

Sarkoidozlu Hastaların Bronkoalveolar Lavaj Sıvılarındaki Yangı Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Yöntemle İncelenmesi

Analysis of Inflammatory Cells with Immunohistochemical Method in Bronchoalveolar Lavage Fluids of Sarcoidosis Patients

Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI,^a
Dr. Matem TUNÇDEMİR,^a
Dr. Gültekin KANER,^b
Prof.Dr. Nail YILMAZ,^c
Prof.Dr. Günseli KILINÇ,^c
Prof.Dr. Selma YILMAZER^a

^aTıbbi Biyoloji AD,
^cGöğüs Hastalıkları AD,
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
^bİstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Emekli Öğretim Üyesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 01.05.2011
Kabul Tarihi/Accepted: 02.12.2011

Bu çalışma, VII. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi (18-21 Eylül 2001, Eskişehir)'nde tebliğ edilmiştir.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Prof.Dr. Selma YILMAZER
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji AD, İstanbul
TÜRKİYE/TURKEY
sylimaze@istanbul.edu.tr

ÖZET Amaç: Sarkoidoz patogenezi iyi bilinmeyen sistemik bir hastalıktır. Olguların %50'sinde akciğer tutulumu görülür. Pulmoner sarkoidozla birlikte görülen kontrolsüz T hücresi proliferasyonu ve zararlı kimyasal mediyatörlerin salınması gibi patolojik olaylar immünolojik mekanizmalar ile açıklanabilir. Pulmoner sarkoidozda Th1 sitokinlerinin ve makrofaj aktivasyonu ile ilgili sitokinlerin sunumunun tercih edildiğini gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte, sitokin sunumu konusunda yeterince çalışılmamıştır. Bu çalışmada, sarkoidozlu hastaların akciğerlerinde görülen yangısal olayların başlaması ve devamından sorumlu olan hücre tiplerini ve bu yangısal reaksiyonları yönlendirmede önemli olabilecek sitokinlerin sunumunu araştırmayı amaçladık. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada 7 sarkoidozlu hasta ile 7 sağlıklı kontrolden alınan bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısından sitosantrüfijde hazırlanan preparatlar kullanıldı. Tüm örneklerde CD4 ve CD8 monoklonal antikorları ile immün boyama yapılarak T hücresi alt tiplerinin dağılımı araştırıldı. Ayrıca T yardımcı-1(Th1) tipi sitokinlerden olan interferon gama (IFN γ) ve bir makrofaj belirteci olan CD68 ekspresyonu da immünohistokimyasal olarak incelendi. **Bulgular:** Sarkoidozlu hastaların BAL sıvılarından hazırlanan sitosantrüfij preparatlarında lenfosit sayısında sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($p=0,002$) bir artış saptandı. T lenfositleri alt gruplarının incelenmesi sonucunda CD4(+) yardımcı T hücrelerinin (Th) (%21,59 \pm 0,87) CD8(+) baskılayıcı T hücrelerine (Ts) (%10,40 \pm 0,59) kıyasla çoğunlukta olduğu gözlemlendi. Th/Ts (CD4+/CD8+) oranı sarkoidoz grubunda 2/1 olarak saptandı. Sarkoidozlu hastaların BAL preparatlarında IFN γ sunumu yapan T hücrelerine rastlandı. CD68 sunumu, sarkoidozlu gruptaki makrofajların yanı sıra, bazı dev hücreler, lenfositler ve polimorf nüveli lökositlerde de görüldü. **Sonuç:** Bulgularımız, yardımcı T lenfositlerdeki artışın, sarkoidoz patogenezinde katılan önemli bir faktör olduğunu ve artmış lenfositlerin Th1 tipi sitokinlerin sunumunu tercih ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Sarkoidoz; CD4-pozitif T-lenfositler; CD8-pozitif T-lenfositler; makrofajlar, alveolar; CD68 antijeni, insan; IFN-gama(95-132) peptid

