

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**STREPTOKOK ENFEKSİYONU İLE İLİŞKİLİ PEDIATRİK
OTOİMMÜN NÖROPSİKİYATRİK HASTALIKTA (PANDAS) MHC
HAPLOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Gökhan KARACAOĞLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP

ADANA-2010

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**STREPTOKOK ENFEKSİYONU İLE İLİŞKİLİ PEDIATRİK
OTOİMMÜN NÖROPSİKİYATRİK HASTALIKTA (PANDAS) MHC
HAPLOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Gökhan KARACAOĞLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2009YL1 nolu proje ile desteklenmiştir

Tez No:

ADANA-2010

KABUL VE ONAY

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Streptokok Enfeksiyonu ile İlişkili Pediatrik Otoimmün Nöropsikiyatrik Hastalıkta (PANDAS) MHC Haplotiplerinin Araştırılması” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/01/2010

Doç. Dr. Ümit LÜLEYAP
Çukurova Üniversitesi

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. Ayşegül YOLGA TAHİROĞLU
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki tez, yönetim kurulunun tarih ve
sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim boyunca bana yol gösteren ve her konuda yardımını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. H. Ümit LÜLEYAP'a ayrıca örnek almamda ve bilgilendirme konusunda bana her türlü desteği sağlayan Çukurova Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşegül YOLGA TAHİROĞLU'na, laboratuvar çalışmamda bana her türlü manevi desteği sağlayan Prof. Dr. Akgün YAMAN'a, Uzm. Dr. Ertuğrul KAHRAMAN'a, Uzm. Bio. Dr. Salih ÇETİNER'e ve çalışmam boyunca beni her konuda destekleyen ÇÜTF-BHML İmmünoloji biriminde görev yapan değerli çalışma arkadaşlarım başta Medine ATEŞ olmak üzere Sonat SARI, Nevin TÜRKAN, Nevin SARI, Mahmut GÖKÜŞ, Handan VARAN, Lütfiye ÖZKAN, Fatma BARAN'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda bana destek veren Onkogen Firmasına, hiçbir desteğini esirgemeyen Dr. Rabia AKILLI'ya, bilgi birikimlerini esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz TAŞTEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Genç'e ve Uzm. Bio. Fadime EROĞLU'na teşekkürü borç bilirim. Beni bugünlere getiren ve hiçbir desteğini esirgemeyen sevgili aileme, ömür boyu yanımda olacağına inandığım sevgili eşime ve yakın zamanda aramıza katılacak olan biricik çocuğuma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
KABUL ve ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. PANDAS	4
2.1.1. PANDAS'ta Otoimmün Düzenek	7
2.1.2. PANDAS'da Tedavi	9
2.2. MAJÖR HİSTOKOMPATİBİLİTE KOMPLEKS (MHC)	9
2.2.1. MHC Gen Bölgelerinin İsimlendirilmesi	10
2.2.2. MHC Moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonları	15
2.2.2.1. MHC Sınıf I Moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonu	16
2.2.2.2. MHC Sınıf II Moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonu	17
2.2.2.3. MHC Sınıf III moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonu	19
2.3. MHC Antijenlerinin Genetiği ve Çeşitliliği	20
2.3.1. MHC Antijenlerinin Hastalıklarla ilişkisi	21
2.3.1.1. İmmün Cevap Genleri	22
2.3.1.2. Antijenik benzerlik teorisi	22
2.3.1.3. Membran resptörleri teorisi	23
2.4. HLA Tiplendirmesi ve Yöntemleri	24

2.4.1. Serolojik yöntemler	24
2.4.2. Hücresel Yöntemler	24
2.4.3. Moleküler Yöntemler	24
2.4.3.1. Moleküler tiplendirme Yöntemleri	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER	26
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	26
3.1.3. Kimyasal Maddeler	27
3.2. ÖRNEKLERİN SAĞLANMASI VE KULLANILAN YÖNTEMLER	27
3.2.1. Moleküler Genetik Çalışmalar	28
3.2.1.1. DNA Eldesi	28
3.2.1.1.1. Chemagen DNA İzolasyon Cihazında Kandan DNA İzolasyonu	28
3.2.1.1.2. GENO-M-6 Genovision Cihazında Kandan DNA İzolasyonu	29
3.2.2. HLA Sınıf I ve Sınıf II Allellerinin PCR ile Amplifikasyonu	30
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	35
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR	51
EKLER	59
EK- 1	59
EK- 2	60
EK- 3	65
EK- 4	66
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

		S. No
Şekil 1.	Pandas'lı hastalarda beyin MRI görüntüsü	7
Şekil 2	HLA gen bölgesinin 6. kromozom üzerinde yerleşimi ve Sınıf- I, II, III bölgeleri	15
Şekil 3	MHC sınıf- I molekülünün şematik görünümü	17
Şekil 4	MHC sınıf- II molekülünün şematik görünümü	18
Şekil 5	MHC Sınıf I ve II moleküllerine TCR reseptörlerinin Bağlanması şematik görünümü	19

ÇİZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa No
Çizelge 1	2009 yılı Temmuz Ayı HLA Antijenleri Allel Sayıları	15
Çizelge 2	HLA gen bölgesi için amplifikasyon PCR reaksiyon miktarları	33
Çizelge 3	HLA Amplifikasyonu için Gerekli ısı döngüleri	34
Çizelge 4	HLA gen bölgesi için melezleme ve boyama için gerekli miktarlar	34
Tablo 1	Ulusal Ruh Sağlığı Enstitüsü'nün PANDAS için Klinik Tanı Yöntemleri	5
Tablo 2	PANDAS'lı çocuklarda en sık görülen Tikler	5
Tablo 3	PANDAS'lı çocuklarda en sık görülen Obsesyon ve Kompulsiyonlar	5
Tablo 4	İnsanda ve Farede homolog MHC gen bölgelerinin karşılaştırılması	11
Tablo 5	HLA Gen bölgesindeki Genlerin isimleri	12
Tablo 6	HLA Allellerini Tanımlarken kullanılan Terminoloji	13
Tablo 7	HLA Antijenlerinin Splitleri	14
Tablo 8	2002 yılı Temmuz yılında DSÖ komitesi tarafından tanımlanmış HLA antijenleri	14
Tablo 9	HLA Antijenlerinin hastalıklarla ilişkisi	23
Tablo 10	Hasta grubu HLA verileri	37
Tablo 11	Kontrol grubu HLA verileri	39
Tablo 12	HLA- A lokusu istatistik değerleri	41
Tablo 13	HLA-B lokusu istatistik değerleri	42
Tablo 14	HLA- C lokusu istatistik değerleri	43
Tablo 15	HLA- DQB1 lokusu istatistik değerleri	43
Tablo 16	HLA- DRB1 lokusu istatistik değerleri	44
Tablo 17	HLA- DRB3 lokusu istatistik değerleri	45
Tablo 18	HLA- DRB4 lokusu istatistik değerleri	45
Tablo 19	HLA- DRB5 lokusu istatistik değerleri	45
Tablo 20	2009 yılı Temmuz ayına ait tanımlanmış bütün HLA allelleri	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AA	Aminoasit
AGBHS	A Grubu Beta Hemolitik Streptokok
BÇ	Baz Çifti
C	Sitozin
°C	Santigrat derece
CTLp	Sitotoksik T lenfosit
ÇYBOKS	Çocukluk Çağı Yale-Brown Obsesif Kompulsif Skala
dATP	Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	Deoksisitozin Trifosfat
DEH	Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite
dGTP	Deoksiguanozin Trifosfat
DK	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleozid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dTTP	deoksitimidin Trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
Epizodik	Aralıklı
FI	Florasan Yoğunluğu
G	Guanin
Gr	Gram
HCL	Hidrojen Klorür
HLA	İnsan Lökosit Antijenleri
IR	İmmün Cevap

IDDM	İnsüline Bağımlı Diyabet Hasalığı
Kb	Kilobaz
kD	Kilo Dalton
LMP	Düşük Molekül Ağırlıklı Proteosom
Mg⁺²	Mağnezyum
MgCL₂	Mağnezyum Klorür
MHC	Majör Histocompotobilite kompleks
µl	Mikro itre
ml	Mililitre
MLR	Karışık Lenfosit Kültürü
mM	Milimolar
MRI	Manyetik Görüntüleme Sistemi
OH	Hidroksil
OKB	Obsesif Kompulsif Bozukluk
OKH	Obsesif Kompulsif Hastalık
PANDAS	Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections (Streptokok enfeksiyonu ile İlişkili Pediatrik Otoimmün Nöropsikiyatrik Hastalıklar)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
pH	Hidrojen iyonları konsantrasyonu
RA	Romatizmal Ateş
SBT	Sequence Based Typing (Dizilim analizine dayanan tiplendirme)
SK	Sydenham Kore
Sn	Saniye
SPECT	Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografisi
SSO	Sequence Specific Oligonucleotide typing (Dizilime özgü oligonükleotitlerin kullanıldığı tiplendirme)
SSP	Sequence Specific Priming (Dizilime bağlı hazırlama)

T	Timidin
TAP	Transporter associated with antigen processing
TBE	Tris-Borik asit-EDTA tamponu
TS	Tourett Sendromu

ÖZET

STREPTOKOK ENFEKSİYONU İLE İLİŞKİLİ PEDIATRİK OTOİMMÜN NÖROPSİKİYATRİK HASTALIKTA (PANDAS) MHC HAPLOTİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Streptokok enfeksiyonlarına bağlı gelişen pediatrik otoimmün nöropsikiyatrik hastalıklar olarak da tanımlanan PANDAS yeni tanımlanmış bir hastalıktır. Çocukluk çağında, özellikle 4-12 yaşları arasında, A grubu Beta hemolitik Streptokok enfeksiyonu sonrasında gelişen otoimmünite mekanizması ile meydana gelir. Streptokokların hücre duvarında antijenik özellikte M, T, R proteinleri bulunur. Bunlardan M proteini Piyojen streptokokların en önemli virülans faktörüdür. İmmün sistemde M grubu antijenlere karşı duyarlı olan B lenfositler ilk aşamada bunları yok ederler. Duyarlı hale gelmiş T ve B lenfosit hücrelerinden bazıları kan-beyin bariyerini aşarak; moleküler mimikri ile, duyarlı konağın bazal gangliyasındaki nöron hücre membranında bulunan epitoplara çapraz reaksiyon vererek bağlanır ve davranış ve hareketlerle ilgili anormalliklerin ortaya çıkmasına neden olur. İmmünolojik reaksiyonların direk olarak tetiklediği ve/veya önemli bir faktör olarak rol oynadığı; PANDAS, gibi nöropsikiyatrik bozuklardan dolayı dikkatler immünoloji alanına odaklanmıştır. Doku antijenlerine moleküler yapı benzerliği gösteren ekzojen kaynaklı antijenik yapıların moleküler mimikri mekanizmasıyla, genetik temele dayanan oto antikor senteziyle veya immün cevabın düzenlenmesinde; MHC sisteminin (Büyük Doku Uygunluk Kompleksi) belirli haplotiplerinin hedef doku ve organlarda otoimmün reaksiyonları tetiklemesi sonucunda apoptoz mekanizmasıyla hedef doku ve organlarda fonksiyon kayıplarının nedeni olabileceği gösterilmiştir. Çalışmamızda PANDAS'lı olan bireylerin, MHC haplotiplerinin belirlenmesi ve HLA haplotipleri arasındaki ilişkileri incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: PANDAS, OKB, İmmün Sistem, HLA, MHC Antijenleri.

ABSTRACT

PEDIATRIC AUTOIMMUNE NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS WITH ASSOCIATED STREPTOCOCCAL INFECTION INVESTIGATION OF MHC HAPLOTYPES

PANDAS is the acronym for pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders related to streptococcal infections which is a newly defined disease. Its symptoms occurs in the childhood especially between 4-12 years. This illness occurs with a autoimmune mechanism after a Group A Beta Haemolytic streptococcus infection. Streptococcus bacteriae have antigenic M, T, R proteins in their cell wall. M proteins are the most important pyogenes virulans factor for human diseases. In the Patient's immune system, firstly B lymphocytes susceptible to M group of antigens kills them. After B lymphocyte activation, some of the susceptible B lymphocytes pass over blood-brain barrier and associates with the cell membrane of neuron cells because of epitope mimicry and the loss of neurons in the part of the brain which is supposed for coordination of moving, care and also active memory cannot be compensate and neuropsychiatric signs are unavoidable. Because of neuropsychiatric disorders like PANDAS, in which immunological reactions directly trigger and/or has an important role for the disease, researchs are focused on immunology area. Exogen originated antigens showing molecular structure similarity to tissue antigens with a molecular mimicry mechanism, otoantibody synthesis based on genetic factors or regulation of immune response; particular MHC system (Major Histocompatibility Complex) haplotypes trigger otoimmune reactions in target tissues and organs. As a result, apoptosis mechanism occurs and unavoidable loss of functions are indicated. In our study, MHC haplotypes of PANDAS patients and association between HLA haplotypes are researched.

Key words: PANDAS, OKB, Immune System, HLA, MHC Antigens.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

PANDAS kısaltmasıyla anılan “Streptokokkal infeksiyonlara bağılı gelişen pediatrik otoimmün nöropsikiyatrik hastalıklar”, 1998 yılında Swedo ve arkadaşları tarafından yeni bir sendrom olarak tanımlanmış olup o tarihten itibaren ilgi çekmeye başlamıştır. Çocuklarda ortaya çıkan PANDAS, A grubu beta hemolitik streptokok infeksiyon ataklarını takiben, bu infeksiyonların sebep olduğu immünolojik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan obsesif kompulsif hastalıklar (OKH) içinde değerlendirilmektedir¹.

Son yıllarda çocukluk çağıında başlayan obsesif kompulsif hastalığın etiyolojisinde poststreptokokkal otoimmünite adı verilen yeni bir mekanizma ileri sürülmüştür². Poststreptokokkal otoimmünite, çocukluk çağı başlangıçlı obsesif kompulsif bozukluk (OKB) ve Tourette bozukluğu dahil Tik bozuklukları için etyolojik bir faktör olarak ileri sürülmüştür³. İmmün sistem normalde kendinden olanı ve olmayanı ayırt eden bir sistemdir. Vücutta immün sistemin kendi dokusunu tanıyamamasına neden olan bir değişiklik ya da lenfositlerin baskılanmadan kaçmasına izin verecek şekilde kesintiye uğraması sonucunda otoimmünite ortaya çıkar. Bağışıklık sisteminin kendinden olanı ve olmayanı ayırt etmesi için gerekli olan “doku antijenleri” ni kodlayan gen bölgesi, Büyük Doku uyum Kompleksi, MHC olarak adlandırılır. Çocukluk döneminde görülen otoimmün, allerjik, infeksiyon veya çeşitli malign hastalıklarda, hastalığın seyri açısından bireyler arasında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıkların hastalığı oluşturan etkenlerle ilgili olmasının yanında, bireylerin HLA doku uygunluk antijenlerinin meydana getirdiğı cevabın farklılığını oluşturan genetik çeşitlilikle de ilgili olduğu ortaya çıkmıştır^{4,5}. Çalışmamızda Streptokok enfeksiyonlarının yol atığı pediatrik otoimmün nöropsikiyatrik rahatsızlığı (PANDAS) olan bireylerin, immün sistemin önemli bir unsuru olan HLA haplotiplerinin belirlenmesi, HLA haplotipleri arasındaki ilişki kurulması ve muhtemel genetik faktörler saptanırsa tedavi yönünde yardımcı olması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİ

Psikiyatride enfeksiyonların rolüne ilişkin araştırma ve bulgular yeni değildir. Bu yüzyılın başında, sifiliz (Frengi) hastalığı, farklı ve yaygın psikiyatrik bozukluklara (örn. paralizi jeneral: frenginin üçüncü evresidir. Frengi etkeninin, beyin ve sinir sistemini enfekte etmesi ile meydana gelir.) yol açan bir enfeksiyon hastalığı olarak tanımlanmıştır. Gram negatif spiroket bir bakteri olan *Treponema pallidum*'un sifilizin etkeni olarak bulunması ve penisilin ile tedavisinin gerçekleştirilmesi, psikiyatrik durumlarda enfeksiyonların rolü olabileceğini düşündürmüştü ve psikiyatrik bozuklukları anlamamızda enfeksiyon hastalıklarının bir model olabileceği fikrini doğurmuştur.

Yaklaşık iki yüzyıl önce Thomas Sydenham tarafından ortaya konmuş streptokok enfeksiyonu kaynaklı bir hastalık olan romatizmal ateş (RA) varyantı olan Sydenham Kore'si (SK) için de aynı durum söz konusudur⁶. SK birkaç nedenle obsesif kompulsif bozukluk'un (OKB) anlaşılmasında önemlidir:

a) Sydenham Kore'sinde, OKB ve başka ruhsal sorunlar sıklıkla görülmektedir.

b) Gerek SK gerekse OKB'de bazal gangliyon işlev bozukluğunun rolü olduğu düşünülmektedir. Sydenham Koresinde genellikle nükleus kaudatunda enflamasyon olduğu gösterilmiştir.

c) Sydenham Koresi puberte öncesi çocuklarda görülür. Hormonların etkisiyle immün yanıtta oluşan farklılıklara ilave olarak, gelişimle birlikte reseptör ekspresyonunun ya da kan-beyin bariyerinin geçirgenliğinin değişmesi otoantikorların patolojik etkilerini minimuma indirir. Bu da puberte sonrası dönemde olgu görülmemesine neden olabilir⁷.

OKB, RA, SK gibi hastalıklar, streptokok bakterilerinin neden olduğu hastalıklardır. Streptokok bakterileri beta hemolitik streptokoklar, alfa hemolitik streptokoklar ve gama hemolitik streptokoklar olmak üzere 3 gruba ayrılır. Beta hemolitik streptokok bakterilerinin A, B, C ve G gibi grupları vardır. Bu gruplardan C ve G grupları boğazda ağrı nedeni olabilirler ancak komplikasyon yapmazlar. Hastaların boğaz kültürlerinden izole edilen beta hemolitik streptokokların %85-90'ı A grubudur^{7,8}. En sık görülen grup A streptokok enfeksiyonları ise farenjit ve tonsillittir⁹.

OKB ilk olarak psikiyatrik literatürde Esquirol tarafından 1838'de tanımlanmıştır. O yıllarda depresyonun bir belirtisi olarak düşünülen OKB, Freud'dan günümüze kadar tanı kriterleri çok az değişikliğe uğramış az sayıdaki psikiyatrik bozukluktan biridir. Yirminci yüzyıl başlarına gelindiğinde ayrı bir klinik tablo olarak ele alınmaya başlamıştır¹⁰. OKB, çocukluk çağına başlayabilen ve oldukça ağır seyredebilen bir psikiyatrik bozukluktur. Yineleyen ve kişinin yaşamında belirgin sıkıntıya yol açan obsesyonlar ve kompulsiyonlarla karakterizedir. Ayrıca zamanın boşa harcanmasına yol açan, kişinin olağan günlük işlerini, mesleki veya eğitimle ilgili işlevselliğini, olağan toplumsal etkinliklerini ya da ilişkilerini önemli ölçüde bozan ve tedaviye cevap verebilen bir ruh sağlığı sorunudur. Günümüzde OKB'nin çocuklukta ve erişkinlikte benzer belirtilerle ortaya çıktıkları ve olguların yarısına yakınının çocuk-ergen döneminde başladığı anlaşılmıştır^{11,12}.

Obsesif kompulsif hastalık (OKH) multifaktöryel etiyojisi olan nörobiyolojik bir hastalık olarak adlandırılır. Son yıllarda çocukluk çağına başlayan OKH'nin etiyojisinde poststreptokokkal otoimmünite adı verilen yeni bir mekanizma ileri sürülmüştür¹³. Poststreptokokkal otoimmünite, çocukluk çağı başlangıçlı OKB ve Tourette bozukluğu dahil tik bozuklukları için etiyojik bir faktör olarak ileri sürülmüştür¹². Bu hipotezin ortaya çıkışı bir seri klinik gözleme dayanmaktadır. Bunlar;

1) SK olan çocukların 3/4'ünde obsesif kompulsif bozukluk semptomlarının saptanması,

2) Çocukluk çağı başlangıçlı OKB ve Tourette bozukluğunun birlikte seyretmesi şeklindedir².

SK'nin geçişi sırasında sıklıkla SK olan bu çocukların yaklaşık olarak 3/4'ünde OKB belirtileri bulunur. OKB, RA başlangıcından itibaren iki aydan daha kısa bir süre içinde ortaya çıkmaktadır. Hastaların %70'inden fazlasında OKB başlangıcı ya SK başlangıcı ile eş zamanlı ya da ondan daha öncedir. Bu belirtiler, SK başlangıcından kısa bir süre önce ortaya çıkar. Ancak OKB romatizmal ateşin başlangıcında olduğu için psikopatolojinin erken dönemde değerlendirilmesi son derece önemlidir. Bu veri, diğer verilerle birlikte SK ile OKB arasında bir ilişki bulunduğunu desteklemektedir. Her iki bozukluğun da

temelinde, bazal gangliyonlar üzerinden etkili olan benzer düzenekler sorumlu olabilmektedir³.

Tourette sendromu (TS), çocukluk çağında başlayan motor ve vokal tiklerle karakterizedir. Tourette bozukluğu ile OKB'nin bazı formları arasında bir ilişki bulunmaktadır. TS tanısı konulmuş hastaların % 40-60'ında OKB görülmektedir. Uzun yıllardır bu durumun psikolojik kökenli olduğu iddia edilmiştir. Fakat 1970'lerde bazı ailelerde TS vakalarının toplandığı ve aile içinde vertikal geçişin varlığı tespit edilmiştir. Çoğu olguda ise otozomal dominant kalıtımın olduğu düşünülmektedir¹⁴.

OKB'nin nöropsikiyatrik belirtileri bazal gangliyon nöronlarının otoantikolar tarafından tahrip edilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır¹¹. OKB olan hastalarda PET (Pozitron Emisyon Tomografisi) ve SPECT (Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi) çalışmaları sonucu görülen bulgularda OKB'de orbitofrontal- limbik-bazal gangliyon döngüsündeki bir bozukluğa işaret ettiği ancak hastalığın nörolojik nedeninin yerini kesin olarak göstermediği söylenebilir^{15,16}.

2.1. PANDAS

Swedo ve arkadaşları SK'nin; obsesif kompulsif bozukluğun bazı formları için tıbbi bir model olabileceğini iddia etmişlerdir¹⁷. Son yıllarda A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonu sonrası immün tepki sonucunda oluştuğu bilinen, ergenlik öncesi başlayan obsesif-kompulsif belirtiler ve tiklerden oluşan nöropsikiyatrik belirti kümesinin farklı bir bozukluk olduğu ortaya konmuştur. Araştırmacılar çocuklarda görülen bu tabloyu pediatrik otoimmün streptokok enfeksiyonuna bağlı çocukluk çağı otoimmün nöropsikiyatrik bozuklukları (PANDAS) olarak tanımlamışlardır. 1998 yılında Swedo ve arkadaşları bu hastalığı yeni bir sendrom olarak tanımlamış olup o tarihten itibaren ilgi görmeye başlamıştır. PANDAS'ta OKB, tikler ve davranışsal belirtiler tipik OKB ve tik bozuklukları ile karşılaştırıldığında akut başlangıçlı ve epizodik olma eğilimindedir¹⁸. Amerikan Ulusal Ruh Sağlığı Enstitüsü'ne göre oluşturulan PANDAS hastalığının kriterleri tablo- 1'de verilmiştir. PANDAS'lı çocuklarda en sık görülen tikler tablo 2'de verilmiştir. PANDAS'lı çocuklarda en sık görülen obsesyon ve kompulsiyonlar aşağıda tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 1. Amerikan Ulusal Ruh Sağlığı Enstitüsü'nün PANDAS için klinik tanı ölçütleri

1. Obsesif-kompulsif bozukluk veya bir tik bozukluğunun bulunması.
2. Başlangıç 3 yaş ile ergenlik başlangıcı arasındadır.
3. Belirtiler aniden başlar ya da belirtilerde dramatik alevlenmelerle karakterize bir gidiş vardır.
4. Belirtilerin başlangıcı ya da alevlenmesi ile A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonu arasında zamansal bir ilişki vardır.
5. Alevlenme sırasında nörolojik bakıda anormal bulguların (hiperaktivite, koreiform hareketler, tikler) varlığı.

