

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TÜBERKÜLOZ HASTALARINDA SİTOKİN GEN
POLİMORFİZMİ VE GENETİK YATKINLIK**

Mahmut ÜLGER

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

MERSİN - 2011

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TÜBERKÜLOZ HASTALARINDA SİTOKİN GEN
POLİMORFİZMİ VE GENETİK YATKINLIK**

Mahmut ÜLGER

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TM (MÜ) 2010-4 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 22

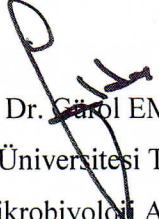
MERSİN - 2011

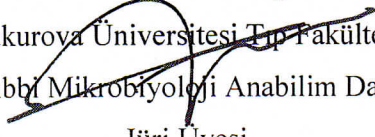
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

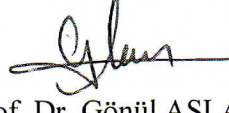
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Tüberküloz Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmi ve Genetik Yatkınlık” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

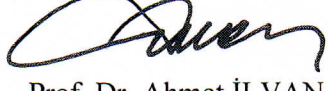
Tez Savunma Tarihi

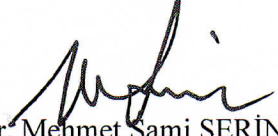
28.12.2011


Prof. Dr. Gülşen EMEKDAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı/Danışman


Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Prof. Dr. Gönül ASLAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Prof. Dr. Ahmet İLVAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 13.01.2012... tarih ve 2012/23.. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ülke ÇÖMELEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, her konuda yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a teşekkür ederim. Lisansüstü eğitimim süresinde destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e teşekkür ederim.

Çalışmamızın hasta kanı örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet İLVAN'a, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Zafer KARTALOĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Dilaver TAŞ'a teşekkür ederim.

Tezimin bulgularının değerlendirilmesi ve istatistiksel analizlerinin yapılması konusundaki yardımlarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN ve Arş. Gör. Didem DERİCİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'mızda görev yapan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni maddi ve manevi olarak destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Tarihçe.....	4
2.2. Epidemiyoloji.....	6
2.2.1. Dünyada TB.....	6
2.2.2. Türkiye’de TB.....	7
2.3. TB Patogenezi ve İmmünolojisi.....	9
2.3.1. TB Patogenezi.....	9
2.3.2. TB İmmünolojisi.....	12
2.3.2.1. Doğal İmmün Yanıt.....	13
2.3.2.2. <i>M. tuberculosis</i> ’e Karşı Kazanılmış İmmün Yanıt.....	20
2.3.2.2.1. Hümorale İmmün Yanıt.....	21
2.3.2.2.2. Hücresele İmmün Yanıt.....	22
2.4. TB Genetiği.....	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	41
3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler.....	41
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	42
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	42
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	43

3.2.3. Kullanılan Boyalar ve Çözeltiler.....	45
3.2.3.1. Kullanılan Boyalar.....	45
3.2.3.2. Kullanılan Çözeltiler.....	45
3.2.4. Kullanılan Besiyeri.....	47
3.3. Yöntemler.....	47
3.3.1. Biyokimyasal Testler.....	47
3.3.2. Moleküler Analiz.....	49
3.3.2.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	49
3.3.2.2. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Belirlenmesi.....	50
3.3.2.2.1. TNF- α Geni Promoter -308 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	50
3.3.2.2.2. IFN- γ Geni +874 T/A Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	52
3.3.2.2.3. IL-10 Geni Promoter -1082 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	55
3.3.2.2.4. IL-12B p40 Geni 1188 A/C Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	58
3.3.2.2.5. IL-4 Geni Promoter -590 C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	61
3.3.2.3. Agaroz Jel Elektropherez İşlemi.....	64
3.3.2.4. Tek Nükleotid Polimorfizminden Sorumlu Gen Bölgelerinin Tespiti.....	65
3.3.3. İstatistiksel Analiz.....	65
4. BULGULAR.....	67
4.1. Hasta ve Sağlıklı kontrol Gruplarının Genel Özellikleri.....	67
4.2. Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	69
4.2.1. TNF- α Geni Promoter -308 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	69
4.2.2. IFN- γ Geni +874 T/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	71
4.2.3. IL-10 Geni Promoter -1082 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	72
4.2.4. IL-12B p40 Geni 1188 A/C Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	74
4.2.5. IL-4 Geni Promoter -590 C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları.....	76
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	99

7. KAYNAKLAR.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1.** TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 184 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....70
- Şekil 4.2.** IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 261 bç'lik bölge ile insan büyüme hormonunun 426 bç'lik bölgesinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....71
- Şekil 4.3.** IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 550 bç'lik bölge ile insan büyüme hormonunun 426 bç'lik bölgesinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....73
- Şekil 4.4.** IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....74
- Şekil 4.5.** IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonrası 233, 165 ve 68 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jelelektroforez Görüntüsü.....75
- Şekil 4.6.** IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 254 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....76
- Şekil 4.7.** IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 254 bç'lik bölgenin *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonrası 254 ve 210 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri.....	51
Çizelge 3.2. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı.....	51
Çizelge 3.3. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları.....	52
Çizelge 3.4. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri.....	53
Çizelge 3.5. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizminde kullanılan internal kontrol primer dizileri.....	53
Çizelge 3.6. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı.....	54
Çizelge 3.7. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları.....	55
Çizelge 3.8. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri.....	55
Çizelge 3.9. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizminde kullanılan internal kontrol primer dizileri.....	56
Çizelge 3.10. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı.....	57
Çizelge 3.11. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları.....	58
Çizelge 3.12. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri.....	58
Çizelge 3.13. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı.....	59
Çizelge 3.14. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları.....	60
Çizelge 3.15. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı.....	60
Çizelge 3.16. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları.....	61

Çizelge 3.17. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri.....	61
Çizelge 3.18. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı.....	62
Çizelge 3.19. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları.....	62
Çizelge 3.20. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı....	63
Çizelge 3.21. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları.....	63
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımı.....	67
Çizelge 4.2. Hasta grubunu oluşturan 84 kişinin tanısı.....	68
Çizelge 4.3. Tutulum yeri, cinsiyet ve ARB sonuçlarına göre hastaların dağılımı.....	68
Çizelge 4.4. Birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli olduğu belirlenen 24 hastanın direnç profili.....	69
Çizelge 4.5. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki TNF- α geni promoter -308 G/A allel ve genotip dağılımı.....	70
Çizelge 4.6. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki IFN- γ geni +874 T/A allel ve genotip dağılımı.....	72
Çizelge 4.7. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki IL-10 geni promoter -1082 G/A allel ve genotip dağılımı.....	73
Çizelge 4.8. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki IL-12B p40 geni 1188 A/C allel ve genotip dağılımı.....	75
Çizelge 4.9. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki IL-4 geni promoter -590 C/T allel ve genotip dağılımı.....	78
Çizelge 4.10. Çalışmaya dahil edilen 84 hastanın ARB sonuçlarına göre allel ve genotip dağılımı.....	79
Çizelge 4.11. Akciğer TB' u tanısı alan 76 hastanın ARB sonuçlarına göre allel ve genotip dağılımı.....	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ARMS	Amplification Refractory Mutational System
ASH	Antijen Sunucu Hücre
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
CD	Cluster Designation
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
IFN-γ	İnterferon Gama
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
MHC	Major Histocompatibility Complex
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
NO	Nitrik Oksit
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücre (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PPD	Purified Protein Derivery
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNI	Reaktif Nitrojen Ara Ürünleri (Reactive Nitrogen Intermediates)
ROI	Reaktif Oksijen Ara Ürünlerinin (Reactive Oxygen Intermediates)
TB	Tüberküloz
Th1	Yardımcı T Hücre 1 (T helper 1)
Th2	Yardımcı T Hücre 2 (T helper 2)
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

ÖZET

Tüberküloz Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmi ve Genetik Yatkınlık

Tüberküloz (TB) biyolojik, sosyoekonomik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı karmaşık bir hastalıktır. *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte kişilerin sadece %10'unda aktif hastalık geliştiği için, konak genetiğinin TB için risk faktörlerini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada, hastalığa karşı duyarlılık veya direnç ile ilişkili olduğu belirtilen, sitokin üretiminden sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığının "Amplification Refractory Mutational System (ARMS) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve PZR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Tek nükleotid polimorfizm varlığı tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) geni promoter -308 G/A bölgesinde, interferon gama (IFN- γ) geni +874 T/A bölgesinde, interlökin (IL)-12B p40 geni 1188 A/C bölgesinde, IL-10 geni promoter -1082 G/A bölgesinde ve IL-4 geni promoter -590 C/T bölgesinde araştırılmıştır.

Klinik materyalinde *M. tuberculosis* kompleks izole edilen 84 hastanın 71 (%84.52)'i erkek, 13 (%15.48)'ü kadındı (yaş ortalamaları 32.57±15.94). Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 110 kişinin 93 (%84.55)'ü erkek, 17 (%15.45)'si kadındı (yaş ortalamaları 29.40±11.56). Hastaların 76 (%90.48)'sı akciğer TB'u iken 8 (%9.52)'i akciğer dışı TB olarak tespit edildi. Hastaların 79 (%94.05)'u yeni tanı konmuş TB hastası iken, 5 (%5.95)'inde daha önceden geçirilmiş TB öyküsü (nüks TB) olduğu belirlendi. Hastaların 58 (%69.05)'inde asido rezistan basil pozitifliği belirlendi.

Tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarına göre TNF- α geni -308 G/A bölgesi polimorfizmi için sağlıklı kontrol grubumuz dengedeysen, hasta grubumuz dengede olmadığından bu iki grubun gen frekansları bakımından karşılaştırılması yapılamamıştır. IFN- γ geni +874 T/A bölgesi, IL-12B p40 geni 1188 A/C bölgesi, IL-10 geni -1082 G/A bölgesi ve IL-4 geni -590 C/T bölgesi polimorfizmleri sonucu allel ve genotip dağılımlarında hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak, çalışılan bu grupta sitokin salınımindan sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığı ile TB'a direnç ya da duyarlılık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu çalışmada sadece sitokin salınımindan sorumlu gen bölgelerindeki bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu konunun daha iyi aydınlatılması için hasta ve kontrol grubunun genişletilerek insan lökosit antijeni (HLA) tiplerinin ve sitokin salınımindan sorumlu gen bölgelerindeki diğer polimorfizmlerin de çalışılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *M. tuberculosis*, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, Polimorfizm

ABSTRACT

Cytokine Gene Polymorphism in Tuberculosis Patients and Genetic Susceptibility

Tuberculosis (TB) is a complex disease with biological, socioeconomic and environmental factors. Since only 10% of individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* go on to develop active disease, it has been suggested that host genetics may influence the risk for TB. In this study, we aimed to investigate the presence of single nucleotide polymorphisms in the gene regions responsible for cytokine production, indicated to be associated with susceptibility or resistance against the disease, by Amplification Refractory Mutational System (ARMS) Polymerase Chain Reaction (PCR) and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) methods. The presence of single nucleotide polymorphisms were analyzed in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene promoter -308 G/A region, interferon gamma (IFN- γ) gene +874 T/A region, interleukin (IL)-12B p40 gene 1188 A/C region, IL-10 gene promoter -1082 G/A region and IL-4 gene promoter -590 C/T region.

Of the 84 patients from whose clinical material *M. tuberculosis* complex was isolated, 71 (84.52%) were males, 13 (15.48%) were females (mean age 32.57 \pm 15.94). Of the 110 healthy controls, 93 (84.55%) were males, 17 (15.45%) were females (mean age 29.40 \pm 11.56). Of the 84 patients, 76 (90.48%) were pulmonary TB while 8 (9.52%) were extrapulmonary TB. While 79 patients (94.05%) were newly diagnosed as TB, 5 patients (5.95%) had a TB history. It was detected that acid resistant bacilli were positive in 58 (69.05%) patients.

According to the single nucleotide polymorphism results, comparison of the gene frequencies could not be done in TNF- α gene -308 G/A region because healthy controls were in equilibrium while the patients were not. There were no significant differences in allele and genotype distribution between the patients and healthy controls in IFN- γ gene +874 T/A region, IL-12B p40 gene 1188 A/C region, IL-10 gene -1082 G/A region and IL-4 gene -590 C/T region.

In conclusion, no statistically significant differences were found between the susceptibility or resistance to TB with single nucleotide polymorphisms in the gene regions responsible for cytokine production in the studied population. In this study, the existence of the some single nucleotide polymorphisms in the gene regions those are responsible from only cytokine production were investigated. For the clarification of this subject, with enlarged patients and healthy controls, human leukocyte antigen types and other polymorphisms in gene regions, responsible for cytokine production should be studied.

Key words: *M. tuberculosis*, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, Polymorphism

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ile enfekte olup bunların büyük çoğunluğunu geliştirmekte olan ülkelerdeki insanlar oluşturmaktadır (1). Tüberküloz (TB) yılda yaklaşık 1.3 milyon insanın ölümüne sebep olan, en yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyon hastalıklarının başında gelmektedir. Her yıl yaklaşık 8.9-9.9 milyon kişi *M. tuberculosis* ile enfekte olmaktadır. Enfekte kişilerinde yaklaşık %5-10'unda hastalığın klinik formu gelişmektedir. Bu hastaların çok azında İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus-HIV) ya da diyabet gibi risk faktörleri tanımlanmıştır. Diğer hastalarda genetik yatkınlık ve çevresel faktörler aktif TB'un gelişmesine katkıda bulunmaktadır. TB'a duyarlılık ile ilgili konak genetik faktörlerinin tanımlanması, bu enfeksiyon hastalığının küresel kontrolüne katkıda bulunacaktır (2).

Fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda *M. tuberculosis*'e karşı etkili immün cevabın oluşturulmasında kritik öneme sahip çeşitli genler ve yollar ortaya çıkarılmış olmasına rağmen insanlarda immün sistemin düzenlenmesi ile ilgili mekanizmaların büyük bir kısmı hala tam olarak bilinmemektedir. 1921'den beri mevcut olup halen geniş çapta kullanılan Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısı, TB'a karşı kısmi ve değişken bir koruma sağlamaktadır. BCG aşısı suşları arasındaki değişkenlik, çevresel mikobakterilere daha önceden maruziyet sonrası immün cevabın düzenlenmesi ve genetik faktörler gibi BCG'nin bu değişken etkinliğini açıklamaya çalışan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. 50 yılı aşan süre boyunca yapılan çalışmaların sonuçlarına göre konak genetik faktörleri TB'a duyarlılığı etkilemektedir. İlk olarak, yapılan ikiz çalışmaları sonucu TB'a yakalanma oranının monozigot ikizlerde dizigot ikizlere oranla iki kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Daha sonra, genom ilişkili çalışmalar sonucunda hastalığa karşı çeşitli duyarlılık bölgeleri tanımlanmış ve bu genler üzerine yapılan çalışmalar devam etmektedir. En son olarak, bu konu ile ilgili aday gen çalışmalarında TB duyarlılığı ile ilgili değişik bölgeler rapor edilmiş ve bu bölgelerdeki polimorfizmlerin duyarlılıktaki rolleri belirtilmiştir (3).

M. tuberculosis ile enfeksiyon sonrası oluşan immün cevap, basil ile konak savunma mekanizmalarının arasındaki dengeyi yansıtmaktadır. TB'a karşı oluşturulan

immün cevap antijen sunucu hücre (ASH)'ler, "Cluster Designation" (CD)4+ ve CD8+ T lenfositler, makrofajlar, monositler ve sitokinler arasındaki etkileşimin karmaşık ilişkisi ile düzenlenmektedir. *M. tuberculosis*'e karşı oluşturulan cevapta sitokinlerin etkili bir şekilde üretilmesi ile konak hücrelerde bakteriler yok edilir. *M. tuberculosis* enfeksiyonu sırasında, basile maruziyetin üçüncü haftasında salgılanan ve makrofajları aktive ederek granülom oluşumuna izin veren anti-mikrobisidal aktivite meydana getiren T helper (Th)1 tipi sitokinlerin koruyucu immünitede çok önemli oldukları gösterilmiştir (4).

İnterferon gama (IFN- γ), makrofaj aktivasyonu ve "major histocompatibility complex" (MHC) sınıf II ile birlikte anti-tümör ve anti-mikrobisidal aktivitelerin uyarılmasındaki en önemli sitokinlerden biridir. IFN- γ geni +874 timin (T)/adenin (A) ve 3' "untranslated region" (UTR) 5644 A/guanin (G) bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin TB'a duyarlılık ile ilişkisi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4).

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) inflamatuvar cevabın başlatılması, düzenlenmesi ve devam ettirilmesinde önemli rolü olan güçlü bir pro-inflamatuvar ve immünregülatör sitokindir. TNF- α ayrıca mikobakteriyal enfeksiyonlara karşı oluşturulan cevapta apoptozisin başlatılmasında gereklidir. TNF- α geni -1031 T/sitozin (C), -863 C/A, -857 T/C, -308 G/A ve -238 G/A tek nükleotid polimorfizmleri ile TB'a duyarlılık arasındaki ilişkiyi gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (4).

İnterlökin (IL)-12, aktive makrofajlar, monositler, B lenfositleri ve dendritik hücre (DH)'ler tarafından üretilen ve Th1 yanıtını uyaran bir heterodimerik pro-inflamatuvar sitokindir. Bu sitokin, hücre içi yerleşen patojenlere karşı uzun dönem korunmayı düzenleyen hafıza/efektör Th1 hücrelerinin oluşturulmasında önemlidir. IL-12B 3' UTR +1188 ve 3' UTR +16974 A/C gen bölgesi polimorfizmleri ile TB arasındaki ilişkinin varlığı değişik çalışmalarda araştırılmıştır (5).

IL-10, *M. tuberculosis* fagosite edildikten sonra makrofajlar ve T lenfositler tarafından üretilen anti-inflamatuvar bir sitokindir. Bu sitokin, IFN- γ , TNF- α ve IL-12 gibi pro-inflamatuvar sitokin cevabını azaltmaktadır. IL-10 geni promoter bölgesindeki -3575 T/A, -2763 C/A, -1082 A/G, -819 C/T ve -592 C/A tek nükleotid polimorfizmleri ile TB'a duyarlılık arasındaki ilişkiyi gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (6).

IL-4, IFN- γ 'nın etkinliğini azaltan anti-inflamatuvar bir sitokindir ve TB hastaları üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Ayrıca Th2 hücrelerinin uyarılmasını

sağlar. IL-4 promoter -1089 T/G, -590 C/T, -33 T/C ve IL-4 intron 3 “Variable Number of Tandem Repeats” (VNTR) gen bölgelerindeki polimorfizmlerin TB’ a karşı duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (7).

TB’ a genetik yatkınlık üzerine yaptığımız bu çalışmada, hastalığa karşı duyarlılık veya direnç ile ilişkili olduğu belirtilen, sitokin üretiminden sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığının “Amplification Refractory Mutational System (ARMS) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve PZR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Tek nükleotid polimorfizm varlığı Th1 tipi pro-inflamatuvar sitokinler (TNF- α geni promoter -308 G/A bölgesi, IFN- γ geni +874 T/A bölgesi, IL-12B p40 geni 1188 A/C bölgesi) ile Th2 tipi anti-inflamatuvar sitokinlerde (IL-10 geni promoter -1082 G/A bölgesi, IL-4 geni promoter -590 C/T bölgesi) incelenecektir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Tarihçe

Mycobacterium cinsinin 150 milyon yıl öncesinden beri var olduğu düşünülmektedir (8, 9). TB'un varlığı Mısır'da 5.000, Hindistan'da 3.300 ve Çin'de 2.300 yıl önce belgelendirilmiştir (8). TB geniş coğrafik dağılımı olan çok eski bir hastalıktır. Bu hastalık Mısır ve Roma'da geniş alanlara yayılmış; Amerika'da Columbus'tan önce var olduğu belirlenmiştir (9).

Mikobakterilerin, lipit bakımından zengin hücre duvarları ve stabilitelelerini artıran DNA'larındaki yüksek G-C oranından dolayı diğer bakterilere göre daha iyi korunmuş oldukları düşünülmektedir. (10).

Verem terimine ilk olarak Yunan kaynaklarında rastlanmaktadır. Milattan önce 460 yıllarında Hipokrat, veremi, zamanın en geniş yayılımı olan hastalık olarak tanımlamıştır. Daha sonraları "Büyük Beyaz Veba" olarak bilinen 17. yy.'ın başlarında başlayan ve sonraki iki yüz yıl boyunca devam eden TB'un, Avrupa'da epidemik olduğu belirtilmiştir (9).

Bu hastalığın doğru patolojik ve anatomik tanımlaması 17. yy.'da ortaya çıkmıştır. Franciscus Sylvius de la Böe (1614-1672), hastaların akciğerlerinde ve diğer bölgelerinde tutarlı ve karakteristik değişiklikleri tanımlayan ilk kişidir. 1679'da yayımlanan *Opera Medica* adlı kitapta, lezyonların tüberküllerden ülserlere ve kavitelere gelişimi tanımlamıştır (9, 11).

Gaspard Laurent Bayle (1774-1816) tüberküllerin ürün veya sonuç olmadığını ama hastalığın önemli nedenlerinden olduğunu söylemiştir. "*tuberculosis*" terimi Bayle'in teorisi ile aynı zamanda tıp literatürüne girmiştir. Alman doktor Johann Lukas Schönlein (1793-1864) 1839'da "*tuberculosis*" terimini tüberküllü hastalığı tanımlamak için kullanmış ama scrofula ve veremin farklı terimler olduğunu düşünmüştür (9).

Robert Koch (1843-1910), TB basilini 1882 yılında izole etmiş; 1884 yılında kültürünü yapıp, kültür bakterileri ile deney hayvanlarında TB oluşturabileceğini kanıtlamış; 1890 yılında "old tüberkülin"i hazırlayarak, TB'lularda geç tipte aşırı duyarlılığı, bağışıklığı ve kendi adıyla anılan "Koch Fenomeni"ni açıklamıştır.

Tüberkülinin terapötik değerinin olmadığı sonradan anlaşılmasına rağmen, deri testi olarak *M. tuberculosis* ile enfekte kişilerin saptanmasında önemli gösterge olduğunun ortaya konması; 1905 yılında Koch'a Nobel ödülünü kazandırmıştır (12).

Edward Jenner'in inek çiçeği ile enfeksiyonun çiçek hastalığına karşı immünite geliştirebileceğini göstermesinden sonra, birçok doktor sığır TB'ü etkeni olan *M. bovis*'i kullanarak insan TB'una karşı aşı geliştirmeye yönelmiştir. 1908'den 1919'a kadar Albert Calmette (1863-1933) ve Camille Guerin (1872-1961) tarafından Fransa'da *M. bovis*'in patojenik suşunun 230 defa seri pasajı yapılmıştır. Bu pasajların sonunda BCG diye bilinen, sığırlarda, atlarda, tavşanlarda ve kobaylarda avirulan olan, attenué suş elde edilmiştir. BCG insanlara ilk kez 1921'de uygulanmış ve halen geniş çapta uygulanmaktadır (9).

İkinci Dünya Savaşı'nın ortalarında, kemoterapi döneminin başlamasıyla, binlerce yıldır insanlığı tehdit eden bakteriye karşı en önemli gelişme meydana gelmiştir. 1944'te Selman Waksman (1888-1973) ve öğrencisi Albert Shatz (1920-2005) *Streptomyces griseus*'tan streptomisin (SM)'i saflaştırmayı başarmışlardır. İlaç basillere karşı *in vitro*, enfeksiyonu takiben kobaylarda da *in vivo* aktivite göstermektedir. İlaç 1944 yılının sonlarında insanlarda kullanılmaya başlanmıştır. SM tedavisinde hastalarda önemli gelişmeler gözlenmiştir. Ama birinci ayın sonunda bazı hastalar kötüleşmeye başlamış ve bu öncü çalışmalar uygun bir şekilde yorumlanamamış; bunun gibi tedavi başarısızlıkları ilaca karşı direncin gelişmesi ile sonuçlanmıştır. Yine 1944 yılının sonlarında para-aminosalisilik asit geliştirilmiş, SM ve para-aminosalisilik asit ile kombine tedavinin tek ilaçlı tedaviden daha üstün olduğu gösterilmiştir. 1952 yılında Robizek ve Selikof tarafından izoniazid (INH)'in bulunmasından sonra üç ilaçla 18-24 ay süren kombine tedavi uygulanması sonucu TB tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir (9).

Sonuçta bu buluşlara rağmen TB, hala güçlü bir şekilde mevcudiyetini devam ettirmektedir. Balgam yayma pozitif TB hastaları öksürme, hapsirme ve konuşma sırasında canlı basil içeren büyük veya küçük damlacıklar çıkartabilirler. Enfektivitenin, çevresel koşullarla ve balgamdaki basil içeriği, kavitasyon varlığı, öksürme sıklığı, larengeal TB varlığı gibi kişisel koşullar ile ilişkili olduğu da bulunmuştur (9).

2.2. Epidemiyoloji

TB insanlık tarihi kadar eski bir hastalık olmasına rağmen hala tüm dünyada bir toplum sağlığı sorunu olarak önemini korumaktadır. TB basili ile enfekte olan insanların çok azında klinik olarak hastalık gelişmektedir. TB basili, konakçı hücrelerde çok uzun süre latent olarak canlılığını sürdürebilmekte ve yıllar sonra ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle basilin eradikasyonu zordur. TB oluşumundan basil ile birlikte sosyal, kültürel, ekonomik ve genetik pek çok etkenin predispozan rol oynadığı bilinmektedir (13, 14). Dünya nüfusunun üçte biri TB basili ile enfekte olup bunların büyük çoğunluğunu geliştirmekte olan ülkelerdeki insanlar oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki enfekte bireylerin %80'i 50 yaş ve üzerinde iken geliştirmekte olan ülkelerdeki bireylerin %77'si 50 yaş ve altındakilerden oluşmaktadır (1).

2.2.1. Dünyada TB

TB kontrolü ile ilgili olarak “Bin Yıl Kalkınma Hedefleri” ve “Stop TB Ortaklığı Hedefleri” çerçevesinde; 2015 yılına kadar insidansın azaltılması, prevalans ve mortalitenin 1990'daki seviyelerinin yarısına düşürülmesi, yeni yayma pozitif akciğer TB hastalarının en az %70'inin kalite kontrollü bakteriyolojik muayene ile tespit edilmesi ve yeni yayma pozitif akciğer TB hastalarının en az %85'inin başarı ile tedavi edilmesi hedefleri belirlenmiştir (15).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Küresel TB Kontrolü 2010 Raporu verilerine göre 2009 yılında, TB olgu insidansı 9.4 milyon, prevalansı 14 milyon olarak belirtilmiştir. HIV negatif kişilerde 1.3 milyon, HIV pozitif kişilerde ise 0.38 milyon ölüm görülmektedir. Olguların büyük çoğunluğu Güneydoğu Asya (%35), Afrika (%30) ve Batı Pasifik (%20) Bölgeleri'nde bulunmaktadır. En fazla toplam TB olgu insidansı sırasıyla Hindistan, Çin, Güney Afrika, Nijerya ve Endonezya'da görülmüştür (16). TB olgu insidansının %11-13'ünün HIV pozitif olduğu tahmin edilmektedir ve bu olguların %80'i Afrika Bölgesi'ndedir (15).

2009 yılında 5.8 milyon TB olgusu bildirilmiştir. Bu olguların 250.000'inin çok ilaca dirençli TB (ÇİDTB) olduğu tahmin edilmektedir. Bu olguların da 30.000'den fazlası ÇİDTB olarak teşhis edilmiş ve bildirilmiştir (15).

İnsidans oranlarının dünya genelinde ve DSÖ'nün beş bölgesine düştüğü, Güneydoğu Asya Bölgesi'nde ise sabit olduğu belirtilmiştir. Ölüm oranının dünya genelinde 1990-2009 yılları arasında yaklaşık %35 oranında azaldığı görülmüştür. Afrika Bölgesi'nde ölüm oranının azalmasına rağmen diğer beş bölgede, ölüm oranı hedeflerine ulaşılmıştır (15).

Prevalans oranları dünya genelinde ve altı bölgede düşmektedir. Dünya genelinde prevalansı 2015 yılına kadar 1990 yılı oranının yarısına indirme hedefinin gerçekleşmeyeceğinin görüldüğü fakat prevalanstaki azalma oranları ile bu hedefe Amerika, Doğu Akdeniz ve Batı Pasifik Bölgeleri'nde ulaşılacağı belirtilmiştir (15).

2.2.2. Türkiye'de TB

TB kontrolünde ülkemizde DSÖ tarafından uygulanan küresel kontrol programı ile paralel ve aynı standartlarda bir "Ulusal TB Kontrol Programı" uygulanmaktadır. Ülkemizde TB kontrol programının planlanması ve yürütülmesinden Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı (VSDB) sorumludur (17).

DSÖ'nün önerilerini içeren ve tüm ülkeler tarafından 2007 yılında kabul edilen "Berlin Deklarasyonu" kapsamında Türkiye'de "TB'ü Durdurma Stratejisi"ni uygulamayı taahhüt etmiş ve strateji gerekleri ülkemizde de uygulanmaya başlanmıştır (17).

"DSÖ Küresel TB Kontrolü 2010 Raporu" verilerine göre ülkemizin de içinde yer aldığı DSÖ Avrupa Bölgesi'nde 2009 yılı TB insidansı ortalaması yüz binde 47 iken, Türkiye'nin TB insidansı yüz binde 29'dur. Dünya genelinde 2009 yılı TB insidansı ortalaması ise yüz binde 137'dir. 2002-2009 yılları arasında insidanstaki değişim yüzdesi dünya genelinde -2.1, DSÖ Avrupa Bölgesi'nde -13 iken Türkiye'de -27.5'dir (17).

DSÖ, TB kontrol programlarının başarı göstergesi olarak prevalansı esas almaktadır. DSÖ'nün TB prevalansı ile ilgili hedefi, "TB prevalansını 2015 yılına

kadar, 1990 yılına kıyasla yarıya düşürmektir". Türkiye'nin 1990 yılında yüz binde 52 olan TB prevalansı 2006 yılında yüz binde 26'ya düşürülmüş ve prevalans hedefine ulaşılmıştır. 2009 yılında ise Türkiye'nin TB prevalans hızı yüz binde 25 iken DSÖ Avrupa Bölgesinde yüz binde 63, dünya genelinde ise yüz binde 201'dir. 2002-2009 yılları arasında prevalanstaki değişim yüzdesi dünya genelinde -14.1, DSÖ Avrupa Bölgesi'nde -17.1 iken Türkiye'de -35.9'dur (17).

Türkiye'de Verem Savaşı 2011 Raporu'nda, TB hastalarının tanı ve tedavileri uzun süreli programlar dahilinde yürütüldüğü için 2011 raporunda 2010 yılı çalışmaları, 2009 yılı TB hasta verileri, 2008 yılı TB hastalarının tedavi sonuçları ve 2007 yılı ÇİDTB hastalarının ikinci yıl tedavi sonuçları sunulmuştur (17).

- **2009 yılı TB hasta verileri**

Toplam 17.402 TB hastası 2009 yılında verem savaşı dispanserleri kayıtlarına girmiştir. Toplam olgu hızı yüz binde 25.8'den yüz binde 24'e (-%7) düşüş göstermiştir. Hastaların 10.519 (%60.4)'u erkek, 6.883 (%39.6)'ü kadındır. Erkek/Kadın oranı 1.5'tir. Olgu hızı erkeklerde yüz binde 28.8 ve kadınlarda yüz binde 19.1'dir. Olgu hızının yaş gruplarına dağılımı incelendiğinde, 15-24 yaş grubundan başlayarak yükseldiği, 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek düzeye (yüz binde 40.6) ulaştığı görülmektedir (17).

Toplam 17.402 hastada yeni olguların oranı %91.6 (15.943) iken önceden tedavi görmüş olguların oranı %8.4 (1.459)'tür. Önceden tedavi görmüş olguların toplam hasta içindeki oranları; %6.8 (1.177) nüks, %1.1 (185) tedaviyi terkten dönen, %0.4 (83) tedavi başarısızlığından gelen ve %0.1 (14) kronik olgudur (17).