ABSTRACT Objective: Sarcoidosis is a systemic disease with an unclear pathogenesis. Pulmonary involvement develops in 50% of cases. Pathologic events like uncontrolled T cell proliferation and release of harmful mediators seen in pulmonary sarcoidosis may be explained with immunologic mechanisms. Pulmonary sarcoidosis has been shown to be related to an increased production of Th1 cytokines and an activation of macrophages. However, cytokine expression in sarcoidosis has not been systematically studied yet. In this study, we aimed to investigate the cell types responsible for initiation and maintenance of inflammatory reactions in the lungs of sarcoidosis patients and expression of cytokines, which are the chemical mediators that may be important for the management of these inflammatory reactions. **Material and Methods:** In this study, slides prepared in cyto-centrifuge from bronchoalveolar lavage (BAL) fluids obtained from 7 sarcoidosis patients and 7 healthy controls were used. All samples were immune stained with CD4 and CD8 monoclonal antibodies and distribution of T-cell subtypes were investigated. Additionally, a T-helper (Th1) cytokine, interferon gamma (IFN γ) and a macrophage marker, CD68 expression were immunohistochemically analyzed. **Results:** A significant increase ($p=0.002$) was detected in lymphocyte count in cyto-centrifuge prepares from BAL fluids of sarcoidosis patients compared to healthy controls. The analysis of T lymphocyte subgroups revealed that CD4 (+) helper T cells (Th) (21.59 \pm 0.87%) were higher compared to CD8 (+) suppressor T cells (Ts) (10.40 \pm 0.59%). Th/Ts (CD4+/CD8+) ratio was 2/1 in the sarcoidosis group. T cells with IFN γ expression were encountered in BAL slides of sarcoidosis patients. Giant cells, lymphocytes and polymorphonuclear leucocytes were also present in addition to macrophages in the sarcoidosis group with CD68 expression. **Conclusion:** Our findings demonstrate that T lymphocyte elevation is an important factor contributing to the pathogenesis of sarcoidosis and increased lymphocytes prefer Th1 type cytokine expression.

Key Words: Sarcoidosis; CD4-positive T-lymphocytes; CD8-positive T-lymphocytes; macrophages, alveolar; CD68 antigen, human; IFN-gamma(95-132) peptide

doi:10.5336/medsci.2011-24410

Copyright © 2012 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32(3):652-8

Sarkoidoz, bilateral lenfadenopati, pulmoner infiltrasyon, deri ve göz lezyonları ile birlikte görülen multisistemik granümatöz bir hastalıktır.^{1,2} Klinik olarak hastaların %50'sinde akciğer semptomları görülür. Hastalığın patogenezi iyi bilinmemekle beraber, kontrolsüz immünolojik olayların önemli bir rol oynayabileceğini gösteren deliller mevcuttur. Pulmoner sarkoidozla birlikte görülen kontrolsüz T hücresi proliferasyonu ve zararlı kimyasal mediyatörlerin salınması gibi patolojik olaylar immünolojik mekanizmalar ile açıklanabilir. Hastalık bölgesindeki aktive olmuş T hücrelerinin ve makrofajların pulmoner sarkoidoz patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmekle birlikte, T hücrelerinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.^{3,4} Akciğerlerin astım gibi diğer immünolojik hastalıklarında aktif hâle gelmiş T lenfositlerinin katılımı gösterilmiştir.^{5,6}

Bronkoalveolar lavaj (BAL), akciğer parankim hastalığını güvenilir bir şekilde gösteren bir materyaldir. Sarkoidozlu hastaların BAL sıvısında flow sitometri yöntemi ile CD4 (+) yardımcı T lenfosit (Th) sayısında belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir.⁷ Son yıllarda, CD4 (+) Th hücreleri, ürettikleri sitokinlere göre çeşitli alt gruplara ayrılmıştır. Bu farklı yardımcı T hücresi fenotiplerinin varlığı, fare üzerinde yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiştir.⁵

Yardımcı T hücrelerinin normalde belli bir sitokin profili sunduğu ve bunların atopik hastalıklarda Th2 tipine dönüşme eğilimi gösterdiği, tüberkülozda ise Th1 tipi sitokinlerin üretildiği ileri sürülmektedir. Pulmoner sarkoidozda Th1 sitokinlerin ve makrofaj aktivasyonu ile ilgili sitokinlerin sunumunun tercih edildiğini gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte, sitokin sunumu konusunda yeterince çalışılmamıştır.⁸⁻¹¹ Sarkoidozlu hastalarda hastalığın ileri evrelerinde Th2 tipi sitokinlerin sunumlarının arttığı veya bazı hastalarda hastalığın başlangıcından itibaren Th2 tipi sitokinlerin sunumunun sürekli bir şekilde baskın olduğu bildirilmiştir.^{12,13} Ayrıca sarkoidoz hastalarının BAL sıvılarından elde edilen T hücresi klonlarında, Th1 ve Th2 tipi sitokinlerin eşit seviyede sunulduğu bulunmuştur.¹⁴ Bu çelişkili sonuçlar ne-

deniyle konunun daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Akım sitometri yöntemi ile yapılan çalışmalar, BAL sıvısındaki hücre fenotiplerini hızlı ve güvenilir bir şekilde saptamakla birlikte, immünohistokimyasal yöntemle intraselüler sitokin boyanması, sitokin sunumunu araştırmak için uygun bir yöntemdir ve sitokinlerin farklı hücrelerdeki olası dağılımları ve hücre içi yerleşimleri hakkında ek bilgiler verme potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, sarkoidoz hastalarının BAL preparatlarında CD4+ ve CD8+ T hücresi alt tiplerinin dağılımını ve Th1 tipi sitokinlerin sunumunu belirlemek amacıyla, IFN γ ve makrofaj ile ilişkili bir intraselüler membran glukoproteini olan CD68 sunumunu immünohistokimyasal yöntemle araştırarak değerlendirmeyi amaçladık.¹⁵

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilen randomize prospektif bir çalışmadır. Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, radyolojik, klinik, bronkoskopik incelemeler, BAL incelemesi ve diğer teknikler ile sarkoidoz tanısı konan ve bildirilerek yazılı izinleri alınmış 7 hasta ile akciğer patolojisi bulunmayan 7 sağlıklı kontrolden alınan BAL örnekleri üzerinde yapılmıştır.