Tablo 2. PANDAS'lı çocuklarda en sık görülen tikler

Motor tikler	Vokal Tikler
Göz kırpma	Öksürme
Göz hareketleri	Boğaz temizleme
Baş hareketleri	Burun çekme
Omuz silkme	Genizden horlama benzeri ses çıkarma
Mimikler	Kelime/cümle tekrarları

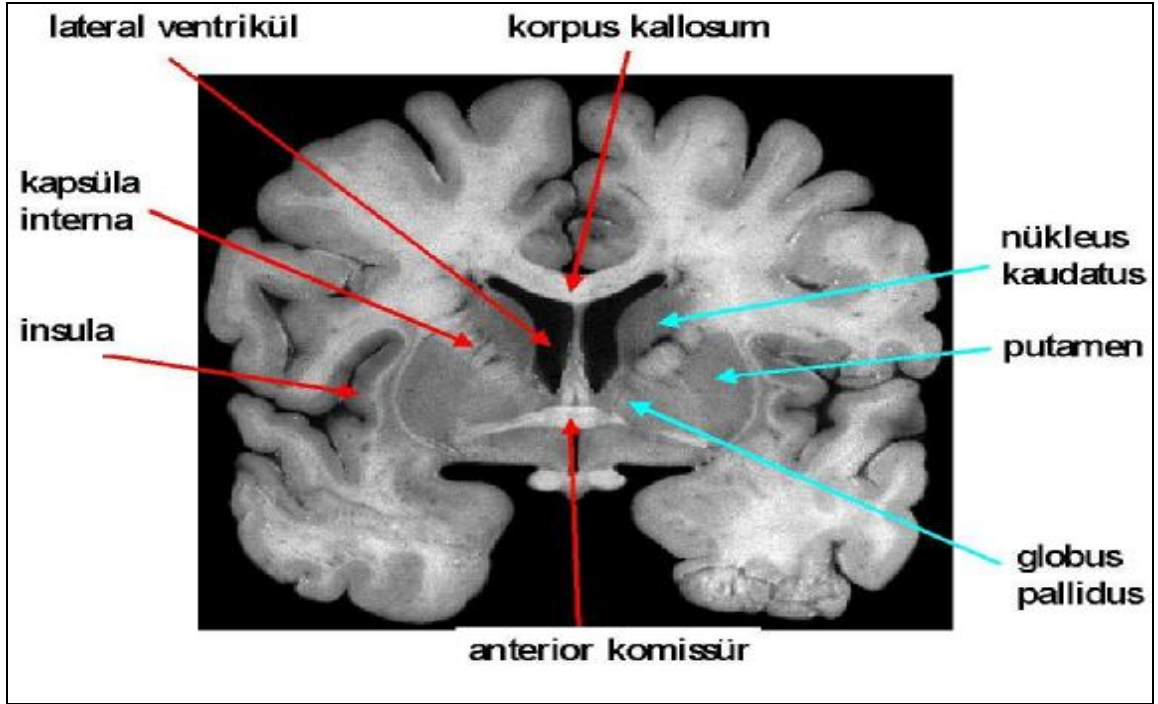
Tablo 3. PANDAS'lı çocuklarda en sık görülen obsesyon/kompulsiyonlar

Obsesyonlar	Kompulsiyonlar
Kontaminasyon	El yıkama/silme
Kendine/başkalarına zarar verme	İşleri tekrar tekrar kontrol etme
Simetri/düzen	Düzenleme
Cinsel Sayma	Dinsel düşünceler Tekrarlama

PANDAS, tıpkı RA'nın bir varyantı olan SK gibi A grubu beta hemolitik streptokok (AGBHS) enfeksiyonu sonrasında görülen komplikasyonlardan biridir. PANDAS'lı çocuklarda AGBHS tonsillofarenjitini takip eden günler haftalar içerisinde OKH ve/veya tik atakları gelişir¹⁹. AGBHS enfeksiyonunu antinöronal antikorların ortaya çıkmasına neden olur. Bu antikorların bazal gangliyonlardaki epitoplarla çapraz reaksiyona girmeleri sonucu davranış ve hareketle ilgili anormallikler ortaya çıkmaktadır⁹. Aynı PANDAS gibi, SK'li çocuklarda da hastalık atağı sırasında yaklaşık %70'e yakın ani başlangıçlı OKB görülmesi, bu mekanizmanın varlığını düşündürmektedir.

OKB ve tikleri olan ancak PANDAS'lı olmayan çocuklarda, beyin görüntüleme metodları ile yapılan araştırmalarda bazal ganglionlar ve frontal subkortekste ileti mekanizmalarında anomaliler bulunmuştur. PANDAS'lı çocuklarda yapılan MRI volümetrik analizlerde, kontrol grubuna göre PANDAS'lı çocukların kaudat, putamen ve globus pallidus hacminde büyüme saptanmıştır²⁰. Beyin MRI görüntüsü şekil 1 de gösterilmiştir.

PANDAS'ın patofizyolojisinin açıklanmasında önemli olabilecek diğer bir bulgu da, RA'lı hastalarda yüksek düzeylerde saptanmış olan ve B lenfositlerin yüzeyinde bulunan, polimorfik bir proteine karşı gelişen, bir monoklonal antikor olan D8/17B ile ilgili yapılan araştırmalardır¹⁰. Yapılan bir çalışmada, bu antikor sağlıklı çocuklarda %17 oranında bulunmasına rağmen, SK'li çocuklarda %89, PANDAS'lı çocuklarda ise %85 olarak saptanmıştır¹¹. Bunun RA veya SK'sı olmayan, otizm de dahil olmak üzere diğer nöropsikiyatrik çocuklarda da pozitifliği bildirilmiştir^{2,3,10}.



Şekil 1. Pandas'lı hastalarda beyin MRI görüntüsü

PANDAS'lı çocuklarda görülen OKB veya tik bozukluğunun başlangıç yaşının, çocukluk OKB ve tik bozukluğu için önceden tanımlanan başlangıç yaşından (OKB için 7,4 ve tik bozukluğu için 6,3) 3 yıl daha küçük olduğu bulundu¹. PANDAS sıklıkla motor hiperaktivite, dürtüsellik ve dikkat eksikliği ile ilişkilidir. Klinik belirtiler, tablonun 6 yaşından sonra başlaması dışında dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) tanısı için gerekli ölçütleri karşılamaktadır. Bu nedenle PANDAS sendromu, tik bozukluğu ve OKB'nin yanı sıra geç başlangıçlı dikkat eksiklik bozukluğu, ayrılık anksiyete bozukluğu gibi birincil tanılarını da içerecek şekilde genişletilmelidir^{9,13,21}.

2.1.1. PANDAS'ta Oto İmmün Düzenek

Romatizmal ateşin patogenezine ilişkin bilinenlere ve PANDAS'lı çocuklara ilişkin gözlemlere dayanarak PANDAS'ın patogenezini için aşağıdaki model önerilmiştir:
Patojen + duyarlı konak=immün yanıt, SK ya da PANDAS (nöropsikiyatrik belirtiler).

Streptokok enfeksiyonuna bağlı bazı hastalık tiplerinde (örneğin, RA) patolojik değişiklikler doğrudan doğruya immün kompleks bağlanmasının bir sonucudur. Bu tür bir model, nöropsikiyatrik bozukluklar için de geçerli olabilir.

A grubu beta hemolitik streptokoklar dışındaki ajan patojenlerin nöropsikiyatrik belirtiler gelişimine katkıda bulunmaları olasılığı, PANDAS'lı çocuklarda, A grubu beta hemolitik olmayan ajan patojenlere bağlı olarak belirtilerde ortaya çıkan alevlenme nedeniyle ileri sürülmüştür.

. PANDAS'lı hastalarda, belirtilerin ilk kez ortaya çıkması ya da daha sonraki alevlenmeler ani ve dramatik olup, A grubu beta hemolitik streptokok enfeksiyonu ile ilişkilidir. Belirtiler, streptokok enfeksiyonu sonrasında ortaya çıkmaktadır. Bu, bilinen immün yanıt modeli ile uyuşmaktadır. Birinci yanıt, streptokok membranları üzerindeki epitoplara karşı gelişmiş özgül yanıttır. İkinci yanıt ise çapraz reaksiyon veren santral sinir sistemindeki bazal gangliyon hücre membranları üzerindeki epitoplara karşı gelişen daha yaygın yanıttır.

Patogenezin bu modelinde konak organizmaya ilişkin etmenler de önemlidir. Erkek olmak, belirgin şekilde bir risk etmenidir. PANDAS, hem çocukluk çağı OKB hem de tik bozukluklarında tanımlandığı gibi erkek çocuklarında, kızlara göre daha fazla görülmektedir. PANDAS'lı çocukların yarısından fazlası erkeklerden oluşmaktadır. Ancak erkek çocuklarda duyarlılığın artışından sorumlu düzenek bilinmemektedir.

Ailesel etmenler de PANDAS'ın patogenezinde rol oynayabilir. A grubu beta hemolitik streptokoklarla enfekte olan bireylerin yalnızca %2-3'ünde RA gelişmektedir. Oysa RA sıklığının genel popülasyondan çok daha yüksek olduğu romatojenik aileler, ilk kez 1889 yılında Cheadle tarafından tanımlanmıştır. RA'nın ailesel sıklığı dramatik olarak yüksektir. Geniş aile çalışmaları romatizmal ateşin kalıtım şeklinin ya otozomal resesif ya da otozomal dominant (sınırlı penetransı olan) olduğunu düşündürmektedir.

İmmünolojik reaksiyonların direk olarak tetiklediği ve/vaya önemli bir faktör olarak rol oynadığı; PANDAS(Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal infections), SK, OKB, Tourette, Şizofreni ile DEHB gibi psikiyatrik bozuklardan dolayı dikkatler immünoloji alanına odaklanmıştır. Çünkü doku antijenlerine moleküler yapı benzerliği gösteren ekzojen kaynaklı antijenik yapıların moleküler mimikri

mekanizmasıyla, genetik temele dayanan otoantikor senteziyle veya immün cevabın düzenlenmesinde; MHC sisteminin (Büyük Doku Uygunluk Kompleksi) belirli haplotiplerinin hedef doku ve organlarda, otoimmün reaksiyonları tetikleyerek apoptoz mekanizmasıyla hedef doku ve organlarda fonksiyon kayıplarının nedeni olabileceği gösterilmiştir^{23,24,25}.

2.1.2. PANDAS'ta Tedavi

PANDAS'ın otoimmün bir düzenek sonucunda oluştuğu düşüncesinden yola çıkılarak, özellikle bu süreci kesintiye uğratan tedavilerin kullanımı önerilmektedir. Bu amaçla immunglobulin, prednizolon ve plazmaferez gibi uygulamalar gündeme gelmektedir. Ayrıca PANDAS'lı olgularda nöropsikiyatrik belirtilerin şiddetlenmesine neden olan streptokokal enfeksiyondan korunmak amacıyla antibiyotik kullanımı gibi uygulamalar da yararlı bulunmuştur^{25,26,27,38}.

2.2. MAJOR HİSTOKOMPATİBİLİTE KOMPLEKS (MHC)

Bağışıklık sisteminin kendinden olanı ve olmayanı tanıması için gerekli olan “doku antijenleri” ni kodlayan gen bölgesi, Büyük Doku uyum Kompleksi, MHC olarak adlandırılır. İlk defa kemirgenlerde tanımlanan bu bölgenin insandaki karşılığı, ilk olarak beyaz kan hücrelerinde gösterilmiş olduğundan sadece bu antijenik yapıların sanki lökositlerde bulunduğunu tanımlayan HLA (Human Leukocyte Antigens) şeklinde yanlış olarak isimlendirilmiş ancak bu antijenik yapıların tüm doku ve hücrelerde bulunduğu anlaşılınca bu tanımlamadan vazgeçilmiş, bunun yerine MHC (Major Histocompatibility Complex) olarak tanımlanmıştır²⁹. MHC genleri, 6. kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olup 3500 kb uzunluğundadır³⁰

Çocukluk döneminde görülen otoimmün, allerjik, infeksiyon veya çeşitli malign hastalıklarda, hastalığın seyri açısından bireyler arasında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıkların hastalığı oluşturan etkenlerle ilgili olmasının yanında, bireylerin HLA doku uygunluk antijenlerinin meydana getirdiği cevabın farklılığını oluşturan genetik

çeşitlilikle de ilgili olduğu ortaya çıkmıştır^{4,5}. Organizmada herhangi bir antijene karşı oluşacak immün cevabın nicelik ve niteliği, genel olarak ‘‘immün response(Ir) genleri tarafından kontrol edilmektedir. Ir genlerinin gerçekte MHC genleri ile identik oldukları gösterilmiştir. Doku uygunluk kompleksi yüksek düzeyde polimorfik genlerin oluşturduğu hücre yüzeylerindeki değişik bölgelerdir^{5,6}. Doku uygunluk antijenleri Mendel kurallarına göre gen setleri şeklinde (haplotip) soydan soya geçerler. Anneden ve babadan gelen haplotipler kromozomda allel genleri oluştururlar. Bu allel genler kodominant etkide olup, her ikisi de fenotipte ifade olurlar. MHC antijenlerindeki farklılık allel genlerin farklılığından kaynaklanır. HLA antijenleri fetüsün erken safhasında (6. hafta) oluşur ve yaşam boyu devam eder^{31,32}.

2.2.1. MHC Gen Bölgelerinin İsimlendirilmesi

HLA antijenlerinin oluşması organizmada ‘‘Major Histokompatibilite kompleksi (Major Histocompatibility Complex Gen Region-MHC) adı verilen bir gen bölgesinin kontrolü altındadır. Farelerde bu gen bölgesi 17 numaralı kromozomun H-2 bölgesinde bulunur (Tablo 4). İnsanlarda ise 6 numaralı kromozomun kısa kolu üzerinde yer almakta ve kromozom haritasında p21 pozisyonunda lokalize olup 3500 kb uzunluğundadır^{30,33} (Şekil 2).

HLA sisteminin nomenklatürü Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) denetiminde HLA nomenklatür komitesi tarafından düzenlenmektedir. Bu komiteye göre 3 ana gruba ayrılan bu bölgede ;

MHC Sınıf-I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G),

MHC Sınıf-II (HLA- DR, -DP, -DQ, -DO, -DN),

MHC Sınıf-III (C2, C4A, C4B, PF, TNF) antijenleri yer almaktadır³⁴.

MHC Sınıf I (A, B, C lokusları) molekülleri vücuttaki tüm çekirdekli hücrelerde bulunurlar,her dokuda eksprese olurlar, fonksiyonları daha iyi bilinmektedir. Sınıf II (DP, DQ, DR lokusları) molekülleri ise makrofajlar ve B lenfositler gibi bazı özel hücrelerde bulunurlar. Sınıf III molekülleri ayrıca C2, C4 kompleman proteinleri, faktor B, Sitokrom

p-450, 21-hidroksilaz, non-MHC genlerini içeren ayrı bir kategori içinde değerlendirilmektedir^{35,36}. HLA gen bölgesindeki genlerin isimleri tablo 5’te verilmiştir.

HLA-E,-F,-G non-klasik Sınıf-I antijenleridir, daha az sayıda dokuda eksprese olurlar. HLA-G’nin sadece plasental dokuda eksprese olduğu ve fonksiyonunun fetusun canlılığı ile ilgili olduğu sanılmaktadır. Aynı şekilde MHC Sınıf-II antijenlerinden HLA-DR,-DP ve DQ klasik Sınıf-II antijenleridir. Daha fazla dokuda eksprese olup, fonksiyonları hakkında daha fazla bilgi mevcuttur. MHC gen bölgesinin her lokusunda her biri farklı HLA antijenlerinden sorumlu allel genler bulunur. Her lokustaki bu alleller HLA harflerinden sonra lokus ve numara yazılarak ifade edilirler (HLA-A1 gibi). Bir lokusta henüz tam olarak spesifiye edilmemiş bir allel, rakamdan önce workshop kelimesinin baş harfi olan “w” yazılarak ifade edilir (HLA-DRw1 gibi). Daha sonraki çalışmalarda kesin olarak tanımlanır ise, w harfi elimine edilir (HLA-DR1 gibi). HLA allellerini tanımlarken kullanılan terminoloji tablo 6’te verilmiştir^{37,38}.

Tablo 4. İnsanda ve farede homolog MHC gen bölgelerinin karşılaştırılması

MAIN GENETIC REGIONS OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX												
HUMAN	MHC CLASS	II			III				I			CHROMOSOME 6
	A1	DP	DQ	DR	C	HSP	TNF	etc	B	C	A	
MOUSE	MHC CLASS	I	II		III				I		CHROMOSOME 17	
	H-2	K	A	E	C	HSP	TNF	etc	D	L		

Tablo 5. HLA gen bölgesindeki genlerin adları

Adı	Eski Adı	Moleküler Özellikler
HLA-A	-	Class I α -zinciri
HLA-B	-	Class I α -zinciri
HLA-C	-	Class I α -zinciri
HLA-F	F, *6.2'	Class I gen
HLA-F	F, *5.1'	Class I gen
HLA-G	G, *6.0'	Class I gene
HLA-H	H, A/B, *12.4'	Class I psödogen
HLA-J	oda12	Class I psödogen
HLA-K	HLA-A*70	Class I psödogen
HLA-L	HLA-A*02	Class I psödogen
HLA-N	HLA-30	Class I gen
HLA-S	HLA-17	Class I gen
HLA-X	HLA-X	Class I gen fragmanı
HLA-Z	HLA-Z1	HLA Class II bölgesi içinde Class I gen fragmanı
HLA-DRA	DR α	DR α - zinciri
HLA-DRB1	DR β 1, DR1B	DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 gibi özellikleri belirleyen DR β 1-zinciri
HLA-DRB2	DR β 2	DR β -benzeri sokanslar taşıyan bir psödogen
HLA-DRB3	DR β 3, DR3B	DR β 2 and Dw24, Dw25, Dw26 yi belirleyen DR β 3 zinciri
HLA-DRB4	DR β 4, DR4B	DR53 u belirleyen DR β 4-zinciri
HLA-DRB5	DR β 5	DR51 i belirleyen DR β 5-zinciri
HLA-DRB6	DR β X, DR β 6	DR1, DR2 ve DR10 haplotiplerinde bulunan DRB psödogeni.
HLA-DRB7	DR β 7	DR4, DR7 ve DR9 haplotiplerinde bulunan DRB psödogeni
HLA-DRB8	DR β 8	DR1, DR7 ve DR9 haplotiplerinde bulunan DRB psödogeni.
HLA-DRB9	M.2 β exon	DRB psödogeni
HLA-DQA1	DQ α 1, DQ1A	DQ α - zinciri, eksprese edilir
HLA-DQB1	DQ β 1, DQ1B	DQ β - zinciri, eksprese edilir
HLA-DQA2	DQ α 2, DQ2A	DQ α - zincirle ilişkili dizi, ekspresyon?
HLA-DQB2	DQ β 2, DQ2B	DQ β - zincirle ilişkili dizi, ekspresyon?
HLA-DQB3	DQ β 3, DQ3B	DQ β - zincirle ilişkili dizi, ekspresyon?
HLA-DQA	DQ α , DQ α , DQA	DQ α - zinciri
HLA-DQB	DQ β	DQ β - zinciri
HLA-DMA	DMA	DM α - zinciri
HLA-DMD	DMA	DM β - zinciri
HLA-DPA1	DP α 1, DP1A	DP α - zinciri, eksprese edilir
HLA-DPB1	DP β 1, DP1B	DP β - zinciri, eksprese edilir
HLA-DPA2	DP α 2, DP2A	DP α - zincirle ilişkili psödogen
HLA-DPB2	DP β 2, DP2B	DP β - zincirle ilişkili psödogen
HLA-DPA3	DP α 3	DP α - zincirle ilişkili psödogen
TAP1	ABCB2, RING4, Y3, PSF1	ADC (ATP Binding Cassette) transporter
TAP2	ABCB3, RING11, Y1, PSF2	ARC (ATP Binding Cassette) transporter
PSMB9	LMP2, RING12	Proteasomla ilişkili dizi
PSMB8	LMP1, RING10	Proteasomla ilişkili dizi
MICA	MICA, PERB11.1	Class I zincirle ilişkili gen
MICD	MICD, PERB11.2	Class I zincirle ilişkili gen
MICC	MICC, PERB11.3	Class I zincirle ilişkili psödogen
MICB	MICB, PERB11.4	Class I zincirle ilişkili psödogen
MICF	MICF, PERB11.5	Class I zincirle ilişkili psödogen

Tablo 6. HLA Allellerini Tanımlarken Kullanılan Terminoloji

<i>Terminoloji</i>	<i>Notları sıra no.</i>	<i>İfade ettiği bilgi</i>
HLA		HLA bölgesini ifade eder ve bir HLA genine örnek olarak kullanılır
HLA-DRB1		Belli bir HLA lokusu Dr: DRB1
HLA-DRB1*13	1-2	Spesifik bir antijeni (Ör:DR13) kodlayan bir allel grubunu tanımlar
HLA-DRB1*1301	3-4	Spesifik bir HLA alelini tanımlar (DR13'in 01 aleli)
HLA-DRB1*1301N	5-6	Eksprese edilmeyen (Null) bir aleli gösterir, L harfi ise zayıf ekspresyonu işaretler
HLA-DRB1*130102	7-8	Sessiz (Sinonim) mutasyonu olan bir aleli ifade eder
HLA-DRB1*13010102	7-8	Kodlama bölgesi (exon) dışında mutasyonu olan bir aleli gösterir
HLA-DRB1*13010102N	5-6	Kodlama bölgesi dışında mutasyonu olan Null bir aleli gösterir

HLA allelleri ve ürünleri HLA antijeni olarak ifade edilirler. HLA antijenlerinden molekül üzerinde tek bir allel ile tanımlanan antijenlere Özel HLA antijenleri denilir. Her biri özel HLA antijeni içeren moleküllerde genel olarak bulunan antijenlere ise Genel HLA antijenleri adı verilir. Genel HLA antijenlerine örnek olarak HLA-Bw4, HLA-Bw6 verilebilir. DSÖ Adlandırma Komitesi, Mayıs 2002'de; "13th International Histocompatibility Workshop and Congress" ardından, toplantıda saptanan kurallar doğrultusunda hem moleküler hem de serolojik tekniklerle adlandırmanın ayrıntılarını değerlendirerek, yeni ekler ve değişiklikler belirlemiştir. HLA antijenlerinin yakın özgülük gösteren antijenik tiplerine "splits" adı verilir³⁹. Birbirleri ile yakın ilişkileri olan 2 veya 3 HLA antijeni tek bir genel HLA antijeni olarak düşünülürler. Tablo 7'de HLA antijenlerinin splitleri verilmiştir. Örneğin HLA-A25 (10) ve HLA-A26 (10), HLA-A10'un splitleri olan A25 ve A26'yı içerirler. HLA-A10, molekül üzerinde HLA-A25 ve HLA-A26 özel antijenlerini içeren genel antijen olarak düşünülebilir. HLA antijenlerinden aynı lokusta olanlar ile HLA antijen splitleri arasında serolojik olarak çapraz reaksiyonlar görülür⁴⁰. DSÖ HLA Adlandırma Komitesi'nce 2002 yılında açıklanan allellerin tanımlanmış HLA antijenlerinin listesi tablo 8'de verilmiştir⁴⁰. 2009 yılına ait HLA web sitesinden alınan en son tanımlanmış HLA antijenlerinin allel listesi HLA web sitesinden alınan bilgilere göre

çizelge 1’de ve tanımlanmış toplam HLA antijenlerinin listesi EK-4’te tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 7. HLA Antijenlerinin splitleri

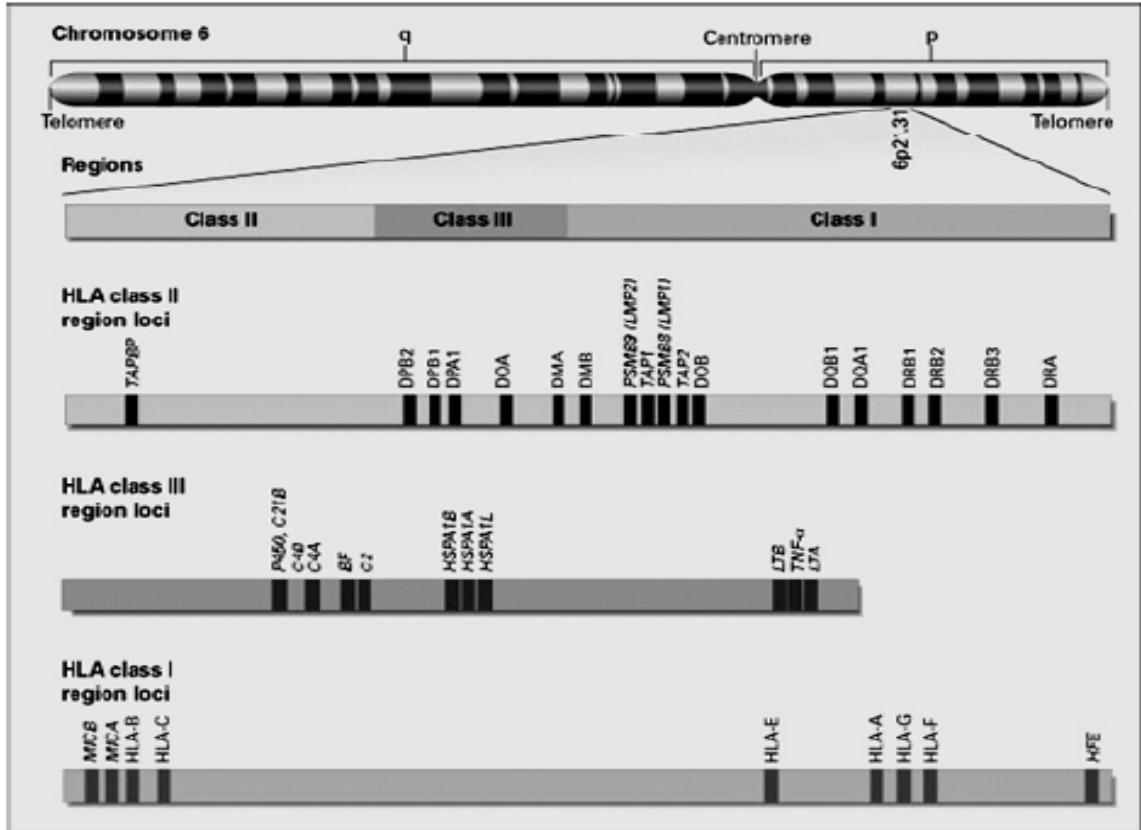
Antijenler	Splitler	Antijenler	Splitler
A9	A23, A24	DR2	DR15, DR16
A10	A25, A26, A34, A66	DR3	DR17, DR18
A19	A29, A30, A31, A32, A33, A74	DR5	DR11, DR12
A28	A68, A69	DR6	DR13, DR14
B5	B51, B52	DQ1	DQ5, DQ6
B12	B44, B45	DQ3	DQ7, DQ8, DQ9
B14	B64, B65		
B15	B62, B63, B75, B76, B77		
B16	B38, B39		
B17	B57, B58		
B31	B49, B50		
B32	B34, B53, B56		
B40	B60, B61		

Tablo 8. 2002 yılında DSÖ HLA komitesi tarafından tanımlanmış HLA antijenleri

HLA A		HLA B		HLA C		HLA DR	HLA DQ	HLA DP
A1	A68 (28)	B7	B45 (12)	B67	CW1	DR1	DQ1	DPW1
A2	A69 (28)	B8	B46	B70	CW2	DR103	DQ2	DPW2
A203	A74 (19)	B12	B47	B71 (70)	CW4	DR2	DQ3	DPW3
A210	A80	B13	B48	B72 (70)	CW5	DR3	DQ4	DPW4
A3		B14	B49 (21)	B73	CW6	DR4	DQ5 (1)	DPW5
A9		B15	B50 (21)	B75 (15)	CW7	DR11(5)	DQ6 (1)	DPW6
A10		B16	B51 (5)	B76 (15)	CW8	DR12 (5)	DQ7 (3)	
A11		B18	B5102	B77 (15)	CW9 (W3)	DR6	DQ8 (3)	
A23 (9)		B21	B5203	B78	CW10 (W3)	DR7	DQ9 (3)	
A24 (9)		B22	B52 (5)	B81		DR8		
A2403		B27	B53	BW1		DR9		
A25 (10)		B2708	B54 (22)	BW6		DR10		
A26 (10)		B35	B55 (22)			DR15 (2)		
A28		B37	B56 (22)			DR16 (2)		
A29 (19)		B38 (16)	B57 (17)			DR17 (3)		
A30 (19)		B39 (16)	B58 (17)			DR18 (3)		
A31 (19)		B3901	B59			DR19 (6)		
A32 (19)		B3902	B60 (10)			DR14 (6)		
A33 (19)		B40	B61 (40)			DR1403		
A34 (10)		B4005	B62 (15)			DR1404		
A36		B41	B63 (15)			DR51		
A43		B42	B64 (14)			DR52		
A66 (10)		B44 (12)	B65 (14)			DR53		

Çizelge 1. 2009 yılı Temmuz Ayı HLA Antijenleri Allel Sayıları

A LOKUSU	B LOKUSU	Cw LOKUSU	DQB1*LOKUSU	DRB1 LOKUSU	DP LOKUSU
770	1186	444	99	631	135



Şekil 2. HLA gen bölgesinin 6. kromozom üzerinde yerleşimi ve sınıf I, II, III bölgeleri

2.2.2. MHC Moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonları

HLA molekülleri ve onları kodlayan genler 3 sınıftır (Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III). Sınıf I ve Sınıf II HLA molekülleri hücre yüzey glikoproteinleridir ve aminoasit benzerliği gösterdiği için immunoglobulin süper ailesinin üyesidir (Bu aile T hücre reseptörleri, immunoglobulinler CD4 ve CD8'leri içeren geniş bir hücre yüzey molekülleri yelpazesini kapsar)⁴¹.

