

157228

T.C
OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNO-HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**HLA B 27 ANTİJENİNİN SAPTANMASINDA AKIM SİTOMETRİ,
REAL TIME PCR VE KONVANSİYONEL SSP-PCR
METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATİCE BAŞYİĞİT

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ZAFER GÜLBAŞ

EKİM 2004

KABUL VE ONAY SAYFASI

Hatice BAŞYİĞİT'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "HLA-B27 Antijeninin Saptanmasında Akım Sitometri, Real Time PCR ve Konvansiyonel SSP-PCR Metodlarının Karşılaştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimiz Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

09.11.2004



Prof.Dr.Yurdanur AKGÜN
ÜYE



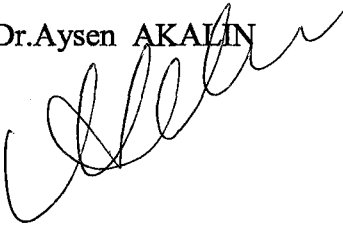
Prof.Dr.Zafer GÜLBAŞ
ÜYE



Prof.Dr.Sevilhan ARTAN
ÜYE

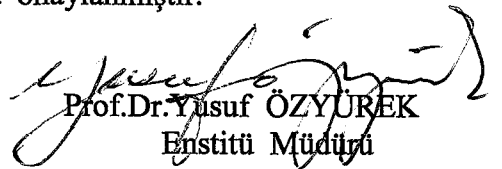


Doç.Dr.Cengiz KÖRKMAZ
ÜYE



Doç.Dr.Aysen AKALIN
ÜYE

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.11.2004.. gün ve 624./180.L... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr.Yusuf ÖZYÜREK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ	1
TABLolar DİZİNİ	2
KISALTMALAR	3
ÖZET	4
SUMMARY	5
GİRİŞ VE AMAÇ	6
GENEL BİLGİLER	7
1)HLA MAJÖR DOKU UYGUNLUK KOMPLEKS İ(HLA-MHC)	7
<u>1-a) HLA-Tarihçe</u>	7
<u>1-b)HLA Moleküllerinin Yapısı Fonksiyonu ve Dokuda Dağılımı.</u>	8
Sınıf I	9
Sınıf II	10
Sınıf III	12
<u>1-c HLA Saptama Yöntemleri</u>	13
<u>1-c-1) Akım Sitometri ile HLA Antijenlerinin Saptanması</u>	13
<u>1-c-2) Real-Time PCR Yöntemiyle HLA Saptanması</u>	14
<u>1-c-3) Konvensiyel SSP-PCR Yöntemiyle HLA Saptanması</u>	17
<u>1-c-4) Serolojik Yöntemle HLA Saptanması</u>	17
<u>1-c-5) HLA Saptanmasında Kullanılan Diğer Yöntemler</u>	18
PCR Methodu	18
Heteroduplekx Metod	18
SSCP Metodları	18
<u>1-d) HLA ve Hastalık İlişkisi</u>	19
2-HLA-B27 HASTALIK İLİŞKİSİ	24
3-HLA-B27 SAPTAMA YÖNTEMLERİ	27
<u>3-a)Akım Sitometri ile HLA –B27 Saptanması</u>	27
<u>3-b) Real Time PCR ile HLA ile HLA-B27 Saptanması</u>	28
<u>3-c) Konvensiyel SSP- PCR ile HLA-B27 Saptanması</u>	29
4-HLA-B27 SAPTAMA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI	29

<u>4-1) Akım Sitometri ile Real-Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması</u>	29
<u>4-2) Akım Sitometri ile Konvansiyel SSP- PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması</u>	30
<u>4-3)Real-Time PCR ile Konvansiyel SSP- PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması</u>	30
YÖNTEM VE GEREÇLER	31
<u>1-Akım Sitometri Yöntemi ile HLA-B27 Çalışılması</u>	31
<u>2-Real-Time PCR Yöntemi ile HLA-B27 Çalışılması</u>	32
<u>3-Konvansiyel SSP-PCR Yöntemi ile HLA-B27 Çalışılması</u>	35
BULGULAR	38
TARTIŞMA	52
SONUÇ	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. MHC Majör Doku Uygunluk Kompleksi.	12
Şekil 2. MHC Sınıf I ve Sınıf II Moleküllerinin Şematik Yapısı.	13
Şekil 3. Akım Sitometride HLA-B27 Negatif Olgudaki Hücre Dağılımı.	41
Şekil 4. Akım Sitometride HLA-B27 Pozitif Olgunun Hücre Dağılımı.	42
Şekil 5. Akım Sitometride HLA-B7 Alleli Olan Olguların Hücre Dağılımı.	42
Şekil 6. Akım Sitometride HLA-B27 Analizindeki Şüpheli Dağılımı.	43
Şekil 7. Real Time PCR' da HLA-B27 Pozitif Olguların Analizi.	44
Şekil 8. Real Time PCR' da Pozitif Kontrol ve Negatif Olguların Analizi.	45
Şekil 9. Konvansiyonel SSP- PCR' da HLA-B27 Pozitif Olgunun jeli	46
Şekil 10. Konvansiyonel SSP- PCR' da HLA-B27 Negatif Olgunun Jeli ve Bilgisayar Analizi	47
Şekil 11. Konvansiyonel SSP- PCR' da HLA-B7 Bulunan Olgunun Jeli ve Bilgisayar Analizi	48
Şekil 12. Konvansiyonel SSP- PCR' daki Pozitif olguların Akım Sitometri ve Real Time PCR' Elde Edilen Sonuçların Grafiği.	51
Şekil 13. Konvansiyonel SSP-PCR' daki Negatif olguların Akım Sitometri ve Real Time PCR' Elde Edilen Sonuçların Grafiği.	51

TABLÖLAR

Tablo 1. MHC Sisteminin Dokulardaki Dağılımı	13
Tablo 2. MHC Sisteminin Hastalık İlişkileri.	23
Tablo 3. Sensivite, Spesifite, Pozitif Prediktif ve Negatif Prediktif Değerlerini Hesaplama Tablosu	36
Tablo 4. Akım Sitometri, Real Time PCR ve Konvansiyonel SSP-PCR Olgu Sonuçları.	39
Tablo 5. Real Time PCR ile Konvansiyonel SSP- PCRsonuçlarının karşılaştırılması	49
Tablo 6. Akım Sitometri ile Konvansiyonel SSP-PCRsonuçlarının karşılaştırılması	49
Tablo 7. Hücre Yüzeyindeki HLA-B27 Ekspresyonlarının (B27 Pozitif) , (B27 Şüpheli Pozitif / B7 Pozitif), (B27 Negatif / B7 Negatif) Hasta Gruplarında Karşılaştırılması.	50

KISALTMALAR

- AS** : Ankilozan Spondolit
- dNTP** : Deoksiribonükleik Asit Trifosfat
- EDTA** : Etilen Diamin Tetraasetik Asit
- HLA** : Human Lökosit Antijen
- MHC** :Majör Histocompatibility Complex (Büyük doku uygunluk kompleksi)
- MIC** : MHC class I heavy chain related genes
- PBS** : Fosfat Buffer tuzu
- PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- R.A** : Romatoid Artrit
- ROC** : Receiver Operating Characteristics curve (Hasta ve sağlam bireylerin doğru olarak ayıran belirli bir kesim noktasını alarak tanımlarda kullanılan eğri)
- SSA** : Sekans Spesifik Allel
- SSP-PCR** : Sekans Spesifik Primer (Diziye Özgü Primerler ve PCR Amplifikasyonu)
- TBE** : Tris-Borat-EDTA
- Taq** : Thermus aquaticus
- UV** : Ultraviole

ÖZET

HLA-B27 Ankilozan Spondilit (AS) ile sık olarak birlikte ve HLA-B27 antijeni Ankilozan spondilitin önemli bir genetik markıdır. HLA-B27 rutin olarak serolojik metotlarla tiplendirilmektedir. Ancak yanlış pozitif neticeler bildirilmiştir. Bu yüzden HLA-B27 genotipleme için daha güvenilir birçok moleküler metotlar geliştirilmiştir. Biz bu çalışmamızda HLA-B27 saptanması için Real Time PCR metodunu araştırdık ve bu metotla akım sitometri ve konvansiyonel SSP-PCR metotlarını karşılaştırdık. Çalışmamızda SSP-PCR rutin HLA tiplemesi yapılan 60 olguyu (33 olgu HLA-B27 pozitif, 27 olgu HLA-B27 negatif) bu metotlarla araştırdık.

Akım sitometri ile 3 olguda yanlış pozitiflik saptanırken yanlış negatif olgu görülmedi. Real Time PCR da 4 yanlış pozitif olgu görülürken hiç yanlış pozitif olgu saptanmadı. Akım sitometri ile HLA-B27 testinin spesifitesi % 89 sensitivitesi % 100 bulunmuştur. Real Time PCR ile HLA-B27 testinin spesifitesi % 100 , sensitivitesi % 88 saptanmıştır.

Bulgularımız Real Time PCR testinin HLA-B27 tiplendirilmesinde rutinde güvenli olarak kullanılabileceğini ve akım sitometri ile HLA-B27' si şüpheli pozitif olgularda kullanılması gerektiğini göstermiştir. HLA-B27 saptanmasında Real Time PCR metodu laboratuardaki büyük sayıdaki örneklerin rutin analizinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler : Ankilozan Spondilit, HLA-B27 Antijeni, Akım Sitometri, Real Time-PCR, SSP -PCR

SUMMARY

HLA-B27 is strongly associated with ankylosing spondylitis (AS) and The HLA-B27 antigen is an important genetic marker in AS . As typing for HLA-B27 is routinely performed by serological methods, false-positive results can be generated. Therefore, several more accurate molecular methods have been developed for HLA-B27 genotyping. We described a real-time PCR method for the detection of the HLA-B27 and this method were compared with a flow cytometry and conventional SSP-PCR methods.

We tested this methods on 60 subjects (33 HLA-B27 positive and 27 HLA-B27 negative) who underwent routine HLA typing testing by SSP-PCR. 3 false positive and no negative results were observed by flow cytometry. 4 false negative and no false positive results were detected by Real Time PCR. The specificity and sensitivity of HLA-B27 test with flow cytometry were 89 % and 100 % . The specificity and sensitivity of HLA-B27 test with Real Time PCR were 100 % and 88 % .

Our results suggest that; Real Time PCR test for HLA-B27 typing can be used safely in routine practice and it should be used for doubt positive cases by detected flow cytometry as HLA-B27 positive. Real Time-PCR method for the detection of HLA-B27 can be used safely for the routine analysis of large numbers of samples in the laboratory.

Keywords: Ankylosing spondylitis; HLA-B27 antigen; Flow cytometry; Real Time-PCR; SSP-PCR

GİRİŞ VE AMAÇ :

HLA-B27 Antijeni; (AS) Ankilozan Spondilit, (R.A) Reaktif Artrit, psoriasis inflamatuvar barsak hastalığı, seronegatif oligoartropati hastalıklarıyla ilişkilidir. Bu nedenle HLA-B27 Antijeninin tespit edilmesi bu hastalıkların tanısında önemlidir.

HLA antijenleri 6. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunmaktadır (14). HLA-A-B-C-DR-DP ve DQ lokuslarında farklı HLA (Human Lokosit Antijeni) antijenleri bulunmaktadır. HLA-B27 antijeni B lokusunda olup 4 santimorgan uzunluğunda ve yaklaşık 4 Mbp' lik bir yer kaplamıştır (24).

HLA-B 27 Antijenini saptamada farklı yöntemler kullanılmaktadır. HLA-B27 antijeninin saptanmasında kullanılacak yöntemin hızlı, tekrarlanabilir, güvenilir metot olması gerekmektedir. HLA-B27 bakılmasında; akım sitometri, Real Time PCR ve konvansiyonel SSP-PCR (Sekans spesifik primer-Polimerize Zincir Reaksiyonu) yöntemi kullanılmaktadır. Akım sitometri ile hızlı netice alınmasına karşın bazı olgularda pozitiflik-negatiflik ayırımında sorunlar çıkmaktadır. Sorun çıkmasının nedeni HLA-B27' ye karşı kullanılan monoklonal antikörlerin diğer HLA antijenleri ile çapraz reaksiyon vermesidir.

Konvansiyonel SSP- PCR yöntemi ile çalışma pahalı olup zaman almaktadır. Yeni bir yöntem olan Real Time PCR, konvansiyonel SSP- PCR' a göre hızlı netice veren bir metottur ve akım sitometre ile HLA-B27 şüpheli pozitif bulunan olgularda kullanılabilir bir yöntem olarak görünmektedir (30).

