

# Akciğer tüberkülozunda ekstraselüler matriks proteinlerinin granülom yapılanmasındaki rolü

## *The role of extracellular matrix proteins in the formation of granulomas in pulmonary tuberculosis*

Gülay Özbilim<sup>1</sup>

Nural Ören<sup>1</sup>

Tülay Özdemir<sup>2</sup>

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Antalya

<sup>1</sup> Patoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup> Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

### Özet

**Amaç:** Çalışmamızda akciğer tüberkülozundaki granülom yapılarına ekstraselüler matriks elemanlarının katılım oranını belirlemeyi; TGF-beta 1'in granülomlardaki ve akciğerin diğer alanlarındaki ekspresyonunu saptamayı; TGF-beta 1 ile olası ilişkiyi göstermeyi; hastaların, sağaltıma verdikleri yanıt ile TGF-beta 1 ve ekstraselüler matriks elemanlarının ekspresyon miktarları arasında bir bağlantı olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

**Yöntem:** Akciğer tüberkülozlu 43 olguya ait preparatlar, ışık mikroskopunda yeniden değerlendirildi. İmmun dokü kimyasal olarak kollajen 1, kollajen 4, fibronektin, laminin ve TGF-beta 1 ekspresyonları incelendi.

**Bulgular ve sonuç:** Sonuç olarak, ekstraselüler matriks elemanlarının granülomların yapısına katıldıkları; TGF-beta 1 ile arasında paralellik olduğu belirlendi ve TGF-beta 1'in granülomlara katılan ekstraselüler matriks elemanları üzerinde etkili olabileceği düşünüldü. Olguların sağaltıma verdikleri yanıtlar ile granülomların düzeni, ekstraselüler matriks elemanlarının granülomlardaki miktarı ve TGF-beta 1 ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki belirlenemedi.

**Anahtar sözcükler:** Tüberküloz, ekstraselüler matriks, TGF-beta 1

### Summary

**Aims:** We aimed to identify the rate of participation of extracellular matrix elements in granulomas of pulmonary tuberculosis and evaluate the expression of TGF-beta 1 in granulomas and other regions of lung. We also aimed to show the probable relation with TGF-beta 1 and to assess the relation of patients response to therapy with the intensity of expression of extracellular matrix elements.

**Material-methods:** The specimens of 43 cases with pulmonary tbc are reevaluated under light microscope. The immunohistochemical expressions of collagen 1, collagen 4, fibronectin, laminin and TGF-beta 1 are evaluated.

**Results and conclusion:** In conclusion, we showed here that the extracellular matrix elements are involved in the formation of granulomas and there is positive relation with TGF-beta 1. TGF-beta 1 may influence the extracellular matrix elements participated in granulomas. There was no relation of the patients' response to therapy with the amount of extracellular matrix elements in granulomas and TGF-beta 1 expression.

**Key words:** Tuberculosis, extracellular matrix, TGF-beta 1

**T**überküloz enfeksiyonu mycobacterium grubu bakteriler tarafından oluşturulan, geçmişte hipersensitivite ve hücrel immun yanıt oluşumuna yol açan, granülomatöz yangı gelişimi ile belirli bir hastalıktır. Granülomatöz yangı oluşmasında hücrel immun yanıtın temel öğeleri olan T lenfositler, makrofajlar ve bunlardan salgılanan sitokinlerin önemli rolleri vardır.

Ekstraselüler matriks (ESM), dokuların fizyolojik iskeletini oluşturan, yara iyileşmesi, hücrelerin çoğalması, hareketi ve farklılaşması gibi birçok olaya katkıları olan aktif bir yapıdır.

Granülomatöz yangı gelişmesinde ve hastalığın sınırlandırılmasında, ESM elemanlarının önemli katkıları vardır. TGF-beta 1'in fibroblastlarda ESM elemanlarının üreti-

mini arttırdığı, fibrozis gelişimini uyardığı, yara iyileşmesinde merkezi bir rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (1-5). Bu çalışmalarda; TGF-beta 1'in tüberküloz (tbc) enfeksiyonunda, ESM elemanlarını artırarak yangıyı sınırlayıcı bir rolü olabileceği gibi, immün sistemi baskılayarak, bakterilerin makrofajlar içindeki çoğalmalarını artırıcı yönde etkileri de saptanmıştır.

