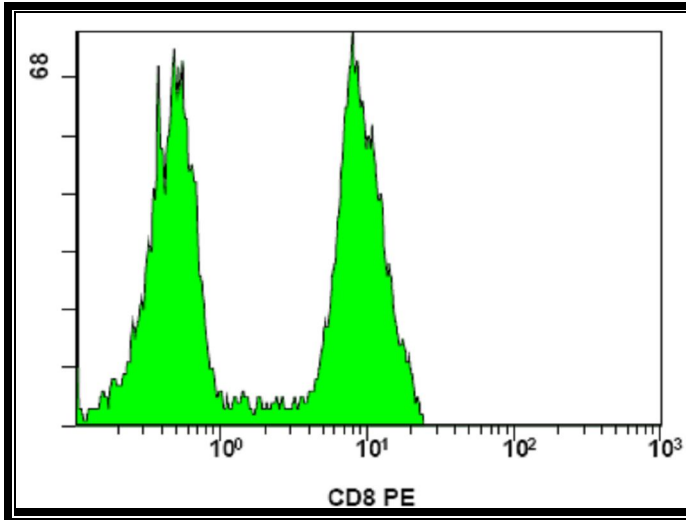
Serum CD4+ T hücre ve CD8+ T hücrelerin flow stometri cihazındaki analizlerinde elde edilen izotipik kontrol, CD4+ T hücre ve CD8+ T hücrelere ait histogramlar sırasıyla Şekil 12-13-14 de verilmiştir



**Şekil 12:**Flow sitometri CD4 (IgG1 FITC) ve CD8 (IgG1 PE) için İzotipik kontrol histogramları.



**Şekil 13:**Flow sitometri CD4 lenfosit ekspresyon histogramı.



**Şekil 14:**Flow sitometri CD8 lenfosit ekspresyon histogramı.

Çalıştığımız parametreleri ait bulgularımızın solunum fonksiyon test sonuçları ve birbirleriyle korelasyonunu saptamak amacıyla Pearson Korelasyon analizi uygulandı: Tablo 21.

**Tablo 21:** Parametrelerin solunum fonksiyon testleri ve birbiriyle korelasyonu.

		MBL	CD4	CD8	CD4/CD8	FEV <sub>1</sub>	FEV <sub>1</sub> /FVC	Sigara p/y
MBL	r	-	-0,164	0,086	-0,264*	-0,246	-0,264*	0,280*
	p	-	0,147	0,447	0,018	0,058	0,041	0,030
CD4	r	-0,164	-	0,404*	0,399**	0,311*	0,293*	-0,159
	p	0,147	-	0,000	0,000	0,016	0,023	0,225
CD8	r	0,086	0,404**	-	-0,535**	-0,033	-0,189	0,170
	p	0,447	0,000	-	0,000	0,803	0,149	0,195
CD4/CD8	r	-0,264*	0,399**	-0,535**	-	0,205	0,295*	-0,274*
	p	0,018	0,000	0,000	-	0,116	0,022	0,034
FEV <sub>1</sub>	r	-0,246	0,311*	-0,33	0,205	-	0,866**	-0,551**
	p	0,058	0,016	0,803	0,116	-	0,000	0,000
FEV <sub>1</sub> /FVC	r	-0,264*	0,293*	-0,189	0,295*	0,866**	-	-0,624**
	p	0,041	0,023	0,149	0,022	0,000	-	0,000
Sigara p/y	r	0,280*	-0,159	0,170	-0,274*	-0,551**	-0,624**	-
	p	0,030	0,225	0,195	0,034	0,000	0,000	-

\* p<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

\*\*p<0,001 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Serum MBL konsantrasyonları ile FEV<sub>1</sub> değerleri arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı negatif bir korelasyon ( $r=-0,246$ ,  $p=0,058$ ), FEV<sub>1</sub>/FVC değerleri arasında yine negatif korelasyon ( $r=-0,264$ ,  $p=0,041$ ) ve CD4/CD8 oranları arasında negatif bir korelasyon ( $r=-0,264$ ,  $p=0,018$ ) tespit edilmiştir.

Sonuçlarımızı solunum fonksiyon testleri ile karşılaştırdığımızda CD4+ T hücre oranları ile FEV<sub>1</sub> arasında pozitif korelasyon ( $r= 0,311$ ,  $p=0,16$ ) ve yine FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif yönde korelasyon ( $r= 0,293$ ,  $p=0,23$ ) tespit ettik. Yine CD4/CD8 oranı ile FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif korelasyon ( $r=0,295$ ,  $p=0,022$ ) saptadık. CD8+ T hücre oranları ile FEV<sub>1</sub>) ve FEV<sub>1</sub>/FVC arasında istatistiksel olarak anlamsız da olsa negatif bir korelasyon olduğunu ( sırasıyla  $r=-0,033$   $p=0,803$ ,  $r=-0,189$   $p=0,149$ ) görülmüştür. CD4 ve CD8 arasında pozitif korelasyon ( $r= 0,404$ ,  $p=0,000$ ), CD4 ve CD4/CD8 arasında pozitif korelasyon ( $r= 0,399$ ,  $p=0,000$ ),CD8 ile CD4/CD8 arasında pozitif korelasyon ( $r= 0,535$ ,  $p=0,000$ ) tespit edilmiştir.

Sigara içimini (paket/yıl) karşılaştırdığımızda serum MBL konsantrasyonu ile pozitif bir korelasyon ( $r=0,280$ ,  $p=0,030$ ) , CD4/CD8 oranları ile negatif korelasyon ( $r= -0,274$ ,  $p=0,034$ ), FEV<sub>1</sub> ile negatif korelasyon ( $r= -0,551$ ,  $p=0,000$ ) ve FEV<sub>1</sub>/FVC ile negatif korelasyon ( $r= -0,624$ ,  $p=0,000$ ) saptanmıştır.



## V. TARTIŞMA

Günümüzde KOAH tüm dünyada önemli mortalite ve morbidite nedeni olduğu bilinen bir hastalık olup önümüzdeki yıllarda hastalığın mortalitesinin artarak 2020 yılında üçüncü sırada ölüm nedeni olacağı beklenmektedir (2,71,72). KOAH neden olduğu sakatlıklar, iş gücü kayıpları ve sağlık harcamaları dolayısıyla da toplumlar ve sağlık kuruluşlarında oldukça büyük ve giderek artan sosyoekonomik yüke neden olmaktadır. Ancak günümüzde halen KOAH'ın tanı ve tedavisinde uluslararası görüş birliği çabalarına rağmen hastaların büyük bir kısmı tanı almamış durumdadır ve tanı konulanlar da yetersiz tedavi edilmektedir (70).