Biz bu çalışmamızda HLA-B27 antijeni saptanmasında akım sitometri ile elde edilen sonuçları Real Time PCR ve konvansiyonel SSP-PCR sonuçlarıyla karşılaştırmayı ve bu sonuçların birbiriyle olan uyumunu saptamayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

1-HLA- MAJÖR DOKU UYGUNLUK KOMPLEKSİ (HLA-MHC)

1-a) HLA-Tarihçe :

HLA kompleksinin varlığı 1950 yıllarında düşünölmeye başlanmıştır (2,14,28). Dausset, Payne, Jan Rood ilk olarak lösemik olarak sürekli tekrarlanan kan transfüzyonlarına ihtiyaç duyulan olgularda, beyaz küreleri aglütine eden antikörlerin geliştiğini gözlemlemişlerdir. Kısa bir süre sonra aglütine edici özelliğı olan antikörlerin multipar kadınların %20 ile %30' da olduğı saptanmıştır. Bulunan bu antikörler, bazı kişilerin beyaz kürelerini aglütine ederken bazılarını etmemiştir. Farklı antiserumlar farklı olguların beyaz kürelerini aglütine etmiştir. Bu antiserumların alloantijenleri saptamış olduğı düşünölmüştür (3,24,28).

1967 yılında histokompatibilite antijenlerinin simgelenmesinde bir anlaşmaya varılarak 'insan lökositleri' anlamına gelen 'HLA' denilmiştir. Bu antijenler ilk kez 1979 yılında monoklonal antikörlerle gösterilmiştir (17).

1973 yılında HLA antijenlerinin, HLA sistemine ilişkin çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğı bulunmuştur. HLA molekülleri kristalize edilmiştir. İmmün yanıt oluşturacak şekilde peptidlerin T hücrelerini etkilediğı gösterilmiştir. Bu bulgular, HLA molekülleri ile ortaya çıkan polimorfizimin immün yanıtı nasıl etkilediğine ve hastalıklara olan ilişkisine ışık tutmaktadır (3).

1970' li yılların sonları ve 1980' lerin başlarında, çeşitli HLA genleri moleküler genetik teknikler kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfizm) teknikleri, MHC' deki genetik çeşitliliğı ortaya çıkarmıştır. İlk moleküler genetik HLA tipleme metodu için dayanak oluşturmuştur (2).

1980 'li yılların sonlarında klasik olmayan HLA-E, -G ve -F molekülleri bulunmuştur (1).

1994 yılında MHC sınıf I bölgesinde klasik MHC sınıf I genlerinden organizasyonları, ekspresyonları ve ürünleri farklı başka yeni gen lokusu bulunmuştur. Bu yeni bulunan lokusa MIC (MHC sınıf I ağır zinciriyle ilişkili genler) adı verilmiştir (1).

İnsan MHC bölgesinin tüm DNA sekansı 2000' li yılların sonuna doğru aydınlatılmıştır. Altıncı kromozomun üzerindeki 3.6 megabazlık bu bölgede 224 gen lokusu saptanmıştır (1).

1-b) HLA Moleküllerinin Yapısı, Fonksiyonu ve Dokudaki Dağılımı:

HLA kompleksinin, çeşitli fonksiyonları oluşturan molekülleri kodlayan çok fazla sayıda gene sahip olduğu gösterilmiştir. HLA kompleksinin tanınmasına olanak sağlayan hücre yüzey molekülleri 3 ana gruptur (3,6,16,18,24,25).

1. Sınıf I : HLA-A,- B,-C ve non klasik olarak da HLA-E,-F,-G,-H,-J' dir.
2. Sınıf II: HLA-DR, -DP ve -DQ' dur (1,6,24,25). İlave genler, HLA-DM,-DN,-DO dur (2,24).
3. Sınıf III: Kompleman genleridir.

HLA Sınıf I :

HLA sınıf I molekülleri β_2 mikroglobulinle oluşturulan 12.000 daltonluk nonpolimorfik proteinle non kovalent bağlı olan ve ağır zincir oluşturan 44.000 daltonluk polimorfik glikoprotein içeren 2 zincirli yapıdadır. α zinciri 6. kromozom üzerinde bulunan HLA kompleksindeki genle ve β_2 mikroglobulin ise 15. kromozom üzerinde bulunan non-HLA genle kodlanmaktadır (3,6,14,16). Hücre membranında yer alan sınıf I molekülü sadece α zinciridir. α zinciri; üç bölgede organize olan yaklaşık 340 amino asit içermekte olup bu bölgeler, ekstrasellüler bölge, transmembran bölgesi ve intrastoplazmik bölgeleridir denilmiştir (3,6).

Ekstrasellüler bölge: α_1 , α_2 , α_3 olmak üzere üç domaine bölünmüş olup bu bölgeler yaklaşık 90 amino asitten oluşmuştur. Bu üç domain β_2 mikroglobulinle ilişkilidir. α zincirindeki polimorfizm, primer olarak α_1 , α_2 domainlerinde hipervariable bölge olarak lokalize olmuştur (3,16). α_1 , α_2 domaininde bulunan bir hipervariabel bölge yaklaşık 62-80 rezidü içermiştir. α_2 domaininde yer alan ve daha az polimorfik hipervariable bölge ise 140-160 rezidü içermiştir. α_3 domainindeki amino asit rezidüleri ise 223- 227 ve 229 rezidü içermiştir (3).

Sınıf I moleküllerinin ve peptidlerinin T hücre reseptörleri ile tanınması kompleks biçimde olmaktadır. Sitotoksik T Lenfosit (CTL) prekürsörleri, yabancı peptid kombinasyonunu veya duyarlı hücre üzerindeki sınıf I molekülünü tanıdıklarında proliferasyon olarak matür CTL olarak olgunlaşırlar. Matür CTL, tanıma işini yapar ve spesifik olarak hedef hücreleri öldürür. Özel CTL hücreleri aynı virüsle enfekte olan farklı sınıf I molekülü olan hücreyi lizise uğratmadığı gibi farklı virüsle enfekte olan aynı sınıf I molekülü olan hücreleri de lizise uğratmaz. Sonuç olarak CTL' lerin öldürme işlemi peptid spesifiktir, sınıf I restriktedir (3). CD8+ T lenfosit yüzeyinde bulunan reseptörler HLA-A2 gibi sadece belirli sınıf I molekülü ile ilgili olan yabancı peptidleri tanır.

HLA sınıf I molekülleri tüm nükleuslu somatik hücrelerde bulunmaktadır. HLA-E,-F, ve- G lokusundaki genler HLA-A,-B,-C genlerine göre daha az polimorfik olup daha sınırlı doku dağılımı vardır (24).

HLA Sınıf II:

HLA sınıf II molekülü, 29.000 dalton β zinciri ile 34.000 dalton α_1 zinciri olmak üzere, 2 tane HLA kompleksi ile kodlanan glikoprotein zincirinden oluşmuştur (3,14,16,28). Molekül her iki zincirle birlikte membranda bulunur. Zincirlerin herbiri 230 amino asitten oluşmuştur. Sınıf II molekülünde sınıf I molekülü gibi extrasellüler bölge, transmembran bölgesi ve intrastoplazmik bölge olarak organize olmuştur. Extrasellüler transmembran bölgenin 3 domain içerdiği sınıf I α zincirinin aksine, sınıf II α zinciri ve β zinciri extrasellüler bölgelerinin herbiri 2 domain içermiştir. Bunların herbiri de 90 amino asitten oluşmuştur, α zincirinin domainleri α_1 ve α_2 , β zincirinin domainleri 4 external domaine sahiptir. Sınıf I α_3 domaini ve β_2 mikroglobiline benzer şekilde, sınıf II α_2 ve β_2 domainleri ile immünglobulin bölgesi domainleri homoloji göstermiştir. Bu da sonuç olarak sınıf II moleküllerini immünglobulin supergen ailesine dahil etmiştir (3).

Sınıf II α_1 ve β_1 domainlerinin peptid binding alanı oluşturması, sınıf I α_1 ve α_2 domainlerinin aynı yapıyı oluşturulmasının karşılaştırılabilir olması, sınıf II yapısı, sınıf I yapısı ile biraz benzerlik göstermiştir. Sınıf II' ler $CD4^+$ T lenfositleri üzerinde reseptör olarak görülmüştür(6,28). HLA sınıf II α_1 ve β_1 domainlerinin yapısı 8β zinciri ile 2α zincirinden oluşmuştur. α_1 ve β_1 domainleri eşit dağılmıştır. Sınıf II molekülünde de sınıf I molekülündeki gibi 2α heliksi ve β zincirlerinin bir bölümü, peptid fragmanlarına eklenen boşluğu oluşturmuştur. Birinci ve ikinci hipervariable bölgeler β zinciri üzerinde lokalize olurken üçüncü hipervariable bölge β zincirinin α heliksi üzerinde bulunmaktadır. Sınıf I' in aksine sınıf II ' nin binding alanı açıktır. 10- 25 aminoasit veya daha fazla peptid bağlanmasına olanak

tanır. Bu bağılı peptit ve sınıf II molekülü, CD4⁺ T lenfositleri üzerinde T reseptör için ligand oluşturmaktadır (3,28).

HLA sınıf II genleri α ve β primer amino asit dizisine ve kristal yapısına göre 4 bölgeye ayrılmıştır.

1-Amino terminal ekstrasellüler peptid bağlayan bölge

2-Ekstrasellüler immunoglobulin benzeri bölge

3-Transmembran bölgesi

4- Sitoplazmik bölge (24).

Sınıf I molekülleri CD8⁺ T hücreleri ile peptid tanınmasını sınırladığı gibi, sınıf II molekülleri CD4⁺ T hücreleri ile peptid tanınması sınırlandırılmaktadır (6,8,16). Sınıf II molekülleri ile bağılı peptidler, 10 ila 25 amino asit arasında değışecek şekilde fazla çeşitliliğe sahiptir. Sınıf I molekülünün peptid bağlantıları N-terminal ve C-terminal ucu ile olurken; sınıf II molekülü peptid bağlantıları heliksler ve peptidin uzunluğunca devam eden peptid dizilimi ile olmaktadır. Bununla birlikte, Sınıf II alanının sol son kısmında, peptid 3. pozisyonuna yakın amino asit zinciri yer alır. Sınıf II bağılı peptid, sınıf I bağılı peptiden daha uzun devam etmiştir (3).

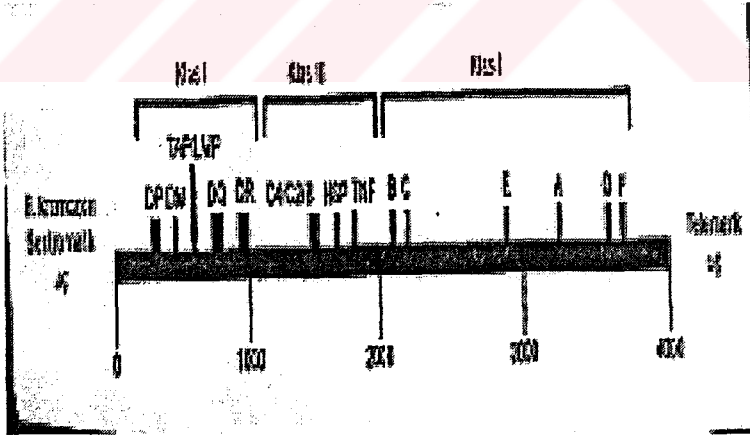
Sınıf II HLA molekülündeki peptidlerin yerleşmesinde önemli rol oynayan proteinleri kodlamıştır .

Sınıf II molekülleri daha sınırlı dağılım göstermiştir. Bu moleküller primer olarak makrofajlar, dendritik hücreler, B lenfositleri, aktive T lenfositlerini de kapsayan immun hücreler üzerinden eksprese edilmiştir (3).

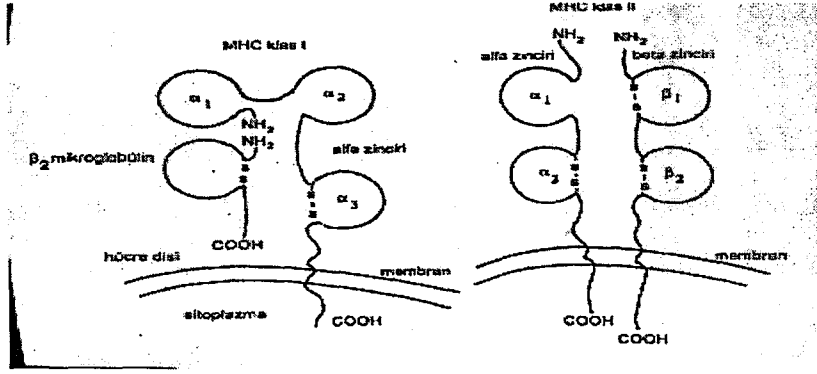
HLA Sınıf III :

HLA kompleksinin 1000 kb sentromerlik kısmında lokalize olan genler sınıf II bölgesidir. Bu bölgede sınıf II' nin tüm genleri bulunmuştur. 1000 kb orta kısmında lokalize olan genler sınıf III bölgesidir. Bu bölge diğer genlere ilaveten kompleman genlerini içermiştir. Bu genler sınıf III genleri diye adlandırılmıştır (3). Bu bölge I.ve II. sınıf gen bölgeleri arasında yer almıştır. C4, C2 ve properdin B faktörünü sentezleyen gen alt bölgesi bölgeleri vardır. Bu proteinler serumda serbest olarak bulunmuştur ve serolojik olarak tayin edilmişlerdir (24).