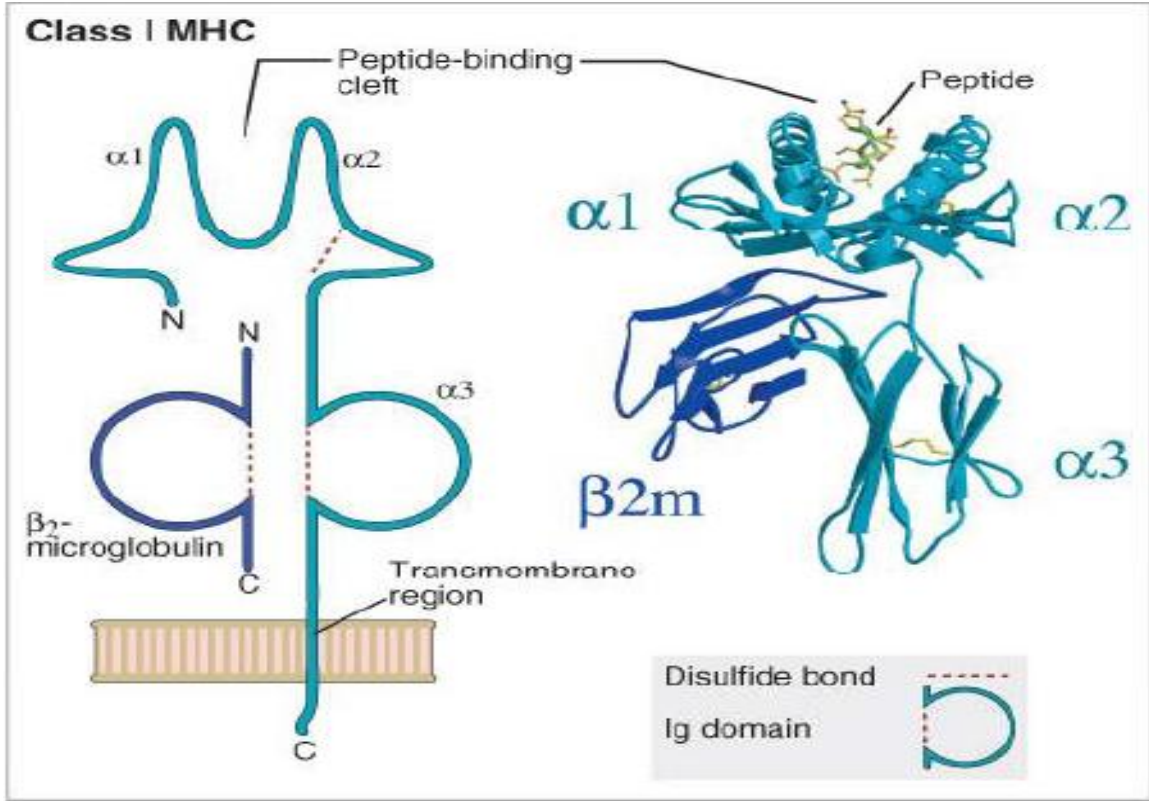
Sınıf I ve Sınıf II molekülleri yapıları, doku dağılımları ve fonksiyon esaslarına göre ayırd edilebilirler. Sınıf I molekülleri, HLA-A, B, ve C olarak, Sınıf II molekülleri de HLA-DR, DQ ve DP olarak ayrılırlar. Sınıf III molekülleri klasik kompleman sisteminin C2, C4 faktörleri ile alternatif yoldaki “Properdin faktör-B”leri içerir^{5,42,43}.

Sınıf III molekülleri stabildirler ve Transplantasyon antijenleri olarak rol oynamadıkları gibi, T hücrelerine antijen de tanıtmazlar. Kompleman genlerinin, HLA kompleksi içersindeki lokalizasyonu hala açıklığa kavuşturulamamıştır^{44,45}.

2.2.2.1. MHC Sınıf I Moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonu

MHC Sınıf I moleküller, kovalan olmayan bağlarla bir arada tutulan, iki polipeptid zincirinden oluşmuş heterodimerlerdir³¹. Bunlardan 44 kD mol ağırlığındaki ağır zincir olan α (alfa), 6. kromozom üzerindeki MHC kompleksindeki genlerce kodlanan polimorfik bir glikoproteindir ve 15. kromozom üzerinde yer alan bir gen tarafından kodlanan non-polimorfik protein olan 12 kD mol ağırlığındaki $\beta 2$ (beta) mikroglobulinle non-kovalan bir şekilde sonradan bağlanır. Bütün molekül bir alfa zinciri ile hücre membranına tutunmuştur. 338 aminoasit (aa) biriminden oluşan α zinciri 3 bölgeye ayrılır. Bu bölgeler; Ekstraselüler hidrofilik bölge (1-281 aa), Transmembran hidrofobik bölge (282-306 aa), ve intraselüler hidrofilik (307-338 aa) bölgelerdir. Ekstraselüler bölge, hidrofilik olup N terminali ile sonlanır ve 3 etki alanına ayrılır. Bunlar; 1-90 aa'ten oluşan $\alpha 1$, 91- 180 aa'ten oluşan $\alpha 2$, ve 181-271 aa dizilimli $\alpha 3$ bölgeleridir. Çeşitli HLA antijen aa sıralarının karşılaştırılması sonucunda HLA antijenik determinantlarının ekseri çoğunluğunun $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ etki sahalarında yer aldığı ortaya konulmuştur^{5,46,47}. Burası peptid bağlama bölgesi olup, fonksiyonel olarak molekülün en önemli yeridir. T lenfosit tanıma olaylarında T hücresinin CD8 molekülünün bağlandığı $\alpha 3$ birimi ile transmembran ve intraselüler bölgeler ise polimorfik olmayıp bütün MHC Sınıf I tiplerinde aynıdır⁴⁸ (Şekil 3).

$\beta 2$ mikroglobulin, alfa zincirinden ayrılırsa ya da konjenital olarak yokluğu söz konusu lursa MHC Sınıf I molekülü fonksiyonunu kaybeder³⁹.



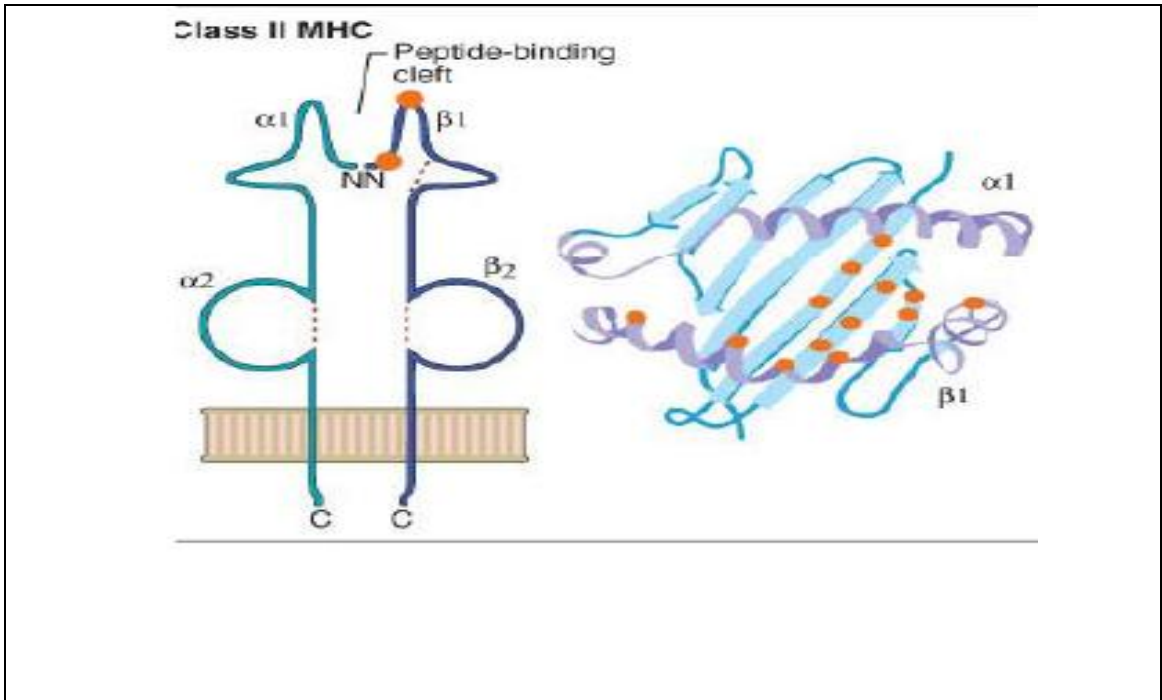
Şekil 3. MHC Sınıf I Molekülünün şematik görünümü

2.2.2.2. MHC Sınıf II Moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonu

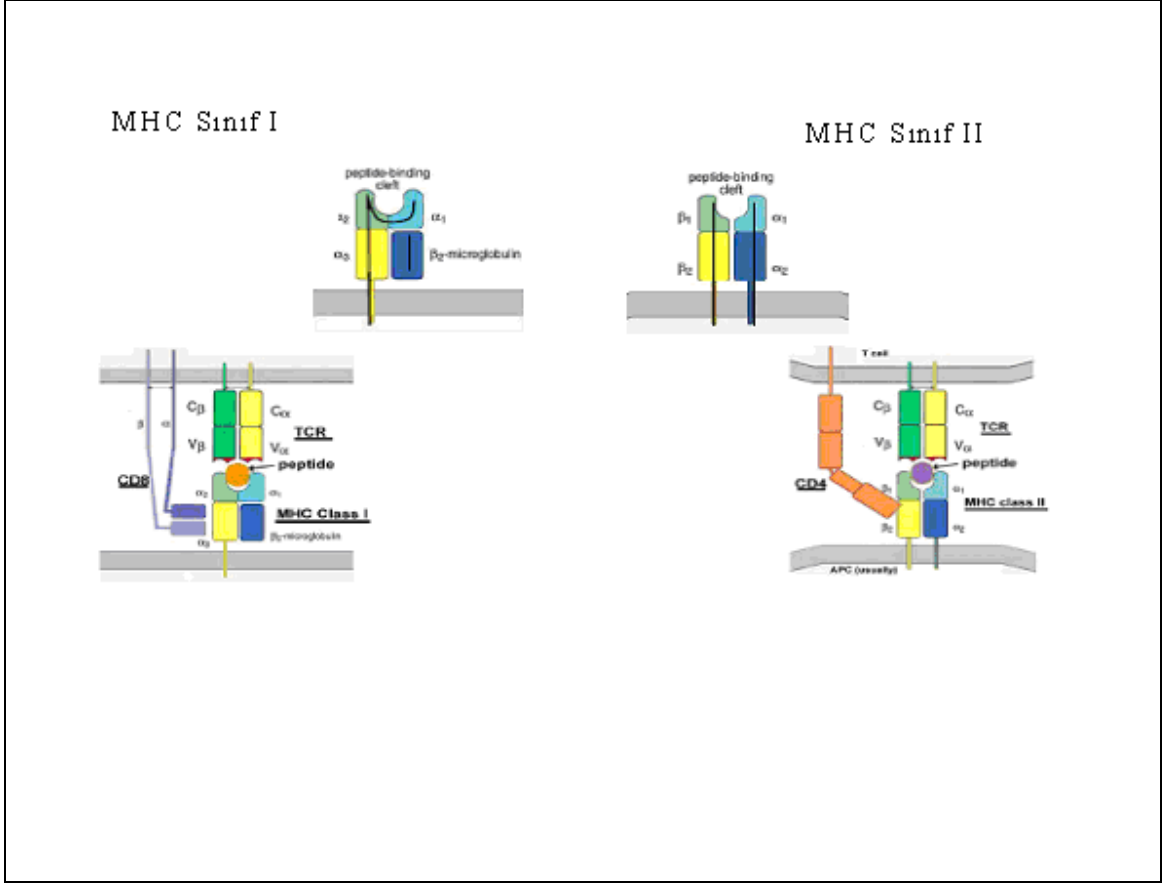
MHC Sınıf II moleküller, kovalan olmayan bağlarla bir arada tutulan, alfa ve beta olmak üzere iki adet transmembran glikoprotein zincirinden oluşmuş heterodimerlerdir⁴⁹. Alfa zinciri 229, beta zinciri 237 aa'ten oluşur. Sınıf I moleküllerinin ağır zinciri gibi Sınıf II alfa ve beta zincirlerinin herbiri bir ekstraselüler hidrofilik bir transmembran, hidrofobik bölge ve intraselüler hidrofilik bölgeden ibarettir. Bunların son ikisi hücre membranı içine tutunmuşlardır. Ekstraselüler hidrofilik bölgedeki alfa zinciri $\alpha 1$ ve $\alpha 2$, beta zinciri de $\beta 1$ ve $\beta 2$ olarak iki ayrı bölgeyi oluştururlar. Alfa'lar (1-84 ve 85-188), beta'lar (1-91 ve 92-192) aa sırasındadırlar. $\alpha 2$ ve $\beta 2$ bölgeleri immüoglobulinlerin sabit bölgelerine benzeme açısından önemli bir homoloji gösterirler^{50,51}. Membranın distalinde yerleşen ve polimorfik bir yapı gösteren $\alpha 1$ ve $\beta 1$ zincirleri Sınıf I moleküllerde olduğu gibi antijenlere ait peptidlerin yerleşebileceği kovuğa benzer bir yapı oluştururlar³⁰ (Şekil 4). Sınıf II MHC

molekülleri sınırlı bir hücrel dağılıma sahiptirler. Büyük ölçüde immuno komponent hücrelerinde, B lenfositlerde, antijen sunucu hücrelerde (Makrofaj ve dentritik hücreler) ve insanlarda aktive olmuş T hücrelerinde bulunurlar. İlave olarak normalde Sınıf II moleküllerini taşımayan (istirahat halindeki T hücreleri, endotelial hücreler ve troid hücreleri gibi) kimi hücreler bunları taşımak üzere harekete geçirilebilirler^{52,53,54}.

Bu anormal taşıma işleminin HLA ile ilgili hastalıklarda önemli bir yeri olduğu varsayılmaktadır. Sınıf II molekülünün fonksiyonu immün cevabın başlangıcında aktif antijenik peptid fragmantlerini CD4 T lenfositlere sunmaktır. Nasıl ki CD8 T lenfositleri peptid fragmanlarını ancak Sınıf I'lere bağlanınca tanıyorlarsa CD4 T lenfositlerde peptid fragmanlarını ancak Sınıf II bağlamında tanıyabilirler^{55,56,57,58} (Şekil 5).



Şekil 4. MH C Sınıf II moleküllerinin şematik görünümü



Şekil 5. MHC Sınıf I ve II moleküllerine TCR reseptörlerinin Bağlanması şematik görünümü

2.2.2.3. MHC Sınıf III moleküllerinin Yapısı ve Fonksiyonu

MHC Sınıf III antijenleri Sınıf I ve Sınıf II antijenleri arasındaki bölgede bulunurlar. Klasik kompleman yolunun C2, C4a ve C4b, alternatif yolun properdin faktörü ile 21-hidroksilaz gibi enzimler ve TNF gibi sitokinlerin sentez edildiği bölgedir. Bu antijenlerin immün sistemde önemli fonksiyonları olmasına karşın transplantasyon için önemi gösterilememiştir^{50,51}.

2.3. MHC Antijenlerinin Genetiği ve Çeşitliliği

Tek bir kromozomda yer alan ve birbirine yakın lokuslarda bulunan allel kompleksleri Haplotip olarak adlandırılır. HLA haplotipleri Sınıf I, II, III allellerinden oluşur. Bir bireyde bulunan 2 haplotip, o bireyin MHC genotipini oluşturmaktadır⁵⁹. Haplotip terimi, bir kromozom üzerinde çok yakın bağlantı gösteren ve dolayısı ile bir ünite halinde kalıtılan bir gen grubuna verilen isimdir. HLA genleri kodominanttır, hem anne hem baba 2 haplotip taşımaktadır. Bunlardan herhangi birini çocuklarına verebilir³⁸.

Her hücrede, anne ve baba kökenli kromozomlar (homolog) üzerindeki genler tarafından kodlanan proteinler, birlikte eksprese edilirler. Homolog kromozomlar arasında bir segment değişiminin olması ise rekombinasyon olarak tanımlanır; görülme sıklığı %1-3 olup, en sık HLA-A, HLA-DP bölgelerinde görülür. Her bölgede yer alan allellerin sayısı göz önüne alındığında; toplumlarda beklenen teorik değerden daha az sayıda haplotip bulunduğu görülür. Bu durum, bazı allellerin birlikteliğinin rasgele olmadığını desteklemektedir. Bu, Linkage Disequilibrium olarak bilinir ve bazı haplotiplerin korunma çabası ile açıklanmaktadır. Bu eğilim en çok, HLA -B, Cw, -DRB1, -DRB3/4/5, -DRB1, -DQB1 arasında olmak üzere HLA-B ile HLA-DQB1 arasındaki bölge boyunca görülmektedir. Arada yerleşmiş olan kompleman genlerini de kapsayan bazı haplotipler genişletilmiş haplotipler olarak adlandırılır. Hastalık ilişkisi çalışmalarında genişletilmiş haplotipler ile kurulan ilişkiler, allelik farklarla kurulan ilişkilere göre daha anlamlı bulunmaktadır. Haplotiplerin frekansında etnik farklılıkların önemi büyüktür.

HLA genlerinde benzersiz bir genetik çeşitliliğin bulunduğu bilinmektedir. Bir kişinin sergilediği MHC genlerini etkileyen pek çok faktör vardır.

1. Çok sayıda farklı lokusun birlikte sergilendiği görülür; bunların sayısı haplotiplere göre farklılık gösterir. Sınıf I genlerde bu polimorfizmi çok sayıdaki psödogen ve fizyolojik rolleri henüz bilinmeyen, klasik olmayan genler sağlar (Klasik olarak adlandırılanlar, HLA -A, -B, -C gibi antijen sunumunda rol alan genlerdir). Sınıf II genlerde ise DR alt bölgesindeki genlerin yapısı ve psödogenler etkili olur.

2. HLA genleri içinde farklı allellerin oluşmasına sebep olacak şekilde dizi farklılıkları vardır. Bu çeşitlilik, özellikle antijen sunulması sırasında T hücre reseptörü (TCR) ile ilişkiye giren zincirleri kodlayan genlerde dikkat çekicidir (Sınıf I genler için ekson 2-3, Sınıf II moleküller için ekson 2). Alleller arasındaki farklar, peptidin taşındığı kovuğun üç boyutlu yapısı üzerinde etkili olduğundan; taşınabilecek peptidlerin seçilmesinde de önem kazanmaktadır³⁰.

HLA antijenleri mobildirler. Hücre yüzeyinden kopabilirler. HLA antijenini kaybetmiş lenfositler 6 saat içinde bunu yeniden sentezlerler⁶⁰.

2.3.1. MHC Antijenlerinin Hastalıklarla ilişkisi

Belirli bazı hastalıklar ile HLA sistemi arasındaki ilişkilerin keşfi bu hastalıkların genetik yönlerini daha iyi anlamamızı sağlamıştır⁶¹. HLA ve hastalıklar arasındaki ilişkilerin anlaşılması için genetik seçim, göç ve bağlantı ile insan evrimi etkileşimi arasındaki bağıntı, HLA verileri kullanılarak saptanmaya çalışılmıştır.

MHC'nin bir hastalıkla ilişkisini ortaya koymanın iki yolu vardır.

1. Aile çalışmaları: HLA lokusu ile hastalığı kontrol eden genler arasında bir beraberlik olup olmadığını ortaya koymakta yararlı olur. HLA çok polimorfik bir sistem olduğundan, ancak ailesel yakın akraba evliliklerinde veya sınırlı sayıda bireyden oluşan kapalı populasyonarda bilgi içeriği yüksek sonuçlar vermektedir.

2. Populasyon çalışmaları: Bir hastalık ile HLA antijenleri arasındaki ilişki hasta ve kontrol gruplarında yapılan çalışmalar sonucunda belirlenir. HLA fenotipleri birbiriyle bağlantısız kontrol bireyleri üzerinde gözlenerek kullanılmaktadır⁶².

HLA ve hastalıklar arasındaki ilişkinin ölçümünde kıkare istatistiği kullanılmaktadır. Ayrıca bağlantı (linkage) incelemeleri hastalıkların haplotip ilişkilerini tespit etmek için uygulanmaktadır^{63,64}.

Hastalıklarla ilişkili bulunan allellerin daha çok sınıf II genlerde bulunduğu, sınıf I ile kurulan ilişkilerin de "linkeage disequilibrium" nedeni ile Sınıf I ve II arasındaki birlikteliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. HLA molekülleri sadece hastalığa yatkınlığı gösteren bir özellik olup; genellikle hastalığın ortaya çıkmasına çok sayıda

faktörün beraberce bulunması sebep olmaktadır. Bu faktörler, HLA molekülleri ile birlikte kalıtılan genler, farklı kromozomlarda yerleşen farklı genlerle ilişkili olabilir. Örneğin Ankilozan Spondilit ile HLA B27 ilişkisi çok iyi bilinmektedir. Ancak HLA B27 taşıyan kişilerin sadece %2 sinde bu hastalık ortaya çıkmaktadır. Antijenler yerine o grupta mevcut allellerin saptanması durumunda daha anlamlı sonuçlar alınabilir. Sunulacak peptidleri ve dolayısıyla oluşacak immün yanıtın özelliklerini HLA molekülleri kadar antijenlerin işlenmesi sırasında oluşan peptidlerin yapısı da belirlemektedir. Bu nedenle sınıf II MHC genleri arasında yer alan ancak yapısal olarak onlara benzerlik göstermeyen ve antijen işlenmesinde rol alan LMP (Low Molecular Weight Proteosome) ve TAP (Transporter Associated with Antigen Processing) genlerindeki çeşitliliğin de hastalıklar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir³⁰.

HLA ve hastalık ilişkileri konusunda birçok teori ileri sürülmüş, bunlardan sadece 3 tanesi kabul görmüştür.

2.3.1.1. İmmün Cevap Genleri

Hastalık etmenlerine karşı immünolojik cevabın kişinin genetik yapısıyla ilişkili olduğu, immün cevap genlerinin de HLA antijenleri gibi 6. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunduğu ileri sürülmüştür. İmmün cevabı farklı kılan bu gen yapısındaki değişikliklerin yakın komşuluk sebebiyle HLA antijenlerini regüle eden genler ile tanımlanabileceğini savunan teoridir⁶⁰.

2.3.1.2. Antijenik benzerlik teorisi

HLA antijenleri ile bazı hastalık nedeni antijenlerin arasında benzerlik bulunması nedeniyle immün cevabın tam olmadığını ve bu hastalık etkeninin kronik hastalığa neden olduğunu ileri süren teoridir⁶⁰.