Bu çalışmada; akciğer tbc'undaki granülom yapılarına ESM elemanlarının katılım oranını belirlemek, TGF-beta 1'in granülomlardaki ekspresyonunu saptamak, TGF-beta 1 ile ESM elemanları arasındaki olası ilişkiyi göstermek, hastaların sağaltıma verdikleri yanıt ile TGF-beta 1 ve ESM elemanlarının ekspresyonu arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

### Gereç ve yöntem

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda "akciğer tbc" tanısı almış 43 olguya ait Hematoksilin Eozin (H+E) ile boyalı preparatlar ve parafin bloklar kullanıldı.

Olgulara ait klinik bilgiler hasta dosyalarından elde edildi ve preparatlar ışık mikroskopunda yeniden değerlendirildi. Seçilen bloklardan elde edilen doku kesitlerine immün dokü kimyasal olarak streptavidin-biotin kompleksi yöntemi ile uygulanan antikörlerin özellikleri Tablo I'de sunulmuştur. Uygulanan her bir antikör için (fibronektin, laminin, kollagen 4, kollagen 1, TGF-beta 1) granülomların çevresi, içi, epiteloid histiyositler, dev hücreler, fibroblastlar, damarlar, alveol epitel ve alveoler makrofajlar incelendi. Reaksiyonun yoğunluğu 1 (hafif), 2 (orta), 3 (şiddetli) pozitif (+) olarak semikantitatif yöntemle değerlendirildi (Tablo II).

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

### Bulgular

Işık mikroskopunda değerlendirmede izlenen granülom yapılarında nekroz içermeyen olgu saptanmadı. 9 olguda

fibrotik görünümde granülomlar görüldü; diğer 34 olguda ise fibrozis izlenmedi. Ayrıca 39 olguda, alveoler makrofaj yoğunluğu vardı.

İmmün dokü kimyasal bulgular (Resim 1-5): Granülomlar çevresindeki ESM elemanları arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak granülomlar çevresindeki fibronektin ekspresyon yoğunluğu ile kollagen 4 ( $p=0.020$ ) ve kollagen 1 ekspresyon yoğunluğu ( $P=0.000$ ) arasında ve ayrıca kollagen 4 ile kollagen 1 yoğunlukları ( $P=0.001$ ) arasında pozitif bir korelasyon saptandı. Granülomlar içindeki fibronektin ekspresyon yoğunluğu ile laminin ( $P=0.044$ ), kollagen 4 ( $P=0.025$ ) ve kollagen 1 yoğunlukları ( $P=0.004$ ) arasında pozitif bir korelasyon saptandı. Ayrıca granülomlar içindeki kollagen 4 ile kollagen 1 ekspresyon yoğunlukları da birbiri ile korele bulundu ( $P=0.019$ ).

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

Fibroblastlardaki ESM elemanlarının ekspresyonu ile granülomlardaki ESM elemanlarının yoğunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde; fibroblastlardaki fibronektin ile granülomlar çevresindeki ( $p=0.000$ ), granülomlar içindeki ( $p=0.002$ ) ve epiteloid histiyositlerdeki ( $p=0.000$ ) fibronektin ekspresyonu arasında pozitif korelasyon saptandı.

Aynı şekilde fibroblastlardaki laminin ekspresyonu ile granülomlar çevresindeki laminin yoğunluğu ( $p=0.000$ ); fibroblastlardaki kollagen 4 ile granülomlar çevresindeki kollagen 4 ekspresyonu ( $p=0.003$ ), fibroblastlardaki kollagen 1 ile granülomlar çevresindeki ( $p=0.004$ ) ve içindeki kollagen 1 ( $p=0.037$ ) ekspresyonları korele bulundu.

Fibronektin için dev hücreler ve epiteloid histiyositlerdeki ekspresyonlar arasında da pozitif korelasyon saptandı. Ayrıca bronş epitelindeki fibronektin ve kollagen 1 ekspresyonları da korele bulundu ( $p=0.033$ ).