Sınıf III Bölgesi, bağılı olmayan fonksiyonlara sahip molekülleri kodlayan çok sayıda gen içermiştir. Bu genler C4A ve -B , C2 ve Bf genlerini kapsar. Sırasıyla klasik ve alternatif kompleman sisteminin 4., 2. ve properdin faktörünü kodlamaktadır. (Tissue Nekroz Faktör) TNF-A ve-B genleri TNF α - β ' yı kodlamaktadır (3).



Şekil 1: MHC : Majör Doku Uygunluk Kompleksi.



Şekil 2: MHC Sınıf I ve Sınıf II Moleküllerinin Şematik Yapısı.

Doku	MHC Sınıf I	MHC Sınıf II
T Hücreleri	+++	+ / -
B Hücreleri	+++	+++
Makrofajlar	+++	++
Diğer Antijen Sunan Hücreler	+++	+++
Timus Epiteli	+	+++
Nötrofiller	+++	-
Hepatositler	+	-
Böbrek	+	-
Beyin	+	-
Eritrositler	-	-

Tablo 1 : MHC Sisteminin Dokularda Dağılımı .

1-c) HLA Saptama Yöntemleri:

1-c- 1) Akım Sitometri ile HLA Antijenlerinin Saptanması :

Akım sitometri cihazı hücrenin yada biyolojik partiküllerin birçok fiziksel

özelliğini aynı anda ölçen teknoloji olup, akım içerisinde hareket eden hücrelerin çeşitli özellikleri ölçülür. Akım sitometride, lazer ışık kaynağından gelen ışınlarla hücrelerin karşılaşması sağlanır. Fludik, optik ve elektronik sistemleri kullanılarak hücrelerin büyüklüğü, granülositesi ve floresan yoğunluğu ölçülür. Akım sitometrinin bu ölçümü yapabilmesi için hücrenin sıvı içinde süspansiyon olması gerekir. Hücre süspansiyonu akım sitometri içine çekilirken lazer ışığına maruz kalır. Hücrelere çarpan lazer ışınları saçılır. Hücre üzerinde floresan molekülleri varsa bu moleküller lazer ışınlarını absorbe ederek daha uzun dalga boyunda saçılırlar. Saçılan ışınlar uygun olarak yerleştirilen ayna ve filtreler ile dalga boylarına göre dedektörlerle toplanır. Bu sinyaller elektronik sinyallere dönüştürülür. Her hücre ile ilgili bilgi kompütörde toplanır. Kompütörde toplanan datalar izotopik kontrole göre analiz edilir (11).

Sınıf II antijenleri HLA-DR,-DP ve -DQ lenfosit yüzeyinde bulunan epitoplardır. Farklı oranlarda ekspresyon olurlar. Bu ekspresyon miktarı monoklonal antikörlerle işaretlenerek akım sitometri cihazında değerlendirilir.

Sınıf I antijenlerinden HLA-B alleli olan HLA-B27 akım sitometri ile tespit edilebilmektedir (31).

1-c-2) Real Time PCR Yöntemi ile HLA Saptaması :

Real Time PCR nükleik asit amplifikasyonu eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir (7). (Ticari olarak kullanılan 3 tipi vardır: Light Cyler, Taqman, BİO-RAD) Yalnızca çift zincirli DNA' ya bağlandıklarında floresan veren boyalar (Cyber green I) kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresan miktarı ölçülür. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA' nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA' ya bağlanan 'cyber green' miktarı artmakta ve buna bağlı

olarak yayılan floresans miktarındaki artış gözlenmektedir (7). Bu uygulamada, floresan artışı her zaman spesifik amplifikasyon göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA' ya entegre olan 'cyber green' ortamda hedef moleküler olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin 'melting curve' (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü 'melting temperature Tm' (çift sarmal DNA' nın % 50' sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR amplifikasyonunun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca 'Cyber green' boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampliconun Tm derecesi saptanabilmektedir. Klinik örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilir (7).

Diğer bir uygulama şeklinde hedefe özgül prob lar kullanılmaktadır. Burada prob larla testin özgüllüğü artmıştır. Problardan biri 3' ucundan floresans boya işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlenmiştir. Problar hedef ampliconlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. 'Fluoresance resonance energy transfer, (FRET)' olarak adlandırılan bu enerji transferi

sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine bağı olarak artmaktadır (7).

TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob, tek sarmal hale gelen hedef molekülün üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam etmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5' → 3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçerek sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel, sinyal şiddeti artar (7).

Real Time PCR kısa sürede sonuç verebilmektedir. Test yapılırken tüpler açılmadığından kontaminasyon riski azdır. Elektroforeze gerek kalmadan sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren proplar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir(7).

Sınıf II Antijenlerinden HLA-B27 antijeni Real Time PCR' la son zamanlarda çalışılmaktadır(30).

1-c-3) Konvansiyonel SSP-PCR Yöntemiyle HLA Saptanması:

Moleküler HLA tiplemesi için en yaygın metotlardan birisi de HLA tiplerini adlandırmak için kullanılan, polimorfik sekansların saptanmasını sağlayan sekans spesifik primerlerdir (SSP). Bu metot için isimler PCR-SSP, amplifikasyon refraktör mutasyon sistemi (ARMS), allel spesifik mutasyon (ASA), spesifik allellerin PCR amplifikasyonu ve allel spesifik PCR (ASP) kapsamaktadır. Bu metotla, amplifikasyon primerlerinde yer alan polimorfik sekanslar saptanabilmektedir. Eğer allelde her 2 primerin sekansıda mevcutsa amplifikasyon gerçekleşir. Eğer allelde her 2 primerin sekansı yoksa, amplifikasyon ürünü oluşmayacaktır. Bu metot, partiküler HLA tipini tanımlamada en az 2 polimorfik sekans saptayarak değerlendirir. Bu metot, tüpler veya mikroliter alanlara ilave edilen her bir çiftle birlikte bir çok farklı amplifikasyon çiftlerini gerekli kılar. Bilinmeyen DNA örneği her bir tüpe ilave edilir. Amplifikasyon ürünleri, DNA örneklerinde var olan sekansları kapsayan primerlerden elde edilmektedir. Amplifikasyon ürünleri, genellikle agaroz jel ile elektroforez yapılan DNA' nın ethidium bromidle boyanması ile saptanmaktadır (2).

Bu metot da ortaya çıkan bir potansiyel problem; partiküler primer karışım için negatif sonucun, hedef sekansların olmamasından değil de amplifikasyonun başarısızlığından kaynaklanmaktadır. Kontaminasyon problem olabilir.

Amplifikasyon primerleri, düşük rezolüsyonlu HLA-A,-B,-C ve -DR,-DQ tipleme için rapor edilmişlerdir. Yüksek rezolüsyonlu tipleme metotları HLA-DR ,-DQ için ve sınıf I HLA allelleri için rapor edilmiştir(2).

1-c-4) Serolojik Yöntemle HLA Saptanması :

Serolojik yöntem sınıf I (HLA-A,-B ve-C) lokuslarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde kan örneğinden histopak solüsyonu ile lenfositler izole edilir. İzole edilen lenfositler plaklara ekilir. İşlem sonunda plak mikroskop altında

değerlendirilerek alleller belirlenir. PCR' a göre ucuz bir yöntemdir. Bu yöntem sınıf II allellerini belirlemede yetersiz kalmaktadır. Bu yöntemin yetersizliği kross reaksiyon veren antijenlerden kaynaklanmaktadır (26).

1-c-5) HLA-Saptamasında Kullanılan Diğer Yöntemler :

PCR Metodu :PCR, DNA üzerinde seçilmiş olan spesifik bölgenin amplifikasyonunu otomatik olarak sağlayan metottur (24).

PCR invitro ortamında spesifik DNA'nın amplifiye olarak ardarda primerlerin birbirini tamamlayarak DNA ipliğinin uzamasıdır. Hedef bölgedeki zincir 5'→3' yönünde olmaktadır (10,24).

Heteroduplex Metot: Heteroduplex formasyonu, amplifiye edilmiş ürünlerin denatürasyonu ve renatürasyonu sonrasında heteroduplex ve homoduplex DNA formları arasındaki farklılığın belirlenmesiyle genetik sekanslarla bağlantılı farklılıkları saptamaktadır (2).

SSCP Metotları: SSCP (Sekans Spesifik Zincir Reaksiyonu), aynı zamanda iki HLA allelinin karşılaştırılması için kullanılmıştır. Bu metotta tek zincirli nükleik asitlerin sekonder yapılarındaki farklılıkları saptamak için elektroforez kullanılmaktadır (2).

DGGE Metotları : Denatüre edici gradient jel elektroforezi, elektroforez süresince DNA' yi denatüre etmek için jel içerisine ilave edilen denatürant gradienti kullanılmaktadır (2).

1-d) HLA ve Hastalık İlişkisi :

Belli bir MHC allele sahip olmanın yatkınlık yarattığı hastalıklar; otoimmün hastalıklar, viral hastalıklar, kompleman sistemi bozuklukları, bazı nörolojik ve alerjik hastalıklardır. Bu grup hastalıkların çoğunda MHC dışı çok sayıda gen ve çevresel etkiler de rol oynar. Bu nedenle belli bir hastalık ile MHC ilişkisini belirlemek zordur (28).

Otoimmün hastalıklar, insanlarda birkaç basamakta olur. Pek çok otoimmün hastalığın gelişiminde genetik özelliğin katkısı bulunmaktadır. Bu hastalıklarda, MHC genlerinin katkıları ile kompleks bir genetik geçiş vardır. Otoimmün hastalıklarının çoğunun patogeneğinde, HLA sınıf II antijenleriyle ilişkisi olan T lenfositlerinin önemi büyüktür (32).

MHC molekülleri ile hastalık arasındaki ilişkinin en tipik örneği HLA-B27 doku tipine sahip olma ile oluşan ankilozan spondilit riskidir(28).

Reaktif artritlerde HLA-B27 sıklığı % 60-80 arasındadır. Bu sıklık reaktif artritlerin etkenine göre değişmektedir. Bütün reaktif artritlerin kronik şekilleri akut tipine oranla hastalığı başlatan mikroorganizma ne olursa olsun, HLA-B27 (+)' liği % 90 dan daha yüksektir (28).

Hasta ve normal popülasyonda HLA antijenlerinin sıklığı karşılaştırılarak yapılan popülasyon çalışmalarında HLA-hastalık bağlantısı değerlendirilmiştir. Farklı etnik gruplar ve ırklar arasındaki HLA antijen çeşitliliğinin sıklığından dolayı, aynı etnik grup ve ırklara ait hasta ve normal popülasyondaki antijen sıklığının karşılaştırılması uygundur. Örneğin HLA-B27, Amerikalı beyaz ankilozan spondilitli hastaların % 88' inde ve kontrol hastalarının % 8'inde bulunmuştur. Afrikalı Amerikalı ankilozan spondilitli hastaların % 48' inde HLA-B27 varken kontrol grubunun sadece %2' inde HLA-B27 saptanmıştır (3).

HLA- hastalık bağlantısının ölçüsü, reaktif risk (RR) ile değerlendirilmiştir. RR, HLA antijeni olmayan bir hasta ile karşılaştırıldığında, hastalıkla ilişkili HLA antijeni olan hasta için bu hastalığın olma şansını göstermiştir.

$RR=(P^+ \times C^-) / (P^- \times C^+)$ formülü ile hesaplanmıştır. Burada;

P^+ : hastalar arasında hastalıkla ilişkili HLA antijeni olan hastaların % oranını.

C^- : HLA antijeni olmayan kontrol grubunda kişilerinin % oranını.

P^- : HLA antijeni olmayan hastaların % oranını.

C^+ : HLA antijeni olan kontrol grubunda kişilerinin % oranını.

RR: 1'in üzerinde oldukça, HLA antijeni ile hastalık arasındaki bağlantıda güçlenmiştir. Örneğin HLA-B27 pozitif olan beyaz Amerikalılar için bu değer ≈ 90 ' dir (3).

Her toplumda AS ile ilgili HLA-DRB1 alelleri farklıdır. Japonlarda DRB1 0404, Musevilerde DRB1 6101, Amerikalılarda HLAB1 1402' dir (28).

Avrupalılarda SLE, HLA-DR3 ile ilgilidir. DR3 ile umulandan daha sık birlikte bulunan HLA-B8' dir (28).

HLA-hastalık ilişkisini açıklayan hipotezler mevcuttur. Bunlardan 6 tanesi şöyledir. Bu hipotezlerin 5 tanesi HLA sınıf I ve sınıf II moleküllerine uygulanırken, 6. hipotez sadece sınıf II moleküllerine uygulanmıştır (3).

İlk hipotez; HLA molekülünün, etyolojik mikrop için reseptör olarak rol oynadığı öne sürülmüştür. Eğer, HLA-B27, AS' na neden olan mikrop için reseptörse, HLA-B27' ye sahip olgu için AS için artmış risk söz konusudur. Mikroba maruz kalma halinde AS gelişecektir (3).