2.3.1.3. Membran reseptörleri teorisi

Hücreler buldukları ortamla ilişkilerini hücrelerin yüzeylerindeki reseptörler aracılığı sağlarlar. MHC antijenleri hücre yüzeyinde bulunan reseptörler olarak kabul edilirse, hücrelerin aynı etken karşısında değişik cevap vermeleri mümkün olacaktır⁶⁰.

Aşağıda Tablo 9'da HLA ile ilişkilendirilen hastalıklardan bazı örnekler gösterilmiştir. Rölatif riskleri büyükten küçüğe doğru sıralanmış şekilde gösterilmiştir. Rölatif risk, bir antijeni taşıyan bireyin, taşımayanlara göre herhangi bir hastalığa yakalanma olasılığını gösteren bir parametredir. Rölatif risk ne kadar yüksekse o antijene hasta popülasyonunda o kadar fazla rastlanılır³⁰.

Tablo 9. HLA Antijenlerinin hastalıklarla ilişkileri

Hastalık	HLA	Rölatif Risk
Ankilozan Spondilit	B27	87.4
Herpetiformik Dermatit	DR3	56.4
Reiter hastalığı	B27	37.0
Reaktif artrit	B27	29.7
Üveit	B27	14.6
Subakut tiroidit	B35	13.7
Sjögren sendromu	DR3	9.7
Amiloid ve romatoid artrit	B27	8.2
Tüberküloid lepra	DR2	8.1
Multiple sklerozis	DR2	4.8
Myastenia Gravis	B8	4.4

2.4. HLA Tiplendirmesi ve Yöntemleri

HLA tipinin belirlenmesi çok duyarlı yöntemlerle yapılmaktadır.

2.4.1. Serolojik yöntemler

Bu yöntem lenfosit mikrotoksisite testi olarak tanımlanmaktadır. Deney iki basamaklı olarak gerçekleşmektedir. İlk basamakta saflaştırılmış olan hücreler bir plaktaki küçük kuyucuklarda çeşitli antikorlarla karşılaştırılır. Bu antikorlar, monoklonal ya da poliklonal (çok sayıda doğum yapmış olan kadınların, fazla kan nakli yapılmış bireylerin serumundan elde edilen) olabilir. Antikorum özgün olduğu antijeni taşıyan hücreler, ortamdaki antikoru bağlar. Deneyin ikinci kısmında ortama kompleman eklenerek antikor bağlamış olan hücrelerin ölmeleri sağlanır. Daha sonra eklenen bir boya aracılığıyla hücrelerin canlı mı ölü mü oldukları değerlendirilir³⁰.

2.4.2. Hücresel Yöntemler

Çoğalan Sitotoksik T lenfositlerin (CTLp) belirlenmesi, HLA tiplendirilmesinde olmasa da verici hücrelerince alıcı hücrelerindeki sınıf I antijenlere karşı oluşabilecek immun yanıtın belirlenmesinde kullanılabilen bir testtir. Hücre kültüründeki lenfositlerin aynı ortamda bulunan ikinci bir seri hücrenin yüzey antijenlerine karşı çoğalarak oluşturduğu yanıt, "Miksed Lymphocyte Reaction", MLR olarak tanımlanır. MLR, invitro koşullarda sınıf II antijenlerin uyum ya da uyumsuzluğunun bir ölçütü olarak kullanılır³⁰.

2.4.3. Moleküler Yöntemler

Teknolojide ve kullanılan moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmeler, organ ve doku nakillerinde önemi olan Sınıf I ve Sınıf II allellerin belirlenmesini kolaylaştırmıştır. Moleküler yöntemlerin avantajları; Özgün, esnek olmaları, yeni alleller tanımlandıkça yeni reaktiflerin geliştirilebilmesi, istenen duyarlılıkta çalışma yapabilecek seçeneklerin mevcut olması, çalışmalarda canlı hücre gerektirmemesi, bireyin hastalık ya da tedavi durumundan

etkilenmemesi, serolojik ve hücresel yöntemlere göre otomasyona daha uygun olması, eş zamanlı olarak çok sayıda örneğin çalışılabilmesi, HLA genlerindeki tüm çeşitliliklerin gösterilebilmesi, serolojik olarak tanımlanamayan allellerin tanınabilmesi olarak özetlenebilir³⁰.

2.4.3.1. Moleküler tiplendirme Yöntemleri

Çekirdekli hücrelerden elde edilen DNA örnekleri, ilgilenilen bölgeyi hedefleyen ve bu bölgenin analiz edilebilir miktara ulaşabilmesi için PCR ile çoğaltılır. Bazı yöntemlerde, tüm lokusu içine alacak şekilde primerler seçilirken (ör. Sequence Specific Oligonucleotide typing-SSO); bazı yöntemlerde sadece bir allel ya da allel grubuna özgün (Sequence Specific Priming- SSP) DNA segmentlerinin çoğaltılabileceği primerler kullanılır. Bu çoğaltma işleminde ortam koşullarının reaksiyonun özgünlüğünü sağlayacak şekilde planlanmış olması gerekir. Uygulanacak moleküler teknikler hassasiyetlerine göre kendi içinde 3 gruba ayrılır;

- Dizilime bağlı hazırlama (Sequence Specific Priming- SSP)
- Dizilime özgü oligonükleotitlerin kullanıldığı tiplendirme (Sequence Specific Oligonucleotide typing-SSO)
- Dizilim analizine dayanan tiplendirme (Sequence Based Typing-SBT)³⁰.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- Luminex LabScan™ 100 Analiz Cihazı (Luminex)
- Thermal Cycler (MyGene™ Series Peltier)
- DNA İzolasyon Cihazı (Chemagen)
- DNA izolasyon Cihazı (Geno-M-6 genovision)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Mojor Science)
- HLA tiplendirme kiti HLAA, -B,-Cw,-DQB1,-DRB1,-DRB345 (One lambda)
- Güç Kaynağı (Mojor Science)
- Elektroforez Tankı (Mojor Science)
- Hassas Terazî (Sartorius)
- Mikrodalga Fırın (Beko)
- Santrifüj (Nuve CN180)
- Steril Kabin (Nüve)
- Derin Dondurucular (Siemens, Gallencamp)
- Buz Dolabı (Uğur Soğutucu)
- Steril EDTA'lı Tüp
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Multi Pipetler (10µl, 300µl) (Labmate)
- Otomatik pipetler (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl) (Labmate)
- Mezür
- PCR Tüpü (Thermo)
- Ependorf Tüpü
- Beher
- Spor

- PCR Plağı kapatma etiketi (Onelambda)

3.1.3. Kimyasal Maddeler

- 5X TRİS-BORAT-EDTA
- Ethidium Bromide (Olerup)
- Agarose (Prona)
- Master miks (Onelambda)
- Streptavidin Boyası (Onelambda)
- Manyetik Boncuk (Onelambda)
- Proteinase K
- Denatürasyon Tamponu (Onelambda)
- Nötralizasyon Tamponu (Onelambda)
- Yıkama Tamponu (Onelambda)
- Melezleme Tamponu (Onelambda)
- Sape Tampon (Onelambda)
- Taq polimeraz (Fermantas)
- %70'lik Etanol
- Shead Fluid Buffer
- %2'lik seyreltilmiş çamaşır suyu
- Distile Su

3.2. Örneklerin Sağlanması ve Kullanılan Yöntemler

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh ve Sinir Hastalıkları A.B.D. polikliniği tarafından PANDAS teşhisi konulan, 4-12 yaşları arası 41(82 allel) hastadan ve PANDAS hastası olmayan, yaş bakımından uygun 38 (76 allel) sağlıklı bireyden etik onay alındıktan sonra çalışmamızın amacı doğrultusunda her iki gruptan EDTA'lı tüplere 3ml kan alındı. Kanlar steril şartlar altında Balcalı Hastanesi Merkez Labaratuvarına getirildi.

3.2.1. Moleküler Genetik Çalışmalar

3.2.1.1. DNA Eldesi

Hasta ve kontrol grubundan alınan EDTA'lı tüplere alınan 3 ml kanların, iki farklı otomatik DNA izolasyon cihazında DNA izolasyonu yapıldı.

3.2.1.2. Chemagen DNA İzolasyon Cihazında Kandan DNA İzolasyonu

1. Çalışma süresine kadar +4 °C'de bekletilen kan örnekleri oda ısısına gelmesi için dolaptan çıkarıldı.
2. Laminar Air Flow Kabini çalıştırıldı.
3. DNA izolasyon cihazının arkasında bulunan güç düğmesine basılıp çalışır konuma getirildi.
4. Cihazın içi kontaminasyon riskine karşı seyreltilmiş çamaşır suyu ile steril hale getirildi.
5. Cihazın solüsyonları kontrol edildi.
6. Sarf malzemeleri kontrol edildi.
7. Disposable olan plate'in birinci sırasına 250µl kan konuldu.
8. Üzerine 10µl proteaz K eklendi.
9. Cihazın parçası olan rack'ın birinci sırasına tüp yerleştirildi ve içerisine 150µl manyetik boncuk konuldu.
10. İkinci sıraya ince pipet uçları yerleştirildi.
11. Üçüncü sıraya ise DNA için boş tüp yerleştirildi
12. Plate ve rack cihazdaki yerlerine yerleştirildi.
13. Cihazın üzerindeki LCD ekranda 'CODE'tuşuna basıldı, kod girildi ve 'ENTER'tuşuna basıldı.
14. Gelen ekranda 'CONTINUE'tuşuna basıldı.
15. Çalışılacak örnek sayısı girildi ve tekrar 'CONTINUE'tuşuna basıldı.
16. Çıkan ekranda 'ENTER KIT BARCODE'tuşuna basıldı.

17. Tekrar ekrandaki 'ENTER'tuşuna ve sonra 'OK'düğmesine basıldı ve cihaz DNA izolasyonuna başladı.
18. Bu işlem yalaşık 1 saat sürdü.
19. İşlem sonunda kullan at özellikte olan kısımlar atıldı ve elde edilen DNA tüplerinin ağızları kapatıldıktan sonra çalışılmak üzere -20°C 'de saklandı.
20. Cihaza yıkama işlemi yapıldıktan sonra arka düğmesinden kapatıldı.

3.2.1.3. GENO-M-6 Genovision Cihazında Kandan DNA İzolasyonu

1. Çalışma süresine kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen kan örnekleri oda ısısına gelmesi için dolaptan çıkarıldı.
2. Laminar Air Flow Kabini çalıştırıldı.
3. DNA izolasyon cihazının arkasında bulunan güç düğmesine basılıp çalışır konuma getirildi.
4. Kontaminasyon riskine karşı seyreltilmiş hipo ile steril hale getirildi.
5. Cihaz içerisindeki, DNA izolasyonu için gerekli olan kimyasalların bulunduğu kartuşun, pipet ve pipet kabı, örnek tüpü ve DNA elüsyon tüplerinin konulduğu rack'lar çıkarıldı.
6. Steril kabin içerisinde birinci rack'a izolasyon kartuşları yerleştirildi.
7. İkinci rack üzerinde 4 sıra bulunmaktadır. Birinci sıraya DNA'nın aktarılacağı elüsyon tüpleri, ikinci sıraya pipet ve pipet kabı, dördüncü sıraya ise kanların konulacağı örnek tüpleri yerleştirildi.
8. Oda ısısına ulaşan kanlar el yöntemi ile hücreleri homojen hale getirildi.
9. Elüsyon tüpleri üzerine hasta isimleri yazıldı.
10. Her kan örneği için ayrı ayrı konulan örnek tüpleri içerisine $200\mu\text{l}$ kan konuldu.
11. Cihaz her çalışmada en fazla 6 örnek çalışıldığından dolayı bu işlem 6 hasta için de tekrar edildi.
12. Rack'lar cihazda bulunan yerlerine tekrar yerleştirildi.
13. Cihazın kapağı kapatıldı.
14. Cihaz üzerinde bulunan ekrandan 'Blood Protocol'ayarı seçildi.

15. 1 tuşuna basılarak 200µl kan hacmi seçildi.
16. 2 tuşuna basılarak bu kez 200µl DNA elüsyon hacmi seçildi.
17. ‘START ‘tuşuna basıldı.
18. Çıkan ekranda örnek tüplerinin yeri onaylandı ve devam tuşuna basıldı.
19. Sırasıyla rack üzerindeki pipet ve pipet kabının, elüsyon tüpünün ve kartuşların yerlerinin doğruluğu cihaz ekranından onaylandı.
20. ‘Start’tuşuna basılarak izolasyon işlemine başlandı.
21. Protokol 15 dakika sürdü.
22. Bu süre sonunda içerisinde izole edilmiş DNA bulunan elüsyon tüpleri çalışma süresine kadar -20°C ’ye konuldu.
23. Geriye kalan kullanılmış olan disposable sarflar çöpe atıldı.
24. Cihaz temizlendikten sonra arka güç düğmesinden kapatıldı.

3.2.2. HLA Sınıf I ve Sınıf II Allellerinin PCR ile Amplifikasyonu

PCR reaksiyonun hazırlanmasında sırasıyla şu işlemler uygulandı:

A. Hazırlık Aşaması

- PCR cihazı açıldı ve 60°C inkübasyon programına ayarlanarak başlatıldı.
- Kırılmış buz parçaları hazırlandı.
- Amplifikasyonda kullanılacak olan DNA’lar ve diğer çözeltiler -20°C ’den alınıp çözdürüldü.
- Laminar air flow kabin içerisinde 96’lık PCR plağı hazırlandı.
- DNA örnekleri ve diğer çözeltiler vortekslendi.
- Bütün çözeltiler (100X SAPE şişesi dışındaki) kutularından çıkartılarak oda ısısında kullanılmak üzere hazırlandı.

B. Amplifikasyon Aşaması

- Çözülen amplifikasyon çözeltileri buzda korundu.
- DNA 96 kuyucuklu PCR plağına her kuyucuğa 2µl olacak şekilde dağıtıldı.

- 432 µl Primer Karışımı, 1491 µl D- Karışımı ve 22 µl Taq Polimeraz karıştırıldı ve vortekslendi (çizelge 2).
- DNA içeren 96 kuyucuklu PCR plağına, her kuyucuğa 18 µl olacak şekilde amplifikasyon karışımı dağıtıldı.
- Plağın ağzı kapatıldı .
- Thermal Cycler cihazında LABType® SSO PCR programı kullanılarak PCR yapıldı (çizelge 3).
- Program bittikten sonra plak Thermal Cycler cihazından çıkartıldı ve amplifiye edilmiş DNA örnekleri %2.5 agaroz jelde yürütüldü ve amplifikasyon olup olmadığı kontrol edildi.

C. Denatürasyon ve Nötralizasyon Aşaması

- Temiz ince duvarlı 96 kuyucuklu PCR plağına her kuyucuğunda 2.5 µl olacak şekilde denatürasyon tamponu eklendi.
- Amplifikasyonu yapılmış DNA örneklerinden bütün kuyucuklara 5 µl eklendi.
- Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi(20°C*25°C).
- Bu süre zarfında 96 kuyucuğa yetecek şekilde her lokusa özgü olan boncuk ve melezleme tamponu karışımı hazırlandı (çizelge 4).
- Süre sonunda her kuyucuğa 5 µl nötralizasyon tamponu eklendi.
- Karışımın rengi solgun bir sarı range dönünceye kadar pipetlendi.
- Plak buza yerleştirildi.

D. Hibridizasyon ve Yıkama Aşaması

- Nötürlenmiş DNA'lara kuyucuk başına 38 µl olacak şekilde önceden hazırlanmış olan melezleme tampon karışımı eklendi.
- Plağın ağzı kapatıldıktan sonra düşük hızda vortekslendi.
- Plak 15 dakika 60°C'ye ayarlı olan Thermal Cycler'da inkübe edildi.

- Süre sonunda plak çıkartıldı.
- Plak soğuduktan sonra bütün kuyucuklara 100 µl yıkama tamponu eklendi.
- Plağın ağzı kapatıldı ve 3000g'de 4 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı çırpma yöntemi ile uzaklaştırıldı.
- Bu işlem ard arda 2 defa daha tekrarlandı.
- Son santrifügasyon işlemi sırasında sape stok ve sape tampon karışımı hazırlandı (Çizelge 4).

E. İşaretleme Aşaması

- 3. santrifüj işlemi bittikten sonra süpernatant kısmı atıldı.
- Plakta her kuyucuğa 50 µl hazırlanmış olan sape tampon karışımı eklendi..
- Plağın ağzı kapatıldı ve vortekslendi .
- Plak 5 dakika 60°C'ye programlı Thermal Cycler'da inkübe edildi.
- Süre sonunda plak çıkartıldı ve soğumaya alındı.
- Bütün kuyucuklara 100 µl yıkama tamponu eklendi.
- Plağın ağzı kapatılıp 3000g'de 4 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
- Bütün kuyucuklara içerisinde 70 µl olacak şekilde yıkama tamponu eklendi.
- Pipet kullanarak kuyucuklar karıştırıldı ve örnekler veri yorumlaması için kullanılan okuma plaklarına aktarıldı.

F. Cihaz Okuma ve Değerlendirme Aşaması

- LABScan™ 100 analiz cihazı açıldı ve ısınması için 30 dakika beklendi.
- Cihaz ısındıktan sonra cihaza önce prime yapıldı.
- Prime işlemi bittikten sonra %70'lik alkol ile yıkama işlemi yapıldı.
- Alkolden sonra tekrar distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- Rezervuara okuma işleminin gerçekleşebilmesi için shead fluid solusyonu konuldu.

- Cihaz programında okunacak örnekler için bir dosya oluşturuldu.
- Örnek numaraları yazıldı.
- Okuma plağı cihazın XY platformuna yerleştirildi.
- Başla düğmesine basıldı ve örnekler değerlendirildi.
- Her örnek için, boncuklar tarafından içerilen (veya boncuğa bağlı bir probda bulunan), floresan yoğunluğu (FI), luminex® Veri toplayıcı Programı veya benzeri program ile ortaya çıkartıldı.

Çizelge 2. HLA gen bölgesi için amplifikasyon PCR reaksiyon miktarları.

Reaksiyon Sayısı	D-mix (ul)	Primer (ul)	Taq Polimeraz (ul)
1	13,8	4	0,2
5	69	20	1
10	138	40	2
12	165,6	48	2,4
16	220,8	64	3,2
24	331,2	96	4,8
32	441,6	128	6,4
40	552	160	8
48	662,4	192	9,6
50	690	200	10
56	772,8	224	11,2
64	883,2	256	12,8
72	993,6	288	14,4
80	1104	320	16
88	1214,4	352	17,2
96	1491	432	21,6(22)

Çizelge 3. HLA Amplifikasyonu için Gerekli ısı döngüleri

	Sıcaklık ve İnkübasyon süresi	Devir Sayısı
1. Basamak	96 °C 03:00	1
2. Basamak	96 °C 00:20	5
	60 °C 00:20	
	72 °C 00:20	
3. Basamak	96 °C 00:10	30
	60 °C 00:15	
	72 °C 00:20	
4. Basamak	72 °C 10:00	1
5. Basamak	Sonsuza kadar 4 °C	1

Çizelge 4. HLA gen bölgesi için melezleme ve boyama için gerekli miktarlar

Reaksiyon Sayısı	Hibridizasyon Tamponu (ul)	Boncuk Miktarı (ul)	Stok Miktarı (ul)	SAPE	SAPE Tamponu (ul)
1	34	4	0,5		49,5
5	170	20	2,5		247,5
10	340	40	5		495
20	680	80	10		990
24	816	96	12		1188
48	1632	192	24		2376
72	2448	288	36		3564
88	2992	352	44		4356

3.3. İstatiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 18.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği (Fisher's Exact Test) kullanıldı. Bu analizler sonucunda anlamlı çıkan sonuçlar için Odds Ratio değerleri verildi. Pandas olup olmamayı en çok etkileyen genleri saptamak ve düzeltilmiş Odds Ratio değerlerini elde etmek için Lojistik Regresyon kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmaya aldığımız hasta grupları, 4-12 yaşları arasında değişme olup hasta grubu 41(82 allel), kontrol grubu 38(76 allel) bireyden oluşmaktadır. Çalışmamızda hasta grubu içerisinde PANDAS olan erkek hasta sayısı 30, bayan hasta sayısı 11, kontrol grubu içerisinde erkek sayısı 16, bayan sayısı ise 22 kişiden oluşmaktadır. Çalışmamızda bulduğumuz hasta ve kontrol gruplarına ait HLA sonuçları tablo 10 ve 11’de verilmiştir.

Tablo 10. Hasta grubuna ait HLA sonucu

HASTA NO	HLA SINIF I						HLA SINIF II									
	A LOKUSU		B LOKUSU		C LOKUSU		DQB1 LOKUSU		DRB1 LOKUSU		DRB3 LOKUSU		DRB4 LOKUSU		DRB5 LOKUSU	
	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2
HASTA 1	2	24	15	44	1	16	3	4	8	11	2					
HASTA 2	2	24	51	51	2	14	3	6	11	15	2				1	
HASTA 3	2	68	35	44	4	5	2	3	3	11	2	2				
HASTA 4	3	68	35	38	4	12	3	3	11	11	2	2				
HASTA 5	26	30	15	56	1	7	5	6	13	14						
HASTA 6	11	33	44	51	5	14	3	3	4	11	2		1			
HASTA 7	2	11	18	51	7	15	3	3	8	11	1	1				
HASTA 8	23	26	15	51	3	15	3	5	11	14	2	2				
HASTA 9	3	26	49	50	6	7	3	5	7	11	2		1			
HASTA 10	1	2	15	57	6	12	5	6	15	16					2	1
HASTA 11	25	33	7	14	7	8	2	5	1	3	2					
HASTA 12	26	30	15	56	1	7	5	6	13	14	1	2				
HASTA 13	3	11	52	52	12	12	5	6	14	15	2				1	
HASTA 14	3	26	38	47	6	12	2	6	13	14	1	2				
HASTA 15	23	32	35	51	4	16	6	6	4	15			1			
HASTA 16	11	24	35	46	1	4	6	6	8	15	2				1	
HASTA 17	3	24	51	52	12	14	3	5	1	4			1			
HASTA 18	24	24	37	40	2	6	3	5	11	16	2				2	
HASTA 19	1	33	14	35	4	8	5	5	1	14	2					
HASTA 20	2	3	44	51	12	15	5	6	14	15	2				1	
HASTA 21	2	3	49	52	7	12	2	3	7	11	2		1			
HASTA 22	32	68	15	51	7	15	3	5	9	15			1			1

Tablo 10. Hasta grubuna ait HLA sonuçları(Devamı)

HASTA NO	HLA SINIF I						HLA SINIF II									
	A LOKUSU		BLOKUSU		C LOKUSU		DQB1 LOKUSU		DRB1 LOKUSU		DRB3 LOKUSU		DRB4 LOKUSU		DRB5 LOKUSU	
	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2
HASTA 23	2	3	35	51	4	15	3	5	11	11	2	2				
HASTA 24	1	33	38	55	3	12	6	6	8	15					1	
HASTA 25	3	32	38	44	5	12	5	6	14	15	2				2	
HASTA 26	3	3	7	8	7	7	2	5	3	16	2				2	
HASTA 27	3	29	41	51	16	17	3	3	4	11	2		1			
HASTA 28	2	24	13	58	3	6	2	3	7	11	2		2			
HASTA 29	2	2	18	51	7	15	3	5	11	14	2	2				
HASTA 30	1	24	38	51	7	12	3	3	15	15					1	1
HASTA 31	2	11	37	41	2	17	3	5	11	16	2				2	
HASTA 32	11	32	51	55	3	15	3	5	4	14	2		1			
HASTA 33	2	11	35	35	4	4	5	5	11	14			2	2		
HASTA 34	3	24	35	44	4	12	3	6	4	13						
HASTA 35	11	66	41	51	16	17	2	5	1	8	1	1				
HASTA 36	1	24	40	44	2	15	3	4	1	15					1	1
HASTA 37	2	69	44	55	1	2	6	6	11	15						
HASTA 38	2	2	41	45	16	17	2	2	1	1						
HASTA 39	2	33	14	51	5	7	5	5	7	15			1.0			1.0
HASTA 40	2	33	14	51	5	15	2	2	8	14						
HASTA 41	26	36	8	50	6	7	2	5	2	3	1	1				

Tablo 11. Kontrol grubuna ait HLA sonuçları

KONTROL NO	HLA SINIF I										HLA SINIF II									
	A LOKUSU		B LOKUSU		C LOKUSU		DQB1 LOKUSU		DRB1 LOKUSU		DRB3 LOKUSU		DRB4 LOKUSU		DRB5 LOKUSU					
	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2				
KONTROL 1	1	33	18	73	15	-	3	5	11	16	2				2					
KONTROL 2	1	29	8	55	1	7	2	5	3	14	2	2								
KONTROL 3	2	30	13	13	6	6	2	2	7	7			1	2						
KONTROL 4	1	24	18	38	12	12	3	-	11	11	2	2								
KONTROL 5	24	26	27	38	2	12	6	6	4	13	1									
KONTROL 6	24	33	13	14	6	8	2	5	1	7										
KONTROL 7	26	31	35	50	4	6	3		4	7										
KONTROL 8	1	2	15	18	7	12	3	4	4	4	1	2								
KONTROL 9	1	2	38	57	12	18	2	6	7	15					1					
KONTROL 10	24	29	8	49	7	7	2	2	3	7										
KONTROL 11	2	2	18	48	8	12	5		1	14	2	2								
KONTROL 12	2	2	35	35	4	4	2	2	3	3	1	2								
KONTROL 13	2	24	18	35	4	7	3	3	11	11	2	2								
KONTROL 14	1	3	15	39	4	7	3	6	11	13	1	3								
KONTROL 15	32	68	44	53	4	5	3	5	4	11	1	3								
KONTROL 16	33	33	51	52	6	12	2		11	15	2				1					
KONTROL 17	11	24	13	51	6	14	2	3	3	4	2				1					
KONTROL 18	30	69	49	53	4	7	3	5	10	11	1	2								
KONTROL 19	2	2	18	48	8	12	5		1	14	2	2								
KONTROL 20	2	24	18	51	12	14	3	3	4	12	2				1					
KONTROL 21	23	30	13	44	4	6	2	2	3	9	2				1					
KONTROL 22	24	26	27	38	2	12	3	6	4	13	1				1					
KONTROL 23	24	24	18	49	7	12	3	6	11	13	1	3								
KONTROL 24	2	33	18	40	8	12	3		4	11	2				1					
KONTROL 25	2	33	18	56	1	12	3	3	4	11	2				1					

Tablo 11. Kontrol grubuna ait HLA sonuçları (Devamı)

KONTROL NO	HLA SINIF I						HLA SINIF II											
	A LOKUSU		B LOKUSU		C LOKUSU		DQB1 LOKUSU		DRB1 LOKUSU		DRB3 LOKUSU		DRB4 LOKUSU		DRB5 LOKUSU			
	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2	AG1	AG2		
KONTROL 26	2	69	41	51	7	15	3	3	11	13	2	2						
KONTROL 27	2	11	40	51	4	15	3	6	4	15								
KONTROL 28	2		40	52	12	15	6		15	15					1	2		
KONTROL 29	24	24	40	48	8	15	2	3	4	7			1					
KONTROL 30	3	30	35	57	4	6	3	3	4	7								
KONTROL 31	2	23	44	49	7	7	2	3	7	11	2		1					
KONTROL 32	3	24	49	55	3	7	5	6	15	16				1		1		
KONTROL 33	3	24	35	50	4	6	2	3	3	11	1	2						
KONTROL 34	2	24	18	44	5	7	3	5	4	15			1					
KONTROL 35	1	1	41	41	17	17	2	5	1	3	2							
KONTROL 36	11	26	35	51	4		3	3	11	11	2	2						
KONTROL 37	1	33	18	73	12	15	3	5	11	16	2	2						
KONTROL 38	30	33	51	51	15	16	3	5	11	14	2	2						
KONTROL 26	2	69	41	51	7	15	3	3	11	13	2	2						
KONTROL 27	2	11	40	51	4	15	3	6	4	15								
KONTROL 28	2		40	52	12	15	6		15	15				1		2		
KONTROL 29	24	24	40	48	8	15	2	3	4	7			1					
KONTROL 30	3	30	35	57	4	6	3	3	4	7								
KONTROL 31	2	23	44	49	7	7	2	3	7	11	2		1					
KONTROL 32	3	24	49	55	3	7	5	6	15	16				1		1		
KONTROL 33	3	24	35	50	4	6	2	3	3	11	1	2						
KONTROL 34	2	24	18	44	5	7	3	5	4	15			1					
KONTROL 35	1	1	41	41	17	17	2	5	1	3	2							
KONTROL 36	11	26	35	51	4		3	3	11	11	2	2						
KONTROL 37	1	33	18	73	12	15	3	5	11	16	2	2						
KONTROL 38	30	33	51	51	15	16	3	5	11	14	2	2						

Çalışmamızda HLA-A lokusuna ait allellerin, PANDAS hastalığının ortaya çıkması arasında HLA-A3 arasında yakın anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur (Tablo 12).