Tablo I. Kullanılan antikörlerin özellikleri.

Antikör	Klon No	Kaynak	Kod No.	Dilüsyon oranı	Pozitif kontrol
Fibronektin	Poliklonal	Dako	AO245	1/800	Tonsil
Kollajen Tip 4	Monoklonal	Dako	MO785	1/50	Plasenta
Kollajen Tip 1	Poliklonal	Novocastra	NCL-COL-1p	1/40	Plasenta
Laminin	Monoklonal	Novocastra	NCL-Laminin	1/50	Tonsil
TGF-beta 1	Poliklonal	Santa Cruz	Ca #sc-146	1/500	İnce barsak

Tablo II. Olgularda izlenen fibronektin ekspresyon yoğunluğu.

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

G.Ç. : Granülom çevresi

E.H.: Eiteloid histiyositler

Dm. : Damarlar

A.E.: Alveol epiteli

G.İ. : Granülom içi

Fib. : Fibroblastlar

B.E. : Bronşiol epiteli

A.M.: Alveoler makrofajlar

D.H. : Dev hücreler

Len.: Lenfositler

B.B.M.: Bronşiol bazal membranı

Y : Kesitte yok

Olguların hastalık süreleri ile granülom yapılarının içerdiği ESM elemanlarının yoğunlukları arasında, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. Ayrıca granülomlardaki ESM elemanlarının yoğunluğu ile ilaca verilen yanıt da istatistiksel olarak ilişkisizdi.

Granülomlar çevresinde izlenen TGF-beta 1 ile granülom çevresi ve içindeki kollagen 1 ekspresyonu ( $p=0.010$  ve  $p=0.006$ ) ayrıca granülom içindeki fibronektin ile granülom çevresi ve içindeki TGF-beta 1 ekspresyonu arasında korelasyon bulundu ( $p=0.004$  ve  $p=0.005$ ). Granülom içindeki kollagen 4 ile TGF-beta 1 ekspresyonu da paraleldi ( $p=0.041$ ).

Granülomlardaki laminin ile TGF-beta 1 arasında istatistiksel anlamlılık izlenmedi. TGF-beta 1'in granülomlardaki ve diğer alanlardaki ekspresyon şiddeti ile olguların tedaviye verdikleri yanıtlar arasında anlamlı bir ilişki belirlenemedi.

Fibroblastlardaki TGF-beta 1 ile granülom çevresindeki ve içindeki fibronektin, fibroblastlardaki fibronektin ve granülom içindeki kollagen 1 birbiri ile korele idi ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.019$ ). Granülomlar çevresindeki ve içindeki epitelooid histiyositlerdeki ve dev hücrelerdeki fibronektin ile TGF-beta 1 ekspresyonu arasında istatistiksel korelasyon saptandı ( $p=0.027$ ,  $p=0.013$ ,  $P=0.014$ ,  $p=0.030$ ).

## Tartışma

Tüberküloza karşı vücudun savunulmasında ve hastalığın sınırlandırılmasında, T lenfositlerin aracılık ettiği, makrofajların aktivasyonu, epitelooid histiyositlerin ve dev hücrelerin oluşumu ile belirli granülom gelişimi ile sonuçlanan hücreyel immün yanıt temel mekanizmadır. Bu hücreyel immün yanıt ek olarak, ESM elemanlarının granülom oluşumunda ve tüberküloz enfeksiyonunun sınırlandırılmasında yoğun katkıları vardır (7-9).

Granülomatöz yangıda, ESM elemanlarının granülomlardaki ekspresyonunu ve granülom yapılanmasındaki rolünü belirlemek amacıyla yapılmış az sayıda çalışma vardır.