Hastalardan toplanan BAL sıvıları steril propilen tüplere alındı, santrifüj edilerek üst faz ayrıldı. Pellet süspanse edilip tekrar santrifüj edilerek sitosantrifüj preparatları hazırlandı. Sitosantrifüj preparatları fosfat tamponu ile hazırlanan %2 formaldehit ile 15-30 dakika fikse edildi. Yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra -20°C'de saklandı. Diferansiyel hücre sayımı için preparatlar hematopoetik sistem hücrelerini en iyi gösteren Wright-Giemsa yöntemi ile boyandı.¹⁶ Işık mikroskobu (Olympus BH2, Japonya) ile 400 büyütmede her lamda 200 hücre sayıldı, yüzde değerleri hesaplandı.

İMMÜNOHİSTOKİMYA

Sitosantrifüj preparatlarına, CD4 (Novo Castra Laboratories, NCL-CD4-1F6, UK) ve CD8 (Novo Castra

Labrotories, NCL-CD8-4B11, UK) monoklonal antikorları ile inkübasyonunu takiben DAKO LSAB^R2 System Peroxidase Kiti (DAKO, K0675, CA 93013, USA) immünohistokimyasal boyama yapıldı. Ayrıca IFN γ (R&D Systems, AF-285-NA, USA) ve CD68 (DAKO, Mo718) antikorlarının uygulanmasından sonra, alkali fosfat azantibi alkali fosfat az (APAAP) yöntemi ile immün boyama yapıldı.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmada kullanılan grupların lenfosit, makrofaj ve granülosit sayımlarının ve CD4 ve CD8 immün pozitifliklerinin değerlendirilmesinde non-parametrik Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Tüm gruplardaki verilerin normal dağılım gösterdikleri, Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak saptandı. Anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak alındı.

BULGULAR

BAL sıvısından hazırlanan sitosantrifüj preparatlarında diferansiyel hücre sayımı sonucunda, sarkoidozlu hastalardaki lenfosit sayısında ($24,17 \pm 5,81$) sağlıklı kontrol ($8,47 \pm 1,71$) grubuna kıyasla anlamlı ($p=0,002$) bir artış görüldü. Makrofaj sayısında ise sarkoidoz grubunda ($68,93 \pm 6,38$) kontrol grubuna ($88,38 \pm 2,67$) kıyasla anlamlı ($p=0,002$) bir azalma vardı. Polimorf nüveli lökosit sayısında sarkoidoz grubunda ($7,33 \pm 4,60$), sağlıklı kontrol grubuna ($3,34 \pm 1,34$) kıyasla anlamlı olmayan bir artış saptandı ($p=0,64$) (Tablo 1).

T lenfositlerinin alt tiplerinin saptanması amacıyla CD4 ve CD8 antikorları ile immün boyama yapılan preparatların değerlendirilmesi sonucunda, CD4 (+) yardımcı T (Th) lenfositlerinin ($21,59 \pm 0,87$) CD8(+), baskılayıcı T (Ts) hücrelerine ($10,40 \pm 0,59$) kıyasla baskın olduğu görüldü.

Th/Ts (CD4+/CD8+) oranı sarkoidoz grubunda 2/1 olarak saptandı (Tablo 2). CD4 ve CD8 monoklonal antikorları ile boyanan sitosantrifüj preparatları ışık mikroskobu ile incelendiğinde, hem kontrol grubunda (Resim 1A ve 2A) hem de sarkoidozlu (Resim 1B ve 2B) grupta, her iki antijenin de genellikle T lenfositlerinin yüzeyinde lokalize olduğu gözlemlendi. Sarkoidoz grubuna ait bazı sitosantrifüj preparatlarında makrofaj, dev hücre ve polimorf nüveli lökositlerin sitoplazmasında da CD4 için immün pozitiflik görüldü (Resim 1C).

Sarkoidoz hastalarının BAL preparatlarında T hücrelerinde IFN γ sunumu immünohistokimyasal yöntemle gösterildi. IFN γ için immün pozitifliğin intrasitoplazmik yerleşim gösterdiği belirlendi (Resim 3B). Kontrol grubunda IFN γ immün reaksiyonu görülmedi (Resim 3A).