İlaç duyarlılık testi yapılan toplam 4.320 hastanın (4.311 akciğer+9 akciğer dışı) sonuçları incelendiğinde; %19 (827/4.320) 'unda en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranda direncin %13 ile izoniyazide karşı (564/4.320) geliştiği görülmüştür. İlaç duyarlılık testi yapılan 4.320 olgunun 222 (%5.1)'sinin ÇİDTB olduğu tespit edilmiştir. İlaç duyarlılık testi yapılanlarda ÇİDTB oranı yeni olgularda %2.7 (99) iken, önceden tedavi görmüş olgularda %20.5 (123) olarak saptanmıştır (17).

- **Tedavi sonuçları, 2008 yılı hastaları**

Verem savaşı dispanserlerinde 2008 yılında toplam 18.236 hastanın (16.569 yeni ve 1.667 önceden tedavi görmüş olgu) tedavi başlangıcından 12 ay sonraki tedavi sonuçlarına göre tedavi başarısı %91 (16.588/18.236); yeni olgularda %92.5 (15.326/16.569), önceden tedavi görmüş hastalarda %75.7 (1.262/1.667) olarak tespit edilmiştir. Kadın hastalarda tedavi başarısı %92.7 ve tedavi terki %2.3 iken, aynı oranlar erkeklerde sırasıyla %89.9 ve %3.7'dir. Kadın hastaların tedavi sonuçlarının daha iyi olduğu anlaşılmaktadır (17).

Yıllara göre tedavi sonuçları incelendiğinde tedavi başarısının arttığı (2005 yılında %87.5, 2006 yılında %89.4, 2007 ve 2008 yıllarında %91) ve tedavi terkinin azaldığı (2005 yılında %5.7, 2006 yılında %4.7, 2007 yılında %4 ve 2008 yılında %3.2) görülmektedir. 2007 yılı ÇİDTB olgularının ikinci yıl (24. ay) tedavi sonuçları değerlendirilmiş olup tedavi başarısı %64.6 (155/240)'dır (17).

2.3. TB Patogenezi ve İmmünolojisi

2.3.1. TB Patogenezi

TB basilleri insan vücuduna çok değişik bölgelerden (solunum, sindirim, deri ve konjunktiva) girebilir. Ancak en önemli bulaş yolu inhalasyondur. Her ne kadar ilk yerleştikleri organlar farklı olsa da, meydana gelen patolojik olaylar daima aynıdır. Bulaş sonrası enfeksiyon oluşup oluşmaması veya hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virulans arasındaki dengeye bağlıdır. Aktif TB'lu kişiler çevreye, içinde değişik sayıda basil bulunan damlacıklar (Pflugge damlacıkları) saçarlar. Normal solunum sırasında çok az olan damlacık sayısı, öksürükle 3.500'e, hapşırma ile bir milyona kadar ulaşır (18, 19).

TB basili ile karşılaşan konakta basile karşı oluşan hücrel immunité ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları, TB patogenezinin esasını oluşturur. Basilin çoğalması ile ona karşı gelişen yanıtın etkileşimi hastalık tablolarından sorumludur.

Hücrel immunité hasta için yararlı olurken özellikle yüksek konsantrasyondaki antijenik uyarıma karşı oluşan şiddetli hücrel immunité ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları çevre dokularda nekroza, kaviteleşmeye yol açan zararlı bir reaksiyon olarak ortaya çıkar (20).

TB patogenezi ile ilgili ilk çalışmalar Koch'un basil antijenine karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu olduğunu anlatan Koch Fenomeni'ni tanımlamasıyla başlamış; Lurie'nin tavşanlarda yaptığı çalışmalar, alveolar makrofajların ilk enfeksiyondan kavite oluşumuna kadar devam eden olayları açıklayan dört evrenin tanımlanmasını sağlamıştır (11).

- **Evre I: Başlangıç Evresi-İnvazyon (1. Hafta)**

Sağlıklı kişiler tarafından solunan bu damlacıkların büyük olanları burun ve bronş yüzeyindeki silialar tarafından tutulurken, içinde 1-3 basil bulunan küçük partiküller kolaylıkla alveollere ulaşır ve bakteriler, alveolar makrofajlarla fagosite edilir. Fagozom ile lizozom birleşir; proteolitik enzimlerin etkisiyle basil öldürülmeye çalışılır. Eğer makrofajın sahip olduğu mikrobiyosidal aktivite bakteriyi öldürmeye yeterse, basiller ortadan kaldırılır ve enfeksiyon oluşmadan olay sonlanır. Bu durumda kişide radyolojik bulgu saptanmaz (18, 19).

- **Evre II: Basillerin Logaritmik Çoğalması ve Erken TB Lezyonu (2-3. Hafta)**

Bakterinin virulans faktörlerinden (kord faktör, sülfatidler ve diğer asidik lipidler) dolayı makrofajlarca fagosite edilen basiller yok edilemezse basil hücre içinde çoğalmaya başlar. Virulan basiller makrofajlarda fagozom-lizozom füzyonunu bozmakta, fagozomu tahrip etmekte ve yüksek konsantrasyonda amonyum iyonları ile siklik adenozin monofosfat (cAMP) salgılayarak sindirilmekten korunmaktadır. Basiller belirli bir sayıya ulaşınca makrofajları parçalayarak alveolar boşluğa salınırlar. Salınan basiller hücrel debris ve konakçıdan salınan birçok kemotaktik faktör (kompleman bileşikleri, C5a, sitokinler) etkisi ile dolaşımdaki inaktif makrofajların lezyon bölgesine gelmesine neden olur. İnaktif makrofajların sitoplazmalarındaki vakuoller, basilin logaritmik çoğalması için ideal bir ortam oluşturur. Konak ve basil ortak bir yaşam

sürer. Basil yüklü makrofajlar lenfatiklerle bölgesel lenf bezlerine (hiler, mediastinal, supraklavikular) taşınırlar. Sonuçta parankim odağı (Ghon odağı), hiler lenfadenopati ve ikisi arasında lenfanjitten oluşan bir kompleks (primer kompleks, Ranke kompleksi) ortaya çıkar. Basiller burada kontrol altına alınamazlarsa, hematojen yolla tüm vücuda yayılarak çoğalmaya devam ederler. Hücrel immün yanıtın henüz gelişmediği bu dönemde konağın özgül olmayan savunması, basillerin çoğalmasını engelleyememektedir. Hematojen yayılımla basiller akciğerlerin apeksine yerleşerek Simon odaklarını, beyin-meninkslere yerleşerek Rich odaklarını oluştururlar. Ayrıca karaciğer, dalak, böbrek, böbreküstü bezleri, kemik ve seröz zarlara da yerleşebilirler. Buralarda sessiz halde (dormant) bulunan bakteriler yaşamın herhangi bir döneminde erişkin (reenfeksiyon) tipi TB'a neden olabilirler (18, 19).

- **Evre III: Hücrel İmmün Yanıt ve Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılığın Gelişimi (3-9 hafta)**

Bu evrede basilin logaritmik gelişimi durdurulmaya başlar; hem hücrel immün yanıt hem de gecikmiş tip aşırı duyarlılığın gelişimi gözlenir. Bu dönemde basil sayısı hücrel immün yanıt tarafından yok edilemeyecek kadar fazladır. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı, basil yüklü makrofajları ve çevre dokuları harap ederek inaktif makrofajlar içerisindeki basillerin logaritmik üremelerini durdurur. Konakçının bu yanıtı, granülom merkezinde kazeöz nekroz odaklarının oluşmasına yol açar. Oluşan kazeöz nekroz ortamında, basiller canlılıklarını sürdürmekle beraber anoksik koşullar, düşük pH, toksik yağ asitlerinin varlığı gibi sebeplerden ötürü basiller çoğalamaz. Basillerin bir kısmı ölür, diğerleri de yıllarca dormant halde kalırlar. Evre III'ün ileri aşamalarında, immün sistemi yeterli kişilerde eğer kazeöz odak erimezse, gelişen süreç hücrel immün yanıt tarafından durdurulur. Tüberkülün etrafı fibröz bir duvarla çevrilerek ortadaki kazeöz odak koyulaşır ve süreç yaşam boyu durdurulur. Kazeöz odaktan basil kaçıışı olur ve basil aktive makrofajlar tarafından tutulup yok edilmezse, gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı tekrarlanarak makrofajlar tahrip edilir. Sonuç olarak, immün sistemi yeterli kişilerde basillerin yok edilmesiyle süreç durdurularak, sadece deri testi (Purified Protein Derivery-PPD) pozitifliği ile primer enfeksiyon ortaya çıkar.

İmmün sistemi baskılanmış kişilerde ise genişleyen kazeöz nekrozlar akciğerde doku hasarına neden olur ve klinik olarak primer TB gelişir (11, 21).

- **Evre IV: Erime ve Kavite Oluşumu (Aylar veya Yıllar Sonra)**

İmmün sistemi yeterli olan kişilerin hücrel immün yanıtı eğer primer TB’u kontrol edemezse, ilerleyici primer TB gelişecek ve kaviter lezyonlar ortaya çıkabilecektir. Ancak bu olay genellikle, primer enfeksiyondan veya hastalıktan yıllar sonra endojen reaktivasyon veya ekzojen reenfeksiyonla gelişen sekonder TB’da görülmektedir. İmmün sistemi yeterli kişilerde, hücrel immün yanıt yeterince güçlü olsa bile, hastalığın ilerlemesi devam edebilir ve sonuçta kazeöz odaklarda erime (likeifikasyon) ve kavite oluşumu gelişebilir. Erimiş materyal, basiller için mükemmel üreme ortamı oluşturmaktadır. Bu şekilde kavite oluşumu, hem hastalığın akciğere yayılmasını hem de hastalığın bulaşıcı bir nitelik kazanmasına neden olmaktadır (11, 21).

2.3.2. TB İmmunolojisi

Konağın *M. tuberculosis*’e karşı geliştirdiği immün yanıt tam olarak anlaşılammıştır. *M. tuberculosis* ile enfekte kişilerin sadece %10’unda aktif hastalık gelişmesine karşın geri kalan kişilerde hastalık kontrol edilebilmektedir, bu kişilerde hangi immün cevabın hastalığa karşı duyarlılık veya direnç ile ilişkili olduğu tam olarak bilinmemektedir (22-24). Buna ek olarak, çoğu hastada TB, akciğerlerde lokalize kalırken neden bazı hastalarda meninglere ve merkezi sinir sistemine yayıldığı bilinmemektedir. Yine birçok çalışmada araştırma konusu olan BCG aşısının etkinliği de tam olarak anlaşılammıştır (23). Enfeksiyonda doğal immünite çok önemlidir çünkü makrofajlarda bakterinin öldürülmesi veya canlı kalması güçlü bir immün cevaba bağlıdır (22). Konağın genetik yapısının TB için risk faktörü olabileceği belirtilmiştir. Bireylerin TB’ a genetik yatkınlıkları ikiz çalışmalarında ve değişik insan popülasyonlarında araştırılmıştır (24). Siyah ırktan olan kişilerin beyazlara göre TB’ a daha duyarlı oldukları belirtilmiştir (25). Genetik faktörlere ek olarak, çevresel faktörler

gibi kişinin TB'a duyarlılığını etkileyen faktörler de bulunmaktadır. Batı Afrika'da yapılan bir çalışmada yayma pozitif TB hastaları ile ev halkı veya hastanın bulunduğu topluluktaki kişiler arasındaki potansiyel risk faktörleri araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre erkek cinsiyet, HIV enfeksiyonu, sigara kullanımı, astım, ailesinde TB hikayesi olması, aynı evde yaşayan kişi sayısı gibi faktörlerin TB duyarlılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (26). *M. tuberculosis* akciğerlerde alveoler makrofajlar, akciğer makrofajları ve DH gibi ASH'leri enfekte eden hücre içi bir patojendir. *M. tuberculosis* bu hücrelerde fagozomu modifiye ederek hayatta kalır; doğal ve kazanılmış immüniteden kurtulmak için fagozom olgunlaşmasının, doğal mikrobisidal mekanizmaların ve sitokin ilişkili konak savunmasının önlenmesi gibi birçok mekanizma kullanmaktadır (27).

2.3.2.1. Doğal İmmün Yanıt

Alveollere ulaşan *M. tuberculosis* basilleri, doğal savunma yollarıyla yok edilebilir veya çoğalarak klinik görünümleri oluşturabilirler. Konağın doğal savunmasında; üst solunum yolunun fiziksel engeli, fagositoz, fagositik hücrelerin reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, inflamatuvar hücreler ve saldıkları sitokinler, alveoler makrofajların kimyasal yapısını değiştirmesi, apoptoz ve genetik faktörler rol oynar (28).

- **Makrofajlar**

TB basilleri ile ilk etkileşime giren hücre topluluğu olduğu düşünülen alveoler makrofajlar, organizmaya hava yolu ile giren partiküllerin ortadan kaldırılmasında önemli role sahiptir. Daha sonra kan dolaşımındaki makrofajlar bölgeye toplanmakta ve konağın enfeksiyondan korunmasında görev almaktadır (29).

Makrofajlar ile basillerin ilk etkileşimi Fc, kompleman, mannoz, surfaktan protein, CD14, CD43, fibrinojen, laktoferrin, proteinaz ve makromoleküllerin yakalanmasını sağlayan "scavenger reseptör" gibi hücre reseptörlerinde olmaktadır (30-32). *In vivo* enfeksiyon sırasında bakterinin kaç tane reseptör ile etkileşime girdiği

bilinmemesine rağmen, *in vitro* çalışmaların sonuçlarına göre makrofaj cevabının bakteri ile etkileşime giren reseptör tipine bağlı olduğu görülmüştür. Bakterilerin Fc reseptörleri ile etkileşimi sonucu reaktif oksijen ara ürünleri (reactive oxygen intermediates-ROI)'nin üretiminin arttığı ve bunun da bakteri içeren fagozomlar ile lizozomların füzyonuna izin verdiği belirlenmiştir (29). Diğer taraftan bakterinin kompleman reseptör (CR) 3 ile etkileşimi solunum patlamasına engel olmakta ve bakteri içeren fagozomların olgunlaşmasını engellemekte, böylece lizozom ile füzyon oluşumu önlenmektedir (33).

M. tuberculosis'in farklı komponentleri "Toll-like receptor" (TLR)-2 ve TLR-4'ü aktive etmektedir. 19 kiloDalton (kDa) lipoprotein ve lipoarabinomannan (LAM), TLR-2 ile makrofajları aktive ederek, IL-12 ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) üretimini teşvik eder (34).

Bakteri makrofaja girdiğinde mikobakteriyal fagozom içerisine yerleşir. Bu yapı plazma membranından köken alır ve yüzeyinde hücre yüzey reseptörleri bulunur. Normal fagozitozun aksine, lizozom ile füzyon sırasında fagozomal içeriğin indirgenmesi sırasında mikobakteriler bu işlemi inhibe ederler. Bu inhibisyon canlı mikobakterilerin sebep olduğu aktif süreçlere bağlıdır çünkü ölü basiller lizozomal bölümlerde bulunabilmektedir (35).

Mikobakteriyal fagozomun diğer bir özelliği de sınırlı asidifikasyonudur. Normalde, endozomal yol ile taşınan materyal geç endozom içerisinde veziküler proton pompası adenozin trifosfaz (V-ATPase)'in aktivitesinden dolayı asidik bir ortam bulur. Bu azalan asidifikasyonun, mikobakteriyal fagozomdaki düşük veya hiç olmayan V-ATPase konsantrasyonu sonucu olduğu düşünülmektedir (29).

Mikobakteriyal fagozomun olgunlaşmaması, fagozomlarda aktif birikim sonucu bulunan ve triptofan aspartat kaplı protein (tryptophan aspartate coat protein-TACO) olarak bilinen bir proteine bağlanmıştır. TACO proteini içermeyen hücreler mikobakteriler ile enfekte edildiklerinde fagozomların lizozomlar ile füzyonu sonucu basiller ortadan kaldırılmaktadır (36). Ayrıca TACO, mikobakterilerin makrofaj içerisine alınmasında önemli bir rolü olan plazmatik membranda bulunan kolesterole bağlanmaktadır. Bu bulgular her iki molekülün de mikobakterilerin hayatta kalması için önemli olduğunu göstermektedir (37).

Mikobakteriler tarafından fagozom olgunlaşmasının önlenmesi, ROI ve reaktif nitrojen ara ürünleri (reactive nitrogen intermediates-RNI)'nin üretimini içeren mikrobisidal mekanizmaları da uyaran IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinler ile geri döndürülebilir. Nitrojen ara ürünlerinin koruyucu rolü farklı fare modellerinde ve insan TB'unda gösterilmiştir. Buna karşılık, sitokinler tarafından aktive edilen makrofajların ürettiği hidrojen peroksitin mikobakterisidal aktivitesinin bilinmesine rağmen enfeksiyon sırasında ROI'nin rolü tam olarak açıklanamamıştır. Ayrıca, basillerde bulunan LAM ve fenolik glikolipid I gibi yapılar oksijen radikallerini ortadan kaldıran moleküllerdir (29).

- **Nötrofil Lökositler**

M. tuberculosis ile enfeksiyonda ana hedef hücrelerin makrofajlar olduğu düşünülse bile, nötrofillerin de içinde bulunduğu diğer hücre popülasyonlarının mikobakteriler ile enfekte olabileceği ve bu özelliğin hastalığın gelişmesinde önemli olduğu ileri sürülmüştür. Vücuda herhangi bir zararlı ajanın girdiği veya inflamatuvar sinyallerin üretildiği bölgede ilk toplanan hücreler arasındadır. Oksijene bağımlı ve hücre dışı uzantılar oluşturma gibi iyi tanımlanmış mikrobisidal mekanizmalara sahiptirler (38).

Fare modelleri ile yapılan deneylerde, TB'da nötrofillerin oynadığı rol tartışmalıdır. Enfeksiyonun başlangıcında ve birkaç gün sonrasında bu hücreler tespit edilmiş ve mikobakteriyal üremenin kontrolünde önemli bir role sahip olduğu düşünülmüştür. Eğer nötrofiller enfeksiyondan önce ortadan kaldırılırsa, deneysel olarak enfekte edilen farelerin akciğerlerinde mikobakteriyal üreme artmakta, diğer taraftan fareler nötrofil sayısını artıracak bir ajan ile tedavi edilirse basillerin üreme oranı düşmektedir (39). Bununla birlikte nötrofillerin mikobakterilere karşı mikrobisidal aktivitesi analiz edildiğinde tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir. Nötrofillerin mikobakterileri öldürme yeteneği olduğunu belirten ve bunun gözlenmediğini vurgulayan çalışmalar vardır (29). Bununla birlikte nötrofillerin yaptıkları işlerin mikrobisidal yeteneklerinden fazla olduğu düşünülmektedir. Bu hücrelerin kemokin üretimiyle, granülom oluşumuna neden olmasıyla ve mikrobisidal moleküllerini enfekte makrofajlara aktarmasıyla enfeksiyonun kontrolüne katkıda bulunduğu düşünülmektedir

(40). Diğer taraftan n6trofillerin hastayı korumaktan ziyade, patolojinin gelişiminde rol oynadığı d6ř6n6lmektedir. TB'a duyarlı hayvanlarda dirençli hayvanlara g6re lezyonlarda daha geniş ve uzun n6trofil yığınlarının olduğu g6r6lm6řt6r (41).

- **Mast H6creleri**

Mast h6creleri alerjik reaksiyonların efekt6r h6creleridir ve Th2 cevabının gelişmesinde kritik rolleri vardır. Solunum yolu mukozasında, gastrointestinal ve 6riner sistemde, kan ve lenf damarlarının 6evresinde bulunurlar. Bu h6creler imm6nglobulin (Ig) E'ye karşı y6ksek affiniteye sahip resept6rler bulundururlar (FcεRI) ve bu sayede IgE h6cre membranına bağlanır. FcεRI-IgE'nin aktif b6lgesine antijenin bağlanması 6zerine mast h6creleri 6nceden oluşmuş mediat6rleri ve daha 6nceden sentezlenmeyen mediat6rler salgılar (42). Mast h6cre gran6llerindeki 6nceden oluşmuş mediat6rler arasında histamin, triptaz, kimaz, karboksipeptidaz ve heparin bulunurken 6nc6 mediat6rler arasında ise l6kotrien C4, prostaglandin D2, trombosit aktive edici fakt6r (platelet activating factor-PAF), TNF-α, transforme edici b6y6me fakt6r6 beta (transforming growth factor beta-TGF-β), fibroblast b6y6me fakt6r6 2 (fibroblast growth factor 2-FGF2), vask6ler endotelial b6y6me fakt6r6 (vascular endothelial growth factor-VEGF) ve IL-4, IL-5, IL-8 bulunmaktadır (42, 43).

Antijen ve IgE arasındaki ilişkinin yanında, diğer ajanlar mast h6crelerinin aktivasyonunu, sitokin ve diğer mediat6rlerin a6ığa 6ıkmasını uyarabilir. 6rneğin, mikrobiyal 6r6nler TLR ailesinin 6yesi olan TLR-2 ve TLR-4 yolu ile mast h6crelerini uyarabilirler (44, 45). Mast h6creleri mikobakterilere karşı konak savunmasında 6nemli role sahiptir. Mast h6creleri ile *M. tuberculosis* arasında CD48 molek6l6 aracılığı ile bir etkileşimin olduğu g6sterilmiştir. Bu ilişki histamin ve β-heksozamidaz gibi 6nc6 mediat6rlerin salınmasını başlatırken IL-6 ve TNF-α gibi yeni sentezlenen sitokinlerin a6ığa 6ıkmasını sağlar. *M. tuberculosis* tarafından salgılanan “*M. tuberculosis* secreted antigen” (MTSA)-10 ve 6 kDA “early secretory antigenic target” (ESAT)-6 sadece makrofajların ve DH'lerin aktivasyonunda değil aynı zamanda bunlardan pro-inflamatuvar mediat6rlerin a6ığa 6ıkmasını da sağlar (46).

- **Dendritik Hücreler**

DH'lerin *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı koruyucu immün yanıtta yer aldığı belirlenmiştir. DH'ler kandan ve muhtemelen akciğer dokularından enfeksiyon bölgesine toplanmaktadır ve TB lezyonlarında artan sayıda bulunmalarından dolayı koruyucu immünitede rol almaktadırlar (47).

DH'ler antijenleri tanır, yakalar ve işler. CD1 aracılığı ile olduğu gibi bu antijenleri MHC molekülleri ile sunarlar (48). DH'ler antijenleri C-tip lektin ve Fc γ /Fc ϵ reseptörleri ile bağlayarak endositoz ile hücre içine alırlar. *M. tuberculosis* endositozu, "dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing non-integrin" (DC-SIGN) gibi C-tip lektin reseptörleri ile yapılmaktadır. Bu molekül, mikobakteri hücre duvarının bir bileşeni olan mannoz kaplı LAM ile etkileşime girer. Buna ilave olarak periferik kan DH'leri ve monositlerden köken alan olgunlaşmamış DH'ler, yüzeylerinde mikobakteriler ile etkileşime giren TLR-2 ve TLR-4 bulundurlar. Bu yüzden, koruyucu konak yanıtının bu sinyaller tarafından uyarıldığı sanılmaktadır. Mannoza kaplı LAM ile DC-SIGN arasındaki ilişki IL-10 üretimini uyarırken 19 kDa *M. tuberculosis* lipoproteini ile TLR-2 birleşmesi IL-12, TNF- α ve IL-6 üretimini uyarır (49).

Antijenler yakalanıp hücre içine alındığında DH'ler fenotipik ve fonksiyonel olarak olgunlaşırlar ve periferik lenf nodlarına göç ederler. Bu enfekte DH'ler göç edebilmek için yüzeylerinde, kendilerini kemokin (C-C motif) ligand (CCL)-19 ve CCL21'e karşı duyarlı hale getiren, kemokin reseptör (chemokine receptor-CCR)-7'yi eksprese etmeleri gerekmektedir (50). DH'lerin olgunlaşması sadece MHC sınıf I ve II'nin artan sentezi ile değil aynı zamanda CD80 ve CD86 gibi kostimulan moleküllerin ve IL-12'nin üretimi ile beraber olmaktadır (51).

Monositler, *M. tuberculosis* ile enfekte olduklarında DH'lere dönüşürler, lipidik antijenleri sunma yetenekleri azaldığı için CD1 ekspresyonu azalır. *M. tuberculosis* hücre duvar yapılarının, lipopolisakkaritler ile uyarılan DH'lerin fenotipik olgunlaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (52). Koruyucu immün cevapta DH'ler, salgıladıkları IL-12, IL-18, IL-23 gibi sitokinlerle ve muhtemelen IFN- α ve IFN- β ile T hücrelerinin Th1 yönünde olgunlaşmasını sağlamaktadır (53).

- **Doğal Öldürücü Hücreler**

Doğal öldürücü (natural killer-NK) hücreler, doğal immün yanıtın gelişmesinde önemli bir rol oynarlar. Esas görevleri hedef hücrelere karşı sitotoksitenin gelişmesi ile ilişkilidir ve immün cevap sırasında IFN- γ üreten ilk hücreler arasında yer alır. NK hücre sayısının akciğerlerde *M. tuberculosis* kompleks (*M. tuberculosis* complex-MTC) suşları ile enfeksiyon sonrası ilk üç haftada arttığı gösterilmiştir. Bu hücre artışı aktivasyon ve olgunlaşma markırlarının salgılanmasının artışı ile ve IFN- γ üretimi ile ilişkilidir. Bununla birlikte NK hücre sayısının azalması akciğerlerdeki bakteri yükünü etkilememektedir, akciğer TB'unda erken cevap süresince bu hücreler aktive olmasına rağmen konak direnci için gerekli değildirler (54). Ayrıca NK hücreleri immün cevabın değişik basamaklarını düzenleyerek TB'da önemli bir rol oynar. NK hücrelerinin *M. tuberculosis* ile enfekte makrofajlar için artan sitotoksiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca CD8+ T lenfositlerin IFN- γ üretimi ve *M. tuberculosis* ile enfekte hücreleri yok etme kabiliyetini düzenleyerek hem doğal immünitede hem de kazanılmış immün yanıtta rol alır (55).

- **CD1d Sınırlı Doğal Öldürücü T Hücreler**

NK T hücrelerinin özgün bir alt grubu olan bu hücreler klasik olmayan antijen sunucu CD1d'yi tanıyan değişmez bir V alfa 24 hücre reseptörünün ekspresyonu ile karakterizedirler. CD1d sınırlı NK T hücrelerin aktivitesi alfa-galaktozilseramid ile artmaktadır. Bu molekül ile aktive edildiğinde CD1d sınırlı NK T hücreleri *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı konak savunmasına katkıda bulunurlar. Monositlerden köken alan CD1d eksprese eden makrofajlar, bu molekül ile aktive edildiğinde *M. tuberculosis* ile enfekte hücrelere karşı NK T hücrelerin efektör fonksiyonlarını uyarabilir. Bu fonksiyonlar arasında IFN- γ salınımı, proliferasyon, litik aktivite ve antimikobakteriyal aktivite bulunur. Bu antimikobakteriyal etki mikobakterilerin yüzeyinde hasara yola açan antimikrobiyal peptid olan granulizin yoluyla gerçekleşir. TB hastalarının granülomlarında kolaylıkla tespit edilen CD1d'den dolayı hastalık bölgesinde NK T hücreleri ile CD1d eksprese eden hücreler arasındaki potansiyel etkileşim olduğu görülmüştür (56).

- **Epitelyal Hücreler**

Uzun bir süre boyunca, alveoler makrofajların *M. tuberculosis* ile etkileşime giren ilk hücre topluluğu olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, alveollerdeki epitelyal hücre sayısı makrofajlardan 30 kat daha fazladır ve böylece bu hücrelerin enfekte basillere ilk maruz kalan hücreler olma olasılığı daha yüksektir. *M. tuberculosis* enfeksiyonuna epitelyal hücrelerin dahil olduğunu gösteren ilk bulgu, TB dışı hastalıktan ölen bir kişinin biyopsi materyalinde mikobakteriyal DNA'nın tespit edildiği bir çalışmadan elde edilmiştir. Bu çalışmada mikobakteriyal DNA makrofajlardan, tip II pnömositlerden, fibroblastlardan ve endotelyal hücrelerden tespit edilmiştir (57). *M. tuberculosis* epitelyal hücreleri konak olarak kullanır ve bu hücrelerde çoğalır. Bununla birlikte epitelyal hücreler IL-8 salgılayarak ve nitrik oksit (NO) üretimini başlatarak pro-inflamatuvar bir ortam oluştururlar (58).

- **Defensinler**

Mikroorganizmalara karşı doğal immün cevabın dikkat çeken bir grubu da küçük endojen antimikrobiyal peptid olarak bilinen defensinlerdir. Yaklaşık 30-50 amino asitten oluşan bu katyonik peptidler bütün havyan hücrelerinin miyeloid ve epitelyal hücrelerinde bulunur. Bu yapılar antibakteriyal, antifungal ve antiviral aktivite gösterirler. Bu yapılar disülfür bağlarının sayısına ve sistein molekülünün pozisyonuna bağlı olarak alfa, beta ve teta defensin olarak sınıflandırılırlar (59). Fagositik hücrelerde defensinler, oksijen metabolizmasından bağımsız olarak mikroorganizmaları yok eden bileşen olarak görev yaparlar. Bu peptidler birçok mikroorganizmanın membranını yıkıma uğratar ve bazıları sitoplazmik membrandan geçerek enfekte hücreye girebilir (60).

Defensinler ilk olarak kobay ve tavşan nötrofillerinde tanımlanmıştır. İnsan monosit ve makrofajlarında defensin bulunduğuna dair bir rapor yoktur, ancak nötrofillerde dört adet insan nötrofil defensini (human neutrophil defensin-HNP) bulunduğu ve bunlardan üç tanesinin (HNP-1, HNP-2, HNP-3) *M. avium-intracellulare* ve *M. tuberculosis*'e karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur. *M. tuberculosis* ile enfekte farelerin defensin peptid HNP-1 ile tedavileri sonrası akciğerler, karaciğer ve

dalaklarındaki bakteriyel yükün azaldığı gösterilmiştir. Bu gözlem defansinlerin, *M. tuberculosis*'e karşı doğal immün cevap mekanizmasının önemli bileşeni olduğunu ve tedavi edici ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir (61).

2.3.2.2. *M. tuberculosis*'e Karşı Kazanılmış İmmün Yanıt

Doğal mekanizmaların aksine, spesifik ya da kazanılmış immün yanıt yabancı antijenlerin spesifik olarak tanınmasını gerektirir. Doğal immün sistem, kazanılmış immün yanıt tipinin oluşturulmasında temel etkiye sahiptir. Spesifik immün yanıt birçok efektör fonksiyonunu doğal immünite elemanlarının aktivasyonu ile yerine getirir. Spesifik immün yanıt, T hücre aktivasyonu ile efektör mekanizmaları içeren hücrel immün yanıt ve B hücre olgunlaşması ile antikor üretimini içeren humoral immün yanıt olarak ikiye ayrılabilir. Her iki mekanizma birbirinden ayrı düşünülmemelidir, örneğin yardımcı T hücrelere antikor üretiminde, izotip değişiminde ve antijenin tekrar hatırlanmasında ihtiyaç vardır. B hücreleri, T hücrelerini aktive eden antijen sunucu hücre gibi görev yapabilir (29).

M. tuberculosis konakta uzun zaman boyunca persistan olarak kalan, doku hasarı olmadan kronik asemptomatik enfeksiyona yani latent enfeksiyona sebep olan hücre içi yerleşen bakterilerin en göze çarpan örneğidir. Bu özellik dünya genelinde yaklaşık iki milyar insanın *M. tuberculosis* ile enfekte olduğunu fakat bunların %90'ından fazlasının sağlıklı ve hastalığın klinik belirtilerinin görülmediğini, basilin bu kişilerde dormant halde kaldığını gösteren en iyi örnektir. Konağın hücrel immünitesi hastalığın ilerlemesini kontrol etmede yeterli olsa da basil tam olarak yok edilememekte ve bundan dolayı bu enfekte kişiler TB'un latent formu ile yaşamaktadırlar (29).