Tablo 12. HLA- A lokusu istatistik değerleri

HLA-A LOKUSU	PANDAS n(%)	KONTROL n(%)	TOPLAM n(%)	P DEĞERİ	ANLAMLI İLİŞKİ
A1	5(12.2)	8(21.1)	13(16.5)	0.368	YOK
A2	16(39.0)	15(39.5)	31(39.2)	0.999	YOK
A3	11(26.8)	4(10.5)	15(19.0)	0.087	YAKIN ANLAMLI
A11	8(19.5)	3(7.9)	11(13.9)	0.196	YOK
A23	2(4.9)	2(5.3)	4(5.1)	0.999	YOK
A24	9(22.0)	13(34.2)	22(A 27.8)	0.315	YOK
A25	1(2.4)	0	1(1.3)	0.999	YOK
A26	6(14.6)	4(10.5)	10(12.7)	0.739	YOK
A29	1(2.4)	2(5.3)	3(3.8)	0.606	YOK
A30	2(4.9)	5(13.2)	7(8.9)	0.252	YOK
A31	0	1(2.6)	1(1.3)	0.481	YOK
A32	4(9.8)	1(2.6)	5(6.3)	0.361	YOK
A33	6(14.6)	7(18.4)	13(16.5)	0.765	YOK
A36	1(2.4)	0	1(1.3)	0.999	YOK
A66	1(2.4)	0	1(1.3)	0.999	YOK
A68	3(7.3)	1(2.6)	4(5.1)	0.616	YOK
A69	1(2.4)	2(5.3)	3(3.8)	0.606	YOK

HLA- B lokusunda yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz verilere göre HLA- B*18 allelinde çok anlamlı ve HLA- B*51 allelinde anlamlı bir pozitif bir ilişki bulunmuştur.

Yapılan univaryant analizinde HLA-B*18 alleli koruyucu olduğu için hasta olma olasılığını 9 kat azalttığı bulunmuştur (%95 Güven aralığı 1.86-43.48). Diğer açıdan baktığımızda ise bu allel genin PANDAS olma olasılığını yalnızca 0.11 kat arttırdığı bulunmuştur (% 95 güven aralığı 0.023- 0).

HLA- B*51 alleli, kişinin PANDAS olma olasılığını, HLA-B*51 gözlenmeyenlere göre 2.83 kat arttırdığı bulunmuştur (% 95 güven aralığı 1.01- 7.96)(Tablo 13).

Tablo 13. HLAB lokusu istatistik değerleri

HLA-B LOKUSU	PANDAS n(%)	KONTROL n(%)	TOPLAM n(%)	P DEğERİ	ANLAMLI İLİŞKİ
B*7	2(4.9)	0	2(2.5)	0.494	YOK
B*8	2(4.9)	2(5.3)	4(5.1)	0.999	YOK
B*13	1(2.4)	4(10.5)	5(6.3)	0.190	YOK
B*14	4(9.8)	1(2.6)	5(6.3)	0.361	YOK
B*15	6(14.6)	2(5.3)	8(10.1)	0.266	YOK
B*18	2(4.9)	12(31.6)	14(17.7)	0.003	VAR
B*27	0	2(5.3)	2(2.5)	0.228	YOK
B*35	8(19.5)	6(15.8)	14(17.7)	0.772	YOK
B*37	2(4.9)	0	2(2.5)	0.494	YOK
B*38	5(12.2)	4(10.5)	9(11.4)	0.999	YOK
B*39	0	1(2.6)	1(1.3)	0.481	YOK
B*40	2(4.9)	4(10.5)	6(7.6)	0.420	YOK
B*41	4(9.8)	2(5.3)	6(7.6)	0.676	YOK
B*44	8(19.5)	4(1.5)	12(15.2)	0.353	YOK
B*45	1(2.4)	0	1(1.3)	0.999	YOK
B*47	1(2.4)	0	1(1.3)	0.999	YOK
B*48	0	3(7.9)	3(3.8)	0.107	YOK
B*49	2(4.9)	5(13.2)	7(8.9)	0.252	YOK
B*50	2(4.9)	2(5.3)	4(5.1)	0.999	YOK
B*51	16(39.0)	7(18.4)	23(29.1)	0.051	VAR
B*52	3(7.3)	2(5.3)	5(6.3)	0.999	YOK
B*53	0	2(5.3)	2(2.5)	0.228	YOK
B*55	3(7.3)	2(5.3)	5(6.3)	0.999	YOK
B*56	2(4.9)	1(2.6)	3(3.8)	0.999	YOK
B*57	1(2.4)	2(5.3)	3(3.8)	0.606	YOK
B*58	1(2.4)	0	1(1.3)	0.999	YOK
B*73	0	2(5.3)	2(2.5)	0.228	YOK

Çalışmamızda HLA-C lokusunda herhangi bir anlamlı allel bulunamamıştır (tablo 14).

Tablo 14. HLA C lokusu istatistik değerleri

HLA-C LOKUSU	PANDAS n(%)	KONTROL n(%)	TOPLAM n(%)	P DEğERİ	ANLAMLI İLİŞKİ
C*1	5(12.2)	2(5.3)	7(8.9)	0.434	YOK
C*2	4(9.8)	2(5.3)	6(7.6)	0.676	YOK
C*3	4(9.8)	1(2.6)	5(6.3)	0.361	YOK
C*4	8(19.5)	11(28.9)	19(24.1)	0.431	YOK
C*5	5(12.2)	2(5.3)	7(8.9)	0.434	YOK
C*6	6(14.6)	8(21.1)	14(17.7)	0.560	YOK
C*7	12(29.3)	11(28.9)	23(29.1)	0.999	YOK
C*8	2(4.9)	5(13.2)	7(8.9)	0.252	YOK
C*12	11(26.8)	14(36.8)	25(31.6)	0.468	YOK
C*14	3(7.3)	2(5.3)	5(6.3)	0.999	YOK
C*15	9(22.0)	7(43.8)	16(20.3)	0.783	YOK
C*16	5(12.2)	1(2.6)	6(7.6)	0.203	YOK
C*17	4(9.8)	1(2.6)	5(6.3)	0.361	YOK
C*18	0	1(2.6)	1(1.3)	0.481	YOK

İstatistiğimizde HLA- DQB1 lokusunda HLA- DQB1*5 alleli ile PANDAS hastalığı arasında yakın anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur. Yapmış olduğumuz univaryant analizinde ise HLA- DQB1*5 alleli PANDAS olma olasılığını 2.51 kat arttırdığı bulunmuştur (%95 Güven aralığı 1.001- 6.289) (Tablo 15).

Tablo 15. HLA- DQB1*lokusu istatistik değerleri

HLA-DQB1 LOKUSU	PANDAS n(%)	KONTROL n(%)	TOPLAM n(%)	P DEğERİ	ANLAMLI İLİŞKİ
DQB1*2	10(24.4)	12(31.6)	22(27.8)	0.616	YOK
DQB1*3	21(51.2)	24(63.2)	45(57.0)	0.364	YOK
DQB1*4	2(4.9)	1(2.6)	3(3.8)	0.999	YOK
DQB1*5	22(53.7)	12(31.6)	34(43.0)	0.069	YAKIN ANLAMLI
DQB1*6	13(31.7)	8(21.1)	21(26.6)	0.318	YOK

Çalışmamızda HLA- DRB1 lokusunda, HLA- DRB1*4 alleli ile PANDAS olup olmama olasılığı arasında yakın anlamlı, HLA- DRB1*8 ve HLA-DRB1*14 allelleri ile PANDAS olma olasılığı arasında çok anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur.

Univaryant analizinde HLA- DRB1*4 koruyucu etki göstermekte ve hasta olma olasılığını HLA- DRB1*4 bulunmayan bireylere göre 3.03 kat azalttığı(%95 güven aralığı 1.01-9.09), bunun yanı sıra HLA- DRB1*8 bulunan bireylerin PANDAS olma olasılığı olduğu bulunmuştur. HLA-DRB1*14 alleli kişinin PANDAS olma riskini bu alleli taşımayanlara göre 3.52 kat arttırdığı bulunmuştur (%95 güven aralığı 1.02- 12.10) (Tablo 16).

Tablo 16. HLA- DRB1 lokusu istatistik değerleri

HLA-DRB1 LOKUSU	PANDAS n(%)	KONTROL n(%)	TOPLAM n(%)	P DEĞERİ	ANLAMLI İLİŞKİ
DRB1*1	6(14.6)	4(10.5)	10(12.7)	0.739	YOK
DRB1*2	1(2.4)	0	1(1.3)	0.999	YOK
DRB1*3	4(9.8)	6(15.8)	10(12.7)	0.509	YOK
DRB1*4	6(14.6)	13(34.2)	19(24.1)	0.064	YAKIN ANLAMLI
DRB1*7	4(9.8)	8(21.1)	12(15.2)	0.215	YOK
DRB1*8	6(14.6)	0	6(7.6)	0.026	VAR
DRB1*9	1(2.4)	1(2.6)	2(2.5)	0.999	YOK
DRB1*10	0	1(2.6)	1(1.3)	0.481	YOK
DRB1*11	17(41.5)	16(42.1)	33(41.8)	0.999	YOK
DRB1*12	0	1(2.6)	1(1.3)	0.481	YOK
DRB1*13	4(9.8)	5(13.2)	9(11.4)	0.731	YOK
DRB1*14	12(29.3)	4(10.5)	16(20.3)	0.051	VAR
DRB1*15	13(31.7)	6(15.8)	19(24.1)	0.119	YOK
DRB1*16	4(9.8)	3(7.9)	7(8.9)	0.999	YOK

Çalışmamız sonucunda HLA- DRB3, -DRB4, -DRB5 lokuslarında istatistiksel analiz yönünden PANDAS olup olmama olasılığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 17,18,19).

Tablo 17. HLA- DRB3 lokusu istatistik değerleri

HLA-DRB3 LOKUSU	PANDAS n(%)	KONTROL n(%)	TOPLAM n(%)	P DEğERİ	ANLAMLI İLİŞKİ
DRB3*1	7(20.0)	6(25.0)	13(22.5)	0.999	YOK
DRB3*2	27(77.14)	31(88.57.0)	58(82.85)	0.738	YOK
DRB3*3	1(2.8)	3(8.5)	4(6.8)	0.676	YOK

TABLO 18. HLA- DRB4 lokusu istatistik değerleri

HLA-DRB4 LOKUSU	PANDAS n(%)	KONTROL n(%)	TOPLAM n(%)	P DEğERİ	ANLAMLI İLİŞKİ
DRB4*1	8(80.0)	12(100)	20(90.0)	0.195	YOK
DRB4*2	2(20.0)	0	2(10.0)	0.738	YOK

Tablo 19. HLA- DRB5 lokusu istatistik değerleri

HLA-DRB5 LOKUSU	PANDAS n(%)	KONTROL n(%)	TOPLAM n(%)	P DEğERİ	ANLAMLI İLİŞKİ
DRB5*1	8(66.7)	5(83.3)	13(78.15))	0.738	YOK
DRB5*2	4(33.3)	1(16.7)	5(25.0)	0.738	YOK

Çalışmamızda multivaryant analizi sonucunda HLA B*18 ve HLA- DRB1*14 allellerinin, kişilerin PANDAS olup olmamasının saptanması rolü üzerinde en etkin 2 gen olduğu belirlenmiştir. İki genin bilgisiyle hastaların %65'i doğru olarak sınıflandırılabilir. Buna göre bu 2 genin ortak değerlendirilmesi sonucunda HLA-B*18 varlığı bireyin sağlıklı çıkması olasılığını, HLA-B*18 olmayanlara göre 11.424 kat arttırdığı bulunmuştur (%95 güven aralığı 2.10- 62.25).

HLA- DRB1*14 varlığı kişinin hasta olma olasılığını olmayanlara göre 4.77 kat arttırdığı (%95 güven aralığı 1.14- 19.99) saptanmıştır.

Univaryant analizde anlamlı bulunan diğer genler, multivaryant analizde bu iki genden daha çok etkili olmadıkları için anlamlı bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bağışıklık sisteminin önemli bir elemanı olan MHC sistemi, insan ve diğer memeli genomlarının en polimorfik lokuslarını temsil etmenin yanında, bireyin bazı hastalıklara karşı dirençli yada zayıf yapıda olması gibi özelliklerin de belirleyicisi olması, son zamanlarda yapılan hastalık genotip ilişkilendirilmesinde ön plana çıkmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemini direk ilgilendiren otoimmünite, enfeksiyon gibi immün cevaba bağlı hastalıkların gelişiminde MHC sisteminin antijen sunumundaki rolünden ve immün sistemin hangi koordinasyonla ve kombinasyon ile cevap oluşturmasındaki rolünden dolayı daha da öncelikli duruma gelmektedir.

HLA antijenleri ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda yayın vardır. Bu tür çalışmalar, hastalık riskleri ve koruyucu faktörleri saptamak, tedavileri planlayabilmek amaçlarıyla yapılmaktadır. Otoimmün hastalıkların çoğunun HLA ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir, yani belli hastalıklar belli allelleri taşıyan bireylerde daha sık görülür³⁰.

Yaptığımız literatür çalışmalarında PANDAS hastalığı ile HLA haplotipleri arasında bir çalışma yapılmamıştır.

Adından da anlaşılacağı üzere hem otoimmünite hem de enfeksiyon hastalıklarına bağlı olarak ortaya çıktığı tespit edilmiş olan PANDAS hastalarında, yapmış olduğumuz HLA haplotip çalışmasında şu önemli özellikleri ve sonuçları saptadık:

Çalışmamızda Ki-Kare metoduyla analiz edilen HLAA lokusunda HLA-A-3 alleli ile PANDAS hastalığının ortaya çıkması arasında, pozitif bir ilişki saptanmıştır. HLA-A3 alleli PANDAS'lı hasta grubunda %26.8 oranında bulunurken kontrol grubunda bu oran %10.5 olarak saptanmıştır (Tablo11). HLA-A3 allelinin, Asetilkolin reseptörlerine karşı antikor gelişimi ile karakterize olan Myastenia gravis hastalığı⁶⁵ ile HIV enfeksiyonlarına da duyarlılığı arttırdığı⁶⁶ yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Buradan da anlaşılacağı üzere istatistiki olarak bulduğumuz anlamlı ilişkinin PANDAS hastalığı için de geçerli olabileceğini önermekteyiz. Örnek olarak Finlandiya, Yeni Zelanda, Avustralya gibi kapalı populasyonlarda bu allelin yüksek frekansta olduğunu gördüğümüz için, gen göçleri bakımından kavşak noktası diyebileceğimiz bir coğrafyada bulunan ülkemizin,

kapalı popülasyon olmaması da bu allelin PANDAS'a yatkınlık oluşturduğunu ileri sürmemiz için bir dayanak oluşturmaktadır. HLA-A3 allelinin diğer bir özelliği de otoimmünite ile ilgili olan ve en az diğerleri kadar önemli olan Multiple Sclerозis hastalığına yatkınlıkta indikatör olmasıdır⁶⁷.

MHC sisteminin sınıf I bölgesinde en polimorfik lokus olan HLA-B lokusunda⁶⁸, Ki-Kare metoduyla analiz edilen hasta grubunda %4.9 oranında, kontrol grubunda %31.6 oranında tespit edilmiş olan HLA- B*18 allelinin, koruyucu gen olarak görev yaptığını yorumlamamıza olanak sağlayan sonuçlar elde edildi. Univaryant analizi ile HLA-B*18 allelinin, hasta olma olasılığını 9 kat azalttığı, multivaryant analizinde ise bu allelin varlığı, bireyin sağlıklı olma olasılığını HLA-B*18 alleli olmayanlara nispeten 11.424 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Tablo 13). Elde edilen istatistiksel veriler doğrultusunda; HLA-B*18 allelinin hasta olma olasılığını azalttığını saptadık. Ancak bununla birlikte tüm dünya coğrafyasını kapsayan Hap-Map projesi bünyesinde yapılan çalışma doğrultusunda bize nispeten coğrafik konumu itibari ile yakın olan İtalya popülasyonunda (%16.7), Bulgar popülasyonunda (%9.1), Romanya popülasyonunda (%11.3) gibi bir frekansa sahip olması da dikkat çekicidir. Çünkü bu HLA-B*18 alleli gerçekte popülasyonda görülme sıklığı bakımından komşu ülkelerde olduğu gibi yüksek frekansta olduğu için mi yoksa hasta olan bireylerde yatkınlık oluşturacak şekilde mi görülmektedir?

HLA-B*51 allelinde, Ki-Kare metoduyla yaptığımız analiz sonucu anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmekle birlikte bu allelin varlığı ile bireyin hasta olma olasılığını HLA-B*51 alleli taşımayan bireylere göre 2.83 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Tablo 12). Bu alleli taşıyanların taşımayanlara nazaran PANDAS hastalığına bir yatkınlık oluşturabileceğini söylemekle birlikte bu allelin akraba olmayan bireyler arasındaki kemik iliği nakillerinde meydana gelen doku reddi reaksiyonlarında HLA-B*51 tek başından ziyade HLA-C lokusu ile birlikte tetiklediği gösterilmiştir⁷⁰.

HLA- B*51 allelinin, Behçet ve diğer otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasında tek başına etken olduğu da bilinmekte olup, daha çok Güney Amerika ve Asya uzak doğu kökenli popülasyonlarda bu allelin yüksek frekansta bulunduğu unutulmamalıdır⁷¹. Ayrıca Alman popülasyonu ile yapılan bir çalışmada bu alleli taşıyan bireylerin, Alman kızamık hastalığına neden olan virüslere karşı da hassas olduğu saptanmıştır⁷².

HLA-DQB1 lokusunda HLA-DQB1*5 alleli ile PANDAS hastalığı arasında sınırdan anlamlı bir ilişki olduğunu, yaptığımız istatistiksel analiz ile saptadık. PANDAS'lı hasta grubunda HLA-DQB1*5 alleli %53.7 oranında bulunurken, kontrol grubunda ise % 31.6 oranında olduğu bulunmuştur. Univaryant analizi sonucunda, HLA-DQB1*5 allelini taşıyan bireylerin, taşımayanlara nazaran 2.51 kat daha fazla oranda PANDAS'a yatkınlığı tespit edilmiştir (Tablo 15). Bu allelin daha çok Adrenal Yetmezlik ile ilişkili olarak ortaya çıkan Addison hastalığı⁷³ ve Nefrotik sendrom⁷⁴ ile negatif ilişkisi olduğu saptanmış olmakla birlikte daha çok Çin topluluğunu oluşturan milletlerde İntrakranial Anevrizma⁷⁵ ve Guillian Barre sendromuyla⁷⁶ da pozitif bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir.

HLA-DRB1 lokusunda yaptığımız istatistiksel analizde sınırdan anlamlı ilişki saptadığımız HLA-DRB1*4,-DRB1*8 ve HLA-DRB1*14 allellerinin PANDAS hastalığıyla ilişki gösterdiği saptanmıştır. HLA-DRB1*4 alleli, hastalığa karşı koruyucu etki göstermekte ve PANDAS'lı hasta grubunda bu allel % 14.6 oranında bulunurken kontrol grubunda % 34.2 oranında bulunmaktadır (Tablo 16)

Yapmış olduğumuz univaryant analizinde ise bu allelin sağlıklı bireylerdeki varlığı, allelin olmadığı bireylere nazaran hasta olma olasılığını 3.03 kat azalttığı tespit edilmiştir. Ancak literatür çalışmasında erkek bireylerde bu allelin daha yüksek frekansta olduğunu saptamamız nedeniyle, çalışmamızdaki kontrol ve PANDAS hasta grubundaki cinsiyet dağılımının homojen dan kaynaklandığını düşünmekteyiz⁷⁷.

HLA-DRB1*4 alleli ile *E. Coli* ve Epstein-Barr virüsüne ait çeşitli moleküller arasında özellikle HLA'nın antijen bağlama bölgelerine uyan aminoasit dizi benzerlikleri gösterilmiştir. Bu dizileri taşıyan sentetik peptidlere karşı da spondilartropati ve romatoid artritli hastalarda immün yanıt saptanmıştır. Bu bulgular, moleküler benzerlik kuramı (moleküler mimikri) bakımından önemlidir⁷⁸.

HLA-DRB1*8 allelinin kontrol grubunda hiç saptanmamasına karşılık PANDAS'lı hastalarda % 14.6 oranında bulunması, bu allelin önemli bir indikatör olabileceğini düşündürmektedir.

HLA-DRB1*14 allelini taşıyan bireylerin, taşımayanlara göre PANDAS olma olasılığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Hasta olan grupta bu allel % 29.3 oranında bulunurken kontrol grubunda bu oran % 10.5'tir. Univaryant analizinde, HLA-DRB1*14

alleli taşıyan bireylerin PANDAS olma riskinin bu alleleli taşımayanlara göre 3.52 kat arttırdığı tespit edilmiştir.

HLA-DRB1*14 alleli ile hücrel immünitenin önemli bir kısmını oluşturan anormal T hücre düzenlenmesi (otoimmünite) arasında doğrusal bir ilişki bulunmasının yanı sıra Sarkodiazis gibi paraziter hastalıklarla da kuvvetli bir ilişkisi gösterilmiştir⁷⁹.

Çalışmamızda HLA-DRB3, -DRB4, -DRB5 lokuslarının, yaptığımız istatistiksel analizlerde PANDAS'lı hastalar ve kontrol grubuyla bir ilişki tespit edilememiştir (Tablo 17,18,19).

Yaptığımız multivaryant analizi sonucunda HLA-B*18 ve HLA-DRB1*14 allellerinin, bireylerin PANDAS olup olmamasının rolü üzerinde en etkin 2 allel olduğu saptanmıştır. PANDA's hastalığında sadece bu iki allele bakarak elde edilecek bilgi doğrultusunda hastaların % 65'nin doğru şekilde tanımlanmasının mümkün olabileceğini saptadık. Buna göre bu 2 allelin ortak değerlendirilmesi sonucunda HLA-B*18 alleli varlığı bireyin sağlıklı çıkma olasılığını, bu alleli taşımayan bireylere göre 11.424 kat arttırdığı (%95 güven aralığı 2.10- 62.25) tespit edilmiştir.

