

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI
ANABİLİMDALI

**KİTİN VE KİTİNAZIN ALLERJİK
REAKSİYONDAKİ ROLÜ
TÜBİTAK (SBAG-2908/104S443)**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Dilara F. KOCACIK

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Olcay YEĞİN**

**“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”
“Tübitak tarafından desteklenmiştir”**

ANTALYA 2007

Teşekkürler

Tüm pediatri eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Olcay Yeğın'e,

Katkılarından dolayı Akın Yeşilkaya'ya,

Değerli hocalarım Uğur Yavuzer ve Ayşen Bingöl'e,

Tezim boyunca titizlikle ve sabırla çalışan tüm immunoloji ekibine ve biyokimya çalışanlarına,

Hediye olarak kitin mikropartiküllerini gönderen Peter Strong'a,

Deri biyopsilerine katkılarından dolayı Dermatoloji A.B.D ve Dr. Çiçek Durusoy'a,

Deneilerimde benden kanlarını esirgemeyen Dr. Fatih Çelmeli'ye ve çalışma arkadaşlarıma,

Başta Cezmi Akdiş ve Mübeccel Akdiş olmak üzere tüm SIAF (İsviçre Allerji ve Astım Araştırma Enstitüsü) çalışanlarına,

Tezimin tüm aşamalarında daima yanımda olduğu için Vedat'a,

Bu günlere gelmemi sağlayan Anne ve Babama,

En içten teşekkürlerimi sunuyorum

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	v
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Astım	3
2.2. Atopik Dermatit	15
2.3. Kitin,Kitinazlar ve Astım	20
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1. Periferik kan mononükleer hücre ayrılması	28
3.2. Elispot	29
3.3. Elisa	30
3.4. mRNA izolasyonu	32
3.5. cDNAsentezi	33
3.6. RT-PCR	33
4. BULGULAR	36
4.1. Elispot Verileri	36
4.2. Elisa Sonuçları	40
4.3. RT-PCR Sonuçları	43
5.TARTIŞMA	46
6.SONUÇLAR	50
7.ÖZET	51
8.ABSTRACT	53
9.KAYNAKLAR	55

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

AD	:	Atopik Dermatit
AMCase	:	Acidic Mammalian Chitinase (Asidik Memeli Kitinazı)
APC	:	Antijen Sunan Hücre
CD	:	Diferansiyasyon (Farklılaşma) Demeti
CMP	:	Kitin Mikropartikülü
DC	:	Dendritik Hücre
ECP	:	Eosinofil Katyonik Protein
ELİSA	:	Enzim Bağlı İmmun Assay
ELİSPOT	:	Enzim Bağlı İmmunospot
EPO	:	Eosinofil Peroksidaz
FcR	:	İmmunglobulinler için Fc Reseptörü
GM-CSF	:	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HLA	:	İnsan Lökosit Antijeni
Ig	:	İmmunglobulin
IL	:	İnterlökin
LP	:	Lipopolisakkarit
LT	:	Lökotrien
MCP	:	Monosit Kemoatraktan Protein
MHC	:	Major Doku Uyum Kompleksi
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PG	:	Prostaglandin
PHA	:	Fitohemaglutinin
RES	:	Retiküloendotelyal Sistem
TGF	:	Dönüşüm Sağlayan Büyüme Faktörü
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

2.1. Astımda allerjik inflamasyon	8
2.2. JAK-STAT Sinyal Yolağı ve Th ₁ -Th ₂ Yanıtı	11
2.3. Kitin ve glikozaminin moleküler yapısı	21
2.4. Fare AMCcase mRNA'sının dokulardaki dağılımı	23
2.5. İnsan AMCcase mRNA'sının dokulardaki dağılımı	24
2.6. Kitinaz aracılı havayolu aşırı duyarlılığının ve inflamasyonun şematik gösterimi	27
4.1. Mononükleer hücre ve T lenfositlerin kitin mikropartiküllerinin değişen dozlarına ve PHA' ya TNF- α yanıtı	36
4.2. Sağlıklı ve atopik kişilerde PHA, CMP, Kitin ve duyarlı oldukları allerjene TNF- α yanıtı	37
4.3. Sağlıklı ve atopik kişilerde PHA, CMP, Kitin ve duyarlı oldukları allerjene IFN- γ yanıtı	38
4.4. Sağlıklı ve atopik kişilerde PHA, CMP, Kitin ve duyarlı oldukları allerjene IL-4 yanıtı	39
4.5. Sağlıklı kontrol Elisa IFN- γ yanıtı	40
4.6. Atopik grup Elisa IFN- γ yanıtı	41
4.7. Sağlıklı kontrol Elisa IL-13 yanıtı	42
4.8. Atopik grup Elisa IL-13 yanıtı	42
4.9. Atopik Dermatitli hastaların deri biyopsilerinden elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüleri	43
4.10. Atopik Dermatitli hastaların deri biyopsilerinden elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüleri	44
4.11. Atopik dermatitli hastaların sağlıklı ve lezyonlu deri biyopsilerinde AMCcase ekspresyon düzeyleri	44
4.12. Mononükleer hücrelerin değişik zaman dilimlerinde PHA, Polen, CMP ile uyarımı sonucu AMCcase yapımı	45

1. GİRİŞ

Allerjik astım havayolunun kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Hastalığın gelişiminde Th₂ tipi sitokinlerin önemli rolü olduğu, bu sitokinlerin etkisi ile gelişen yangının akciğer eozinofilisi, artmış serum IgE düzeyleri, havayolu aşırı duyarlılığı, artmış mukus sekresyonu ve geriye dönüşümlü hava yolu daralmasının hastalığın temel özelliklerini oluşturduğu bilinmektedir (2,3).

Özellikle IgE yapımı ve eozinofil aktivasyonu ile karakterize Th₂ tipi immün yanıtın, normal koşullarda, öncelikle parazitlere karşı immün savunmada önemli olduğu bilinmektedir ve bu parazitlerin çoğunluğu kitin içermektedir. İnsanların besin kaynakları arasında kitin içeren maddelerin bulunmaması ancak insanlarda kitini parçalayan kitinaz aktivitesi gösteren enzimlerin saptanması, bu enzimlerin doğal savunmada önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak Th₂ tipi immün yanıtla kitinaz indüksiyonu ya da aktivasyonu arasında bir bağlantı olması akla yakın görülmektedir.

Th₂ tipi yanıtın baskın olduğu ve bunun etyopatogenezde en önemli faktör olduğu düşünülen allerjik hastalıklara gelince, ev-tozu akarı, hamam böceği ve mantarlar gibi atopik hastalıkların en yaygın rastlanan allerjenleri kitin içermektedir ve deneysel fare astım modelinde Th₂ tipi sitokinlerin kitinazlarla ilişkili olduğunu düşündüren veriler yayınlanmıştır (37).

Bu bilgilerin ışığında allerjik hastalığı olan bireylerin immün sisteminin kitin içeren bu allerjenleri, henüz bilinmeyen bir algaçla belirleyip, parazit saldırısı olduğu şeklinde algıladığı ve bu nedenle anti-paraziter olduğu iyi bilinen Th₂ tipi immün yanıtı geliştirdiği düşünülebilir. Bu hipotez allerjik hastalıkların etyopatogenezine yeni bir bakış açısı getirmektedir. Kitinazın (Acidic Mammalian Chitinase; AMCCase) özellikle allerjik yangı reaksiyonunun etkin kolunda önemli rolü olduğunun gösterilmesi yeni tedavi yaklaşımlarını da gündeme getirebilir.

Ancak yapılan çalışmalarda AMCCase'in astımdaki havayolu yangısına nasıl katıldığı, kitin dışındaki substratlarının neler olduğunu gösteren çalışmalar yetersizdir. Kitinin mikropartikül şeklinde verilmesinin Th₂ yanıtının aksine Th₁ yanıtına neden olduğunun gözlenmesi kitin ve kitin mikropartiküllerinin farklı yolları etkileyebileceği sorusunu gündeme getirmiştir. Çalışmalarda deneysel fare modelleri kullanılmış, fare ve insanda enzimin farklı işlevleri olduğu

gösterilmiştir. İnsan hücreleri kullanılarak yapılan invitro doz yanıt eğrisi ve sitokin salınımı ile ilgili veriler yetersizdir. Deneysel astım modelinde gözlenen bu kitinaz aktivasyonunun akciğer dokusuna özel bir durum mu olduğu, yoksa diğer dokulardaki alerjik yanıtlarda da aktive olup olmadığı bilinmemektedir. Örneğin, diğer bir Th_2 baskın hastalık olan Atopik dermatitte AMCase'ın durumu konusunda hiçbir veri bulunmamaktadır.

Bu çalışmada biz, atopik dermatitte deri biyopsilerinde AMCase'ın durumunu araştırmayı, ayrıca kitin ve kitin mikropartiküllerinin atopik ve sağlıklı kontrollerin mononükleer hücrelerini nasıl etkilediğini incelemeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astım

2.1.1. Tarihçe

Astım kelimesi yunanca ‘ aazein’ yani soluk soluğa nefes alma kelimesinden gelmektedir. Astım kelimesi ilk olarak 2700 yıl önce Homer’in İliadında tanımlanmıştır. Homer’in destanına göre astım kısa-sık nefes alma, güç nefes alma, sık sık nefes alma olarak tanımlanmıştır.

Hipokrat astımı tıbbi durum olarak ilk milattan 450 yıl önce tanımlamıştır. Galen 6 yüzyıl sonra astımla ilgili daha çok tanımlama yapmış, kısmi ya da tam bronşial obstruksiyona neden olduğunu açıklamıştır.

İspanyol hekim ve filozof Moses Maimonides 1190 yılında tanı, tedavi ve önlemleri tanımlamış, astımlı hastaların kirli hava ve stresten uzak durmalarını, dengeli beslenme ve spor yapmalarını öğütlemiştir.

Bernardino Ramazzini 17. yüzyılda, astım ile organik tozlar arasındaki ilişkiyi not etmiştir. 1901 yılında bronkodilatatörler kullanılmaya başlanmış, ancak 1960’larda inflamatuvar mekanizmaların tanımlanması ile tedavi rejimine anti-inflamatuvar ilaçlar da eklenmiştir (1).

2.1.2. Tanım

Havayolu aşırı duyarlılığı hastalığı olarak ta bilinen astım dünyanın en önde gelen sağlık sorunlarından biridir. Astım mast hücreleri, eosinofiller, T lenfositler, makrofajlar, nötrofiller, epitel hücrelerinin rol aldığı hava yolunun kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. İnflamasyon sonucu özellikle gece ve/veya sabah saatlerinde tekrarlayan nöbetler halinde öksürük, hışıltı (wheezing), hırıltılı solunum, solunum sıkıntısına neden olmaktadır. Havayolu daralması tedaviyle ve/veya kendiliğinden geri dönebilmektedir. Tetikleyici ajanlarla karşılaşma sonrası gelişen bronş düz kaslarındaki kasılma, mukozal inflamasyon, ödem, yoğun mukus sekresyonu ve havayolundaki kalıcı yapısal değişiklikler astımdaki havayolu daralmasının nedenidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda astımın tam anlamıyla geri dönüşümlü bir hastalık olmadığını, havayollarında oluşan yeniden yapılanma (remodeling) nedeniyle bazı kalıcı yapısal değişikliklere neden olduğu

ortaya çıkarılmıştır. Solunum yolu infeksiyon ajanları, allerjenler, stres, egzersiz, iritan maddelerin inflamasyonda önemli rol oynayan tetikleyiciler olduğu bilinmektedir (2,3).

2.1.3. Epidemiyoloji

Astımın görülme sıklığı ülkeden ülkeye hatta aynı ülkede bölgesel farklılık göstermektedir. Gelişmiş toplumlarda ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) yöntemi ile astım prevalansı %4-23 arasında bulunmuştur. Ülkemizde ISAAC yöntemi ile yapılan çocukluk çağı prevalans çalışmalarında ise, kümülatif astım prevalansı %13.7-15.3 arasında değişmektedir. İzmir ilinde 6-13 yaş arası çocuklarda yapılan bir çalışmada, astım kümülatif prevalansı %4.9 olarak bulunmuştur (5).

Çocukluk yaş gurubunda E/K: 2/1 iken puberteden sonra E/K:1/1 olmaktadır. Çocukluk çağı astımlıların % 50-60'ı ergenlikten sonra iyileşmektedirler.

2.1.4. Risk Faktörleri (10)

Kişisel faktörler

- Genetik yatkınlık
- Atopi
- Havayolu aşırı duyarlılığı
- Cinsiyet
- İrk/ Etnik özellikler

Çevresel faktörler

- Allerjenler
- Mesleki ajanlar ve Hava kirliliği
- Solunum sistemi infeksiyonları
- Sosyoekonomik düzey
- Diyet ve ilaçlar
- Obesite
- Sigara dumanı maruziyeti

Szentivani ve ark. (1) 1968 yılında astımda beta adrenerjik teoriyi tanımlamıştır. Bu teoriye göre beta-2 reseptörlerin blokajının astıma neden olduğu düşünülmektedir. 1995 yılında ise atopik hastalarda IgE aşırı üretimi olduğunu tanımlamışlardır.

Astım ve diğer allerjik hastalıklardaki prevalans artışının nedeni ile ilgili olarak en etkileyici açıklama ilk kez 1989 yılında David Strachan tarafından yapılmıştır. Strachan'a göre; "Son yüzyıl süresince aile yapısının küçülmesi, ev içi konforundaki iyileşme, kişisel temizlik standartlarında yükselme, ailedeki genç bireyler arasında çapraz enfeksiyonları azaltmıştır. Bu durum, atopik hastalıkların yaygınlaşmasına neden olabilir." Bu teoriyi destekleyen birçok epidemiyolojik çalışmada, ailedeki birey sayısı arttıkça astım gelişme riskinin azaldığı, ayrıca yuvaya başlama yaşının erken oluşunun da benzer şekilde enfeksiyon ajanları ile karşılaşmayı arttırarak astım hastalığı gelişimine karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır.

İnfeksiyon ajanlarının allerjik hastalıklara yakalanma riskini azalttığını gösteren bir destek de Avrupa'da çiftlikte yaşayan, erken yaşta inek sütü içen bebeklerde ileri yaşlarda allerjik hastalık riskinin anlamlı azaldığını gösteren çalışmalardan gelmiştir. Birçok araştırmacı bu durumu erken yaşta bakteriyel endotoksinlerle temasın atopik hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdiği yönünde yorumlamaktadır. Endotoksinler gram-negatif bakterilerin hücre duvarının dış yapısını oluşturan lipopolisakkaridlerdir. Bu yapılara ve genel olarak hücre içi bakterilere karşı verilen immün yanıt allerjik hastalıklara karşı koruyucu olan Th₁ tipindedir (11,12).

2.1.4.1. Astım ve Genetik

Astımın genetik bir hastalık olduğuna dair yeterince veri bulunmaktadır. Ailesel birikim göstermesi, tek yumurta ikizlerinde ikisinde birden astım görülme oranının (konkordans) çift yumurta ikizlerinden daha fazla olması astımın genetik geçişli bir hastalık olduğunu destekleyen bulgulardır(6). Ailesinde atopi bulunmayan bireylerde astım görülme sıklığı %5-10 arasında iken, babada atopi öyküsü olanlarda 2 kat, annesinde atopi öyküsü bulunanlarda 3 kat, her ikisinde de atopi öyküsü varsa 10 kat arttığı bildirilmektedir. Bu güne kadar astım ve atopi

ile ilişkili birçok kromozom ve genetik mutasyon tanımlanmıştır. Ancak tanımlanan bu genlerin hiçbirisi kesin olarak astım ve atopinin patogenezi ile ilişkilendirilememiştir.

Astım poligenik kompleks bir hastalık olarak ele alınmakta ve oluşumunda birden fazla gen ile çevresel faktörlerin birlikte etkilerinin rol oynadığı düşünülmektedir.

Araştırmalar astım ve ilişkili fenotiplerin ailesel birikim gösterdiğini ortaya koymaktadır. Astımlı hastaların çocuklarının yaklaşık % 25'inde astım veya ilişkili fenotiplerden herhangi birinin mevcut olduğu sonucu çıkmaktadır. Genetik serilere göre multipl popülasyon örneklerinde astım ve atopi ile ilişkili olabilecek yaklaşık 19 kromozomal bölge belirlenmiştir.

HLA tiplerinin allerjik hastalık ya da atopi gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Ev tozu akar duyarlılığı ile HLA sistemi arasındaki ilişki incelendiğinde ev tozuna spesifik IgE yanıtı ile kromozom 6p21, 13q32-34 ve 5q23-33 arasında ilişki olduğu saptanmıştır (6,7).

Erken çocukluk döneminde geçirilen infeksiyonlar atopi gelişimini engellemektedir, bakteri hücre duvarında bulunan LPS, IL-12 salınımını uyarmakta ve Th₁ yanıtını güçlendirmektedir. Monosit, makrofaj ve nötrofillerin yüzeyinde CD14 molekülü bulunmakta ve bu molekül LPS reseptörü olarak görev yapmaktadır. Kromozom 5 üzerinde yerleşen CD14 molekülündeki polimorfizmlerin yüksek IgE düzeyleri ile kolere olduğu saptanmıştır. Ayrıca IL-12 β polimorfizmlerinin de erken dönemde özellikle kız çocuklarda akciğer fonksiyonlarında azalma ile ilişkili olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (6).

Kromozom 11q üzerinde yerleşen yüksek affiniteli IgE reseptör genindeki polimorfizmlerinin de astım ve atopi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. β_2 reseptör genindeki mutasyonların astımın şiddeti ve tedaviye yanıtta ilişkili olabileceği gösterilmiştir (9).

Astım patogenezinde önemli rol oynayan IL-4, IL-13 sitokinlerinde ve bunların reseptörlerine, STAT-6 molekülünde meydana gelen polimorfizmlerinde yaşamın erken döneminde atopi gelişimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kromozom 20 üzerinde yer alan metalloproteinaz ailesinin bir üyesi olan ADAM33 polimorfizmleri incelenmiş, bu

polimorfizmlerin astımda yeniden yapılanma (remodeling) ve bronş aşırı duyarlılığı gelişiminde önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (6-9).

Görüldüğü gibi birçok genin polimorfizmi ile astım arasında ilişki bildirilmiştir ancak bunların çoğu başka toplumlarda veya daha geniş araştırmalarla doğrulanmamıştır. Sonuç olarak kişinin genetik yapısına bağlı olarak ve çevresel faktörlerin de eklenmesi ile duyarlılığın değişik düzeylerde olabileceği görüşü ağırlık kazanmaktadır.