CD68 antikorları ile immün boyama yapılan sarkoidozlu gruba ait preparatlarda çok sayıda makrofaj, bazı dev hücreler, lenfositler ve polimorf nüveli lökositlerde kuvvetli CD68 pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmün işaretlenmenin genellikle intrasitoplazmik yerleşim ve granüller halinde dağılım gösterdiği belirlendi. Bazı makrofajların yüzeyinde de immün pozitiflik mevcuttu. Yüzey pozitifliği kesintili bir çizgi şeklinde görüldü. Sağlıklı kontrol grubunda ise az sayıda BAL hücresinde CD68 sunumu saptandı (Resim 3C-F).

TARTIŞMA

Çalışmamızda 7 sarkoidoz hastası ile akciğer patolojisi bulunmayan 7 sağlıklı kontrolden alınan BAL sıvısından hazırlanan sitosantrifüj preparatlarında diferansiyel hücre sayımı sonucunda, sarkoidozlu hastalarda lenfosit sayısında, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış görüldü. Makrofaj sa-

TABLO 1: BAL sıvısından hazırlanan sitosantrifüj preparatlarında diferansiyel hücre sayımlarının istatistiksel sonuçları.

| Grup | Lenfosit (%) | Makrofaj (%) | Granülosit (%) |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | Arit.ort. \pm st. Sapma (Ortanca) | Arit.ort. \pm st. Sapma (Ortanca) | Arit.ort. \pm st. Sapma (Ortanca) |
| Kontrol (n=7) | 8,47 \pm 1,71 (8,79) | 88,38 \pm 2,67 (88,23) | 3,34 \pm 1,34 (3,46) |
| Sarkoidoz (n=7) | 24,17 \pm 5,81 (25,77) | 68,93 \pm 6,38 (68,84) | 7,33 \pm 4,60 (6,33) |
| p değeri | p=0,002 | p=0,002 | p=0,064 |

n: Hasta sayısı; Arit.Ort. \pm St. Sapma: Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma.

yısında sarkoidoz grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenirken, polimorf nüveli lökosit sayısında sarkoidoz grubunda, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir artış olduğu belirlendi. BAL sıvısının incelenmesi ile alveolar hücrelerin değerlendirilmesi, çeşitli interstisyel akciğer hastalıklarının patogenezinin aydınlatılmasında çok yararlı olmuştur. Sarkoidozun en çok yerleştiği organ akciğerlerdir. Bu nedenle, hastalığın patogenezi üzerindeki pek çok araştırma, hastalığın akciğer tutulumu ile ilgilidir. Son yıllarda BAL'ın rutin kullanıma girmesi, akciğer sarkoidozunda immün cevabın nasıl düzenlendiğinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Sarkoidozlu hastalarda ilk saptanan BAL bulgusu, lenfosit sayısında artış olmasıdır.¹⁷⁻¹⁹ BAL sıvısının incelenmesinde kullanı-

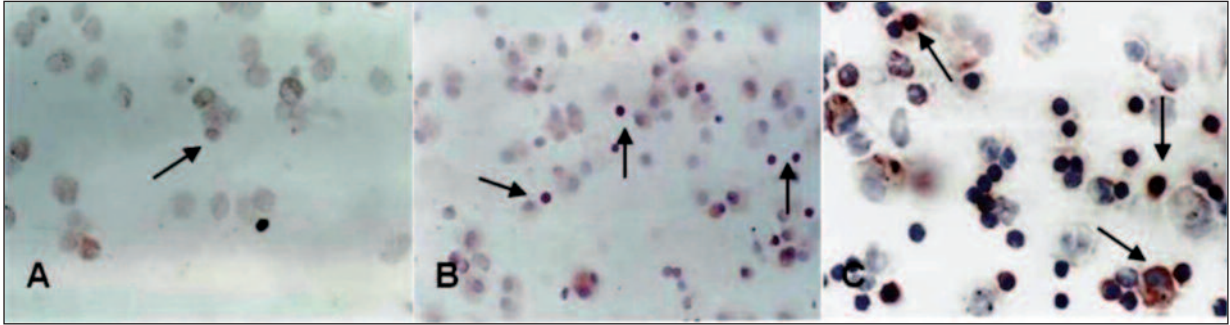
lan metotlar, ışık mikroskopunda immün boyama ve akım sitometresidir. BAL sıvısında lenfosit alt gruplarının dağılımının incelenebilmesi için, lenfosit miktarının belli bir düzeyde olması gerekmektedir.^{18,19} Bazı araştırmacılar, rutin mikroskopik çalışmada lenfosit sayısı total hücre sayısının %10'undan daha düşükse bu çalışmayı yapmamışlardır. Akım sitometrisi kullanıldığı zaman ise len-

TABLO 2: Sarkoidozlu hasta grubunda CD4 (+) ve CD8 (+) hücre sayımı sonuçları.

| | CD4+ | CD8+ |
|-----------------|-------------|-------------|
| Sarkoidoz (n=7) | %21,59±0,87 | %10,40±0,59 |