Uzun yıllar FEV1 KOAH'ta tüm fizyopatolojik değişiklikler için global bir belirteç olarak kullanılmagelmiştir. Ayrıca, hastalığın evrelemesi ve prognozu da sadece solunum fonksiyonu ölçümleri, başlıca FEV1 esasında yapılmaktadır. Oysa FEV1, KOAH'ın hastalara etkisini ya da hastalığın çok bileşenli doğasına olan toplam yükünü yansıtmaktan maalesef uzaktır. Solunum fonksiyon ölçümleri ile nefes darlığı ve diğer semptomların şiddeti, mortalite, sağlık durumu gibi klinik sonuçlar arasındaki korelasyonların zayıf olduğu gösterilmiştir.(70)

Günümüzde KOAH'ta altta yatan patolojiyi ve onun değişik klinik belirtilerini daha iyi anlamaya çalışırken ve de tedavinin yararlarını değerlendirirken başka yeni ve etkin belirteçlerin bulunup doğrulanmasına gereksinim vardır. Yeni KOAH belirteçlerin tanı ve tedavi takibinde yararlı olabilmesi için, hastalığın ortaya çıkışı, şiddeti ve progresyonunu öngörmeleri ya da alevlenmelere olan yatkınlığı öngörmeleri birlikte ve belirteçlerin kullanımlarının basit, maliyet açısından ise ucuz olması gerekmektedir(70).

KOAH'ta günümüzde çok az sayıda onaylanmış belirteç bulunmakla birlikte, potansiyel olarak değerli olabilecek çok sayıda aday belirteç bulunmaktadır. İnflamasyon belirteçleri KOAH'ta akciğer dışı etkilerin de belirteci olabilir. Vücudun herhangi bir yerinde inflamasyon olduğunda bazı kan proteinlerinin yapımında artma olmaktadır. Kanda kolaylıkla ölçülebilen bu proteinler akut faz proteinleri ya da inflamasyon belirteçleri olarak adlandırılmaktadır. Bu belirteçler arasında C-reaktif protein (CRP), fibrinojen, alfa-2 globulin, alfa-1antitripsin ve serüloplazmin sayılabilmektedir(70). Günümüzde akut faz reaktanı olarak yoğun bir şekilde araştırmalara konu olan serum MBL düzeyleri de KOAH'la ilişkisi ve bir belirteç olarak değeri incelemeye değer bulunmuştur.

KOAH hastalarında gen polimorfizmleri KOAH'a yatkınlığı incelemek amacıyla araştırılmaktadır. Yang ve arkadaşları, KOAH hastalarında MBL polimorfizmlerinin daha sık solunum yolu hastalığı nedeni hastane yatışlarına eşlik ettiğini göstermişlerdir (72).

KOAH'ta sistemik biyolojik belirteçleri ve düzeylerini araştırırken, hem bu belirteçlerin sistemik bulgularla ilişkileri anlaşılabilir hem de hastalığın klinik seyrini değiştirebilecek yeni tedavi stratejileri uygulanabilecektir(70).

Çalışmamızda KOAH hastalarında ve sigara kullanan bireylerde akciğer patolojisinin klinik bir belirteci olarak olası kullanımının değerlendirilmek için MBL polimorfizmi, serum MBL konsantrasyonu, CD4, CD8 oranları ve TLR-2 ekspresyonunun incelenmiş ve klinikte uygulanan solunum fonksiyon testleriyle kıyaslanarak aralarındaki korelasyonlar değerlendirilmiştir.

Ytting ve arkadaşları (73), sağlıklı yetişkinlerde serum MBL düzeylerinin cinsiyet farkını, sirkadiyen değişimlerini, egzersize bağlı olabilecek değişimlerini ve biyokimyasal örnek farkını incelemişlerdir. Otuz iki sağlıklı yetişkinde 3 haftalık dönem içinde başlangıçta saat sabah 08:00 de, 1 gün sonra, 1, 2 ve 3 hafta sonra kan örneği almış ve bunu 6 ay sonra tekrar etmişler ve süreç içinde serum MBL düzeylerini stabil olduğunu ( $p=0.39$ ) bulmuşlardır. On dört sağlıklı gönüllüde ise 24 saat içinde farklı zamanlarda 7 kez kan örneği almışlar ve serum MBL değerlerinin sirkadiyen değişimini

incelemişler ve istatistiksel olarak serum MBL değerlerinin sirkadiyen değişim göstermediğini ( $p=0.34$ ) saptamışlardır. Yine aynı çalışmada, fiziksel egzersiz öncesi ve sonrası ( $n=14$ ) kan örneği olarak fiziksel egzersizin serum MBL düzeyine etkisini incelemişler ve egzersizin serum MBL düzeylerini etkilemediğini ( $p>0,8$ ) yönünde bulgular elde etmişlerdir. Ytting ve arkadaşları (73), son olarak serum ve plazma örneklerinin MBL düzeyleri üzerine etkisini karşılaştırmışlar ve serum MBL düzeyleri (median MBL: 1196 ng/ml, 10–10494) ile plazma MBL (median MBL: 1110 ng/ml, 10–9223) konsantrasyonlarının yüksek derecede korelasyon ( $r=0.995$ ,  $p<0.0001$ ) gösterdiğini saptamışlardır. Kadın ve erkek cinsiyetleri arasında serum MBL seviyeleri için anlamlı bir fark ( $p=0,48$ ) bulunmamış ve yaş ile bir korelasyon ( $r = -0.05$ ;  $p=0.34$ ) saptanmamıştır.

Yang ve arkadaşları (72) ise 200 KOAH hastası ve sigara içen ve solunum fonksiyonları normal olan 114 kişide yaptıkları çalışmada MBL polimorfizmi ve KOAH'lı gruptan 82 kişide de ayrıca serum MBL konsantrasyonuna incelemişlerdir. MBL genotip frekansı, KOAH ve sigara içen gruplarda A/A alleli için sırasıyla 147(%73,5) ve 76(%73,1), A/B alleli için 45(%22,5) ve 26(%25), B/B alleli için 8(%4) ve 2(%1,9) olarak bulunmuştur. Serum MBL konsantrasyonu incelenen KOAH hastalarında ( $n=82$ ) MBL genotipi ile serum MBL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,0001$ ) fark bulunmuştur. A/B ve B/B alleli taşıyanların A/A alleli olanlara göre serum MBL düzeylerinin 10 kat daha düşük olduğu saptanmıştır. Hastalarımızda farklı allellerin serum MBL düzeylerini istatistiksel olarak kıyaslamak allel gruplarını taşıyan hastaların sayılarının çalışma grupları arasında istatistik yapmak için yeterli olmaması nedeniyle mümkün olmamıştır. Bizim çalışmamızda ise MBL polimorfizmi bakılan 80 kişinin 66'sında (%82,5) A/B alleli, 12'sinde (%15) homozigot D alleli ve 2'sinde (%2,5) homozigot B alleli tespit edilmiştir. Homozigot B alleli taşıyan iki bireyde de düşük serum MBL düzeyi ( $<50$  ng/ml) tespit edilmiştir. Heterozigot A/B alleli taşıyan 66 kişiden 7'sinde ve homozigot D alleli taşıyan 12 kişiden 3'ünde düşük serum MBL ( $<200$  ng/ml ) konsantrasyonu saptanmıştır. Yalnızca AB alleli taşıyan gruplardaki hasta sayısı istatistik açıdan

değerlendirilebilecek sayıda olduğundan AB alleli taşıyan bireyler seçilip gruplar arası kıyaslama yapıldığında da istatistiksel fark saptanmamıştır.