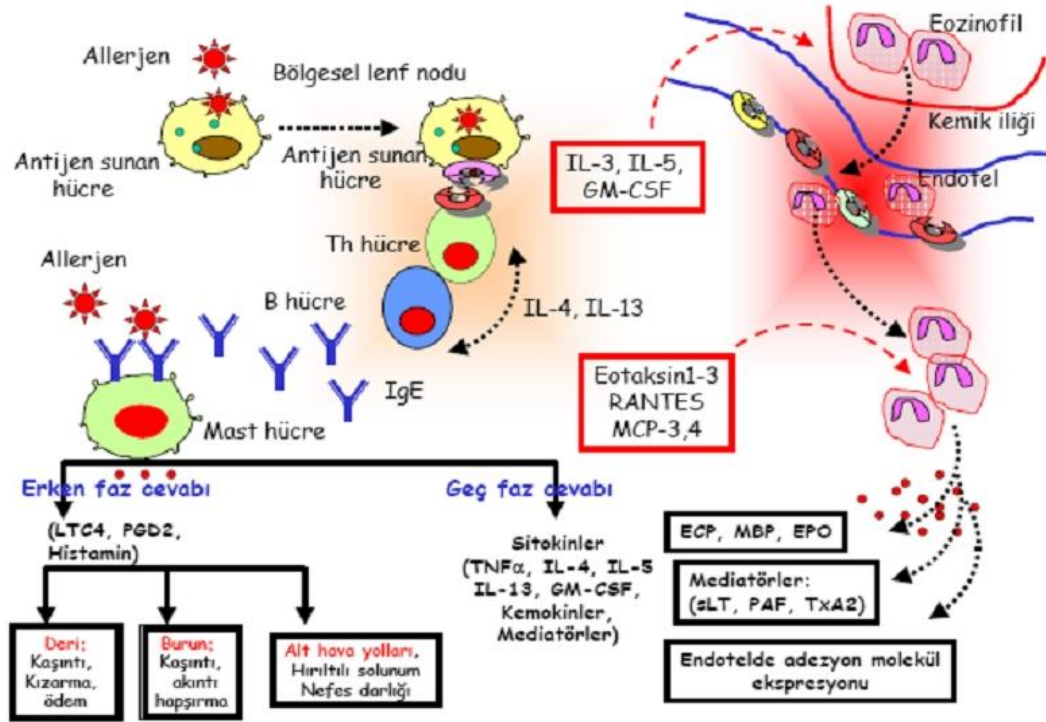
2.1.5. Patofizyoloji

Astım patogenezi oldukça karışık ve henüz yeterince açıklanamamış olmakla birlikte temel mekanizmanın havayolu duvarındaki inflamasyon ve bunun yol açtığı havayolu akımında kısıtlanma ve artmış havayolu duyarlılığı olduğu öne sürülmektedir. Kişide varolan bir genetik yatkınlığa, çevresel faktörlerin de katkısıyla ortaya çıkan bozulmuş immüno-regülasyon ve/veya dengesiz nöral kontrol ve/veya uyarılmış non immünolojik non nöral yol ile oluşan kronik inflamasyon, bronş astımı patogenezinin temelini oluşturmaktadır.

Astımda erken tip hipersensitivite reaksiyonunun rol oynadığı bir inflamasyon söz konusudur. Erken tip hipersensitivite reaksiyonunun temelini oluşturan allerjik inflamasyon, erken fazda mediatör salınımının gerçekleştiği, geç fazında ise başlıca T lenfosit ve eozinofiller olmak üzere ortama hücre göçü ve kronik inflamasyonu ile karakterize bir patolojidir (Şekil 2.1.).

Erken faz cevap, tetiklenen mast hücrelerinden hızla salınan mediatörler ile oluşan bir reaksiyon tipi iken, genelde 6-8 saat sonra asıl olarak hücresel elemanların rol aldığı geç faz yanıt gözlenmektedir. Mast hücreleri sadece erken faz yanıtında değil geç faz cevabında da önemli rol alan mediatör ve sitokinler sentezleyerek, endotel, eozinofil ve IgE yapımı üzerinde etkili olmaktadır. Geç faz yanıt başlıca eozinofilden zengin olmak üzere lenfosit, nötrofil ve bazofil içeren hücre topluluğunun oluşturduğu bir tablodur. T hücre, mast hücre ve aktif epitel hücrelerinden salınan IL-3, IL-5 ve GM-CSF kemik iliğinde eozinofil farklılaşmasına, çoğalmasına ve dolaşıma geçmesine neden olurlar. Eozinofillerin hedef dokuda toplanmaları çeşitli sitokinler, adezyon molekülleri ve kemokinlerin etkileşimleri sonucu gerçekleşmektedir. Eozinofiller içerdikleri toksik ürünler

nedeniyle inflamasyonun geç fazının effektör hücreleridir. İçerdikleri MBP, ECP, EPO ve eozinofil kökenli nörotoksin özellikle solunum yolu için toksiktir ve epitelde dökülmeye neden olur. Vasküler geçirgenlikte artmaya, düz kas kontraksiyonuna, düz kas hipertrofisine, mukus bezlerde hipertrofiye ve eozinofil göçüne yol açan sisteinil lökotrienlerin de ana kaynağı eozinofillerdir. Eozinofiller ayrıca makrofajlara benzer şekilde ekstrasellüler matriks yıkımına neden olan matriks metalloproteinazlarını sentezlerler. Geç fazdaki değişiklikler başlıca hava yolu epitelindeki hasarlanma ve bununla paralel olarak düz kas hipertrofisi, bazal membranda kalınlaşma, ekstrasellüler matriksin yapısındaki değişimler ile seyretmektedir (10).



Şekil 2.1. Astımda allerjik inflamasyon (10)

2.1.6. İmmunoregülasyon

Organizmaya allerjenin girmesi ve antijen sunan hücre ile karşılaşması sonucunda immün yanıt başlamaktadır. Antijen sunan hücre (APC) tarafından allerjen ufak peptit yapılara dönüşmekte ve bölgesel lenf bezlerindeki T hücrelerine sunulmaktadır. Th₀ hücrelerinin effektör fonksiyon kazanması ve proliferasyonu için dendritik hücre (DC) gibi antijen sunan hücrelere ihtiyacı

vardır. Antijen sunumu antijen sunan hücre ile Th₀ hücrelerin karşılıklı olarak bir etkileşime girmeleri ile gerçekleşmektedir. T hücreleri, sadece hücrelerin yüzeylerinde bulunan major doku uyum grup proteinlerine (MHC - Major Histocompatibility Complex) bağlanan antijenleri tanıyabilir. İki sınıf MHC proteini bulunmaktadır. MHC-I tüm vücut hücre yüzeylerinde gösterilebilir ve sitotoksik CD8⁺ T hücrelerine antijen sunarlar. MHC-II özellikle makrofajlarda bulunmak üzere antijeni CD4⁺T hücrelerine sunarlar. T hücre aktivasyonu için iki sinyale ihtiyaç vardır. Birincisi T hücre reseptörünün APC yüzeyindeki antijen-MHC kompleksine bağlanması, ikincisi T hücre yüzeyinde bulunan CD28 proteinin APC yüzeyindeki ligandı olan B7 (CD80/CD86) ye bağlanmasıdır. Aktive olan Th₀ hücreler ortamdaki sitokin düzeyi, aktive olan transkripsiyon faktörleri, sunulan antijenin ve antijen sunan hücrenin özelliğine göre Th₁ veya Th₂ yönünde farklılaşır (3).

Ortamda IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 gibi sitokinler ve T-bet, STAT-4 (Signal transducer and activator of transcription) transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle hücrel immüniteden sorumlu Th₁ hücrelerine farklılaşırlar. Th₁ hücreleri IL-2, IFN- γ , TNF- β salınımına sebep olurlar. Hücre içi patojenlere karşı savunmada bu sitokinler B hücrelerine etki ederek Ig E sentezinin baskılanmasında rol alırlar.

Ortamda IL-4 sitokini, GATA-3 ve STAT-6 gibi transkripsiyon faktörleri etkisiyle de Th₂ yönünde farklılaşma olmaktadır. IL-4, IL-5,IL-6,IL-10,IL-13 salgırlar. IL-3, GM-CSF, TNF- α ise her iki T hücre grubunda yapılmaktadır. Th₂ hücrelerinden salınan bu sitokinler helmint gibi hücre içi patojenlere karşı savunmada rol alırlar, aynı zamanda B hücreleri,mast hücreleri, bazofiller, eosinofiller için kemoatraktan sitokinler olup büyüme ve farklılaşmalarında da rol almaktadırlar. IL-4 ve IL-9 mast hücre maturasyonunda rol alırken, GM-CSF, IL-3, IL-5 eozinofillerin diferansiyasyon ve matürasyonunda, IL-6 eozinofil ve mast hücrelerin aktivasyonunda önemlidir (3,4). Th₂ lenfositten salgılanan IL-4 ve IL-13 aracılığı ile IgG ve IgM üreten plazma hücresi B hücrelerine dönüşerek (izotip kayması) IgE yapımına yol açarlar. Sentezlenen IgE bir süre kanda serbest olarak dolaştıktan sonra yüksek afiniteli IgE reseptörü taşıyan (Fc ϵ RICD64) dokudaki mast hücreleri ile dolaşımdaki bazofillere ve düşük afiniteli IgE reseptörü taşıyan (Fc ϵ RIICD23) lenfosit, eozinofil, trombosit ve makrofajlara bağlanmaktadır.

IgE'nin kendisi için yüksek afiniteli reseptör taşıyan mast hücrelerine bağlanması allerjik inflamasyonun ilk klinik bulgusu olan "erken faz reaksiyonun" gözlenmesine neden olmaktadır.

Solunum yolu ile tekrar allerjenle karşılaşmada, allerjen mast hücrelerinin yüzeyindeki IgE molekülü ile bağlanarak "mast hücrelerinin aktifleşmesine" neden olur. Mast hücre aktivasyonu, hücredeki mevcut ve yeni sentezlenmiş bir takım ürünlerin salınımına (degranüle olmasına) yol açar. Başta histamin olmak üzere bradikinin, serotonin gibi mediatörlerin salınımı allerjik inflamasyonun ilk birkaç dakikasında oluşan erken faz cevabına yol açarak bronş düz kasında kasılmaya ve damar geçirgenliğinde artışa neden olurlar. Bu olaylar kliniğe nefes darlığı ve hırıltılı solunum şeklinde yansımaktadır. Salınan sitokinler hücrelerin adezyonuna, eozinofillerin migrasyon, aktivasyon ve yaşamlarını sürdürmelerine ve kollajen birikimi ile başta bazal membranın kalınlaşması olmak üzere fazladan onarımların başlamasına neden olurlar.

Antijenle karşılaşımından 6-8 saat sonra araşidonik asit oluşmakta, araşidonik asit metabolitleri olan lökotrienler, (LTB₄-LTC₄-LTD₄-LTE₄) (SRS-Aveya sisteinil lökotrienler), prostoglandinler (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂), tromboksan A₂ ve PAF (platelet activating factor) ortaya çıkmaktadır. Bu metabolitler astımın kronik dönem bulguları olan mukozal kalınlaşma, düz kas hipertrofisi gibi bulgulardan sorumlu tutulmaktadır.

Eozinofillerin tetiklediği nöropeptidler nöral mekanizmayı uyararak inflamasyonu ve kronikleşmeyi daha da arttırırlar. Sonuçta eozinofiller astımda 'remodelling' denen yeniden şekillenmeye yol açan ana hücrelerdir.

Mukoza ve submukozada bulunan alveoler makrofajlar da aktive olup, alveoler makrofaj kaynaklı büyüme ve değişim faktörleri salgırlar. Bu da fibroblastlarda kollajen yapımını hızlandırır. Kollajen bazal membranlarda birikir ve onları kalınlaştırır ve remodelling olayına katkıda bulunur.

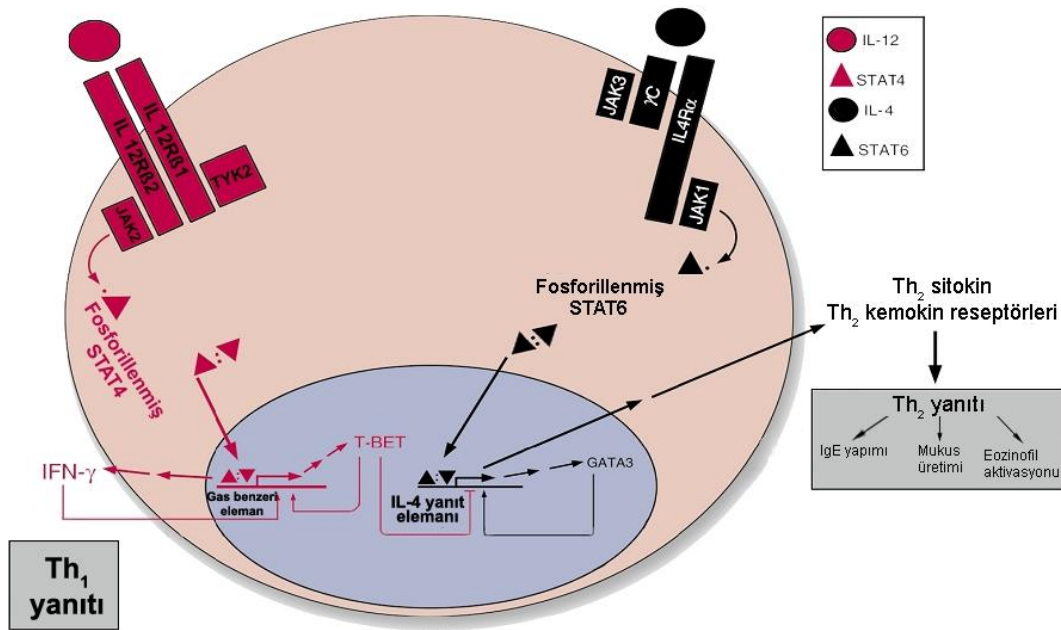
Astımda bazı adezyon moleküllerinin endotel, epitel, lökosit yüzeylerinde artmış ekspresyonları saptanmıştır. Bunlardan en iyi bilinenleri VCAM-1 (Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü), ICAM-1 (Hücre içi adhezyon molekülü), ELAM-1 (Endotelyal-lökosit adhezyon molekülü) artışıdır. Bu da lümene eozinofil geçişini başlatarak, inflamasyonu arttırır. Bunun dışında endotelde artmış E -

selektin, VLA-1, VLA-4 (Very Late Activation Antigen) ekspresyonları da bildirilmiştir (3-5,9).

IL-12 ve/veya IL-12 reseptör (IL-12 R) eksikliği olan fare modellerinde Th₁, IL-4 ve/veya IL-4 reseptör (IL-4 R α) eksikliği olanlarda da Th₂ yanıtında bozukluk olduğu gösterilmiştir.

Bu sitokinlerin reseptörlerine bağlanması sonucunda JAK bağımlı kinazlar aktive olmaktadır. Bu aktivasyon sonucunda intrasitoplazmik sinyal ileticisi olan STAT molekülünde tirozin fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Aktiflenen STAT molekülü nükleusa yönelmekte, DNA'ya bağlanarak gen ekspresyonunu değiştirebilmektedir (Şekil2.2). IL-12 ve IL-4 farklı JAK-STAT yolağını kullanmaktadır.

IL-4, JAK1-3/STAT-6'yı kullanırken, IL-12, JAK2-TYK2/STAT-4 yolağını kullanmaktadır (13-15).



Şekil 2.2. JAK-STAT Sinyal Yolağı ve Th₁-Th₂ Yanıtı (14).

IL-4 geni susturulmuş (Knock-Out=KO) farelerde antijen uyarımı sonucunda allerjik yanıt gelişmediği, bununla uyumlu olarak IL-4'ün antikorla nötralizasyonu sonucunda inflamasyonun engellendiği gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında IL-4'ün antijen spesifik T hücre gelişiminin başlangıç fazında önemli

olduğunu ancak efektör fazda önemli olmadığı düşünülmektedir. IL-4 'ün inflamasyonda primer efektör molekül olmadığı görüşleri yaygınlaşmıştır. Th₂ yolağının aktiflenmesinde tek başına IL-4 rol almamakta IL-13'ün daha önemli role sahip olduğu görüşleri yaygınlaşmıştır. IL-13'ün allerjik astımı indüklemeye tek başına yeterli olduğu gösterilmiştir (15).

IL-13 fonksiyonlarına aracılık eden kompleks reseptör sistemi bulunmaktadır (IL-4R α , IL-13R α 1, IL-13R α 2). IL-13R α 1, IL-13R α 2 hemapoetin reseptör ailesinin üyesi olup % 32 oranında aminoasit benzerliği göstermektedirler. X kromozomunda lokalizedirler. Her ikisi de IL-13 bağlamakta ancak IL-4 bağlamamaktadır. IL-13R α 1 tek başına düşük affinitede, IL-4R α varlığında yüksek affinitede IL-13 bağlamaktadır. IL-13R α 2 ise IL-13'ü yüksek affinitede bağlamaktadır. IL-4R α , IL-13R α 1 fonksiyonel reseptörlerdir. Hemapoetik ve nonhemapoetik hücrelerde eksprese olabilmektedirler (B hücreleri, monosit/makrofaj, dendritik hücreler, eosinofil, basofil, fibroblast, endotelial hücreler, havayolu epiteli ve düz kas hücrelerinde).

IL-13R α 2 ise testis, beyin, karaciğer, timus ve havayolu düz kas hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda çözünebilir formu fare üriner sisteminde ve serumunda gösterilmiştir. Kısa bir sitoplazmik uzantı içermekte ve sinyal iletiminden yoksun olduğu dikkati çekmektedir. Bu reseptör subünitinin IL-13 sinyal iletimini engellediği, STAT-6 aktivasyonunu bloke ettiği düşünülmektedir. IL-13R α 2 ekspresyonunun Th₂ sitokinlerine spesifik olmadığı Th₁ sitokinleri sonucu da eksprese olduğu gösterilmiştir. Reseptörün IFN- γ ile uyarımının IL-13'ü inhibe ettiği gösterilmiştir. Th₁-Th₂ sitokinlerinin IL-13R α 2 aracılığı ile regülasyonda rol oynadıkları düşünülmektedir (16-18).

Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda diğer Th₂ tip sitokinlerden bağımsız olarak IL-13'ün astımı indüklemeye tek başına yeterli ve gerekli olduğu gösterilmiştir. IgE ile duyarlılanmış insan havayolu düz kasında IL-13 üretildiği ancak IL-4 üretilmediği gösterilmiştir. Fare akciğerine IL-25 uygulanmasının IL-13 gen ekspresyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir.

IL-13'ün allerjik yanıtı bilinen eozinofil ve IgE aracılıklı olayları oluşturmasından ziyade havayolu hücrelerinde kompleks olaylar oluşturmasıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Fare akciğerinde IL-13 gen artışının belirgin

fibrozise sebep olması fibrotik yanıtta primer düzenleyici olduğunu düşündürmektedir. IL-13 tek başına havayolu aşırı duyarlılığı, mukus aşırı üretimi ve subepitelyal fibrozise sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu etkilerinin STAT-6 bağımlı olduğu düşünülmektedir (15-19). Aynı zamanda IL-13 paraziter infeksiyonlarda önemli rol oynamakta, IL-13 polimorfizmlerinin schistozoma infeksiyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (19).

IL-13 çeşitli kemokinlerin salınımını arttırarak değişik bölgelerdeki inflamatuvar hücrelerin inflamasyon alanına göçünü sağlamakta ve bu yolla havayolu aşırıduyarlılığı, mukus aşırı üretimi ve subepitelyal fibrozise neden olduğu düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda IL-13'ün havayolu epitelinden kitinaz adlı enzimin aktiflenmesine neden olduğu, aktiflenen kitinazın eotaksin ve MCP-1 gibi kemokinleri eksprese etmesi sonucu inflamasyonu ve havayolu aşırı duyarlılığını arttırıcı etkisi olduğu üzerine durulmaktadır. Kitinaz inhibisyonun havayolu bulgularını inhibe edebileceği yapılan fare modellerinde gösterilmiş ve tedavi yaklaşımına yeni bir bakış açısı getirmiştir (15).