Diğer hücre içi enfeksiyonlardaki gibi, birincil koruyucu immün yanıt antikor aracılı yanıt yerine hücrel immün yanıttır. *M. tuberculosis* makrofajlarda bulunmaktadır ve fagositoz ile hücre içine alınarak ortadan kaldırılan diğer bakterilere göre mikrobisidal mekanizmalara daha dirençlidir. Bu özellik, basilin IFN- γ ve IL-12 ile makrofaj aktivasyonunu engelleme yeteneğinden dolayıdır. Değişik çalışmalar insan ve farelerde TB enfeksiyonunda bu sitokinlerin kritik rolünü doğrulamıştır. Buna ek olarak IFN- γ ve IL-12'deki ya da bunların reseptörlerindeki eksiklikler, kişileri mikobakteriyal

enfeksiyonlara daha duyarlı hale getirmektedir. Son 20 yıldır, Th1 tipi immün yanıtın başlatılmasının bu enfeksiyona karşı korunmada konağa koruyucu özellik kazandırdığı bildirilmektedir (62). TB immünolojisi üzerine yayınlanmış yüzlerce çalışma olmasına rağmen, akciğer TB’unda akciğerde antijen sunan hücrelerin *in vivo* rolleri gibi önemli konularda hala bilgi eksikliği vardır. Bu tip bilgiler, *M. tuberculosis*’e karşı spesifik immün yanıtın başlatılmasını daha iyi anlamamızı ve hastalığın daha etkili kontrol edilmesi için yeni araçların geliştirilmesini sağlayacaktır (63).

2.3.2.2.1. Hümorale İmmün Yanıt

M. tuberculosis hücre içi yerleşen bir bakteri olduğu için, basillerin antikorlara maruz kalmadığı ve bu tip immün yanıtın koruyucu olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, enfeksiyonun ilk basamaklarında, antikorlar yalnız veya uygun sitokinlerle birlikte mukozal yüzeylerden bakteri girişinin önlenmesi gibi önemli bir görevi yerine getirirler. Her ne kadar bu konu tartışmalı olsa da hücre içi bakteriyel enfeksiyonlarda antikorların rolü yeniden önem kazanmıştır. Son zamanlarda *M. tuberculosis* tarafından meydana getirilen kronik enfeksiyonların kontrollerindeki rolleri araştırılmıştır (64).

Antikorlardan, TB kontrolünde ve kliniğinde serolojik tanı aracı ve korunmada aktif maddeler olarak iki şekilde faydalanılır. Serolojik yöntemler kolay, hızlı ve düşük maliyetlerinden dolayı TB’un hızlı tanısında uzun bir süre en cazip araçlar olarak görülmüştür. 1970’li yıllarda “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) yönteminin geliştirilmesi ile birlikte birçok araştırmacı TB’un serolojik tanısında en uygun antijenin bulunması için çalışmalar yapmıştır. O yıllarda, birçok çalışmada tam bakteri, kültür filtratları, bakteri ekstraktları, tüberkülinler ve bunların saflaştırılmış türevleri (PPD) gibi kompleks antijenler kullanılmaktaydı. Son zamanlarda proteinler, lipopolisakkaritler ve glikolipidler (Ag85, 38 kDa protein, LAM veya diaçiltrehalozlar) gibi ayrı ayrı saflaştırılmış antijenler çalışmalarda kullanılmıştır. Bununla birlikte bugüne kadar tanı amaçlı hiçbir test yeteri kadar yüksek duyarlılık ve özgüllük değerlerine sahip değildir (65, 66).

TB’a karşı korunmada ise antikorlar; toksinlerin nötralizasyonu, opsonizasyon, kompleman aktivasyonu, sitokin salınımının artırılması, antikor bağlı sitotoksisite ve

artmış antijen sunumunu da içeren birçok mekanizma ile bağışıklığı artırır. Yapılan çalışmalara göre antimikobakteriyal antikörlerin TB enfeksiyonunda konak cevabının değişik safhalarında önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (67, 68). Spesifik antikörlerin, BCG'nin nötrofiller ve monosit/makrofajlarca hücre içine alınmasını ve öldürülmesini artırdığı gösterilmiştir. Diğer taraftan antikör kaplı BCG basilleri daha etkili işlenmekte ve CD4+ ve CD8+ T hücre cevabının artırılması için DH'ler tarafından sunulmaktadır (68).

Bu antikör kaplı basiller ile fagositlerin artan antimikobakteriyal aktivitesi mukozal immünite için çok önemlidir. IgG ve IgA antikörlerinin varlığı alt solunum yollarının mukozal salgılarında gösterilmiştir. Spesifik mikobakteriyal hedefler için antikör aracılı artan öldürme mekanizması tam olarak bilinmemektedir fakat LAM gibi yüzey antijenleri ya da alfa kristalin gibi stres altında salgılanan proteinler ile ilişkili olabilir. Yapılan bir çalışmada, 17 rekombinant mikobakteriyal protein antijeni, doğal Ag85 kompleksi, LAM ve *M. tuberculosis* lizati, BCG aşısı ile uyarılmış antikör cevabının tespitinde kullanılmış, sadece LAM reaktif serum IgG cevabının BCG ile aşılanmış kişilerde ve aktif TB hastalarında anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür (69).

Deneysel fare TB modelinin olduğu bir çalışmada, TB'a karşı savunmada IgA antikörleri ile pasif inokülasyon test edilmiştir. Farelerde alfa kristalin proteinine karşı monoklonal IgA antikoru ile intranazal inokülasyon sonrası *M. tuberculosis* kolonilerinin akciğerlerde dokuz gün sonra on kat azaldığı belirtilmiştir (67). Bu çalışmanın devamında, enfeksiyondan üç gün önce IFN- γ inokülasyonu ile ve *M. tuberculosis* ile aerosol enfeksiyon sonrası değişik zamanlarda (ikinci saat, ikinci ve yedinci gün) ilave IgA inokülasyonu ile korunma zamanı uzatılmıştır. IFN- γ ve IgA'nın birlikte uygulanması, immünyetmezlikli hastaların profilaktik tedavilerine ya da kemoterapilerine ilavesi umut vermektedir (64).

2.3.2.2.2. Hücresel İmmün Yanıt

M. tuberculosis'e karşı koruyucu yanıtta, hücresel immünite önemlidir. TB basili konakta hücre (genellikle makrofajlar) içinde yaşar. Bu nedenle antikordan daha çok T hücre aracılı mekanizmalar enfeksiyonun kontrolünde rol alır. T lenfositler kemik iliği,

fetüs karaciğeri ve embriyonik dönemde vitellüs kesesinden (yolk sac) meydana gelir. T hücreleri timusta olgunlaşır ve yüzeylerinde bir T hücre reseptörü (T cell receptor-TCR) meydana gelir. T hücreleri, timüs stromasında farklılaşmaya uğrar. Bu farklılaşma sırasında onları karakterize eden glikoprotein yapısında, numaralanmış CD ile ifade edilen bir takım yüzey antijenleri (markırları) kazanırlar. Timusta olgunlaşmaya ve farklılaşmaya uğrayan T lenfositlerden CD4 antijeni taşıyan T4 hücreleri (T helper lenfositler) ve CD8 antijeni taşıyan T8 hücreleri (Supresör-Sitotoksik T lenfositler) olmak üzere iki ayrı T lenfosit grubu oluşur. Periferik kandaki T hücrelerinin üçte ikisi CD4, üçte biri ise CD8 markırları taşıyan lenfositlerdir. T lenfositleri immün sistemin regülasyonunda inflamatuvar ve hasarları giderici fonksiyonlarda rol oynayan bir takım peptidlerden oluşan sitokinler (IL-1, 2, 4, 6 vb) salgılar ve bu sitokinler T hücre gelişmesine yardımcı olur (70).

- **T Helper Lenfositler (CD4+)**

Bu hücreler, Th hücreleri olarak da isimlendirilirler. İmmün cevabı güçlendirmek için immün sistemin diğer hücrelerine yardımcı olurlar. Th hücreleri, salgıladıkları sitokinlere göre Th1 ve Th2 olmak üzere en az iki alt gruba ayrılırlar. Th1 hücreleri ise TB'a karşı konak savunmasında en önemli sitokin olan IFN- γ 'yı; Th2 hücreleri ise IL-4, 5 ve 10'u sentezlerler (71). Mikobakteriler makrofajda vakuol içerisine yerleşir. Antijen sunan hücreler tarafından işlenen mikobakteriyel antijenler, bu hücrelerin yüzeyinde bulunan MHC sınıf II yoluyla CD4+ T hücrelerine sunulur. Bu olay *M. tuberculosis*'e karşı savunmada primer önemi olan CD4+ T hücrelerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu hücrelerin akut mikobakteriyel enfeksiyonların kontrolündeki primer önemi, CD4 ya da MHC sınıf II gen eksikliği bulunan fare türleri ve antikor depleksiyonunun yapıldığı çeşitli deneysel modellerde gösterilmiştir (72). HIV ile enfekte hastaların TB'a duyarlı olmalarında bu hücrelerin kritik rolü bulunmaktadır (73).

CD4+ T hücrelerinin TB'daki ana fonksiyonunun sitokinlerin, özellikle makrofaj aktivasyonu ve mikrobisidal mekanizmaların başlatılması için son derece önemli olan IFN- γ 'nın sentezlenmesi olduğu ileri sürülmekte; IFN- γ üretiminin, enfeksiyonun erken aşamalarında gerekli olduğu düşünülmektedir (72). CD4+ T hücreleri, granüloma

infiltrate olan hücrelerin %5-10 gibi çok küçük bir bölümünü oluşturmasına rağmen, granülom oluşumunun erken fazı sırasında çok etkilidirler. CD4+ T hücreleri eksik farelerde bakteriyel yükün kontrol edilemediği ya da yayılmanın engellenemediği bildirilmiştir (74).

CD4+ T hücrelerinin özellikle akciğerlerdeki lokal immün cevapta sitolitik fonksiyonları vardır. Bu fonksiyonunu hücre içi yerleşen canlı mikobakterilerin azaldığı Fas Ligand (FasL) ile indüklenen apoptoz aracılığı ile gerçekleştirirler. Yapılan bir çalışmada, CD4+CD27- fenotipi gösteren farklı bir T hücre alt grubunun IFN- γ üretiminin yanı sıra perforin ve granzim B salgılayarak *M. tuberculosis*'e karşı savunmada rol aldığı gösterilmiştir (75).

- **Supresör-Sitotoksik T Lenfositler (CD8+)**

CD8+ T hücreleri, MHC sınıf I aracılığı ile sunulan ve ASH'lerin sitoplazmasından kaynaklanan antijenleri tanırlar. *M. tuberculosis*, vakuol içinde yaşadığı için, CD8+ T hücrelerinin MHC sınıf I molekülleri aracılığı ile bu antijenleri etkili bir şekilde sunamadığı düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada apoptoz ile ölen enfekte makrofajlar ve DH'lerden ortama bırakılan basil içeren apoptotik cisimcikler ve veziküllerin, enfekte olmayan makrofajlar ve DH'lere alınarak geç endozom ve lizozomlara girdikleri; MHC sınıf I ve CD1 molekülleri aracılığıyla mikobakteriyel antijenleri CD8+ T hücrelerine sundukları gösterilmiştir (11).

M. tuberculosis enfeksiyonu sonucu gelişen granülomlarda CD8+ T hücre sayısı, CD4+ T hücre sayısına yakın olup; yapılan çalışmalar CD8-/- farelerde normal granülom oluştuğunu; enfeksiyonun kontrol edildiğini; ancak bakteri yükünün daha fazla olduğunu göstermiştir. Granülom oluşumunda CD4+ T hücre sayısı erken dönemde, CD8+ T hücre sayısı ise geç dönemde artar (74).

CD8+ T hücrelerinin TB enfeksiyonunda sitokin salınımı, granül bağımlı sitotoksiste, Fas-FasL aracılı sitotoksiste ve direkt mikrobisidal aktivite olmak üzere başlıca dört görevi vardır. Bu hücreler, IFN- γ ve TNF- α gibi tip 1 sitokinleri salgıladıkları gibi dokulardaki enfekte makrofajları öldürerek de koruyucu etki gösterirler. Her iki sitokin, sinerjistik olarak *M. tuberculosis* ile enfekte makrofajları aktive edebilir. Makrofajların aktivasyonu, NO gibi RNI üretimine yol açan uyarılmış

iNOS üretiminin artışı ile sonuçlanır. ROI ile birlikte RNI, canlı mikobakterilerin azalmasını sağlar (76).

CD8+ T hücreleri, perforin aracılı mekanizmalarla enfekte makrofajları öldürebilirler. Perforin, CD8+ T hücrelerin granüllerinde bulunan bir protein olup; enfekte makrofajın membranında porlar oluşturur ve bu hücrelerin apoptozu ya da lizizi ile sonuçlanan granzim A, granzim B (serin proteaz), granülozin gibi toksik proteinlerin girişine izin verir (76).

- **Gamma/Delta ($\gamma\delta$) T Hücreleri**

Daha önceleri CD4-CD8- T hücreleri olarak bilinen $\gamma\delta$ T hücrelerinin, immün yanıtındaki rollerinin düşük olduğu düşünülmüştür. Bu hücrelerin sadece peptid olmayan antijenlere karşı çoğaldıklarına inanılmaktaydı. Bu hücreler erken lezyonlarda bulunurlarken, sadece IFN- γ üretiminin olduğu enfekte makrofajlarla reaksiyona girdikleri düşünülmekteydi. Son yıllarda, $\gamma\delta$ T hücrelerinin immün cevabın düzenlenmesindeki ilişkisi kanıtlanmıştır (29).

TB hastalarında $\gamma\delta$ T hücreleri MHC'ten bağımsız litik aktivite gösterirler. Hastalık şiddetlendikçe CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin litik aktivitesi yavaş yavaş azalırken $\gamma\delta$ T hücreleri, Fas-FasL mekanizması ve perforin yoluyla *M. tuberculosis* ile enfekte hedef hücreleri sindirerek faaliyetlerini artırır (77).

Yapılan bir çalışmada, *M. tuberculosis* ile enfekte farelerde $\gamma\delta$ T hücrelerinin basilin yok edilmesine katkıda buldukları ve anti-inflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler genetik manüplasyon ile ya da özel monoklonal antikolar kullanılarak yok edildiklerinde, farelerin akciğerlerinde inflamatuvar hasar hızlanmıştır. Ek olarak $\gamma\delta$ T hücreleri, enfeksiyonun erken safhasında, hücrelerin enfeksiyon bölgesine akışını hızlandıran IL-17 üretirler. IL-17 salınımı, *M. tuberculosis* ile enfekte DH'lerden IL-23 salınmasına cevap olarak üretilir (78).

$\gamma\delta$ T hücrelerinin koruyucu immünitedeki rolü, sitokin (IL-17 ve IFN- γ gibi) salınımı ve sitotoksik aktivite ile sınırlı değildir. Bu hücreler ayrıca antijen sunucu hücreler olarak da işlev yaparlar. DH'ler gibi antijeni işleyip sunarlar ve $\alpha\beta$ T hücrelerinin çoğalmasını başlatmak için gerekli yardımcı uyarıcı sinyalleri oluştururlar.

$\gamma\delta$ T hücrelerinin immünedeki diğer görevleri halen bilinmemesine karşın, doğal immün yanıt ile kazanılmış immün yanıt arasında bir köprü gibi görev yaparlar (79).

Makrofajlar içinde küçük parçalara ayrılan ve işlenen basilin antijenik yapılarından bazıları (epitoplar), makrofaj sitoplazmasında MHC'ine bağlanır ve bu yapı, makrofaj hücre yüzeyine taşınır. Daha sonra makrofajlar, basil antijenlerini MHC molekülleri ile birlikte T lenfositlere sunarlar. CD4+ T lenfositler MHC sınıf II molekülleri ile kendilerine sunulan antijenleri tanırken, CD8+ T lenfositler MHC sınıf I molekülleri ile kendilerine sunulan antijenleri tanımaktadırlar. $\gamma\delta$ T lenfositler ise basili bir bütün olarak tanıyabilmekte ve bu işlem MHC sınıf I ve II molekülleri ile sınırlanmamaktadır. T lenfositler, antijen-MHC kompleksi ile aktive olmakta ve ürettikleri IL-2 ile benzer şekilde reaksiyon veren bir T lenfosit topluluğu oluşturmaktadırlar (70)

İnsanlarda *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı gelişen hücresel immün yanıtın düzenlenmesinde esas sorumlu T hücre alt grubu CD4+ T lenfositlerdir. Basil antijenleri ile karşılaşan CD4+ T lenfositler, IL-2 üreterek klonal gelişme göstermekte, sitokinler üreterek [IFN- γ , TNF- α , migrasyon inhibe edici faktör (migration inhibitory factor-MIF), granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor-GM-CSF)] inaktif durumdaki makrofajları aktive etmekte ve böylece hücre içi basil çoğalmasını etkin bir şekilde kontrol etmektedir. CD4+ T lenfositler, B lenfositleri ve CD8+ sitotoksik/supresör T lenfositleri de aktive ederken, hafıza CD4+ T hücrelerinin de oluşmasını sağlamaktadır. Hafıza T lenfositler basil ile daha sonraki karşılaşmada (reenfeksiyon) konakta koruma sağlayabilmektedir. CD4+ T lenfositler basil ile enfekte makrofajların lizisine de aracılık etmekte ve bu sitotoksik aktiviteleri enfeksiyonun başlangıcından yaklaşık altı hafta sonra en üst düzeye çıkmaktadır. Lezyonlarda bulunan basillerin sayısı, basil antijeninin tipi ve miktarı ile aktive makrofajlardan salınan sitokinler (IL-10, TNF- α), CD4+ T lenfositlerin ağırlıklı olarak hangi biçimde aktivite göstereceğini (makrofaj aktivasyonu veya makrofaj harabiyeti) belirledikleri düşünülmektedir (70).

CD4+ T lenfositlerin iki alt grubu (Th1 ve Th2), makrofaj aktivasyonu konusunda birbirleriyle karşıt etki göstermektedir. Th1 lenfositler, aktivasyonları ve klonal gelişmeleri sonucu IFN- γ , IL-2 ve TNF- α gibi lenfokinler salgılamaktadır. Bu lenfokinler sinerjik etki göstererek antijenin bulunduğu yerde makrofajları toplar ve

aktive ederler. Böylece aktive olan makrofajların basilleri yok edebilmelerini sağlarlar. Th2 lenfositler ise makrofaj aktivasyonunu baskılayan IL-10 ve diğer lenfokinleri (IL-4, 5, 6) üretirler. Th1/Th2 oranı, sunulan antijenin tipinden ve miktarından etkilenir. Makrofajların basil antijenlerini Th2 yerine Th1 lenfositlere sunmalarının, makrofajlarca üretilen IL-12 nedeniyle gerçekleştiğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır. Çünkü IL-12, Th1 lenfositlerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlamaktadır (70).

Th1 lenfositlerden salınan IFN- γ , makrofajlarda bulunan 1-alfa hidroksilaz enzimini uyarır. Bu enzim, inaktif olan 25-hidroksilaz vitamin D3'ü aktif olan 1-25 dihidroksi vitamin D3 (1,25D₃) (kalsitriol)'e dönüştürür. Kalsitriol, hem makrofajlarda basillerin çoğalmasını azaltır hem de bu hücrelerden sitokinlerin (IL-1, 6, 8, 10, TNF- α , GM-CSF vb) salınmasını sağlar. Bu sitokinler hem güçlü immün düzenleyici işlev görürler hem de TB'a özgü birçok klinik yanıtın ortaya çıkmasına katkıda bulunurlar. IL-1, 8, TNF- α ve GM-CSF pro-inflamatuvar moleküllerdir ve lenfositler ile monositlerin lezyon bölgesine toplanmasını kolaylaştırırlar. IL-1 endojen bir proteindir ve TB'a özgü ateşin oluşumuna katkıda bulunur. IL-6, aktive B lenfositlerden Ig üretimini artırır ve TB'lu hastalarda sıkça rastlanan hiperglobulinemiye neden olur. TNF- α ise IFN- γ ile birlikte *M. tuberculosis* için bakterisidal olan NO metabolitlerinin üretimini ve makrofajların mikrobisidal aktivitesini artırarak granülom oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Diğer taraftan TNF- α birçok immünopatolojik olayın (ateş, kilo kaybı ve TB'a özgü doku nekrozlarına) gelişmesine de neden olmaktadır (70).

İmmünsüpresif etkili sitokinlerden IL-10, monosit ve lenfositlerden lenfokin salınımını inhibe eder. TGF- β ise T hücre farklılaşmasını ve makrofaj efektör fonksiyonunu inhibe eder. Bu son iki sitokin kontrol edilemeyen inflamatuvar yanıtta, aşırı inflamasyonu ve doku nekrozunu önleyebilir. Fakat immünsüpresif sitokinlerin aşırı yapımı enfeksiyon kontrolünde yetersizliğe neden olabilir (70).

CD8+ T lenfositler ve NK hücreler, antikora bağımlı sitotoksik hücre etkileşimleri kadar, kazeöz nekroz gelişiminde de rol oynayabilirler. Doku yıkımına, muhtemelen pıhtılaşma olaylarına, makrofajlardan salınan ROI ve RNI (özellikle NO), TNF- α ve TGF- β gibi sitokinler katkıda bulunmaktadır (70).

- **Sitokinler**

20. yy. başlarında inflamasyonun kompleks etkileşimleri hakkında ilk görüşler ortaya atılmıştır. Uygun şekilde duyarlılaştırılmış ve uyarılmış lenfositlerden salgılanan bir faktörün makrofaj göçündeki inhibisyondan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu faktör MIF olarak adlandırılmıştır. Bu faktör bulunduktan sonra biyolojik olayları düzenleyen başka faktörlere yönelik de araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda monosit ve nonimmün hücrelerin de hücreler arası iletişimde rol oynayan proteinleri oluşturduğu bulunmuştur. Bu faktörlerden monosit kökenli olanlara lenfokinler adı verilmiş, genel anlamda hepsi sitokinler olarak adlandırılmıştır. Birçok sitokin sadece bir hücreden değil, birden fazla hücreden salgılandığı ve immün sistemin değişik hücreleri arasında kompleks bir etkileşim içinde oldukları için IL olarak adlandırılmıştır (80).

Sitokinler, değişik hücreler tarafından sentez edilip salınan, hücre olgunlaşması ve değişimi, inflamasyon, immünite ve doku onarımında önemli biyolojik roller üstlenen düşük molekül ağırlıklı protein yapısında mediatörlerdir. İmmün sistemdeki temel fonksiyonları nedeniyle genetik ilişki çalışmalarında en fazla araştırılan moleküllerdir. Sistemik etkileri yoktur, uyarılar sonucu lokal olarak sentez edilip etki gösterirler. Yapılan çalışmalar sitokinlerin akciğer ve diğer organlardaki inflamatuvar olayların düzenlenmesinde oldukça kompleks bir etkileşim ağı içinde olduklarını göstermiştir. Sitokinlerin bazıları bir araya geldiğinde birbirlerinin etkilerini inhibe edebilmektedir. Sitokinler inflamatuvar aktivitelere göre pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar olarak da alt gruplara ayrılmıştır (80).

➤ **Proinflamatuvar Sitokinler**

Fagositik hücreler tarafından *M. tuberculosis*'in tanınmasına, hücre aktivasyonuna ve çok sayıda sitokinin üretilmesine sebep olurlar (80).

▪ TNF- α

TNF- α ilk defa farelerde tümörleri nekrotize edebilen makrofaj türevli faktör olarak tanımlanmıştır. Membrana bağlı 233 aminoasitten oluşan prekürsör protein olarak sentezlenir ve TNF- α dönüştürücü enzim ile 157 aminoasitten oluşan çözünür formu meydana gelir. Çözünür molekül TNF reseptör (TNFR) 1 ve TNFR2'ye bağlanarak etkisini gösterir (81).

M. tuberculosis makrofajları, DH'leri ve T hücrelerini TNF- α sekrete etmesi için uyarır. TNF- α , TB'da oluşan immün ve patolojik cevaplarda pek çok açıdan etkilidir. TNF- α ya da TNFR'ü eksik olan farelerde *M. tuberculosis* enfeksiyonunun, kontrol grubuna göre daha fazla bakteriyel yüke ve farelerin daha hızlı ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir. TNF- α , *M. tuberculosis*'e karşı immün cevapta son derece önemli olan IFN- γ ve nitrik oksit sentaz (NOS) 2 ekspresyonunu da uyarabilmektedir (82).

TNF- α granülom oluşumunda anahtar rol oynar, böylece bakteri bir duvar ile sınırlandırılır ve enfeksiyonun yayılması engellenir (83). TNF- α , *M. tuberculosis* enfeksiyonunda hücrelerin göçünü ve doku içine yerleşimini; kemokinler ve kemokin reseptörleri gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu etkiler. Bu sayede enfekte doku içinde fonksiyonel granülom oluşumunda belirgin olarak rol oynar (74).

TNF- α konak dokusunun hasarında etkili olan en önemli faktördür. Sistemik cevap ile karşılaştırıldığında enfeksiyonun yer aldığı sınırlı alanda (örneğin plevral sıvı) TNF- α düzeylerinin arttığı görülmüştür. TNF- α 'nın sistemik yayılımı, ateş, kilo kaybı gibi istenmeyen inflamatuvar etkilere sebep olur. TNF- α ya da TNF- α reseptör p55 eksik farelerin mikobakterilere karşı duyarlılıkları artmıştır. Benzer olarak Crohn hastalığı ve romatoid artritte monoklonal anti-TNF- α antikor kullanımının TB reaktivasyon oranını artırdığı gösterilmiştir (83).

▪ IFN- γ

IFN- γ , *M. tuberculosis* enfeksiyonunun kontrolünde son derece önemli Th1 tipi bir sitokin olup; CD4+, CD8+ ve NK hücreler tarafından üretilir. Antijen sunumunu artırır; etkenin öldürülmesine CD4+ T lenfosit ve sitotoksik T lenfositin katılımını sağlar. Antijen spesifik T hücre immünesinde özellikle etkindir (83).

Makrofajları aktive etmede oldukça etkili olan IFN- γ , TNF- α ile birlikte sinerjik etki gösterir. Antimikobakteriyel makrofaj fonksiyonlarının aktivasyonunda IFN- γ ve TNF- α 'nın kostimülatör aktivitesi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, IFN- γ 'nın TNF- α 'dan daha fazla antimikobakteriyel makrofaj fonksiyonlarını uyardığı; TNF- α üretiminin endojen olarak bloke edilmesiyle, IFN- γ ile uyarılan makrofaj aktivasyonunun azaldığı; hem IFN- γ hem de TNF- α 'nın kombinasyonu ile optimum makrofaj aktivasyonunun sağlandığı gösterilmiştir (74).

IFN- γ geni eksik farelerin, virülan *M. tuberculosis*'e karşı çok duyarlı oldukları gösterilmiştir. Bu fareler BCG ile enfekte edildiklerinde, bakteriyel yükün çok arttığı ve granülomların daha büyük ve düzensiz olduğu görülmüştür (74). IFN- γ ya da IFN- γ reseptör genlerinde eksiklik veya bozukluk olan insanlarda mikobakteriyel enfeksiyonlara eğilimin arttığı bildirilmiştir. Aktif TB'lu hastalarda yapılan çalışmalarda, IFN- γ düzeylerinin baskılandığı da saptanmıştır (82).

▪ IL-12

IL-12, disülfid bağları ile bağlanan iki subünitten (p35 ve p40) oluşmuş 70 kDa'luk heterodimerik bir proteindir. NK, $\alpha\beta$ (CD4+ ve CD8+) ve $\gamma\delta$ T hücre reseptörü taşıyan T hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırır. IFN- γ üretimini artırarak Th1 tipi T hücre cevabının gelişimine katkıda bulunur. IL-4 ve IL-10'un etkin olduğu Th2 tipi cevabı aşağıya çeker (84). IL-12, *M. tuberculosis*'in fagositozundan sonra makrofaj, DH gibi fagositik hücreler tarafından üretilir. TB'da akciğer infiltratlarında, plörezide, granülomlarda ve lenfadenitlerde tespit edilmiştir (83). IL-12 eksik farelerde mikobakteri enfeksiyonlarına duyarlılığın artmış olması bu sitokinin koruyucu rolünü göstermektedir. IL-12 p40 eksik farelerin enfeksiyona duyarlılıklarının ve bakteriyel yüklerinin arttığı; ayrıca muhtemelen azalmış IFN- γ 'ya bağlı olarak hayatta kalma sürelerinin azaldığı görülmüştür. IL-12 p40 ya da IL-12 reseptör gen mutasyonları olan insanların, T hücrelerinden IFN- γ üretiminin azaldığı, dissemine BCG ve *M. avium* enfeksiyonlarına daha duyarlı oldukları rapor edilmiştir (11).

▪ IL-18

IL-1 ailesinin bir üyesidir. Başlangıçta IL-12 ile sinerjisi olan IFN- γ uyarıcı faktör olarak bilinen bu sitokinin daha sonraları diğer pro-inflamatuvar sitokinleri, kemokinleri ve transkripsiyon faktörlerinin üretimini uyardığı anlaşılmıştır. IL-18'in mikobakteriyel enfeksiyonlar sırasında koruyucu rolü vardır. IL-18 eksik olan fareler, BCG ve *M. tuberculosis* enfeksiyonlarına çok duyarlıdır. *M. leprae* ile enfekte farelerde de direnç, IL-18 ekspresyonu ile orantılı bulunmuştur (83).

IL-18'in en önemli etkisi, IFN- γ indüksiyonunu sağlamasıdır. Yapılan bir çalışmada, TB hastalarının ve sağlıklı kontrollerin periferik kan mononükleer hücre (Peripheral Blood Mononuclear Cell-PBMC)'leri *M. tuberculosis* ile stimüle edilmiş, hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha az IL-18 ve IFN- γ saptanmış; *M. tuberculosis* ile indüklenen IFN- γ üretimi, anti-IL-18 ile inhibe edilmiş, rekombinant IL-18 ile artırılmıştır; *M. tuberculosis*'e cevap olarak alveolar makrofajların salgıladığı IL-18 ve plevral sıvıya sekrete edilen IL-18 ve IFN- γ konsantrasyonları TB'lu hastalarda, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgular IL-18'in, TB immünesi ile IFN- γ üretiminde son derece önemli olduğunu ve mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı Tip1 sitokin cevabını sağladığını ortaya koymuştur (85).

▪ IL-15

IL-15, biyolojik aktiviteleri açısından IL-2'ye benzer. NK ve NKT (Natural Killer T cell) hücrelerinin gelişimini stimüle ettiği; periferik kan T hücrelerinin, tümöre infiltre olan lenfositlerin ve B hücrelerinin aktivasyonu ile makrofaj ve dentritik hücrelerin olgunlaşmasını sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca efektör sitolitik hücre gelişimini uyardığı; NK hücreleri farklılaşmaya uğratarak bu hücrelerin daha etkin sitotoksik-sitolitik aktivite kazanmış olan lenfokinle aktive öldürücü hücreler formuna geçmesine yardımcı olduğu tespit edilmiştir (86).

In vivo IL-15'in aşırı ekspresyonunun NK ve antijen spesifik T sitotoksik 1 cevabının artışına yol açarak BCG enfeksiyonuna karşı korunmayı güçlendirdiği, bununla ilişkili olarak BCG aşısının biyolojik etkinliğini artırabilmek amacıyla IL-15'in BCG aşısı ile birlikte adjuvan olarak verilebileceği ileri sürülmektedir (87).

➤ Anti-inflamatuvar Sitokinler

M. tuberculosis'in başlattığı pro-inflamatuvar cevap, anti-inflamatuvar mekanizmalarla antagonize edilir. Solubl sitokin reseptörleri (solubl TNF- α reseptör I ve II), hücrel reseptörlere sitokinlerin bağlanmalarını engeller ve böylece hücre içi sinyalizasyonu bloke eder. Ayrıca üç anti-inflamatuvar sitokin olan IL-4, IL-10 ve TGF- β , TB'a karşı etkin olan pro-inflamatuvar sitokinlerin etkilerini veya üretimini inhibe edebilir (11).