HLA-DRB1*14 allelini taşıyan bireylerin hasta olma olasılığını bu alleli taşımayan bireylere nazaran hastalık olma riskini 4.77 kat arttırdığı % 95 güven aralığı 1.14- 19.99 ile saptanmıştır. Univaryant analizde anlamlı bulunan diğer genler, multivaryant analizde bu iki genden daha çok etkili olmadıkları için anlamlı olmadıkları şeklinde değerlendirilmiştir

Bağışıklık cevabının düzenlenmesi ile etkenlere karşı aşırı hassasiyet ve direnç gelişiminde etkili olan MHC sistemini oluşturan gen lokuslarının ve haplotip kalıplarının değişik seçim baskıları altında olduğunu, bu konuda yapılan çalışmalarda görebiliyoruz⁸⁰. Bu nedenle belirli allellerin veya haplotiplerin belirli populasyonlarda yüksek frekansta olmasının bireye kazandırdığı avantajlar kadar, şansa bağlı genetik sürüklenmeyle, göç hareketleriyle (populasyon içine veya dışına) ilişkili olabilceğinin yanı sıra, MHC sistemi içerisinde yer alan tek tek genlerin bir aradaki uyumunda da önemli olduğunu göz önünde bulundurmamız gerektiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; PANDAS hastalığı ile MHC haplotip ilişkisi bakımından; HLA-B*18, HLA-DRB1*8, HLA- B*51, HLA- DRB1*14, HLA- DRB1*4 ve HLA-DQB1*5 ve HLA-A3 allellerinin PANDAS hastalığı ile çok önemli ilişki gösterdiğini saptamış olup,

bunlardan özellikle, HLA-DRB1*8 allelinin kontrol grubunda olmaması nedeniyle çok önemli bir indikatör olabileceğini önermekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Erişim: <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/cocukruh/pandas.htm> E.T. : 16.9.2009
2. **Salman N, Öngen B, Uzel N.** Çocuklarda ,steptococcus Pyogenes İnfeksiyonları. İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çapa, İSTANBUL. ANKEM Derg **2004**; 18 (Ek 2):42-44
3. **Asbahr FR, Negrao AB, Gentil V, Zanetta DMT, da Paz JA, Marques-Dias MJ, Kiss MH.** Obsessive-compulsive and related symptoms in children and adolescent with rheumatic fever with and without chorea: A prospective 6- month study. Am J Psychiatry 155: 1122-1124.
4. **Ekici N.** Atopik Dermatitli Olgularda HLA Antijenlerinin Dağılımı Trakya Üniversitesi. **2000**. EDİRNE,Yüksek Lisans Tezi.
5. **Yakut T.** HLA Doku Uygunluk Kompleksi, Genetik Lokalizasyonları ve Fonksiyonları. Uludağ Üniversitesi tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD. Güncel Pediatri **2004**;2: 53-57.
6. **Onatoğlu D.** Pandas'lı Hastalarda TNF- α Gen Polimorfizmi. Yüksek Lisans Tezi **2008**. ADANA.
7. **Swedo SE, Leonard HL** Childhood movement disorders and obsessive-compulsive disorder. J Clin Psychiatry, (1994a) 55 (Suppl. 3): 33-37
8. **Gımsal A, Topçuoğlu V, Yazgan Y.** Akut Romatizmal Ateş, Sydenham Koresi ve Psikopatoloji. Türk Psikiyatri Dergisi, **2002**; 13(2): 137-141.
9. **Salman N.** Çocuklarda Stretokokkus pyogenes İnfeksiyonları. Aknem dergi, **2004**; 18 (Ek 2): 41-53
10. **AKPINAR A.** Ergenlik Döneminde Obsesif Kompulsif Bozukluğun Yaygınlığı. Uzmanlık Tezi. İSTANBUL, **2007**
11. **Öner P, Aysev A.** Çocuk ve Ergenlerde Obsesif Kompulsif Bozukluk. Sted **2001** cilt 10 sayı 11-409

12. **American Psychiatric Association:** Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4.ed rev. Washington DC, American Psychiatric Association, **2000**
13. **Bottas A, Richter MA:** Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections (PANDAS), *Pediatr Infect Dis J*, **2002**;21 : 67.
14. **Leckman JF, Dolnansky ES, Hardin MT.** Perinatal factors in the expression of Tourette's syndrome: an exploratory study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **1990**; 29; 220- 226.
15. **EŞEL E.** Obsesif Kompulsif Bozukluğun Biyolojisi Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı, Kayseri Klinik Psikiyatri**2000**;3:46-55
16. **Lucey JV, Costa DC, Adshead G et al.** Brain blood flow in anxiety disorders. OCD, panic disorder with agoraphobia, and post-traumatic stress disorder on 99mTc HMPAO single photon emission tomography (SPECT). *Br J Psychiatry*, 171: 346-350. (**1997**)
17. **Bayraktar E, Kala Y.** Obsesif - Kompulsif Bozukluğun Etyopatogenezinde Yeni Bir Boyut: PANDAS Klinik Psikofarmakoloji Bülteni **2000**;10:144-152.
18. **Swedo SE, Leonard HL, Garvey M, Mittleman B, Allen AJ, Perlmutter S et al.** Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *Am J Psychiatry* **1998**; 155(2):264-71
19. Erişim: <http://www.cocukenfeksiyon.org/sayilar/14/149.pdf>. Erişim Tarihi: 10.11.2009.
20. **Heubi C, Shott SR.** PANDAS: pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections-an uncommon, but important indication for tonsillectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, **2003**;67(8):837-40.
21. **Bektaş D, Çaylan R.** Streptokok İnfeksiyonu Sonucu Gelişen Pediatrik Otoimmün Nöropsikiyatrik Hastalıklar (PANDAS). *Türkiye Klinikleri, JENT*. **2004**;4:120-124.
22. **Pavone P, Parono F, Rizzo R, Trifiletti RR.** Autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: Sydenham chorea, PANDAS and PANDAS variants. *J. Child. Neuron*, **2006**, 21 (9): 727-36

23. **Aktaş F.** Post İnfeksiyöz Sekeller ve Sendromlar. Gazi Ünivrsitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. Klimik XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi ,2007 syf: 1-3.
24. **Morer A, Lazano L, Sabater L, Masansa J, Castro J, Graus F.** Antineuronal antibodiesin a grup of children with obsessive- compulsive disorder and tourette syndrome. J. Psychiatr Res, **2008**, 42 (1): 64-8.
25. **Dinn WM, Haris CL, McGonial KM, Raynard RC.** Obsesive- compulsive disorder and immunocompotence. Int. J. Psychiatry med, **2001**; 31 (3): 311-310
26. **Beşiroğlu L, Ağargün M.Y, Özbebit T Ö, Sözen M, Dilek İ, Güleç M.** Streptokok Enfeksiyonu ile İlişkili OKB ve Tik Bozukluğu Olan Dört Olguda Plazmaferez Tedavisine Yanıt Türk Psikiyatri Dergisi, **2007**; 18(3): 270-276
27. **Aydın A, Kırpınar İ.** Atatürk Üniv. Tıp Fak. Psikiyatri AD, Erzurum Güncel Psikiyatri Yazıları; **2001**; 1:5-62
28. **Kara A.** Tonsillofarenjit. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara, Çocuk Enf Derg **2009**; 3 (Özel Sayı 1): 25-34
29. **Davla K.** Nedir Bu HLA Tiplendirimi Ulusal Hematoloji Kongresi. IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu,2004
30. **Lüleyap Ü.** Moleküler Genetiğin Esasları, 1.Baskı.Adana.Nobel Kitabevi, **2008**.
31. **Gülmezoğlu E, Ergüven S,** Doku Uygunluk Antijenleri. İmmünoloji. Ankara. Hacettepe-Taş Kitapçılık, **1994**; 29-39.
32. **Kuby J.** Major histocompatibility complex. Immunology. 3th ed. New York: Van Hoffman Press; **1997**, p.223-48.
35. **Bender K.** Immunogenetics. Experientia, **1986**;42:1138-47.
34. **Lobo PI, Spencer CE, Isaacs RB, McCullough C.** Hyperacute renal allograft rejection from anti-HLA Smif 1 antibody to B cells--antibody detection by two color FCXM was possible only after using pronase-digested donor lymphocytes. Transpl Int **1997**; 10:69-73.

35. **Ikuta Y, Katayama N, Wang L, Okugawa T, Takahashi Y, Schmitt M, Gu X, Watanabe M, Akiyoshi K, Nakamura H, Kuribayashi K, Sunamoto J, Shiku H.** Presentation of a major histocompatibility complex SınıfI-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide-truncated HER2 protein complex: implications for a polyvalent immuno-cell therapy. *Blood* **2002**; 99: 3717-24
36. **Bodmer WF, Albert ED, Bodmer JG.** Nomenclature for actors of HLA system. *Tissue Antigens* **1984**;24:73-80.
37. **Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, et al.** Nomenclature for factors of the HLA, system, 1998. *Tissue Antigens* **1999**;53(4 Pt 2):407-6.
38. **Akçam F.** HLA Sistemi Derleme Enfeksiyon hastalıkları AD, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, ISPARTA. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* **2005**, 25:829-834
39. **Schwartz BD.** The human major histocompatibility HLA complex. In: Stites DP, Stobo JD, Wells JV, eds. *Basic and Clinical Immunology*. 6th ed. California: Appleton and Lange; **1987**. p.50-64.
40. **Kudva YC, Deng YJ, Govindarajan R, Abraham RS, Marietta EV, Notkins AL, David CS.** HLA-DQ8 transgenic and NOD mice recognize different epitopes within the cytoplasmic region of the tyrosine phosphatase-like molecule, IA-2. *Hum Immunol* **2001**; 62: 1099-105.
41. **Weber DA, Dao CT, Jun J, Wigal JL, Jensen PE.** Transmembrane domain-mediated colocalization of HLA-DM and HLA-DR is required for optimal HLA-DM catalytic activity. *J Immunol* **2001**; 167: 5167-74.
42. **Roitt IM, Jonathan B, Davis MK.** *Immunology*, London, UK, **1993**.
43. **Matsuzaka Y, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Bahram S, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H.** New polymorphic microsatellite markers in the human MHC SınıfIII region. *Tissue Antigens* **2001**; 57: 397-404.
44. **Milner CM, Campbell RD.** Genetic organization of the human MHC SınıfIII region. *Front Biosci* **2001**; 6 : 914-26.

45. **Abbas AK, Lichtman JS.** Cellular and molecular immunology. W.B.Saunders, USA. 2nd. edition, **1994**; p: 102-14.
46. **Kostyu DD, Hannick LI, Traweck JL, Ghanayem M, Heilpern D, Dawson DV.** HLA Sınıfı polymorphism: structure and function and still questions. *Hum Immunol* **1997**; 571: 1-18.
47. **Oguz FS, Çarın M.** MHC genlerinin organizasyonu. *Sendom* 1999;11:126-7.
48. **Klein J, Sato A.** The HLA System— First of Two Parts. *N Engl J Med* **2000**; 343(10):702-709, 2000
49. **Morimoto Y, Toyota M, Satoh A, Murai M, Mita H, Suzuki H, Takamura Y, Ikeda H, Ishida T, Sato N, Tokino T, Imai K.** Inactivation of SınıfII transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon-gamma in haematopoietic tumour cells. *Br J Cancer* **2004**; 90:844-52.
50. **Dzuris JL, Sidney J, Horton H, Correa R, Carter D, Chesnut RW, Watkins DI, Sette A.** Molecular determinants of peptide binding to two common rhesus macaque major histocompatibility complex SınıfII molecules. *J Virol* **2001**; 75: 10958-68.
51. **Glimcher LH, Kara CJ.** Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol* **1992**; 10:13- 49.
52. **Bixby DL, Yannelli JR.** CD80 expression in an HLA-A2-positive human non-small cell lung cancer cell line enhances tumor-specific cytotoxicity of HLA-A2-positive T cells derived from a normal donor and a patient with non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* **1998**; 78:685-94.
53. **McMichael A, Bowness P.** HLA-B27: natural function and pathogenic role in spondyloarthritis. *Arthritis Res* **2002**; Suppl 3: p153-8.
54. **Fujiwara H, El Ouriaghli F, Grube M, Price DA, Rezvani K, Gostick E, Sconocchia G, Melenhorst J, Hensel N, Douek DC, Barrett AJ.** Identification and in vitro expansion of CD4+ and CD8+ T cells specific for human neutrophil elastase. *Blood* **2004**; 103: 3076-83.
55. **Cai J, Lee J, Jankowsk A Gan E, Derks R, Pool J, Mutis T, Goulmy E, Burlingham WJ.** Minor H Antigen HA-1-specific Regulator and Effector CD8+ T Cells, and HA-1 Microchimerism, in Allograft Tolerance. *J Exp Med* **2004**; 199:1017- 23.

56. **Bixby DL, Yannelli JR.** CD80 expression in an HLA-A2-positive human non-small cell lung cancer cell line enhances tumor-specific cytotoxicity of HLA-A2-positive T cells derived from a normal donor and a patient with non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* **1998**; 78:685-94.
57. **Dissanayake SK, Thompson JA, Bosch JJ, Clements VK, Chen PW, Ksander BR, Ostrand-Rosenberg S.** Activation of tumor-specific CD4(+) T lymphocytes by major histocompatibility complex class II tumor cell vaccines: a novel cell-based immunotherapy. *Cancer Res* **2004**; 64:1867-74.
58. **Marsh Steven G.E, Parham Peter, Barber Linda D. :** The HLA Facts Book.
59. **Dick HM.** HLA and disease. *Br Med Bull* **1978**;34:271-4.
60. **YÜCEL A, YÜCEL A.E, İMİR T.** HLA Yapısı ve Hastalıklarla ilişkisi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, İmmünoloji Bölümü, ANKARA Romatoloji Bülteni **1995**;3(1): 3-8.
61. **Cavalli-Sforza, L.L, P. Menozzi, A.Piazza (1994).** The History and Geography of Human Genes, Princeton University Press
62. **Thomson, G.(1981).** A review of theoretical aspects of HLA and disease association. *Theoretical Population Biology*, 20, 168-208
63. **Zachary, A.A. (1995).** Statistical analysis of genetic data, *ASHI Quarterly*, 4-7
64. **Devrim A.K, Kaya N.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kars- TÜRKİYE. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* **2004**, 10(2): 209-214.
65. **Machens A, Löliger C, Pichlmeier U, Emskötter T, Busch C, Izbicki J (1999).** "Correlation of thymic pathology with HLA in myasthenia gravis.". *Clin Immunol* 91 (3): 296–301.
66. **Allen TM, Altfeld M, Yu XG, et al. (July 2004).** "Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection". *J. Virol.* **78** (13): 7069–78.
67. **Fogdell-Hahn A, Ligers A, Grønning M, Hillert J, Olerup O (2000).** "Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease.". *Tissue Antigens* 55 (2): 140–8.

68. **Gomez-Casado,E. , Vargas-Alarcón,G. , Martinez-Laso,J. , Granados,J. , Varela,P. , Alegre,R. , Longás,J. , González-Hevilla,M. , Martín-Villa,J.M. , Arnaiz-Villena,A.**Evolutionary relationships between HLA-B alleles as indicated by an analysis of intron sequences. *Tissue Antigens* 1999, 53 (2):153-60
69. **Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. (2005).** "Nomenclature for factors of the HLA system, 2004". *Tissue Antigens* 65 (4): 301–69.
70. **Bettens¹; Nicoloso de Faveri²; Tiercy.** HLA-B*51 and haplotypic diversity of B*CW associations: implications for matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation Volume 73, Number 4, April 2009 , pp. 316-325(10)
71. **Durrani K, Papaliadis GN (2008).** "The genetics of Adamantiades-Behcet's disease". *Semin Ophthalmol* 23 (1): 73–9.
72. **Ishii K, Nakazono N, Sawada H, et al. (1981).** "Host factors and susceptibility to rubella virus infection: the association of HLA antigens". *J. Med. Virol.* 7 (4): 287–97.
73. **Myhre AG, Undlien DE, Løvås K, et al. (2002).** "Autoimmune adrenocortical failure in Norway autoantibodies and human leukocyte antigen class II associations related to clinical features". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2): 618–23.
74. **Krasowska-Kwiecień A, Sancewicz-Pach K, Moczulska A (2006).** "Idiopathic nephrotic syndrome in Polish children - its variants and associations with HLA". *Pediatr. Nephrol.* 21 (12): 1837–46.
75. **Wang JF, Zhang D, Zhao JZ, Jia BX, Bi RM (2006).** "A study on the relationship between HLA-DR, DQ antigen, and intracranial aneurysm in the Han nationality". *Surgical neurology* 66 Suppl 1: S25–8; discussion S28–9.
76. **Guo L, Wang W, Li C, Liu R, Wang G (2002).** "[The association between HLA typing and different subtypes of Guillain Barré syndrome]" (in Chinese). *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 41 (6): 381–3.
77. **Tevfik Dorak^a, Fatma S. Oguz^b, Nevin Yalman^c, A. Sarper Diler^b, Sevgi Kalayoglu^d, Sema Anak^e, Deniz Sargin^d and Mahmut Carin.** A male-specific increase in the HLA-DRB4 (DR53) frequency in high-risk and relapsed childhood ALL M. *Leukemia Research*, Volume 26, Issue 7, 2002, Pages 651-656.

78. **Aydın A, Kırpınar İ.** HLA-DRB1*4 allellerini taşıyanlarda tip 1 diyabet görülme riski 20 kez daha yüksektir. Atatürk Üniv. Tıp Fak. Psikiyatri AD, Erzurum . Güncel Psikiyatri Yazıları; **2001**; 1:5-62
79. **Jörg J. Goronzy, James W. Fulbright, Cynthia S. Crowson, Gregory A. Poland, William M. O'Fallon, and Cornelia M. Weyand.** Minnesota Value of Immunological Markers in Predicting Responsiveness to Influenza Vaccination in Elderly Individuals. Departments of Medicine and Biostatistics, Mayo Clinic, Rochester, Journal of Virology, **December 2001**, p. 12182-12187, Vol. 75, No. 24
80. **Traherne A.** Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. Journal compilation © **2008** Blackwell Publishing Ltd, International Journal of Immunogenetics 35, 179–192
81. **Şahin F, Çiftçi M, Pirim İ:** Polimeraz zincir Reaksiyonu (PCR). II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kurs Notları. A.Ü. Bioteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi. **2000**
82. **McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR:** PCR 2: A Practical Approach. 7- 118, Oxford University Pres, Oxford- **1995**
83. **Kaufman J, Birmaher B, Brent D, et al.** Schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children-present and lifetime version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, **1997**; 36:980-988.
84. **Gökler B, Ünal F, Pehlivan Türk B, et al.** Reliability And Validity of Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School Age Children-Present and Lifetime Version-Turkish Version (K-SADS-PL-T). Turkish J Child Adolesc Psychiatry, **2004**; 11:109-117.
85. **Scahill L, Riddle MA, McSwiggın-Hardin M, et al.** Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale: reliability and validity. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, **1997**; 36:844-852.
86. **Yücelen A, Arman V, Topçuoğlu G, et al.** Çocuklar için Yale-Brown obsesif kompulsif geçerlik ve güvenilirlik değerlendirmesi. 10. Ulusal Çocuk ve Ergen Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur. Sarıgerme. **2000**.
87. **Erişim: [http://www. Onelambda. Com](http://www.Onelambda.Com) E.T. :12.12.2009**

EKLER

EK-1. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

a) % 70 Etil Alkol Hazırlama

- 70 ml %100'lük etil alkole
- 30 ml saf su eklendi
- Oda ısısında muhafaza edildi.

b) 1XTBE Hazırlama

- 100 ml 10XTBE'ye 900 ml bidistile su eklendi.
- Elektroforez tankına konularak kullanıldı.

c) 5'lik Agaroz Hazırlama

- 2.5 gr agaroz tartıldı.
- 100 ml'lik behere konuldu.
- Üzerine 100 ml 1XTBE eklendi
- Mikrodalgada agaroz 1XTBE içerisinde eritildi.
- Üzerine 2 damla Ethidium Bromid eklendi ve karıştırıldı.
- Kullanılmak üzere elektroforez tankına aktarıldı.

EK-2. PCR

Günümüzde PCR olarak bilinen, in vitro DNA amplifikasyonunu ilk kez 1974'te kimyasal gen sentezine alternatif olarak Panet ve Khorana tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem adını, 1985'te tek kopya genlerinin çoğaltılmasını tanımlayan, Mullis ve arkadaşlarından almıştır. Bu tarihte ilk defa Saiki ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin teşhisi amacıyla geliştirilmiş ve kullanılmıştır. 1988 yılında *Thermus aquaticus* adlı bakteriden yüksek sıcaklıklara dayanıklı DNA polimeraz enziminin izole edilmesi ve bu enzimin DNA amplifikasyonu için kullanılması, PCR'ın kullanım alanlarını genişletmiştir.

1980'li yılların ortalarında geliştirilmesinden sonra temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi) ve birçok hastalığın (Orak hücre anemisi, kistik fibrosis, fragile X sendromu, AIDS, lösemi vb.) DNA temeline dayanan tanıları için de klinik tıpta, hızla kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından, spesifik DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir hale gelmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasına neden olmuştur.

PCR, genetik materyaller (DNA ve RNA üzerinde seçilmiş, bir veya birden fazla bölgenin, kimyasal olarak sentezlemiş olan oligonükleotid primerler ve saflaştırılarak elde edilmiş olan Taq polimeraz enzimleri kullanılarak bir otomatik thermocycle sistem yardımıyla in vitro şartlar altında çoğaltılma metodudur.

PCR işleminde amaç, dizilimi bilinen iki bölge arasında bulunan bir DNA parçasını amplifiye etmektir. DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak iki oligonükleotid kullanılır. Bu nükleotidler tipik olarak farklı dizilere sahiptir. Bu oligonükleotidler, kalıp DNA'nın karşı dizilerinde uzanan ve amplifiye olacak DNA'nın parçasına eşittir. Kalıp DNA ilk önce iki oligonükleotidin ve dört deoksiribonükleozid trifosfatın (dNTP) varlığında ısıyla denatüre edilirler. Daha sonra tepkime karışımının ısısı, oligonükleotid primerlerinin kalıp dizilere yapışması için düşürülür. Primerler yapıştıktan sonra uygun sıcaklığa çıkarılarak DNA polimeraz enzimi

ile uzatılır. Denaturasyon, annealing(yapışma) ve DNA sentezi döngüleri bir çok kez tekrarlanır. Amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri bir sonraki aşama için kalıp görevi gördüğünden her bir döngü temel olarak DNA ürününün miktarını ikiye katlar⁸¹.

2.1. PCR'in Mekanizması

PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde, hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması prensibine dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine komplementer olan bölgelerle melezlenirler. Primerlerin, spesifik olan hedef dizilerle birleşmesi düşük sıcaklıkta olur. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört eşit dNTP varlığında primerin 3' OH ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur.

Bir PCR döngüsü, denaturasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Bu üç aşamanın ard arda takrarlanması ile DNA fragmentleri katsayısı artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde, diğer primer için kalıp görevi yapmasından kaynaklanır.

2.2. PCR'in Basamakları

Polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü 3 basamakta gerçekleşir.

2.2.1. Denaturasyon

Çift zincirli DNA molekülünün sıcaklıkla ayrılmasıdır. G + C'ce zengin dizilerde denaturasyon ısı artabilir. Denaturasyonun tam olmaması verimi düşürür ve DNA'nın uzun süre yüksek sıcaklıkta bekletilmesi ise DNA polimeraz aktivitesinin düşürür.

2.2.2. Primer Yapışması (Annealing)

Primer yapışması için gerekli olan sıcaklık hesaplanırken, her bir Adenin (A) ve Timin (T) için 4 °C alınır. Yapışma sıcaklığı 55-72 °C arasında değişir. Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve uygulanacak ısı, amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine, uzunluğuna ve derişimine bağı olarak değişmektedir.

2.2.3. Zincirin Uzaması (Extansion):

Zincir uzaması 5'→3'yönünde olup, uzama hızı 35- 100 nükleotid/ sn'dir. Uzama zamanı; hedef dizinin derişimine uzunluğuyla orantılıdır. En uygun sıcaklık 72 °C de 1 dk'dır. 1 dk'da 2 kb'a kadar uzama gerçekleşebilir. Döngü sayısı, başlangıçta kalıp olarak kullanılan DNA konsantrasyonuna bağıdır. Tek DNA ile başlandığında en fazla 40 döngü, çok DNA ile başlandığında ise ideal döngü sayısı 30 olmalıdır.

2.3. PCR Temel Bileşenleri

PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli maddeler; kalıp DNA, primerler (oligonükleotidler), dNTP karışımı, DNA polimeraz enzimi, Mg⁺² ve PCR tamponudur.

2.3.1. Primerler (Oligonükleotidler)

Seçilmiş primer dizilimi, PCR ürününün büyüklüğünü ve yerini tanımlar. Genel olarak primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Tipik primerler ise % 50- 60 G+C bileşimine sahip 18- 28 baz uzunluğundadır. Primer tasarımı yapılırken, çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınmaktadır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Kullanılacak primerler yalnızca amplifiye edilecek bölgeye spesifik olmalıdır. Konsantrasyonları 0,1 ile 0,5 mM arasında değişebilir. Bundan daha büyük konsantrasyonlara sahip primerlerin kullanılması kalıntıyı artırır ve hatalı dizilimlere sebep olabilir.

2.3.2. dNTP:

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) polimerizasyon aşamasında görev alırlar. Taq DNA polimeraz, düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 mM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılıdır. Ayrıca optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl₂ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün büyüklüğüne ve PCR döngü sayısına bağlıdır.

2.3.3. Kalıp DNA

PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Kalıp DNA'daki hedef dizilerin konsantrasyonu değişkenlik gösterir ve genellikle araştırmacıların kontrolü altında değildir.

2.3.4. Taq DNA Polimeraz

Thermus aquaticus'tan elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. Enzim 5'→3'aktivitesine sahiptir. 3'→5'ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Dolayısıyla sentezin yönü 5' uçtan 3' uca olup, primerin serbest 3'OH ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etkileri nedeniyle, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

2.3.5. Mg⁺² Derişimi

Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve primer- kalıp DNA hibridizasyonunu sağlarlar. Bu nedenle MgCl₂'ün PCR'ın özgülüğü ve ürün verimi üzerinde etkisi çok büyüktür.