Th₂ baskın hastalıkların artmasına paralel olarak Th₁ baskın otoimmün hastalıkların da artış göstermesi allerjik hastalıklarda T hücrelerinin rolünün basit bir Th₁-Th₂ dengesi ile açıklanamıyacağını gündeme getirmiştir. Son yıllarda Th₁ ve Th₂ hücrelerden farklı başka bir T hücre alt grubu bulunmuştur. Bu hücreler T regulatuar (T_{reg}) hücreler olarak adlandırılmıştır. T_{reg} hücreler otoimmünite, allograft rejeksiyonuna karşı korumada, infeksiyöz ve allerjik hastalıklarda önemli role sahiptir (20,21).

İki önemli Treg hücre grubu tanımlanmıştır. CD4⁺CD25⁺Treg hücreler, timus tarafından üretilir, yüksek oranda transkripsiyon faktörü FoxP₃ eksprese ederler. Antijen spesifik Treg hücreler antiinflamatuvar sitokinler olan IL-10 ve/veya TGF-β sekrete ederler. IL-10 sekrete edenler TR₁, TGF-β sekrete edenler Th₃ olarak adlandırılmaktadır.

Her iki Treg hücre alt grubunun baskılayıcı fonksiyonları olduğu, astımda havayolu aşırı duyarlılığını ve inflamasyonu azaltıcı etkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Allerjen immunoterapisi ya da glukokortikoid tedavi sonrası Treg hücrelerde IL-10 sekresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Allerjik inflamasyon sırasında APC'lerden salgılanan IL-6 sitokini etkisi ile Treg hücrelerin baskılandığı gösterilmiştir. IL-6 ve IL-10'un allerjik hastalıklarda önemli düzenleyici sitokin olduğu düşünülmektedir (3,20,21).

Tanımlanan bir başka T hücre alt grubu ise Th₁₇ hücreleridir. Th₁₇ hücrelerinin otoimmün hastalıklarda, özellikle deneysel ensefalomyelit modellerinde, romatoid artrit gibi hastalıklarda, transplant rejeksiyonunda, multipl sclerosiste, tümör büyümesinde, astım ve allerjik inflamasyonda önemli rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

Th₁₇ hücreleri IL-17 sekrete ederler ve değişik IL-17 alt grupları tanımlanmıştır (IL-17A–F). IL-17E diğer ismiyle IL-25 olarak adlandırılmaktadır. IL-25 ekspresyonu naive T hücreleri, Th₁ hücreler, B hücre, kemik iliği kaynaklı DC, makrofaj, mast hücre veya endotelyal hücrelerde saptanamamış ve IL-25'in in vivo ekspresyonu özellikle mukozal dokuda olduğu gösterilmiştir.

IL-17 sitokinleri farklı dokularda çalışılmıştır. IL-17A ve IL-17F'nin astımda rol aldığını bir çok kanıt göstermektedir. IL-17A ve IL-17F ekspresyonu normal insanlara göre astımlılarda artmış ve ikisi de IL-6 ve IL-8 in ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.

IL-17A ve IL-17F'e zıt olarak, IL-25 CCL-5 (RANTES) ve CCL-11 (Eotaxin-1) gibi kemokinlerinin ekspresyonunu indükler ki bunlar eozinofil aktivasyonunu sağlamakla beraber Th₂ sitokinlerinden IL-5, IL-13 ve belki de IL-4 ekspresyonunu da sağladığı düşünülmektedir.

IL-12 sitokin ailesinin üyeleri (IL-12, IL-23, IL-27) Th₁/Th₁₇ diferansiyasyonunda önemlidir. Th₁₇'yi stabilize eden IL-23'e zıt olarak IL-12 ve IL-27 Th₁ yanıtını artırır ve Th₁₇ gelişimi ve fonksiyonunu engeller. Bu yüzden IL-12/IL-27 ve IL-23 dengesi Th₁/Th₁₇ değişiminde önemli role sahiptir.

IL-17'nin aynı zamanda ekstraselüler bakteriler olan Klebsiella pneumonia ve Bacteroides fragilis ve Candida albicans gibi mantarlara da karşı savunmada etkili olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur.

CD4+CD25+ regulatory T cells (Tregs) varlığında naive T hücrelerin aktivasyonu, IFN- γ ve IL-2 üretiminde baskılanma olmakla beraber IL-17A

düzeylerinde artışa neden olur. Bazı çalışmalarda T_{reg} hücrelerinin alerjik astımın efektor fazında Th₂ yanıtını kontrol edebileceği düşünülmektedir (23-26).

Yapılan bir başka çalışmada IL-17, Th₂ sitokinleri olan IL-4, IL-13 ve IL-5' in akciğer ve bölgesel lenf nodlarında lokal üretimine inhibitör etkisi olduğunu ancak dalak hücre kültüründe bu etkisi olmadığı gösterilmiş, IL-17'nin alerjik astımın yeni bir endojen negatif regülatörü olduğu ve IL-17-Th₁₇'nin astımda terapötik hedef tedavi olabileceğini düşünülmüştür (27).

Sonuç olarak alerjik astım basit bir Th₁-Th₂ dengesi ile açıklanamayan, birçok hücre grubunun dahil olduğu kompleks bir hastalıktır.

2.2. Atopik Dermatit

2.2.1. Tanım

Atopik dermatit (AD) kronik, tekrarlayan, kaşıntılı, inflamatuvar deri hastalığıdır. Çocukluk çaının en sık görülen deri hastalığı olmakla birlikte her yaşta görülebilmektedir. Olguların çoğunluğunda bulgular ilk 5 yaşta başlamaktadır. Çocukluk çağında başlayan bulgular zaman içinde gerileyebilmekte ve erişkin dönemde tekrar bulgu verebilmektedir. Sıklıkla kişisel ya da ailevi atopik dermatit, astım ve alerjik rinit öyküsü ve sık görülen çevresel antijenlere karşı IgE yapma eğilimini de içeren çok sayıda genetik ve immunolojik faktörler hastalığa eşlik etmektedir (28).

2.2.2. Epidemiyoloji

Son yıllarda birçok alerjik hastalıkta olduğu gibi atopik dermatit prevalansında da artış bildirilmektedir. Çeşitli ülkelerde çocukluk yaş grubunda AD prevalansı % 2-10 arasındadır. Ülkemizde atopik dermatit sıklığı ile ilgili çok sağlıklı veriler olmamakla birlikte, yapılan değişik çalışmalarda %2-7 arasında değişen oranlar saptanmıştır. Erkeklerde kızlara göre iki misli daha fazladır (29).

2.2.3. Genetik

Genetik faktörler hastalığa yatkınlıkta önemli rol oynamaktadır. Hastaların ailelerinde de atopik hastalık öyküsü sıktır. Kalıtım şekli açık olmamakla birlikte poligenik kalıtım söz konusudur. AD gelişiminde annedeki yüklülüğün daha belirgin etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Yapılan ikiz çalışmaları bu genetik özelliği doğrulamaktadır. Tek yumurta ikizlerinde birinde AD varsa diğerinde görülme sıklığı çift yumurta ikizlerine göre 4 kat daha fazladır. AD ile diğer allerjik hastalıkların gelişiminde rol oynadığı düşünülen bazı genler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu genler içerisinde Th₂ sitokinlerinin kümelenildiği kromozom 5q31-33 bölgesi özellikle dikkati çekmektedir. Çalışmalarda IL-4 ve IL-13 gen polimorfizmleri ile hastalık arasında ilişki olabileceği gösterilmiştir. AD için 3q21, 1q21, 17q25, 20p ve 13q12-14 linkage grupları belirlenmiş, HLA tiplerinin rolü halen tartışmalıdır (31,34).

Son yıllarda yaygın konjenital eritrodermi ile karakterize bir tek gen hastalığı olan Netherton hastalığı üzerinde durulmaktadır. Bu hastalarda atopi bulguları (besin allejisi, ürtiker, astım) ve yüksek serum IgE düzeyleri mevcuttur. SPINK5 (Serin Proteaz İnhibitör) mutasyonunun bu hastalıkta önemli rol oynayabileceği görüşleri yaygın olup bu proteinin AD, astım gibi atopik hastalıklar da da önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (33).

2.2.4. Klinik

Klinik olarak üç fazı bulunmaktadır:

Akut dönemde şiddetli kaşıntı ile birlikte eritem, ödem, veziküller, kaşıntı sonucu epidermis kaybı (ekskoriasyon), seröz sızıntı ve kabuklanmalar dikkati çeker.

Subakut dönemde eritematöz deri üzerinde ekskoriye, üzeri kabuklanmış olan papüller bulunur. Deride kalınlaşma ve hafif pullanma başlamıştır.

Kronik dönemde ise deri kalınlığı (likenifikasyon) ve fibrotik papüller bulunur, eritem genellikle yoktur. Kaşınma ve sürtünme nedeni ile deri kıvrımları belirginleşmiştir.

Atopik dermatit kronik ve tekrarlayıcı bir hastalık olduğu için olgularda bu üç tip lezyon bir arada bulunabilir. Deri genellikle kurudur,sağlam deriye göre lezyonların olduğu deri bölgesinde su kaybı fazladır.

Bebeklik döneminde (2 yaş altında) sıklıkla yüzde, yanaklarda olmak üzere bazen alında, kaşlar üzerinde, göz kapaklarında tutulum olup şiddetli kaşıntı ile birlikte eritemli zeminde, papül ve vezikül oluşumları, seröz sızıntı ve kabuklaşmalar dikkati çeker, ayrıca ekstremitelerin ekstansör yüzleri tutulmuştur ve saçlı deride dermatit bulunabilir.

Çocukluk çağında (2-12 yaş grubunda), kıvrım yerlerinde (fleksural bölgelerde) tutulum daha fazladır. Bu bölgelerde deri kalınlaşmış, papül oluşumları, likenifikasyon ve ekskoriasyon, kaşıntı izleri ve deride renk değişikliği dikkati çeker.

Adolesan dönemi ve erişkinlerde ise tekrarlayıcı bir hastalık olduğu için bazen hiçbir bulgu bulunmayabilir. Bulgu olan olgularda daha çok kıvrım yerlerinde likenifikasyon, kabuklanmalar, ellerde, el ve ayak parmaklarında tutulum şeklinde görülür.

Atopik dermatitli hastaların deri enfeksiyonlarına yatkınlığı fazladır. Hastaların deri yüzeyindeki sekretuar IgA düzeyinin azalmış olmasının enfeksiyonlara yatkınlığı arttırdığı ileri sürülmektedir. Herpes Simpleks ve Molluscum Contagiosum enfeksiyonları sık görülmekle birlikte olguların büyük çoğunluğunda deri lezyonlarında Stafilokokus Aureus kolonizasyonuna rastlanmaktadır. Bunların dışında Candida ve M.Furfue gibi fungal enfeksiyonlara sık rastlanmaktadır (28,30).

Atopik dermatit tanısında Hanifin-Rajka tarafından 1980 yılında bildirilen kriterler yaygın kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar, bu kriterlerin duyarlılık ve özgüllüğünün toplumlar arasında ve değerlendirci hekime göre büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Son olarak tanı amaçlı “American Academy of Dermatology” Pediatrik Dermatoloji grubunun toplantılarında geliştirilmiş olan basitleştirilmiş kriterlerin kullanımı önerilmektedir. İngiltere çalışma grubu özellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere daha pratik tanı kriterleri geliştirmiş, daha sonraları da Milenyum Kriterleri tanımlanmıştır (28,30,31).

Atopik Dermatitte Major ve Minör kriterler (Hanifin-Rajka Kriterleri)

(Tam için 3 Major ve 3 Minör kriter bulunmalıdır)

Majör Kriterler

1. Kaşıntı
2. Tipik morfoloji ve dağılım (bebek ve çocuklarda yüzde ve ekstansör yüzlerde tutulum, yetişkinlerde fleksural tutulum ve likenifikasyon, kasık ve aksillanın tutulmaması)
3. Kronik veya kronik olmayan relapslarla seyreden dermatit
4. Kendisinde ve/veya ailesinde atopi öyküsünün olması

Minör Kriterler

1. Kserozis (yaygın cilt kuruluğu)
2. İhtiyoz
3. Allerji deri testinde pozitiflik saptanması
4. Yüksek serum IgE düzeyleri
5. Erken başlangıç
6. Deri enfeksiyonlarına yatkınlık (özellikle S.Aureus ve H.Simpleks gibi)
7. Dennie-Morgan göz altı kıvrımı
8. Terleme ile kaşıntı
9. Tekrarlayan konjoktivit
10. Anterior Subkapsüller Katarakt
11. Yün ve lipid çözücülere karşı intolerans
12. Besinlere aşırıduyarlılık
13. Çevresel faktörlerden etkilenme
14. Beyaz dermografizm
15. Perifoliküler belirginleşme

2.2.5. İmmunopatogenez

AD'de en önemli immunopatogenik anormalliğin T hücrelerde gözleendiği ileri sürülmektedir. AD'li hastalarda yardımcı T ve sitotoksik T hücre oranının arttığı ve belirgin bir yardımcı T hücre baskınlığı olduğu belirlenmiştir. Lezyonların aktivasyon ve erken gelişim evresinde Th₂, kronik lezyonlarda ise Th₁ sitokin cevabının baskın hale gelmektedir (32).

Th₂ hücrelerini baskılayan bir sitokin olan IFN- γ düzeyleri AD'li hastalarda düşüktür. Buna bağılı olarak IL-4, IL-5, IL-13, PGE₂ gibi sitokinler ile IgE ve periferik kandaki eozinofiller sıklıkla yüksek oranda bulunur. AD'de T hücrelerinin aktive olması ile IL-2R ekspresyonu da artar, bu bulgu AD'de T hücre aktivasyonunun bir göstergesidir (34).

Atopik dermatitte deri fonksiyonel olarak farklı bir immünolojik organ gibi davranır ve derinin kronik inflamasyonu T-hücreler tarafından infiltrasyonu sonucu olur. Deride yerleşen bu T-hücrelerin büyük çoğunluğu CD45RO⁺ bellek/efektör hücre tipindedir ve Cutaneous-Lymphocyte-Associated Antigen (CLA) molekülü taşırlar. Bu hücrelerin yüksek miktarda IL-5 ve IL-13, az miktarda da IL-4 ve IFN- γ salgıladıkları gösterilmiştir. CLA⁺CD45⁺RO hücrelerin apoptozisinin ortamdaki IL-2, IL-4 ve IL-5 ile baskılandığı ve hücrelerin yaşam süresinin uzadığı bildirilmektedir (34). Atopik dermatitte dolaşımdaki CLA⁺ allerjen-spesifik bellek/efektör T-hücreleri aktive olur ve salgıladıkları IL-13 ağırlıklı bir sitokin paterniyle bir yandan IgE yapımını tetiklerken, IL-5 ile de eozinofillerin apoptozisini geciktirirler. Atopik dermatitte CLA eksprese eden derideki T-hücrelerin intralezyonel sitokin paternlerine yönelik araştırmalarda en fazla miktarda IFN- γ , daha az IL-4 bulunmasının yanı sıra, yine yüksek miktarlarda IL-5 ve IL-13 yapımının olduğu gösterilmiştir. Derinin allerjik inflamasyonlarında CD4⁺ T-lenfositlerin yanı sıra önemli miktarda CD8⁺ hücrelerinin deriye infiltre olduğunun bulunması, T-hücrelerin bu her iki alt grubunun da önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

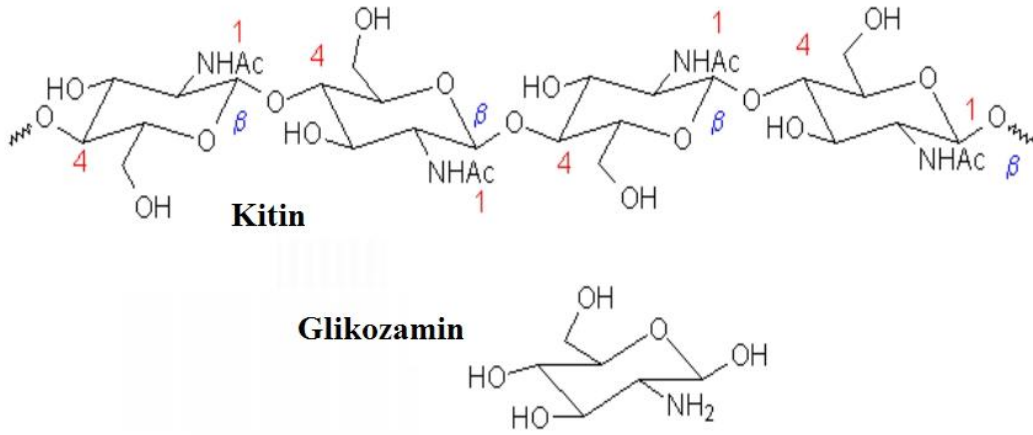
Akut dönemde IFN- γ ve IL-12 üreten hücreler çok azdır, kronik dönemde ise IL-4 ve IL-13 üreten hücreler azalırken IL-5, GM-CSF, IFN- γ ve IL-12 gibi sitokinlerin salgılandığı hücrelerin arttığı görülmektedir. AD'li hastaların periferik kan CLA⁺ T-hücrelerinde ve deri biyopsi örneklerinde incelenen sitokinlerde IL-5

ekspresyonun artmış olduğu görülmektedir. Buna göre, hem CD4⁺ hem CD8⁺ CLA⁺ T-hücrelerin süpernatantları yeni saf eozinofillerin in vitro yaşam sürelerini uzatırken, CLA⁺ T-hücre süpernatantlarının eozinofil sürvisini etkilememektedir. Sitokinlerin nötralizasyonu CLA⁺ T-hücrelerden salınan IL-5'in AD'deki uzamış eozinofil sürvisinde baskın rol oynadığını göstermiştir.

Aktive olmuş T- hücrelerinin salgıladığı IFN- γ keratinositler üzerindeki Fas reseptörünün (CD95) ekspresyonunu arttırarak bunları apoptozise duyarlı hale getirir. çoğunlukla düşük IFN- γ salgılayan T-hücreler aynı zamanda fazla miktarda IL-5 ve IL-13 yaparak eozinofili ve IgE yapımına katkıda bulunurlar. Keratinositlere öldürücü darbeyi epidermisteki T-hücre yüzeyinde eksprese olduktan sonra serbestleşen Fas ligandı yapar. Sağlıklı insan derisi ve yapay olarak elde edilmiş derilerin aktive T-hücreler ile kültürleri yapıldığında, deriye infiltre olan T-hücrelerin neden olduğu keratinosit apoptozisinin atopik dermatitteki esas olay olduğu görülmektedir aktivasyon durumlarına bağlı olarak CD4⁺ ve CD8⁺ T-hücrelerin keratinosit hasarında rol oynayabileceğini göstermektedir. T-hücresinin keratinositle her zaman doğrudan teması gerekmemekte ve aktive T-hücreden serbestleşen Fas ligandı eğer keratinositler apoptozise duyarlıysa bunların apoptozisini başlatabilmektedir. IFN- γ keratinositlerin apoptozise doğru gidişine karar veren bir sitokin gibi durmaktadır. Epidermal keratinositlerin apoptozisini hedef alarak astım ve atopik dermatit tedavisinde geliştirilecek ilaçlar gelecekte yeni ufuklar açacak gibi durmaktadır (35).