İkinci hipotez; sadece belirli bir HLA molekülünün, peptidi yerleştirebilen, peptid binding alanına sahip olduğunu öne sürmüştür. AS' na neden olan etyolojik mikrop hücreye girdiğinde, bazı mikrobale proteinler peptidlere degrade olmaktadır. Eğer HLA-B27 molekülü, Etyolojik mikrobale peptidi kabul edebilen peptid binding alanı ile dominant sınıf I molekülü ise, ardından HLA-B27, peptidleri T hücrelerine sunan dominant sınıf I molekülü olacaktır. Bu hipoteze göre, mikropla infekte HLA-B27 pozitif olgularda AS gelişebilir (3).

Üçüncü hipotez; HLA molekülü peptid kompleksini tanımlayan, T hücre antijen reseptörünün hastalık için sorumlu olduğunu öne sürmektedir. Bununla birlikte HLA molekülünün, T hücre tanınmasını etkilemeleri nedeniyle, hastalık ve HLA molekülü arasında açık bir bağlantı görülmüştür. Bu hipotez, tüm HLA -B27 pozitif olguların etyolojik B27 mikrobiyal peptid kompleksi oluşturabileceğini belirtmektedir. Fakat sadece kesin olgular, bu kompleksi tanımlayabilir. Sadece, uygun reseptörü olan T hücreleri olan olgularda AS gelişebilir. Aksine, HLA-B27 pozitif olan, bu T hücrelerinin olmadığı olgularda AS gelişmeyecektir. Her ne kadar uygun reseptöre sahip T hücreleri, hastalığın gelişiminden sorumlu tutulsa da, HLA-B27 ile net bağlantı, bu hücrelerin HLA-B27 etkilenimi ile ortaya çıkmıştır (3).

Dördüncü hipotez; antijenik peptidleri stoplazmadan endoplazmik retikulumla taşıyan TAP gen ürünleri ile ilgilidir. Defektif olay varsa, bu defekt hastalığa predispozandır. Bu durumda, defektif TAP gen ürünleri endoplazmik retikulumla birkaç peptid geçişine izin verir. Bu da hücre yüzeyinde HLA sınıf I molekülünün anormal düşük dansitesi ile sonuçlanmıştır. 3 olası alternatif, HLA ve hastalık arasındaki bağlantıyı açıklayabilir. İlk alternatif, defektif TAP geninin, birkaç immünojenik mikrobiyal peptid HLA molekül kompleksine olanak tanıdığını bunun da mikroba karşı efektif immun yanıtı önlediğini öne sürer. Ardından mikrop, bazı bilinmeyen patofizyolojik mekanizma ile AS' ye neden olur. İkinci ve Üçüncü alternatifler mikrobiyal infeksiyonu geliştirmemektir. İkinci alternatif, defektif TAP geni nedeniyle, birçok boş HLA-B27 molekülünün oluştuğunu öne sürmektedir. Ayrıca, boş HLA-B27 molekülünün, hücre yüzeyinde, diğer HLA sınıf I molekülünden daha stabil olduğunu öne sürmektedir. Bu boş HLA-B27 kompleksleri patojenik T hücre

yanıtını stimüle etmektedir. Üçüncü alternatif, sınıf I moleküllerinin düşük dansitesinin, defektif self toleransa neden olduğunu ve bunun da otoimmünite ile sonuçlandığını öne sürmüştür (3).

Beşinci hipotez; hastalıkla ilişkili HLA antijeninin, mikrobiyal antijene immünolojik olarak benzer olduğunu öne sürmüştür. Bu çalışmadaki örnekte, AS için etyolojik olan örnekten alınan antijen, immünolojik olarak HLA-B27' ye benzer ve uygun T hücre reseptörü tarafından tanınmıştır. Peptid ve HLA-B27'nin immünolojik benzerliği nedeniyle, aynı T hücre reseptörü aynı zamanda HLA-B27' yide tanır. Bu hipotez, iki olası alternatif öne sürmektedir. Birinci alternatif, HLA-B27 ile mikrobiyal peptid arasındaki benzerliğin, mikrobun yabancı olarak tanınmasını önlediğini öne sürmektedir. İmmün yanıt belirlenememiştir. Bilinmeyen patofizyolojik mekanizma ile mikrop hastalık oluşturmaktadır. İkinci alternatif, mikrobiyal peptidin yabancı olarak tanındığını ve immün yanıtın mikropla başladığını öne sürmüştür. HLA-B27 ve mikrobiyal peptid benzerliği nedeniyle immün yanıt aynı zamanda HLA-B27' ye karşıda oluşmaktadır. Bu da otoimmün yanıt AS ile sonuçlanmıştır (3).

Son teori, AS' li olduğu kesinleşen hastalar arasındaki gözlemlerle oluşturuldu. Reiter Sendromu, Shigella flexneri türlerinin neden olduğu dizanteriyi takiben HLA-B27 pozitif olgularda gelişebilir. AS durumuna neden olan Shigellada, plazmid veya ekstrakromozal sirküler DNA PHS-2 parçası tanımlanmıştır. Bu plazmid, 5 amino asidin HLA-B27 sekansı ile birliktelik göstermektedir. Artritogenik Shigella ile taşınan PHS-2 plazmidi ile yapısal ve immünolojik benzerlik gösteren HLA-B27' li olgular, bu plazmidi taşıyan shigella ile infekte olmaları durumunda, hastalığa duyarlı hale gelmişlerdir (3).

Spondiloartropati gelişimi olan HLA-B27 transgenik rat çalışması, bazı olası mekanizmaları ortaya koymaktadır. Sadece, HLA-B27 geni varlığında, hastalığa duyarlılık oluşmaktadır. Bu sonuç, HLA-B27 varlığının hastalık için sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Daha ileri çalışmalar, transgenik ratların hastalığın birçok bulgusunun gelişmesini sağladığını gösterir. Buna ilaveten hastalık, hiçbir belirti

olmadan, kemik iliği hücrelerinden transgenik ratlara aktarılır. Bu bulgular, HLA-B27 peptid kompleksinin hastalık patogenezinde yer aldığını düşündürmektedir(3).

HLA- hastalık ilişkisini değerlendiren son hipotez sadece, sınıf II molekülleri ile ilişkili hastalıklarla bağlantılıdır. HLA sınıf II molekülleri, normalde sınırlı doku dağılımına sahiptirler. Antijen sunan hücreler, B hücreleri ve aktive T hücreleri ile etkilenirler. Genel olarak da HLA sınıf II molekülünü ekspresyon etmeyen hücreler, interferon γ ekspresyonunu sağlamak için indükleyici olabilirler (3).

Yukarıdaki hipotezlerden hiçbiri, herhangi bir hastalık için kesin değildir. Farklı hastalıklar için farklı mekanizmalar vardır.

HASTALIK	İLGİLİ HLA ANTİJENİ	ORTALAMA RÖLATİF RİSK
Hematokromozis	A3	-
Narkolepsi	DR2	-
Ankilozan spondilit	B27	81.8
Reiter sendromu	B27	40
Psoriatik spondilit	B27	10
Akut anterior üveit	B27	8
Behçet hastalığı	B5	3.3
Romatoid artrit	DR4	6.4
Pausi artiküler romatoid art.	DR5/DP2	7
Kronik hepatit	B8	
Sistemik lupus eritematozus	DR3/C4	17.1
Sjögren sendromu	DR3	5.6
İnsulin bağ. Diabetes mellit	DQ8/DR3/4	31.8
Goodpasture	DQ57	0.1
Multiple skleroz	DR2	20
Myastenia gravis	DR2/B8/A2	6
Hodking hastalığı	B18	-
Preeklampsi	DR4	-

Tablo 2 : MHC Sisteminin Hastalık İlişkileri .

2-HLA-B27 ve HASTALIK İLİŞKİSİ :

1986 yılında Townsend' de uygun bir şekilde ard arda gelen kısa lineer peptidleri tanımaya duyarlı CTL hücrelerinin viral proteinlerin epitoplarını tanıdığı göstermiştir. Bu buluş, belirli sınıf I moleküllerinden HLA-A2, HLA-Aw68 ve HLA-B27 nin x-ışınlarıyla peptid binding bölgelerinin kristal grafik yapısının belirlenmesine yardımcı olmuştur (4).

HLA-B27 antijeni 6. kromozomun kısa kolunda HLA-B lokusun da bulunmuştur(24).

Sınıf I MHC molekülleri , virüsler ve intrasellüler bakterilere karşı koruyucu immünitete majör rol oynayan polimorfik yüzey antijenleridir. HLA sınıf I antijenlerinden, insanlardaki hastalıklarla en güçlü ilişkisi olan HLA-B27 molekülüdür(19).

Sınıf I HLA bölgesinin β lokusunda B27'nin ağır zincirini kodlayan 6 farklı allel vardır (28).

HLA-B27'nin antijenik peptidi bağlayan oyuğunda bulunan sekiz amino asidin yerleşimi; 70. pozisyonda lizin, 9. pozisyonda histidin, 44. pozisyonda glutamik asit, 67. pozisyonda sistein, 69. ve 71. pozisyonda ise alanin vardır. HLA-B27 dışındaki sınıf I MHC moleküllerinde bu amino asitlerin ikisinden fazlası bulunmaz. Bu nedenle HLA-B27'nin hastalık yatkınlığından sorumlu kısmı bu özel amino asit dizilimine sahip antijen bağlayan oyuk kısmıdır (22).

HLA-B27 (+) olan kişilerin ankilozan spondilit olma olasılığı HLA-B27 (-) olanlara oranla fazladır. Buna rölatif risk denilmiştir. HLA-B27 (+) kişilerde ankilozan spondilit için rölatif risk %81'dir. 100 HLA-B27 (+) kişinin 4'ünde ankilozan spondilit

TCR dizisindeki sınırlama nedeniyle, sadece T hücre prosedürü kullanılırsa, bir tanesi gözden kaçacaktır. C. trochomatis için, CD8+ T hücre grupları elde edildi. Ardından C. Trochomotis genlerinin ekspresyonunu gözlemlemek için kullanılmıştır (19).

B27 etkilenimli peptidlerin sayısının daha ileri olarak belirlenmesi için, 2 tane bilgisayara dayalı algoritm kombinasyonu kullanılmıştır: Birinci algoritm, HLA-B2705' e pozisyon 2' deki arjininle birlikte nanomer peptidlerin eklenme olasılığı tahmini için oluşturulmuştur. Algoritm H-G Rammensel grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. İkinci algoritm, MHC sınıf I molekülleri tarafından CD8+ T hücrelerine sunulan peptidlerin proteozomlarla sitoplazmada işlem görmesini değerlendirmektedir(19). Sonuç olarak, CD8+ T hücreleri için HLA-B27 etkilenimli klamidyal peptid stimulatörlerini tanımlamada, seçilmiş peptidlere T hücre yanıtları antijen spesifik akım-sitometri ile test edilmiştir. Böylece seçilmiş klamidyal peptidlerin immünojenitesi nedeniyle, CD8+ T hücrelerinin stimülasyonu, hücre yüzeyi üzerinde erken aktivasyon markeri CD69 ekspresyonu için double-pozitif olan hücrelerin yüzde oranlarının değerlendirilmesi ile hücrelerde IFNy' nin intrasellüler artışı ölçülmüştür (19).

Diğer basamaklarda araştırmacılar, immünojenitesi açısından seçilmiş peptidleri test ettiler. Hücre yüzey ekspresyon markırları ve intrasellüler sitokin sekresyonuna dayanan antijen-spesifik akım-sitometri kullanılmıştır. C. Trochomatisle indüklenen reaktif artriti olan hastalardan alınan perifrik kandaki mononükleer hücreler sinoviyal sıvı hücreleri seçilmiş peptidlerle 6 saat stimüle edildi. İmmün yanıt, intrasellüler değerlendirme ile erken aktivasyon markeri CD69 ve INFy' için double pozitif olan kantitatif CD8+ T hücreleri ile analiz edilmiştir. Chlamydia ile indüklenen reaktif artriti olan B2705(+) hastalarda 11 tane HLA-B27 etkilenimli oligoda nanomer peptidler tanımlanabilmiştir(19).

3- HLA-B27 SAPTAMA YÖNTEMLERİ :

3-a) Akım Sitometri ile HLA-B27 saptanması :

Akım sitometri; biyolojik materyalleri ve hücrel antijenleri saptama olanağı sağlayan duyarlı, güçlü bir teknolojidir. HLA-B27, transplantasyon sonrası antikoru ve transplantasyon öncesi krossmatch ve antikoru izlemede klinik olarak müracaat edilen çok parametrelili bir sistem olarak bulmuşlardır (13).

HLA-B27 klinikte hastalıkla ilgili hücre markırıdır. HLA-B27 antijeni lenfositler üzerinde monoklonal antikoru kullanılarak direkt olarak akım sitometride belirlenebilir. 107 örnekte bu çalışmayı yapmışlar. Akım sitometri metoduyla elde edilen sonuçların standart lenfositotoksisite testiyle tam uyuştüğünü göstermişlerdir (15).