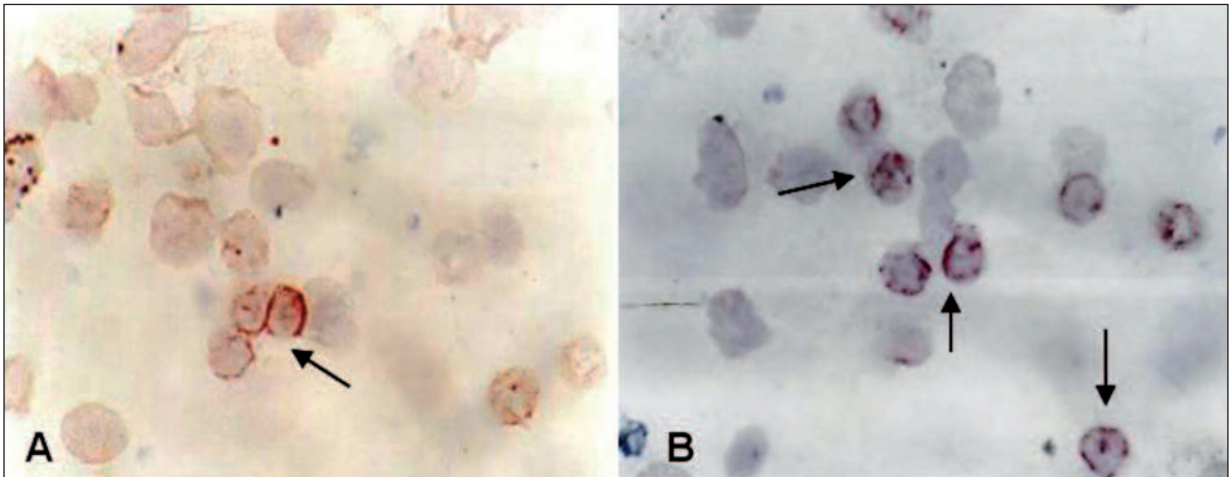
n: Hasta sayısı

Th/Ts (CD4/CD8)= 2/1.