Serum MBL düşüklüğü ya da yetmezliği farklı çalışmalarda, ya 100 ng/ml den 1000 ng/ml kadar değişen eşik değerler baz alınarak ya da varyant allel varlığı ile tanımlanmıştır (74). Bizim çalışmamızda, çalışmaya alınan tüm olgularda serum MBL düşüklüğü için eşik değer olarak 200 ng/ml'yi almanın uygun olacağı istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Homozigot B varyantı yalnızca iki kişi olduğundan riski çok yüksek, güven aralığı çok geniş olması nedeni ile analiz dışı bırakılmıştır. Çalışmaya alınan tüm olgularda serum MBL düşüklüğü için A/B varyantla karşılaştırıldığında, D varyantına sahip olmak istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,184$ ) bulunmamıştır (OR =2,81 , %95 CI: 0,61-12,89).

Yine Yang ve arkadaşlarının (72) yaptığı çalışmada 2 yıllık çalışma dönemi içinde serum MBL düzeylerine bakılan 82 KOAH hastasından 40'ında enfektif alevlenmeler görülmüştür. A/B ve B/B alleli taşıyanlarda, A/A alleli olanlara göre enfektif alevlenme görülme sıklığı istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,0037$ ) farklı bulunmuştur (OR =4,9 , %95 CI:1,7-14,4). Toplam MBL genotip frekansı A/A alleli için %73,4, A/B alleli için % 23,4 ve B/B alleli için %3,3 bulunmuştur. A/B ve B/B varyantları açısından KOAH ve sigara içen sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise Yang ve arkadaşlarının çalışmasından ve diğer yayınlardan farklı olarak birinci sıklıkta A/B varyantı %82,5 (66/80), ikinci sıklıkta homozigot D varyantı %15 (12/80) saptanmıştır. Ülkemizde MBL polimorfizmi daha önce çalışılmamıştır, bu nedenle bizim çalışmamız bir ilk olma özelliğini taşımaktadır. MBL genotip frekansı açısından bulgularımızın literatürden farklı olmasının nedeni kendi popülasyonumuzdan kaynaklanıyor olduğunu düşünmekteyiz. Yang ve arkadaşlarının çalışmasına benzer biçimde KOAH, sigara içen KOAH, sigara içen sağlıklı grup ve sağlıklı kontrol grupları arasında MBL genotip frekansı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Wang ve arkadaşlarının (75) 579 astımlı ve 232 sağlıklı kontrol grubuyla yaptığı çalışmada MBL2 gen polimorfizmi açısından her iki grupta

bir fark saptanmamıştır. Serum MBL konsantrasyonları açısından da astımlı grup ( $1,47 \pm 0,07$  mg/L) ile kontrol grubu ( $1,66 \pm 0,14$  mg/L) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yine serum MBL seviyesi ve MBL genotipi ile pulmoner fonksiyonlar ve astımın klinik derecesi ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Dahl ve Nordestgaard (76) yaptıkları çalışmada serum MBL düşüklüğünün KOAH ve astım için bir risk artışına yol açmadığı ve MBL-2 gen polimorfiziminin KOAH için bir belirteç olamayacağı sonucuna varmışlardır.

Uğuz ve arkadaşları (77) 5 ile 15 yaş arasındaki 72 astımlı çocukta ve benzer yaşlarda 30 sağlıklı kontrol grubunda serum MBL düzeyini incelemişlerdir. Serum MBL düzeyleri, astımlı çocuklar sağlıklı kontrol grubuyla kıyaslandığında hem akut atak (median 4.1 mg/L ile median 2.8 mg/L,  $p < 0.0001$ ) döneminde hem de stabil dönemde (median 3.6 mg/L ile median 2.8 mg/L,  $p < 0.0001$ ) istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır. Aynı zamanda astımlı hasta gruplarında serum MBL seviyeleri ile periferik kandaki eozinofil seviyeleri arasında pozitif korelasyon tespit etmişlerdir.

Kaur ve arkadaşları (78), alerjik rinit ile birlikte astımı olan ( $n=49$ ) grup ile alerjik bronkopulmoner aspergilosisi bulunun ( $n=11$ ) grup ve sağlıklı kontrol ( $n=84$ ) grubunda serum MBL düzeyi ve polimorfizmine incelemişlerdir. Yüksek serum MBL düzeyleri gösteren homozigot 1011A allelinin periferik kandaki yüksek eozinofil seviyeleri ( $p < 0,05$ ) ve düşük FEV<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ) değerleri ile anlamlı derecede korelasyon gösterdiğini tespit etmişler.

Aittoniemi ve arkadaşları (79) 243 astımlı ve 400 sağlıklı kontrol grubunda MBL genotipine bakmışlar ve düşük serum MBL konsantrasyonuna yol açan -221 promoter bölgesindeki varyant X alleleline sahip olmanın erkeklerde non atopik astım için risk faktörü oluşturduğunu (OR= 2.52, % 95 CI =1.23–5.15;  $p=0.01$ ) bulmuşlar. Ayrıca varyant X alleli taşımanın astım hastalarında hastalık sürecinde gelişen FEV<sub>1</sub> deki düşüşle ilgili olduğunu ( $p=0.033$ ), tespit etmişler.

Biz çalışmamızda serum MBL seviyesine baktığımız KOAH (2103±1311 ng/ml), sigara içen KOAH (2324±1001 ng/ml), sigara içen sağlıklı bireyler (1746±1142 ng/ml) ve sağlıklı birey kontrol grubunda (2040±879 ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı bir fark (p=0,424) bulamadık. Serum MBL seviyelerini solunum fonksiyon testleri ve çalıştığımız diğer parametrelerle karşılaştırdık. MBL konsantrasyonları ile FEV<sub>1</sub> değerleri arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı negatif bir korelasyon (r=-0,246, p=0,058), FEV<sub>1</sub>/FVC değerleri arasında yine negatif korelasyon (r=-0,264, p=0,041) ve CD4/CD8 oranları arasında negatif bir korelasyon (r=-0,264, p=0,018) tespit ettik. Yine sigara içimi ile serum MBL düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon (r=0,280, p=0,030) saptadık. MBL konsantrasyonları ile FEV<sub>1</sub> değerleri arasındaki korelasyon açısından bulgularımız Kaur ve arkadaşlarının sonuçlarına paralellik göstermekteyken Aittoniemi ve arkadaşların sonuçlarına zıt gözükmemektedir. Çalışmamızda serum MBL konsantrasyonunun KOAH'ta en önemli risk faktörü olan sigara içimi ile pozitif, solunum fonksiyon testleri ile (FEV<sub>1</sub> ve FEV<sub>1</sub>/FVC) ile negatif korelasyon göstermesi serum MBL değerinin KOAH'ta klinik bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