▪ IL-10

Sitokin sentez inhibitör faktörü olarak isimlendirilen IL-10, CD4+ T hücreleri, monositler, CD8+ T hücreleri, keratinositler vb birçok hücre tarafından üretilir. TB'da IL-10, LAM'ın bağlanıp bakterinin fagosite edilmesinden sonra makrofajlar tarafından üretilir. *M. tuberculosis* ile aktive olan T hücreleri de IL-10 sentezleyebilirler. IL-10 pro-inflamatuvar sitokin cevabını, IFN- γ , TNF- α ve IL-12'nin üretimini aşağı çekerek antagonize eder (83). CD4+ T hücre cevabını ya direkt olarak ya da mikobakteri ile enfekte hücrelerin ASH fonksiyonunu bozarak inhibe edebilir (82). T hücreleri aşırı IL-10 eksprese eden transgenik fareler BCG ile enfekte edildiklerinde, yeterli IFN- γ üretimi yapan T hücre cevabına rağmen; bakteriyel yükün daha fazla, enfeksiyonu temizleme kapasitesinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar IL-10'un, IFN- γ aracılı makrofaj aktivasyonunu engelleyebileceğini göstermektedir (88).

▪ TGF- β

M. tuberculosis ya da LAM ile stimülasyondan sonra monosit ve DH'ler tarafından üretilir (82). TGF- β , hücrel immüneyi, T hücrelerinde IFN- γ üretimini ve T lenfositlerin olgunlaşmasını baskılar. Makrofajlarda antijen sunumunu, pro-inflamatuvar sitokin üretimini, hücrel aktivasyonu antagonize eder; ROI ve RNI'lerinin üretimini engeller; NK ve sitotoksik T lenfosit fonksiyonlarını inhibe eder. IFN- γ 'nın yanı sıra TNF- α ve IL-1 salınımını azaltır (83). Anti-inflamatuvar cevapta, TGF- β ve IL-10 sinerji göstermektedir. TGF- β , IL-10 üretimini selektif olarak uyarır ve

her iki sitokin, fagosite edilmiş mikroorganizmaların öldürülmesi ve monosit/makrofaj aktivasyonunu da kapsayan, IFN- γ 'nın aracılık ettiği pek çok olayı antagonize eder; ayrıca IL-2 ve IFN- γ üretimini ve farklılaşmasını inhibe eder (89). TB'da TGF- β düzeylerindeki artış, hastalığın şiddeti ile ilişkili bulunmuştur. İlerlemiş akciğer TB hastalarının PBMC'leri, *M. tuberculosis* antijenleri ile uyarıldığında; TGF- β düzeylerinin, sağlıklı kontrollere ve orta düzeyde ilerlemiş hastalığı bulunanlara göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (90).

▪ IL-4

IL-4, *M. tuberculosis*'in latent hale geçişinde önemli rol oynayan iNOS'ı aşağı çekerek ve TLR-2 ile sinyalizasyonu kapatarak makrofajların aktivasyonunu engeller. Sağlık çalışanları ile yapılan bir çalışmada, *M. tuberculosis*'e cevap olarak IL-4 üreten CD8+ T hücrelerinin bulunduğu kişilerde 2-4 yıl içerisinde aktif hastalığın geliştiği görülmüş; IL-4'ün hastalığın erken evresindeki direnci yıkabileceği öne sürülmüştür. IL-4, farelerde Th1 cevabının baskın olduğu lezyonlar içinde de gösterilmiştir. Her iki durum, IL-4'ün immünpatolojiye de katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (91).

M. tuberculosis ile enfekte farelerde yapılan çalışmalarda ilerlemiş hastalık ve reaktivasyon ile IL-4'ün artmış düzeyleri arasında bir ilişki bulunmuştur. Benzer biçimde IL-4'ün aşırı üretimi, deneysel enfeksiyonlarda doku hasarını artırırken; inhibisyonu ise hücrel immüniteyi güçlendirmemiştir. IL4-/- farelerde, mikobakterilere karşı duyarlılığın artmadığı; bir başka çalışmada ise hava yolu ile enfeksiyondan sonra bakteri üremesinde ve granülom büyüklüğünde artış gözlenmiştir. Bu bulgular TB'da IL-4'ün rolünün hala oldukça tartışılan konular arasında olduğunu göstermekte; IL-4'ün insanlarda TB nedeni olduğu ya da sadece hastalık aktivitesini yansıttığı konusunda kesin bir görüş birliği bulunmamaktadır (83).

• Kemokinler

Enfeksiyon alanında inflamatuvar hücrelerin toplanmasından sorumlu olan kemokinlerin, bugüne kadar 40'tan fazla türü tanımlanmıştır (83). Kemokinler hedef hücrelerdeki spesifik reseptörleri ile sinyalizasyon kaskadını tetikler ve kemotaksisi

başlatırlar. Kemokinler makrofajlar, DH'ler, lökositler ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücrelerden salınırlar (11).

- **IL-8**

IL-8'in, nötrofillerin, T hücrelerinin ve monositlerin inflamasyon alanına göçünü düzenlemede etkin rolü vardır. TB hastalarının bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvılarında, plevra sıvılarında, plazmalarında ve *M. tuberculosis* ile enfekte dokularında IL-8 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (92).

- **Monosit Kemoatraktan Protein-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1)**

TB'da en önemli ikinci kemokin olan, MCP-1, monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenir ve bu hücreler üzerinde etkili olur. *M. tuberculosis*, öncelikli olarak monositler tarafından MCP-1'in üretimini uyarır. MCP-1'i eksik olan fare modellerinde, granülom oluşumunun inhibe edildiği gösterilmiştir. MCP-1'e cevap vermede başarısız olan C-C kemokin reseptör 2 eksik olan farelerde de granülom oluşumunun ve Th1 tipi sitokin üretiminin baskılandığı ayrıca *M. tuberculosis* ile enfeksiyondan sonra erken ölümün gerçekleştiği gözlenmiştir. (83).

- **RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted)**

TB'da yer alan diğer bir kemokin; lenfosit, makrofaj, fibroblast, trombosit, düz kas, endotel ve epitel hücreleri tarafından üretilen ve CCR-1, CCR-3, CCR-4 ve CCR-5 gibi reseptörlere bağlanabilen RANTES'dir. İnsanlar üzerine yapılan çalışmalarında RANTES, BAL örneklerinde saptanmıştır (83).

IL-8, MCP-1 ve RANTES'den başka kemokinlerin de TB'da hücre trafiğinde yer aldığı rapor edilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* fare çalışmalarında *M. tuberculosis*'in uyardığı tespit edilen diğer kemokinler; makrofaj inflamatuvar protein (MIP) 1- α , MIP-2, MCP-3, MCP-5 ve "Interferon gamma-induced protein" (IP) 10'dur (82).

2.4. TB Genetiği

M. tuberculosis, konak hücresi olarak makrofajları kullanmaktadır. Bakterinin temizlenmesinde özellikle makrofajlar ve makrofaj fonksiyonu üzerine etkili olan sitokinlerin önemli rolü vardır. Oluşturduğu enfeksiyona karşı direnç, bakteri ile konağın bağışıklık sistemi arasında gelişen kompleks ilişkilerin sonucudur. *M. tuberculosis* ile enfekte olan bireylerin hemen hemen tamamında enfeksiyon gelişmekle beraber, enfeksiyonu geçirenlerin sadece %5-10 kadarında klinik hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır (93). Oysa hastaların çok azında diabetes mellitus, ileri yaş, alkol bağımlılığı, HIV enfeksiyonu, kortikosteroid kullanımı gibi altta yatan bir risk faktörü tespit edilebilmektedir (94).

Son yıllara kadar bu durumdan, sosyoekonomik durum, kalabalık yaşam ve malnütrisyon gibi çevresel faktörler sorumlu tutulmuştur. Ancak, özellikle son yıllarda aile ve ikiz çalışmaları ile başlayan ve yeni moleküler yöntemlerin devreye girmesi ile çeşitlenerek devam eden sayısız çalışma, konağa ait genetik faktörlerin de en az çevresel faktörler kadar önemli rolü olduğunu ortaya koymuştur. Bugüne kadar TB'a konak duyarlılığı üzerine etkili olduğu bildirilen genetik faktörler şunlardır: İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen-HLA), Vitamin D Reseptörü, Doğal Dirençle İlişkili Makrofaj Protein 1 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1-NRAMP 1), Mannoza Bağlayıcı Lektin (Mannoz Binding Lectin-MBL) ve sitokinler (TNF- α ve IL-1)'dir (13).

- **İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen-HLA)**

İnsanlarda HLA sistemi, altıncı kromozomun kısa kolunda yerleşmiş olan MHC sınıf I (A, B, C lokusları) ve sınıf II (DP, DQ, DR lokusları) moleküllerinden oluşan bir komplekstir. Sınıf I molekülleri vücutta tüm çekirdekli hücrelerde bulunurken, sınıf II molekülleri B lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere sadece birkaç tip hücrede bulunur. Sınıf I moleküller, hücre içine alınan endojen antijenlerin (virüsle enfekte olan konak hücreleri gibi) CD8+ T lenfositlere sunumunda görev alır ve hedef hücrelerin efektör fonksiyonlarını yönlendirirler (95). Sınıf II moleküller ise immün yanıtın uyarılmasında görev yaparlar. Antijen sunan hücreler (makrofajlar gibi), ekzojen

antijenlerle sınıf II molekülleri bir araya getirerek, IL-1 varlığında bu antijenleri CD4+ T lenfositlere sunarlar (13).

HLA genlerinin hastalık üzerine etkisinin, T lenfositlerin antijen sunmadaki tipik fonksiyonları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, klinik TB'un ortaya çıkışı ve hastalığın ciddiyeti ile ilişkili birkaç major genin varlığını ortaya koymuştur. Bu çalışmaların çoğunda, bir sınıf II antijeni olan HLA-DR2 (özellikle HLADRB1*1501 ve HLA-DRB1*1502) ile akciğer TB'u gelişimi ve radyolojik olarak yaygın lezyonlarla seyreden ciddi hastalık tablosu arasında ilişki bulunmuştur. Bu ilişkinin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber bir çalışmada, HLA-DR2 (+) olan hastalarda *M. tuberculosis*'in 38kDa proteinine karşı artmış immün yanıt tespit edilmiş ve bazı hastalarda aktif TB'da yükselmesi beklenen lizozim düzeyleri daha düşük bulunmuştur (93).

HLA-DR2, TB'da ilaç direncinden de sorumlu tutulmaktadır. Major anti-TB ajanlardan biri olan INH, karaciğerde asetillenerek metabolize olmaktadır. Karaciğerin ilaç asetilleyen enzimlerinin (N-asetil transferaz 2) genetik kontrol altında olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir. İnsanlar farmakokinetik, biyokimyasal ve genetik açıdan, hızlı ve yavaş N-asetilleyenler olarak ikiye ayrılmaktadır. Yavaş asetilleyenler, periferik nöropati gibi ilacın yan etkilerinin ortaya çıkması açısından risk altındayken, hızlı asetilleyenler ilacı hızla uzaklaştırdığından tedavinin yetersiz kalması ile karşı karşıya kalır. HLA-DR2'nin yapılan çalışmalarda hızlı asetilleyen grupta anlamlı olarak daha yüksek düzeyde bulunduğu belirtilmiştir (93).

- **Vitamin D Reseptörü**

D vitamininin aktif metaboliti olan 1,25D₃, kalsiyum metabolizmasında önemli bir regülatör olmasının yanısıra, bağışıklık sistemini düzenleyici fonksiyonları da vardır. 1,25D₃ monositleri aktive eder, hücre aracılı bağışıklığı düzenler, lenfosit olgunlaşması ile Ig üretimi ve sitokin sentezini baskılar (96). 1,25D₃'ün bu fonksiyonlarına aracılık eden Vitamin D Reseptörü (VDR) geni, insanda 12. kromozomda lokalize olmuştur. VDR, monositler ve aktive T ve B lenfositler üzerinde bulunur (13). Yapılan çalışmalar, VDR'nün insanlarda enfeksiyon hastalıklarına duyarlılığı düzenleyen bir immün yanıt geni olabileceğini ortaya koymuştur (97).

Epidemiyolojik veriler, D vitamini eksikliği ile TB duyarlılığı arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (96). TB'lu hastaların alveoler makrofajlarının 1,25D₃ ürettiği gösterilmiştir. Ayrıca, cilt TB'ü olan olgulara D vitamini verilmesi klinik düzelme sağlamaktadır (94).

1,25D₃, *M. tuberculosis*'in insan makrofajlarında replikasyonunu sınırlamaktadır. Yapılan bir çalışmada, kodon 352 değişimi için homozigot olanların (TT), TB'lu olgularda kontrollerden daha az bulunduğu tespit edilmiş ve D vitamini desteğinin TB'da bağışıklığı modifiye edebileceği üzerinde durulmuştur (97).

- **NRAMP-1**

NRAMP-1, 53kDa'luk bir integral membran proteini olup, makrofajlarda endolizozomal kompartmanda bulunmaktadır. Kesin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber, özellikle demir alımını yönlendiren bir metal iyon taşıyıcısı olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Enfekte makrofajların fagolizozomlarından demiri sitoplazmaya pompalayarak, fagolizozomlardaki bakterilerin gelişimi için gerekli olan demiri ortamdan uzaklaştırır ve hücre içi mikroorganizmaların replikasyonunu önler. Makrofaj aktivasyon yolunda da önemli roller üstlenmektedir: IL-1b, iNOS, MHC sınıf II molekülleri, TNF- α ve NO salınımını düzenler; larginin akımı ve oksidatif patlamayı denetler; ayrıca tümörisidal ve antimikrobiyal aktiviteleri bulunmaktadır (13).

NRAMP-1'deki değişimler, mikobakterilere karşı duyarlılığı artırmaktadır (98). Akciğer ve spinal TB'lu hastalarda yapılan bir çalışmada NRAMP-1 geni ile akciğer ve spinal TB'a duyarlılık arasında da ilişki bulunmuştur. Batı Afrika'da yapılan bir çalışmada, NRAMP-1 polimorfizmleri ile latent enfeksiyonlu hastalarda aktif TB gelişme riski arasında da kesin bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (82).

- **Mannoz Bağlayıcı Lektin (MBL)**

MBL, karaciğerde sentezlenen 96 kDa'luk bir akut faz proteini olup, komplemanı lektin yoldan aktive ederek mikroorganizmaların öldürülmesini sağlamaktadır (99). MBL, pek çok şekere etkin bir şekilde bağlanabilen ve oldukça iyi

korunmuş bir antikor olarak görev yapar. Bağlandığı şekerlerin çoğu memeli hücrelerinde yüksek yoğunlukta bulunmadığından memelilere ait şekerleri genellikle tanımaz, sıklıkla mikrobiyal hücrelerin yüzeyleri ile iyi uyum gösterir. Bu hücrelerle bağlanması; fagositlerin MBL ile kaplanan bakterilere tutunması, bakterinin hücre içine alınması ve öldürülmesi ile sonuçlanmaktadır (13).

M. tuberculosis, hücre duvarında LAM ve fosfatidil inozitol mannozid içerir. Bunların ikisi de mannoz içeren birer karbonhidrat olduğundan MBL tarafından bağlanabilmektedir. MBL, mikobakterilerin makrofajlara alınmasını sağlayan bir bağlayıcı protein olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle düşük serum MBL düzeylerine neden olan fonksiyonel mutasyonların akciğer TB'una duyarlılığı artırabileceği üzerinde durulmaktadır (13).

- **Sitokinler (TNF- α ve IL-1)**

TB duyarlılığı ile mikobakteriyal enfeksiyonların kontrolünde önemli olan immün sistem elemanlarını kodlayan genlerdeki polimorfizmler birçok çalışmada araştırma konusu olmuştur. Popülasyonda var olan bu değişik polimorfizmler veya alleller genellikle tek nükleotid değişimi (Tek Nükleotid Polimorfizmi-Single Nucleotide Polymorphism-SNP) ile olmaktadır (100). Polimorfizmler hastalığa yol açmayan, fakat hastalık için yatkınlık yaratabilen DNA değişikliği olarak tanımlanır. Bir sonraki jenerasyona basit Mendel kuralları ile aktarılır (101).

TNF- α , birçok inflamatuvar ve immün sistem aracılı cevapta önemli rol oynayan bir sitokindir. Esas olarak, monosit, makrofaj, T ve B lenfositler, NK hücreler ve endotoksin veya mikrobiyal ürünlerle uyarılan diğer hücrelerden salınır. Bağışık cevabı oluşturacak sitokin kaskadının indüksiyonu için gereklidir. TNF- α , inflamasyonda, yara iyileşmesinde ve doku onarımında görev alır. Vasküler tromboz ve tümör nekrozundan sorumludur (13).

İleri derecede artmış TNF konsantrasyonları birçok hastalığın patofizyolojisinde görev alır. Ateş, iştah kaybı, kaşeksi, letarji ve doku hasarına neden olur. Kontrolsüz olarak aşırı üretimi ise yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Sepsis ve çoklu organ yetmezliği ölümlerine sonuçlanabilir. TNF molekülünün bu etkilerine aracılık eden iki reseptörü bulunmaktadır: 55kDa (Tip I: CD120a) ve 75kDa (Tip II: CD120b) TNF

reseptörleri. Tip II reseptörün TNF- α bağlama afinitesi, Tip I reseptörden on kat fazladır. Tip I reseptör sitotoksik aktivite ve endotoksik şoktan sorumluyken, Tip II reseptör lenfosit olgunlaşmasını yönlendirmektedir (13).

TNF geni, insanda altıncı kromozomda, 6p21.1 ile 6p21.3 arasında MHC lokusunda yerleşmiştir. Bugüne kadar TNF lokusunda tanımlanmış birkaç önemli polimorfizm bulunmaktadır (102, 103):

- 1- (CA)_n sekansları: TNF a (15 allel)
- 2- (CT)_n sekansları: TNF b (7 allel), TNF c (2 allel), TNF d (7 allel), TNF e (4 allel)
- 3- Promoter bölge polimorfizmleri: -238 G→A değişimi (TNFA) Heterozigot/Homozigot, -244 G→A değişimi, -308 G→A değişimi (TNF1-2) Heterozigot /Homozigot, -376 G→A değişimi
- 4- Diğer nadir polimorfizmler: -49 G→A değişimi, -419 G→C inversiyonu, LT- α +250 G→A değişimi (TNFB1-B2), -1031, -863, -857 ve -228'de değişimler vardır.

Bunlar arasında LT- α +250 ve TNF- α -308 polimorfizmleri, bazal ve uyarılmış olarak artmış TNF- α üretimi ile ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle pek çok inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalığa yatkınlık ile bu polimorfizmler arasında ilişki kurulmaktadır (103).

IL-1, vücuttaki tüm çekirdekli hücreler tarafından üretilmektedir. İnsanda IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Bu iki form, ikinci kromozom üzerinde yer alan farklı genler tarafından kodlanan 159 ve 153 aminoasitlik peptidlerdir. Birçok hücre tarafından, biyolojik olarak inaktif olan, ancak reseptörlere bağlanma için IL-1 molekülleri ile yarışarak kompetitif inhibisyon yapan IL-1 reseptör antagonist (IL-1Ra) olarak bilinen proteini kodlayan üçüncü bir gen eksprese edilmektedir. IL-1 α ve β 'yi eşit olarak bağlayan iki tip IL-1 reseptörü tanımlanmıştır: Tip I reseptör (IL-1RI), IL-1'e duyarlı olan tüm hücrelerde sinyal iletimini sağlarken, Tip II reseptör (IL-1RII) IL-1 β 'ya daha kuvvetli bağlanır ve inflamasyon bölgesinde IL-1 β 'nın endojen inhibitörü olarak davranır (13).

Pro-inflamatuvar sitokin olan IL-1b ve IL-1 aktivitesinin spesifik inhibitörü olan IL-1Ra, *in vitro* olarak *M. tuberculosis* tarafından indüklenmektedir. Yine TB'lu hastaların IL-1Ra serum konsantrasyonları, sağlıklı kişilere oranla daha yüksek olup,

TB'da hastalık aktivitesinin bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır. IL-1 β geninde, -511 ve +3953 pozisyonlarında iki adet biallelik polimorfizm tanımlanmıştır. IL-1Ra geninde ise, 5 farklı allel ve 2-6 adet 86 baz çift (bç)'lik tekrar dizisi (tandem repeat) polimorfizmi bulunmuştur. Genetik analizler, IL-1Ra VNTR allel A2'nin, *M. tuberculosis* enfeksiyonuna cevap olarak daha yüksek düzeyde IL-1Ra üretimi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu alleli taşıyanlar, taşımayanlardan 1.9 kat daha fazla IL-1Ra üretmektedir (104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Etik Kurul Başkanlığı'nın 17.04.2009 tarih ve 2009/56-04 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı"nı almıştır.

Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı Göğüs Hastalıkları A. D. Tüberküloz Servisi'nde klinik materyalinde MTC izole edilen 84 TB hastası dahil edildi.

Klinik örnekler; steril (BOS, diğer vücut sıvıları, kemik iliği, subrapubik aspirasyon ve biyopsi örnekleri) ve steril olmayan (balgam, idrar, apse, laringeal sürüntü, bronkoalveoler lavaj sıvısı, açlık mide suyu, gaita, cilt ve yumuşak doku) örnekler olarak gruplandırıldı ve steril olmayan örnekler homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulandı (105, 106). Steril örnekler santrifüj edildikten sonra, santrifüj tüpünün dip kısmından; steril olmayan örnekler homojenizasyon-dekontaminasyon işleminden sonra Lowenstein Jensen (LJ) katı ve BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 sıvı besiyerlerine ekildi ve üremeleri için 37°C'de inkübatörde 6 haftaya kadar bekletildi. Üremesi gözlenen izolatların saflık kontrolü Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile yapıldı (107, 108). Boya sonuçları saf olan izolatların MTC ve TB dışı mikobakteri (Mycobacteria other than tuberculosis-MOTT) ayrımı BACTEC MGIT 960 para nitro benzoik asit (p-NBA) testi (109) ve klasik biyokimyasal testler (niasin birikim, katalaz aktivitesi, nitrat redüksiyonu) ile yapıldı (110, 111). Tiplendirme sonucunda klinik materyalinde MTC izole edilen hastalar çalışmaya dahil edildi.

Sağlıklı kontrol grubunun kanları, Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kan Merkezi'ne donör olarak başvuran, donör sorgulama formuna göre parenteral taşınan hastalıklar bakımından hiçbir risk faktörüne sahip olmayan ve donör tarama testleri negatif olan toplam 110 sağlıklı bireyden elde edildi. Sağlıklı

kontrol grubu seçilirken cinsiyet ve yaş ortalamalarının hasta grubu ile uyumlu olmasına dikkat edildi.

Tüm hastalara ve sağlıklı kontrol grubuna çalışma hakkında bilgi verildi ve onayı alınan kişiler çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol grubuna ait kişilerden 3-4 ml periferik kan örneği, içerisinde antikoagülan (EDTA) bulunan tüplere alındı.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- PZR cihazı (Thermal Cyclers, Eppendorf Mastercycler)
- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich-Universal 32 R)
- Mikrodalga Fırın (Beko-MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert)
- Otoklav (Nüve-OT 020)
- Hassas Terazisi (Scaltec)
- Buzdolabı (Indesit)
- Vortex (NM-110)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108)
- Mikropipet Seti (Gilson-Pipetman-P 10-P100-P1000)
- Isı bloğu (Techne DB-2D)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris-Hidroklorid (Sigma T- 5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema-302430300, cat nr 30354)
- Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
- Borik asit (Merck K29935665 204)
- Brom fenol mavisi (SCP Science B7722)
- Sükröz (Merck 1.07651)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän/ 32221 Germany)
- Fenol kristalleri (Sigma P-1039, USA)
- Kloroform (Merck K28735331 107)
- Agaroz (Sigma- A-9539 lot 013K0008)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas)
- 10X PCR Buffer (Mg Free) (Fermentas)
- 5 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10 mM dNTP Mix (Fermentas)
- Proteinaz K (Sigma P 2308)
- 100 bç'lik Markır (100 bp DNA Step Ladder) (Fermentas)
- Lowenstein Jensen besiyeri (Merck 01256-03 Germany)
- Bazik fuksin (Sigma C-4165 USA)
- %95'lik etil alkol (Sigma E-285 USA)
- Metilen mavisi (Sigma 6900 USA)
- Hidroklorik asit (Sigma 920-01 USA)
- NaNO₃ (Sigma S8170 USA)
- KH₂PO₄ (P-2222 USA)
- Na₂HPO₄ (Sigma S0876 USA)
- Sulfanilamid (Sigma S9251 USA)
- *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Sigma N9125 USA)
- H₂O₂ (Sigma H6520 USA)
- Tween-80 (Sigma P043 USA)

- Anilin (Sigma A9880 USA)
- Siyanojen bromid (Sigma C9142 USA)
- Gliserol (Sigma G516 USA)
- İyot (Merck 34806 USA)
- ρ-nitrobenzoik asit (PNB) (Merck, S4678746 Germany)
- Etidyum-Bromid (Sigma E8751-1G USA)
- Distile Su
- DNase, RNase içermeyen su (Fermentas)
- Primerler
 - IL-12 p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmi
1188-F, 5'-TTCTATCTGATTTGCTTTA-3'
1188-R, 5'-CCTACATACCTTACAAAGT -3'
 - IFN-γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi
Antisense 5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'
Primer A (sense) 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3'
Primer T (sense) 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3'
 - IL-10 -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi
Antisense 5'-CAGCCCTTCCATTTTACTTTC-3'
Primer G (sense) 5'-TACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3'
Primer A (sense) 5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3'
İnternal kontrol
Primer 1 (sense) 5'-GCCTTCCAACCATTCCTTA-3'
Primer 2 (antisense) 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'
 - IL-4 -590 C/T tek nükleotid polimorfizmi
Primer 1: (AW41A) 5'-ACTAGGCCTCACCTGATACG-3'
Primer 2: (AW41B) 5'-GTTGTAATGCAGTCCTCCTG-3'
 - TNF-α -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi
Generic primer (antisense) 5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3'
Primer G (sense): 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3'
Primer A (sense): 5'-AATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3'
- Enzimler
 - *BsmFI* (*FaqI*) (Fermentas ER1811)

- *TaqI* (Fermentas ER0671)

3.2.3. Kullanılan Boyalar ve Çözeltiler

3.2.3.1. Kullanılan Boyalar

- **Karbolfuksin Hazırlanması**

0.3 gr bazik fuksin tartılarak 10 ml %95'lik etil alkolde çözüldü. 5 gr fenol kristalleri tartılarak 100 ml distile suda çözüldü. Hazırlanan bu solüsyonlar 1/1 oranında karıştırıldı.

- **Metilen Mavisi Hazırlanması**

0.3 gr metilen mavisi tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.

- **%3'lük Asit Alkol Hazırlanması**

3 ml hidroklorik asit üzerine 97 ml %95'lik etil alkol ilave edildi.

3.2.3.2. Kullanılan Çözeltiler

- **Nitrat Redüksiyon Testi Kimyasallarının Hazırlanışı**

- **Nitrat Çözeltisi Hazırlanışı**

M/45 fosfat tamponu eriyiği (0.02 M, pH 7.0) içindeki nitrat test substratı şu şekilde hazırlandı. 0.8 gr NaNO₃; 1.17 gr KH₂PO₄ ve 1.93 gr Na₂HPO₄ tartılarak 1 litre steril distile suda çözüldü.

➤ **%0.2'lik Sulfanilamid Hazırlanışı**

0.1 gr sulfanilamid tartılarak 50 ml steril distile suda çözüldü.

➤ **%0.1'lik *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride Hazırlanışı**

N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 0.1 gr tartılarak 100 ml steril distile suda çözüldü.

• **Katalaz Aktivitesi Testi Kimyasallarının Hazırlanışı**

➤ **%30'luk Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Hazırlanışı**

30 ml H₂O₂ çözeltisi, son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

➤ **%10'luk Tween-80 Hazırlanışı**

10 ml Tween-80, son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

• **Niasin Birikimi Testi Kimyasallarının Hazırlanışı**

➤ **%4'lük Anilin Hazırlanışı**

4 ml anilin, son hacim 100 ml olacak şekilde %95'lik etil alkol ile tamamlandı.

➤ **%10'luk Siyanojen Bromid Hazırlanışı**

10 gr siyanojen bromid tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.

3.2.4. Kullanılan Besiyeri

- **LJ Besiyerinin Hazırlanması**

37.5 gr toz LJ besiyeri tartılarak cam balona aktarıldı. Üzerine 600 ml distile su ve 12 ml gliserol eklendi. 121°C’de 15 dakika 1 atmosfer basınçta otoklavlandı. Otoklavdan çıkan besiyeri benmaride 50°C’ye kadar soğutuldu. Yumurtaların uç tarafı önce %2’lik iyotla daha sonra alkol (%70’lik etil alkol) ile silindi. Steril pens ile yumurtalar uç tarafından kırılarak, öncelikle içerisinde steril cam bocuk bulunan steril cam balona aktarıldı. Cam balon sürekli karıştırılarak yumurtaların tamamen homojenize olması sağlandı. Daha sonra ağız kısmı iki kat steril gazlı bez ile kaplanan steril cam mezüre son hacim 1000 ml olacak şekilde aktarıldı. Homojenize edilen yumurta, hazırlanmış olan besiyeri üzerine ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyerinden steril tüplere 5’er ml dağıtıldı. Tüpler koagülatörde, 80°C’de eğik bir şekilde, 45 dakika koagüle edildi. Besiyerlerinin sterilite kontrolü için ekim yapılmamış bir adet LJ besiyeri 37°C’de inkübatörde 2-3 gün bekletildi. Yine hazırlanan bu besiyerinin kalite kontrolü standart suşlarla [*M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. kansasii* (ATCC12478)] yapıldı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Biyokimyasal Testler

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik materyallerinden izole edilen suşların tiplendirilmesi için klasik biyokimyasal testler kullanıldı. Bunun için izole edilen suşlardan iki adet LJ besiyerine pasaj yapıldı ve 37°C’lik inkübatörde 3-4 hafta üremeleri için beklendi. Bu süre içerisinde üremesi tespit edilenler, öncelikle EZN yöntemiyle boyanarak saflık kontrolünden geçirildi. Biyokimyasal identifikasyon için saf olan kültürlerle niasin birikimi, nitrat redüksiyon ve katalaz aktivitesi testleri yapıldı.

- **Nitrat Redüksiyon Testi**

Nitrat redüksiyon testi için, LJ besiyerlerinde 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilip, EZN yöntemiyle boya sonucu saf olan taze kültürlerden bir öze dolusu koloni alınarak, 2 ml nitrat çözeltisi içerisine süspanse edildi ve 37°C'lik inkübatörde 2 saat bekletildi. Bu süre sonunda süspansiyona 1 damla hidroklorik asit, 2 damla %0.2'lik sülfanilamid çözeltisi ve 2 damla %0.12'lik N-naftil etilen diamin dihidroklorid çözeltisi ilave edildi. Tüpler çalkalanarak renk oluşumuna göre değerlendirildi. Pembe renk oluşumu nitrat redüksiyonunun olduğunu göstermektedir. MTC izolatlarında nitrat redüksiyon reaksiyonu gelişmesi beklenmektedir (110, 111).

- **Katalaz Aktivitesi Testi**

Katalaz aktivitesi, ısıya stabil katalaz testi ve semikantitatif katalaz testi olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Bu çalışmada semikantitatif katalaz testi yapıldı. LJ besiyerlerinde 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilip, EZN yöntemiyle boya sonucu saf olan taze kültür tüpüne 1 ml %30'luk H₂O₂-%10'luk Tween 80 karışımı eklendi. Tüp oda ısısında 5 dakika bekletildi. Süre sonunda oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçüldü. Yüksek katalaz reaksiyonunda hava kabarcıklarının yüksekliği 45 mm'den daha yüksek, düşük katalaz reaksiyonunda 45 mm'den daha düşüktür. MTC izolatlarında düşük katalaz aktivitesi gözlenmektedir (110, 111).