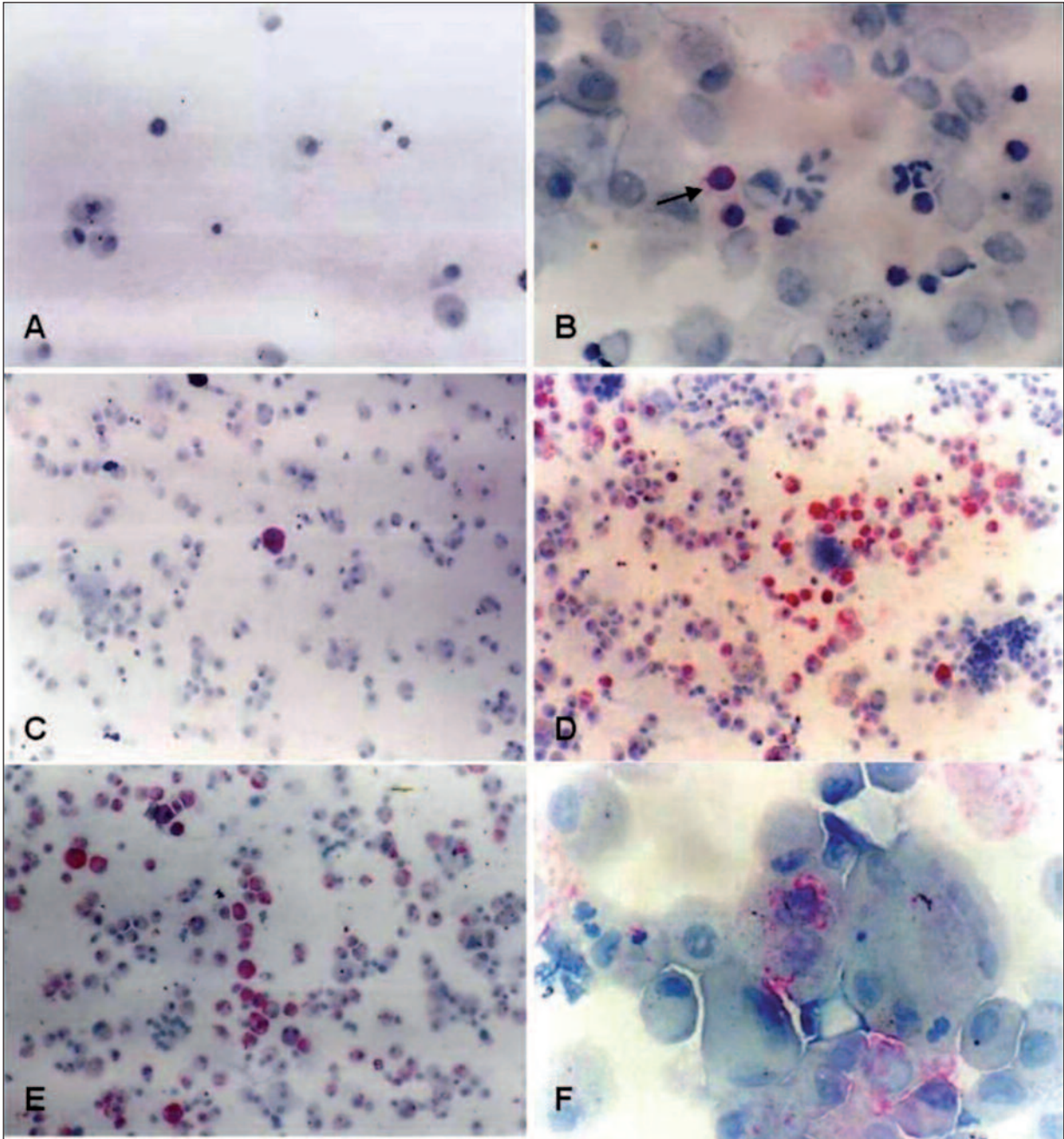
RESİM 1: Bronkoalveolar lavaj preparatlarında CD4 (+) lenfositler. Kontrol grubu (A) Sarkoidozlu hasta grubu (B,C). Sarkoidozlu hasta grubunda çok sayıda CD4 immün pozitif lenfosit (†) görülmektedir. İmmünohistokimyasal boyama: CD4 monoklonal antikoruna ile Streptavidin Biotin Peroksidaz. Zıt Boya: Hemotoksilen (A,C; X40), (B; X20).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 2: Bronkoalveolar lavaj preparatlarında CD8 (+) lenfositlerin (†) gösterilmesi. Kontrol grubu (A). Sarkoidozlu hasta grubu (B). İmmünohistokimyasal boyama: CD8 monoklonal antikoruna ile Streptavidin Biotin Peroksidaz. Zıt Boya: Hemotoksilen X40.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 3: Bronkoalveolar lavaj preparatlarında IFN γ ve CD68 sunumu yapan hücrelerin gösterilmesi. IFN γ ; Kontrol grubu (A), sarkoidozlu hasta grubu (B). Sarkoidozlu hasta grubunda IFN γ için immünpozitif hücreler (†) görülmektedir. CD68; Kontrol grubu (C) Sarkoidozlu hasta grubu (D-F). Sarkoidozlu hasta grubunda CD68 pozitif reaksiyon veren makrofaj, lenfosit, dev hücreler ve polimorf nüveli lökositler görülmektedir (D-E). CD68 (+) reaksiyon hem hücre yüzeyinde hem de sitoplazmik yerleşim göstermektedir (F). İmmünohistokimyasal boyama: IFN- γ ve CD68 antikorları ile Alkali Fosfataz Anti Alkali Fosfataz (APAAP). Zıt Boya: Hemotoksilen (A-C; X40), (D,E; X20), (F;X100). (Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

fosit sayısı az da olsa lenfositlerin alt grup dağılımı incelenebilmiştir. Bu nedenle çoğu çalışmalar akım sitometrisi sonuçlarına dayalıdır. Normalde BAL'dan elde edilen hücrelerin %80-90'ını alveolar makrofajlar %5-10'unu lenfositler %3-5'ini gra-

nülositler oluşturur. Sarkoidozlu hastalarda %26-54 arasında artmış lenfosit oranları bildirilmiştir.¹⁸ Bizim çalışmamızda ise bu artış %24,17 \pm 5,81 olarak bulunmuştur. Bu artış, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,01$).

Sarkoidozlu hastalarda artmış olan lenfositlerin CD4 (+) yardımcı T lenfositleri ve HLA-DR+CD3+ aktif T lenfositleri olduğu bildirilmiştir.²⁰ Çalışmamızda, sitosantrifüj preparatlarında immün boyama yaparak CD4 (+) ve CD8 (+) hücrelerinin sayımı sonucunda sarkoidozlu hastaların BAL preparatlarında CD4 (+) yardımcı T lenfositlerinin sayısının, CD8 (+) baskılayıcı T hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, akım sitometri sonuçları ile uyumlu bulunmaktadır.^{21,22} Sarkoidozda lenfositik alveolitin yardımcı T/baskılayıcı T oranında belirgin bir yükselme ile birlikte olduğu bildirilmiştir. CD4+/CD8+ T lenfositlerinin oranı normalde BAL'da, kandaki değerine yakın olup 1 civarındadır. Sarkoidozda bu artış çeşitli çalışmalarda 10/1'e kadar olmak üzere değişen oranlarda bulunmuştur.¹⁸ Bizim çalışmamızda artış 2/1 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlarımız önceki çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. Ancak kontrol grubunda lenfosit sayısının %10'un altında olması nedeniyle kullandığımız yöntemle bu grupta T lenfositleri alt tiplerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi mümkün olmamıştır.