Bu çalışmamızda Akım sitometri sonuçların en iyi şekilde karşılaştırabildiği uygun metot da üç farklı anti-B27 antikoru kullanmışlardır. (HLA-ABC-m3, GS145. 2, ve FD705). 400 den fazla örnek test etmişlerdir. Sonuç olarak üç farklı anti- B27 monoklonal antikoru kullanılarak yapılan HLA-B27 antijeni belirlenmesinde akım sitometri ile kesin güvenilir sonuçların elde edildiğini belirlemişlerdir(12).

50 klinik laboratuvar da HLA-B27 akım sitometrik olarak 1995' den beri çalışılmakta olup neticelerini açıklamışlardır. Sonuçlar göstermiştir ki, HLA-B27 monoklonal antikoru kross reaktif olarak majör problem oluşturmaktadır. HLA-B antijenlerinin serolojik kross reaktif antijenleri (HLA-B7,B12, B13, B16, B17, B22, B37, B40,B41 , B42,B47 ve B48) dir. B27 ile kross reaksiyon vermeyenler (B5, B8, B14, B15, B21 ve B35) diye belirtmişlerdir (20).

HLA-B27 tespit edilmesi A.S tanısında yardımcı olur. Klasik teknoloji mikrolenfositosite pahalı ve hatalı sonuçlar vermektedir. İki yeni metot ile 304 örnekte çalışmışlardır. Akım sitometri ve SSP-PCR. Akım sitometri de 3 monoklonal kullanılmışlardır. Cut-of değeri HLA-B27(+), HLA-B27(-) örneklere göre ROC eğrisini tespit etmişlerdir. Akım sitometriyi deneyimleriyle ekonomik ve güvenilir bir yöntem olarak bulmuşlardır (5).

HLA-B27 ile A.S teşhisi arasında güçlü bir beraberlik vardır. Anti HLA-B7 / HLA-B27 bütün kan örneklerinde akım sitometri yöntemiyle hızlı bir şekilde saptanabilir. 300 örnekten elde edilen sonuçlar TERASAKİ mikrolimfositotoxisite referans metodu ile karşılaştırılmıştır. Bu metot AS uyumlu yanlış negatif sonuçları gizlemektedir. HLA-B7 akım sitometride kullanılmasıyla oluşan iki monoklonal antikor kross reaksiyonları elimine ettiğini bulmuşlardır (33).

Avustralyadaki Royal Kollejinde İmmünolojik Programda 7 yıl süresince akım sitometri ile HLA-B27 neticeleri değerlendirmişlerdir. Burada hatalı olan negatif ve pozitif sonuçların düzeltilebilirlik dereceleri ispat etmişlerdir. Çok sayıda çalışmaya katılan laboratuar akım sitometri ile hatalı sonuçların düzeltildiğinde hem fikir olmuşlardır (22).

209 klinik örnek de HLA-B27 ekspresyonu iki renkli immünfloresan kullanılarak akım sitometride çalışmışlardır. 7 hatalı pozitif , 169 B27 negatif örnek bulunmuşlardır. Akım sitometrinin B27 için uygun yöntem olduğu sonucuna varmışlardır (21).

3-b) Real Time PCR ile HLA-B27 Saptanması :

MHC sınıf I lokusunda HLA-B27 antijeninin varlığının tespiti yeni bir yöntem olan Real Time PCR ile yapılabilir. Çalışma materyali olarak DNA kullanılmaktadır.

HLA-B27 antijeni saptanmasında Real Time PCR teknolojisi rutinde kullanılabilinecek hızlı yeni bir teknolojidir (31). Burada SYBR Green I boyası ile amplifikasyona bağlı olarak oluşan artışla floresans yoğunluğu ölçülür. Tm noktasına göre HLA-B27 pozitif ve negatif sonuçlar belirlenir. Bu yöntemle HLA-B27 saptanmasını araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

3-c) Konvansiyonel SSP-PCR ile HLA-B27 saptanması:

Konvansiyonel SSP- PCR'da HLA-B alleleri tespit edilir. Çalışma materyali olarak DNA kullanılır. Belirlenen allellerde HLA-B27 varsa birey HLA-B27 pozitifdir. Allellerde HLA-B27 yoksa birey HLA-B27 negatiftir. Güvenilir bir yöntemdir.

İki yıl süresince HLA-B27 tipleme için Konvansiyonel PCR-SSP yöntemini kullanmışlardır. Bu süre içerisinde romatolojik rahatsızlıklardan dolayı müracaat eden 1062 hastanın 309 'unda HLA-B27 pozitif bulmuşlardır. SSP-PCR yöntemi rezülasyonu güçlü olup güvenilir yöntemdir diye belirtmişlerdir (26).

4-) HLA-B27 SAPTAMA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI:

4-1) Akım Sitometri ile Real Time PCR Yönteminin Karşılaştırılması:

150 örnek (41 HLA-B27 pozitif ve 109 HLA-B27 negatif) akım sitometri ve yeni yöntem olan Real Time PCR ile çalışmışlardır. Bu tek tüp Real Time PCR metodunu örnek sayısı yüksek olan laboratuvarlarda güvenilir olarak tavsiye etmişlerdir (29).

4-2) Akım Sitometri ile Konvansiyonel SSP-PCR Yönteminin Karşılaştırılması :

HLA-B27 allelleri Caucasian popülasyonunun % 9 ' unda saptanmıştır ve AS ile güçlü bir uyum sağlar. Akım sitometride elde edilen sonuçların % 3' ünde belirsiz ürün oluşmuştur. Bunun sebebi antikor kross reaksiyonu olmasıdır. 5 yıl süresince 2000' den fazla örnek de net sonuç almışlardır. Oluşan karışık sonuçlar ise gerekli PCR jel elektroforezi ve spesifik alel hibridizasyonu analizi yaparak doğrulamışlardır (23).

4-3) Real-Time PCR ile Konvansiyonel SSP-PCR Yönteminin karşılaştırılması:

Her iki yöntemde de HLA-B27 antijeninin tespiti DNA örneğinden çalışılmaktadır. Real Time PCR' da bireyin HLA-B27 antijeninin varlığı belli olur. Konvansiyonel PCR yönteminde ise ilaveten HLA-B lokusunun allelleri belirlenir. Belirlenen bu allellerde HLA-B27 varsa birey HLA-B27 pozitif denir. Real Time PCR' da kapalı sistemde çalışıldığından kontaminasyon riski azdır.

YÖNTEM ve GEREÇLER

Bu çalışma Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Moleküler Hematoloji ve (PCR) Doku Tiplendirme Laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmaya 60 olgu alınmıştır. Bu olgulardan 35' i Erkek, 25' i Bayandır. HLA Doku Grubu (PCR) laboratuvarında ki SSP-PCR yöntemi ile rutin doku grubu bakılmasında HLA-B27 (+) bulunan 33 ve HLA-B27(-) bulunan 27 olgunun HLA-B27 pozitifliğine Akım sitometri ve Real Time PCR metotlarıyla da bakıldı.

Aşağıda Akım sitometri, Real Time PCR ve Konvansiyonel SSP-PCR ile HLA-B27 antijeninin saptanması ayrıntılı şekilde anlatılmıştır.

1-) AKIM SİTOMETRİ İLE HLA-B27 BAKILMASI:

Bu çalışma için HLA-B27 antijeni bakılacak bireylerden sabah açken K3-EDTA'lı tüpe kan örnekleri alındı. Akım sitometri olarak Facs Calibur (B.D) cihazı ve antikor olarakda Coulter immunotech HLA-B27 FITC / HLA-B7 PE iki renkli antikorlar kullanıldı.

Denevin Yapılışı:

1. Falkon tüplerine HLA-B27 antijeni çalışılacak bireyin ismi yazıldı.
2. Tüpün dibine 10 µl double antikordan pipetle dikkatlice konuldu.
3. Antikorum üzerine 50 µl kan örneği konuldu.
4. Tüp vortekslenerek 20 dakika karanlık da inkübasyona alındı.

5. Bu sürenin sonunda üzerine 2 cc lyses ilave edilerek karışım vortexlendi.
6. Lyses ile 10 dakika daha karanlıkta inkübe edildi.
7. Tüpler 5 dakika 1800 rpm de santrifüj edildi.
8. Süpernatant dikkatlice döküldü. Pelletin üzerine 2 cc PBS konularak vortexlendi.
9. Tüpler tekrar 5 dakika 1800 rpm de santrifüj edildi.
10. Süpernatant tekrar dökülerek PBS ile yıkama işlemi tekrarlandı.
11. 2. yıkamadan sonra pellet üzerine 250 µl PBS ilave edilerek, pellet süspanse edildi.
12. Numune Cell Quest programında okutularak analiz edildi.

2-) REAL TIME PCR İLE HLA-B27 BAKILMASI

Bunun için önce K3-EDTA'lı tüpe alınan kan örneğinden aşağıda anlatıldığı şekilde DNA elde edildi.

2-a) Magnetik Boncuklarla Büyük Hacim DNA İzolasyonu:

Roche Firmasının MagNA-Pure cihazında Büyük Hacim DNA İzalasyon kiti kullanıldı.

Testin Çalışılması:

1. Cihazın içi çamaşır suyu ile silindi.
2. Önce cihaz sonra bilgisayar açıldı.
3. Örnekler yeni oluşturulan sample file sayfasına kayıt edildi.
4. Çalışma yöntemi olarak büyük hacim seçildi.
5. Kullanılan kan hacimi 500 µl , final hacimi 200 µl olarak belirlendi.
6. Çalışılacak materyal sayısına göre bilgisayarın belirlediği kit içeriklikleri ilgili yerlere dağıtıldı.

7. Kan örnekleri pipetlendi. Enson olarak manyetik boncuklar hızlı olarak vortexlenerek ilgili kuvvete konuldu.
8. Pipet uçları, örnek kapları cihaza yerleştirildi ve program başlatıldı..
9. Lyses/ binding buffer kan hücrelerini lize ederek DNA'yı açığa çıkardı. Proteinler denatüre oldu.
10. Protein K eklenmesi sonucu hücresel proteinlerin sindirimi başladı.
11. Lyses/ Binding bufferın yüksek iyonik gücü ile manyetik partiküllerin silis yüzeyine DNA yapıştı.
12. Hb gibi PCR inhibitörleri ve hücre membranındaki protein gibi maddeler Wash Buffer I ile uzaklaştırıldı.
13. Tuz konsantrasyonunun düşürülmesi hücresel debrilerin uzaklaştırılması Wash Buffer II ile oldu.
14. Yüksek sıcaklık da pürifiye DNA elde edildi. (200µl)

2-b) Real Time Yöntemiyle HLA-B27 Çalışması :

Bu çalışmamızda Roche Firmasının (LCL) Real Time PCR cihazı ve Metis Firmasının HLA-B27 (3. ekson, 135 bç) kiti kullanıldı.

Testin Çalışması :

1. Önce cihaz sonra bilgisayar açıldı.
2. Çalışılacak HLA-B27 prosedürü ekrandan seçildi.
3. Çalışılacak hastalar sırasıyla kayıt edildi. Son olarak pozitif kontrol yazıldı.
4. Kapiller tüpler buz blok içerisine yerleştirildi.
5. Kit oda ısısına getirilerek örneklerin çözünmesi beklenildi. Çözünen örnekler kısa süre ve düşük devirde santrifüj edildi.
6. d H2O test başına 3.8 µl, Mg CI 1.2 µl, HLAB27 LC Primer mix 1.0 µl, HLA-B27 internal kontrol, LC Fast Start DNA Master mix SYBR Green

I 1.0 µl olarak hesaplandı, hazırlanan karışımdan kapiller tüplere 7 µl olarak dağıtıldı.

7. En son 3 µl DNA eklendi. Pozitif kontrole Kit deki pozitif kontrol numunesinden konuldu.
8. Kapillerin ağzı sıkıca kapatıldı. 3000-5000 x rpm'de 10 sn santrifüj edildi.
9. Kapiller dikkatlice cihaza yerleştirilerek cihaz programı başlatıldı.

Denev Protokülü :

1. Denatürasyon ; (1 Cycles , 1 segment , 10 dakika)
2. Amplifikasyon ;(45 cycles ve 4 segment : 1. segment 10 saniye 95 °C , 2. segment 8 saniye 57 °C , 3. segment 15 saniye 72 °C , 4. segment sıfır saniye ısı 80 °C dir).
3. Melting Curve analiz; (1 cycles ve 3 segment . 1. segment 0 saniye 95 °C, 2. segment 15 saniye 75 °C ve son segment 0 saniye 95°C).
4. Cooling ; (1 cycles ve 1 segment . 30 saniye 40 °C) .

Çalışma bittiğinde flouresans kanalı 1/1 (F1/1) olarak analiz yapıldı. B27 spesifik Tm noktası 90.3 °C +/- 0.2 °C dir.

Çalışma analizinde önce pozitif kontrolün çalışması kontrol edildi. Manuel olarak oluşan pikin ısısı kontrol edildi. Sırası ile çalışılan örnekler oluşan bu pikle karşılaştırılarak kontrol edildi. Pozitif kontrolle uyumlu örnekler pozitif olarak değerlendirildi.(İnternal kontrol piki ile uyumlu örnekler negatiftir.)