MBL varyantlarının düşük serum MBL konsantrasyonu ile ilişkisi pek çok çalışmada ortaya konmuştur. Doğal immun cevabın önemli bir bileşeni olan ve komplemanı farklı bir yoldan aktive eden MBL'nin eksikliğinin enfeksiyona yatkınlığı artırdığı pek çok çalışmada gösterilirken Yang ve arkadaşları bu durumun KOAH hastalarında enfektif alevlenmeyi artırdığını göstermiştir (72). Ytting ve arkadaşları (73) serum MBL konsantrasyonunun sağlıklı bireylerde yaş, cinsiyet, sirkadien ritim, fiziksel egzersiz ve zamandan etkilenmediğini, oldukça stabil olduğunu ve bu nedenle potansiyel bir biyolojik belirteç olabileceğini ortaya koymuşlarken bizim ve daha önce yapılan çalışmalarda serum MBL seviyeleri açısından KOAH hastaları, sigara içen sağlıklı bireyler ile sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Buna karşın bizim çalışmamızdaki gibi serum MBL seviyeleri ile solunum fonksiyon testleri arasında korelasyon bulan çalışmalar bulunmaktadır. Bu durum MBL konsantrasyonunun KOAH kliniğinde bir

belirteç olarak potansiyelini arttırmaktadır. Sonuç olarak aynı zamanda akut faz reaktanı olan MBL'nin KOAH'taki inflamasyonun patogenezindeki rolü ve sigara içimi ile ilişkisinin ve bir belirteç olarak değerinin anlaşılması için daha ileri düzeyde ve daha kapsamlı araştırmalara gereksinim vardır.

KOAH'ta inflamasyon ile ilgili araştırmaların çoğu epitelyum hücresi, intraepitelyal lenfosit, nötrofil, monosit ve makrofaj içeren doğal immün cevabın rolüne odaklanmıştır. Bu hücreler doku hasarı ve mikroorganizmalara karşı birinci basamak savunmayı yapan hücrelerdir (70). KOAH patogenezinde doğal immün sistemin aksine kazanılmış immün cevabın rolü, hastalıkta artmış sayıda antijen sunan dendritik hücre, T ve B lenfositler ve artmış bronşla ilişkili lenfoid doku mevcudiyetine rağmen uzun zaman ihmal edilmiştir (80,81). Patojenlerdeki PAMP'lara bağlanan TLR'ler sitokinler salgılayarak inflamasyonu indükler ve kazanılmış bağışık yanıtı uyarır. Bu bağlamda KOAH'lılarda periferik kandaki monositlerde TLR ekspresyonundaki artma ya da azalma aynı zamanda TLR ekspresyonunun sigara içimi ile ilişkisi önemli olabilir.

Pann ve arkadaşları (82) bizim çalışmamıza benzer şekilde KOAH'lı bir grupta (n=30), sağlıklı sigara içen bir grupta (n=21) ve sigara içmeyen sağlıklı kontrol grubunda (n=25) CD 14+ monositlerdeki TLR2 ve TLR4 ekspresyonunu incelemişler ve solunum fonksiyon testleriyle korelasyonunu değerlendirmişlerdir. KOAH'lı grupta CD 14+ monositlerdeki TLR2 ekspresyonu (% 52,9±20,5) hem sağlıklı sigara içen bir gruptan (% 73,5±19,0) hem de sigara içmeyen sağlıklı kontrol grubundan (% 82,8±17,9) istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001) derecede düşük bulmuşlar. Hem TLR2 hem de TLR4 ekspresyonu ile solunum fonksiyon parametreleri olan FEV<sub>1</sub> % ve FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif korelasyon (p<0,001) saptamışlardır.

Biz çalışmamızda gruplardaki CD 14 + monositlerdeki TLR2 ekspresyon oranlarını KOAH (% 56,41±24,49), sigara içen KOAH (% 64,47±22,93), sigara içen sağlıklı bireyler (% 64,18±23,47) ve sağlıklı birey kontrol grubunda (% 51,82±24,79) olarak bulunmuştur. Hasta grupları arasında TLR ekspresyonunun açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark (p=0,269) saptanmamış olsa da çalışmamızdaki KOAH grubu ve sigara içen

sağlıklı gruptaki TLR2 ekspresyon oranları Pann ve arkadaşlarının çalışmasındakine benzerdir ve yine benzer biçimde KOAH' lılarda diğer gruba göre daha düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda Pann ve arkadaşlarından farklı olarak sağlıklı kontrol grubunda TLR ekspresyonu tüm gruplardan daha düşük bulundu. Bu durumun sağlıklı kontrol grubumuzun yaş ortalamasının (47,4±6,3 yaş) KOAH grubunun yaş ortalamasından (64,6±7,4 yaş) daha düşük olmasından ya da kontrol grubundaki bireylerin olası biyolojik varyasyonundan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Pons ve arkadaşlarının (83) yaptığı çalışmada ise Pann ve arkadaşlarının bulgularına zıt olarak CD 14+ monositlerdeki TLR2 ekspresyonu, sigara içmeyen sağlıklı grupla (4.01±1.94 Mean Floresans Intensity: MFI) karşılaştırıldığında KOAH'lılarda (6.02±1,9 MFI) istatistiksel olarak anlamlı (p=0,01) artış bulunmuş. Sigara içen sağlıklı grup ile sigara içmeyen sağlıklı grup arasında bir fark bulunmazken, sigara içen sağlıklı grupta(3.40±0,5 MFI) TLR2 ekspresyonu KOAH grubuna (6.02±1,9 MFI) göre anlamlı derecede düşük (p=0,02) bulunmuştur. Aynı çalışmada kullanılan sistemik steroidlerin TLR-2 ekspresyonunda doza bağımlı olarak azalmaya yol açtığını tespit edilmiştir.

Stabil KOAH hastalarında ve sağlıklı sigara içenlerdeki monositlerdeki TLR-2 ekspresyonunun sağlıklı kontrol gruplarına kıyaslandığı çalışmalarda birbirine tamamen zıt sonuçlar alınmasının nedeni açık değildir. Bu durum hastaların kullandığı inhale steroidler ve bunların kullanım süresi ve dozları ile ilişkili olabilir. Yine bazı stabil KOAH hastalarında görülen artmış bakteriyel kolonizasyonun TLR-2 ekspresyonunu uyarmasından kaynaklanabilir. KOAH hastalarında TLR-2 ekspresyonunu ve bunun solunum fonksiyonu ile korelasyonunun daha ayrıntılı incelenmesi gereklidir.

KOAH hastalarında akciğerlerdeki lokal inflamasyon üzerinde sürekli çalışmalar yapılmaktadır ve bu hastaların akciğerlerinde nötrofil, makrofaj ve T hücrelerde artış saptanmıştır (81). Son yıllarda bu hastalarda büyük ve küçük hava yolları, alveoller ve pulmoner damarlarda artmış sayıda CD8+ hücre olduğu gösterilmiş ve bu hücrelerin akciğer fonksiyon azalmasıyla ilişkisi saptanmıştır (81). Çok ağır KOAH'ta CD4+ hücreler de artmıştır (12).