CD4+ T hücreleri ve makrofajların yangı alanında toplanması, sarkoidozda granülatöz lezyon oluşumuna neden olan olaylardan biridir.²³ T hücresinden salınan sitokinlerin pulmoner sarkoidoz patogenezi katılımları son yıllarda araştırma konusu olmuştur. Akciğerde IL-2, IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin salınmasından, bu hastalıkta görülen T lenfosit proliferasyonunun sorumlu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca IL-2, IL-12 ve IFN γ gibi T yardımcı tip 1 (Th1) sitokinlerin seviyelerinin artmış olduğu, in situ hibridizasyon tekniği kullanılarak gösterilmiştir. Bu Th1 tipi sitokinlerin, hastalığın patolojisinde, özellikle de granülatöz lezyonların gelişmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Th1 tipi sitokin sunumu, diğer granülatöz hastalıklarda ve özellikle tüberkülozda da görülür.²⁴ Birçok otoimmün hastalıkta IFN γ 'nın sunumunun artmış olduğu tespit edilmiştir. IFN γ , Th1 hücreleri, NK (doğal öldürücü) hücreler, dendritik hücreler ve sitotoksik T hücreleri tarafından üretilir.²⁵ Sarkoidozlu hastaların BAL preparatlarındaki lenfositlerde kontrol grubuna kıyasla belirgin IFN γ sunumu saptamamız, sarkoidozda Th1 tipi sitokinle-

rin sunumunun görüldüğünü bildiren önceki çalışmaları desteklemektedir.

IFN γ salgılayan Th1 hücreleri tarafından uyarılan alveolar makrofajlar da sarkoidozda aktif haldedir. Ancak sarkoidozlu hastalara ait BAL preparatlarında makrofajlara yönelik yeterince çalışma yapılmamıştır. CD68, bir makrofaj belirteci olan 110 Kd'luk bir transmembran glukoproteini-dir.²⁶ Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber, elektron mikroskopik immün altın işaretleme çalışmaları ile lizozomal bir membran proteini olduğu ve geç endozomal kompartmanda bulunduğu belirlenmiş, ayrıca az miktarda hücre yüzeyinde de bulunabildiği gösterilmiştir.²⁷ İnsanda monosit ve makrofajlarda bol miktarda sunulmaktadır.^{28,29} Ayrıca fibroblastlarda, epidermal dendritik hücrelerde, astrosit ve mikroglia hücrelerinde, dev hücreler ve osteoklastlarda CD68 sunumu gösterilmiştir.³⁰⁻³⁴ Nötrofillerin primer granüllerinde bulunur. İltihabi reaksiyonlarda sunumunun arttığı bildirilmiştir.¹⁵ Aktif haldeki CD4 (+) ve CD8 (+) T lenfositlerinde de CD68 sunumunun uyarıldığı gösterilmiştir.³⁵ Bizim çalışmamızda, sarkoidozlu hastaların BAL sıvılarındaki makrofajlarda, hem intrasitoplazmik hem de hücre yüzeyinde CD68'in sunumunun artmış olduğu gözlemlendi. Ayrıca bazı dev hücreler, lenfositler ve polimorf nüveli lökositlerde de kuvvetli CD68 pozitif reaksiyon gözlemlendi.

Sonuçlarımız, yardımcı T lenfositlerindeki artışın, sarkoidoz patogenezi katılan önemli bir faktör olduğunu ve artmış lenfositlerin Th1 tipi sitokinlerin sunumunu tercih ettiğini göstermektedir. Ayrıca, akım sitometri yönteminin hassasiyetine karşın BAL preparatlarında immünohistokimyasal yöntemle hücre fenotiplerinin ve sitokin dağılımlarının incelenmesinin, araştırılan antijenlerin hücresel dağılımlarını ve hücre içi yerleşimlerini açığa çıkararak katkı yaptığını göstermektedir.

Teşekkür

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizlerindeki yardımlarından dolayı Prof.Dr. Ahmet Dirican'a teşekkür ederiz. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-569/240698 ve B-1260/15082001.