TGF-beta grubunu oluşturan sitokinler ESM'in düzenlenmesi ve yara iyileşmesinde etkilidir. TGF-beta'nın birçok farklı dokulardaki fibroblastlarda farklı kollagen tiplerinin üretimini arttırdığı, fibronektin ve fibronektin reseptörü ekspresyonunu çoğalttığı, bazı mezankimal ve epitelyal hücrelerden kondroitin dermatan sülfat proteoglikanlarının salınımını arttırdığı; yangı hücrelerinin kemotaksisi, angioneogenez, ESM birikimi, granülasyon dokusu

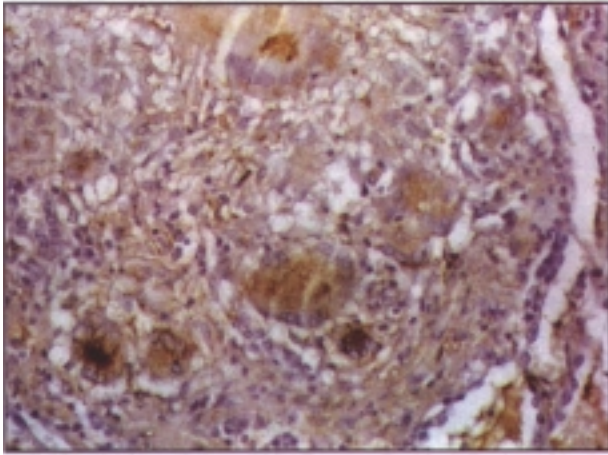
gelişimi, reepitelizasyon, fibroblastların myofibroblastlara dönüşmesi gibi birçok olayda merkezi rol oynadığı saptanmıştır (7).

Çalışmamızda akciğer tüberkülozundaki granülomlarda TGF-beta 1'in epitelooid histiyositler ve Langhans tipi dev hücrelerde hafif ve orta düzeyde eksprese olduğu saptandı, fakat ikisi arasında ekspresyon farkı izlenmedi. TGF-beta 1 ekspresyonunun dev hücreler ve epitelooid histiyositlerde eşit ve korele oluşu, her iki hücrenin aynı kökenden geldiğini destekleyen bir bulgudur.

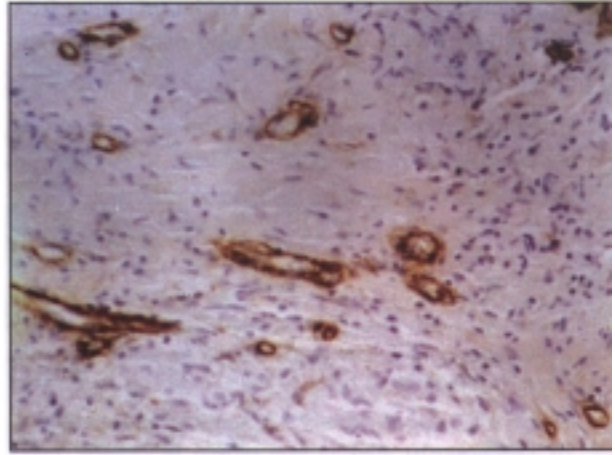
Maeda ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada pleural tbc olgularında TGF-beta'nın doku onarımı ve pleural fibrozis gelişiminde önemli bir rolü olabileceği bildirilmiştir (10). Çalışmamızda da TGF-beta 1'in granülomlar çevresindeki fibroblastlarda orta şiddette varlığı, fibroblastların granülomatöz yangıda TGF-beta 1 üretimine katıldıklarını göstermektedir. Bu sonuç TGF-beta 1'in bağ dokusu artışı ve fibrozis gelişimini uyarıcı etkileri ile uyumludur. Marshall ve ark.'nın çalışmasında ise; TGF-beta ekspresyonu granülomu çevreleyen ESM'de ve fibroblastlarda görülmüş, granülom içinde ise saptanmamıştır. Aynı çalışmada Tip 1 prokollagen, tbc olgularında fibroblastlarda granülomun merkezine doğru dağılık olarak, granülom kenarlarında ise granülomları birbirinden ayıracak biçimde boyanmıştır (7).