2.3.6. PCR Tamponu

PCR'da kullanılan tamponlar arasında DNA polimeraz enzimlerine özgü olanlar daha yaygındır. PCR için uygun olan tampon 10-50 mM arasında değişen Tris- HCl'dir. Tampunun pH'sı 8,3- 8,8 arasında değişir. Bu tampona 50 mM kadar KCl çöeltisinin eklenmesi primer yapışmasını kolaylaştırır⁸².

EK-3 Hasta Değerlendirmede Kullanılan Yöntemler

3.1. Enfeksiyon Hastalıklarının Kaydı

Olguların demografik bilgilerinin yanı sıra, enfeksiyon ve romatizmal hastalık öyküsü kaydedilmiştir. Çocuklarda “sık enfeksiyon öyküsü (yılda 6 kereden sık tonsillit)”, “tonsillektomi öyküsü”, “enfeksiyon hastalıklarının ardından belirtilerde alevlenme öyküsü”; sorgulanmıştır. Ayrıca ailelerde ise romatizmal ateş, romatizmal kardit, Sydenham koresinden birini içerecek biçimde, “ailede romatizmal hastalık öyküsü” ile ilgili bilgiler kaydedilmiştir⁸³.

3.2. Psikometrik Ölçüm Araçları

3.2.1. Washington Üniversitesi Çocuk ve Gençler için Duygudurum Bozuklukları ve Şizofreni Ölçeği (WASH-U-KSADS)

Çocuk ve gençlerde psikiyatrik tanılarının belirlenmesi için kullanılan yarı yapılandırılmış görüşme formudur. Tanıların DSM-IV tanı ölçütlerine göre ve belli bir standartta konmasını sağlayan form 1997 yılında Kaufman ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik çalışmaları Gökler ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılmıştır⁸⁴.

3.2.2. Çocukluk Çağı Yale-Brown Obsesif Kompulsif Skala (ÇYBOKS)

OKB tanısını ve belirti şiddetini belirlemek amacıyla tüm dünyada sık kullanılan yarı yapılandırılmış görüşme formudur. Scahill ve arkadaşları tarafından 1997 yılında geliştirilen ölçüm aracının Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik çalışması Yücelen ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılmıştır. Obsesyon puanı, kompülsiyon puanı ve toplam puan olmak üzere üç puan üzerinden değerlendirilir^{85,86}.

EK- 4 2009 Yılına Ait Tanımlanmış HLA allelleri

Tablo 20 2009 yılı Temmuz ayına ait tanımlanmış bütün HLA allelleri⁸⁷

[A*01010101]	A*02010102L	A*0216	A*0253N	A*0292	A*0324
A*01010102N	A*02010103	A*021701	A*0254	A*0293	A*0325
A*010102	A*020102	A*021702	A*0255	A*0294N	A*0326
A*010103	A*020103	A*0218	A*025601	A*0295	A*0327
A*010104	A*020104	A*0219	A*025602	A*0296	A*0328
A*010105	A*020105	A*022001	A*0257	A*0297	A*0329
[A*0102]	A*020106	A*022002	A*0258	A*0299	A*0330
[A*0103]	A*020107	A*0221	A*0259	[A*03010101]	A*0331
A*0104N	A*020108	A*022201	A*0260	A*03010102N	A*0332
A*0106	A*020109	A*022202	A*0261	A*03010103	A*0333
A*0107	A*020110	A*0224	A*0262	A*030102	A*0334
A*0108	A*020111	A*0225	A*0263	A*030103	A*0335
A*0109	A*020112	A*0226	A*0264	A*030104	A*0336N
A*0110	A*020113	A*0227	A*0265	A*030105	A*0337
A*0111N	A*020114	A*0228	A*0266	A*030106	A*0338
A*0112	A*020115	A*0229	A*0267	A*030107	A*0339
A*0113	A*020117	A*0230	A*0268	A*030108	A*0340
A*0114	A*020118	A*0231	A*0269	A*030109	A*0341
A*0115N	A*020119	A*0232N	A*0270	A*030110	A*0342
A*0116N	A*020121	A*0233	A*0271	A*0302	A*0343
A*0117	A*020122	A*0234	A*0272	A*0303N	A*0344
A*0118N	A*0202	A*023501	A*0273	A*0304	A*0345
A*0119	A*020301	A*023502	A*027401	A*0305	A*0346
A*0120	A*020302	A*023503	A*027402	A*0306	A*0347
A*0121	[A*0204]	A*0236	A*0275	A*0307	A*0350
A*0122N	[A*020501]	A*0237	A*0276	A*0308	A*0351
A*0123	[A*020601]	A*0238	A*0277	A*0309	A*0355
A*0124	A*020602	A*0239	A*0278	A*0310	[A*110101]
A*0125	A*020603	A*0240	A*0279	A*0311N	A*110102
A*0126	A*020604	A*0241	A*0280	A*0312	A*110103
A*0127N	A*020605	A*0242	A*0281	A*0313	A*110104
A*0128	A*020606	A*0243N	A*0282N	A*0314	A*110105
A*0129	[A*0207]	A*0244	A*0283N	A*0315	A*110106
A*0130	A*0208	A*0245	A*0284	A*0316	A*110107
A*0131N	A*0209	A*0246	A*0285	A*0317	A*110108
A*0132	A*0210	A*0247	A*0286	A*0318	A*110109
A*0133	[A*0211]	A*0248	A*0287	A*0319	A*110110
A*0134N	A*0212	A*0249	A*0288N	A*0320	A*110201
A*0135	A*0213	A*0250	A*0289	A*0321N	A*110202
A*0137	A*0214	A*0251	A*0290	A*0322	A*110203
[A*02010101]	A*0215N	A*0252	A*0291	A*0323	A*1103

A*1104	A*2305	A*241302	A*2461	[A*260101]	[A*290101]
A*1105	A*2306	A*2414	A*2462	A*260102	A*290102
A*1106	A*2307N	A*2415	A*2463	A*260103	A*290103
A*1107	A*2308N	[A*2417]	A*2464	A*260104	A*290201
A*1108	A*2309	A*2418	A*2466	A*260105	A*290202
A*1109	A*2310	A*2419	A*2467	A*260106	A*290203
A*1110	A*2311N	A*2420	A*2468	A*260107	A*2903
A*1111	A*2312	A*2421	A*2469	A*260108	A*2904
A*1112	A*2313	A*2422	A*2470	A*2602	A*2905
A*1113	A*2314	A*2423	A*2471	A*2603	A*2906
A*1114	A*2315	A*2424	A*2472	A*2604	A*2907
A*111501	A*2316	A*2425	A*2473	A*2605	A*2908N
A*111502	A*2317	A*2426	A*2474	A*2606	A*2909
A*1116	A*2318	A*2427	A*2475	A*260701	A*2910
A*1117	A*2319Q	A*2428	A*2476	A*260702	A*2911
A*1118	A*2320	A*2429	A*2477	A*2608	A*2912
A*1119	A*2321	A*2430	A*2478	A*2609	A*2913
A*1120	[A*24020101]	A*2431	A*2479	A*2610	A*2914
A*1121N	[A*24020102L]	A*2432	A*2480	A*2611N	A*2915
A*1122	A*240202	A*2433	A*2481	A*2612	A*2916
A*1123	A*240203	A*2434	A*2482	A*2613	A*2917
A*112401	A*240204	A*2435	A*2483N	A*2614	A*2918
A*112402	A*240205	A*2436N	A*2484N	A*2615	A*2919
A*1125	A*240206	A*2437	A*2485	A*2616	[A*300101]
A*1126	A*240207	A*2438	A*2486N	A*2617	A*300102
A*1127	A*240208	A*2439	A*2487	A*2618	A*300201
A*1129	A*240209	A*2440N	A*2488	A*2619	A*300202
A*1130	A*240210	A*2441	A*2489	A*2620	A*300203
A*1131	A*240211	A*2442	A*2490N	A*2621	A*300204
A*1132	A*240212	A*2443	A*2491	A*2622	A*3003
A*1133	A*240213	A*2444	A*2492	A*2623	A*3004
A*1134	A*240214	A*2445N	A*2493	A*2624	A*3006
A*1135	A*240215	A*2446	A*2494	A*2625N	A*3007
A*1136	A*240216	A*2447	A*2495	A*2626	A*3008
A*1137	A*240217	A*2448N	A*2496	A*2627	A*3009
A*1138	A*240220	A*2449	A*2497	A*2628	A*3010
A*1139	[A*240301]	A*2450	A*2498	A*2629	A*301101
A*1140	A*240302	A*2451	A*2499	A*2630	A*301102
A*1141	A*2404	A*2452	[A*250101]	A*2631	A*3012
A*1142	A*2405	A*2453	A*250102	A*2632	A*3013
A*1143	A*2406	A*2454	A*2502	A*2633	A*3014L
A*1144	[A*2407]	A*2455	A*2503	A*2634	A*3015
[A*230101]	A*2408	A*2456	A*2504	A*2635	A*3016
A*2302	A*2409N	A*2457	A*2505	A*2636	A*3017
A*230301	A*2410	A*2458	A*2506	A*2637	A*3018
A*230302	A*2411N	A*2459	A*2507	A*2638	A*3019
A*2304	A*241301	A*2460N	A*2508	A*2640	A*3020

A*3022	A*3213	[A*6601]	A*6827	A*9210	A*9257
A*3023	A*3214	A*6602	A*6828	A*9211	A*9269
A*3024	A*3215	A*6603	A*6829	A*9212	A*9270
A*3025	A*3216	A*6604	A*6830	A*9213N	A*9271
A*3026	A*3217	A*6605	A*6831	A*9214	A*9277
A*3027N	A*3218	A*6606	A*6832	A*9215	A*9278
A*3028	A*3219N	A*6607	A*6833	A*9216	A*9279
[A*310102]	[A*330101]	A*6608	A*6834	A*9217	[B*070201]
A*310103	[A*330301]	A*6609	A*6835	A*9218	B*070202
A*3102	A*330302	A*6610	A*6836	A*9219	B*070203
A*3103	A*330303	[A*680101]	A*6837	A*9220	B*070204
A*3104	A*3304	[A*680102]	A*6838	A*9221	B*070205
A*3105	A*3305	A*680103	A*6839	A*9222	B*070206
A*3106	A*3306	A*680104	A*6840	A*9223	B*070207
A*3107	A*3307	A*680105	A*6841	A*9224	B*070209
A*3108	A*3308	A*680106	A*6842	A*9225N	B*0703
A*3109	A*3309	A*680107	A*6843	A*9226	B*0704
A*3110	A*3310	A*68020101	A*6844	A*9227	B*070501
A*3111	A*3311	A*68020102	A*6845	A*9228	B*070502
A*3112	A*3312	A*68020103	A*6846	A*9229	B*070503
A*3113	A*3313	A*680202	A*6847	A*9230	B*0706
A*3114N	A*3314	A*680301	A*6848	A*9231	B*0707
A*3115	A*3315	A*680302	[A*6901]	A*9232	B*0708
A*3116	A*3316	A*6804	[A*7401]	A*9233	B*0709
A*3117	A*3317	A*6805	A*7402	A*9234	B*0710
A*3118	A*3318	A*6806	A*7403	A*9235	B*0711
A*3119	A*3319	A*6807	A*7404	A*9236	B*0712
A*3120	A*3320	A*680801	A*7405	A*9237	B*0713
A*3121	A*3321	A*680802	A*7406	A*9238	B*0714
A*3122	A*3322	A*6809	A*7407	A*9239	B*0715
A*3123	A*3323	A*6810	A*7408	A*9240	B*0716
A*3124	A*3324	A*6811N	A*7409	A*9241	B*0717
A*3125	A*3325	A*6812	A*7410	A*9242	B*071801
A*320101	A*340101	A*6813	A*7411	A*9243	B*071802
A*320102	A*340102	A*6814	A*7412N	A*9244	B*0719
A*320103	[A*3402]	A*6815	A*7413	A*9245	B*0720
A*3202	A*3403	A*6816	A*7414N	A*9246	B*0721
A*3203	A*3404	A*6817	[A*8001]	A*9247	B*072201
A*3204	A*3405	A*6818N	A*9201	A*9248	B*072202
A*3205	A*3406	A*6819	A*9202	A*9249	B*0723
A*3206	A*3407	A*6820	A*9203	A*9250	B*0724
A*3207	A*3408	A*6821	A*9204	A*9251	B*0725
A*3208	[A*3601]	A*6822	A*9205	A*9252	B*0726
A*3209	A*3602	A*6823	A*9206	A*9253	B*0727
A*3210	A*3603	A*6824	A*9207	A*9254	B*0728
A*3211Q	A*3604	A*6825	A*9208	A*9255	B*0729
A*3212	[A*4301]	A*6826	A*9209	A*9256	B*0730

B*0731	B*080103	B*130204	[B*1504]	B*1547	B*1595
B*0732	B*080104	B*130205	B*1505	B*1548	B*1596
B*0733	B*080105	B*1303	B*1506	B*1549	B*1597
B*0734	B*080106	B*1304	B*1507	B*1550	B*1598
B*0735	B*0802	B*1306	[B*1508]	B*1551	B*1599
B*0736	B*0803	B*1307N	B*1509	B*1552	B*180101
B*0737	B*0804	B*1308Q	[B*1510]	B*1553	B*180102
B*0738	B*0805	B*1309	B*151101	B*1554	B*180103
B*0739	B*0806	B*1310	B*151102	B*1555	B*1802
B*0740	B*0807	B*1311	B*151103	B*1556	B*1803
B*0741	B*0808N	B*1312	B*1512	B*1557	B*1804
B*0742	B*0809	B*1313	B*1513	B*1558	B*1805
B*0743	B*0810	B*1314	[B*1514]	B*1560	B*1806
B*0744	B*0811	B*1315	B*1515	B*1561	B*1807
B*0745	B*081201	B*1316	B*1516	B*1562	B*1808
B*0746	B*0813	B*1317	B*15170101	B*1563	B*1809
B*0747	B*0814	B*1318	B*15170102	B*1564	B*1810
B*0748	B*0815	B*1319	B*151702	B*1565	B*1811
B*0749N	B*0816	B*1320	B*1518	B*1566	B*1812
B*0750	B*0817	B*1321	[B*1519]	B*1567	B*1813
B*0751	B*0818	B*132201	B*1520	B*1568	B*1814
B*0752	B*0819N	B*132202	[B*1521]	B*1569	B*1815
B*0753	B*0820	B*1323	[B*1523]	B*1570	B*1817N
B*0754	B*0821	B*1325	B*1524	B*1571	B*1818
B*0755	B*0822	B*1326	B*152501	B*1572	B*1819
B*0756	B*0823	[B*1401]	B*1526N	B*1573	B*1820
B*0757	B*0824	B*140201	B*152701	B*1574	B*1821
B*0758	B*0825	B*140202	B*152702	B*1575	B*1822
B*0759	B*0826	B*1403	B*152703	B*1576	B*1823N
B*0760	B*0827	B*1404	B*1528	B*1577	B*1824
B*0761	B*0828	B*1405	B*1529	B*157801	B*1825
B*0762	B*0829	B*140601	B*1530	B*1579N	B*1826
B*0763	B*0830N	B*140602	B*1531	B*1580	B*1827
B*0764	B*0831	B*1407N	B*1532	B*1581	B*1828
B*0765	B*0832	B*1408	B*1533	B*1582	B*1829
B*0766	B*0833	B*1409	B*1534	B*1583	B*1830
B*0767N	B*0834	B*1410	B*1535	B*1584	B*1831
B*0768	B*0835	[B*15010101]	B*1536	B*1585	B*1832
B*0769	B*0836	B*15010102N	B*1537	B*1586	B*1833
B*0770	B*0837	B*150102	B*1538	B*1587	B*1835
B*0771	B*0838	B*150103	B*1539	B*1588	B*2701
B*0772	B*0840	B*150104	B*1540	B*1589	[B*2702]
B*0775	[B*130101]	B*150106	B*1542	B*1590	B*2703
B*0776	B*130102	B*150107	B*1543	B*1591	B*270401
B*0777	B*130201	B*150108	B*1544	B*1592	B*270402
[B*080101]	B*130202	[B*1502]	B*1545	B*1593	B*270502
B*080102	B*130203	[B*150301]	B*1546	B*1594N	B*270503

B*270504	B*2750	B*3529	B*3576	B*3806	B*3926
B*270505	B*2751	B*3530	B*3577	B*3807	B*3927
B*270506	B*2752	B*3531	B*3578	B*3808	B*3928
B*270507	[B*350101]	B*3532	B*3579	B*3809	B*3929
B*270508	B*350102	B*3533	B*3580	B*3810	B*3930
B*270509	B*350103	B*3534	B*3581	B*3811	B*3931
B*270510	B*350104	B*3535	B*3582	B*3812	B*3932
[B*2706]	B*350105	B*3536	B*3583	B*3813	B*3933
B*2707	B*350106	B*3537	B*3584	B*3814	B*3934
[B*2708]	B*350107	B*3538	B*3585	B*3815	B*3935
B*2709	B*350201	B*3539	B*3586	B*3816	B*3936
B*2710	B*350202	B*3540N	B*3587	B*3817	B*3937
B*2711	B*350203	B*3541	B*3588	B*3818	B*3938Q
B*2712	B*350301	B*3542	B*3589	B*3819	B*3939
B*2713	B*350302	B*3543	B*3590	B*39010101	B*3940N
B*2714	[B*350401]	B*3544	B*3591	B*39010102L	B*3941
B*2715	B*350402	B*3545	B*3592	B*390103	B*3942
B*2716	B*350403	B*3546	B*3593	B*390104	B*3943
B*2717	[B*3505]	B*3547	B*3594	B*390105	B*3944
B*2718	B*3506	B*3548	B*3595	B*390106	B*3945
B*2719	B*3507	B*3549	B*3597	B*390201	B*3946
B*2720	B*350801	B*3550	B*3599	B*390202	B*3947
B*2721	B*350802	B*3551	B*370101	B*3903	B*3948
B*2723	B*350803	B*3552	B*370102	B*3904	B*3949
B*2724	B*350901	B*3553N	B*370103	B*3905	B*3950
B*2725	B*350902	B*3554	B*370104	B*390601	B*400101
B*2726	B*3510	B*3555	B*370105	B*390602	B*400102
B*2727	B*3511	B*3556	B*3702	B*3907	B*400103
B*2728	B*3512	B*3557	B*3703N	B*3908	B*400104
B*2729	B*3513	B*3558	B*3704	B*3909	B*400105
B*2730	B*351401	B*3559	B*3705	[B*3910]	B*400106
B*2731	B*351402	B*3560	B*3706	B*3911	B*400201
B*2732	B*3515	B*3561	B*3707	B*3912	B*400202
B*2733	[B*3516]	B*3562	B*3708	B*391301	B*400203
B*2734	B*3517	B*3563	B*3709	B*391302	B*400204
B*2735	B*3518	B*3564	B*3710	B*3914	B*400205
B*2736	B*3519	B*3565Q	B*3711	B*3915	[B*4003]
B*2737	B*352001	B*3566	B*3712	B*3916	B*4004
B*2738	B*352002	B*3567	B*3713	B*3917	B*4005
B*2739	B*3521	B*356801	B*3714	B*3918	B*40060101
B*2740	B*3522	B*356802	B*380101	B*391901	B*40060102
B*2741	B*3523	B*3569	B*380102	B*391902	B*400602
B*2742	B*3524	B*3570	B*380201	B*3920	B*4007
B*2743	B*3525	B*3571	B*380202	B*3922	[B*4008]
B*2744	B*3526	B*3572	B*3803	B*3923	B*4009
B*2745	B*3527	B*3574	B*3804	B*3924	B*4010
B*2746	B*3528	B*3575	B*3805	B*3925N	B*4011

B*4012	B*4059	B*4106	B*4425	B*4502	B*4810
B*4013	B*4060	B*4107	B*4426	B*4503	B*4811
B*401401	B*4061	B*4108	B*4427	B*4504	B*4812
B*401402	B*4062	[B*4201]	B*442801	B*4505	B*4813
B*401403	B*4063	B*4202	B*442802	B*4506	B*4814
B*4015	B*4064	B*4204	B*4429	B*4507	B*4815
B*4016	B*4065	B*420501	B*4430	B*4508	B*4816
B*4018	B*4066	B*420502	B*4431	B*4509	B*4817
B*4019	B*4067	B*4206	B*4432	B*460101	B*4818
B*4020	B*4068	B*4207	B*4433	B*460102	B*4819
B*4021	B*4069	B*4208	B*4434	B*4602	B*490101
B*4022N	B*4070	B*4209	B*4435	B*4603	B*490102
B*4023	B*4071	B*4210	B*4436	B*4604	B*4902
B*4024	B*407201	B*4211	B*4437	B*4605	B*4903
B*4025	B*407202	B*4212	B*4438	B*4606	B*4904
B*4026	B*4073	B*44020101	B*4439	B*4607N	B*4905
B*4027	B*4074	B*44020102S	B*4440	B*4608	[B*5001]
B*4028	B*4075	B*440202	B*4441	B*4609	B*5002
B*4029	B*4076	B*440203	B*4442	B*4610	B*5004
B*4030	B*4077	B*440204	B*4443	B*4611	[B*510101]
B*4031	B*4078	B*440205	B*4444	B*4612	B*510102
B*4032	B*4079	B*440208	B*4445	B*461301	B*510103
B*4033	B*4080	B*440301	B*4446	B*461302	B*510104
B*4034	B*4081	B*440302	B*4447	B*4614	B*510105
B*4035	B*4082	B*440303	B*4448	B*4615N	B*510106
B*4036	B*4083	B*440304	B*4449	B*4616	B*510107
B*4037	B*4084	B*4404	B*4450	B*4617	B*510108
B*4038	B*4085	B*4405	B*4451	B*4618	B*510109
B*4039	B*4086	B*4406	B*4452N	B*4619	B*510201
B*4040	B*4087	B*4407	B*4453	B*4621	B*510202
B*4042	B*4088	B*4408	B*4454	[B*47010101]	B*510203
B*4043	B*4089	B*4409	B*4455	B*47010102	B*510204
B*4044	B*4090	B*4410	B*4456N	[B*4702]	B*5103
B*4045	B*4091	B*4411	B*4457	B*4703	B*5104
B*4046	B*4092	B*4412	B*4458N	B*4704	B*5105
B*4047	B*4093	B*4413	B*4459	B*4705	[B*5106]
B*4048	B*4094	B*4414	B*4460	B*480101	B*5107
B*4049	B*4095	B*4415	B*4461N	B*480102	B*5108
B*4050	B*4096	B*4416	B*4462	[B*4802]	B*510901
B*4051	B*4097	B*4417	B*4463	B*480301	B*510902
B*4052	B*4098	B*4418	B*446401	B*480302	B*5110
B*4053	[B*4101]	B*4419N	B*446402	B*4804	B*5111N
B*4054	B*410201	B*4420	B*4465	B*4805	B*5112
B*4055	B*410301	B*4421	B*4466	B*4806	B*511301
B*4056	B*410302	B*4422	B*4467	B*4807	B*511302
B*4057	B*4104	B*4423N	B*4469	B*4808	B*5114
B*4058	B*4105	B*4424	[B*4501]	B*4809	B*5115

B*5116	B*5164	B*5407	B*5531	B*5715	B*8202
B*5117	B*5165	B*5408N	B*5532	B*5716	B*8301
B*5118	[B*520101]	B*5409	B*5533	B*5717	B*9501
B*5119	B*520102	B*5410	B*5534	B*5718	B*9502
B*5120	B*520103	B*5411	B*5535	B*5719	B*9503
B*5121	B*520104	B*5412	[B*5601]	B*580101	B*9504
B*5122	B*5202	B*5413	B*5602	B*580102	B*9505
B*5123	B*5203	B*5414	B*5603	[B*5802]	B*9506
B*512401	B*5204	B*5415	B*5604	B*5804	B*9507
B*512402	B*5205	B*5416	B*560501	B*5805	B*9508
B*5126	B*520601	B*5417	B*560502	B*5806	B*9509
B*5127N	B*520602	B*5418	B*5606	B*5807	B*9510
B*5128	B*5207	B*5419	B*5607	B*5808	B*9511N
B*5129	B*5208	B*550101	B*5608	B*5809	B*9512
B*5130	B*5209	B*550102	B*5609	B*5810N	B*9513
B*5131	B*5210	B*550103	B*5610	B*5811	B*9514
B*5132	B*5211	B*550104	B*5611	B*5812	B*9515
B*5133	B*5212	B*550201	B*5612	B*5813	B*9516
B*5134	B*5213	B*550202	B*5613	B*5814	B*9517
B*5135	B*5214	B*550203	B*5614	B*5815	B*9518
B*5136	[B*530101]	B*5503	B*5615	B*5816	B*9519
B*5137	B*530102	B*5504	B*5616	B*5817N	B*9520
B*5138	B*530103	B*5505	B*5617	B*5818	B*9521
B*5139	B*530104	B*5507	B*5618	B*5819	B*9522
B*5140	B*5302	B*5508	B*5619N	B*5820	B*9523
B*5141N	B*5303	B*5509	B*5620	B*5821	B*9524
B*5142	B*5304	B*5510	B*5621	[B*5901]	B*9525
B*5143	B*5305	B*5511	B*5622	B*5902	B*9526
B*5144N	B*5306	B*5512	B*5623	B*5903	B*9527
B*5145	B*5307	B*5513	B*5624	B*5904	B*9528
B*5146	B*5308	B*5514	B*570101	B*5905	B*9529
B*5148	B*5309	B*5515	B*570102	[B*670101]	B*9531
B*5149	B*5310	B*5516	B*570103	B*670102	B*9532
B*5150	B*5311	B*5517	B*5702	B*6702	B*9533
B*5151	B*5312	B*5518	B*570301	[B*7301]	B*9534
B*5152	B*5313	B*5519	B*570302	[B*7801]	B*9535
B*5153	B*5314	B*5520	B*5704	B*780201	B*9536
B*5154	B*5315	B*5521	B*5705	B*780202	B*9537
B*5155	B*5316	B*5522	B*5706	B*7803	B*9538
B*5156	B*5317	B*5523	B*5707	B*7804	B*9539
B*5157	B*5318	B*5524	B*5708	B*7805	B*9540
B*5158	[B*5401]	B*5525	B*5709	B*7806	B*9541
B*5159	B*5402	B*5526	B*5710	[B*8101]	B*9542
B*5160	B*5403	B*5527	B*5711	B*8102	B*9543
B*5161	B*5404	B*5528	B*5712	B*8103	B*9544
B*5162	B*5405N	B*5529	B*5713	B*8104N	B*9545
B*5163	B*5406	B*5530	B*5714	[B*8201]	B*9546