2.3. Kitin, Kitinazlar ve Astım

Kitin nematodlar, böcekler ve mantarlarda yaygın olarak bulunan, ancak memelilerde bulunmayan bir karbonhidrat polimeridir. Doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan N-asetilglukozamin polimeridir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kitin ve glikozaminin moleküler yapısı (Ray Fort. Structure and Mechanism in Biological Chemistry)

Kitinazlar endo- β -1,4-N-asetilglukozaminidazdır. Beklenildiği gibi kitinazlar, kitini parçalayan, kitin içeren organizmaların büyümesini engelleyen enzimlerdir, bu enzimlerin kitin içeren patojenlere karşı savunmada önemli rol oynadığı bilinmektedir. İnsanlarda da kitinaz genlerinin bulunduğu bilinmektedir, ancak bu gen ürünlerinin biyolojik rolleri bilinmemektedir ve benzer şekilde insanlarda da kitin içeren patojenlere karşı savunmada rol oynamaları beklenirse de bunu gösteren çok az veri vardır.

İlk kez Gaucher Hastalarının plazmalarında kitinaz aktivitesi tespit edilmiş ve insan fagosit-spesifik kitinazı (chitotriosidaz) olarak adlandırılmıştır. Makrofajlardan sekrete edilen bu enzim katalitik bir bölüm ve C-terminal kitin bağlayan bölüm içermekte ve 50 kDa ağırlığındadır. Chitotriosidaz diğer hücrelerde eksprese edilmemekte ve nötrofilik granüllerde depolanmaktadır (36,38,46,50,52,53,66). Granulomatöz hastalıklar (Wegener granulomatozis, Sarkoidoz), granulomatöz infeksiyon hastalıkları (Tüberkülozis, Leishmaniozis, Lepre)'nda plazma chitotriosidaz aktivitesi saptanmış olup, sarkoidozlu ve beta talasemili hastaların bir kısmında bu enzim aktivitesi tespit edilmiştir (47,51,67).

Chitotriosidazın biyolojik fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte fagositik spesifik salınımının doğuştan immunitede rol oynadığını düşündürmektedir. Bitki kaynaklı kitinazın kitin bağımlı mantarlara karşı savunmada rol oynadığı belirlenmiştir. Sistemik fungal enfeksiyon oluşturulan

deneysel fare modellerinde chitotriosidazın fungostatik etki göstermesi benzer aktivitenin insan immunitesinde de rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Etnik gruplarda chitotriosidaz aktivitesinde farklı defektler tespit edilmiş ve bu defektlerin kitin içeren bir filarial parazit olan *Wuchereria Bancrofti* infeksiyonuna yatkınlığı arttırdığı düşünülmektedir (38,68).

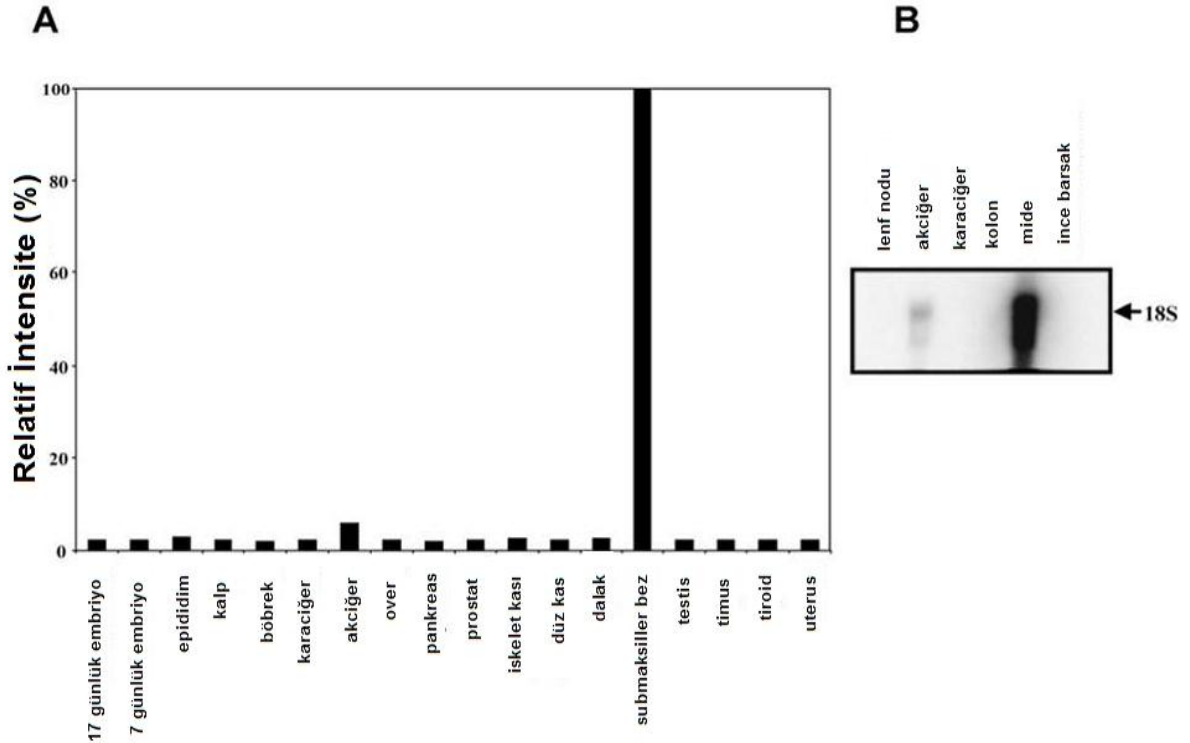
Daha sonraları memelilerde ikinci bir enzim tanımlanmış ve bu enzim chitotriosidaz ile %52 homolog olmakla beraber optimum pH:2'de çalıştığı gösterilmiş ve bu asidik memeli kitinazı (Acidic Mammalian Chitinase ; AMCCase) olarak adlandırılmıştır (36,42-44). AMCCase farelerin ve insanların gastrointestinal sistem ve akciğerlerinde bulunmaktadır. Aynı zamanda AMCCase farelerin ekzokrin hücrelerinde de bulunmuş, chitotriosidazdan farklı olarak asidik pH'da optimum etki gösterdiği ifade edilmiştir (42-44,55).

Farelere intravenöz *Schistosoma mansoni* yumurtaları enjekte edildikten sonra akciğerde aşırı miktarda AMCCase eksprese olduğu görülmüş. Bu ekspresyonun IL-4 ve IL-13'ün rol aldığı Th₂ tipi immun yanıtla arttığı belirtilmiştir. Bu artış Th₁ yanıtın baskın olduğu ya da IL-13 geni susturulmuş (knockout) olan farelerde saptanmamıştır (57). *Aspergillus fumigatus* antijeni ya da ovalbumin verilerek deneysel astım modeli oluşturulmuş farelerde yüksek oranda AMCCase mRNA düzeyleri saptanmış, bu artışta STAT-6 sinyal yolağının aracılık ettiği dolayısıyla IL-4 ve IL-13'ün rol oynadığı belirtilmiştir (13).

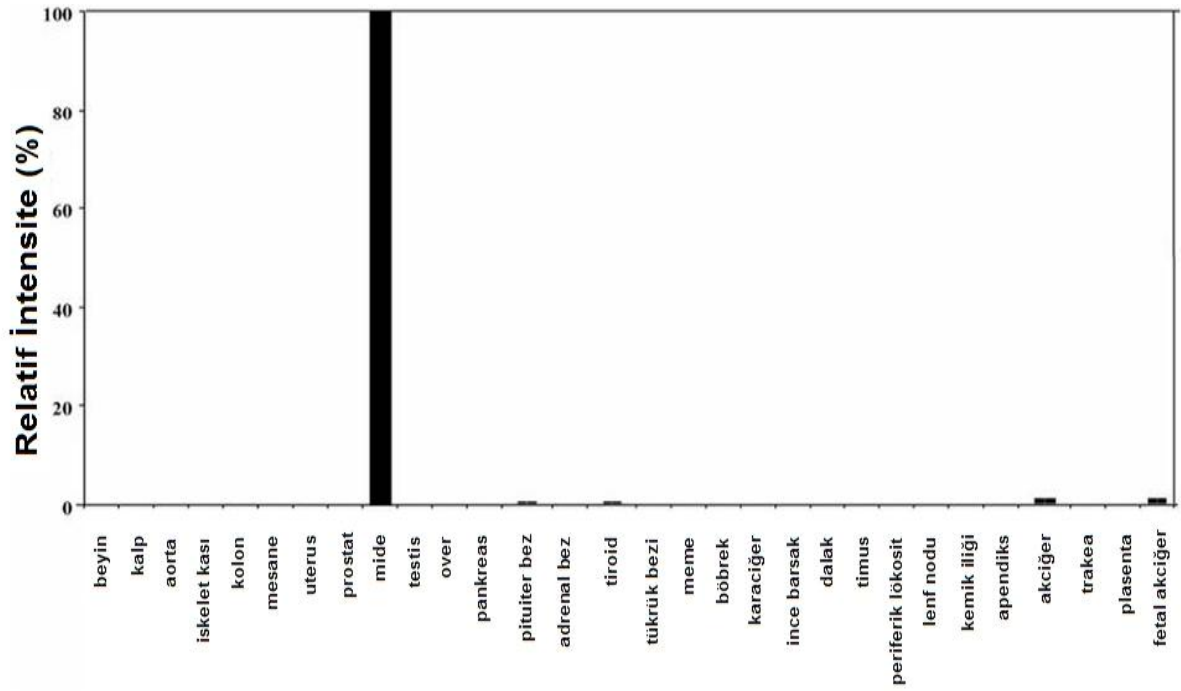
İnsan AMCCase geni kromozom 1p13'te lokalize olup chitotriosidaz geninin 1p32'de lokalize olduğu gösterilmiştir. 1p32'de chitotriosidaz (CHIT1) ve HCgp39 (CHI3L1) kitinaz protein ailesi lokalizedir (41). Farelere ise kromozom 1 bant E4'te lokalize olup BRP39 (Chi3I1) ve Hgp39 kitinaz protein ailesi bulunmaktadır. AMCCase, chitotriosidaz, human cartilage glycoprotein-39 kd (HcGP-39)/YKL-40, YKL-39 insanda, YM-1, YM-2, AMCCase, oviductin ve breast regression protein 39 (BRP-39) ise farelerde tanımlanan kitinaz benzeri genlerdir. BRP39 fare meme hücrelerinde keşfedilmiş ve bunun değişik adlarda çeşitli homologları değişik türlerde tanımlanmıştır. Human cartilage glycoprotein-39 kd (HcGP-39), human YKL-40, porcine 38-kd heparin-binding glycoprotein (GP38K), ve bovine 39-kd whey proteini kapsarlar. Sadece AMCCase ve chitotriosidazın kitinolitik etkisi bulunduğu ifade edilmektedir (49,56,58). BRP-39

ve HcGP-39/YKL-40 1. kromozomdaki 39-kd lik ürünlerdir ve ilki fare ikincisi insan ürünüdür, kitinaz aktiviteleri olmadığı belirtilmiştir. BRP-39 benzeri moleküller doku yeniden yapılanımında rol aldığı kanıtları vardır, çünkü stromal hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve sağ kalımını regüle etmektedirler. HcGP-39/ YKL-40'ın hastalık patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir, romatoid artrit, osteoartrit, metazatik meme kanseri ve birçok pürülan menenjitlerde kandaki düzeylerinin arttığı görülmüştür (58,65).

YM-1 proteininin CD4⁺ ve eosinofiller için önemli bir kemotaktik faktör olduğu düşünülmektedir. Fare chitotriosidazının mRNA ekspresyonuna bakıldığında yüksek oranda dil ve midede olduğu ancak diğer dokularda olmadığı görülmüş. İnsan chitotriosidaz ekspresyonu ise özellikle lenf nodlarında olmak üzere kemik iliği ve akciğerlerde de saptanmış olup mide de saptanmamış bu bulgu da farelerin aksine bu enzimin insanlarda beslenmeden çok savunmada rol oynadığını düşündürmektedir (38,39). İnsan AMCCase'ı ise yüksek oranda mide ve akciğer dokusunda eksprese olduğu belirtilmektedir. Fare AMCCase'ı ise mide, tükrük bezi ve akciğerlerde eksprese olmaktadır (Şekil 2.4-5) (38,44).



Şekil 2.4. Fare AMCCase mRNA'sının dokulardaki dağılımı (44)



Şekil 2.5. İnsan AMCcase mRNA'sının dokulardaki dağılımı (44)

Non radyoaktif in-situ hibridizasyon kullanarak her iki kitinazın mRNA ekspresyonuna bakılmış. Chitotriosidaz dil papillalarının skuamoz epitelinde, AMCcase von Ebner adı verilen küçük tükürük bezlerinde ve parotiste bulunmuş. İnsandan farklı olarak her iki enzimin de fare midesinde eksprese olduğu bulunmuş. Antumun pilorik glandlarında chitotriosidaz ekspresyonu saptanmamış olup özellikle aşağı gastrointestinal kanalda, duodenumda, ileumun paneth hücrelerinin lieberkühn kriptalarında eksprese olduğu saptanmıştır. İnsan akciğerinde chitotriosidaz alveoler makrofajlar aracılığı ile eksprese olmakta buna zıt olarak fare akciğerinde chitotriosidaz ekspresyonu görülmemiştir (44). Enzim ekspresyonundaki bu fark fare ve insandaki chitotriosidaz genindeki farklılıkla açıklanmaktadır.

AMCcase astımlı hastaların akciğerlerinde yüksek oranda eksprese olmakta iken sağlıklı bireylerde bulunmamaktadır (37). Bir başka çalışmada AMCcase alveolar makrofajlarda ve gastrointestinal kanalda meydana geldiği ancak chitotriosidazın sadece fagositlerde eksprese olduğu gösterilmiştir (38).

Bir başka çalışmada nazal poliple birlikte eosinofilik kronik sinüziti olan olgular incelenmiş. Kontrol grup ve nazal polipli grubun her ikisinde de AMCCase yapımına (ekspresyonu) saptanmış. Ancak AMCCase ekspresyonu tedaviye dirençli polip grubunda tedaviye yanıtı gruba göre daha fazla bulunmuş. Her iki grubun IL-13 düzeylerine bakıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır (69). İlginç olarak, ovalbumin verilerek astım modeli oluşturulmuş farelerde acidic mammalian chitinase (AMCCase) ın hava yolu epiteli ve akciğer makrofajlarında aktive olduğu, aynı bulguların astımlı hastalarda da gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu araştırmada ayrıca, AMCCase ın indüksiyonunun IL-13 üzerinden olduğu gösterilmiştir (37). Allosamidin ve anti-kitinazların verilmesi ile AMCCase indüksiyonunun gerilediği belirtilmiştir (37,48). IL-13, Th₂ tipi yanıtta salınan bir interleokindir ve atopik hastalıklarda Th₂ baskın immün yanıtın çok önemli olduğu bilinmektedir (45). Özellikle IgE yapımı ve eozinofil aktivasyonu ile karakterize Th₂ tipi immün yanıtın öncelikle parazitlere karşı immün savunmada önemli olduğu bilinmektedir ki bu parazitlerin çoğunluğu kitin içermektedir. Deneysel astım modeli oluşturulmuş fare modellerinde alınan bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL) incelenmiş, sıvıdaki AMCCase ekspresyonunun deksametazonla inhibe edildiği ancak chitotriosidaz ekspresyonu üzerine inhibe edici etkisi olmadığı saptanmıştır (64). Kitin farelere verince eozinofil ve bazofilleri de kapsayan ve IL-4 ekspresyon eden doğal immün hücrelerin dokuda artışını sağlamaktadır. Doku infiltrasyonu TLR aracılıklı lipopolisakkarid tanınmasının yokluğunda etkilenmezken enjekte edilen kitin daha önce IL-4 ve IL-13 ile uyarılabilen memeli kitinaz ve AMCCase ile karşılaştırılmış ise bu yanıt oluşmamakta, eğer kitin AMCCase'ı aşırı ekspresyon etmiş bir fareye enjekte edilirse de oluşmayabilir. Kitin alternatif makrofaj aktivasyonunu ve LTB₄ üretimini in vivo uyarabilir ki bu optimal immün yanıt için gereklidir. Kitin doğal immün hücrelerin doku infiltrasyonu için gereken tanıma aracıdır ki bu alerjik ve helmantik immünitede önemlidir ve bu durum omurgalıların kitinazları tarafından negatif olarak düzenlenebilir (40).

Sonuç olarak Th₂ tipi immün yanıtla kitinaz indüksiyonu ya da aktivasyonu arasında gösterilen ilişki akla yakın görülmektedir. Th₂ tipi yanıtın baskın olduğu ve bunun etyopatogenezde en önemli faktör olduğu düşünülen alerjik hastalıklara

gelince, polenler, ev-tozu akarı, hamam böceği ve mantarlar gibi atopik hastalıkların en yaygın rastlanan allerjenleri kitin içermektedir.

Bu bilgilerin ışığında allerjik hastalığı olan bireylerin immün sisteminin kitin içeren bu allerjenleri, parazit saldırısı olduğu şeklinde algıladığı ve bu nedenle anti-paraziter olduğu iyi bilinen Th₂ tipi immün yanıtı geliştirdiği düşünülebilir. İnsan diyetinde kitin bulunmamaktadır, AMC_{Case}'ın monosit-makrofaj sisteminde ve RES (Retikulo Endotelial Sistem)'de saptanması doğal savunmada rol oynadığını düşündürmektedir.

Astımlı hastalarda AMC_{Case} gen polimorfizmine bakılmış, K17R-ekson 4'te A47G (rs3818822) polimorfizmi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında astımlı hastalarda anlamlı oranda farklı bulunmuş (p=0.0031 ve p= 0.0003). Astımlı hastalarda Chitotriosidaz (CHIT1)'de Gly102Ser ve Ala442Gly polimorfizmleri incelendiğinde hastalıkta major rol oynamadığı tespit edilmiş (41). AMC_{Case}'ın katalitik bölgesinden 7 aminoasit önce başka bir polimorfizm saptanmış, pozisyon 17'deki L>A değişiminin katalitik aktiviteyi değiştirebileceği belirtilmiştir (36).

Bazı araştırmacılar kitinin astımda koruyucu etkisi olduğunu tanımlamıştır. Allerjenle duyarlılaştırılmış farelere düşük miktarda oral kitin verilmesi akciğer eosinofilisini ve IgE miktarını azalttığı gösterilmiş, bu etki kitin verilmeyen farelerde saptanmadığı gösterilmiştir (62). İn vitro yapılan tek çalışmada kitinin makrofaj hücre dizisinde TNF- α ve IL-1 yapımına yol açtığı bildirilmiştir (60).

Bir başka çalışmada Dermatophagoides pteronyssinus ve Aspergillus fumigatus ile deneysel astım modeli oluşturulmuş farelere intranasal CMP (kitin mikropartikülü) verilmiş. Serum Ig E, periferik kan eozinofilisi, havayolu aşırı duyarlılığı ve akciğer inflamasyonunda azalma saptanmış. Aynı zamanda Th1 sitokinleri olan IL-12, IFN- γ , TNF- α ' da artış saptanırken, IL-4'te azalma olduğu belirtilmiştir (54). Yine bir başka çalışmada deneysel astım modeli oluşturulmuş farelere intranasal CMP verilmesinin inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (61). CMP'nin viral hemaglutinin ile intranasal uygulanması sonrası mukozal immunitiyi arttırdığı ve viral infeksiyonlarda koruyucu olduğu belirtilmiştir (59).