- **Niasin Birikimi Testi**

Niasin birikim testi için, LJ besiyerlerinde 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilip, EZN yöntemiyle boya sonucu saf olan taze kültür tüpüne 1.5 ml steril distile su veya steril SF konuldu. Steril bir öze ile besiyeri yüzeyindeki koloniler, besiyerine fazla zarar vermeden, kazınarak sıvı içerisine geçmeleri sağlandı. Tüpler eğik bir şekilde 30 dakika bekletilerek sıvının besiyeri yüzeyini örtmesi sağlandı. Süre sonunda tüpteki sıvıdan 1 ml boş tüpe aktarıldı. Tüpün üzerine %4'lük anilin ve %10'luk siyanojen bromid'den 0.5'er ml ilave edildi. 10 dakika içerisinde renk değişimine göre testin

değerlendirilmesi yapıldı. Sarı renk oluşumu besiyerinde biriken niasini göstermektedir ve MTC izolatlarında niasin test sonucunun pozitif olması beklenmektedir (110, 111).

Bu biyokimyasal testlerde kontrol olarak *M. fortuitum* (ATCC 6841) ve *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) standart suşları kullanıldı.

3.3.2. Moleküler Analiz

3.3.2.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol grubundan alınan tam kan örneklerindeki lenfosit ve granülositlerden genomik DNA ekstraksiyonu Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche 11 796 828 001)'i kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce "Inhibitor Removal Buffer" a 20 ml ve yıkama tamponu (wash buffer)'na 80 ml absolut etanol eklendi. Liyofilize olan proteinaz K, 4.5 ml DNase/RNase içermeyen distile suda çözüldü ve 50 µl'lik hacimlere ayrılarak -20°C'de çalışılıncaya kadar saklandı.

- Steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne 200 µl binding buffer ve 40 µl proteinaz K konuldu.
- Bunun üzerine 200 µl tam kan örneği ilave edildi ve vortekslendi.
- 70°C'de 10 dakika bekletildikten sonra tüpüne 100 µl izopropil alkol ilave edildi.
- Her bir hasta için ekstraksiyon kitinin içerisinde bulunan toplama tüpü ve filtreli tüpten bir adet hazırlandı ve ependorf tüpteki sıvının tamamı filtreli tüplere aktarıldı.
- Toplama tüpü ve filtreli tüp 9.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi ve filtreli tüpe 500 µl "inhibitor removal buffer" eklenerek tekrar 9.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi ve filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu eklenerek tekrar 9.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- Bu basamak bir kez daha tekrarlandı.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılmadan içerisindeki sıvı atık kabına döküldü, toplama tüpü tekrar filtreli tüpün altına yerleştirilerek 12.000 rpm’de 10 saniye yüksek devirde santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak filtreli tüp steril 1.5 ml’lik ependorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 70°C’de bekleyen “elution buffer”dan 150 µl ilave edilerek oda ısısında 3 dakika beklendi.
- Süre sonunda 9.000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapılarak filtreli tüpte bulunan sıvının ependorf tüpe geçmesi sağlandı.
- Edile DNA çalışılmaya kadar -80°C’de saklandı.

3.3.2.2. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol grubundan alınan kanlarından elde edilen DNA örneklerindeki tek nükleotid polimorfizmini tespit etmek için ARMS PZR ve PZR-RFLP yöntemleri kullanıldı.

3.3.2.2.1. TNF- α Geni Promoter -308 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi

TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi için ARMS PZR yöntemi Oh ve ark.’nın (112) çalışmalarından seçilmiştir. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi çoğaltıldı (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. TNF- α geni promotör -308 G/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri (112).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bp)
TNF- α promotör -308 G/A	Generic primer (antisense)	TCTCGGTTTCTTCTCCATCG	184
	Primer G (sense)	ATAGGTTTTGAGGGGCATGG	
	Primer A (sense)	AATAGGTTTTGAGGGGCATGA	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 μ l olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler [Generic primer (antisense), Primer G ve Primer A], Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. TNF- α geni promotör -308 G/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	-308 G nükleotidi	-308 A nükleotidi
Distile su	33.7 μ l	33.7 μ l
10X PZR tamponu	5 μ l	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l	4 μ l
dNTP mix (10 mM)	1 μ l	1 μ l
Generic primer (antisense) (100 pmol/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l
Primer G (sense) (100 pmol/ μ l)	0.5 μ l	-
Primer A (sense) (100 pmol/ μ l)	-	0.5 μ l
Taq DNA polimeraz (5 U/ μ l)	0.3 μ l	0.3 μ l
Toplam PZR karışımı hacmi	45 μ l	45 μ l
DNA	5 μ l	5 μ l
Toplam hacim	50 μl	50 μl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait, üzerinde G ve A harfi yazılı steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 μ l olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er μ l DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi.

TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi için ısı döngü cihazında ARMS PZR koşulları Çizelge 3.3.'teki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.3. TNF- α geni promoter -308 G/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları (112).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	64	50 saniye	10
Zincir Uzaması (Extension)	72	40 saniye	
Denatürasyon	95	20 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	59	50 saniye	20
Zincir Uzaması (Extension)	72	50 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2.2. IFN- γ Geni +874 T/A Tek Nükleotid Polimorfizmi

IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi için ARMS PZR yöntemi Lopez-Maderuleo ve ark.'nın (113) çalışmalarından seçildi. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi çoğaltıldı (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri (113).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
IFN- γ +874 T/A	Antisense primer	TCAACAAAGCTGATACTCCA	261
	Primer A (sense)	TTCTTACAACACAAAATCAAATCA	
	Primer T (sense)	TTCTTACAACACAAAATCAAATCT	

Yine bu gen bölgesi çalışılırken PZR amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu (erişim numarası M13438) nükleotid dizisinden tasarlanan ve 426 bç'lik bölgeyi çoğaltan primerler ARMS PZR reaksiyonunda aynı anda amplifiye edildi (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizminde kullanılan internal kontrol primer dizileri (113).

Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
İnternal kontrol primer 1	GCCTTCCAACCATTCCCTTA	426
İnternal kontrol primer 2	TCACGGATTCTGTTGTGTTTC	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 μ l olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler [Generic primer (antisense), Primer A, Primer T, İnternal kontrol primer 1 ve İnternal kontrol primer 2], Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.6.'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	+874 T nükleotidi	+874 A nükleotidi
Distile su	32.7 μ l	32.7 μ l
10X PZR tamponu	5 μ l	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l	4 μ l
dNTP mix (10 mM)	1 μ l	1 μ l
İnternal kontrol primer 1	0.5 μ l	0.5 μ l
İnternal kontrol primer 2	0.5 μ l	0.5 μ l
Antisense primer (100 pmol/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l
Primer A (sense) (100 pmol/ μ l)	-	0.5 μ l
Primer T (sense) (100 pmol/ μ l)	0.5 μ l	-
Taq DNA polimeraz (5 U/ μ l)	0.3 μ l	0.3 μ l
Toplam PZR karışımı hacmi	45 μ l	45 μ l
DNA	5 μ l	5 μ l
Toplam hacim	50 μl	50 μl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait, üzerinde A ve T harfi yazılı steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 μ l olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er μ l DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi için ısı döngü cihazında ARMS PZR koşulları Çizelge 3.7.'deki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.7. IFN- γ geni +874 T/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları (113).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	62	50 saniye	10
Zincir Uzaması (Extension)	72	40 saniye	
Denatürasyon	95	20 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	56	50 saniye	20
Zincir Uzaması (Extension)	72	50 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2.3. IL-10 Geni Promoter -1082 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi

IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi için ARMS PZR yöntemi Lopez-Maderuleo ve ark.'nın (113) çalışmalarından seçildi. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi çoğaltıldı (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.8. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi ARMS PZR yönteminde kullanılan primer dizileri (113).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
IL-10 promoter -1082 G/A	Antisense primer	CAGCCCTTCCATTTTACTTTC	550
	Primer G (sense)	TACTAAGGCTTCTTTGGGAG	
	Primer A (sense)	CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG	

Yine bu gen bölgesi çalışılırken PZR amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu (erişim numarası M13438) nükleotid dizisinden tasarlanan ve 426 bp'lik bölgeyi çoğaltan primerler ARMS PZR reaksiyonunda aynı anda amplifiye edildi (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizminde kullanılan internal kontrol primer dizileri (113).

Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bp)
İnternal kontrol primer 1	GCCTTCCAACCATTCCTTA	426
İnternal kontrol primer 2	TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler [Generic primer (antisense), Primer A, Primer T, İnternal kontrol primer 1 ve İnternal kontrol primer 2], Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.10.'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.10. IL-10 geni promoter -1082 G/A polimorfizmi ARMS PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	-1082 G nükleotidi	-1082 A nükleotidi
Distile su	32.7 µl	32.7 µl
10X PZR tamponu	5 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	4 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl	1 µl
İnternal kontrol primer 1	0.5 µl	0.5 µl
İnternal kontrol primer 2	0.5 µl	0.5 µl
Antisense primer (100 pmol/µl)	0.5 µl	0.5 µl
Primer G (sense) (100 pmol/µl)	0.5 µl	-
Primer A (sense) (100 pmol/µl)	-	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.3 µl	0.3 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	45 µl	45 µl
DNA	5 µl	5 µl
Toplam hacim	50 µl	50 µl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait, üzerinde G ve A harfi yazılı steril 0,2 ml'lik PZR tüplerine 45 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IL-10 geni -1082 G/A polimorfizmi için ısı döngü cihazında ARMS PZR koşulları Çizelge 3.11.'deki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.11. IL-10 geni promotör -1082 G/A polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan ARMS PZR koşulları (113).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	62	50 saniye	10
Zincir Uzaması (Extension)	72	40 saniye	
Denatürasyon	95	20 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	56	50 saniye	20
Zincir Uzaması (Extension)	72	50 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2.4. IL-12B p40 Geni 1188 A/C Tek Nükleotid Polimorfizmi

IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmi için PZR-RFLP yöntemi Hall ve ark.'nın (114) çalışmalarından seçilmiştir. Bu yöntemde polimorfizmden sorumlu gen bölgesi önce primer spesifik PZR tekniği (Çizelge 3.12.) ile çoğaltılmakta daha sonra çoğaltılan bu bölge *TaqI* enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırılmaktadır.

Çizelge 3.12. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri (114).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bp)
IL-12B p40	1188-F	TTCTATCTGATTTGCTTTA	233
1188 A/C	1188-R	CCTACATACCTTACAAAGT	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler (1188-F ve 1188-R), Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.13.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.13. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	Miktar
Distile su	33.7 µl
10X PZR tamponu	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
1188-F (100 pmol/µl)	0.5 µl
1188-R (100 pmol/µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.3 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	45 µl
DNA	5 µl
Toplam hacim	50 µl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi için ısı döngü cihazında PZR koşulları Çizelge 3.14.'teki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.14. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları (114).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	43	30 saniye	30
Zincir Uzaması (Extension)	72	1 dakika	
Son Uzaması (Extension)	72	7 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra primer spesifik PZR tekniği ile amplifiye edilen 233 bç'lik bölge *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. PZR-RFLP yönteminde her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.15.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.15. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı

RFLP malzemeleri	Miktar
Distile su	1.8 µl
10X Buffer <i>TaqI</i>	1 µl
Restriksiyon enzimi (<i>TaqI</i>)	0.2 µl
Toplam RFLP karışımı hacmi	3 µl
PZR ürünü	7 µl
Toplam hacim	10 µl

Oluşturulan RFLP karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 3 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 7'şer µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi için ısı döngü cihazında RFLP koşulları Çizelge 3.16.'daki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.16. IL-12B p40 geni 1188 A/C polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İnkübasyon	65	16 saat	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2.5. IL-4 Geni Promoter -590 C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi

IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizmi için PZR-RFLP yöntemi Li ve ark.'nın (115) çalışmalarından seçilmiştir. Bu yöntemde polimorfizmden sorumlu gen bölgesi önce primer spesifik PZR tekniği ile (Çizelge 3.17.) çoğaltılmakta daha sonra çoğaltılan bu bölge *BsmFI* enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırılmaktadır.

Çizelge 3.17. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri (115).

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bp)
IL-4 promoter -590 C/T	AW41A	ACTAGGCCTCACCTGATACG	254
	AW41B	GTTGTAATGCAGTCCTCCTG	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas), dNTP (Fermentas), primerler (AW41A ve AW41B), Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve ekstrakte edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.18.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.18. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	Miktar
Distile su	33.7 µl
10X PZR tamponu	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
AW41A (100 pmol/µl)	0.5 µl
AW41B (100 pmol/µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.3 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	45 µl
DNA	5 µl
Toplam hacim	50 µl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi için ısı döngü cihazında PZR koşulları Çizelge 3.19.'daki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.19. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları (115).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	50 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	62	50 saniye	30
Zincir Uzaması (Extension)	72	50 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra primer spesifik PZR tekniği ile amplifiye edilen 254 bp'lik bölge *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile

kesildi. PZR-RFLP yönteminde her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.20.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.20. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı

RFLP malzemeleri	Miktar
Distile su	3.3 µl
10X Tango Buffer	1 µl
50X SAM* Buffer	0.2 µl
Restriksiyon enzimi (<i>BsmFI</i>)	0.5 µl
Toplam RFLP karışımı hacmi	5 µl
PZR ürünü	5 µl
Toplam hacim	10 µl

*SAM: S-adenosyl-L-methionine

Oluşturulan RFLP karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PZR tüplerine 5 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 5'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi için ısı döngü cihazında RFLP koşulları Çizelge 3.21.'deki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.21. IL-4 geni promoter -590 C/T polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İnkübasyon	37	16 saat	1
Enzim inaktivasyonu	80	20 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.3.2.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

ARMS PZR ve PZR-RFLP yöntemleri ile tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgeleri amplifikasyonla çoğaltıldıktan sonra etidyum bromid (Et-Br) ile boyanmış %1.5'lük agaroz jele yüklenerek ürünlerin elektroforezi yapıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli DNA fragmentlerini içeren moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Elektroforez tamponu olarak Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10X konsantre stok olarak hazırlanan bu tampon kullanılmadan önce 1X olacak şekilde distile su ile sulandırıldı.

- **Agaroz Jelin Hazırlanması**

Bir balon jode 0.45 gr agaroz 30 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Biraz soğuduktan sonra Et-Br'den 3 µl eklendi. Daha sonra jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Katılaşıma kadar (25-30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek amplifiye edilen ve restriksiyon enzimleri ile kesilen örneklerin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra buzdolabında bekleyen örneklerden 10'ar µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0.25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30 mA akım verilerek, örneklerin elektroforezi 30-40 dakika boyunca gerçekleştirildi. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde kayıtları yapıldı.

3.3.2.4. Tek Nükleotid Polimorfizminden Sorumlu Gen Bölgelerinin Tespiti

TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonunda, agaroz jel elektroforez işleminden sonra 184 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölge olarak değerlendirildi.

IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonunda, agaroz jel elektroforez işleminden sonra 261 bç ve internal kontrol primerlerinin amplifiye ettiği 426 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölgeler olarak değerlendirildi.

IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonunda, agaroz jel elektroforez işleminden sonra 550 bç ve internal kontrol primerlerinin amplifiye ettiği 426 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölgeler olarak değerlendirildi.

IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizm varlığının PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmasında, PZR amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi sonrası 233 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölge olarak değerlendirildi. Yine aynı gen bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu oluşan RFLP ürünlerinin elektroforezinde 233, 165 ve 68 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölgeler olarak değerlendirildi.

IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizm varlığının PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmasında, PZR amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi sonrası 254 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölge olarak değerlendirildi. Yine aynı gen bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu oluşan RFLP ürünlerinin elektroforezinde 254, 210 ve 44 bç hizasında gözlenen bantlar hedef bölgeler olarak değerlendirildi.

3.3.3. İstatistiksel Analiz

Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri ayrı ayrı ki kare veya likelihood ratio testi ile incelenmiştir. Anlamlı bulunan genotip ve allel frekansları için odds oranı hesaplanmıştır. Genotipler bakımından grupların Hardy-Weinberg dengesi kontrol

edilmiştir. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS v.11.5.1 ve MedCalc v.11.5.0 paket programları ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde $p < 0.05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri

Bu çalışmada klinik materyalinde MTC izole edilen 84 hastanın 37 (%44)'si Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan ve 47 (%56)'si GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı Göğüs Hastalıkları A. D. Tüberküloz Servisi'nden elde edildi. Bu 47 hastanın hepsi erkek hastalardı. Çalışmaya dahil edilen 84 hastanın 71 (%84.52)'i erkek, 13 (%15.48)'ü kadındı ve yaş ortalamaları 32.57 ± 15.94 'tü (minimum:13, maksimum:72). Yaş ve cinsiyet ortalamaları bakımından hasta grubu ile uyumlu olan sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 110 kişinin 93 (%84.55)'ü erkek, 17 (%15.45)'si kadındı ve yaş ortalamaları 29.40 ± 11.56 idi (minimum:18, maksimum:57) (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımı

Demografik Özellikler	Hasta Grubu (n=84)	Kontrol Grubu (n=110)
Yaş	32.57 ± 15.94	29.40 ± 11.56
Cinsiyet		
Erkek	71 (%84.52)	93 (%84.55)
Kadın	13 (%15.48)	17 (%15.45)

Hasta grubunu oluşturan 84 kişinin 76 (%90.48)'sı akciğer TB'u iken 8 (%9.52)'i akciğer dışı TB olarak tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen 84 hastanın 79 (%94.05)'unun yeni tanı konmuş TB hastası olduğu, 5 (%5.95)'inde daha önceden geçirilmiş TB öyküsü (nüks TB) olduğu belirlendi. Hasta grubunu oluşturan 84 kişinin tanıları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hasta grubunu oluşturan 84 kişinin tanısı

Tanı	Yeni hasta	Nüks TB	Toplam
Akciğer TB'u	71 (%84.53)	4 (%4.76)	76 (%90.48)
Silikotüberkülozis	1 (%1.19)	-	
Akciğer dışı TB			
TB plörezi	3 (%3.57)	-	8 (%9.52)
TB lenfadenit	2 (%2.38)	1 (%1.19)	
Granülomatoz mastit	1 (%1.19)	-	
Eklem TB'u	1 (%1.19)	-	
Toplam	79 (%94.05)	5 (%5.95)	84 (%100)

Akciğer TB'u olan hastaların 67 (%79.76)'si erkek, 9 (%10.72)'u kadın, akciğer dışı TB olan hastaların 4 (%4.76)'ü erkek ve 4 (%4.76)'ü kadındı. Çalışmaya dahil edilen 84 hastadan hazırlanan yayma preparatlarının EZN yöntemi ile incelenmesi sonrası 58 (%69.05)'inde asido rezistan basil (ARB) pozitifliği belirlendi. Akciğer TB'u olan hastaların 56 (%66.67)'sının ARB'si pozitifken akciğer dışı TB olan hastaların 2 (%2.38)'sinin ARB'si pozitif olarak tespit edildi (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Tutulum yeri, cinsiyet ve ARB sonuçlarına göre hastaların dağılımı

Hastalar	Akciğer TB'u		Akciğer dışı TB		Toplam
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın	
ARB Pozitif	51 (%60.71)	5 (%5.96)	-	2 (%2.38)	58 (%69.05)
ARB Negatif	16 (%19.05)	4 (%4.76)	4 (%4.76)	2 (%2.38)	26 (%30.95)
Toplam	67 (%79.76)	9 (%10.72)	4 (%4.76)	4 (%4.76)	84 (%100)

Daha önceden TB öyküsü olan hastaların 4 (%80)'ü erkek, 1 (%20)'i kadın hasta idi. Bu hastalardan akciğer TB'u olan 4 hastadan birinin altı ay süre ile birinci seçenek anti-TB ilaçları [SM, INH, rifampisin (RIF), etambutol (EMB)] kullandığı ve EMB direncinin geliştiği, birinin 38 gün boyunca bu ilaçları kullandığı ve EMB direncinin geliştiği belirlenmiştir. Diğer hastanın ise tedaviye kaç gün devam ettiği tespit edilememiştir. Bu hastada da EMB direncinin geliştiği belirlenmiştir. Diğer hastanın ise bir yıl tedavi gördüğü ve birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı olduğu saptanmıştır. Akciğer dışı TB olan hastanın ise daha önceden yine TB lenfadenit tanısı aldığı ve tedavisine dört ay devam ettiği belirlenmiştir. Bu hastanın da birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı olduğu saptanmıştır.

Yeni tanı konulan 79 hastanın 3 (%3.8)'ünde aile içinde TB hastası ile yakın temas öyküsü olduğu belirlendi. Bunlardan 2'sinin akciğer TB olduğu ve annelerinin TB tanısı aldığı, diğerinin ise TB plörezi olduğu ve teyzesinin TB tanısı aldığı tespit edildi.

Çalışmaya GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı Göğüs Hastalıkları A. D. Tüberküloz Servisi'nden dahil edilen 47 hastanın 14 (%29.79)'üne antibiyogram yapılamamıştır. Çalışmadaki diğer 70 hastanın 46 (%65.71)'sının birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı olduğu belirlendi. Geri kalan 24 (%34.29) hastanın birinci seçenek anti-TB ilaç duyarlılık sonuçları Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli olduğu belirlenen 24 hastanın direnç profili

Birinci seçenek anti-TB ilaç	Dirençli
SM	1 (%1.43)
INH	4 (%5.71)
RIF	1 (%1.43)
EMB	9 (%12.86)
INH + RIF	3 (%4.29)
SM + INH	4 (%5.71)
INH + RIF + EMB	2 (%2.86)
Toplam	24 (%34.29)

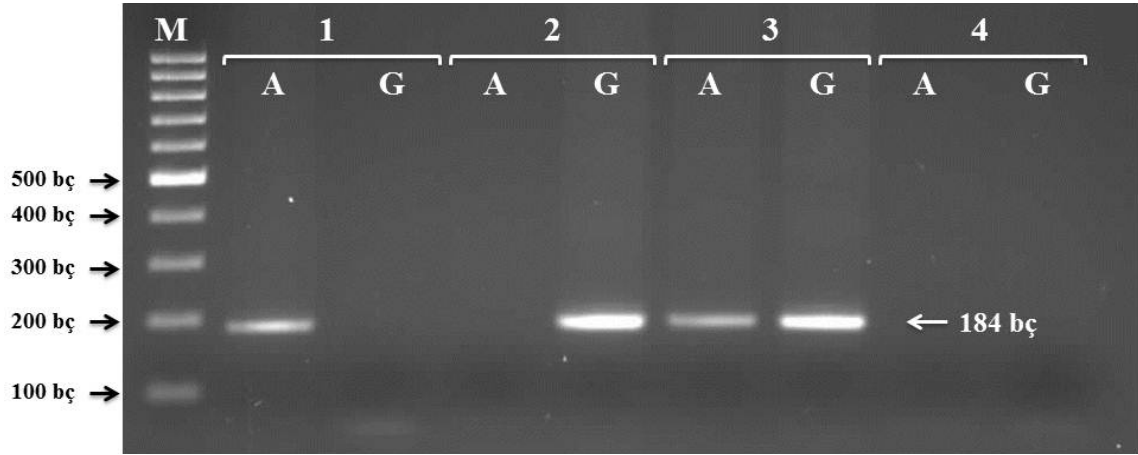
4.2. Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

Sitokin salınımindan sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerin moleküler yöntemlerle araştırılmasında ARMS PZR ve PZR-RFLP yöntemleri kullanıldı.

4.2.1. TNF- α Geni Promoter -308 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için ARMS PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'ların

polimorfizmden sorumlu gen bölgesi amplifiye edildi. Amplifikasyonu sonrası oluşan 184 bç'lik bölgenin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 184 bç'lik bölgenin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), A: A alleli, G: G alleli, 1 nolu örnek: AA Homozigot, 2 nolu örnek: GG Homozigot, 3 nolu örnek: GA Heterozigot, 4 nolu örnek: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.5.'te verilmiştir.

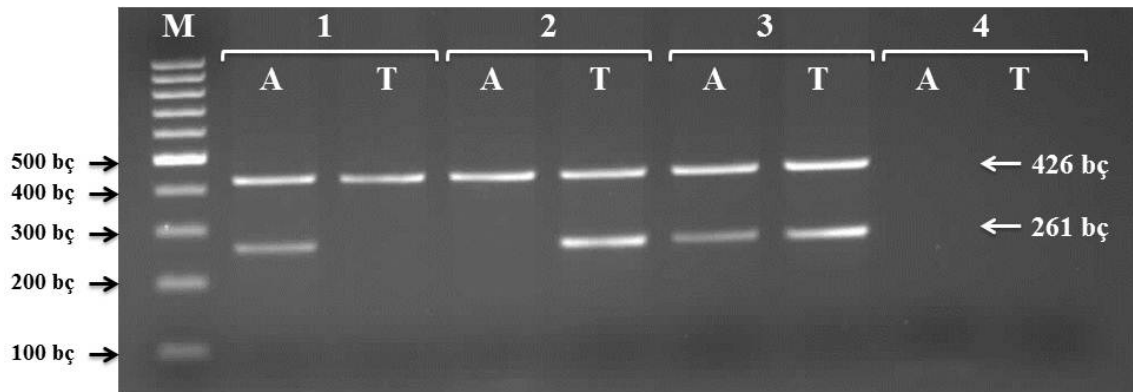
Çizelge 4.5. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki TNF- α geni promoter -308 G/A allel ve genotip dağılımı

Polimorfizm Bölgesi	Hasta Grubu (n=84)	Kontrol Grubu (n=110)
TNF-α -308 G/A		
Allel Tipi		
A alleli	45 (%26.79)	22 (%10)
G alleli	123 (%73.21)	198 (%90)
Genotip		
AA	2 (%2.38)	-
GA	41 (%48.81)	22 (%20)
GG	41 (%48.81)	88 (%80)

TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi için sağlıklı kontrol grubu dengedeysen, hasta grubu dengede olmadığından bu iki grubun gen frekansları bakımından karşılaştırılması yapılamamaktadır. TNF- α salınımindan sorumlu bu gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizm sonuçlarına göre G alleli hasta (%73.21) ve sağlıklı kontrol (%90) grubunda daha sık bulunmaktadır.

4.2.2. IFN- γ Geni +874 T/A Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için ARMS PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'ların polimorfizmden sorumlu gen bölgesinin 261 bç'lik bölgesi amplifiye edildi. Yine bu gen bölgesi çalışılırken PZR amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu nükleotid dizisinden tasarlanan ve 426 bç'lik bölgeyi amplifiye eden primerler ARMS PZR reaksiyonunda aynı anda kullanıldı. Amplifikasyon sonrası oluşan 261 ve 426 bç'lik bölgelerin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 261 bç'lik bölge ile insan büyüme hormonunun 426 bç'lik bölgesinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), A: A alleli, T: T alleli, 1 nolu örnek: AA Homozigot, 2 nolu örnek: TT Homozigot, 3 nolu örnek: TA Heterozigot, 4 nolu örnek: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki IFN- γ geni +874 T/A allel ve genotip dağılımı

Polimorfizm Bölgesi	Hasta Grubu (n=84)	Kontrol Grubu (n=110)	<i>p</i>	OR	%95 GA	<i>p</i>
IFN-γ +874 T/A						
Allel Tipi						
A alleli	99 (%58.93)	116 (%52.73)	0.26	1.28	0.85-1.93	0.22
T alleli	69 (%41.07)	104 (%47.27)				
Genotip						
AA	30 (%35.71)	34 (%30.91)	0.43	1.64	0.74-3.65	0.21
TA	39 (%46.43)	48 (%43.64)				
TT	15 (%17.86)	28 (%25.45)				

OR: Odds ratio, %95 GA: %95 Güven aralığı

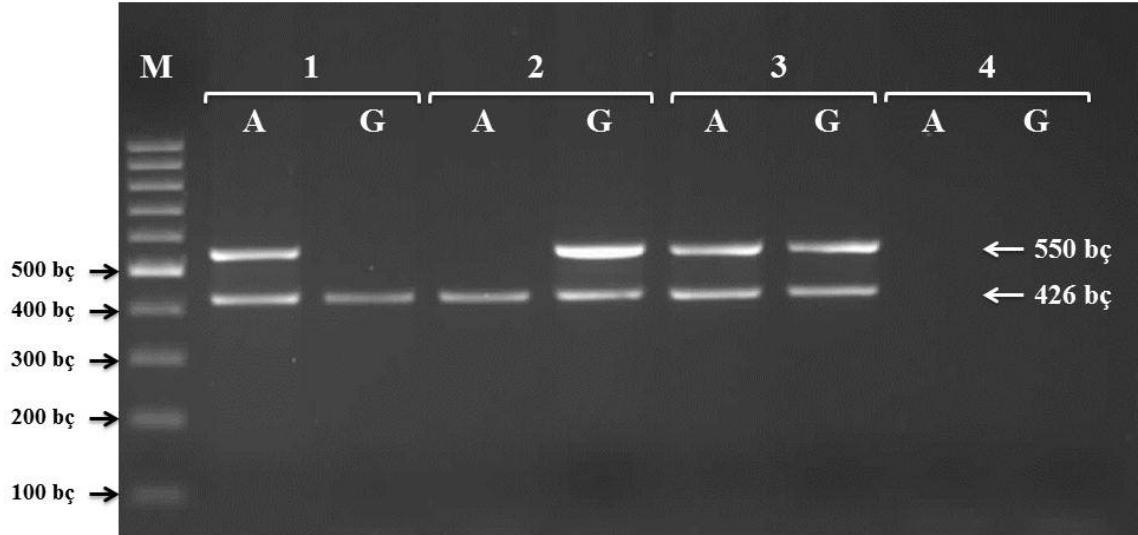
IFN- γ geni +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi için allel ($p=0.26$) ve genotip ($p=0.43$) dağılımı bakımından hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. IFN- γ salınımindan sorumlu bu gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizm sonuçlarına göre A allelli hasta (%58.93) ve kontrol (%52.73) grubunda daha sık bulunmaktadır.

4.2.3. IL-10 Geni Promoter -1082 G/A Tek Nükleotid Polimorfizmi

Sonuçları

IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için ARMS PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde iki adet allel spesifik ve bir adet genel primer kullanılarak hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'ların polimorfizmden sorumlu gen bölgesinin 550 bç'lik bölgesi amplifiye edildi. Yine bu gen bölgesi çalışılırken PZR amplifikasyonunun gerçekleştiğini göstermek için insan büyüme hormonu nükleotid dizisinden tasarlanan ve 426 bç'lik bölgeyi amplifiye eden primerler ARMS PZR reaksiyonunda aynı anda kullanıldı. Amplifikasyon sonrası

oluşan 550 ve 426 bç'lik bölgelerin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizminin ARMS PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 550 bç'lik bölge ile insan büyüme hormonunun 426 bç'lik bölgesinin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), A: A alleli, G: G alleli, 1 nolu örnek: AA Homozigot, 2 nolu örnek: GG Homozigot, 3 nolu örnek: GA Heterozigot, 4 nolu örnek: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki IL-10 geni promoter -1082 G/A allel ve genotip dağılımı

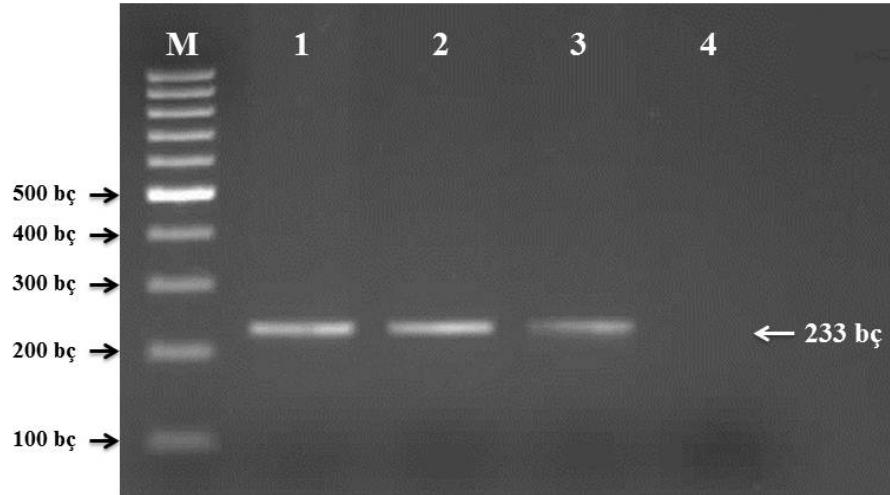
Polimorfizm Bölgesi	Hasta Grubu (n=84)	Kontrol Grubu (n=110)	<i>p</i>	OR	%95 GA	<i>p</i>
IL-10 -1082 G/A						
Allel Tipi						
A alleli	84 (%50)	114 (%51.82)	0.80	0.92	0.62-1.40	0.72
G alleli	84 (%50)	106 (%48.18)				
Genotip						
AA	-	5 (%4.55)	0.80			
GA	84 (%100)	104 (%94.55)				
GG	-	1 (%0.90)				

OR: Odss ratio, %95 GA: %95 Güven aralığı

IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi için genotip dağılımı bakımından karşılaştırılma yapılırken hasta grubunda AA ve GG genotipi olmadığı için istatistiksel karşılaştırma sadece GA genotipi için yapılmıştır. Sonuçta hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında allel ($p=0.80$) ve genotip ($p=0.80$) dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca bu gen bölgesi için popülasyonun dengede olmadığı tespit edilmiştir ($p<0.001$).