B*9547	Cw*0127	Cw*0305	Cw*0349	Cw*0434	Cw*0611
B*9548	Cw*0128	Cw*0306	Cw*0350	Cw*0435	Cw*0612
B*9549N	Cw*020201	Cw*0307	Cw*0357	Cw*0436	Cw*0613
B*9550	[Cw*020202]	Cw*0308	Cw*0358	Cw*0437	Cw*0614
B*9551	Cw*020203	Cw*0309	Cw*0359	Cw*0438	Cw*0615
B*9552	Cw*020205	Cw*0310	Cw*0360	Cw*0440	Cw*0616N
B*9553	Cw*020206	Cw*031101	Cw*0361	Cw*0441	Cw*0617
B*9554	Cw*020208	Cw*031102	Cw*04010101	Cw*05010101	Cw*0618
B*9555	Cw*0203	Cw*0312	Cw*04010102	Cw*05010102	Cw*0619
B*9556	Cw*0204	Cw*0313	Cw*04010103	Cw*050102	Cw*0620
B*9557	Cw*0205	Cw*0314	Cw*040102	Cw*050103	Cw*0622
B*9558	Cw*0206	Cw*0315	Cw*040103	Cw*050104	Cw*0623
B*9559	Cw*0207	Cw*0316	Cw*040104	Cw*050105	Cw*0624
B*9560	Cw*0208	Cw*0317	Cw*040105	Cw*0503	Cw*070101
B*9561	Cw*0209	Cw*0318	Cw*040106	Cw*0504	Cw*070102
B*9563	[Cw*0210]	Cw*0319	Cw*040110	Cw*0505	Cw*070103
B*9564	Cw*0211	Cw*0320N	Cw*0403	Cw*0506	Cw*070104
Cw*010201	Cw*0212	Cw*0321	Cw*040401	Cw*0507N	Cw*070105
Cw*010202	Cw*0213	Cw*0322Q	Cw*040402	Cw*0508	Cw*070106
Cw*010203	Cw*0214	Cw*0323	Cw*0405	Cw*0509	Cw*070107
Cw*010204	Cw*0215	Cw*0324	Cw*0406	Cw*0510	Cw*070108
Cw*010205	Cw*021601	Cw*0325	Cw*0407	Cw*0511	Cw*070109
Cw*010206	Cw*021602	Cw*0326	Cw*0408	Cw*0512	Cw*070201
Cw*0103	Cw*0217	Cw*0327	Cw*0409N	Cw*0513	Cw*070201
Cw*0104	Cw*0218	Cw*0328	Cw*0410	Cw*0514	Cw*070201
Cw*0105	Cw*0219	Cw*0329	Cw*0411	Cw*0515	Cw*070202
Cw*0106	Cw*0220	Cw*0330	Cw*0412	Cw*0516	Cw*070203
Cw*0107	Cw*0221	Cw*0331	Cw*0413	Cw*0517	Cw*070204
Cw*0108	Cw*0222	Cw*0332	Cw*0414	Cw*0518	Cw*070205
Cw*0109	Cw*0223	Cw*0333	Cw*041501	Cw*0519	Cw*070206
Cw*0110	Cw*0226	Cw*0334	Cw*041502	Cw*0520	Cw*0703
Cw*0111	Cw*0227	Cw*0335	Cw*0416	Cw*0521	Cw*070401
Cw*0112	Cw*030201	Cw*0336	Cw*0417	Cw*0522	Cw*070402
Cw*0113	Cw*030202	Cw*0337	Cw*0418	Cw*0523	Cw*070403
Cw*0114	Cw*030203	Cw*033801	Cw*0419	Cw*0524	Cw*0705
Cw*0115	[Cw*030301]	Cw*033802	Cw*0420	Cw*0525	Cw*0706
Cw*0116	Cw*030302	Cw*0339	Cw*0423	Cw*06020101	Cw*0707
Cw*0117	Cw*030303	Cw*0340	Cw*0424	Cw*06020102	Cw*0708
Cw*0118	Cw*030304	Cw*0341	Cw*0425	Cw*060203	Cw*0709
Cw*0119	Cw*030305	Cw*0342	Cw*0426	Cw*0603	Cw*0710
Cw*0120	[Cw*030401]	Cw*034301	Cw*0427	Cw*0604	Cw*0711
Cw*0121	[Cw*030402]	Cw*034302	Cw*0428	Cw*0605	[Cw*0712]
Cw*0122	Cw*030403	Cw*0344	Cw*0429	Cw*0606	Cw*0713
Cw*0123	Cw*030404	Cw*0345	Cw*0430	Cw*0607	Cw*0714
Cw*0124	Cw*030405	Cw*0346	Cw*0431	Cw*0608	Cw*0715
Cw*0125	Cw*030406	Cw*0347	Cw*0432	Cw*0609	Cw*0716
Cw*0126	Cw*030407	Cw*0348	Cw*0433	Cw*0610	Cw*0717

Cw*0718	Cw*0764	Cw*120304	Cw*150504	DPA1*0108	DPB1*1002
Cw*0719	Cw*0765	Cw*120305	Cw*1506	DPA1*0109	[DPB1**110101]
Cw*0720	Cw*0766	Cw*120306	Cw*1507	DPA1*0110	DPB1**110102
Cw*0721	Cw*0767	Cw*120401	Cw*1508	DPA1*020101	DPB1**1102
Cw*0722	Cw*0768	Cw*120402	Cw*1509	DPA1*020102	[DPB1**1301]
Cw*0723	Cw*0769	Cw*1205	Cw*151001	DPA1*020103	DPB1**1302
Cw*0724	Cw*0770	Cw*1206	Cw*151002	DPA1*020104	[DPB1**1401]
Cw*0725	Cw*0771	Cw*1207	Cw*1511	DPA1*020105	DPB1**1402
Cw*0726	Cw*0772	Cw*1208	Cw*1512	DPA1*020106	[DPB1**1501]
Cw*072701	Cw*0773	Cw*1209	Cw*1513	DPA1*020201	DPB1**1502
Cw*072702	Cw*0774	Cw*1210	Cw*1515	DPA1*020202	DPB1**1601
Cw*0728	[Cw*080101]	Cw*1211	Cw*1516	DPA1*020203	DPB1**1602
Cw*0729	Cw*080102	Cw*1212	Cw*1517	DPA1*0203	[DPB1**1701]
Cw*0730	[Cw*0802]	Cw*1213	Cw*1518	DPA1*0204	DPB1**1702
Cw*0731	Cw*080301	Cw*121401	Cw*1519	DPA1*0301	DPB1**1801
Cw*0732N	Cw*080302	Cw*121402	Cw*1520	DPA1*0302	DPB1**1802
Cw*0733N	[Cw*0804]	Cw*1215	Cw*1521	DPA1*0303	[DPB1**1901]
Cw*0735	Cw*0805	Cw*1216	Cw*1522	DPA1*0401	DPB1**1902
Cw*0736	Cw*0806	Cw*1217	Cw*160101	[DPB1*010101]	DPB1**200101
Cw*0737	Cw*0807	Cw*1218	Cw*160102	DPB1*010102	DPB1**200102
Cw*0738	Cw*0808	Cw*1219	Cw*160103	DPB1*010103	DPB1**2002
Cw*0739	Cw*0809	Cw*1220	Cw*1602	DPB1*0102	[DPB1**2101]
Cw*0740	Cw*0810	Cw*1221	Cw*160401	[DPB1*020102]	DPB1**2102
Cw*0741	Cw*0811	Cw*1222	Cw*1606	DPB1*020103	DPB1**2201
Cw*0742	Cw*0812	Cw*140201	Cw*1607	DPB1*020104	DPB1**2202
Cw*0743	Cw*0813	Cw*140202	Cw*1608	DPB1*020105	[DPB1**2301]
Cw*0744	Cw*0814	Cw*140203	Cw*1609	DPB1*020106	DPB1**2302N
Cw*0745	Cw*0815	Cw*140204	Cw*1610	DPB1*020107	DPB1**2401
Cw*0746	Cw*0816	[Cw*1403]	Cw*1611	[DPB1*0202]	DPB1**2402
Cw*0747	Cw*0817	Cw*1404	Cw*1612	DPB1*0203	DPB1**2501
Cw*0748	Cw*0818	Cw*1405	[Cw*1701]	[DPB1*030101]	DPB1**2502
Cw*0749	Cw*0819	Cw*1406	Cw*1702	DPB1*030102	DPB1**260101
Cw*0750	Cw*0820	Cw*1407N	Cw*1703	DPB1*0302	[DPB1**260102]
Cw*0751	Cw*0821	Cw*1408	Cw*1704	[DPB1*040101]	DPB1**2602
Cw*0752	Cw*0822	Cw*1409	Cw*1705	DPB1*040102	DPB1**2701
Cw*0753	Cw*0823	Cw*1410	Cw*1801	[DPB1*0402]	[DPB1**2801]
Cw*0754	Cw*0824	Cw*1411	Cw*1802	DPB1*0403	DPB1**2901
Cw*0755N	Cw*0825	Cw*1412	Cw*1803	[DPB1*050101]	DPB1**3001
Cw*075601	Cw*0826N	[Cw*150201]	DPA1*010301	DPB1*050102	DPB1**3101
Cw*075602	Cw*0827	Cw*150202	DPA1*010302	DPB1*0502	DPB1**3201
Cw*0757	Cw*120201	Cw*150203	DPA1*010303	[DPB1*0601]	DPB1**3301
Cw*0758	Cw*120202	Cw*150204	DPA1*010304	DPB1*0602	DPB1**3401
Cw*0759	Cw*120203	Cw*1503	DPA1*0104	DPB1*0801	DPB1**3501
Cw*0760	Cw*12030101	Cw*1504	DPA1*0105	DPB1*0802	DPB1**3601
Cw*0761N	Cw*12030102	Cw*150501	DPA1*010601	[DPB1*0901]	DPB1**3701
Cw*0762	Cw*120302	Cw*150502	DPA1*010602	[DPB1*0902]	DPB1**3801
Cw*0763	Cw*120303	Cw*150503	DPA1*0107	[DPB1*1001]	[DPB1**3901]

[DPB1*4001]	DPB1*8801	DQB1*020102	DQB1*050202	DQB1*0632	DRB1*030202
DPB1*410101	DPB1*8901	[DQB1*0202]	[DQB1*050301]	DQB1*0633	DRB1*0303
DPB1*410102	DPB1*9001	DQB1*0203	DQB1*050302	DQB1*0634	[DRB1*0304]
DPB1*4401	DPB1*9101	DQB1*0204	DQB1*0504	DQB1*0635	DRB1*030501
DPB1*4501	DPB1*9201	DQB1*0205	DQB1*0505	DRB1*010101	DRB1*030502
DPB1*4601	DPB1*9301	[DQB1*030101]	DQB1*060101	DRB1*010102	DRB1*030503
DPB1*4701	DPB1*9401	DQB1*030102	DQB1*060102	DRB1*010103	DRB1*0306
DPB1*4801	DPB1*9501	DQB1*030103	DQB1*060103	DRB1*010104	DRB1*0307
DPB1*4901	DPB1*9601	DQB1*030104	DQB1*060104	DRB1*010105	DRB1*0308
DPB1*5001	DPB1*9701	[DQB1*030201]	DQB1*060201	DRB1*010106	DRB1*0309
DPB1*5101	DPB1*9801	DQB1*030202	DQB1*060202	DRB1*010107	DRB1*0310
DPB1*5201	DPB1*9901	DQB1*030203	DQB1*060301	DRB1*010108	DRB1*0311
DPB1*5301	DQA1*010101	DQB1*030204	DQB1*060302	DRB1*010109	DRB1*0312
DPB1*5401	DQA1*010102	[DQB1*030302]	DQB1*060401	DRB1*010110	DRB1*031301
DPB1*5501	DQA1*010201	DQB1*030303	DQB1*060402	DRB1*010201	DRB1*031302
DPB1*5601	DQA1*010202	DQB1*0304	DQB1*060403	DRB1*010202	DRB1*0314
DPB1*5701	DQA1*010203	DQB1*030501	DQB1*060501	DRB1*010203	DRB1*0315
DPB1*5801	DQA1*010204	DQB1*030502	DQB1*060502	DRB1*010204	DRB1*0316
DPB1*5901	[DQA1*0103]	DQB1*030503	DQB1*0606	DRB1*010205	DRB1*0317
DPB1*6001	DQA1*010401	DQB1*030504	DQB1*0607	[DRB1*0103]	DRB1*0318
DPB1*6101N	DQA1*010402	DQB1*0306	DQB1*060801	DRB1*0104	DRB1*0319
DPB1*6201	[DQA1*0105]	DQB1*0307	DQB1*060802	DRB1*0105	DRB1*0320
DPB1*6301	DQA1*0106	DQB1*0308	[DQB1*0609]	DRB1*0106	DRB1*0321
DPB1*6401N	DQA1*0107	DQB1*0309	DQB1*0610	DRB1*0107	DRB1*0322
DPB1*6501	[DQA1*0201]	DQB1*0310	DQB1*061101	DRB1*0108	DRB1*0323
DPB1*6601	[DQA1*030101]	DQB1*0311	DQB1*061102	DRB1*0109	DRB1*0324
DPB1*6701	[DQA1*0302]	DQB1*0312	DQB1*0612	DRB1*0110	DRB1*0325
DPB1*6801	[DQA1*0303]	DQB1*0313	DQB1*0613	DRB1*0111	DRB1*0326
DPB1*6901	[DQA1*040101]	DQB1*0314	DQB1*061401	DRB1*0112	DRB1*0327
DPB1*7001	DQA1*040102	DQB1*0315	DQB1*061402	DRB1*0113	DRB1*0328
DPB1*7101	DQA1*0402	DQB1*0316	DQB1*0615	DRB1*0114	DRB1*0329
DPB1*7201	DQA1*0403N	DQB1*0317	DQB1*0616	DRB1*0115	DRB1*0330
DPB1*7301	DQA1*0404	DQB1*0318	DQB1*0617	DRB1*0116	DRB1*0331
DPB1*7401	[DQA1*050101]	DQB1*0319	DQB1*0618	DRB1*0117	DRB1*0332
DPB1*7501	DQA1*050102	DQB1*0320	DQB1*0619	DRB1*0118	DRB1*0333
DPB1*7601	DQA1*0502	DQB1*0321	DQB1*0620	[DRB1*0119]	DRB1*0334
DPB1*7701	[DQA1*0503]	DQB1*0322	DQB1*0621	DRB1*0120	DRB1*0335
DPB1*7801	DQA1*0504	DQB1*0323	DQB1*0622	DRB1*0121	DRB1*0336
DPB1*7901	[DQA1*0505]	DQB1*0324	DQB1*0623	DRB1*0122	DRB1*0337
DPB1*8001	DQA1*0506	DQB1*0325	DQB1*0624	[DRB1*03010101]	DRB1*0338
DPB1*8101	DQA1*0507	DQB1*040101	DQB1*0625	DRB1*03010102	DRB1*0339
DPB1*8201	DQA1*0508	DQB1*040102	DQB1*0626N	DRB1*030102	DRB1*0340
DPB1*8301	DQA1*0509	[DQB1*0402]	DQB1*0627	DRB1*030103	DRB1*0341
DPB1*8401	DQA1*060101	DQB1*0403	DQB1*0628	DRB1*030104	DRB1*0342
DPB1*8501	DQA1*060102	[DQB1*050101]	DQB1*0629	DRB1*030105	DRB1*0343
DPB1*8601	DQA1*0602	DQB1*050102	DQB1*0630	DRB1*030106	[DRB1*040101]
DPB1*8701	DQB1*020101	[DQB1*050201]	DQB1*0631	[DRB1*030201]	DRB1*040102

DRB1*040103	DRB1*0437	[DRB1*0704]	DRB1*0826	DRB1**110801	DRB1**1146
DRB1*0402	DRB1*0438	DRB1*0705	DRB1*0827	DRB1**110802	DRB1**1147
DRB1*040301	DRB1*0439	DRB1*0706	DRB1*0828	DRB1**1109	DRB1**1148
DRB1*040302	DRB1*0440	DRB1*0707	DRB1*0829	DRB1**111001	DRB1**1149
DRB1*040303	DRB1*0441	DRB1*0708	DRB1*0830	DRB1**111002	DRB1**1150
DRB1*040304	DRB1*0442	DRB1*0709	DRB1*0831	DRB1**111101	DRB1**1151
[DRB1*0404]	DRB1*0443	DRB1*0710N	DRB1*0832	DRB1**111102	DRB1**1152
DRB1*040501	DRB1*0444	DRB1*0711	DRB1*0833	DRB1**111201	DRB1**1153
DRB1*040502	DRB1*0445	DRB1*0712	DRB1*0834	DRB1**111202	DRB1**11540
DRB1*040503	DRB1*0446	DRB1*0713	DRB1*0835	DRB1**111301	DRB1**11540
DRB1*040504	DRB1*0447	DRB1*0714	DRB1*0836	DRB1**111302	DRB1**1155
DRB1*040505	DRB1*0448	DRB1*0715	[DRB1*090102]	DRB1**111401	DRB1**1156
DRB1*040506	DRB1*0449	DRB1*0716	DRB1*090103	DRB1**111402	DRB1**1157
DRB1*040601	DRB1*0450	DRB1*0717	DRB1*090104	DRB1**1115	DRB1**1158
DRB1*040602	DRB1*0451	[DRB1*080101]	DRB1*090105	DRB1**1116	DRB1**1159
DRB1*040701	DRB1*0452	DRB1*080102	DRB1*090201	DRB1**1117	DRB1**1160
DRB1*040702	DRB1*0453	DRB1*080103	DRB1*090202	DRB1**1118	DRB1**1161
DRB1*040703	DRB1*0454	DRB1*080104	DRB1*0903	DRB1**111901	DRB1**1162
[DRB1*0408]	DRB1*0455	DRB1*080201	DRB1*0904	DRB1**111902	DRB1**1163
DRB1*0409	DRB1*0456	DRB1*080202	DRB1*0905	DRB1**1120	DRB1**1164
[DRB1*0410]	DRB1*0457	DRB1*080203	DRB1*0906	[DRB1**1121]	DRB1**11650
DRB1*0411	DRB1*0458	[DRB1*080302]	DRB1*0907	DRB1**1122	DRB1**11650
DRB1*0412	DRB1*0459	[DRB1*080401]	DRB1*0908	DRB1**1123	DRB1**1166
DRB1*0413	DRB1*0460	DRB1*080402	DRB1*100101	DRB1**1124	DRB1**1167
DRB1*0414	DRB1*0461	DRB1*080403	DRB1*100102	DRB1**1125	DRB1**1168
[DRB1*0415]	DRB1*0462	DRB1*080404	DRB1*100103	DRB1**1126	DRB1**1169
DRB1*0416	DRB1*0463	DRB1*0805	DRB1*1002	DRB1**112701	DRB1**1170
DRB1*0417	DRB1*0464	[DRB1*0806]	DRB1*1003	DRB1**112702	DRB1**1172
DRB1*0418	DRB1*0465	[DRB1*0807]	DRB1**110101	DRB1**112801	DRB1**1173
DRB1*0419	DRB1*0466	DRB1*0808	DRB1**110102	DRB1**112802	DRB1**12010
DRB1*0420	DRB1*0467	DRB1*0809	DRB1**110103	[DRB1**1129]	DRB1**12010
DRB1*0421	DRB1*0468	DRB1*0810	DRB1**110104	DRB1**1130	[DRB1**12020
DRB1*0422	DRB1*0469	DRB1*0811	DRB1**110105	DRB1**1131	DRB1**12020
DRB1*0423	DRB1*0470	DRB1*0812	DRB1**110106	DRB1**1132	DRB1**12020
DRB1*0424	DRB1*0471	DRB1*0813	DRB1**110107	DRB1**1133	DRB1**12020
DRB1*0425	DRB1*0472	DRB1*0814	DRB1**110108	DRB1**1134	DRB1**12030
[DRB1*0426]	DRB1*0473	DRB1*0815	DRB1**110201	DRB1**1135	DRB1**1204
DRB1*0427	DRB1*0474	DRB1*0816	DRB1**110202	DRB1**1136	DRB1**1205
DRB1*0428	DRB1*0475	DRB1*0817	[DRB1**1103]	DRB1**1137	DRB1**1206
DRB1*0429	DRB1*0476	DRB1*0818	DRB1**110401	DRB1**1138	DRB1**1207
DRB1*0430	DRB1*0477	DRB1*0819	DRB1**110402	DRB1**1139	DRB1**1208
DRB1*0431	DRB1*0478	DRB1*0820	DRB1**110403	DRB1**1140	DRB1**1209
[DRB1*0432]	[DRB1*07010101]	DRB1*0821	DRB1**110404	DRB1**1141	DRB1**1210
DRB1*0433	DRB1*07010102	DRB1*0822	DRB1**1105	DRB1**1142	DRB1**1211
DRB1*0434	DRB1*070102	DRB1*0823	DRB1**110601	DRB1**1143	DRB1**1212
DRB1*0435	DRB1*070103	DRB1*0824	DRB1**110602	DRB1**1144	DRB1**1213
DRB1*0436	DRB1*0703	DRB1*0825	DRB1**1107	DRB1**1145	DRB1**1214

DRB3*0203	DRB5*0107	MICA*020	MICB*0050203
DRB3*0204	[DRB5*0108N]	MICA*022	MICB*0050204
DRB3*0205	DRB5*0109	MICA*023	MICB*00503
DRB3*0206	DRB5*0110N	MICA*024	MICB*00504
DRB3*0207	DRB5*0111	MICA*025	MICB*00505
DRB3*0208	DRB5*0112	MICA*026	MICB*006
DRB3*0209	DRB5*0113	MICA*027	MICB*007
DRB3*0210	DRB5*0202	MICA*028	MICB*008
DRB3*0211	DRB5*0203	MICA*029	MICB*009N
DRB3*0212	DRB5*0204	MICA*030	MICB*010
DRB3*0213	DRB5*0205	MICA*031	MICB*011
DRB3*0214	DRB6*0101	MICA*032	MICB*012
DRB3*0215	DRB6*0201	MICA*033	MICB*013
DRB3*0216	DRB6*0202	MICA*034	MICB*014
DRB3*0217	DRB7*010101	MICA*035	MICB*015
DRB3*0218	DRB7*010102	MICA*036	MICB*016
DRB3*0219	DRB8*0101	MICA*037	MICB*018
DRB3*0220	DRB9*0101	MICA*038	MICB*019
DRB3*0221	MICA*001	MICA*039	MICB*020
DRB3*0222	MICA*00201	MICA*040	MICB*021N
DRB3*0223	MICA*00202	MICA*041	MICB*022
DRB3*0224	MICA*00203	MICA*042	
DRB3*030101	MICA*004	MICA*043	
DRB3*030102	MICA*005	MICA*044	
DRB3*030103	MICA*006	MICA*045	
DRB3*0302	MICA*00701	MICA*046	
DRB3*0303	MICA*00702	MICA*047	
DRB4*01010101	MICA*00703	MICA*048	
DRB4*0102	MICA*00801	MICA*049	
DRB4*01030101	MICA*00802	MICA*050	
[DRB4*01030102N]	MICA*00803	MICA*051	
DRB4*010302	MICA*00804	MICA*052	
DRB4*010303	MICA*00901	MICA*053	
DRB4*010304	MICA*00902	MICA*054	
DRB4*0104	MICA*010	MICA*055	
DRB4*0105	MICA*011	MICA*056	
DRB4*0106	MICA*01201	MICA*057	
DRB4*0107	MICA*01202	MICA*058	
DRB4*0201N	MICA*01203	MICB*001	
DRB4*0301N	MICA*013	MICB*0020101	
[DRB5*010101]	MICA*014	MICB*0020102	
DRB5*010102	MICA*015	MICB*003	
[DRB5*0102]	MICA*016	MICB*0040101	
DRB5*0103	MICA*017	MICB*0040102	
DRB5*0104	MICA*01801	MICB*0050101	
DRB5*0105	MICA*01802	MICB*0050201	
DRB5*0106	MICA*019	MICB*0050202	

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Kars'ın Arpaçay ilçesinde doğdu. İlkokul eğitimini 1992 yılında İbni Sina İlkokulu, Ortaokulu Dedekorkut İlköğretim okulunda tamamladı. 1997 yılında Mehmet Kemal Tuncel Lisesi'nden mezun olup 2000 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı ve buradan 2004 yılında mezun oldu. 2004-2005 yılında askerliğini tamamladıktan sonra Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında İmmünoloji biriminde HLA Doku Tayin Testleri çalışmaya başladı. 2006 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Hala Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında İmmünoloji biriminde çalışmaya devam etmektedir.