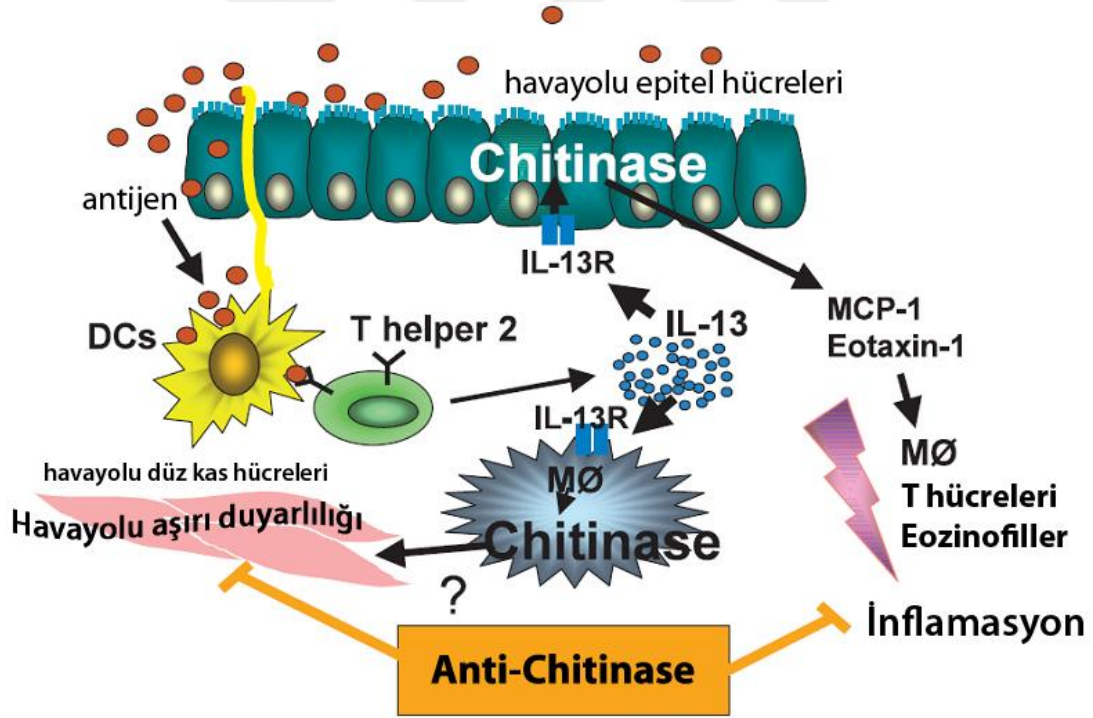
Kitinazın allerjik hastalıklarda rol oynadığına dair veriler varsa da özellikle AMC_{Case}'ı indükleyen düzenek ortaya konulmamıştır. Parazitlerde, mantarlarda ve

allerjenlerde yoğun olarak bulunan kitinin bağışıklık sistemi tarafından nasıl algılandığı ve hangi algaçların rol oynadığı bilinmemektedir.

AMCase'ın astımda belirgin arttığına yönelik veriler yaygınlaşmışsa da bu artışın organizma lehine ya da aleyhine mi olduğu konusunda kesin veriler bulunmamaktadır.

Yukarıda sözünü ettiğimiz çalışmaların çoğunluğu doku düzeyinde yapılmış olup in vitro olarak kitin, kitin mikropartikülleri ile karşılaşım sonrasında hücre ve algaç düzeyinde AMCase ve diğer sitokin yanıtları arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar yetersizdir.

AMCase çalışmalarında çoğunlukla fare modelleri kullanılmıştır, halbuki fare ve insanlarda bu enzimin işlevinin farklı olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Kitin ve/veya kitin mikropartiküllerinin allerjik hastalıklardan koruyucu ya da arttırıcı etkileri halen tartışılmakta, bununla ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.6. Kitinaz aracılı havayolu aşırı duyarlılığının ve inflamasyonun şematik gösterimi (65).

Bu çalışmalar allerjik hastalıkların etyopatogenezine yeni bir bakış açısı getirmektedir. Biz projemizde atopik dermatitte kitinazların durumunu

incelemeyi, ayrıca kitin ve/veya allerjen uyarımının kitinaz oluşumu ve Th₁ veya Th₂ tipte sitokin sentezi üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı, Allerji-İmmunoloji kliniğine başvuran 4 atopik ve 4 sağlıklı bireyden sodyum heparin içeren tüplere kan alındı. Mononükleer hücreler dansite gradiyent yöntemi ile ayrıştırıldıktan sonra değişik allerjenlerle uyarılarak Elispot yapıldı. Uyarılmış mononükleer hücrelerden elde edilen süpernatantlar Elisa tayini için saklandı. Ayrıca uyarılmış mononükleer hücrelerde AMCcase gen yapımına (ekspresyonuna) bakıldı.

Akdeniz Üniversitesi Dermatoloji Anabilim dalı ve Alanya Başkent Üniversitesi Dermatoloji bölümünde 5 atopik dermatitli hastanın sağlıklı ve lezyonlu deri bölgesinden aydınlatılmış onam formu imzalatıldıktan sonra biyopsi alındı, gönderilen biyopsilerden AMCcase gen yapımına (ekspresyonuna) bakıldı.

3.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PBMC) Ayrılması

Alerjik semptomu bulunan bireylerden ve kontrol grubundan Sodyum-heparin içeren tüplere 10 mL venöz kan alındı ve dansite gradientine göre ayrıldı. Yapılan işlemler aşağıda belirtildiği gibidir.

1. Sodyum-heparin içeren tüplere ~ 10 mL venöz kan alındı.
2. Alınan kan 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra üzerine aynı oranda PBS eklendi.
3. Ficoll histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) ilave edilmiş falcon tüplerine PBS ile sulandırılmış kan oran 1:2 olacak şekilde yavaşça eklendi.
4. 2040 rpm (800g), 20 dk., 20⁰C de santrifüj (Beckman-Coulter) edildi.
5. Süpernatantlar atıldıktan sonra üzerinde PBS eklendi.
6. 2000 rpm (780g), 10 dk., 8⁰C de santrifüj edildi.
7. Süpernatantlar atıldıktan sonra üzerinde PBS eklendi.
8. 1050 rpm (220g), 10 dk., 8⁰C de santrifüj edildi.

9. Süpernatantlar atıldıktan sonra üzerinde RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) eklendi.
10. Elde edilen hücre miktarı sayıldıktan sonra Elispot işlemine geçildi.

3.2. Elispot

Alerjik semptomu bulunan bireylerden ve kontrol grubundan Sodyum-heparin içeren tüplere 10 mL venöz kan alındıktan sonra dansite gradienti ile ayrıştırıldı ve elispot yapıldı. PVDF- Elispot kit (Euro-Clone) kullanılarak yapılan Elispot yöntemi aşağıda belirtilmiştir.

1. PVDF kaplı plaklara 25 µL % 70 etanol eklendi, 30 sn. oda ısısında inkübe edildi.
2. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra plaklar 100 µL PBS ile 3 kez yıkandı.
3. 10 mL PBS içine 100 µL capture antikoru konularak dilüe edildi. Hazırlanan bu karışımdan tüm kuyucuklara 100 µL konularak plaklar kapatıldı ve bir gece + 4°C de bekletildi.
4. Kuyuların içi boşaltıldıktan sonra boş kuyucuklar 100 µL PBS ile yıkandı.
5. PBS ile dilüe edilmiş UHT-milk kuyucuklara 100 µL olarak dağıtıldı, karanlıkta, oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
6. Plak döküldükten sonra kurutma kağıdının üzerine hafifçe vurularak içindeki solüsyonun tamamen boşaltılması sağlandı.
7. PBS ile bir kez yıkandı.
8. İstenilen konsantrasyonlarda hücre süspansiyonu ve antijen her kuyuya 100 µL olacak şekilde dağıtıldı. 37°C de CO₂ inkubatörde değişik zaman dilimlerinde inkübe edildi. İnkübasyon süresince plaklar hareket ettirilmedi.
9. Plak döküldükten sonra kurutma kağıdının üzerine hafifçe vurularak içindeki solüsyonun tamamen boşaltılması sağlandı .
10. Kuyulara 100 µL PBS-%0.1 tween 20 konularak 10 dakika + 4°C de bekletildi.
11. PBS-%0.1 tween 20 ile 3 kez plaklar yıkandı.

12. 96'lık plate için 10 mL PBS-1%BSA içine 10 µL streptavidin-alkaline fosfataz konularak bu karışımdan her kuyuya 100 µL eklendi, plate kapatıldı, 1 saat 37⁰C de inkübe edildi.
13. Kuyuların içi döküldü, PBS-%0.1 tween 20 ile 3 kez plaklar yıkandı, kurutma kağıdının üzerine plaklar hafifçe vurularak içindeki kalan solüsyonun uzaklaştırılması sağlandı.
14. 100 µL BCIP/NBT buffer eklendi. 2-5 dakika oda ısısında reaksiyon oluşması için bekletildi. Görsel olarak nokta formasyonunun oluşması gözlemlendi.
15. 3 kez distile su ile yıkandı.
16. Plaklar kurumaya bırakıldı.
17. Elispot okuma cihazı (C.T.L.) ile nokta sayıları okutuldu. (Aynı gün okuma yapılmayan plaklar ışıktan teması engellenmiş bir şekilde +4⁰C de bekletildi, ertesi gün okumaya alındı.)

3.3. Elisa

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen kültür süpernatantlarından Elisa kiti (Beckman Coulter) kullanılarak IFN- γ , IL-13, IL-4 bakıldı. Elisa yöntemi aşağıda açıklandığı gibi yapıldı.

3.3.1. Elisa Protokol

Standart Konsantrasyon	IFN- γ	Dilüent
25 IU/mL	50 µL 250 IU/mL standart	900 µL
6.25 IU/mL	100 µL 25 IU/mL standart	300 µL
1.56 IU/mL	100 µL 6.25 IU/mL standart	300 µL
0.39 IU/mL	100 µL 1.56 IU/mL standart	300 µL
0	-	300 µL

Standart Konsantrasyon	IL-13	Dilüent
300 pg/mL	100 µL 3 ng/mL standart	900 µL
75 pg/mL	100 µL 300 pg/mL standart	300 µL
19 pg/mL	100 µL 75 pg/mL standart	300 µL
5 pg/mL	100 µL 19 pg/mL standart	300 µL
0	-	300 µL

Standart Konsantrasyon	IL-4	Dilüent
1000 pg/mL	50 µL 10 ng/mL standart	450 µL
250 pg/mL	100 µL 1000 pg/mL standart	300 µL
62.5 pg/mL	100 µL 250 pg/mL standart	300 µL
15.6 pg/mL	100 µL 61.5 pg/mL standart	300 µL
0	-	300 µL

1. Standart konsantrasyonları protokole göre hazırlandı.
2. Kuyulara IFN- γ ve IL-13 için 50 µL, IL-4 için 100 µL standart ve kültür süpernatantı eklendi.
3. 2 saat 18-25⁰C'de sallayıcıda tutuldu.
4. Kuyular yıkama solüsyonu ile yıkandı.
5. 50 µL biotin işaretli antikor ve 100 µL streptavidin-HRP ekledi.
6. 30 dakika 18-25⁰C de sallayıcıda tutuldu.
7. Kuyular yıkama solüsyonu ile yıkandı.
8. 100 µL substrat eklendi.
9. 30 dakika 18-25⁰C de sallayıcıda tutuldu.
10. 50 µL durdurucu solüsyon eklendi.
11. 450 nm de emilimleri (absorbansları) okutuldu.

3.4. mRNA İzolasyonu

Atopik dermatitli hastalardan elde edilen deri biyopsilerinden ve kültüre edilmiş mononükleer hücrelerden mRNA izolasyon kiti (Qiagen kit) kullanılarak yapıldı. mRNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibidir.

1. Hücre pelletlerine 350-600 µL RLT buffer eklendi. Bu karışım QIA- shredder kolonlarına aktarıldı.
2. 2 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
3. Kolonların filterli kısmı atıldı.
4. 350-600 µL % 70'lik etanol eklenip lizat RNeasy kolonlarına aktarıldı.
5. 15 sn. 8700 rpm (8000g) de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası kolonların altında kalan sıvı kısım atıldı.
7. 350 µL RW1 buffer eklendi.
8. 15 sn. 8700 rpm (8000g) de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası kolonların altında kalan sıvı kısım atıldı.
10. 80 µL DNase 1 mix eklendi.
11. 15 dakika oda ısısında bekletildi.
12. 350 µL RW1 buffer eklendi.
13. 15 sn. 8700 rpm (8000g) de santrifüj edildi.
14. RNeasy kolonları yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
15. 500 µL RPE buffer eklendi.
16. 15 sn. 8700 rpm (8000g) de santrifüj edildi.
17. Santrifüj sonrası kolonların altında kalan sıvı kısım atıldı.
18. 500 µL RPE buffer eklendi.
19. 2 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
20. RNeasy kolonları yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
21. 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
22. RNeasy kolonları yeni bir tüpe aktarıldı.
23. 30-50 µL RNase içermeyen steril su ilave edildi.
24. 1 dakika 8700 rpm (8000g) de santrifüj edildi.
25. RNeasy kolonları atıldı.
26. cDNA izolasyon aşamasına geçildi (cDNA izolasyonu yapılmayan örnekler – 80°C de saklandı).

3.5. cDNA Sentezi

Sensiscript Reverse Transcription kiti (Qiagen) kullanıldı.

Komponent	Volüm	Final Konsantrasyon
Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 10x	2 µL	1x
Deoksinükleotid Karışımı, 5 mM	2 µL	0.5 mM dNTPmix
Oligo-dT primer (10 µM)	2 µL	1 µM
Random primer (100 µM)	2 µL	10 µM
RNase İnhibitör, 10 U/µL	1 µL	10 U
RNase-icermeyen su	Değişken	
Template RNA	Değişken	50 ng/reaksiyon
Revers Transkriptaz	1 µL	
Final volüm	20 µL	

Yukarıda belirtilen miktarlarda RT reaksiyonu hazırlandıktan sonra 37⁰C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan cDNA’lar PCR reaksiyonunda kullanılıncaya kadar -20⁰C’de saklandı.

3.6. RT-PCR Protokol

Atopik dermatitli hastalardan alınan dokulardan izole edilen RNA Sensiscript Reverse Transcription kiti (Qiagen) kullanılarak cDNA’ya dönüştürüldükten sonra aşağıdaki primerler kullanılarak PCR yapılmıştır.

Kullanılan Primerler ;

AMCase için: (Accession number: NM_201653.1) (PCR ürünü: 170 bp)

Forward primer: 5’-CTA CTC CTG AGA ACC GCC-3’

Reverse primer: 5’-5’-CCT GCT CAA AAG CTT CAC GC-3’

Beta-Aktin için: (Accession number: NC_000007) (PCR ürünü: 180 bp)

Forward primer: 5’-GGA TGA TGA TAT CGC CGC G-3’

Reverse primer: 5’-CCA TGC CCA CCA TCA CGC-3’

Light Cyclerdaki kantitatif değerlendirme için QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) kiti kullanıldı. Kullanılan primerler aşağıda belirtilmiştir.

Kullanılan Primerler ;

AMCase için : (Accession number: NC_000001) (PCR ürünü : 172 bp)

Forward primer: 5'-CTA CTC CTG AGA ACC GCC-3'

Reverse primer: 5'-CCT GCT CAA AAG CTT CAC GC-3'

Beta-Aktin için: Primer dizisinde deęiŐiklik yoktur.

Komponent	Volüm
Master Mix, 2x	10 μ L
Spesifik Forward Primer (10 μ M)	1.6 μ L
Spesifik Reverse Primer (10 μ M)	1.6 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	0.4 μ L
RNase icermeyen su	5.4 μ L
Template cDNA	1 μ L
Total Volüm	20 μL

Toplam volüm cDNA eklenmesiyle 20 μ L'ye tamamlandı ve aşağıdaki PCR koŐullarında LightCycler'da amplifikasyon gerçekleştirildi.

Hazırlanan reaksiyon karışımı LightCycler 20 µL'lik kapillere aktarıldıktan sonra cihaza yerleştirildi ve amplifikasyon aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi.

	Isı	Süre	Döngü Sayısı
PCR aktivasyon	95 ⁰ C	15dk.	1
Amplifikasyon			50
Denatürasyon	95 ⁰ C	45sn.	
Annealing	60 ⁰ C	45sn.	
Extansion	72 ⁰ C	45sn.	
Melting curve			1
Denatürasyon	95 ⁰ C	1dk.	
Annealing	60 ⁰ C	1dk.	
Melting	90 ⁰ C	0-0	
Cooling	40 ⁰ C	10dk.	1

4. BULGULAR

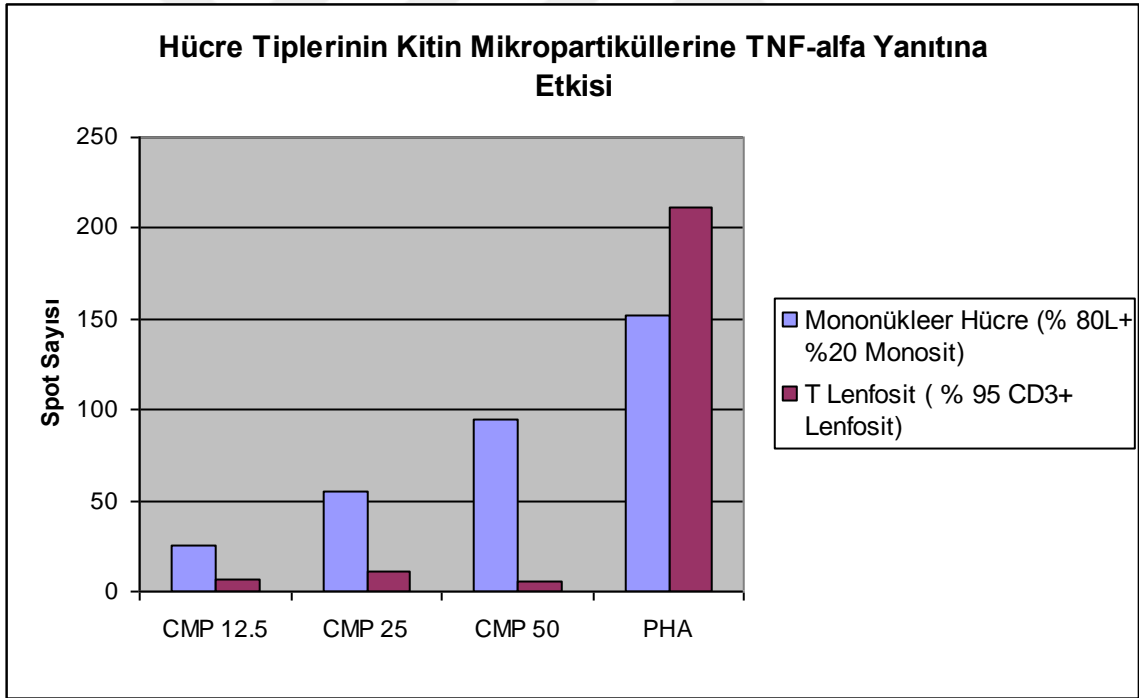
4.1. Elispot Verileri

4.1.1. TNF- α Yanıtı

4.1.1.1. CMP'nin Mononükleer Hücrelerde ve T lenfositlerinde TNF- α Yanıtına Etkisi

Yeni elde edilmiş mononükleer hücreler (genelde % 80 lenfosit + %20 monosit) ve magnetik boncuk yöntemi ile saflaştırılmış T hücreleri CMP'nin değişik dozları ve PHA ile uyarıldı.