Yine T hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda CD8+ T hücreleri ile azalan akciğer fonksiyonu arasında bir korelasyon bulunmuştur (84,85), KOAH hastalarının akciğerlerinde CD4+ ve CD8+ T hücreleri arasındaki dengenin bozulmuş olduğu ve sonuç olarak CD4/CD8 oranının azaldığı gösterilmiştir (84).

KOAH hastalarının periferik kanlarındaki T hücre profili akciğerlerdeki T hücre profili kadar iyi nitelendirilmemiştir; yine de dolaşımdaki T hücrelerindeki lenfosit bileşimi ve CD4/CD8 oranı açısından azda olsa farklılık olduğu gösterilmiştir (86-88). KOAH hastalarında ve sigara içenlerde dolaşımdaki T hücrelerini aktivasyon belirteci olarak ifade eden az sayıda çalışma yayınlanmıştır (86, 88, 89).

Glader ve arkadaşları (90), KOAH hastalarında (n=17), sigara içen sağlıklı grupta (n=8) ve sigara içmeyen sağlıklı grupta (n=6) yaptıkları çalışmada periferik kanda CD4+ ve CD8+ T hücre yüzdeleri ve CD4/CD8 oranı açısından gruplar arasında herhangi bir fark bulmamışlar. CD8+ T hücrelerinin aktivasyon belirteci olarak solunum fonksiyonları ile korele olmadığını buna karşın CD4+ T hücrelerinden CD69 ekspresyonu gösterenlerin FEV<sub>1</sub> ile pozitif korelasyon gösterdiğini (r=0,55, p=0,0065) saptamışlardır.

Kulawik ve arkadaşları (91), KOAH hastalarında (n=18), sigara içen sağlıklı grupta (n=12) ve sigara içmeyen sağlıklı grupta (n=12) yaptıkları çalışmada, KOAH'lı grupta CD8+ T hücre (% 35,4 median) oranları sigara içen sağlıklı gruptan (%26,4 median) daha yüksek ama istatistiksel olarak anlamsız (p=0,07) bulmuşlardır. Aynı çalışmada CD4/CD8 oranı KOAH hastalarında (median:1,06 / 0,61-1,52)sigara içen sağlıklı gruptan (median: 1,65 / 1,23-1,95) anlamlı (p<0,05) derecede düşük bulunmuştur. CD 95 eksprese eden CD4+ T lenfosit ve CD95+ CD8+ lenfosit oranları KOAH hastaları ile sigara içen sağlıklı grup ve sigara içmeyen sağlıklı grupla karşılaştırıldığında her iki T lenfosit alt grubu KOAH grubunda anlamlı (p<0,05) derecede yüksek bulunmuştur. CD8+ T hücreleri ile FEV<sub>1</sub>/FVC arasında negatif korelasyon (r= -0,57, p=0,06) ve CD4/CD8 oranı ile FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif korelasyon (r=0,47) saptanmıştır.

Rufino ve arkadaşlarının(92), KOAH hastalarında (n=38), sigara içen sağlıklı grupta (n=29) ve sigara içmeyen sağlıklı grupta (n=18) yaptığı çalışmada; CD8+ T hücre oranlarını incelemişlerdir. KOAH'lı grupta CD8+ T hücre (% 32,29±9,55) oranları sigara içen sağlıklı gruptan (%27,72±10,7) anlamlı derecede yüksek (p=0,036) bulunmuştur. İstatistiksel yönden önemli olmamasına rağmen, CD4+ T hücreleri oranlarında, sigara içen sağlıklı grupta ve KOAH hastalarında, sigara içmeyen sağlıklı kontrollere göre bir artış eğilimi olduğu saptanmış.

Kim WD ve arkadaşlarının (86), KOAH hastalarında (n=20), sigara içen sağlıklı grupta (n=20) ve sigara içmeyen sağlıklı grupta (n=20) yaptığı çalışmada CD4+ ve CD8+T hücre oranlarını incelemişlerdir. CD4+ T hücre oranları KOAH'lı grupta (% 33,3±9,4), sigara içen sağlıklı grupta (% 37,2±9,6) ve sigara içmeyen sağlıklı grupta (% 37,8±5,8) bulunmuştur. CD8+ T hücre oranları KOAH'lı grupta (% 31,9±7,3), sigara içen sağlıklı grupta (% 31,6±4,2) ve sigara içmeyen sağlıklı grupta (% 30,6±5,3) bulunmuştur. CD4/CD8 oranı ise KOAH'lı grupta (1,14±0,55), sigara içen sağlıklı grupta (1,25±0,45) ve sigara içmeyen sağlıklı grupta (1,28±0,34) saptanmıştır. Bakılan bu parametrelerin hiçbir parametrede gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Bizim çalışmamızda ise, CD4+ T hücre oranları KOAH hastalarında (% 33,72±10,9), sigara içen KOAH hastalarında (% 33,31±14,15), sigara içen sağlıklı bireylerde (% 38,64±12,79) ve sağlıklı birey kontrol grubunda (% 38,83±15,59) olarak bulunmuştur. CD8+ T hücre oranları KOAH hastalarında (% 29,21±12,08), sigara içen KOAH hastalarında (% 25,76±9,85), sigara içen sağlıklı bireylerde (% 25,23±7,89) ve sağlıklı birey kontrol grubunda (% 24,88±9,06) olarak saptanmıştır. CD4/CD8 oranını ise KOAH hastalarında (1,41±0,74), sigara içen KOAH hastalarında (1,33±0,47), sigara içen sağlıklı bireylerde (1,58±0,56) ve sağlıklı birey kontrol grubunda (1,65±0,64) olarak bulduk. Çalışmamızda hem CD4+ T hücre oranları, hem CD8+ T hücre oranları hem de CD4/CD8 oranı için gruplar arasında anlamlı bir fark (sırasıyla p=0.396, p=0.486, p=0.310) tespit edilememiştir. Sonuçlarımızı solunum fonksiyon testleri ile karşılaştırdığımızda CD4+ T hücre oranları ile

FEV<sub>1</sub> arasında pozitif korelasyon ( $r=0,311$ ,  $p=0,16$ ) ve yine CD4+ T hücre oranları ile FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif yönde korelasyon ( $r=0,293$ ,  $p=0,23$ ) tespit edilmiştir. Aynı zamanda CD4/CD8 oranı ile FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif korelasyon ( $r=0,295$ ,  $p=0,022$ ) saptanmıştır. Bu korelasyon değerleri Glader ile Kulawik ve arkadaşlarının çalışmalarındaki korelasyon sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. CD8+ T hücre yüzdesi ile solunum fonksiyon test parametrelerinden FEV1 ve FEV1/FVC oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Ancak CD8 hücre yüzdesinin, FEV1 ve FEV1/FVC oranı arasında negatif yönde bir korelasyon olduğu ( sırasıyla  $r=-0,033$   $p=0,803$ ,  $r=-0,189$   $p=0,149$ ) dikkati çekmektedir.