3-KONVANSİYONEL SSP-PCR YÖNTEMİYLE HLA-B27 ÇALIŞILMASI:

Bu çalışmada Techne Genius PCR cihazı, Trans Farma Firmasının Olerup SSP-HLA –A-B-DR Combi Tray Kiti kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

1. Elde edilen DNA, master mix, Taq Polimeraz , distile su ve HLA-B primeri buz blok üzerine getirildi.
2. HLA-B lokusu konvansiyonel PCR' da 48 kuyudan oluşur. Her kuyu için 2 µl DNA, 3 µl Master mix (PCR maxter mix'inde d NTP, mMKCl, MgCl₂, Tris-HCl jelatin, gliserol ve kresol red bulunur. Bu karışım hazır olarak gelir. -20 °C de saklanır.) 5 µl distile su ve Taq 0.4 unit kullanılır. HLA-B için 106 µl DNA+ 159 µl master mix+ 265µl distile su+ 4.2µl Taq alınarak ependorf tüpünde karıştırıldı.(48. kuyu kontrol kuyusudur.)
3. Hazırlanan bu karışım vortexlenmiş ve kuyulara 10 µl pipetlendi.
4. Primerlerin ağzı dikkatlice kapatıldı. Termal cycler'in içine yerleştirildi.
5. Termal Cyclerde daha önceden girilmiş olan program seçilerek program başlatıldı.

Termal Cycler Programı :

1. Denatürasyon;(1 cycles 94 ° C 2 dakika).
2. Denatürasyon, bağlanma ve uzama ; (10 cycles dan oluşur. Denatürasyon 10 saniye 94 ° C . Bağlanma ve uzama aşaması 60 saniye 65 ° C).
3. 20 cycles .(Denatürasyon 10 saniye 94 ° C , bağlanma 50 saniye 61 ° C , uzama 30 saniye 72 ° C)

Program bittiğinde primer plağı Termal cycler dan alındı. Daha önceden hazırlanan agaroz jele dikkatlice ekim yapıldı.

Agaroz Jel'in Hazırlanması:

2 gram agaroz, 133 gram % 5' lik TBE solüsyonu içerisinde birkaç taşım mikrodalga da kaynatıldı. Isı 60 ° C ye indiğinde içerisinde 1 damla etidium bromid ilave edildi. İyice karıştırılarak içerisinde taraklar yerleştirilen tanka yavaşça döküldü. Jel donup katılaştıncaya dikkatlice alınarak elektroforez tankına yerleştirildi. Tankı içinde % 5' lik TBE solüsyonu vardır. Oluşan kuyucuklara Termal cycler dan çıkan ürün dikkatlice pipetlendi. Ekim işlemi bitince elektroforez tankının kapağı kapatıldı. Yaklaşık 20 dakika 100 volt 60 amper akım uygulandı. Sonra jel tank dan alınarak UV (ultraviole) tablasına getirildi. UV tablasında yürüyen kuyular tesbit edildi. Bu arada jelin fotoğrafı çekildi. Tespit edilen kuyular bilgisayarda yüklü olan programdan primerin lot numarasına pozitif kuyular girildi. Bilgisayar hazır programdan HLA-B lokusunun alellerini belirlendi. Elde ki kitap dan bu sonuçlar kontrol edildi

Kullanılan İstatistik Yöntem

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçların sensitivitesi, spesifitesi, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri aşağıdaki anlatıldığı şekilde hesaplanarak Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İstatistik Ana Bilim Dalı'nda karşılaştırılmaları yapılmıştır. Sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerlerin hesaplanma şekli tablo 3' de gösterilmiştir.

		Gerçek Durum (Referans)		
		H+	H-	Toplam
Medikal Test Sonucu	H+	Gerçek Pozitif (GP =a)	Yalancı Pozitif (YP=b)	T(T+)
	H-	Yalancı Negatif (YN=c)	Gerçek Negatif (GN=d)	T (T-)
Toplam		G (H+)=a+c	G(H-)=b+d	N

Tablo 3 : Sensivite, Spesifite Pozitif Prediktif ve Negatif Prediktif Hesaplama Tablosu

Sensitivite (Duyarlılık) Oranı : Gerçekten hasta olan (G (H+)) bireylerinin test tarafından hangi oranda saptanabildiğini belirten bir olasılıktır. Testin gerçek hastaları ortaya çıkarmakta ne kadar duyarlı olduğunu belirtir. Hastalık etkeni var iken bu testin, bu etkeni kesin olarak tanıyabilme yeteneğini ölçer (27). Şu formülle hesaplanır:

$$\text{Sensivite} = P(D) = a / (a+c) = GP / (GP + YN)$$

Spesifite (Özgüllük) Oranı : Bir testin gerçekten hasta olmayanları ayırabilme yeteneğini belirten orandır. Bir kişi değerlendirilen hastalığa yakalanmamış ise bunu kesin olarak ayırabilme yeteneğini gösterir (27). Şu formülle hesaplanır.

$$\text{Spesifite} = P(\bar{D}) = d / (b+d) = GN / (YP + GN)$$

Pozitif prediktif (Pozitif Tanımlama Oranı) : Bir testin gerçekten hasta diye nitelediği kişilerin gerçekten ne kadarının hasta olduklarını gösteren orandır (27). Şu formülle hesaplanır.

$$\text{Pozitif Prediktif} = P(PP) = a / (a+b) = GP / (GP + YP)$$

Negatif prediktif (Negatif Belirleyicilik Oranı) : Bir testin gerçekten hasta olmadığını belirttiği kişilerin gerçekte hangi oranda sağlam olduklarını gösteren bir orandır (27). Şu formülle hesaplanır.

$$\text{Negatif Prediktif} = P(NB) = d / (c+d) = GN / (YN + GN)$$

BULGULAR

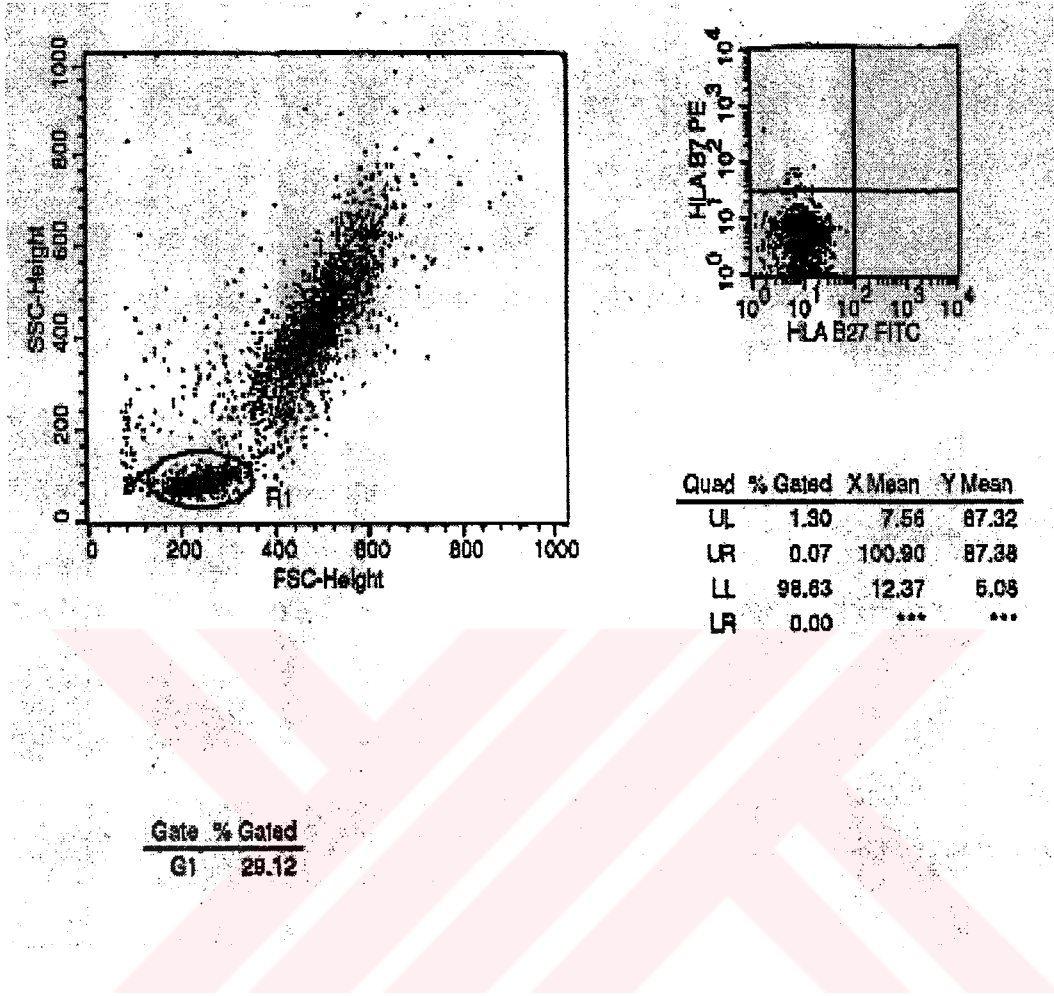
Sıra No	Adı Soyadı	Cinsiyet	Yas	Akım Cytometri	Real Time PCR	Konvansiyonel SSP- PCR
1	F.G	F	28	pozitif	pozitif	B*2702,B*35
2	M.G	M	34	pozitif	pozitif	B*2702,B*35
3	A.G	M	32	pozitif	pozitif	B*2702,B*35
4	K.S	F	30	pozitif	pozitif	B*2702,B*35
5	E.K	F	23	pozitif	pozitif	B*27 ,B*55
6	F.Ö	F	40	pozitif	Negatif	B*27 , B*35
7	F.U	M	23	pozitif	pozitif	B*27 ,B044
8	H.U	M	12	pozitif	pozitif	B*27 ,B*44
9	İ.U	M	37	pozitif	pozitif	B*27 ,B*44
10	Ü.O	F	38	pozitif	pozitif	B*27 ,B*35
11	N.G	M	37	pozitif	Negatif	B*27 ,B*40
12	E.T	F	14	pozitif	pozitif	B*2702,B*44
13	S.E	F	14	pozitif	pozitif	B*27 ,B*35
14	H.K	F	24	pozitif	pozitif	B*27 ,B*35
15	İ.B	M	23	pozitif	pozitif	B*27 ,B*35
16	Y.Y	M	40	pozitif	pozitif	B*27 ,B*51
17	H.Ö	F	73	pozitif	pozitif	B*27 ,B*54
18	Z.O	F	29	pozitif	pozitif	B*27 ,B*35
19	R.B	M	58	pozitif	pozitif	B*27 ,B*39
20	B.Y	M	60	pozitif	Negatif	B*27 ,B*18
21	M.Ö	M	28	pozitif	pozitif	B*27 ,B*35
22	F.T	F	64	pozitif	pozitif	B*2702,B*13
23	A.K	M	50	pozitif	pozitif	B*27 ,B*35
24	D.İ	F	25	pozitif	pozitif	B*27 ,B*51
25	H.İ	M	23	pozitif	pozitif	B*27 ,B*18
26	Ö.İ	M	25	pozitif	pozitif	B*27 ,B*35
27	A.Ö	M	18	pozitif	pozitif	B*27 ,B*41
28	O.Ö	M	46	pozitif	pozitif	B*27 ,B*50
29	E.Ö	M	23	pozitif	pozitif	B*27 ,B*50

30	H.Ö	M	23	pozitif	Negatif	B027 ,B*52
31	R.B	M	56	pozitif	pozitif	B*2702,B*14
32	H.B	M	54	pozitif	pozitif	B*2702,B*14
33	M.B	M	52	pozitif	pozitif	B*2702,B*14
34	V.H	F	31	Negatif	Negatif	B*08 ,B*44
35	M.K	M	11	pozitif	Negatif	B*51 ,B*55
36	A.Ö	M	41	Negatif	Negatif	B*35 ,B*50
37	R.K	M	27	Negatif	Negatif	B*08 ,B*51
38	G.G	F	36	Negatif	Negatif	B*13 ,B*38
39	A.Ç	M	30	Negatif	Negatif	B*40 ,B*51
40	F.S	F	20	Negatif	Negatif	B*40 ,B049
41	Z.K	F	43	Pozitif	Negatif	B*38 ,B*50
42	H.K	M	52	Negatif	Negatif	B*44 ,B*56
43	M.D	M	45	Negatif	Negatif	B*14 ,B*35
44	E.Ö	M	52	Negatif	Negatif	B*37 ,B*58
45	N.Ö	F	42	Negatif	Negatif	B*41 ,B*50
46	Ü.Ö	M	23	Negatif	Negatif	B*50 ,B*50
47	H.M	M	43	pozitif	Negatif	B*51 ,B*55
48	B.Ş	F	38	Negatif	Negatif	B*35 ,B*51
49	M.T	F	50	Negatif	Negatif	B*07 ,B*38
50	Ü.Y	F	46	Negatif	Negatif	B*07 ,B*51
51	G.S	F	34	Negatif	Negatif	B*07 ,B*51
52	Ö.A	M	54	Negatif	Negatif	B*07 ,B*15
53	H.A	F	51	Negatif	Negatif	B*07 ,B*41
54	H.Ö	M	48	Negatif	Negatif	B*07 ,B*54
55	G.D	F	17	Negatif	Negatif	B*07 ,B*07
56	A.B	M	48	Negatif	Negatif	B*07 ,B*55
57	N.D	F	32	Negatif	Negatif	B*07 ,B*54
58	İ.S	M	61	Negatif	Negatif	B*07 ,B*35
59	T.T	M	31	Negatif	Negatif	B*07 ,B*08
60	Ö.Y	F	24	Negatif	Negatif	B*07 ,B*08

Tablo 4: Akım Sitometri, Real Time PCR ve Konvansiyonel SSP-PCR Olgularının Sonuçları.