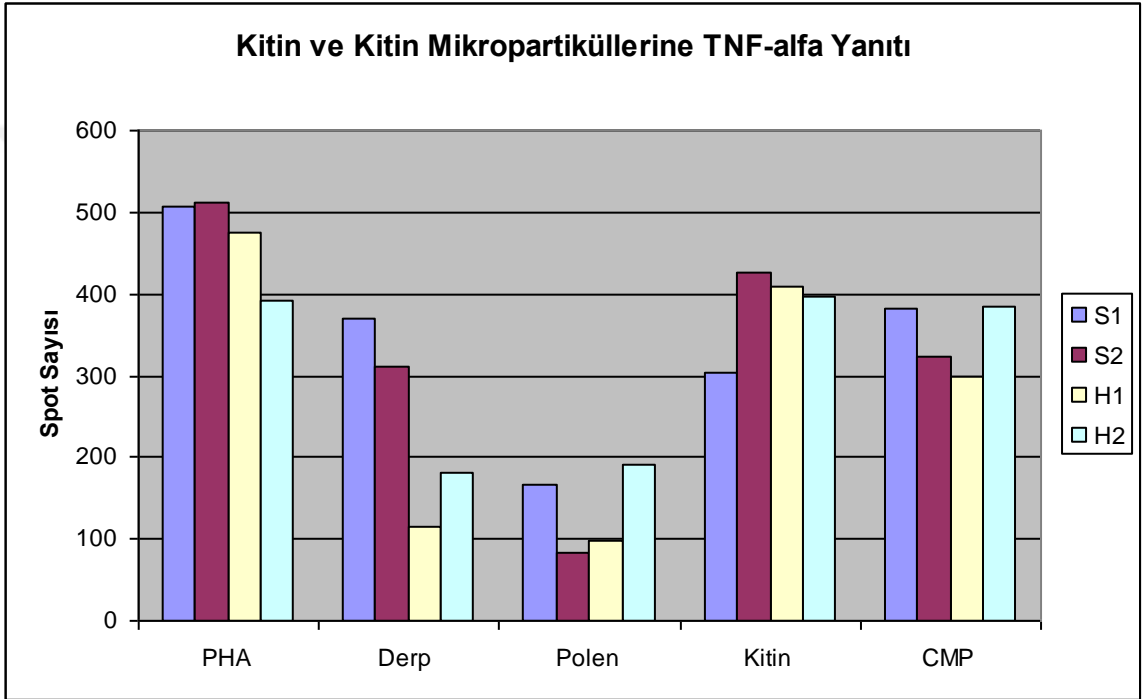
CMP yeni elde edilmiş mononükleer hücrelerden TNF- α yapımını kuvvetle uyarmaktadır ancak saflaştırılmış T hücrelerini uyarmamaktadır, diğer bir deyişle CMP'ne TNF- α yanıtı monosit kaynaklıdır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Mononükleer hücre ve T lenfositlerin kitin mikropartiküllerinin değişen dozlarına ve PHA'ya TNF- α yanıtı (Spot Sayısı : Uyarılmış Ortalama – Uyarılmamış Ortalama).

4.1.1.2. PHA, Kitin, CMP ve Allerjenlerle Uyarımın Mononükleer Hücrelerde TNF- α Yanıtına Etkisi

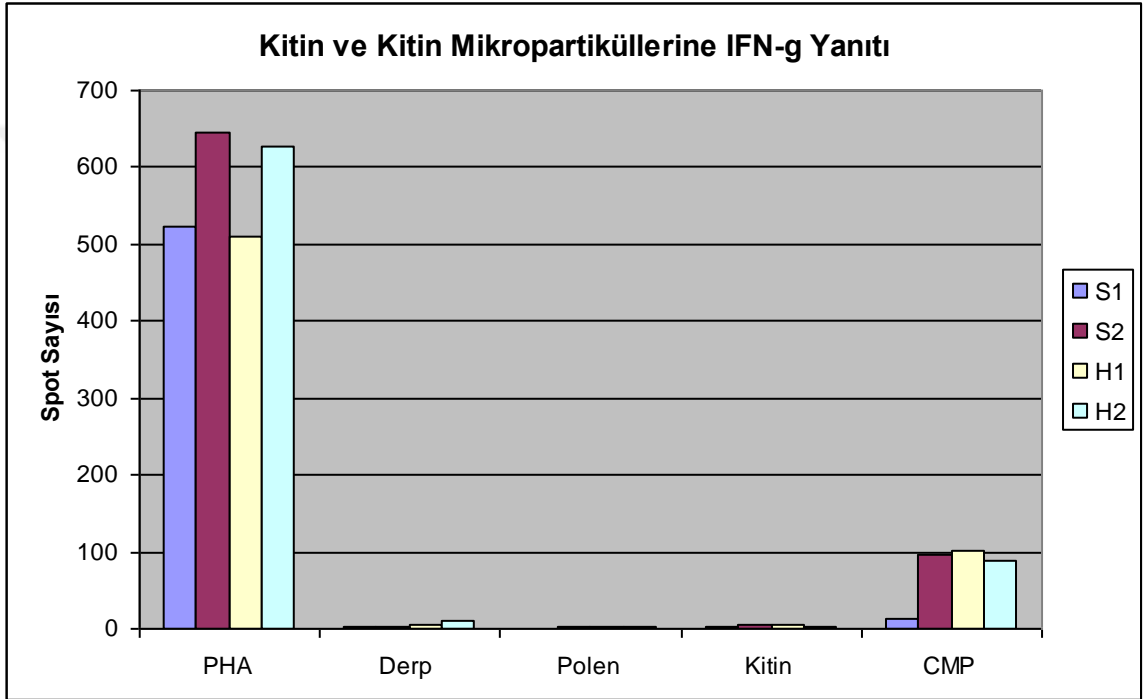
Sağlıklı ve atopik hastalardan elde edilen mononükleer hücreler kitin, CMP, PHA ve allerjenler ile uyarıldı. MN hücrelerin tüm uyarılara TNF- α yanıtı verdikleri gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil4.2. Sağlıklı ve atopik kişilerde PHA, CMP, Kitin ve duyarlı oldukları allerjene TNF- α yanıtı. S1 ve S2 sağlıklı 2'şer kişinin ortalamalarıdır. H1: Derp duyarlılığı, H2: Polen duyarlılığı deri testi ile saptanmış atopik kişilerin ortalamalarıdır (Spot Sayısı: Uyarılmış Ortalama – Uyarılmamış Ortalama).

4.1.2. PHA, Kitin, CMP ve Allerjen Uyarımının Mononükleer Hücrelerde IFN- γ Yanıtına Etkisi

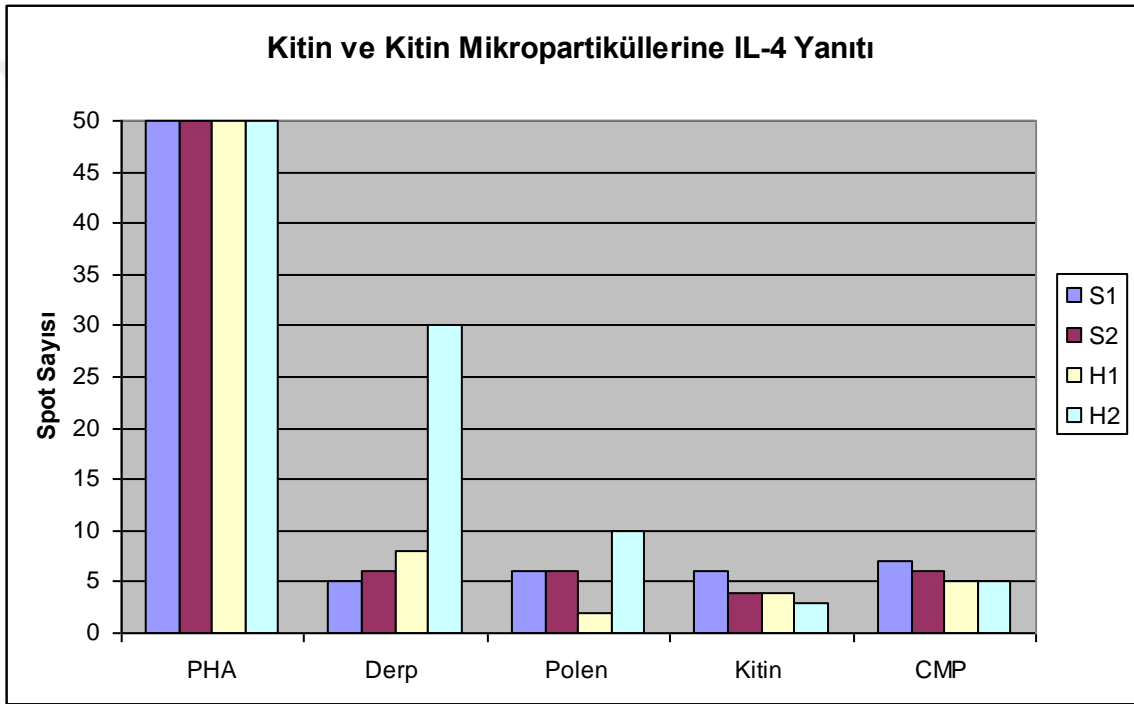
Sağlıklı ve atopik kişilerden elde edilen mononükleer hücreler kitin, CMP, PHA ve allerjenler ile uyarıldığında MN hücrelerin, CMP ve PHA'ye IFN- γ yanıtı verdikleri gözlemlendi, mediyuma doğrudan eklenen kitine yanıt saptanmadı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Sağlıklı ve atopik kişilerde PHA, CMP, Kitin ve duyarlı oldukları allerjene IFN- γ yanıtı. S1 ve S2 sağlıklı 2'şer kişinin ortalamalarıdır. H1: Derp duyarlılığı, H2: Polen duyarlılığı deri testi ile saptanmış atopik kişilerin ortalamalarıdır (Spot Sayısı: Uyarılmış Ortalama – Uyarılmamış Ortalama).

4.1.3. PHA, Kitin, CMP ve Allerjen Uyarımının Mononükleer Hücrelerde IL-4 Yanıtına Etkisi

Sağlıklı ve atopik kişilerden elde edilen mononükleer hücreler kitin, CMP, PHA ve allerjenler ile uyarıldığında MN hücrelerin, kitin ve CMP'ye IL-4 yanıtı vermediklerini, PHA'ya kuvvetli, allerjenlere zayıf da olsa IL-4 yanıtı verdiklerini gözledik (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Sağlıklı ve atopik kişilerde PHA, CMP, Kitin ve duyarlı oldukları allerjene IL-4 yanıtı. S1 ve S2 sağlıklı kişiler için ortalamalarıdır. H1: Derp duyarlılığı, H2: Polen duyarlılığı deri testi ile saptanmış atopik kişilerin ortalamalarıdır (Spot Sayısı: Uyarılmış Ortalama – Uyarılmamış Ortalama). Not: Olguların hepsinde PHA yanıtı 50'nin üstünde değerlerde bulunmuştur, daha düşük düzeyde olan diğer verilerin görülebilmesi için bu değerde kesilmiştir.

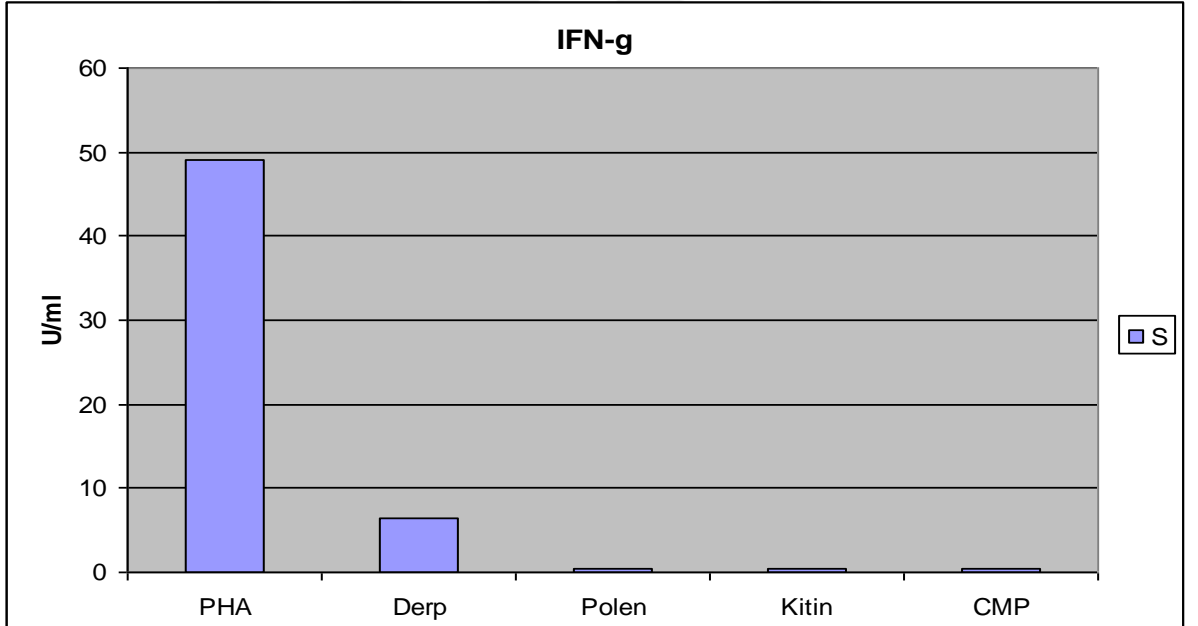
Sonuç olarak; ELISPOT verilerimize göre CMP'nin insan mononükleer hücrelerini uyararak TNF- α ve IFN- γ yanıtı oluşturabildiği ancak IL-4 yanıtına yol açmadığı söylenebilir. Kitin doğrudan ortama eklendiğinde, IFN- γ ve IL-4 yanıtı oluşturmamaktadır.

4.2. Elisa Sonuçları

Sağlıklı ve hasta grubunun uyarılmış mononükleer hücrelerinden süpernatant toplanarak yapılan Elisa sonuçları aşağıda belirtilmiştir. Sonuçlar kat artışı olarak verilmiştir. 2 kat ve üzeri artışlar pozitif yanıt olarak değerlendirilmiştir.

4.2.1. IFN- γ Yanıtı

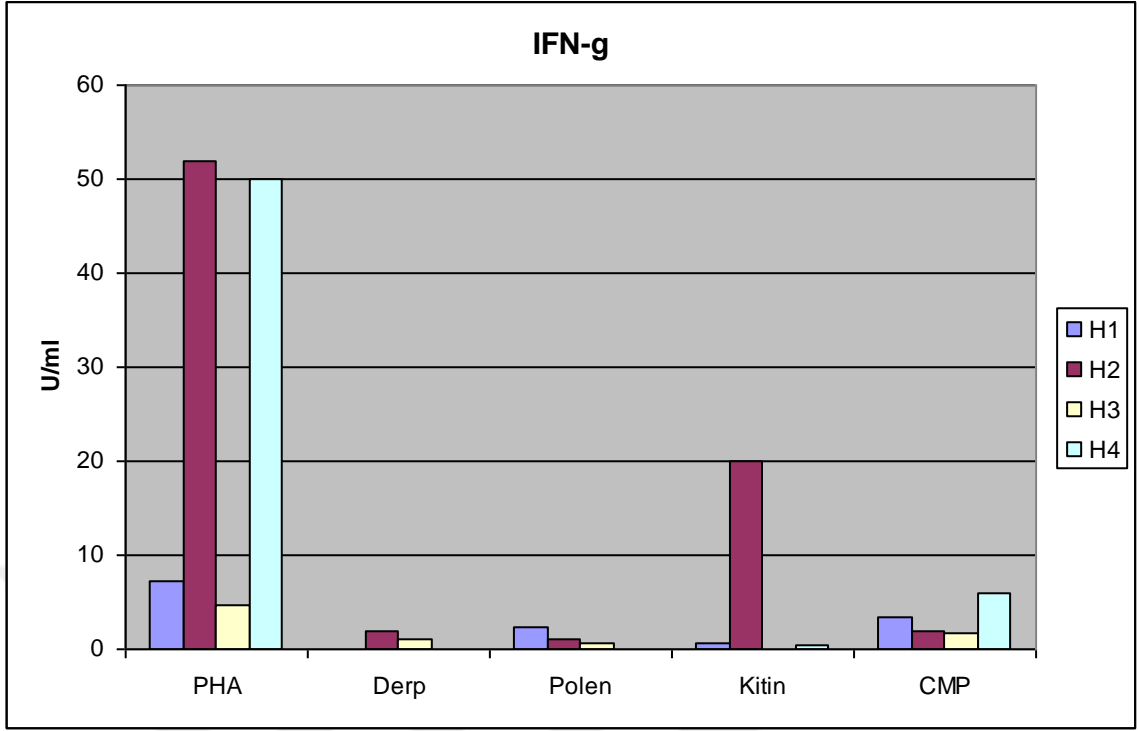
Polen ve derp allerjisi bulunan hasta grubu ile sağlıklı kontrollerden PHA, CMP, kitin ve allerjenlerle uyarmı sonucu edilde edilen süpernatantlarda IFN- γ yanıtı değerlendirildi. Atopik grupta CMP'ye IFN- γ yanıtı olduğu saptandı (Şekil 4.5 ve 4.6).



Şekil 4.5. Sağlıklı kontrolde IFN- γ yanıtı (S=Sağlıklı kontrol)

(CMP yanıtı : 0,5 U/ml oranında saptanmıştır.)

Sağlıklı kontrolde PHA'ya ve az bir oranda derp allerjenine karşı yanıt saptanmışken CMP yanıtı saptanmadı.