KOAH hastalarında ve sigara içen sağlıklı bireylerde periferik kandaki CD4+ ve CD8+ T hücre oranları ve CD4/CD8 oranını sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştıran çalışmaların bir kısmında, bizim çalışmamızda olduğu gibi gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görülmektedir. Bir kısım çalışmada ise KOAH hastalarında CD8+ T hücre oranlarında artış, CD4/CD8 oranının da ise azalma ve bu parametreler ile solunum fonksiyonları ile korelasyon saptanmıştır. Bu parametrelerin KOAH hastalarında aktivasyon belirteci olarak kullanılması açısından elde edilen sonuçlar umut verici gözükmele birlikte bu konuda ve de özellikle CD4+ ve CD8+ T hücrelerin alt gruplarında daha çok ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

## VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde Türk toplumunda MBL polimorfizmi analizini içeren bir yayın saptanmamıştır. Çalışmamız bu konuda bir ilk olma özelliği taşımakta olup toplumumuzda MBL genotip frekansı yabancı literatürlerden farklı olarak saptanmıştır. Biz çalışmamızda heterozigot A/B varyantı sıklığını %82,5 (66/80) bulduğumuz halde literatürde bu oran ortalama %25'tir, homozigot D varyantı için bulduğumuz %15 (12/80) sıklık oranı literatürde %1'in altındadır ve çalışmamızda homozigot B varyantı için %2,5 (2/80) olarak saptadığımız sıklık oranı literatürde ortalama %4 olarak saptanmıştır.

Literatürde MBL polimorfizminde farklı varyantların serum MBL düzeylerinin daha düşük değerlerde olduğu ileri sürülmektedir. Bu varyantlar arasında çalışmamızda analiz ettiğimiz AB, B ve D varyanta sahip bireylerin de serum MBL düzeylerini düşük bekliyorduk. Homozigot B varyanta sahip yalnızca iki olgu saptadık ve her ikisinde de literatürle uyumlu şekilde serum MBL düzeylerini 50 ng/ml'nin altında saptadık. Ancak B varyant olgu sayısı çok az olduğundan (n=2) diğer varyantlarla istatistiksel kıyaslama yapmak mümkün olamamıştır. Olgularımızın % 82,5 oluşturan heterozigot AB olguları ile % 15 oluşturan homozigot D varyant arasında serum MBL konsantrasyonları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Hasta grupları arasında TLR ekspresyonunun açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışmamızda TLR-2 ekspresyonunun KOAH'ta klinik belirteç olarak kullanılamayacağı kanısına varılmıştır.

Çalışma gruplarımızda hem CD4+, CD8+ ve CD4/CD8 oranı için gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ancak buna rağmen

CD4+ T hücre oranları ile FEV<sub>1</sub> ve FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif korelasyon tespit ettik. Yine CD4/CD8 oranı ile FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif korelasyon saptadık. Bu korelasyonlar KOAH'ta klinik açıdan hastaların patogenezi değerlendirilmede bu parametrelerin anlamlı olduğunu düşündürmektedir.

Çalışma grupları arasında serum MBL konsantrasyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak buna rağmen MBL konsantrasyonları ile FEV<sub>1</sub> ve FEV<sub>1</sub>/FVC değerleri arasında negatif bir korelasyon, MBL düzeyleri ile CD4/CD8 oranları arasında negatif bir korelasyon tespit ettik. Yine sigara içimi ile serum MBL düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon saptadık. Serum MBL konsantrasyonunun KOAH 'ta en önemli risk faktörü olan sigara içimi ile pozitif, solunum fonksiyon testleri ile (FEV<sub>1</sub> ve FEV<sub>1</sub>/FVC ) ile negatif korelasyon göstermesi serum MBL değerinin KOAH'ta klinik bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. İleri klinik araştırmalarla daha çok KOAH hastası içeren çalışma gruplarında klinik evrelendirmeyle bu ilişkinin değeri daha net açığa çıkacaktır.

## VII. ÖZET

**Amaç:** Çalışmamızda KOAH hastalarında ve sigara kullanan bireylerde olası biyomarkırları incelemek amacıyla MBL polimorfizmi, serum MBL konsantrasyonu, CD4+ ve CD8+ ile CD4/CD8 oranı ve monositer TLR2 ekspresyonlarının klinikte uygulanan solunum fonksiyon testleriyle kıyaslanarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç yöntem:** Çalışmaya, Grup 1'e KOAH tanısı almış 20, Grup 2'ye KOAH tanısı almış ve sigara içen 20; Grup 3'e sigara içen ve solunum fonksiyon testi normal olan 20 ve Grup 4'e kontrol grubu olarak 20 birey dâhil edilmiştir. Serum MBL konsantrasyonları ELISA yöntemi ile MBL polimorfizmi RT-PCR tekniği kullanılarak saptandı. CD4 ve CD8 T hücre oranları ile monositer TLR2 ekspresyonu flow sitometri tekniği ile bakıldı. Kontrol grubu hariç diğer olgulara spirometrik solunum fonksiyon testi uygulanmıştır.

**Bulgular:** Tüm denekler incelendiğinde MBL A/B alleli %82,5 (66/80), homozigot D alleli %15 (12/80) ve homozigot B alleli %2,5 (2/80) sıklıkla tespit edilmiştir; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Serum MBL konsantrasyonu, Grup 1'de 2103±1311 ng/ml, Grup 2'de 2324±1001 ng/ml, Grup 3'de 1746±1142 ng/ml ve Grup 4'de 2040±879 ng/ml saptanmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. CD14+ hücrelerde yapılan TLR2 ekspresyon analizinde, Grup 1'de %56,41±24,49, Grup 2'de %64,47±22,93, Grup 3'de %64,18±23,47 ve Grup4'de %51,82±24,79 olarak saptanmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışma gruplarımızda hem CD4+, CD8+ ve CD4/CD8 oranı için gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ancak buna rağmen CD4+ T hücre oranları ile FEV<sub>1</sub> ve FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif korelasyon, CD4/CD8 oranı ile FEV<sub>1</sub>/FVC arasında pozitif korelasyon saptadık. MBL düzeyleri ile CD4/CD8 oranları arasında negatif bir korelasyon tespit ettik. Serum MBL konsantrasyonu KOAH 'ta en önemli risk faktörü olan sigara içimi ile pozitif, solunum fonksiyon testleri ile (FEV<sub>1</sub> ve FEV<sub>1</sub>/FVC) ile negatif korelasyon göstermektedir.