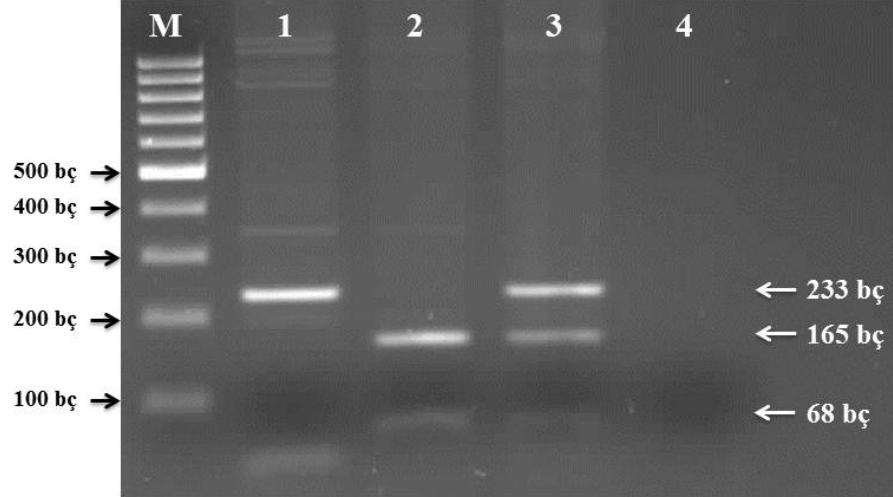
4.2.4. IL-12B p40 Geni 1188 A/C Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, önce primer spesifik PZR tekniği ile hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'lar kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.4. IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin %1.5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1, 2, 3: 233 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 4: Negatif kontrol].

Daha sonra amplifiye edilen bu bölge *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırıldı. Kesim sonucu oluşan 233, 165 ve 68 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 233 bç'lik bölgenin *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonrası 233, 165 ve 68 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1: AA Homozigot (233 bç), Kolon 2: CC Homozigot (165 bç+68 bç), Kolon 3: AC Heterozigot (233 bç+165 bç+68 bç), Kolon 4: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki IL-12B p40 geni 1188 A/C allel ve genotip dağılımı

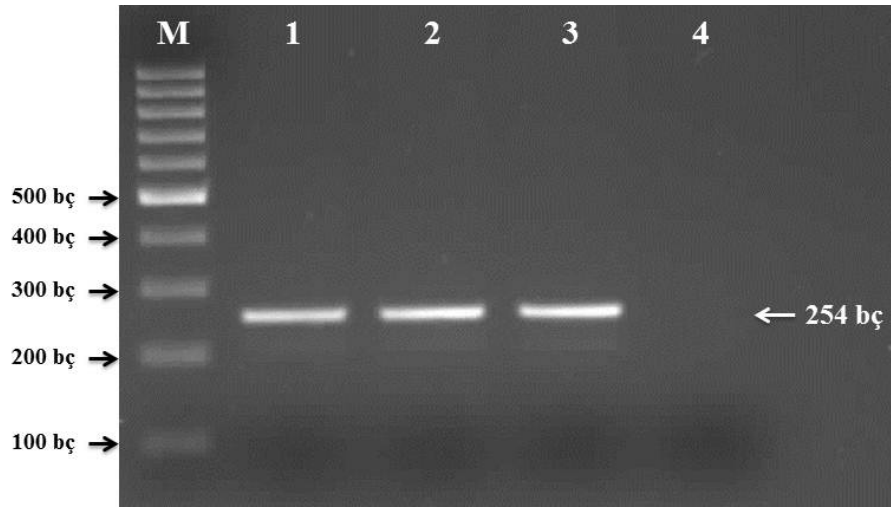
Polimorfizm Bölgesi	Hasta Grubu (n=84)	Kontrol Grubu (n=110)	<i>p</i>	OR	%95 GA	<i>p</i>
IL-12B p40 1188 A/C						
Allel Tipi						
A alleli	124 (%73.81)	160 (%72.73)	0.92	0.94	0.60-1.49	0.81
C alleli	44 (%26.19)	60 (%27.27)				
Genotip						
AA	47 (%55.95)	58 (%52.73)	0.82	0.84	0.46-1.53	0.57
AC	30 (%35.71)	44 (%40)				
CC	7 (%8.34)	8 (%7.27)				

OR: Odds ratio, %95 GA: %95 Güven aralığı

IL-12B p40 geni 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmi için allel ($p=0.92$) ve genotip ($p=0.82$) dağılımı bakımından hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. IL-12 salınımindan sorumlu bu gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizm sonuçlarına göre A allelli hasta (%73.81) ve kontrol (%72.73) grubunda daha sık bulunmaktadır.

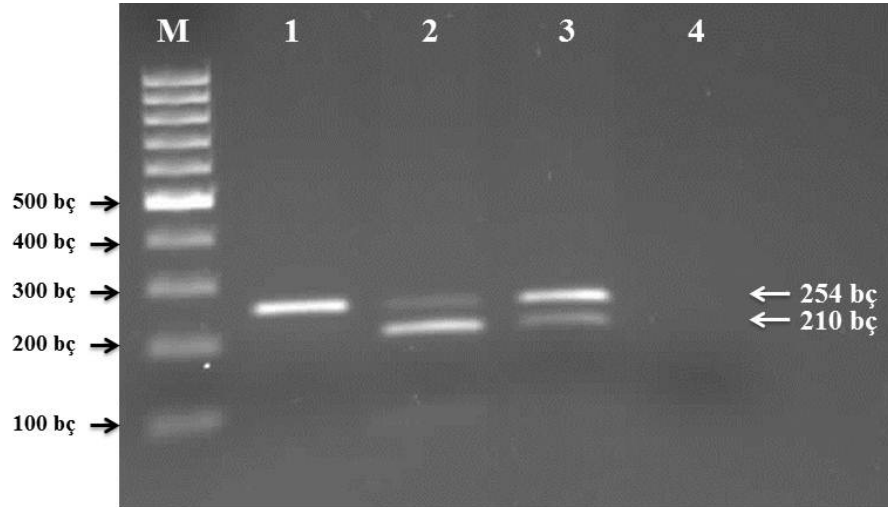
4.2.5. IL-4 Geni Promoter -590 C/T Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizm varlığını araştırmak için PZR-RFLP yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, önce primer spesifik PZR tekniği ile hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen DNA'lar kullanılarak polimorfizmden sorumlu gen bölgesi amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası oluşan 254 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 254 bç'lik bölgenin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1, 2, 3: 254 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 4: Negatif kontrol].

Daha sonra amplifiye edilen bu bölge *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırıldı. Kesim sonucu 254, 210 ve 44 bç'lik RFLP ürünleri oluşmaktadır. 44 bç'lik RFLP ürünü %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde görülememektedir. 254 ve 210 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 254 bç'lik bölgenin *BsmFI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonrası 254 ve 210 bç'lik RFLP ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü (44 bç'lik RFLP ürünü %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde görülememektedir) [Kolon M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Fermentas), Kolon 1: TT Homozigot (254 bç), Kolon 2: CC Homozigot (210 bç+48 bç), Kolon 3: CT Heterozigot (254 bç+210 bç+48 bç), Kolon 4: Negatif kontrol].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki IL-4 geni promoter -590 C/T allel ve genotip dağılımı

Polimorfizm Bölgesi	Hasta Grubu (n=84)	Kontrol Grubu (n=110)	<i>p</i>	OR	%95 GA	<i>p</i>
IL-4 -590 C/T						
Allel Tipi						
C alleli	140 (%83.33)	193 (%87.73)	0.27	1.43	0.80-2.53	0.22
T alleli	28 (%16.67)	27 (%12.27)				
Genotip						
CC	58 (%69.05)	83 (%75.45)		1.00	-	-
CT	24 (%28.57)	27 (%24.55)	0.14	1.27	0.66-2.42	0.46
TT	2 (%2.38)	-		7.13	0.33-151.4	0.20

OR: Odds ratio, %95 GA: %95 Güven aralığı

IL-4 geni promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizmi için allel ($p=0.27$) ve genotip ($p=0.14$) dağılımı bakımından hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. IL-4 salınımindan sorumlu bu gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizm sonuçlarına göre C allelli hasta (%83.33) ve kontrol (%87.73) grubunda daha sık bulunmaktadır.

Tek nükleotid polimorfizmi analizlerden elde edilen sonuçlara göre akciğer ve akciğer dışı TB gruplarındaki hasta sayılarıyla, yeni tanı konmuş hasta ile eski hasta sayıları istatistiksel olarak karşılaştırmaya uygun olmadığı için bu grupların kendi aralarında TB'a genetik yatkınlık bakımından allel ve genotip dağılımı için bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Hasta grubu, ARB pozitif ($n=58$) ve negatif ($n=26$) olarak iki gruba ayrıldığında, bu iki grup arasında, polimorfizm varlığı araştırılan gen bölgeleri için allel ve genotip dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Bu hesaplama TNF- α geni promoter -308 G/A ve IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi için yapılamamıştır) (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. Çalışmaya dahil edilen 84 hastanın ARB sonuçlarına göre allel ve genotip dağılımı

Polimorfizm Bölgesi	ARB Pozitif (n=58)	ARB Negatif (n=26)	<i>p</i>	OR	%95 GA	<i>p</i>
IFN-γ +874 T/A						
Allel Tipi						
A alleli	65 (%56.03)	34 (%65.39)	0.33	0.67	0.34-1.33	0.25
T alleli	51 (%43.97)	18 (%34.61)				
Genotip						
AA	20 (%34.48)	10 (%38.46)		0.31	0.06-1.64	0.16
TA	25 (%43.10)	14 (%53.85)	0.25	0.27	0.05-1.40	0.11
TT	13 (%22.42)	2 (%7.69)		1.00	-	-
IL-12B p40 1188 A/C						
Allel Tipi						
A alleli	84 (%72.41)	40 (%76.92)	0.67	1.27	0.59-2.72	0.53
C alleli	32 (%27.59)	12 (%23.08)				
Genotip						
AA	31 (%53.45)	16 (%61.54)		1.00	-	-
AC	22 (%37.93)	8 (%30.77)	0.78	1.42	0.52-3.89	0.49
CC	5 (%8.62)	2 (%7.69)		1.29	0.22-7.40	0.77
IL-4 -590 C/T						
Allel Tipi						
C alleli	98 (%84.48)	42 (%80.77)	0.79	0.77	0.33-1.81	0.55
T alleli	18 (%15.52)	10 (%19.23)				
Genotip						
CC	40 (%68.97)	18 (%69.23)		1.00	-	-
CT	18 (%31.03)	6 (%23.08)	0.07	1.35	0.46-3.97	0.58
TT	-	2 (%7.69)		0.09	0.00-1.99	0.12

OR: Odds ratio, %95 GA: %95 Güven aralığı

Çalışmaya dahil edilen 84 hastanın 76 (%90.48)'sı akciğer TB'ü tanısı almıştır. Bu hastalar ARB pozitif (n=56) ve negatif (n=20) olarak iki gruba ayrıldığında, yine bu iki grup arasında, polimorfizm varlığı araştırılan gen bölgeleri için allel ve genotip dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Bu hesaplama TNF- α geni promoter -308 G/A ve IL-10 geni promoter -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi için yapılamamıştır) (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. Akciğer TB' u tanısı alan 76 hastanın ARB sonuçlarına göre allel ve genotip dağılımı

Polimorfizm Bölgesi	ARB Pozitif (n=56)	ARB Negatif (n=20)	<i>p</i>	OR	%95 GA	<i>p</i>
IFN-γ +874 T/A						
Allel Tipi						
A alleli	63 (%56.25)	26 (%65)	0.43	0.69	0.33-1.46	0.33
T alleli	49 (%43.75)	14 (%35)				
Genotip						
AA	19 (%33.93)	8 (%40)		0.39	0.07-2.19	0.28
TA	25 (%44.64)	10 (%50)	0.52	0.42	0.08-2.21	0.30
TT	12 (%21.43)	2 (%10)		1.00	-	-
IL-12B p40 1188 A/C						
Allel Tipi						
A alleli	82 (%73.21)	29 (%72.50)	0.90	0.96	0.43-2.17	0.93
C alleli	30 (%26.79)	11 (%27.50)				
Genotip						
AA	31 (%55.36)	11 (%55)		1.00	-	-
AC	20 (%35.71)	7 (%35)	0.99	1.01	0.34-3.05	0.98
CC	5 (%8.93)	2 (%10)		0.89	0.15-5.25	0.89
IL-4 -590 C/T						
Allel Tipi						
C alleli	94 (%83.93)	35 (%87.5)	0.77	1.34	0.46-3.88	0.58
T alleli	18 (%16.07)	5 (%12.5)				
Genotip						
CC	38 (%67.86)	16 (%80)		1.00	-	-
CT	18 (%32.14)	3 (%15)	0.09	2.53	0.65-9.79	0.30
TT	-	1 (%5)		0.14	0.00-3.69	0.28

OR: Odds ratio, %95 GA: %95 Güven aralığı

5. TARTIŞMA

TB, önemli bir küresel sağlık problemi olarak önemini korumaktadır. Dünya genelinde yaklaşık iki milyar kişi TB'un etkeni olan *M. tuberculosis* ile enfektedir ve her yıl yaklaşık on milyon yeni olgu bildirilmektedir. TB biyolojik, sosyoekonomik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı karmaşık bir hastalıktır (14).

M. tuberculosis'in 1882'de Koch tarafından keşfedilmesine ve 50 yılı aşkın bir süredir tedavi için etkili ilaçların var olmasına rağmen, enfeksiyonun kontrolünde hala birçok sorun bulunmaktadır. Bu sorunlara örnek olarak altı ile dokuz ay süren uzun tedavi rejimleri, ilaç dirençleri, etkili bir aşının eksikliği, hastalığın ilerleyişine ve enfektivitesine hangi mekanizmaların etki ettiğinin tam olarak anlaşılammış olması verilebilir. *M. bovis* BCG suşu ile aşılama *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı bir miktar koruma sağlasa da etkinliği yeterli değildir ve hastalığın kontrolünde etkili değildir. Daha etkili bir aşının geliştirilmesi öncelikle üzerinde durulması gereken bir konudur ve enfeksiyona karşı konak cevabının tam olarak bilinmesine bağlıdır (23).

M. tuberculosis ile enfekte kişilerin sadece %10'unda aktif hastalık geliştiği için, konak genetiğinin TB için risk faktörlerini etkileyebileceği öne sürülmüştür (24). Enfeksiyon hastalıklarında konak genetik faktörlerinin rollerinin bir bölümünün bile olsa belirlenmesi, neden bazı insanların diğerlerine göre enfeksiyona dirençte daha başarılı olduğunu ve önemli enfeksiyon hastalıklara karşı farklı duyarlılıkların oluşturulmasını açıklayabilir. Çeşitli enfeksiyon hastalıklarına karşı konak genetik faktörlerinin genetik duyarlılık üzerindeki önemi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (116, 117). TB'a duyarlılık ya da direnç ile ilişkili konak genetik faktörleri, vaka-kontrol çalışmaları, aile tabanlı aday gen araştırmaları ve moleküler çalışmalar gibi çeşitli yöntemler ile yaygın olarak araştırılmıştır (100, 118).

TB'a duyarlılık ya da dirençle ilişkili MHC'in HLA tipleri ve MHC olmayan genler/gen ürünleri gibi konak genetik faktörlerinin tanımlanması, TB'a yatkınlık ya da hastalığın gelişimini tahmin etmek için genetik markır olarak kullanılabilir. TB'dan korunma ile ilişkili bu HLA tipleri yeni epitop tabanlı aşuların geliştirilmesinde kullanılabilir. İmmün sistemdeki bu markırların TB'a duyarlılık ya da dirençteki

rollerinin aydınlatılması hastalığın immünopatogenezinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır (117).

TB'a karşı immün cevap, ASH'ler ile lenfositler arasındaki etkileşim ve bu hücre tiplerinden salgılanan sitokinler ile düzenlenmektedir. Sitokinler düşük derecede genetik değişim göstermelerine rağmen, enfeksiyon hastalıklara duyarlılığı etkileyen konak faktörleri arasında yer almaktadır. Sitokin genlerinin promoter ya da kodlama bölgelerindeki polimorfizmleri içeren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlar, transkripsiyonel aktivasyonu etkileyen transkripsiyon faktör tanıma bölgelerinde değişime ve değişen seviyede sitokin üretimine sebep olabilir (117, 119).

TB'a genetik yatkınlık üzerine yaptığımız bu çalışmada, hastalığa karşı duyarlılık veya direnç ile ilişkili olduğu belirtilen, sitokin üretiminden sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığının ARMS PZR ve PZR-RFLP yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Tek nükleotid polimorfizm varlığı Th1 tipi pro-inflamatuvar sitokinler (TNF- α geni promoter -308 G/A bölgesi, IFN- γ geni +874 T/A bölgesi, IL-12B p40 geni 1188 A/C bölgesi) ile Th2 tipi anti-inflamatuvar sitokinlerde (IL-10 geni promoter -1082 G/A bölgesi, IL-4 geni promoter -590 C/T bölgesi) incelenmiştir.

Çalışma sonucunda, 84 TB hastası ve 110 sağlıklı kontrol grubu arasında, sitokin üretiminden sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarına göre allel (TNF- α : sağlıklı kontrol grubu dengedeysen hasta grubu dengede değil; IFN- γ : $p=0.26$; IL-12B p40: $p=0.92$; IL-10: $p=0.80$, ayrıca popülasyon dengede değil; IL-4: $p=0.27$) ve genotip (TNF- α : sağlıklı kontrol grubu dengedeysen hasta grubu dengede değil; IFN- γ : $p=0.43$; IL-12B p40: $p=0.82$; IL-10: $p=0.80$, ayrıca popülasyon dengede değil; IL-4: $p=0.14$) dağılımı bakımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

TNF- α geni 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.1-21.3) MHC sınıf III bölgesindedir. 2.75 kilo baz uzunluğunda ve 4 ekzondan oluşmaktadır (81). TNF- α , *M. tuberculosis* tarafından üretilen mikrobiyal ürünlere maruz kaldığında monosit ve makrofajlar tarafından salgılanan prototipik pro-inflamatuvar bir sitokindir. TNF- α , IFN- γ ile birlikte, hücre içerisinde çoğalan *M. tuberculosis*'in makrofajlar tarafından öldürülmesini sağlayan NOS2 üretilmesi için makrofajları aktive eder. TNF- α , *M.*

tuberculosis'e karşı konak savunmasında önemli bir role sahiptir çünkü TNF- α inhibitörü alan hastaların TB'a daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmalar vardır (23).

Ben-Selma ve ark.'nın Tunus'ta 131 aktif TB (76 akciğer TB'u, 55 akciğer dışı TB) hastasını ve kontrol grubu olarak 95 sağlıklı kan donörünü dahil ettikleri çalışmada PZR-RFLP yöntemi ile TB'a duyarlılıkta TNF- α geni promoter -308 G/A tek nüleotid polimorfizminin etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bu promoter bölgesinde A allelinin kontrol grubu ile kıyaslandığında akciğer dışı TB grubunda istatistiksel olarak daha sık görüldüğü belirtilmiştir. Akciğer TB'u ve akciğer dışı TB gruplarında GA ve GG genotipleri, AA genotipi (yüksek TNF- α üreticisi) ile karşılaştırıldığında AA genotipinin sıklığının daha az olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda Tunus halkında, TNF- α geni promoter -308 G/A tek nüleotid polimorfizminin TB'a karşı duyarlılık ya da dirençte önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir (2).

Abhimanyu ve ark.'nın Hindistan'da 108 aktif akciğer TB'u ve 48 sağlıklı kontrolü dahil ettikleri çalışmada, bu gruplardaki serum sitokin seviyeleri ELISA yöntemiyle ve sitokin gen polimorfizmi multipleks PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Hasta grubu ile karşılaştırıldığında serum TNF- α seviyesinin kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda rs3093662 AA genotipine sahip kişilerin istatistiksel olarak yüksek seviye TNF- α ürettikleri, GG genotipine sahip kişilerin ise düşük seviyede TNF- α ürettikleri görülmüştür. Hasta grubunda ise genotipler arasında TNF- α üretimi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığı belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda sitokin genlerindeki polimorfizmlerin aktif akciğer TB'lu hastalarda sitokin üretimini değiştirmede önemli bir role sahip olduğu vurgulanmıştır (4).

Sharma ve ark.'nın Kuzey Hindistan'da 185 TB hastasını ve 155 sağlıklı kontrolü dahil ettikleri çalışmada, bu gruplardaki serum TNF- α seviyeleri ELISA yöntemiyle ve sitokin gen polimorfizmleri (TNF- α -1031 T>C, TNF- α -863 C>A, TNF- α -857 T>C, TNF- α -308 G>A ve TNF- α -238 G>A) "SNaPshot ddNTP Primer Extension Kit" yöntemi ile araştırılmıştır. Polimorfizm varlığı araştırılan bölgelerdeki allel sıklığının karşılaştırılması sonrası TB hastaları ve kontroller arasında bu bölgelerin hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca hastalar kendi aralarında minimal, orta ve ileri derecede hasta olarak gruplandırıldığında, yine bu bölgelerdeki polimorfizm farklılıklarının hasta grupları arasındaki istatistiksel olarak

anlamli olmadigi belirtilmistir. Serum TNF- α seviyeleri karšılařtırıldıđında hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamli bulunduğu fakat bu polimorfizmlerin serum TNF- α seviyesini etkilemediği vurgulanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda Kuzey Hindistan'da, TNF genlerinin TB için önemli bir risk faktörü olmadigi belirtilmistir (120).

Yurtdışında TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi üzerine yapılan değişik çalışmalar bulunmaktadır. Bu gen bölgesindeki polimorfizm ile TB'a duyarlılık arasında İran'da (121) ve İtalya'da (122) yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak anlamli fark bulunurken, Kore'de (112), Çin'de (123, 124) ve Meksika'da (125) yapılan çalışmalarda ise herhangi bir ilişkinin tespit edilemediği bildirilmiştir.

Ülkemizde Ateş ve ark., 128 TB hastasında (98 akciğer TB'u, 30 akciğer dışı TB) ve 80 sağlıklı kontrolde TNF- α genindeki (-308 G/A, -238 G/A, -376 G/A) tek nükleotid polimorfizm varlığını ARMS PZR yöntemi ile araştırılmışlardır. Allel ve genotip sıklığı sonuçlarına göre TNF- α -308 G/A, -238 G/A ve -376 G/A polimorfizmlerinde, hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamli olmadigi belirtilmistir. Bu çalışmada ayrıca TNF- α /IL-10 fonksiyonunu etkileyen genotipler de araştırılmış ve hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunamamıştır. Bu çalışmanın kısmen küçük bir grupta yapıldığı ve daha geniş bir grup ile çalışılarak aradaki farklılığın aydınlatılması gerektiği vurgulanmıştır (126).

Yine ülkemizde Oral ve ark.'nın 81 TB (29 akciğer TB'u, 52 akciğer dışı TB) hastasında ve 50 sağlıklı organ donöründe TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizm varlığını sekans spesifik primer (sequence-specific primers- SSP) PZR yöntemi ile araştırdıkları çalışmada, alleller arasında, genotip dağılımında ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunmadığı belirtilmistir (127).

Samsun'da yapılan doktora tez çalışmasında "Lifecodes sitokin SSO" tiplendirme kiti kullanılarak 30 akciğer TB hastasında ve 33 sağlıklı kontrol grubunda çeşitli gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarında istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunamadığı belirtilmistir (21). Bizim alışmamızda da ARMS PZR yöntemi ile TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizm varlığı 84 TB hastasında ve 110 sağlıklı kontrol grubunda araştırıldı. Çalışmamızda

kontrol grubu dengedeysen, hasta grubu dengede olmadığından bu iki grubun gen frekansları bakımından karşılaştırılması yapılamamıştır.

IFN- γ , Th1 tipi sitokin olup viral enfeksiyonlara ve hücre içi yerleşen bakterilere karşı doğal ve kazanılmış immünitede önemli bir görevi vardır. Esas olarak Th1 hücreleri, CD8+ sitotoksik T hücreleri, DH'ler ve NK hücrelerinden salgılanır. NK hücrelerinde IFN- γ üretimi, hem makrofajlar tarafından üretilen TNF- α ve IL-12 gibi sitokinler tarafından hem de IFN- γ 'nın kendisi tarafından stimüle edilir (128). IFN- γ 'nın *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı ilk koruyucu immün yanıtta önemli bir rolü olduğu belirtilmiştir. IFN- γ defektli farelerin *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı son derece duyarlı oldukları bulunmuştur. IFN- γ geninde mutasyon bulunan insanlar, *M. tuberculosis* ve patojen olmayan mikobakteri enfeksiyonlarına karşı duyarlıdırlar. IFN- γ geni 12. kromozomda (12q24.1) bulunmaktadır ve ilk intron bölgesindeki polimorfizmin (+874 T/A) sitokin salınımını etkilediği ve TB'a karşı duyarlılık ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (129).

Hashemi ve ark. İran'da 142 akciğer TB hastasında ve 166 sağlıklı kontrolde ARMS PZR yöntemi ile IFN- γ +874 T/A (rs61923114) tek nükleotid polimorfizmi varlığını araştırmışlardır. Çalışma sonunda bu gen bölgesi için AA genotipinin akciğer TB'u için bir risk faktörü olduğu, yine A allel sıklığının kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak İran halkında IFN- γ +874 T/A (rs61923114) tek nükleotid polimorfizmi ile akciğer TB'una duyarlılık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunduğu vurgulanmıştır (130).

Mosaad ve ark.'nın Mısır'da yaptıkları çalışmada, 110 TB hastasında (26 akciğer TB, 84 akciğer dışı TB), post-BCG lenfadenitli 40 çocuk hastada ve 118 sağlıklı çocukta ARMS PZR yöntemi ile IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi varlığı araştırılmıştır. Bu gen bölgesinde A allellinin kontrol grubuna kıyasla TB ve post-BCG lenfadenitli gruplarda daha fazla görüldüğü, AA genotip sıklığının kontrol grubuna kıyasla TB grubunda, akciğer TB'lu hastalara kıyasla akciğer dışı TB hastalarında ve 5 yaş üstü post-BCG lenfadenitli çocuklarda istatistiksel olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak IFN- γ +874 AA genotipine sahip düşük seviyede IFN salgılayan özellikle 5 yaş üstü çocuklarda, post-BCG lenfadenit ve TB hastalığı arasında ilişki olduğu vurgulanmıştır (131).

Vallinoto ve ark.'nın Brezilya'da yaptıkları çalışmada, 162 TB hastasında (129 akciğer TB'u, 33 akciğer dışı TB) ve 156 sağlıklı kan donöründe plazma IFN- γ seviyesi ELISA yöntemiyle, IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi varlığı allel-spesifik oligonükleotid PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada A allelinin hastalarda, T allelinin ise kontrol grubunda daha fazla görüldüğü, AA genotipinin hastalarda TT genotipinin ise kontrol grubunda daha fazla bulunduğu ve bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu, hasta grupları (akciğer ve akciğer dışı TB) arasında ise allel sıklığı bakımından istatistiksel bir farklılık bulunmadığı, plazma IFN- γ konsantrasyonunun hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu, akciğer TB'u grubu ile kıyaslandığında akciğer dışı TB grubunda da bu konsantrasyonun daha düşük olduğu ve bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışılan popülasyonda IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi ile TB'a duyarlılık arasında bir ilişkinin olduğu vurgulanmıştır (132).

Moran ve ark.'nın Amerika'da yaptıkları çalışmada, 240 (204 akciğer TB'u, 24 akciğer dışı TB, 12 her iki klinik form) Afrika kökenli Amerikalıda, 161 (139 akciğer TB'u, 14 akciğer dışı TB, 6 her iki klinik form) Kafkasyalıda, 319 (270 akciğer TB'u, 39 akciğer dışı TB, 10 her iki klinik form) Latin Amerikalıda ve 336 (174 Afrika kökenli Amerikalı, 64 Kafkasyalı, 98 Latin Amerikalı) kontrol grubunda IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Kafkasyalılarla kıyaslandığında Afrika kökenli ve Latin Amerikanlarda A allelinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yaygın olduğu bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında üç etnik grup arasında ve hastalığın klinik formu bakımından (akciğer, akciğer dışı ve her iki form birlikte) genotip frekansı dağılımı arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirtilmiştir. Sonuç olarak çalışılan bu grupta IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizminin TB'a duyarlılık ya da hastalığın şiddeti üzerine ölçülebilir bir etkisinin olmadığı vurgulanmıştır (133).

Yurtdışında IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi üzerine yapılan değişik çalışmalar bulunmaktadır. Bu gen bölgesindeki polimorfizm ile TB'a duyarlılık arasında Pakistan'da (119), Tunus'ta (134) ve Hindistan'da (135) yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken, Çin'de (124) ve Hindistan'da (136) yapılan çalışmalarda ise herhangi bir ilişkinin tespit edilemediği bildirilmiştir.

Ülkemizde Onay ve ark.'nın çocuklarda yaptıkları çalışmada, 40 TB hastası ve 67 kontrolde IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizm varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında allel ve genotip frekansları arasında istatistiksel bir fark bulunamadığı belirtilmiştir. Sonuç olarak çalışılan çocuk grubunda IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi ile TB'a duyarlılık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı vurgulanmıştır (137).

Sallakçı ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, 361 TB (319 akciğer TB, 35 TB menenjit ve 7 milier TB) hastasında ve 115 sağlıklı kontrol grubunda IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi varlığı pirosekanslama yöntemiyle, 55 hastada ise *M. tuberculosis* antijenlerine karşı IFN- γ cevabı ELISPOT testi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda T allel frekansının ve TT genotipinin kontrollere kıyasla TB hastalarında anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. TT genotipinde PPD antijenine karşı IFN- γ cevabının AA genotipine kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu, +874 genotipleri ile PPD, kültür filtrat proteini (culture filtrate protein-CFP)-10 ve ESAT-6 değerlerinin anlamlı derecede ters ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizminin, IFN- γ cevabı ve bu cevapta genotipler arasındaki farklılıklar ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (138).

Oral ve ark.'nın yaptıkları çalışmada (127) ve Samsun'da yapılan doktora tez çalışmasında (21) IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi ile TB'a duyarlılık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda da ARMS PZR yöntemi ile IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizm varlığı 84 TB hastasında ve 110 sağlıklı kontrol grubunda araştırıldı. Çalışmamız sonucunda allel ($p=0.26$) ve genotip ($p=0.43$) dağılımlarında hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

IL-10, makrofajlar, monositler, T ve B hücreleri, DH'ler, mast hücreleri ve eozinofiller tarafından üretilen önemli bir immünregülatör sitokindir. Th2 hücreleri tarafından salgılanan bir sitokin olan IL-10'un, Th1 hücreleri tarafından salgılanan sitokinlerin sekresyonunu inhibe ettiği, inflamatuvar cevabı sınırladığı, T ve B hücreleri, NK hücreleri, ASH ve mast hücreleri gibi immün cevapta rol oynayan değişik hücrelerin olgunlaşmasını ve farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir. IL-10 geni defektli fareler *M. tuberculosis* ile enfekte edildiklerinde antimikrobiyal immünitinin

arttığı görülmüştür. IL-10 *M. tuberculosis*'e karşı oluşturulan Th1 cevabını baskılamakta, farelerde kronik akciğer TB'unun reaktive olmasına sebep olmakta ve makrofajlarda *M. tuberculosis* ile uyarılan apoptozisi azaltmaktadır. IL-10 genini kodlayan gen 1. kromozomda (1q31-32) bulunmaktadır. IL-10 geni promoter bölgesinin transkripsiyon başlangıç bölgesinde -1082, -819 ve -592 pozisyonunda üç adet biallelik polimorfizm bölgesi tanımlanmıştır. İkiz ve aile çalışmalarında, IL-10 sekresyonunda gözlenen değişimlerin %70'inden fazlasının genetik faktörler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6).