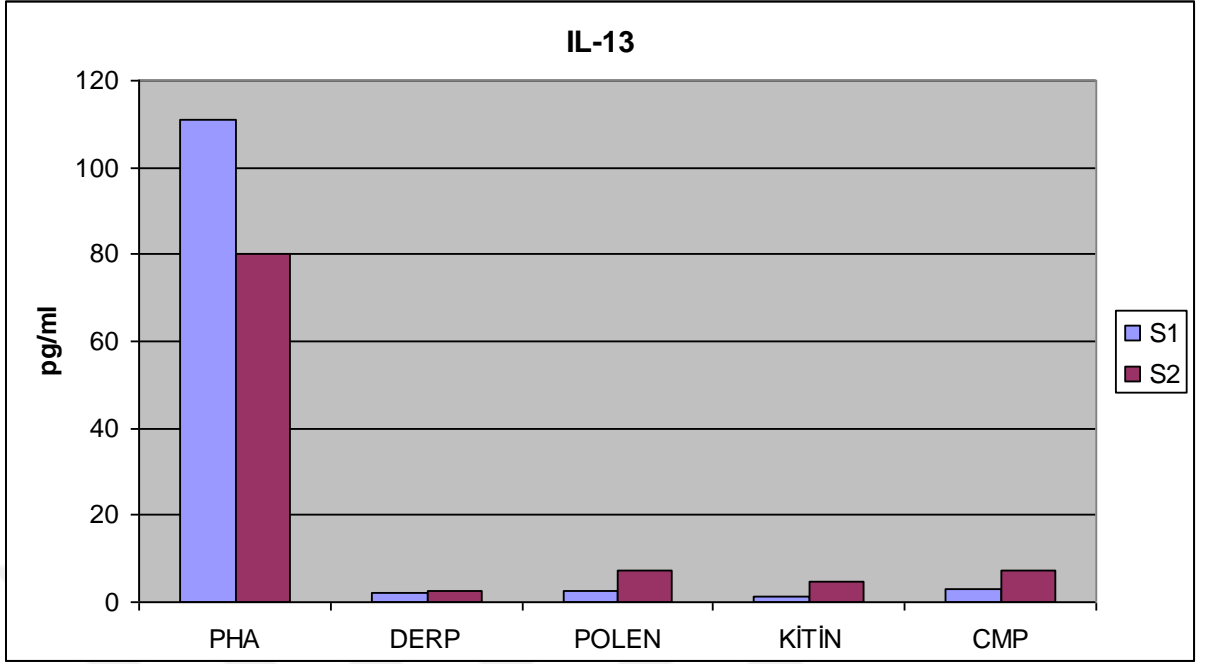
Şekil 4.6. Atopik grupta IFN- γ yanıtı

H1-3 : Derp allerjisi H2-4 : Polen allerjisi bulunan hasta grubu

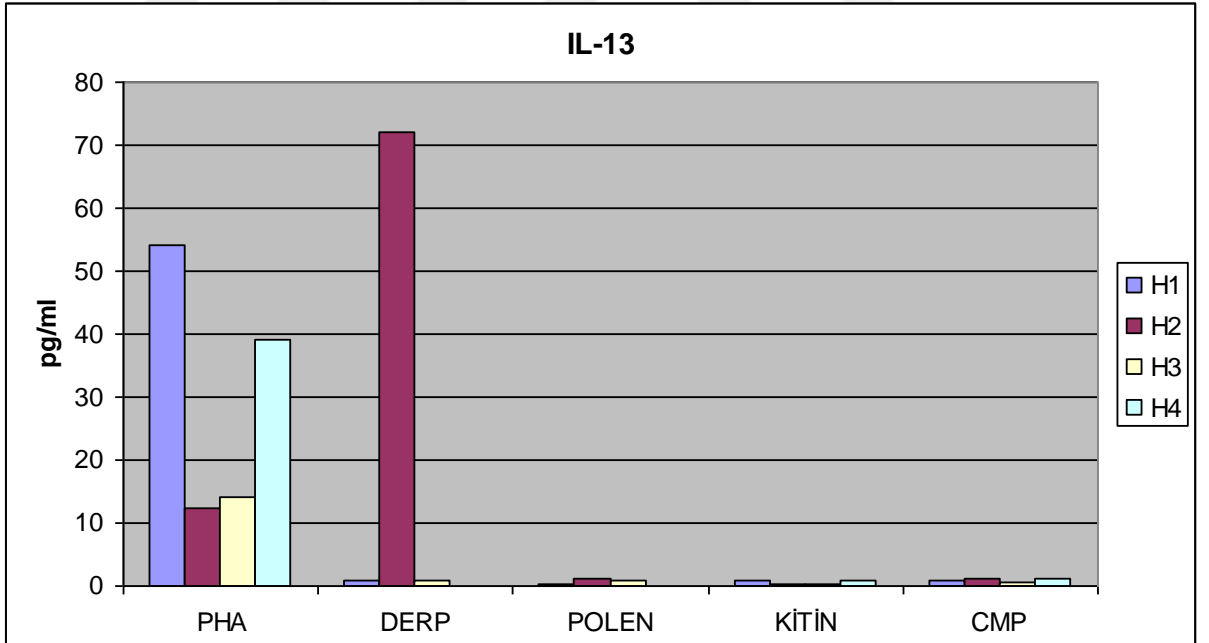
Atopik grup değerlendirildiğinde PHA ve CMP'ye IFN- γ yanıtı olduğu saptandı.

4.2.2. IL-13 Yanıtı

Polen ve derp allerjisi bulunan hasta grubu ile sağlıklı kontrollerden aynı uyarılar sonucu elde edilen süpernatantlarda zayıf da olsa IL-13 yanıtı saptandı (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.7. Sağlıklı kontrollerdeki IL-13 yanıtı



Şekil 4.8. Atopik grupta IL-13 yanıtı (H1-3 : Derp allerjisi H2-4 : Polen allerjisi bulunan hasta grubu)

Sağlıklı ve atopik grubun her ikisinde de PHA'ya güçlü bir IL-13 yanıtı saptandı. CMP uyarımı sonucu az da olsa yanıt olduğu görüldü.

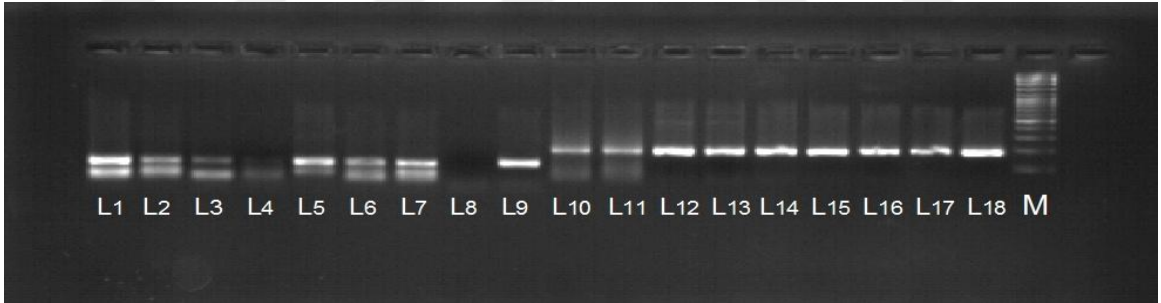
ELİSA verilerimize göre CMP nin insan mononükleer hücrelerini uyararak IFN- γ ve az miktarda IL-13 yanıtı oluşturmaktadır ancak IL-4 yanıtı oluşturmamaktadır (sonuçlarımız testin belirleme sınırlarının altında kaldığı için data tablosu verilmemiştir). Bu bulgular Elispot verilerimiz ile uyum göstermektedir.

4.3. RT-PCR Sonuçları

4.3.2. AMCase Yapım (Ekspresyon) Çalışmalarının Sonuçları

4.3.2.1. Atopik Dermatitli Hastaların Deri biyopsilerinden elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüleri

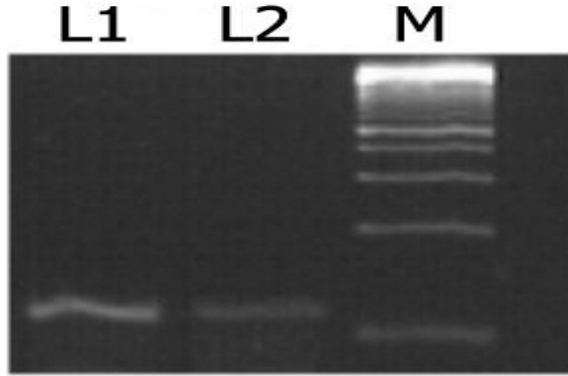
PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde belirlendi. PCR ürünlerinin büyüklükleri AMCase için 172 bp, β -aktin için 180 bp idi. AMCase'ın deride eksprese olup olmadığı literatürde bilinmediğinden mide dokusu pozitif kontrol olarak alındı (Şekil 4.9ve 4.10).



Şekil 4.9. Hastaların jel elektroforez görüntüleri

- Lane 1 : 1. hastanın normal deri bölgesi,
- Lane 2 : 1. hastanın lezyonlu deri bölgesi
- Lane 3: 2. hastanın normal deri bölgesi
- Lane 4 : 2. hastanın lezyonlu deri bölgesi
- Lane 5 : 3. hastanın normal deri bölgesi
- Lane 6 : 3. hastanın lezyonlu deri bölgesi
- Lane 7 : 4. hastanın normal deri bölgesi
- Lane 8 : 4. hastanın lezyonlu deri bölgesi
- Lane 9-18 : Mide dokusu
- Lane 10-17 : Aktin Ürünü
- M : Marker

Diğer bir hastanın bulguları resim 4.2’de görülmektedir:



Şekil 4.10. Hastaların jel elektroforez görüntüleri

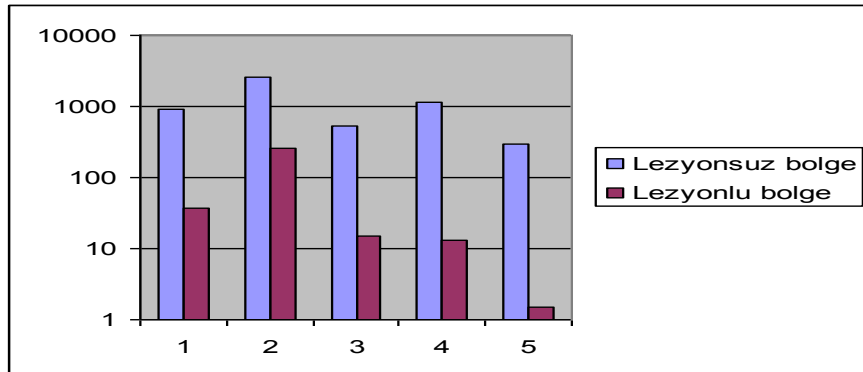
Lane 1: Atopik dermatitli hastanın normal deri bölgesi

Lane 2: Atopik dermatitli hastanın lezyonlu deri bölgesi

Jel elektroforez görüntülerimiz değerlendirildiğinde hastaların normal ve lezyonlu deri bölgelerinin her ikisinde de AMCCase bantlarına rastlandı, ancak hastaların normal deri bölgelerinde daha fazla ekspresyon olduğu görülmektedir.

4.3.2.2. Atopik Dermatitli Hastaların Deri Biyopsilerinde AMCCase Yapımı (Ekspresyonu)

Atopik dermatitli 5 hastadan alınan sağlıklı ve lezyonlu deri biyopsilerinden elde edilen PCR ürünlerinin düzeyleri, β -Actin’e göre normalize edilerek karşılaştırıldı (Şekil 4.11.).

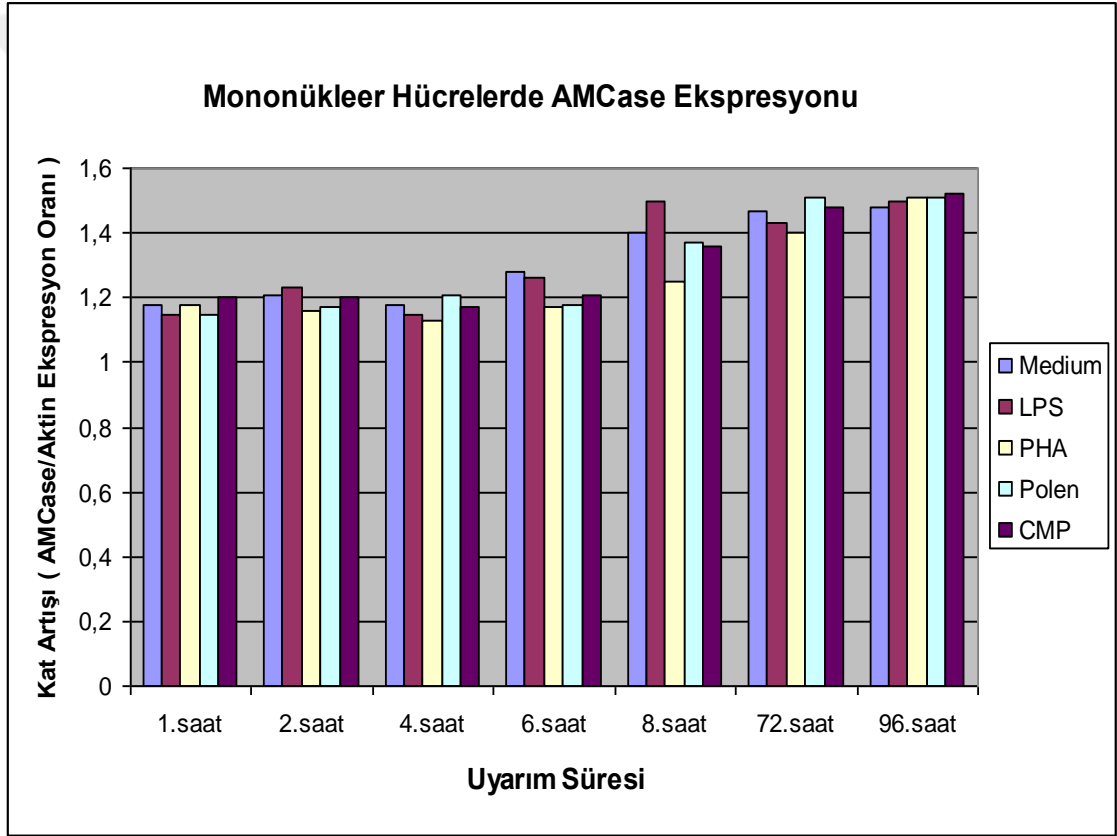


Şekil 4.11. Atopik dermatitli hastaların (1-5 nolu hastalar) sağlıklı ve lezyonlu deri biyopsilerinde AMCCase ekspresyon düzeyleri β -Aktin’e göre normalize edilerek karşılaştırılmıştır.

Hastalardan alınan deri biyopsilerinde normal deri ve atopik deri bölgesinin her ikisinde de AMCase ekspresyonu saptanmış olup, normal deri bölgesinde daha fazla gözlemlendi. Bu bulgularımız jel elektroforez görüntüleri ile uyumlu bulundu.

4.3.2.3. PHA ve CMP ile Uyarılmış Mononükleer Hücrelerde AMCase Yapımı (Ekspresyonu)

Mononükleer hücrelerin değişik zaman dilimlerinde LPS, PHA, Polen, CMP ile uyarımı sonucu AMCase yapımı (ekspresyonu) incelendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Periferik kandan izole edilen mononükleer hücreler değişik zaman aralıkları boyunca PHA, CMP, LPS, Polen ile uyarıldı. AMCase ürün düzeyleri β -Aktine göre normalize edilerek karşılaştırılmıştır.

AMCase ekspresyonu grafikte CMP ile indüksiyon sonucu 8. saatten sonra bir artış göstermektedir, ancak aynı artış mediumla veya diğer uyarılarla

uyarılmış hücrelerde de benzerdir. Ancak diyebiliriz ki AMCase ekspresyonu uyarılara ve zaman bağı olarak anlamlı bir artış göstermemiştir .

5. TARTIŞMA

Kitin parazit, mantar, gibi canlılarda ve polen, ev tozları gibi sık rastlanılan allerjenlerde bulunan bir glikopolimerdir. Kitinazlar kitini parçalayan enzimlerdir. Son yıllarda insanlarda da kitinazların bulunduğu ve bu enzimlerin bağışıklık yanıtında ve yangı oluşumunda rolü olduğunu gösteren çalışmalar yaygınlaşmıştır. Araştırmamızın temel esin kaynağı olan Zhu ve arkadaşlarının (37) yaptığı çalışma kitinazlarla allerjik yangı yanıtı arasındaki ilişkiye dikkati çekmiştir. Temelde parazitlere karşı dirençte önemli rolü olan Th₂ tipi bağışıklık yanıtı ve özellikle IL-13 ile AMCase arasındaki bağlantının gösterilmesi, kitinin bu canlılarda yoğun olarak bulunduğu göz önüne alınırsa fizyolojiye uymaktadır. Bu bilgilerin ışığında parazit varlığında aktive olan kitinazların kitin içeren parazitleri öldürerek ya da çoğalmalarını durdurarak etkin olması ve ajanın yok edilmesi ile yangının sınırlanması ya da durdurulması şeklinde bir seyir akla yatkın gelmektedir. Bu durumda kitinazın (AMCase) aktif dönemde yangının başlatılması ve bunu izleyen dönemde ise etkin olarak yangının sona erdirilmesi ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu çalışmalarda açıklanmayan ya da üzerinde çalışılmayan nokta parazit varlığında ya da allerjenle karşılaşma sonrası AMCase'ı tetikleyen IL-13'ü kitinin ya da başka hangi uyarıların uyardığı sorusudur. Kitinin insanlarda bir reseptörü olduğu gösterilmemiştir, dahası kitinin hangi hücrelerce algılandığı ve nasıl bir sitokin yanıtına yol açtığına yönelik araştırmalar çok sınırlıdır. Bu konuda bulabildiğimiz tek çalışma olan, Shibata ve arkadaşlarının (60) araştırmasında kitin mikropartiküllerine makrofaj hücre dizisinin TNF- α ve IL-1 yanıtı verdiği bildirilmiştir. Bizim elispot sonuçlarımızda (Şekil 4.1) kitin mikropartiküllerine öncelikle monositlerin TNF- α yanıtı verdiği ve CMP'nin mononükleer hücrelerde TNF- α yanında belirgin IFN- γ yapımını uyardığı ancak IL-4 yanıtına yol açmadığı gözlenmiştir(Şekil 4.3 ve 4.4).Elisa verilerimiz de buna uygun bulunmuş ancak CMP'nin zayıf ta olsa IL-13 yapımını uyardığına işaret etmektedir (Şekil 4.7 ve 4.8). Özetle sonuçlarımız Shibata ve arkadaşlarının bulgularına uymakta ve bu konuya IL-4, IFN- γ ve IL-13 yönünden yeni bilgiler eklemektedir. Bu sonuçlar CMP'nin, kitinden beklediğimiz şekilde

kuvvetli ve Th₂ ağırlıklı (IFN- γ düşük, IL-4 ve IL-13 yüksek) bir yanıt oluşturmadığını göstermektedir. AMCase'nin indüklenebilmesi için ne oranda IL-13 gerektiği konusunda bilgiler yetersiz olmakla birlikte, zayıf da olsa salgılanan IL-13'ün etkilerinin neler olabileceği konusunda bilgilerimiz sınırlıdır. İn vitro şartlarda gözlediğimiz zayıf IL-13 yanıtının biyolojik anlamı konusunda ileri çalışmalara gerek vardır. Strong ve arkadaşları (54) intranasal CMP verilmesi ile IL-12, IFN- γ , TNF- α ' da artış saptarken, IL-4'te azalma olduğunu belirtmişlerdir. Strong ve arkadaşlarının bu bulguları bizim bulgularımıza uymaktadır. Yine Özdemir ve arkadaşları (61) intranasal CMP verilmesi ile akciğer patolojisinin azalmasının Th₂ yanıtının azalması ve Th₁ yanıtına kaymasının yol açtığı şeklinde açıklamışlardır ki bu bizim invitro verilerimizle paralellik göstermektedir. Ancak elde ettiğimiz invitro verilerin hem başka tür bir canlıda hem de değişik doz yanıt çalışmaları olmayan çalışmalarla doğrudan ilişkilendirilmesi yanılgılara yol açabilir. Kitin yerine CMP ile yapılan çalışmalar kitine yönelik immün yanıtın değerlendirilmesi için iyi bir model olmayabilir. Kitinin bağışıklık dizgesinde hangi hücreler tarafından nasıl bir işlemden sonra algılandığı, işleme aşamasında klas I-II ya da CD 1a-e moleküllerine sunulup sunulmadığı konusu bilinmemektedir. CMP ile yaptığımız deneylerde bizim verilerimiz örneğin CMP'ye saf T hücrelerinin yanıt vermediğini monositlerin gerekli olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1). Kitin ve CMP ayrı yollara sunulabilir, invivo şartlarda mide asidi gibi etkilerle ve araya giren hücrelerle (epitel hücreleri, dendritik hücre v.b.) değişik şekilde işlenen CMP ve kitin birbirinden farklı yanıtlara yol açıyor olabilir. Ayrıca deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda doz değişikliklerinin ve uyarıcı veriş yolunun (deri altı, oral veya parenteral) gelecek yanıtı önemli oranda değiştirebileceği bilinmektedir. Özetle kitinin organizmada yol açtığı bağışıklık yanıtının düzeneği konusundaki bilgilerimiz çok eksiktir.