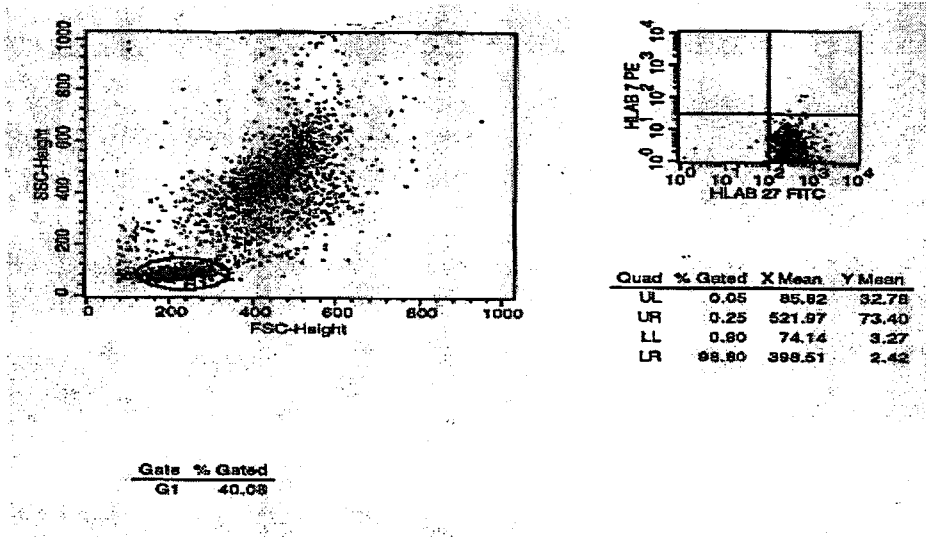
Çalışmamızda Konvansiyonel SSP- PCR' la HLA-B27 pozitif bulunan 33 olgu ile HLA-B27 negatif olarak belirlenen 27 olgunun akım sitometri ve Real Time PCR ile kıyaslaması yapılmıştır. Olguların toplu sonuçları Tablo 4' de gösterilmiştir.

Bu çalışmada ki olguların 35'i erkek, 25'i bayandır. Konvansiyonel SSP-PCR yönteminde HLA-B27 pozitif olan olguların akım sitometri ile değerlendirmesinde; 33 HLA-B27 pozitif olgunun tamamı pozitif olarak tespit edilmiştir. Konvansiyonel PCR' da negatif bulunan 27 olgunun ise; 3' ü şüpheli pozitif, olarak değerlendirilmiştir. HLA-B27(+) olguların HLA-B27(+)’ liğinin ortalama floresans yoğunluğu $482,30 \pm 166,76$ iken HLA-B7(+) olan olguların HLA-B27(+)’ liğinin ortalama floresans yoğunluğu $243,49 \pm 47,24$ HLA-B27 negatif olgulardaki HLA-B27’ nin ortalama floresans yoğunluğu $143,1 \pm 7,32$ dir. HLA-B27’ si şüpheli pozitif olan üç olgunun ortalama floresans yoğunluğu $224,54 \pm 5,81$ saptanmıştır.

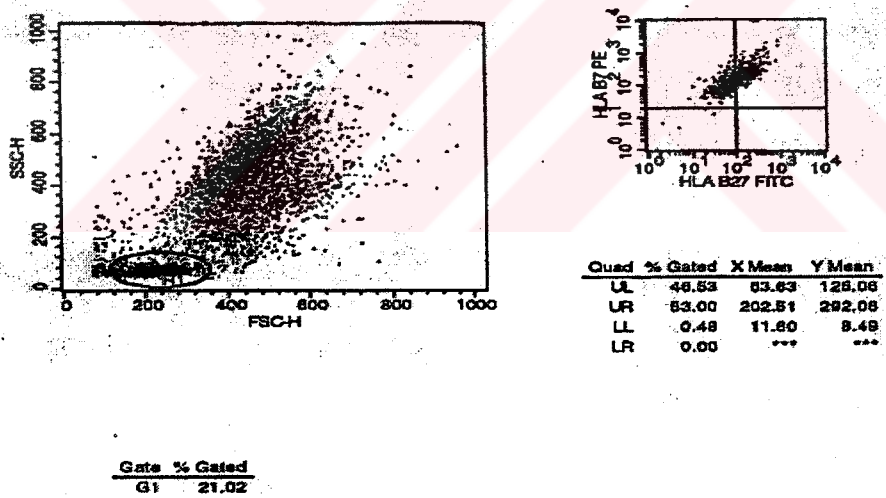


Şekil 3: Akım Sitometride Negatif Olgudaki Hücre Dağılımı.

Akım sitometri de çalışılan olgularda negatif olan olguların lenfosit dağılımı yukarıdaki gibi elde edildi. Konvansiyonel SSP- PCR' da HLA-B27 negatif bulunan 27 olgudan 24 tanesinin dağılımı yukarıdaki gibi analiz edildi.

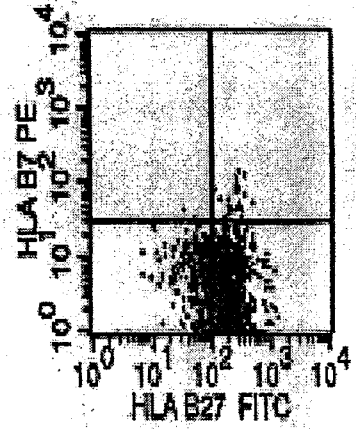
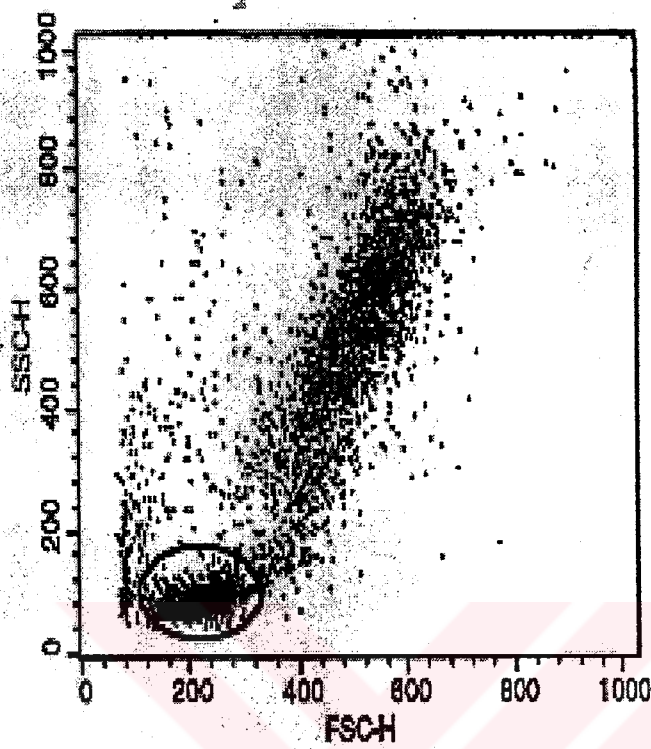


Şekil 4: Akım Sitometride HLA-B27 Pozitif Olgunun Hücre Dağılımı.



Şekil 5: Akım Sitometride HLA-B7 Alleli Olan Olguların Hücre Dağılımı.

Konvansiyonel SSP-PCR da HLA-B7 alleli bulunan olguların akım sitometride ki hücre dağılımları yukarıdaki gibi görüntülendi.

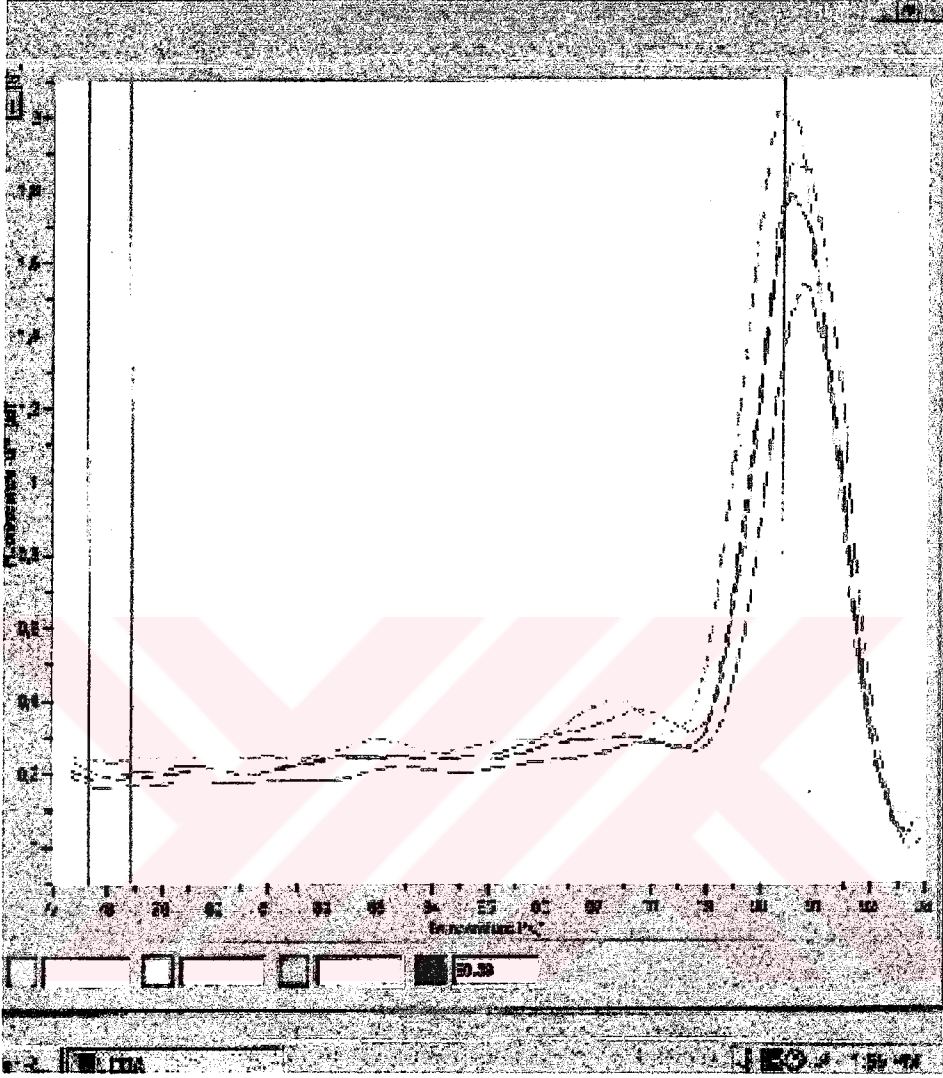


Quad	% Gated	X Mean	Y Mean
UL	0.13	44.10	38.18
UR	1.69	263.79	61.97
LL	22.89	64.75	6.70
LR	75.40	224.65	5.18

Gate	% Gated
G1	31.54

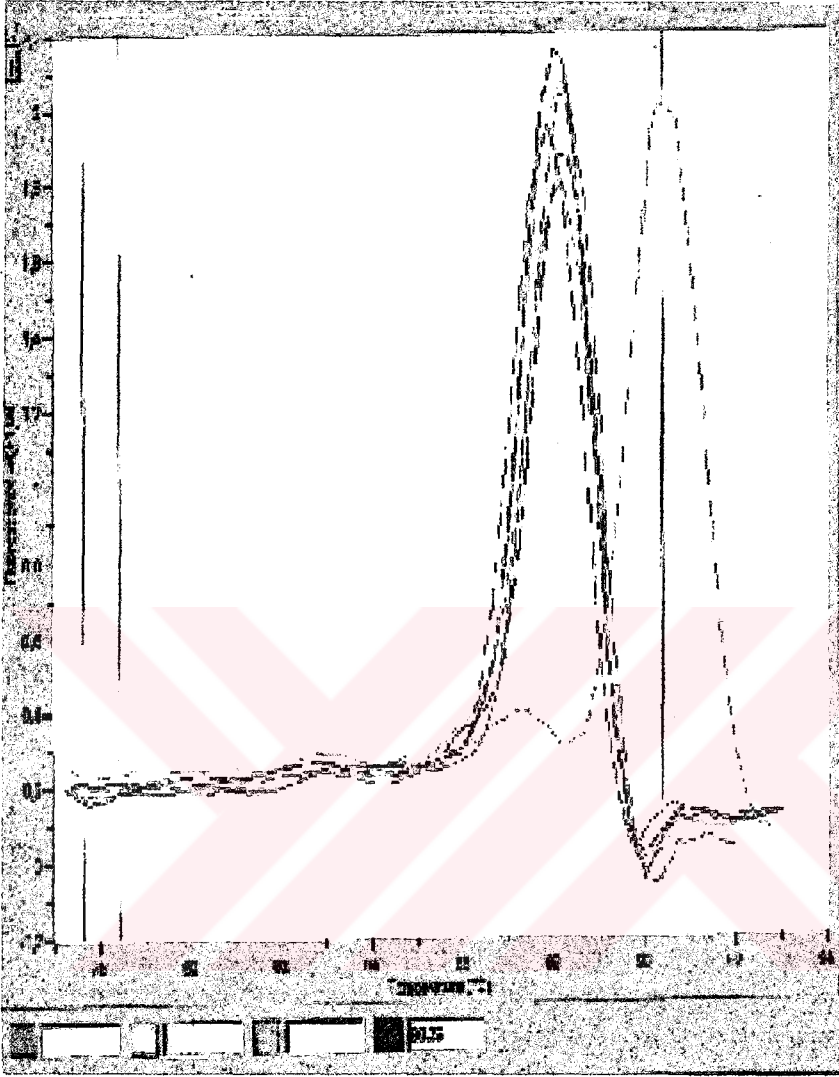
Şekil 6: Akım Sitometride HLA-B27 Analizinde ki Şüpheli Dağılım.