KAYNAKLAR

1. Thomas PD, Hunninghake GW. Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1987;135(3):747-60.
2. Kucuk NO, Ozkan E, Uzun B, Celik O, Kumbasar O, Aras G. Evaluation of extrapulmonary Ga-67 uptake in sarcoidosis: a retrospective analysis. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29(2):375-80.
3. Minshall EM, Tscopoulos A, Yasruel Z, Wallaert B, Akoum H, Vorng H, et al. Cytokine mRNA gene expression in active and nonactive pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997;10(9):2034-9.
4. Grunewald J, Eklund A. Role of CD4+ T cells in sarcoidosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4(5):461-4.
5. Muro S, Minshall EM, Hamid QA. The pathology of chronic asthma. *Clin Chest Med* 2000; 21(2):225-44.
6. Güler MZ, Kılıç İ, Ergün P, Atalay F. [Immunology of sarcoidosis]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 1997;17(2):91-6.
7. Hunninghake GW, Crystal RG. Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N Engl J Med* 1981;305(8): 429-34.
8. Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* 1985;75(5):1488-95.
9. Moller DR, Forman JD, Liu MC, Noble PW, Greenlee BM, Vyas P, et al. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996;156(12):4952-60.
10. Saltini C, Spurzem JR, Lee JJ, Pinkston P, Crystal RG. Spontaneous release of interleukin 2 by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis is primarily from the Leu3+DR+ T cell subset. *J Clin Invest* 1986; 77(6):1962-70.
11. Mroz RM, Korniluk M, Stasiak-Barmuta A, Chyczewska E. Increased levels of interleukin-12 and interleukin-18 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *J Physiol Pharmacol* 2008;59(Suppl 6):507-13.
12. Moller DR. Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999;16(1):24-31.
13. Moller DR. Pulmonary fibrosis of sarcoidosis. New approaches, old ideas. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(3 Suppl):37-41.
14. Bäumer I, Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Th1/Th2 cell distribution in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16(2):171-7.
15. Rabinowitz SS, Gordon S. Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med* 1991;174(4): 827-36.
16. Yılmaz N. [Basics of Respiratory Cytology]. *Solunum Hastalıklarında Sitolojik Bulguların Tanı Değeri*. 1. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2011. p.33-74.
17. Peterson MW, Nugent KM, Jolles H, Monick M, Hunninghake GW. Uniformity of bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1988;137(1): 79-84.
18. Klech H, Haslam P, Turner-Warwick M. Worldwide clinical survey on bronchoalveolar lavage (BAL) in sarcoidosis. Experience in 62 centers in 19 countries. Preliminary analysis. *Sarcoidosis* 1986;3(2):113-22.
19. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007;28(5):486-95.
20. Sipahi S, Karayel T, Demirci S, Çağatay T, Yarıdağ H. [The distribution of T lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis]. *Klinik Gelişim* 1998;11(11-12):1676.
21. Bencic D, Batinic D, Cucevic I, Boranic M, Milulinic N. The role of T-lymphocyte subpopulation in bronchoalveolar lavage in pulmonary parenchyma diseases. *Sarcoidosis* 1990;7(2): 106-9.
22. Lin CC, Hung CC, Huang WC, Lin CY. [T-cell subpopulation of bronchoalveolar lavage fluid in patients of sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis--2 cases report]. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1988;21(1):67-74.
23. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 1997;336(17):1224-34.
24. Taha RA, Minshall EM, Olivenstein R, Ihaku D, Wallaert B, Tscopoulos A, et al. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(4):1119-23.
25. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007;96: 41-101.
26. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993; 81(6):1607-13.
27. Horikawa T, Komohara Y, Kiyota E, Terasaki Y, Takagi K, Takeya M. Detection of guinea pig macrophages by a new CD68 monoclonal antibody, PM-1K. *J Mol Histol* 2006;37(1-2): 15-25.
28. Pulford KA, Sipos A, Cordell JL, Stross WP, Mason DY. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int Immunol* 1990;2(10):973-80.
29. Lewis S, Singh D, Evans CE. Cyclic hydrostatic pressure and cotton particles stimulate synthesis by human lung macrophages of cytokines in vitro. *Respir Res* 2009;10:44.
30. Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Gotfried E, Brockhoff G, Krause SW, et al. [The "classical" macrophage marker CD68 is strongly expressed in primary human fibroblasts]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2003;87:215-23.
31. Petzelbauer P, Födinger D, Rappersberger K, Volc-Platzner B, Wolff K. CD68 positive epidermal dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1993; 101(3):256-61.
32. Pihlaja R, Koistinaho J, Kauppinen R, Sandholm J, Tanila H, Koistinaho M. Multiple cellular and molecular mechanisms are involved in human A β clearance by transplanted adult astrocytes. *Glia* 2011;59(11):1643-57.
33. Mosqueda-Taylor A, Martinez-Mata G, Carlos-Bregni R, Vargas PA, Toral-Rizo V, Cano-Valdéz AM, et al. Central odontogenic fibroma: new findings and report of a multicentric collaborative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112(3):349-58.
34. Hasegawa T, Hirose T, Seki K, Sano T, Hizawa K. Transforming growth factor alpha and CD68 immunoreactivity in giant cell tumours of bone: a study on the nature of stromal and giant cells, and their interrelations. *J Pathol* 1993;170(3):305-10.
35. Hameed A, Hruban RH, Gage W, Pettis G, Fox WM 3rd. Immunohistochemical expression of CD68 antigen in human peripheral blood T cells. *Hum Pathol* 1994;25(9):872-6.