Oh ve ark.'nın Kore'de yaptıkları çalışmada, 145 TB (80 yeni, 65 rekürren) hastasında ve 117 sağlıklı kontrol grubunda IL-10 geni promoter bölgesi -1082 G/A polimorfizm varlığı ARMS PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda A allelinin her iki TB hasta grubunda istatistiksel olarak ilişkili olduğu, kontrol grubu ile kıyaslandığında hasta grubunda AA genotipinin anlamlı derecede fazla olduğu belirtilmiştir. Yeni ve rekürren TB hastaları arasında allel ve genotip dağılımı bakımından istatistiksel bir farkın bulunmadığı söylenmiştir. Sonuç olarak IL-10 -1082 A allelinin TB'a duyarlılığın belirlenmesinde önemli olabileceği vurgulanmıştır (112).

Henao ve ark.'nın Kolombiya'da, 140 akciğer TB'lu, 30 plevral TB'lu, 20 milier TB'lu hasta ile, 54 tüberkülin negatif ve 81 tüberkülin pozitif kontrol grubunu dahil ettikleri çalışmada IL-10 geni promoter bölgesi -1082 G/A polimorfizm varlığı SSP-PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonunda plevral TB hastalarında AA genotipinin diğer hasta gruplarına göre anlamlı derecede daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Sonuç olarak IL-10 AA genotipinin plevral TB ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (139).

Liang ve ark.'nın Çin'de yaptıkları çalışmada, 123 TB plörezi hastada, 112 akciğer TB'lu hastada ve 78 kontrol grubunda IL-10 geni promoter bölgesi -1082, -819 ve -592 polimorfizmler SNaPshot yöntemiyle, plevral sıvıdaki IL-10 protein seviyeleri ise ELISA ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda kontrol grubu ile TB plörezi grubu arasında IL-10 geni promoter bölgesi -1082 G/A polimorfizminde genotip ve allel dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte -819 T ve -592 A allel sıklığının TB plörezi grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yaygın olduğu saptanmıştır. TB plörezi grubu ile kontrol grubu arasında plevral sıvı IL-10 protein seviyesinin; TB plörezi grubunda -1082, -819 ve -

592 polimorfizmleri ile plevral sıvı IL-10 protein seviyelerinin; kontrol grubunda ise -1082 polimorfizmi ile protein seviyesi arasında anlamlı derecede ilişki olduğu bulunmuştur. Bu bulguların, IL-10 geni promoter bölgesi -819 ve -592 polimorfizmleri ve protein üretimi ile plevral TB arasındaki ilişkiyi desteklediği vurgulanmıştır (6).

Prabhu Anand ve ark.'nın Hindistan'da yaptıkları çalışmada, 132 akciğer TB'lu hastada ve 143 sağlıklı kontrol grubunda IL-10 geni promoter bölgesi -1082 G/A polimorfizm varlığı ARMS PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bu gen bölgesinde, hasta ve kontrol grubu arasında allel ve genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre Kuzey Hindistan'da çalışılan popülasyonda bu gen bölgesi için akciğer TB'una duyarlılık veya direnç arasında bir ilişkinin bulunmadığı vurgulanmıştır (140).

Yurtdışında IL-10 geni promoter bölgesi -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi üzerine yapılan değişik çalışmalar bulunmaktadır. Bu gen bölgesindeki polimorfizm ile TB'a duyarlılık arasında İtalya'da (122) ve Kolombiya'da (141) yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken, Çin'de (124) ve Mısır'da (131) yapılan çalışmalarda ise herhangi bir ilişkinin tespit edilemediği bildirilmiştir.

Ülkemizde Yılmaz ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, 152 sağlıklı kişide IL-10 geni promoter bölgesindeki (-3575 T/A, -2763 C/A, -1082 A/G, -819 C/T, -592 C/A) tek nükleotid polimorfizmleri PZR-RFLP ve SSP-PZR yöntemleriyle, bu kişilerin PBMC'lerinin *Escherichia coli* lipopolisakariti (LPS), PPD ve *Staphylococcus aureus* Cowan suşu I (SAC) ile stimülasyonu sonrası, hücreler tarafından salınan IL-10 konsantrasyonları ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. PPD veya SAC ile stimülasyon sonrası IL-10 -1082 A alleli taşıyanların taşımayanlara göre anlamlı derecede düşük seviyede IL-10 ürettikleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak IL-10 geni promoter bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmleri dağılımının Türk toplumunda önemli varyasyonlar içerdiği belirtilmiştir (142).

Ülkemizde Ateş ve ark. (126) ile Oral ve ark.'nın (127) yaptıkları çalışmalarda IL-10 -1082 G allelinin kontrol grubuna kıyasla TB'lu hasta grubunda daha fazla görüldüğü ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. Yine Samsun'da yapılan doktora tez çalışmasında hasta ve kontrol grubu arasında IL-10 geni promoter bölgesi -1082, -819 ve -592 polimorfizmlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunduğu söylenmiştir (21). Bizim çalışmamızda ARMS PZR yöntemi ile IL-10 geni

promoter bölgesi -1082 G/A tek nükleotid polimorfizm varlığı 84 TB hastasında ve 110 sağlıklı kontrol grubunda araştırıldı. Çalışmamız sonucunda allel ($p=0.80$) ve genotip ($p=0.80$) dağılımlarında hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Ayrıca bu gen bölgesi için popülasyonun dengede olmadığı tespit edilmiştir ($p<0.001$).

IL-12, p35 ve p40 alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir sitokin olup, IL-12A geni p35, IL-12B geni ise p40 alt ünitesini kodlar. p35 alt ünitesi 3. kromozomda (3q25.33-q26), p40 alt ünitesi ise 5. kromozomda (5q31.1-q33.1) bulunmaktadır (143). IL-12B gen ekspresyonu IFN- γ 'nın en önemli uyarıcısıdır ve *M. tuberculosis*'e karşı uyarılmış IFN- γ 'nın oluşması için IL-12 p40 alt ünitesi gereklidir. IL-12B ekspresyonu, IL-12 p40 azalmasına bağlı olarak TB hastalarında IFN- γ 'nın düşük ekspresyonu hipotezi ile uygun bir şekilde latent TB'lu hastalarla karşılaştırıldığında aktif TB hastalarında anlamlı derecede düşüktür. TB hastalarının ESAT-6 ile uyarılmış PBMC'lerine dış kaynaklı IL-12 ilavesi bu antijene karşı oluşan IFN- γ cevabının artmasına neden olmaktadır. TB'da IL-12'nin bu önemli rolünden dolayı, değişen IL-12 p40 seviyesine ve azalan IFN- γ aracılı immüniteden dolayı TB dışı mikobakterileri de içeren mikobakteriyal enfeksiyonlara duyarlılığın artmasına sebep olan nadir görülen IL-12B geni mutasyonlarına olan ilgi artmıştır (5).

Morris ve ark.'nın Gambiya'da yaptıkları çalışmada, iki Batı Afrika popülasyonu (Gambiya ve Gine-Bissau) ile birbirinden bağımsız iki popülasyonda (Kuzey ve Güney Amerika) IL-12B rs3212227 (p40 geni 1188 A/C) tek nükleotid polimorfizm varlığı real-time PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya Gambiya'dan 280 akciğer TB'u ile 286 kontrol, Gine-Bissau'dan 321 akciğer TB'u ile 346 kontrol, Kuzey Amerika'dan 281 akciğer TB'u ile 179 kontrol (Afrika kökenli Amerikalı), Arjantin ve Amerika'dan 221 akciğer TB'u ile 144 kontrol (Avrupa kökenli Amerikalı) dahil edilmiştir. Çalışma sonucunda Gine-Bissau ve Afrika kökenli Amerikalı hasta grubunda IL-12B rs3212227 gen bölgesinde anlamlı farkın bulunduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak bu verilerin IL-12B genetik varyasyonlarının Afrika kökenli popülasyonda akciğer TB'u için bir risk faktörü olarak belirlenmesine rağmen bu ilişkinin doğrulanması için daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır (5).

Morahan ve ark.'nın Avustralya'da yaptıkları çalışmada, Hindistanlı 123 TB'lu hasta ile 80 lepralı hastada ve 89 kontrol grubunda IL-12B 3' untranslated region (UTR)

ve IL-12 promoter genotipleri araştırılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla lepralı hastalarda IL-12B 3' UTR homozigot allel 2'nin, TB hastalarında da IL-12 promoter homozigot genotiplerinin istatistiksel olarak daha sık görüldüğü belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre IL-12 p40 üretiminin uyarılması ile bu enfeksiyon hastalıklarına karşı korunma sağlanabileceği vurgulanmıştır (144).

Wang ve ark.'nın Çin'de yaptıkları çalışmada, 522 akciğer TB'lu hastada ve 527 kontrol grubunda IL-12B 3' UTR rs3212227 (A>C) gen bölgesi ile IL-12A 3' UTR rs2243115 (T>G) ve rs568408 (G>A) gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığı PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda kontrol grubu ile hasta grubunun IL-12B 3' UTR rs3212227 ve IL-12A 3' UTR rs568408 gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmi farklılıklarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, IL-12A 3' UTR rs2243115 gen bölgesi tek nükleotid polimorfizm farkının ise anlamlı olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre IL-12 gen bölgesindeki genetik polimorfizmlerin akciğer TB'unun prognozuna ve bu hastalığa karşı duyarlılığa katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır (145).

Selvaraj ve ark.'nın Hindistan'da yaptıkları çalışmada, 166 akciğer TB'lu hastanın ve 188 sağlıklı kontrol grubunun PBMC'leri tam kandan izole edildikten sonra *M. tuberculosis* H37Rv kültür filtrat antijeni (culture filtrate antigen-CFA) ya da fitohemaglutinin (phytohaemagglutinin-PHA) ile stimüle edilerek hücre kültüründeki sitokin seviyeleri ELISA yöntemiyle, IL-12B 3' UTR +1188 (A/C) tek nükleotid polimorfizm varlığı ise PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda IL-12B 3' UTR +1188 gen bölgesinde kontrol grubu ile hasta grubu arasında allel ve genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirtilmiştir. Kontrol grubunda, hücre kültürleri bu maddeler ile stimüle edilenler ile stimüle edilmeyenlerin IL-12 p40 seviyeleri ölçüldüğünde AA genotipindekiler ile AC genotipindekiler arasındaki farkın; hasta grubunda ise, hücreleri CFA ile stimüle edilenlerin IL-12 p40 seviyeleri ölçüldüğünde CC genotipindekiler ile AC genotipindekiler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu söylenmiştir. Sonuç olarak 12B 3' UTR +1188 gen bölgesi polimorfizminin IL-12 p40 üretimini etkilediği ve TB'a karşı kazanılmış immünitede önemli bir rol oynadığı söylenmiştir (146).

Yurtdışında IL-12B p40 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmi üzerine yapılan değişik çalışmalar bulunmaktadır. Bu gen bölgesindeki polimorfizm ile TB'a duyarlılık arasında Rusya'da (147) ve Çin'de (148) yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken Hindistan'da (140) ve Amerika'da (149) yapılan çalışmalarda ise herhangi bir ilişkinin tespit edilemediği bildirilmiştir.

Ülkemizde Samsun'da yapılan doktora tez çalışmasında (21) hasta ve kontrol grubu arasında IL-12B p40 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı belirtilmiştir. Yine ülkemizde bu konuyla ilgili benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yalnız AYTEKİN ve ark. BCG lenfadenitli ve rekürren oral kandidiazisli 7 aylık erkek bir olgu bildirmişlerdir. Bu hastada 2-3 haftadır sol aksiller bölgede lenfadenopatinin mevcut olduğu, rekürren oral kandidiazis dışında hastanın önemli bir şikayeti olmadığı belirtilmiştir. Hasta 3 aylıkken BCG aşısı yapılmıştır. Tüberkülin cilt testinin pozitif olduğu (15x15 mm), bilgisayarlı tomografi ve abdominal ultrason bulgularının normal olduğu, lenf nodunun histopatolojik incelenmesi sonucu kazeöz nekroz içermeyen küçük granülomların mevcut olduğu, MTC PZR ve kültür sonuçlarının negatif olduğu belirtilmiştir. Hastadan alınan tam kan örneğinin BCG, BCG+IL-12 ve BCG+IFN- γ ile *in vitro* stimülasyonu sonucu IL-12 p40 seviyesinin BCG+IFN- γ stimülasyonu sonrası arttığı söylenmiştir. Flow sitometri sonucunda aktive T hücrelerinde IL-12R beta (IL-12R β) 1 ekspresyonunun olmadığı görülmüştür. IL-12R β 1 geninin DNA sekansı sonrası bu bölgede yeni bir mutasyon (64+1G>T) varlığının tespit edildiği söylenmiştir. Sonuç olarak IL-12R β 1 eksikliğinin BCG enfeksiyonu olan kişilerde düşünülmesi gerektiği vurgulanmıştır (150).

Yılmaz ve ark.'nın çalışmalarında ise 155 sağlıklı kişide IL-12B 3' UTR (+16974 A/C) polimorfizmi PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmış ve allel dağılımlarının beklenen Hardy Weinberg oranında olmadığı belirtilmiştir. Bu polimorfizmin IL-12 üretimi üzerindeki etkisi araştırıldığında, CC homozigot bireylerin AC heterozigot ve AA homozigotlara göre LPS ve PPD ile stimüle edilen PBMC'lerinde istatistiksel olarak daha fazla IL-12 salgılandığı görülmüştür (142). Bizim çalışmamızda da ARMS PZR yöntemi ile IL-12B p40 1188 A/C tek nükleotid polimorfizm varlığı 84 TB'lu hastada ve 110 sağlıklı kontrol grubunda araştırıldı. Çalışmamız sonucunda allel ($p=0.92$) ve genotip ($p=0.82$) dağılımlarında hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Th2 tipi anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-4'ün salgılanmasından sorumlu olan gen 5. kromozomun uzun kolunda (5q23-31) diğer sitokin genleri (IL-3, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15, granülosit koloni stimüle edici faktör ve IFN regüle edici faktör) ile birlikte bulunur (151). IL-4 genellikle TB'un ilerlemiş safhalarında yükselir ve koruyucu Th1 cevabını azaltır. İlerleyen hastalıkta immünpatolojinin azalmasından ziyade artmasına sebep olur. IL-4 promoter bölgesinin transkripsiyon başlangıç kısmında yer alan C/T tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. Bu polimorfizmin promoter etkinliğinin artması, nükleer transkripsiyon faktörlerin promoter bölgesine bağlanmasındaki artış, ayrıca değişik seviyelerde IL-4 aktivitesi ve spesifik antijenlere karşı IgG artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (136).

Vidyanani ve ark.'nın Hindistan'da yaptıkları çalışmada, 129 akciğer TB'lu hastada ve 127 sağlıklı kontrol grubunda IL-4 promoter -590 C/T polimorfizm varlığı PZR sonrası sekans spesifik oligonükleotid problama (sequence-specific oligonucleotide probing-SSOP) yöntemiyle, *in vitro* sitokin seviyeleri ise PBMC'lerin hücre kültüründe canlı *M. tuberculosis* H37Rv suşu, CFA ve PHA ile stimülasyonu sonrası ELISA ile araştırılmıştır. Çalışma sonunda hasta grubunda CT genotipinin, kontrol grubunda ise CC genotipinin; allel dağılımına bakıldığında T allelinin hastalarda, C allelinin ise kontrollerde daha sık görüldüğü ve bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. Hücre kültürü sonrası birçok hastada ve kontrolde, çeşitli stimülasyonlar sonrası IL-4 seviyesinin ölçülemeyecek kadar az olduğu, IL-4 genotip varyantları ile IL-4 seviyesi arasında istatistiksel bir fark olmadığı söylenmiştir. Sonuç olarak akciğer TB'lu hastalarda IL-4 promoter -590 CT genotipinin daha sık görüldüğü ve bu polimorfizmin TB'a duyarlılık ile ilişkili olabileceği, CC genotipinin ise hastalığa karşı korunmada önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (136).

Selvaraj ve ark.'nın Hindistan'da yaptıkları çalışmada, 166 akciğer TB'lu hastanın ve 188 sağlıklı kontrol grubunun PBMC'leri tam kandan izole edildikten sonra *M. tuberculosis* H37Rv CFA ya da PHA ile stimüle edilerek hücre kültüründeki sitokin seviyeleri ELISA yöntemiyle, IL-4 intron 3 VNTR gen polimorfizm varlığı ise allel spesifik primerler kullanılarak PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında allel ve genotip dağılımı bakımından bir farklılık bulunmadığı belirtilmiştir. Hücre kültürü sonrası IL-4 seviyelerinin bazı kişilerde tespit edilebildiği, kontrol grubunda değişik genotiplerde IL-4 seviyeleri arasında bir farkın

gözlenmediği söylenmiştir. Bununla birlikte hasta grubunda B2/B1 genotipinde B2/B2 geotipine göre stimülasyon sonrası IL-4 cevabında bir artış olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir (146).

Amirzargar ve ark.'nın İran'da yaptıkları çalışmada, 43 akciğer TB'lu hastada ve 123 sağlıklı kontrolde IL-4 -1089 T/G, -590 T/C ve -33 T/C gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizm varlığı SSP-PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hasta grubunda IL-4 -590 gen bölgesinde TT genotipinin tespit edilemediği, T allelinin hastalarda istatistiksel olarak negatif bir ilişki gösterdiği, yine hasta grubunda C allelinin ve T/C genotipinin daha fazla görüldüğü ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda IL-4 gen bölgesi tek nükleotid polimorfizm farklılıklarının akciğer TB'u ile bir ilişkisi olmadığı belirtilmiştir (7).

Ülkemizde IL-4 promoter -590 C/T polimorfizm varlığı ile ilgili benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu konu ile ilgili yaptığımız çalışma ülkemiz için bir ilktir. Çalışmamızda ARMS PZR yöntemi ile IL-4 promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizm varlığı 84 TB'lu hastada ve 110 sağlıklı kontrol grubunda araştırıldı. Çalışmamız sonucunda allel ($p=0.27$) ve genotip ($p=0.14$) dağılımlarında hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

TNF- α , *M. tuberculosis*'e karşı konak savunmasında önemli bir role sahiptir çünkü TNF- α inhibitörü alan hastaların TB'a daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmalar vardır (23). TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi üzerine yurtdışında yapılan değişik çalışmalar bulunmaktadır. Bu gen bölgesindeki polimorfizm ile TB'a duyarlılık arasında bazı çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken (2, 4, 121, 122), bazı çalışmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadığı belirtilmiştir (112, 120, 123-125). Ülkemizde bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda bu gen bölgesindeki polimorfizm ile TB'a duyarlılık ya da direnç arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadığı belirtilmiştir (21, 126, 127). Bizim çalışmamızda ise sağlıklı kontrol grubumuz dengede, hasta grubumuz dengede olmadığından bu iki grubun gen frekansları bakımından karşılaştırılması yapılamamıştır.

IFN- γ 'nın *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı ilk koruyucu immün yanıtta önemli bir rolü olduğu, IFN- γ geninde mutasyon bulunan insanların, *M. tuberculosis* ve patojen olmayan mikobakteri enfeksiyonlarına karşı duyarlı oldukları belirtilmiştir

(129). IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi üzerine yurtdışında yapılan değişik çalışmalar mevcuttur. Bu gen bölgesindeki polimorfizmin sitokin salınımını etkilediği ve bazı çalışmalarda çalışılan gruplar arasındaki farkın TB'a karşı duyarlılıkta istatistiksel olarak anlamlı olduğu (119, 130-132, 134, 135), bazı çalışmalarda ise bu farkın anlamlı olmadığı vurgulanmıştır (124, 133, 136). Ülkemizde bu konu ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda bu gen bölgesindeki tek nükleotid polimorfizminin, IFN- γ cevabı ve bu cevapta genotipler arasındaki farklılıklar ile ilişkili olduğunu vurgulayan bir çalışma olduğu gibi (138), bizim çalışmamızdaki gibi, bu gen bölgesindeki polimorfizm ile TB'a duyarlılık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı çalışmalar da mevcuttur (21, 127, 137).

IL-12B gen ekspresyonu IFN- γ 'nın en önemli uyarıcısıdır ve *M. tuberculosis*'e karşı uyarılmış IFN- γ 'nın oluşması için IL-12 p40 alt ünitesi gereklidir. IL-12B gen mutasyonlarının IL-12 p40 seviyesinde değişime sebep olduğu belirtilmektedir (5). Yurtdışında IL-12B p40 1188 A/C tek nükleotid polimorfizmi üzerine yapılan çalışmalarda bu gen bölgesindeki polimorfizmin TB için bir risk faktörü olduğunu belirten çalışmalar olduğu gibi (5, 144, 147, 148), gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (140, 145, 146, 149). Ülkemizde bu konu üzerine az sayıda çalışma yapıldığı belirlenmiştir. Samsun'da yapılan doktora tez çalışmasında (21) hasta ve kontrol grubu arasında IL-12B p40 1188 A/C tek nükleotid polimorfizminde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı belirtilmiştir. Bu sonuç bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç ile benzerdir. IL-12 üretimi üzerine etki eden başka gen bölgeleri de bulunmaktadır. Ülkemizde Aytekin ve ark.'nın (150) bildirdikleri bir olgu sunumunda BCG enfeksiyonu olan kişilerde IL-12R β 1 ekspresyon eksikliğinin düşünülmesi gerektiği söylenmiştir. Yılmaz ve ark. (142) ise IL-12B 3' UTR (+16974 A/C) polimorfizminin hücre kültüründe farklı genotipe sahip kişilerde değişik seviyelerde IL-12 salgılanmasına sebep olduğunu belirtmiştir.

Th2 hücreleri tarafından salgılanan bir sitokin olan IL-10'un, Th1 hücreleri tarafından salgılanan sitokinlerin sekresyonunu inhibe ettiği, inflamatuvar cevabı sınırlandırdığı, immün cevapta rol oynayan değişik hücrelerin olgunlaşmasını ve farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir (6). IL-10 geni promotor bölgesi -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi varlığı üzerine yurtdışında yapılan çalışmalarda bu gen

bölgesindeki polimorfizmin TB ile ilişkili olduğu belirten çalışmalar bulunduğu gibi (112, 122, 139, 141), bu ilişkinin saptanamadığı çalışmalar da bulunmaktadır (6, 124, 131, 140). Ülkemizde bu gen bölgesi polimorfizmi ile TB'a duyarlılık arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (21, 126, 127, 142). Bu çalışmalardan elde edilen verilerin aksine bizim çalışmamız sonucunda hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında IL-10 geni promoter bölgesi -1082 G/A tek nükleotid polimorfizmi sonuçları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığı ve çalışılan popülasyonun dengede olmadığı tespit edilmiştir. Bunun sebebinin, çalıştığımız hasta ve sağlıklı kontrol grubumuzun diğer çalışmalara dahil edilen gruplardan farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü bu tip genetik çalışmalara dahil edilen gruplardaki bireylerin allel ve genotip frekansları farklılık göstereceğinden, aynı ülkenin değişik popülasyonlarında yapılan çalışma sonuçlarının birbiri ile uygun olmadığı görülmektedir. IFN- γ +874 T/A tek nükleotid polimorfizmi için bunun gibi birbiri ile uygun olmayan sonuçlara ülkemizde (21, 127, 137, 138) ve diğer ülkelerdeki çalışmalarda (135, 136), TNF- α geni promoter -308 G/A tek nükleotid polimorfizmi ile ilgili yurt dışında yapılan çalışmalarda (4, 120) rastlanılmaktadır.

Th2 tipi anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-4 koruyucu Th1 cevabını azaltır. IL-4 promoter bölgesinin transkripsiyon başlangıç kısmında yer alan C/T tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. Bu polimorfizmin değişik seviyelerde IL-4 aktivitesi ve spesifik antijenlere karşı IgG artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (136). IL-4 promoter -590 C/T tek nükleotid polimorfizm varlığı ile ilgili yurtdışında yapılan çalışmalarda bu polimorfizmin TB'a duyarlılık ile ilişkili olabileceği bildirilirken (7, 136), yapılan diğer çalışmalarda böyle bir ilişkinin bulunamadığı belirtilmiştir (4, 146). Ülkemizde IL-4 promoter -590 C/T polimorfizm varlığı ile ilgili benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yaptığımız bu çalışmada hasta ve sağlıklı kontrol grubumuz arasında bu gen bölgesindeki polimorfizm için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemekle birlikte bu sonuçların hem bölgemizin hem de ülkemizin epidemiyolojik verilerine önemli katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

TB'da konak duyarlılığı üzerine etkili olduğu bildirilen diğer genetik faktörler üzerine ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda Samsun'da Akgüneş ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, TB duyarlılığında konak genetiğinin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, Samsun ilinde ikamet eden akciğer TB'lu hastaların, sınıf I HLA, sınıf II

HLA antijenlerinde, TB'a duyarlılık ya da dirençte etken olabilecek gen polimorfizmlerinin saptanması hedeflenmiştir. Çalışmaya 30 akciğer TB'lu hasta ve 33 kontrol grubu dahil edilmiştir. Sınıf I HLA ve sınıf II HLA antijenleri SSP-PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda sınıf I HLA-Cw*01 antijeni TB hastalarında anlamlı derecede yüksek, sınıf I HLA-Cw*12 antijeni de kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. TB olgularında HLA-A, -B, -DR ve DQ allellerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu çalışma ile akciğer TB'una duyarlılıkta Cw*01 ve Cw*12 antijenlerinin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (21).

İzmir'de Ekmekçi ve ark. Türk toplumunda TB'a yatkınlık ile *NRAMP1* gen polimorfizmlerinin ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, Türk toplumundaki TB olgularında *NRAMP1* genine ait dört polimorfizmin [3' UTR, D543N, INT4, 5'(CA)_n] bu hastalığa yatkınlık ve TB'un farklı klinik formlarıyla ilişkisinin, RFLP ve mikrosatellit analiz yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 472 TB hastası ve 571 yaş uyumlu kontrol olgusu dahil edilmiştir. *NRAMP1* genine ait dört polimorfizmin allel ve genotip sıklıkları farklı yaş gruplarında tek tek ele alındığında hastalığa yatkınlık veya direnç ile anlamlı ilişkinin bulunmadığı, bununla birlikte birleşik genotip sonuçları değerlendirildiğinde, birleşik genotiplerden birinin hem çocukluk yaş ve hem de 19-59 yaştaki hasta grubunda hastalıktan koruyucu olduğu saptanmıştır. Tüm hastalar klinik formlarına ve yaşlarına göre gruplandırılarak birbirleri ile ve yaş uyumlu kontrol grupları ile karşılaştırıldığında da farklı bir birleşik genotipin çocukluk çağı TB'una yatkınlıktan sorumlu olabileceği görülmüştür. Yetişkin grupta 60 yaş altı ve üstü TB hastalarının sonuçları karşılaştırıldığında iki farklı birleşik genotipin hastalığa yatkınlık ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada sonuç olarak *NRAMP1* gen polimorfizmlerinin Türk toplumunda hastalığa yatkınlığı, hastalığın ortaya çıkma yaşını ve hastalığın progresyonunu etkileyebileceği görülmüştür (152).

İstanbul'da Ateş ve ark. romatoid artrit ve TB'da metal iyon taşıyıcı protein (*SLC11A1-NRAMP1*) gen polimorfizminin rolünü araştırmışlardır. Bu kapsamda, 112 TB'lu hastada ve 213 sağlıklı kontrol grubunda *NRAMP1* geninin 5' promotor bölgesi polimorfizmi DNA dizileme yöntemi ile, INT4, D543N ve 3' UTR polimorfizmleri ise hem ARMS PZR hem de RFLP yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. TB ile *NRAMP1*'in 5' promotor, INT4, D543N ve 3' UTR polimorfizmleri arasında ve TB'un farklı klinik tipleri ile 5' promotor, INT4, D543N, 3' UTR polimorfizmleri arasında da

anlamalı bağlantı bulunmadığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, Türk toplumunda TB ile *NRAMP1* polimorfizmleri arasında bağlantı bulunmadığı vurgulanmıştır (153).

Adana'da Solğun ve ark. Çukurova Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları servisinde yatarak veya polikliniğinde ayaktan takip altında olan ve yeni tanı alan, 0-18 yaş arası pediatrik TB tanısı almış hasta grubunun, kontrol grubuna oranla TB'a genetik yatkınlığının belirlenmesini amaçlamışlardır. Bu kapsam da 50 TB'lu hasta ile 50 kontrol grubunda *NRAMP1* geninin D543N, 3' UTR ve INT4 polimorfizmleri ile MBL geni ekzon 1 bölgesinin 54. ve 57. kodonlardaki polimorfizmler PZR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hem *NRAMP1* hem de MBL genlerindeki polimorfizmler açısından hasta grubu ve kontrol grubu vakaları arasında istatistiksel bir farklılık saptanamadığı belirtilmiştir. Litaretürdeki diğer benzer çalışmalarda pozitif sonuçların; bu çalışmalarda vaka sayısı genişliğinin ya da sosyoekonomik, ırksal, çevresel ve coğrafi faktörlerin farklılığından kaynaklandığı, bu açıdan özellikle vaka sayısının artırılmasının gerektiği söylenmiştir (154).

Yaptığımız bu çalışma nispeten küçük bir popülasyonda gerçekleştirilmiştir. Konağın immün sisteminde sitokin salınımını kontrol eden birçok gen bölgesi bulunmaktadır. Ayrıca bu sitokinlerin salgılandıktan sonra fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için değişik hücrelere bağlanmalarını sağlayan çok sayıda reseptör bulunmaktadır. Gerek sitokin salınımını kontrol eden genlerdeki gerekse bu sitokinlerin bağlandıkları reseptörlerdeki polimorfizmlerin, konağın *M. tuberculosis*'e karşı vereceği immün cevabı düzenlediği bilinmektedir. Bu yüzden *M. tuberculosis*'e karşı Th1/Th2 dengesini düzenleyen sitokinlerin salınımını kontrol eden bu polimorfizmlerin ayrıntılı bir şekilde belirlenip, bu sitokinlerin üretiminde veya fonksiyonlarını yerine getirmesinde herhangi bir sorun tespit edilmesi durumunda uygun tedavilerle bu sorunların ortadan kaldırılması gerekmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Konağın genetik faktörlerinin TB'a duyarlılık veya direnç ile ilişkisini araştırdığımız bu çalışmada, *M. tuberculosis*'e karşı konak immün cevabının düzenlenmesinde önemli rolü olan sitokinlerin salgılanmasından sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin varlığı ARMS PZR ve PZR-RFLP yöntemleri ile araştırıldı.

Çalışmada, klinik materyalinde MTC izole edilen 84 hastanın 37 (%44)'si Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan ve 47 (%56)'si GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı Göğüs Hastalıkları A.D. Tüberküloz Servisi'nden elde edildi. Bu 84 hastanın 71 (%84.52)'i erkek, 13 (%15.48)'ü kadındı ve yaş ortalamaları 32.57 ± 15.94 'tü. Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 110 kişinin 93 (%84.55)'ü erkek, 17 (%15.45)'si kadındı ve yaş ortalamaları 29.40 ± 11.56 idi.