**Sonuç:** Bulgularımız CD4/CD8 oranı ve serum MBL değerinin KOAH'ta klinik bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu konu daha çok KOAH hastası içeren ileri klinik araştırmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır. Literatürde Türk toplumunda MBL polimorfizmi analizini içeren bir yayın saptanmamıştır. Çalışmamız bu konuda bir ilk olma özelliği taşımaktadır

**Anahtar kelimeler:** KOAH, sigara, TLR-2, CD4, CD8, MBL, MBL varyant, FEV<sub>1</sub>/FVC.

## VIII. SUMMARY

### **Assessments of Toll-like receptor 2 expression, mannose-binding lectin gene polymorphisms, serum mannose-binding lectin concentrations, CD4, CD8 ratio in chronic obstructive pulmonary disease patients and cigarette smokers**

**Aim:** The aim of the present study is to assess monocyte (CD14+) Toll-like receptor 2 expression (TLR-2), mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphisms, serum MBL concentrations, CD4+, CD8+ and CD4/CD8 ratio as possible biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients and in cigarette smokers and to search for possible correlations between the clinical pulmonary function tests.

**Materials and methods:** In this prospective study, 20 COPD patients were enrolled as Group 1, 20 COPD patients who were cigarette smokers were enrolled as Group 2, 20 cigarette smokers with normal pulmonary function tests were enrolled as Group 3 and 20 healthy volunteers were enrolled as the control group for Group 4. Circulating MBL concentrations were assessed by ELISA method and MBL gene polymorphisms were assessed by real time RT-PCR method. Flow cytometry method with monoclonal antibodies was used for the evaluation of lymphocyte subsets: CD4+ and CD8+ T lymphocytes and TLR-2 expression on CD14+ monocytes. Pulmonary function tests were performed to all cases except group 4 controls.

**Results:** In all cases MBL gene frequencies were found A/B allele 82,5% (66/80), homozygote D allele 15 % (12/80) and homozygote B allele 2,5% (2/80) and we found no statistical differences between the study groups.

Circulating MBL concentrations were found as  $2103\pm 1311$  ng/ml,  $2324\pm 1001$  ng/ml,  $1746\pm 1142$  ng/ml and  $2040\pm 879$  ng/ml respectively in Groups 1, 2, 3 and 4. No statistical difference was found between the study groups. TLR-2 expression on CD14+ monocytes  $56.41\pm 24.49\%$ ,  $64.47\pm 22.93\%$ ,  $64.18\pm 23.47\%$  and  $51.82\pm 24.79\%$  respectively in groups 1, 2, 3 and 4. No statistical difference was found between the study groups for TLR-2, CD4+, CD8+ and CD4/CD8 ratio. We found significant positive correlations between CD4+ T subsets and FEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>/FVC ratio, and between CD4/CD8 ratio and FEV<sub>1</sub>/FVC. We found negative correlations between serum MBL concentrations and CD4/CD8 ratio. Serum MBL concentration correlated positively with cigarette smoking and negatively with pulmonary function tests (FEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>/FVC).

**Conclusion:** Our results revealed that CD4/CD8 ratio and serum MBL concentration could correlate well with pulmonary function tests and could be used as one of the clinical biomarkers of COPD. However we believe these results still needs further investigation which includes larger series of COPD patients. Previously no study was performed in Turkish population about the MBL gene polymorphism and our study is the first article presenting this data.

**Key Words:** COPD, cigarette smoking, TLR-2, CD4, CD8, MBL, MBL variant, FEV<sub>1</sub>/FVC.



## IX. KAYNAKLAR

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global strategy for diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease updated 2008. ([www.goldcopd.org](http://www.goldcopd.org) )
2. The world health report 2004-changing history. 2005. Available at: <http://www.who.int/whr/2004/en/>
3. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance: United States,1971-2000. Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ 2002; 51: 1-16
4. Kocabaş A. KOAH'da doğal gelişim. Umut S, Yıldırım N. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı(içinde). İstanbul, Turgut Yayıncılık ve Ticaret Anonim Şirketi, 2005; B2:10-27
5. Baykal Y. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı üzerinde epidemiyolojik bir araştırma. Tüberküloz ve Toraks 1976; 24: 3-18
6. Sağlık Bakanlığı RSHMB Hıfzısıhha Mektebi Müdürlüğü Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkinlik Çalışması. Hastalık yüğü final raporu 2004 Ankara.
7. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. Lancet 2005; 365(9478):2225-36.
8. Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. Lancet 1997;350(9078):630-3.
9. National Heart, Lung, and Blood Institute. Morbidity and mortality chartbook on cardiovascular, lung and blood diseases. Bethesda, Maryland: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. Accessed at: <http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/cht-book.htm>; 2004

10. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 1999;13(5):1109-14.
11. Shapiro SD, Snider GL. Obstructive diseases. In: Nadel JA, Murray JF. *Textbook of Respiratory Medicine*. 4. Ed., Philadelphia: Curtis Center, 2005:1115-1153.
12. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364(9435):709-21.
13. Birring SS, Brightling CE, Bradding P, et al. Clinical, radiologic, and induced sputum features of chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers: a descriptive study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(8):1078-83.
14. Soriano JB, Visick GT, Muellerova H, et al. Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest* 2005;128(4):2099-107.
15. Johannessen A, Lehmann S, Omenaas ER, et al. Post-bronchodilator spirometry reference values in adults and implications for disease management. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(12):1316-25.
16. Wedzicha JA, Donaldson GC. Exacerbations of COPD. *Respir Care* 2003; 48: 1204-13.
17. R. M. Dommett, N. Klein, M. W. Turner. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*, The Authors Journal compilation 2006;68 :193–209.
18. Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 547–78.
19. Endo Y, Takahashi M, Fujita T. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, 2006: 211 (4): 283-293.
20. Takashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, et al. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 2004: 136: 585-590.

21. Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose binding lectin biology and clinical implications. *Internal Medicine Journal*, 2005; 35: 548-555.
22. Tsutsumi A, Takahashi R, Sumida T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 2005; 4 (6): 364-372.
23. Schafranski MD, Stier A, Nishihara R, Messias-Reason IJT. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic disease: a beneficial role for MBL deficiency. *Clin Exp Immunol*, 2004; 138: 521-525.
24. Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 1992; 176: 1497-502
25. Weis WI, Kahn R, Fourme R, Drickamer K, Hendrickson WA. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 1991; 254: 1608-15.
26. Weis WI, Drickamer K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure* 1994; 2: 1227-40.
27. Sheriff S, Chang CY, Ezekowitz RA. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol* 1994; 1: 789-94.
28. Palaniyar N, Nadesalingam J, Clark H, et al. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. *J Biol Chem* 2004; 279: 32728-36.
29. Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, et al. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem* 1987; 262: 7451-4.
30. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997; 386: 506-10.
31. Takahashi M, Endo Y, Fujita T, Matsushita M. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol* 1999; 11: 859-63.