Shigehara ve ark. sarkoidozlu olguya ait çalışmasında, ESM elemanlarından kollajen I, 3, 4, fibronektin, laminin, vitronektin ve tenaskin ekspresyonu değerlendirilmiş, immatür granülomların periferinde konsantrik olarak bulunduğu; aktif dönemde kollagen 4 ve laminin dışındaki ESM elemanlarının granülomların periferinde konsantrik biçimde belirgin olarak ve granülomların içinde ve kenarlarında fibriler yapıda zayıf olarak boyandığı saptanmıştır. Granülomların fibrotik görünümünde ve epitelooid hücrelerin dejenere olarak atrofiye uğradığı regressif dönemde ise kollagen 4 ve laminin dışındaki tüm ECM elemanlarının, granülomların tamamında yaygın ve yoğun olduğu belirlenmiştir (11).

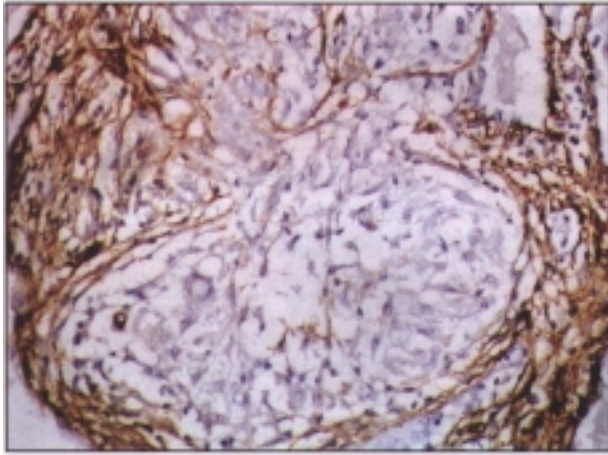
Kendi çalışmamızda, granülomlardaki ESM elemanlarının ekspresyonu değerlendirildiğinde granülomlar çevresi ve içinde en yoğun fibronektin, sonra da kollagen I saptandı. Kollagen tip 4 orta derecede eksprese idi. En az boyanma daha çok damarlarla ilişkili olarak lamininde gözlemlendi. Bu sonuç, granülom gelişiminde diğer ECM elemanlarına göre fibronektin'in daha yoğun katkıları olduğunu düşündürmektedir.



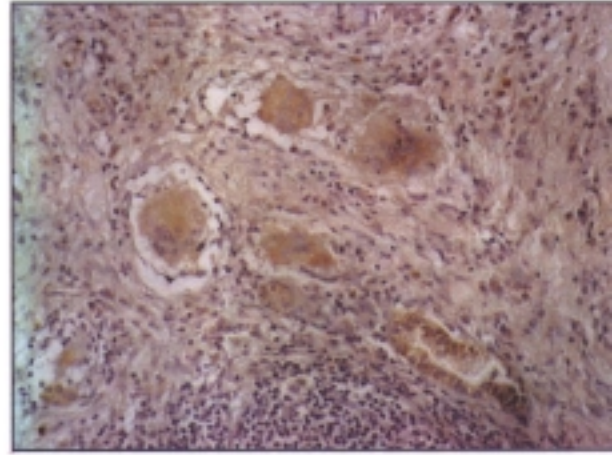
Resim 1. Dev hücreler ve epitelioid histiositlerde fibronektin immünreaktivitesi (Fibronektin X200)



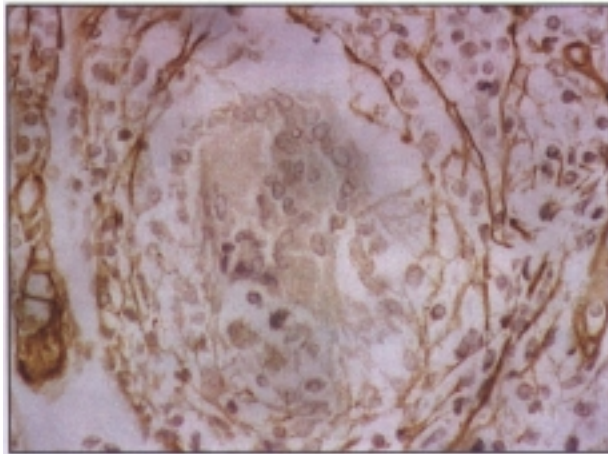
Resim 4. Granülom yapısında kollagen 1 immünreaktivitesi (Kollagen 1 X400)