Hasta grubunu oluşturan 84 kişinin 76 (%90.48)'sı akciğer TB'u iken 8 (%9.52)'i akciğer dışı TB olarak tespit edildi. Hastaların 5 (%5.95)'inde daha önceden TB öyküsü (nüks TB) olduğu belirlendi. Akciğer TB'u olan hastaların 67 (%79.76)'si erkek, 9 (%10.72)'u kadın, akciğer dışı TB olan hastaların 4 (%4.76)'ü erkek ve 4 (%4.76)'ü kadındı. Çalışmaya dahil edilen 84 hastanın 58 (%69.05)'inin ARB'si pozitif. Akciğer TB'u olan hastaların 56 (%66.67)'sının ARB'si pozitifken akciğer dışı TB olan hastaların 2 (%2.38)'sinin ARB'si pozitif olarak tespit edildi.

Sitokin salgılanmasından sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmi sonuçlarına baktığımızda TNF- α geni promoter -308 G/A bölgesi polimorfizmi için sağlıklı kontrol grubumuz dengedeysen, hasta grubumuz dengede olmadığından bu iki grubun gen frekansları bakımından karşılaştırılması yapılamamıştır. IFN- γ geni +874 T/A bölgesi, IL-12B p40 geni 1188 A/C bölgesi, IL-10 geni promoter -1082 G/A bölgesi ve IL-4 geni promoter -590 C/T bölgesi polimorfizmleri sonucu allel ve genotip dağılımlarında hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

TB'a duyarlılık ya da dirençle ilişkili MHC'in HLA tipleri ve MHC olmayan genler/gen ürünleri (sitokinler) gibi konak genetik faktörlerinin tanımlanması, TB'a

yatkınlık ya da hastalığın gelişimini tahmin etmek için genetik markır olarak kullanılabilir. Yaptığımız bu çalışmada sadece, TB ile ilişkisi daha önceki çalışmalarda ortaya konan, sitokin salınımından sorumlu gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu konunun daha iyi aydınlatılması için HLA tiplerinin de çalışılması gerekmektedir. Ayrıca bu çalışmamız nispeten küçük bir popülasyon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu sayının artırılması, MHC'in HLA tipleri ve MHC olmayan gen bölgelerinin birlikte çalışılması ile TB'a karşı genetik yatkınlığın daha ayrıntılı bir şekilde ortaya konacağı düşüncesindeyiz.

TB biyolojik, sosyoekonomik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı karmaşık bir hastalıktır. Bu hastalığa karşı korunmada *M. bovis* BCG suşu ile aşılama bir miktar koruma sağlasa da bu aşı hastalığın kontrolünde etkili değildir. Bu nedenle, TB'un kontrolü ve gelecekte eradikasyonu için etkili aşılarm, özel tanı reaktiflerinin geliştirilmesine; tedavi için alternatif immün modülatör yaklaşımların belirlenmesine ihtiyaç vardır. Ayrıca konak tarafından *M. tuberculosis*'e karşı oluşturulan immün cevapta rol oynayan hücre ve proteinlerin fonksiyonlarının tam olarak belirlenmesi, bu fonksiyonların yerine getirilmesinde görevli genlerin tespit edilmesi ve bu genlerdeki bozuklukların belirlenip kişilerin genotipleri ile tedaviye verdikleri cevap arasındaki bağlantılar araştırılmalıdır. Bu mekanizmaların birbirleri ile olan etkileşimlerinin anlaşılması, yeni aşılarmın tasarlanmasında son derece önemli destek sağlayacaktır.

TB'a karşı konağın duyarlılık ya da direncini etkileyen gen bölgelerindeki polimorfizmlerin belirlenmesi, hastalığın klinik seyri açısından son derece önemlidir. Bu nedenle toplumumuzda bu konu üzerine yapılacak çalışmalarmal gen bölgeleri ile TB'a genetik yatkınlık arasındaki ilişkilerin tespit edilmesi gerekmektedir. Yapılacak bu çalışmalarmın sonucunda, hastalığın immünopatogenezi ve konak savunma mekanizmaları daha ayrıntılı bir şekilde aydınlatılacağı gibi ilaç araştırmalarında yeni farmakolojik hedeflerin belirlenmesine, yeni ve etkinliği daha fazla olan aşılarmın geliştirilmesine de yardımcı olacaktır. Bu çalışmalarmın değişik ülkelerde farklı popülasyonlar üzerinde yapılarak sonuçlarının değerlendirilmesi, TB'a karşı daha etkili bir şekilde savaşmamıza olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- World Health Organization. Tuberculosis Fact Sheet, 2007, *World Health Organization*, Erişim: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007 Erişim tarihi:24.02.2011
- 2- **Ben-Selma W, Harizi H, Boukadida J.** Association of TNF- α and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations. *Microbes Infect*, **2011**; 13(10):837-843.
- 3- **Randhawa AK, Shey MS, Keyser A, Peixoto B, Wells RD, de Kock M, Lerumo L, Hughes J, Hussey G, Hawkrige A, Kaplan G, Hanekom WA, Hawn TR; South African Tuberculosis Vaccine Initiative Team.** Association of human TLR1 and TLR6 deficiency with altered immune responses to BCG vaccination in South African infants. *PLoS Pathog*, **2011**; 7(8):e1002174.
- 4- **Abhimanyu, Mangangcha IR, Jha P, Arora K, Mukerji M, Banavaliker JN; Indian Genome Variation Consortium, Brahmachari V, Bose M.** Differential serum cytokine levels are associated with cytokine gene polymorphisms in north Indians with active pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol*, **2011**; 11(5):1015-1022.
- 5- **Morris GA, Edwards DR, Hill PC, Wejse C, Bisseye C, Olesen R, Edwards TL, Gilbert JR, Myers JL, Stryjewski ME, Abbate E, Estevan R, Hamilton CD, Tacconelli A, Novelli G, Brunetti E, Aaby P, Sodemann M, Østergaard L, Adegbola R, Williams SM, Scott WK, Sirugo G.** Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS One*, **2011**; 6(2):e16656.
- 6- **Liang L, Zhao YL, Yue J, Liu JF, Han M, Wang H, Xiao H.** Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and their protein production in pleural fluid in patients with tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2011**; 62(1):84-90.
- 7- **Amirzargar AA, Rezaei N, Jabbari H, Danesh AA, Khosravi F, Hajabdolbaghi M, Yalda A, Nikbin B.** Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw*, **2006**; 17(2):84-89.
- 8- **Daniel TM.** The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, **2006**; 100(11):1862-1870.
- 9- **Leão SC, Portaels F.** History. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*. 1st Ed, BourcillierKamps, **2007**:25-52.
- 10- **Taylor GM, Young DB, Mays SA.** Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *Journal of Clinical Microbiology*, **2005**; 43(5):2236-2240.

- 11- **Budak F.** Tüberküloz Plöreziye Spesifik Koruyucu İmmün Yanıtın Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Bilim Dalı. Bursa **2006**.
- 12- **Herzog H.** History of Tuberculosis. *Respiration*, **1998**; 65(1):5-15.
- 13- **Karahan ZC, Akar N.** Tüberküloza genetik yatkınlık. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, **2002**; 55(2):151-162.
- 14- **Comas I, Gagneux S.** The Past and Future of Tuberculosis Research. *PLoS Pathog*, **2009**; 5(10):e1000600.
- 15- WHO Global Tuberculosis Control 2010 Erişim: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069eng.pdf> Erişim tarihi: 02.08.2011
- 16- **Lawn SD, Zumla AI.** Tuberculosis. *Lancet*, **2011**; 378(9785):57-72.
- 17- Türkiye’de Verem Savaşı Raporu 2011 Erişim: http://www.verem.saglik.gov.tr/content/files/yayinlar/raporlar/turkiyede_verem_savasi_2011_raporu.pdf Erişim tarihi:28.08.2011
- 18- **Kıyan M.** Mycobacteriaceae. In: Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:419-455.
- 19- **Piessens WF, Nardell EA.** Pathogenesis of Tuberculosis. In: Reichman LB, Hershfield ES. *Tuberculosis A Comprehensive International Approach*. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker, **2000**:241-260.
- 20- **Şinasi EK.** Tüberküloz Tedavisi Esnasında Hepatotoksisite Gelişen Hastalarda AST, ALT Enzim Düzeylerinin Normale Dönme Süresini Etkileyen Faktörler. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Heybeliada Sanatoryumu Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi. İstanbul **2005**.
- 21- **Akgüneş A.** Tüberküloz Duyarlılığında Konak Genetiği. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Samsun **2009**.
- 22- **Hoal EG.** Human Genetic Susceptibility to Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases. *IUBMB Life*, **2002**; 53(4-5):225-229.
- 23- **Berrington WR, Hawn TR.** Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunological Reviews*, **2007**; 219:167-186.
- 24- **Stein CM, Zalwango S, Malone LL, Won S, Mayanja-Kizza H, Mugerwa RD, Leontiev DV, Thompson CL, Cartier KC, Elston RC, Iyengar SK, Boom WH, Whalen CC.** Genome Scan of M. tuberculosis Infection and Disease in Ugandans. *PLoS One*, **2008**; 3(12):e4094.

- 25- **Hill AVS.** Human Genetics and Infection. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th Ed. Philadelphia: The Curtis Center, **2005**:42-52.
- 26- **Lienhardt C, Fielding K, Sillah JS, Bah B, Gustafson P, Warndorff D, Palayew M, Lisse I, Donkor S, Diallo S, Manneh K, Adegbola R, Aaby P, Bah-Sow O, Bennett S, McAdam K.** Investigation of the risk factors for tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa. *Int J Epidemiol*, **2005**; 34(4):914-923.
- 27- **Harding CV, Boom WH.** Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol*, **2010**; 8(4):296-307.
- 28- **Özbal Y.** Tüberküloz İmmünolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, **2006**; 28(1):25-34.
- 29- **Hernandez-Pando R, Chacon-Salinas R, Serafin-Lopez J, Estrada I.** Immunology, Pathogenesis, Virulence. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*. 1st Ed, BourcillierKamps, **2007**:157-206.
- 30- **Schlesinger LS.** Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol*, **1993**; 150(7):2920-2930.
- 31- **Randhawa AK, Ziltener HJ, Merzaban JS, Stokes RW.** CD43 is required for optimal growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and in mice. *J Immunol*, **2005**; 175(3):1805-1812.
- 32- **Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R.** Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*, **2011**; Article ID:405310.
- 33- **Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I.** Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun*, **2000**; 68(8):4736-4745.
- 34- **Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, YangRB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin.** Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, **1999**; 285(5428):732-736.
- 35- **Hasan Z, Schlax C, Kuhn L, Lefkovits I, Young D, Thole J, Pieters J.** Isolation and characterization of the mycobacterial phagosome: segregation from the endosomal/lysosomal pathway. *Mol Microbiol*, **1997**; 24(3):545-553.
- 36- **Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J.** A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*, **1999**; 97(4):435-447.

- 37- **Gatfield J, Pieters J.** Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, **2000**; 288(5471):1647-1650.
- 38- **Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A.** How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, **2006**; 8(11):1687-1696.
- 39- **Fulton SA, Reba SM, Martin TD, Boom WH.** Neutrophil-mediated mycobacteriocidal immunity in the lung during *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun*, **2002**; 70(9):5322-5327.
- 40- **Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, Krutzik SR, Bloom BR, Ganz T, Modlin RL, Stenger S.** Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol*, **2006**; 177(3):1864-1871.
- 41- **Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, Orlova MO, Apt AS.** Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun*, **2005**; 73(3):1744-1753.
- 42- **Williams CMM, Galli SJ.** The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, **2000**; 105(5):847-859.
- 43- **Sayama K, Diehn M, Matsuda K, Lunderius C, Tsai M, Tam SY, Botstein D, Brown PO, Galli SJ.** Transcriptional response of human mast cells stimulated via the Fc(epsilon)RI and identification of mast cells as a source of IL-11. *BMC Immunol*, **2002**; 3:5.
- 44- **McCurdy JD, Olynych TJ, Maher LH, Marshall JS.** Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol*, **2003**; 170(4):1625-1629.
- 45- **Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL.** Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol*, **2003**; 170(5):2274-2278.
- 46- **Munoz S, Hernandez-Pando R, Abraham SN, Enciso JA.** Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol*, **2003**; 170(11):5590-5596.
- 47- **García-Romo GS, Pedroza-González A, Aguilar-León D, Orozco-Estevez H, Lambrecht BN, Estrada-García I, Flores-Romo L, Hernández-Pando R.** Airways infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* delays the influx of dendritic cells and the expression of costimulatory molecules in mediastinal lymph nodes. *Immunology*, **2004**; 112(4):661-668.
- 48- **Gumperz JE, Brenner MB.** CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol*, **2001**; 13(4):471-478.

- 49- **Geijtenbeek TBH, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y.** Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, **2003**; 197(1):7-17.
- 50- **Bhatt K, Hickman SP, Salgame P.** Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. *J Immunol*, **2004**; 172(5):2748-2751.
- 51- **Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, Mellman I.** Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, **2000**; 288(5465):522-527.
- 52- **López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, van Soolingen D.** A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol*, **2003**; 133(1):30-37.
- 53- **Wozniak TM, Ryan AA, Triccas JA, Britton WJ.** Plasmid interleukin-23 (IL-23), but not plasmid IL-27, enhances the protective efficacy of a DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*, **2006**; 74(1):557-565.
- 54- **Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raulet DH, Turner J, Orme IM.** NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol*, **2003**; 171(11):6039-6045.
- 55- **Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B, Weis SE, Samten B, Safi H, Shams H, Barnes PF.** NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol*, **2004**; 172(1):130-137.
- 56- **Gansert JL, Kiessler V, Engele M, Wittke F, Röllinghoff M, Krensky AM, Porcelli SA, Modlin RL, Stenger S.** Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol*, **2003**; 170(6):3154-3161.
- 57- **Hernandez-Pando R, De La Luz Streber M, Orozco H, Arriaga K, Pavon L, Al-Nakhli SA, Rook GA.** The effects of androstenrediol and dehydroepiandrosterone on the course of tuberculosis in Balb/c mice. *Immunology*, **1998**; 95(2):234-241.
- 58- **Roy S, Sharma S, Sharma M, Aggarwal R, Bose M.** Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, **2004**; 112(3):471-480.
- 59- **Bals R.** Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, **2000**; 1(3):141-150.
- 60- **Rivas-Santiago B, Sada E, Tsutsumi V, Aguilar-Leon D, Contreras JL, Hernandez-Pando R.** beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis*, **2006**; 194(5):697-701.

- 61- **Sharma S, Verma I, Khuller GK.** Therapeutic potential of human neutrophil peptide 1 against experimental tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**; 45(2):639-640.
- 62- **Alcais A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL.** Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med*, **2005**; 202(12):1617-1621.
- 63- **Pedroza-González A, García-Romo GS, Aguilar-León D, Calderon-Amador J, Hurtado-Ortiz R, Orozco-Estevez H, Lambrecht BN, Estrada-García I, Hernández-Pando R, Flores-Romo L.** In situ analysis of lung antigen-presenting cells during murine pulmonary infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Exp Pathol*, **2004**; 85(3):135-145.
- 64- **Reljic R, Clark SO, Williams A, Falero-Diaz G, Singh M, Challacombe S, Marsh PD, Ivanyi J.** Intranasal IFN γ extends passive IgA antibody protection of mice against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection. *Clin Exp Immunol*, **2006**; 143(3):467-473.
- 65- **Raqib R, Rahman J, Kamaluddin AK, Kamal SM, Banu FA, Ahmed S, Rahim Z, Bardhan PK, Andersson J, Sack DA.** Rapid diagnosis of active tuberculosis by detecting antibodies from lymphocyte secretions. *J Infect Dis*, **2003**; 188(3):364-370.
- 66- **Julian E, Matas L, Alcaide J, Luquin M.** Comparison of antibody responses to a potential combination of specific glycolipids and proteins for test sensitivity improvement in tuberculosis serodiagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **2004**; 11(1):70-76.
- 67- **Williams A, Reljic R, Naylor I, Clark SO, Falero-Diaz G, Singh M, Challacombe S, Marsh PD, Ivanyi J.** Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology*, **2004**; 111(3):328-333.
- 68- **de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF.** Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun*, **2005**; 73(10):6711-6720.
- 69- **Brown RM, Cruz O, Brennan M, Gennaro ML, Schlesinger L, Skeiky YA, Hoft DF.** Lipoarabinomannan reactive human secretory immunoglobulin A responses induced by mucosal bacille Calmette-Guerin vaccination. *J Infect Dis*, **2003**; 187(3):513-517.
- 70- **Seyhan EC.** HIV(-) Akciğer Tüberkülozlu Olgularda T-Lenfosit Alt Grupları. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. İstanbul **1999**.
- 71- **Schluger NW.** Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res*, **2001**; 2(3):157-163.
- 72- **Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, Flynn JL.** Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med*, **2000**; 192(3):347-358.

- 73- **Trajkovic V, Singh G, Singh B, Singh S, Sharma P.** Effect of Mycobacterium tuberculosis-specific 10-kilodalton antigen on macrophage release of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Infect Immun*, **2002**; 70(12):6558-6566.
- 74- **Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M.** Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol*, **2004**; 113(2):130-136.
- 75- **Lyadova IV, Oberdorf S, Kapina MA, Apt AS, Swain SL, Sayles PC.** CD4 T cells producing IFN-gamma in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype. *Clin Exp Immunol*, **2004**; 138(1):21-29.
- 76- **Lazarevic V, Flynn J.** CD8+ T cells in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **2002**; 166(8):1116-1121.
- 77- **de la Barrera SS, Finiasz M, Frias A, Alemán M, Barrionuevo P, Fink S, Franco MC, Abbate E, del C Sasiain M.** Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, **2003**; 132(3):450-461.
- 78- **Lockhart E, Green AM, Flynn JL.** IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*, **2006**; 177(7):4662-4669.
- 79- **Brandes M, Willmann K, Moser B.** Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*, **2005**; 309(5732):264-268.
- 80- **Bayrakçı S.** Tüberküloz Plörezide İnterlökin 6'nın Tanısal Değeri ve Diğer Parametrelerle Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı Başkanlığı. Ankara **1997**.
- 81- **Hajeer AH, Hutchinson IV.** Influence of TNF- α Gene polymorphisms on TNF- α production and disease. *Hum Immunol*, **2001**; 62(11):1191-1199.
- 82- **Raja A.** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*, **2004**; 120(4):213-232.
- 83- **van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW.** Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, **2002**; 15(2):294-309.
- 84- **Huang D, Cancilla MR, Morahan G.** Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes Immun*, **2000**; 1(8):515-520.
- 85- **Vankayalapati R, Wize B, Weis SE, Samten B, Girard WM, Barnes PF.** Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis*, **2000**; 182(1):234-239.
- 86- **Ohteki T.** Critical role for IL-15 in innate immunity. *Curr Mol Med*, **2002**; 2(4):371-380.

- 87- **Umemura M, Nishimura H, Saito K, Yajima T, Matsuzaki G, Mizuno S, Sugawara I, Yoshikai Y.** Interleukin-15 as an immune adjuvant to increase the efficacy of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Infect Immun*, **2003**; 71(10):6045-6048.
- 88- **Murray PJ, Wang L, Onufryk C, Tepper RI, Young RA.** T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J Immunol*, **1997**; 158(1):315-321.
- 89- **Bonecini-Almeida MG, Ho JL, Boéchat N, Huard RC, Chitale S, Doo H, Geng J, Rego L, Lazzarini LC, Kritski AL, Johnson WD Jr, McCaffrey TA, Silva JR.** Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis. *Infect Immun*, **2004**; 72(5):2628-2634.
- 90- **Allen SS, Cassone L, Lasco TM, McMurray DN.** Effect of neutralizing transforming growth factor beta1 on the immune response against Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs. *Infect Immun*, **2004**; 72(3):1358-1363.
- 91- **Rook GA, Dheda K, Zumla A.** Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine*, **2005**; 23(17-18):2115-2120.
- 92- **Ameixa C, Friedland JS.** Interleukin-8 secretion from Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes is regulated by protein tyrosine kinases but not by ERK1/2 or p38 mitogen-activated protein kinases. *Infect Immun*, **2002**; 70(8):4743-4746.
- 93- **McNicholl JM, Downer MV, Udhayakumar V, Alper CA, Swerdlow DL.** Host-pathogen interactions in emerging and reemerging infectious diseases: A genomic perspective of Tuberculosis, Malaria, Human Immunodeficiency Virus infection, Hepatitis B and Cholera. *Annu Rev Public Health*, **2000**; 21:15-46.
- 94- **Bellamy R.** Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clin Sci*, **2000**; 98(3):245-250.
- 95- **Qu HQ, Fisher-Hoch SP, McCormick JB.** Knowledge gaining by human genetic studies on tuberculosis susceptibility. *J Hum Genet*, **2011**; 56(3):177-182.
- 96- **Luong K, Nguyen LT.** Impact of Vitamin D in the Treatment of Tuberculosis. *Am J Med Sci*, **2011**; 341(6):493-498.
- 97- **Bellamy R, Hill AVS.** Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. *Curr Opin Immunol*, **1998**; 10(4):483-487.
- 98- **Li X, Yang Y, Zhou F, Zhang Y, Lu H, Jin Q, Gao L.** SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: updated systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, **2011**; 25;6(1):e15831.

- 99- **Denholm JT, McBryde ES, Eisen DP.** Mannose-binding lectin and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Exp Immunol*, **2010**; 162(1):84-90.
- 100- **Takiff HE.** Host Genetics and Susceptibility. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*. 1st Ed, BourcillierKamps, **2007**:207-262.
- 101- **Bozkurt B.** Türk Glokom Popülasyonunda Tümör Nekrozis Faktör Alfa -308 ve İnterlökin-10 -592, -819 ve -1082 Polimorfizmlerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Programı. Ankara **2006**.
- 102- **Kim HK, Han H, Choi HB, Pyo CW, Kim CC, Kim TG.** Distribution of seven polymorphic markers and haplotypes within the human TNF gene cluster in Koreans. *Hum Immunol*, **2000**; 61(12):1274-1280.
- 103- **Quasney MW, Bronstein DE, Cantor RM, Zhang Q, Stroupe C, Shike H, Bastian JF, Matsubara T, Fujiwara M, Akimoto K, Newburger JW, Burns JC.** Increased frequency of alleles associated with elevated Tumor Necrosis Factor- α levels in children with Kawasaki disease. *Ped Res*, **2001**; 49(5):686-690.
- 104- **Wilkinson RJ, Patel P, Llewelyn M, Hirsch CS, Pasvol G, Snounou G, Davidson RN, Toossi Z.** Influence of polymorphism in the genes for the Interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 β on Tuberculosis. *J Exp Med*, **1999**; 189(12):1863-1873.
- 105- **Isenberg DH.** Homogenization-decontamination Procedures. *Essentials Procedures for Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Pres. **2000**:182-184.
- 106- **Aslan G.** Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürü. III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulama kursu, Adana, **2004**. Kurs kitabı;10-18.
- 107- **Isenberg DH.** Acid, fast stain procedures. *Essentials Procedures for Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Pres. **2000**:179-181.
- 108- **Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** Türkiyede tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı. 1. baskı, Ankara: Rekmay Ltd. Şti., **2003**; 12-14.
- 109- **Rodrigues C, Shenai S, Sadani M, Sukhadia N, Jani M, Ajbani K, Sodha A, Mehta A.** Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a high volume tertiary care centre. *Indian J Med Microbiol*, **2009**; 27(3):217-221.
- 110- **Lee LV.** Procedures for identification from culture: Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In H. D. Isenberg (ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Volume 2. Washington, DC: ASM Press, **2004**:Section 7, p. 7.6.1.1-7.6.1.12.
- 111- **Sürücüoğlu S.** Tüberküloz basillerinin identifikasyonu. III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulama kursu, Adana, **2004**. Kurs kitabı;30-43.

- 112- **Oh JH, Yang CS, Noh YK, Kweon YM, Jung SS, Son JW, Kong SJ, Yoon JU, Lee JS, Kim HJ, Park JK, Jo EK, Song CH.** Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology*, **2007**; 12(4):594-598.
- 113- **Lopez-Maderuleo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C.** Interferon gama and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **2003**; 167(7):970-975.
- 114- **Hall MA, McGlenn E, Coakley G, Fisher SA, Boki K, Middleton D, Kaklamani E, Moutsopoulos H, Loughran Jr TP, Ollier WER, Panayi GS, Lanchbury JS.** Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immunemediated disease. *Genes and Immunity*, **2000**; 1(3):219-224.
- 115- **Li H, Xiaoyan D, Quanhua L, Jie L, Yixiao B.** Single-nucleotide polymorphisms in genes predisposing to asthma in children of Chinese Han nationality. *J Investig Allergol Clin Immunol*, **2009**; 19(5):391-395.
- 116- **Hill AVS.** Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu. Rev. Genet*, **2006**; 40:469-486.
- 117- **Yim JJ, Selvaraj P.** Genetic susceptibility in tuberculosis. *Respirology*, **2010**; 15(2):241-256.
- 118- **Bellamy R.** Genome-wide approaches to identifying genetic factors in host susceptibility to tuberculosis. *Microbes Infect*, **2006**; 8(4):1119-1123.
- 119- **Ansari A, Talat N, Jamil B, Hasan Z, Razzaki T, Dawood G, Hussain R.** Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients. *PLoS One*, **2009**; 4(3):e4778.
- 120- **Sharma S, Rathored J, Ghosh B, Sharma SK.** Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians. *BMC Infect Dis*, **2010**; 10:165-173.
- 121- **Merza M, Farnia P, Anoosheh S, Varahram M, Kazampour M, Pajand O, Saeif S, Mirsaeidi M, Masjedi MR, Velayati AA, Hoffner S.** The NRAMPI, VDR and TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility. *Braz J Infect Dis*, **2009**; 13(4):252-256.
- 122- **Scola L, Crivello A, Marino V, Gioia V, Serauto A, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C, Lio D.** IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mech Ageing Dev*, **2003**; 124(4):569-572.
- 123- **Fan HM, Wang Z, Feng FM, Zhang KL, Yuan JX, Sui H, Qiu HY, Liu LH, Deng XJ, Ren JX.** Association of TNF-alpha-238G/A and 308 G/A gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among patients with coal worker's pneumoconiosis. *Biomed Environ Sci*, **2010**; 23(2):137-145.

- 124- **Wu F, Qu Y, Tang Y, Cao D, Sun P, Xia Z.** Lack of association between cytokine gene polymorphisms and silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. *J Occup Health*, **2008**; 50(6):445-454.
- 125- **García-Elorriaga G, Carrillo-Montes G, Mendoza-Aguilar M, González-Bonilla C.** Polymorphisms in tumor necrosis factor and lymphotoxin A in tuberculosis without and with response to treatment. *Inflammation*, **2010**; 33(4):267-275.
- 126- **Ateş Ö, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A.** Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol*, **2008**; 28(3):232-236.
- 127- **Oral HB, Budak F, Uzaslan EK, Baştürk B, Bekar A, Akalin H, Ege E, Ener B, Göral G.** Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine*, **2006**; 35(3-4):143-147.
- 128- **Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC.** Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, **1997**; 15:749-795.
- 129- **Tian C, Zhang Y, Zhang J, Deng Y, Li X, Xu D, Huang H, Huang J, Fan H.** The +874T/A polymorphism in the interferon- γ gene and tuberculosis risk: An update by meta-analysis. *Hum Immunol*, **2011**; 72(11):1137-1142.
- 130- **Hashemi M, Sharifi-Mood B, Nezamdoost M, Moazeni-Roodi A, Naderi M, Kouhpayeh H, Taheri M, Ghavami S.** Functional polymorphism of interferon- γ (IFN- γ) gene +874T/A polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *Prague Med Rep*, **2011**; 112(1):38-43.
- 131- **Mosaad YM, Soliman OE, Tawhid ZE, Sherif DM.** Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis. *Scand J Immunol*, **2010**; 72(4):358-364.
- 132- **Vallinoto AC, Graça ES, Araújo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I, Machado LF, Ishak MO, Ishak R.** IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Hum Immunol*, **2010**; 71(7):692-696.
- 133- **Moran A, Ma X, Reich RA, Graviss EA.** No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2007**; 11(1):113-115.
- 134- **Ben-Selma W, Harizi H, Bougmiza I, Hannachi N, Ben Kahla I, Zaieni R, Boukadida J.** Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA Cell Biol*, **2011**; 30(6):379-387.
- 135- **Prabhu Anand S, Harishankar M, Selvaraj P.** Interferon gamma gene +874A/T polymorphism and intracellular interferon gamma expression in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, **2010**; 49(2):130-133.

- 136- **Vidyarani M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR.** Interferon gamma (IFN γ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res*, **2006**; 124(4):403-410.
- 137- **Onay H, Ekmekci AY, Durmaz B, Sayin E, Cosar H, Bayram N, Can D, Akin H, Ozkinay C, Ozkinay F.** Interferon-gamma gene and interferon-gamma receptor-1 gene polymorphisms in children with tuberculosis from Turkey. *Scand J Infect Dis*, **2010**; 42(1):39-42.
- 138- **Sallakçı N, Coşkun M, Berber Z, Gürkan F, Kocamaz H, Uysal G, Bhuju S, Yavuzer U, Singh M, Yeğın O.** Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis*, **2007**; 87(3):225-230.
- 139- **Henao MI, Montes C, París SC, García LF.** Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis*, **2006**; 86(1):11-9.
- 140- **Prabhu Anand S, Selvaraj P, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR.** Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res*, **2007**; 126(2):135-138.
- 141- **Delgado JC, Baena A, Thim S, Goldfeld AE.** Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, **2002**; 186(10):1463-1468.
- 142- **Yılmaz V, Yentür SP, Saruhan-Direskeneli G.** IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine*, **2005**; 30(4):188-194.
- 143- **Qu HQ, Fisher-Hoch SP, McCormick JB.** Molecular immunity to mycobacteria: knowledge from the mutation and phenotype spectrum analysis of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *Int J Infect Dis*, **2011**; 15(5):e305-313.
- 144- **Morahan G, Kaur G, Singh M, Rappaport CC, Kumar N, Katoch K, Mehra NK, Huang D.** Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. *Tissue Antigens*, **2007**; 69(1):234-236.
- 145- **Wang J, Tang S, Shen H.** Association of genetic polymorphisms in the IL12-IFNG pathway with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis in a Chinese population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2010**; 29(10):1291-1295.
- 146- **Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyarani M, Nisha Rajeswari D, Narayanan PR.** Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, **2008**; 43(1):26-33.
- 147- **Freidin MB, Rudko AA, Kolokolova OV, Strelis AK, Puzyrev VP.** Association between the 1188 A/C polymorphism in the human IL12B gene and Th1-mediated infectious diseases. *Int J Immunogenet*, **2006**; 33(3):231-232.

- 148- **Tso HW, Lau YL, Tam CM, Wong HS, Chiang AK.** Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population. *J Infect Dis*, **2004**; 190(5):913-919.
- 149- **Ma X, Reich RA, Gonzalez O, Pan X, Fothergill AK, Starke JR, Teeter LD, Musser JM, Graviss EA.** No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*, **2003**; 188(8):1116-1118.
- 150- **Aytekin C, Doğu F, Tuygun N, Tanır G, Güloğlu D, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Feinberg J, Casanova JL, İkinciöğulları A.** Bacille Calmette-Guérin lymphadenitis and recurrent oral candidiasis in an infant with a new mutation leading to interleukin-12 receptor beta-1 deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*, **2011**; 21(5):401-404.
- 151- **Sobti RC, Berhane N, Mahdi SA, Takur H, Wanch A.** Association of interleukin 4 VNTR polymorphism and HIV/AIDS in a north Indian seropositive patients. *Mol Biol Rep*, **2011**; Doi: 10.1007/s11033-011-1093-7.
- 152- **Ekmekçi A.** Türk Toplumunda Tüberküloza Yatkınlıkta *NRAMP1* Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genetik Doktora Programı. İzmir **2008**.
- 153- **Ateş Ö.** Romatoid artrit ve Tüberkülozda Metal İyon Taşıyıcı Protein (*SLC11A1-NRAMP1*) Gen Polimorfizminin Rolü. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. İstanbul **2007**.
- 154- **Solğun HA.** Çocukluk Çağı Tüberkülozunda Genetik Yatkınlık. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Adana **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

14.06.1980 tarihinde Kayseri ilinde doğdu. Liseyi Ankara'da tamamladı. 1998 yılında Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2003 yılında mezun oldu. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu'na Öğretim Görevlisi olarak atandı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.