Kitin ve kitin mikropartiküllerinin AMCase'ı uyarması konusunda yaptığımız deneyler sonucunda AMCase'nin mononükleer hücreler tarafından yapıldığını (eksprese edildiğini) ancak denediğimiz hiçbir uyarıcının (PHA, Kitin, CMP) bu yapıyı (ekspresyonu) belirgin olarak değiştirmedeğini gözledik. Deney düzeneğimizde değişik zaman aralıklarını denetledik ancak belirgin bir zaman

tetikleme eğrisi de elde edemedik (Şekil 4.12). Belki de hücrelerin ayrıştırılma işlemleri sırasında AMCase yapılıyor (eksprese oluyor) olabilir ancak bu yapıyı engellemek teknik nedenlerden dolayı mümkün gibi görünmemektedir. Daha önceki yapım (ekspresyon) çalışmaları AMCase'ın mide ve akciğer epitelinde olduğunu göstermiştir (38).

Biz de AMCase'ın mide dokusunda kuvvetle yapıldığını gösterdik (resim 4.1 ve 4.2). Ayrıca verilerimiz bu enzimin hem mononükleer hücrelerde hem de deride yapıldığını göstermektedir. Goldberg ve arkadaşlarının (63) yaptığı çalışmada kordon kanı periferik mononükleer hücrelerinde AMCase'ın yapıldığı (eksprese olduğu) saptanmıştır. Ramanathan ve arkadaşları (69) yaptıkları çalışmada hem normal hem nazal poliplerde bu enzimin eksprese olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak yayınlanan bu veriler ile bizim verilerimiz, AMCase ekspresyonunun sanıldığı gibi sadece mide ve akciğer dokusuyla sınırlı olmadığını göstermektedir.

Atopik dermatitli (AD) olgularda AMCase gösterimi (ekspresyonu) bulgularımız beklediğimizin ve Zhu ve arkadaşlarının (37) akciğer dokusundaki bulgularının tersi şeklinde ortaya çıkmıştır. AMCase gösterimini (ekspresyonunu) normal deride lezyonlu bölgelerden daha yüksek saptadık (Şekil 4.11). Bunun iki açıklaması olabilir. AMCase hastalığın aktif döneminde yükselmiş, kullanılmış ve kronik fazda azalmış olabilir (biyopsilerin hepsi kronik dönemdeki AD'li erişkin hastalardan alınmıştır. İstememize karşın akut fazdaki lezyonlardan ve çocuklardan biyopsi alınamamıştır). Daha önce yapılan çalışmalarda özellikle erişkinlerde AD in erken fazında Th₂ tipi sitokinlerin geç fazda ise IFN- γ 'nın etkin olduğu yayınlanmıştır (22). IFN- γ 'nın Th₂ yanıtını, dolayısıyla IL-13 yapımını inhibe ettiği göz önüne alınırsa, bu dönemde AMCase gösterimi azalmış olabilir.

Bu bilgiler ışığında düşünülebilecek ikinci bir olasılık ise tartışmanın giriş bölümünde de belirttiğimiz gibi AMCase'ın etkinliği kitin içeren veya öyle algılanan allerjene karşı etkin bir yanıtla yangının sonlandırılmasını sağlamakta ve AMCase'ın düşük olması, yangının kronikleşmesiyle ilişkili olabilir. Bu konunun açıklığı kavuşması için AD'in değişik evrelerinde tekrarlanan biyopsilerde bu tarz çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Son yıllarda kitinazlar konusunda artan bilgilerimiz bu enzimin insanlarda, özellikle parazitlere karşı dirençte önemli olduğunu, alerjik yangı sırasında da aktive olduğunu göstermektedir, ancak bu enzimlerin özellikle alerjik hastalıkların patogenezindeki önemi, bağışıklık dizgesinin kitini nasıl ve ne şekilde algıladığı, kitinazların kitin dışında hangi yapılara (substratlara) etkilediği konularında ileri çalışmalara gerek vardır.



6. SONUÇLAR

1. Kitin mikropartikülleri invitro koşullarda mononükleer (özellikle monositler) hücreleri uyarak TNF- α , IFN- γ ve zayıf IL-13 yanıtı oluşturduğu, IL-4 yapımını uyarmadığı saptandı.

2. Periferik kandan ayrıştırılan mononükleer hücrelerin AMCase yaptığı (eksprese ettiği) ancak deneğimiz uyaranların (PHA, Kitin, CMP) hiçbirisinin bu ekspresyonu değiştirmediği ayrıca değişik zaman dilimlerinde ekspresyonda değişiklik olmadiği görüldü.

3. AD'li olgularda AMCase yapımı sağlıklı ve lezyonlu deri bölgesinin her ikisinde birden saptandı ancak sağlıklı deri bölgesinde lezyonlu bölgeden daha yüksek oranda saptandı.

7. ÖZET

Kitin ve Kitinazın Allerjik Reaksiyondaki Rolü

Kitin nematodlar, böcekler ve mantarlarda yaygın olarak bulunan, ancak memelilerde bulunmayan bir karbonhidrat polimeridir. Beklenildiği gibi kitinazlar, kitini parçalayan, kitin içeren organizmaların büyümesini engelleyen enzimlerdir, bu enzimlerin kitin içeren patojenlere karşı savunmada önemli rol oynadığı bilinmektedir. İnsanlarda da kitinaz genlerinin bulunduğu bilinmektedir, ancak bu gen ürünlerinin biyolojik rolleri bilinmemektedir ve benzer şekilde insanlarda da kitin içeren patojenlere karşı savunmada rol oynamaları beklenirse de bunu gösteren çok az veri vardır.

Özellikle IgE yapımı ve eozinofil aktivasyonu ile karakterize Th₂ tipi immün yanıtın öncelikle parazitlere karşı immün savunmada önemli olduğu bilinmektedir ki bu parazitlerin çoğunluğu kitin içermektedir. Sonuç olarak Th₂ tipi immün yanıtla kitinaz indüksiyonu ya da aktivasyonu arasında gösterilen ilişki akla yakın görülmektedir. Th₂ tipi yanıtın baskın olduğu ve bunun etyopatogenezde en önemli faktör olduğu düşünülen allerjik hastalıklara gelince, ev-tozu akarı, hamam böceği ve mantarlar gibi atopik hastalıkların en yaygın rastlanan allerjenleri kitin içermektedir. Bu bilgilerin ışığında allerjik hastalığı olan bireylerin immün sisteminin kitin içeren bu allerjenleri, parazit saldırısı olduğu şeklinde algıladığı ve bu nedenle anti-paraziter olduğu iyi bilinen Th₂ tipi immün yanıtı geliştirdiği düşünülebilir.

Bu çalışmada kitin mikropartikülerinin in vitro etkileri Elisa ve Elispot yöntemi ile araştırıldı. Elde edilen mononükleer hücrelerin değişik uyaranlarla ve farklı zaman dilimlerinde karşılaşımı sonucu ve atopik dermatitli olgulardan alınan deri biyopsilerinden AMC₂ gen yapımına (ekspresyonuna) bakıldı. AMC₂ ürün düzeyleri β-aktine göre normalize edilerek karşılaştırıldı.

Kitin mikropartikülleri in vitro koşullarda mononükleer (özellikle monositler) hücreleri uyarak TNF-α, IFN-γ ve zayıf IL-13 yanıtı oluşturduğu, IL-4 yapımını uyarmadığı saptandı.

Periferik kandan ayrıştırılan mononükleer hücreler AMCCase yaptığı (eksprese ettiği) ancak denediğimiz uyarıların (PHA, Kitin, CMP) hiçbirisinin bu ekspresyonu değiştirmedeği görüldü.

AD'li olgularda AMCCase yapımı sağlıklı bölgede lezyonlu bölgeden daha yüksek oranda saptandı.

AMCCase gen yapımı normal deri ve atopik deri dokusunda da saptanmıştır. Bu bulgu sanıldığının aksine bu enzim yapımının sadece mide ve akciğer dokusuna sınırlı olmadığı yönünde düşündürmektedir.

İnsan vücudunda farklı AMCCase tiplerinin tanımlanması, allerjenin vücuda farklı yollardan girmesi sonucu farklı yolakları kullanabilme özelliğinin olması sebebi ile değişik mekanizmaların denendiği, insan hücrelerinin kullanıldığı daha fazla invitro verilere ihtiyaç duyulmakta olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar Sözcükler : Kitin, Kitin mikropartikülü, Kitinaz

8. ABSTRACT

Role of Chitin and Chitinase on Allergic Immune Response

Chitin is found in the sheaths of parasitic nematodes, in the exoskeletons of crustaceans and insects, in the fungal cell walls, but not in mammals. Chitinases are induced in lower life forms during infections with these agents. Chitinase production is an important feature of antiparasitic response against chitin containing organisms. Although chitin itself does not exist in humans, chitinases are present. There is very limited knowledge on the biological roles of human chitinases and the role of these enzymes in antiparasitic response in humans remains to be defined.

Together with the Th₂ type response, IgE production and eosinophil activation are also main components of antiparasitic defense. Most of the parasites contain chitin and in addition to these, house dust mite, cockroach, fungi, which are common causal allergens also contain chitin. These evidence lead us to a novel hypothesis about allergic diseases; i.e. immun system senses chitin as if there is a parasite or fungi infection, and responds with a Th₂ polarised immune reaction accordingly.

In this study, we investigated in vitro effects of chitin or chitin microparticles on peripheral blood mononuclear cells by Elisa and Elispot technique. We stimulated these cells with various stimulations at different times and investigated AMCCase gene expression in skin biopsies taken from atopic dermatitis patients. We compared AMCCase gene products with β -actin.

We observed a positive TNF- α , IFN- γ and poor IL-13 response but no IL-4 response with chitin microparticle stimulation. We also observed that the mononuclear cells, precipitated from peripheral blood, expressed AMCCase but no stimulators (PHA, Chitin, CMP) changed this expression.

In AD patients, AMCCase production was higher in healthy regions of skin than in skin of atopic lesion.

AMCase gen expression was isolated in healthy and atopic skin regions. In opposition to current expectations, it can be assumed that the production of this enzyme is not limited to stomach and lung tissues.

As there are various types of AMCases in human body, and because there are different entrances for allergens that use different pathways, we need more in vitro datas derived from human cells.

Key words : Chitin, Chitin microparticle, Chitinase



9. KAYNAKLAR

1. Marketos SG, Ballas CN. Historical perspectives bronchial asthma in the medical literature of Greek antiquity. *J Asthma* 1982; 19:263-269
2. Gemicioğlu B. Astım tanımından tanısına. *Türk Toraks Derneği 1. Kış Okulu, Adana, 22-26 Ocak 2002*
3. Özdemir C, Bahçeciler N, Barlan I. Astım immunolojisi. *Clinic Pediatri* 2006; 1:26-31
4. Koçak K. Astma Patogenezi. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Allerji Sayısı* 2005; 1:59-66
5. Karaman Ö, Babayiğit A, Ölmez D. Çocukluk çağında astım. *Güncel Pediatri* 2006; 3:56-62
6. Mungan D. Astımda Genotip-Fenotip İlişkisi. 11. Ulusal Allerji İmmunoloji Kongresi: Konuşma Metinleri, 11-14 Ekim, İstanbul, 120-122
7. Pillai SG, Chiano MN, White NJ, Speer M ve ark. A genome-wide search for linkage to asthma phenotypes in the genetics of asthma international network families: evidence for a major susceptibility locus on chromosome 2p. *Eur J Hum Genet* 2006; 14:307-316
8. Dittrich A.M, Quarcoo D, Krokowski M, Ahrens B, Hamelmann E. Gene expression profiling as novel tool in experimental asthma research. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 2:31-33
9. Le Souef PN. Variations in genetic influences on the development of asthma throughout childhood, adolescence and early adult life. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6:317-322
10. Mungan D. Astım Tanı ve Tedavisi. *Türk Toraks Derneği , 1. Mesleki gelişim Kursu, 3-6 Mart 2004, Nevşehir*
11. Solak Z. Astım ve atopi gelişiminde hijyen hipotezi. *Toraks Dergisi*, 2003; 4:269-278

12. Barlan I. Atopik yanıt ve mikobakteri ilişkisi. *Astım Allerji İmmünoloji* 2004; 2:83-88
13. Zimmermann N, Mishra A, King NE, Fulkerson PC, Doepker MP, Nikolaidis NM ve ark. Transcript signatures in experimental asthma: identification of stat6-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2004; 172:1815–1824.
14. Pernis AB, Rothman PB. JAK-STAT signaling in asthma. *J Clin Invest* 2002; 109:1279–1283
15. Wills-Karp M, Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2004; 202:175–190
16. Wills-Karp M et al, Interleukin-13:central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282:2258-60
17. Kuperman DA, Huang X, Koth L, Chang GH, Dolganov GM ve ark. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 2002; 8:885-889
18. Khurana Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:677-90
19. Dessein A, Kouriba B, Eboumbou C, Dessein H, Argiro L, Marquet S ve ark. Interleukin-13 in the skin and interferon-g in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. *Immunol Rev* 2004; 201:180-190
20. Akdiş M, Blaser K, Akdiş CA. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases, *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:961-8
21. Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med* 2005;202:1459–1463
22. Akdiş CA , Akdiş M, Trautmann A, Blaser K. Immune regulation in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol* 2000;12:641–646
23. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-52

24. Moseley T.A., Haudenschild D.R., Rose L., Reddi A.H. Interleukin family and IL-17 receptors, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003;14: 155–174
25. Maitra A, Shen F, Hanel W, Mossman K, Tocker J, Swart D ve ark. Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:7506-11
26. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells, *Curr Opin Immunol* 2007;19:281–286
27. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V ve ark. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 2006; 203:2715-2725
28. Sapan N. Atopik Dermatitte Klinik, *Astım Allerji İmmunoloji* 2003;1:173-174
29. Çokuğraş H. Allerjik hastalıklar ve atopik dermatit prevalansı, *Güncel Pediatri* 2005; Cilt:3 Sayı:1
30. Ergun T. Atopik dermatitin ayırıcı tanısı, *Astım Allerji İmmunoloji* 2003; 1:175-177
31. Utaş S, Atopik Dermatit. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Dermatoloji Özel Sayısı* 2005; 1:61-67
32. Yıldırım M, Özcanlı Ç, Atopik Dermatit, *S.D.Ü. Tıp Fak Derg* 2004;11:21-25
33. Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema : a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 2004;4:978-88
34. Çokuğraş H. Atopik dermatitte immunopatogenez, *Astım Allerji İmmunoloji* 2003;1:171-172
35. Akdiş M, Akdiş C. Atopik dermatit immunopatogenezi, *Astım allerji İmmunoloji* 2003;1:38-43
36. Bierbaum S, Nickel R, Koch A, Lau S, Deichmann K, Wahn U ve ark. Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1505-1509

37. Zhu Z, Zheng T, Homer R, Kim Y, Chen N, Cohn L ve ark. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 2004;304:1678-82
38. Boot R, Bussink A, Verhoek M, Boer P, Moorman A, Aerts J. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem* 2005;53:1283-1292
39. Gotoa M, Fujimoto W, Niob J, Iwanagab T, Kawasakia T. Immunohistochemical demonstration of acidic mammalian chitinase in the mouse salivary gland and gastric mucosa. *Arch Oral Biol* 2003; 48:701-707
40. Reese T, Liang H, Tager A, Luster A, Rooijen N, Voehringer D ve ark. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 2007;447:92-96
41. Bierbaum S, Superti-Furga A, Heinzmann A. Genetic polymorphisms of chitotriosidase in Caucasian children with bronchial asthma. *Int J Immunogenet* 2006;33:201–204
42. Homer R, Zhu Z, Cohn L, Gun Lee C, White W, Chen S ve ark. Differential expression of chitinases identify subsets of murine airway epithelial cells in allergic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291:502–511
43. Chou Y, Yao S, Czerwinski R, Fleming M, Krykbaev R, Xuan D ve ark. Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry* 2006;45:4444-4454
44. Boot RG, Blommaart EF, Swart E, Vlugt KG, Bijl N, Moe C ve ark. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem* 2001; 276:6770–6778
45. Wills-Karp M, Karp C. Chitin checking—novel insights into asthma. *N.Engl. J. Med.* 2004; 351:1455-1457
46. Boot R, Verhoek M, Fost M, Carla E. M, Hollak C, Maas M ve ark. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood* 2004; 103:33-39

47. van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaert EF ve ark. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1505-1512
48. Rao FV, Houston DR, Boot RG, Aerts JM, Sakuda S, Aalten DM. Crystal structures of allosamidin derivatives in complex with human macrophage chitinase. *J Biol Chem* 2003;278: 20110–20116
49. Boot RG, Renkema H, Verhoek M, Strijland A, Bliet J, Meulemeester TM ve ark. The Human Chitotriosidase Gene. *J Biol Chem* 1998; 273: 25680–25685
50. Hollak C, Weely S, Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity-a novel hallmark of gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93:1288-1292
51. Barone R, Di Gregorio F, Romeo MA, Schilirò G, Pavone L. Plasma chitotriosidase activity in patients with beta-thalassemia. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 25:1-8
52. Boot RG, Renkema H, Strijland A, Zonneveld AJ, Aerts JM. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* 1995; 270:26252–26256
53. Renkema H, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JM. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem* 1995; 270:2198-2202
54. Strong P, Clark H, Reid K. Intranasal application of chitin microparticles down-regulates symptoms of allergic hypersensitivity to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Aspergillus fumigatus* in murine models of allergy. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1794-1800
55. Suzuki M, Fujimoto W, Goto M, Morimatsu M, Syuto B, Iwanaga T. Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:1081–1089
56. Suzukia M, Morimatsua M, Yamashitab T, Iwanagac T, Syutoa B. A novel serum chitinase that is expressed in bovine liver. *FEBS Lett* 2001; 506:127-130

57. Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol* 2003; 171:3655–3667.
58. Elias JA, Homer RJ, Hamid Q, Lee CG. Chitinases and chitinase-like proteins in TH2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:497-500
59. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S ve ark. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of hemagglutinin vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *J Med Virol* 2005; 75:130-136
60. Shibata Y, Foster LA, Metzger JW, Myrvik QN. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of n-acetyl-d-glucosamine, in mice. *Infect Immun* 1997; 65:1734-1741
61. C.Özdemir, D.Yazı, M.Aydoğan, T.Akkoç, N.N.Bahçeciler, P.Strong ve ark. Treatment with chitin microparticles is protective against lung histopathology in a murine asthma model. *Clin.Exp.Allergy* 2006; 36:960-968
62. Shibata Y, Foster AL, Bradfield JF, Myrvik QN. Oral administration of chitin down-regulates serum IgE levels and lung eosinophilia in the allergic mouse. *J Immunol* 2000;164:1314–1321.
63. Goldberg M, Nadiv O, Luknar-Gabor N, Katz Y. Expression of acidic mammalian chitinase in cord blood mononuclear cells. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:14
64. Zhao J, Yeong LH, Wong F. Dexamethasone alters bronchoalveolar lavage fluid proteome in a mouse asthma model. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 142:219-229
65. Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A, Mizoguchi E. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med* 2007; 56:21-27
66. Escott GM, Adams DJ. Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect Immun* 1995; 63:4770–4773

67. DE Mathew, JA Sills, AG Cleary. Novel biochemical markers of granulomatous disease in common variable immunodeficiency in a child with arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J* 2004; 2:497-502
68. Cho E, Zimmerman PA, Foster CB, ZhuS, Kumaraswami V, Nutman TB ve ark. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with wuchereria bancrofti in South India. *Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* 2000; 40: 516
69. Ramanathan M, Lee W-K, Lane A. Increased expression of acidic mammalian chitinase in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Rhinol* 2006; 20:330-335