Resim 2. Granülom kenarındaki matrikste hafif damarlarda yoğun laminin immün reaktivitesi (Laminin X200)



Resim 5. Dev hücrelerde TGF-beta 1 immün reaktivitesi (TGF-beta 1 X200)



Resim 3. Granülom çevresinde ve içinde kollagen 4 immün reaktivitesi (Kollagen 4 X200)

Granülomlar çevresindeki fibronektin, kollagen 1 ve 4, granülomlar içindeki fibronektin, kollagen 1, 4 ve laminin arasındaki korelasyon ve ayrıca bunların kendi kendileri ile istatistiksel korelasyonu, ESM elemanlarının granülom oluşumuna birlikte katıldıklarını göstermektedir.

Fibronektinin hemen tüm olgularda, alveoler makrofajlarda da pozitif bulunması, araştırmacılarca da belirtilen alveoler makrofajların fibronektin için "potansiyel bir kaynaktır" görüşünü desteklemektedir (12).

### Sonuçlar

1. Akciğer tbc'deki granülomların yapısına, çalışmamızda yeralan ESM elemanlarından tümü katılmıştır.
2. Granülomların yapısına, en yoğun katılım gösteren ESM elemanı fibronektindir.

3. Granülomların yapısına en az katılım gösteren ESM elemanı laminindir ve ekspresyonu daha çok damarlarla ilişkilidir.
4. Granülomlarda izlenen ESM elemanlarının yoğunlukları birbiriyle paralellik göstermektedir, ESM elemanları granülom oluşumuna birlikte katılmaktadır.
5. Granülomların içinde ve çevresindeki matrikste, fibroblastlarda, dev hücrelerde ve epitelioid histiyositlereki TGF-beta 1 ekspresyonu ile granülomların yapısına katılan bazı ESM elemanları arasındaki paralellikler, TGF-beta 1'in tbc granülomlarına ESM elemanlarının katılımını yönlendirici etkileri olabileceğini gösteren bir bulgudur.

### Kaynaklar

1. Arthur M, Dannenberg Jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infec Dis* 1989; 11(2): S369-78.
2. Fulton SA, Cross JV, Toossi Z. Regulation of interleukin-12 by interleukin-10, transforming growth factor-beta, tumor necrosis factor-alfa, and interferon-gamma in human monocytes infected with mycobacterium tuberculosis H37Ra. *J Infect Dis* 1998; 178: 1105-14.
3. Kindler V, Sappino AP, Grau GE. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989 56(5): 731-40.
4. Kindler V, Sappino AP. The beneficial effects of localized tumor necrosis factor production in BCG infection. *Behring Inst Mitt* 1991 Feb; (88): 120-4
5. Roberts CJ, Birkenmeier TM, McQuillan JJ. Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 263(10): 4586-92.
6. Grande JP, Melder DC, Zinsmeister AR. Modulation of collagen gene expression by cytokines: Stimulatory effect of transforming growth factor-beta 1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 476-86.
7. Marshall BG, Wangoo A, Cook HT. Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. *Thorax* 1996; 51: 1253-61.
8. Sewell DL, Reinke EK, Hogan LH, Sandor M. Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. *Immunology Letters* 2002; 82: 101-110.
9. Mert A, Bilir M, Ozaros R. Miliary tuberculosis: Clinical manifestations, diagnosis and outcome in 38 adults. *Respirology* 2001; 6 (3): 217-24.
10. Maeda J, Ueki N, Ohkawa T. Local production and localization of transforming growth factor-beta in tuberculous pleurisy. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 32-8.
11. Shigehara K, Shijubo N, Hirasawa M. Immunolocalization of extracellular matrix proteins and integrins in sarcoid lymph nodes. *Virchows Arch* 1998; 433: 55-61.
12. Sinkin RA, LoMonaco MB, Finkelstein JN. Increased fibronectin mRNA in alveolar macrophages following in vivo hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7(5): 548-55.

---

#### Yazışma adresi:

Doç. Dr. Gülay Özbilim  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Patoloji Anabilim Dalı, Antalya  
Tel : 0242- 227 44 88  
Fax : 0242- 227 44 82  
E-posta : gulayozbilim@hotmail.com.

---