32. Stover CM, Thiel S, Thelen M et al. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol* 1999; 162: 3481–90.
33. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 2001; 15: 127–35.
34. Miller ME, Seals J, Haye R, Levitsky LC. A familial plasma-associated defect of phagocytosis. *Lancet* 1968; 2: 60–3.
35. Turner MW, Mowbray JF, Robertson DR. A study of C3b deposition on yeast surfaces by sera of known opsonic potential. *Clin Exp Immunol* 1981; 46: 412–9.
36. Super M, Thiel S, Lu J, et al. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet* 1989; 2: 1236–9.
37. Sastry K, Herman GA, Day L et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med* 1989; 170: 1175–89.
38. Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J* 1989; 262: 763–71.
39. Lee YH, Witte T, Momot T, et al. The mannose-binding lectin gene polymorphisms and Systemic Lupus Erythematosus. Two case –control studies and meta-analysis. *Arthritis Rheum*, 2005; 52 (12): 3966-3974.
40. Tsutsumi A, Takahashi R, Sumida T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 2005; 4 (6): 364-372.
41. Moens L, Van Hoeyveld E, Peetermans W E, et al. Mannose-Binding Lectin Genotype and Invasive Pneumococcal Infection. *Human Immunology* 2006; 67: 605–611.
42. Crosdale DJ, Ollier WER, Thomson W, et al. Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relations to serum levels in UK Caucasoids. *Eur J Immunogenet* 2000; 27: 111.

43. Sumiya M, Super M, Tabona P et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991; 337:1569–70.
44. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; 40: 37–44.
45. Liu G, Zhao Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunology*, 2007; 122: 149–156.
46. Damo Xu, Haiying Liu and Mousa Komai-Koma. Direct and Indirect Role of Toll-Like Receptors in T Cell Mediated Immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 2004; 1(4): 239-246.
47. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7: 145-173.
48. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 1998; 8: 275-283.
49. O'Neill LA, Dinarello CA. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today.* 2000; 21: 206-209.
50. Sandor F, Buc M. Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands. *Folia Biologica (Praha)*, 2005; 51: 148-156.
51. Unutmaz D, Pileri P, Abrignani S. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med.* 1994; 180: 1159-1164.
52. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12: 13-19.
53. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1: 135-145.
54. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 984-993.
55. Arancibia S A, Beltrán C J, Aguirre I M, et al. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biol Res.* 2007; 40: 97-112.

56. Wieland Cw, Knapp S, Florquin S, et al. Non-mannose capped lipoarabinomannan induces lung inflammation via toll-like receptor 2. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170: 1367-74.
57. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13766-71.
58. Sato M, Sano H, Iwakı D, et al. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NFkappa B activation and TNF-alpha secretion are downregulated by lung collectin surfactant protein, A. *J Immunol*, 2003;171: 417-25
59. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*: 2001;167: 416-23.
60. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SI, et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; 197: 1107-17.
61. Hermoso MA, Matsuguchi T, Smoak K, Cidlowski JA. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 4743-56.
62. Yüksel H. Alerjik yanıtta genetik faktörler ve gen çevre etkileşimi. *Sağlıkta Birlik* 2006; Cilt:1 Sayı:1.
63. Folds J. D, Overview of Immunity. In: O'Gorman MRG, Donnenberg AD, eds. *Handbook of human immunology*, 2nd ed. New York: CRC Pres, 2008(1):18-23.
64. McCullough, KC, Summerfield A. Basic concepts of immune response and defense development, *ILAR J*. 2005; 46: 230.
65. Obhrai, J.S, Oberbarnscheidt M.H, Hand T.W, et al. Effector T cell differentiation and memory T cell maintenance outside secondary lymphoid organs, *J. Immunol*. 2006; 176: 4051.
66. Castellino F, Germain R.N. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where and how, *Annu. Rev. Immunol* 2006; 24: 519.

67. Shortman K, Liu Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes, *Nat. Rev. Immunol* 2002: 2: 151.
68. Neurath M.F, Finotto S, Glimcher L.H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity, *Nat. Med.* 2002: 8: 567.
69. Sigal L.H. Basic science for the clinician 32: T-cells with regulatory function, *J. Clin. Rheumatol.* 2005: 11: 286.
70. Tatlıcıoğlu T. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve geleceği. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2007: 55(3): 303-318
71. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet* 1997: 349: 1498-504.
72. Yang IA, Seeney SL, Wolter JM, et al. Mannose-binding lectin gene polymorfism predicts hospital admissions for COPD infections. *Genes Immun* 2003: 4: 269-74.
73. Ytting H, Christensen I.J, Thiel S, et al. Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise scandinavian. *Journal of Immunology* 2007: 66: 458–464.
74. MacDonald S L, Downing I, Turner M, Kilpatrick D C. Is mannan-binding lectin (MBL) detectable on monocytes and monocyte-derived immature dendritic cells? *Biochemical Society Transactions* 2008: 36: 1497–1500.
75. Wang X, Saito J, Tanino Y, et al. Mannose binding lectin gene polymorphisms and asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2007: 37: 1334–1339.
76. Dahl M, Nordestgaard B G. Markers of early disease and prognosis in COPD. *International Journal OF copd* 2009:4: 157-167.
77. Uğuz A, Berber Z, Coskun M. ve ark. Mannose binding lectin levels in children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005: 16(3): 231-5.
78. Kaur S, Gupta V K, Shah A, et al. Elevated levels of mannan-binding leptin (MBL) and eosinophilia in patients of bronchial asthma with allergic rhinitis and allergic bronchopulmonary aspergillosis associate with a novel

- intronic polymorphism in MBL. *Clinical and Experimental Immunology* 2006; 143: 414–419
79. Aittoniemi J, Soranummi H, Rovio A T, et al. Mannose-binding lectin 2(MBL2) gene polymorphism in asthma and atopy among adults. *Clinical and Experimental Immunology*, 2005: 142: 120–124.
  80. Hogg JC. Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 71-5.
  81. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-53.
  82. Pan MM, Sun TY, Zhang HS. Expression of toll-like receptors on CD14+ monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease and smokers. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008; 88(30): 2103-7.
  83. Pons J, Sauleda J, Regueiro V, et al. Expression of Toll-like receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research* 2006; 7: 64.
  84. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:852–7.
  85. Saetta M, Di Stefano A, Graziella T, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822–6.
  86. Kim WD, Kim WS, Koh Y, et al. Abnormal peripheral blood T-lymphocyte subsets in a subgroup of patients with COPD. *Chest* 2002; 122(2): 437–44.
  87. Lewis SA, Pavord ID, Stringer JR, et al. The relation between peripheral blood leukocyte counts and respiratory symptoms, atopy, lung function, and airway responsiveness in adults. *Chest* 2001;119(1):105–14.
  88. Leckie MJ, Jenkins GR, Khan J, et al. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69+ CD103+). *Thorax* 2003;58: 23–9.



89. Majori M, Corradi M, Caminati A, et al. Predominant Th1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:458–62.
90. Glader P, Wachenfeldt K, Löfdahl CG. Systemic CD4+ T-cell activation is correlated with FEV1 in smokers. *Respiratory Medicine* 2006;100: 1088–1093.
91. Kulawik J D, Hoser G, Dabrowska M, et al. Increased proportion of Fas positive CD8+ cells in peripheral blood of patients with COPD. *Respiratory Medicine* 2007; 101: 1338–1343.
92. Rufino R, Costa CH, Souza HSP et al. Induced sputum and peripheral blood cell profile in chronic obstructive pulmonary disease *J Bras Pneumol*. 2007; 33(5): 510-518.