Konvansiyonel PCR' da HLA-B27 antijeni negatif bulunan olgulardan 3 olgunun Akım sitometrideki lenfosit dağılımı yukarıdaki gibi saptandı.



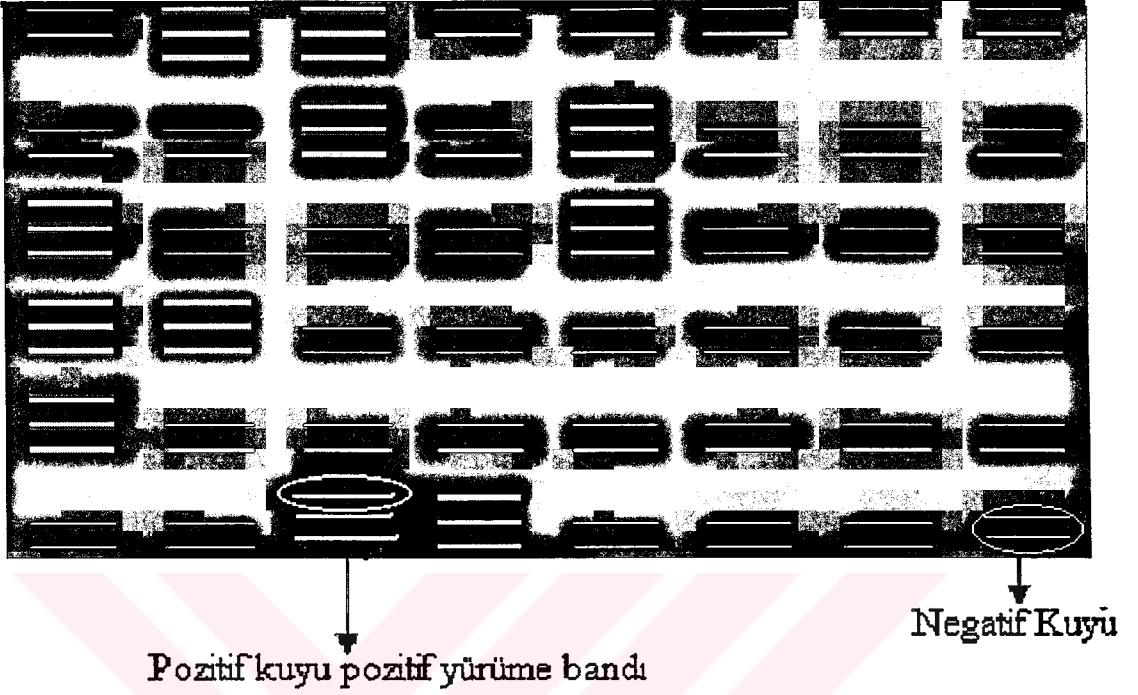
Şekil 7 : Real Time PCR da HLA-B 27 Pozitif olguların analizi.

Real Time PCR ile çalışılan olgulardan HLA-B27 pozitif olanların ve pozitif kontrolün oluşturduğu pik yukarıdaki gibi bulundu.



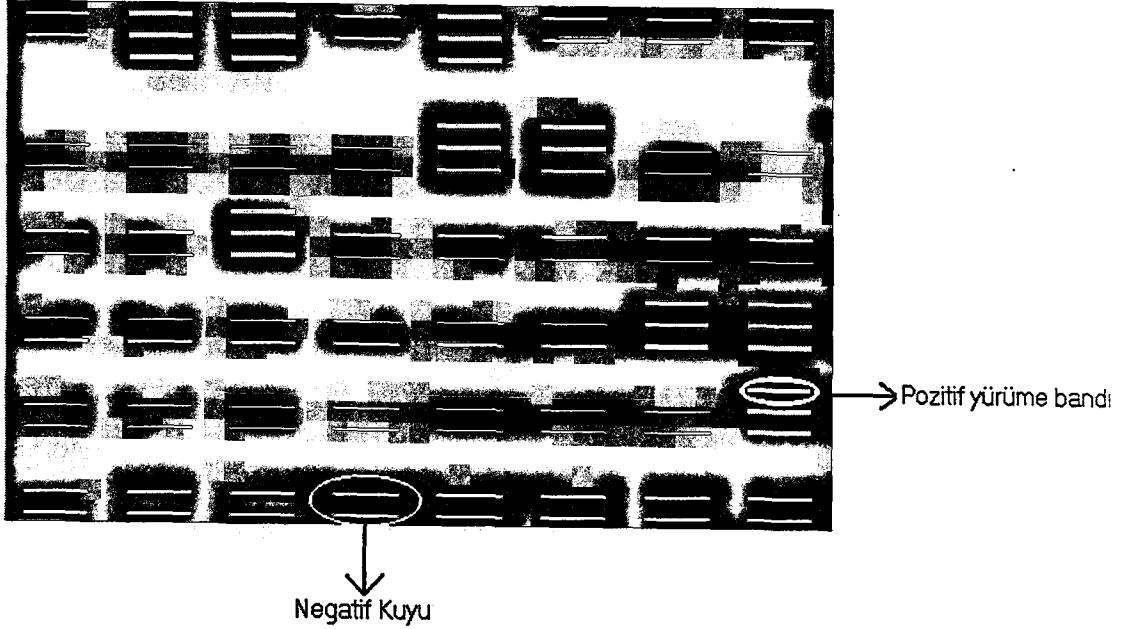
Şekil 8: Real Time PCR da Pozitif Kontrol ile Negatif olguların analizi.

Real time PCR da HLA-B27 çalışılan olgulardan negatif olanların oluşturduğu pik yukarıdaki gibi bulundu.



Şekil 9 : Konvansiyonel SSP-PCR' da HLA-B27 Pozitif Olgunun Jeli .

jel 25. kuyudan başlamaktadır. Pozitif kuyular: 29, 30, 40, 47, 48, 52, 56, 60, 62,70 ve 71 nolu kuyulardır.



HLA-B B*35, B*51
(authorised by O. ogü, 07.05.2004)

summarised typing interpretation: B*35 -B*51 (tolerance 0)

Tested SSO/SSP Kits:

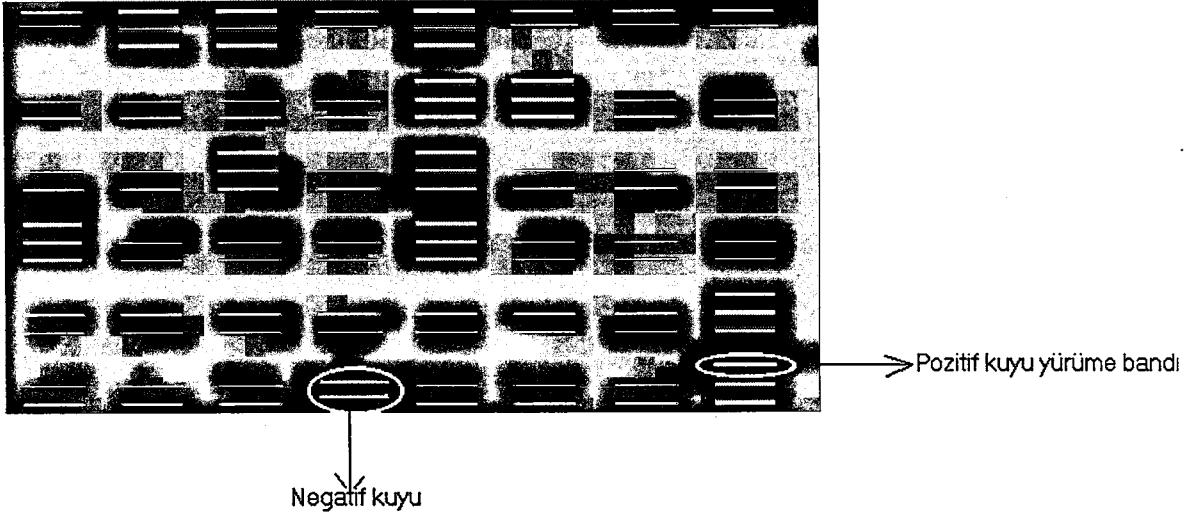
HLA-B low resolution/K73

1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	6 <input type="checkbox"/>	7 <input type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>
9 <input checked="" type="checkbox"/>	10 <input type="checkbox"/>	11 <input type="checkbox"/>	12 <input type="checkbox"/>	13 <input type="checkbox"/>	14 <input type="checkbox"/>	15 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>
17 <input checked="" type="checkbox"/>	18 <input checked="" type="checkbox"/>	19 <input type="checkbox"/>	20 <input type="checkbox"/>	21 <input type="checkbox"/>	22 <input type="checkbox"/>	23 <input type="checkbox"/>	24 <input type="checkbox"/>
25 <input type="checkbox"/>	26 <input type="checkbox"/>	27 <input type="checkbox"/>	28 <input type="checkbox"/>	29 <input type="checkbox"/>	30 <input checked="" type="checkbox"/>	31 <input type="checkbox"/>	32 <input type="checkbox"/>
33 <input type="checkbox"/>	34 <input type="checkbox"/>	35 <input checked="" type="checkbox"/>	36 <input checked="" type="checkbox"/>	37 <input type="checkbox"/>	38 <input type="checkbox"/>	39 <input type="checkbox"/>	40 <input type="checkbox"/>
41 <input type="checkbox"/>	42 <input type="checkbox"/>	43 <input type="checkbox"/>	44 <input checked="" type="checkbox"/>	45 <input type="checkbox"/>	46 <input checked="" type="checkbox"/>	47 <input checked="" type="checkbox"/>	

entered: 07.05.20
O. ogü

modified: 07.05.20
O. ogü

Şekil 10 : Konvansiyonel SSP- PCR' da HLA-B27 Negatif Olgunun Jeli ve Bilgisayar Analizi.



HLA-B		B*07, B*51	
(authorised by O. oğü, 23.01.2004)			
summarised typing interpretation: B*07		- B*51	(tolerance 0)
Tested SSO/SSP Kits:			
HLA-B low resolution/K73			
1 <input checked="" type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
5 <input type="checkbox"/>	6 <input type="checkbox"/>	7 <input type="checkbox"/>	8 <input type="checkbox"/>
9 <input checked="" type="checkbox"/>	10 <input type="checkbox"/>	11 <input type="checkbox"/>	12 <input type="checkbox"/>
13 <input type="checkbox"/>	14 <input type="checkbox"/>	15 <input type="checkbox"/>	16 <input type="checkbox"/>
17 <input type="checkbox"/>	18 <input type="checkbox"/>	19 <input type="checkbox"/>	20 <input checked="" type="checkbox"/>
21 <input type="checkbox"/>	22 <input type="checkbox"/>	23 <input type="checkbox"/>	24 <input checked="" type="checkbox"/>
25 <input type="checkbox"/>	26 <input type="checkbox"/>	27 <input type="checkbox"/>	28 <input checked="" type="checkbox"/>
29 <input type="checkbox"/>	30 <input checked="" type="checkbox"/>	31 <input type="checkbox"/>	32 <input type="checkbox"/>
33 <input type="checkbox"/>	34 <input type="checkbox"/>	35 <input checked="" type="checkbox"/>	36 <input checked="" type="checkbox"/>
37 <input type="checkbox"/>	38 <input type="checkbox"/>	39 <input type="checkbox"/>	40 <input type="checkbox"/>
41 <input type="checkbox"/>	42 <input type="checkbox"/>	43 <input type="checkbox"/>	44 <input checked="" type="checkbox"/>
45 <input type="checkbox"/>	46 <input checked="" type="checkbox"/>	47 <input checked="" type="checkbox"/>	
entered: 23.01.20		O. oğü	
modified: 23.01.20		O. oğü	

Şekil 11: Konvansiyonel SSP- PCR' da HLA-B7 Bulunan Olgunun Jeli ve Bilgisayar Analizi

Real Time PCR ile yapılan çalışmalarda Konvansiyonel SSP-PCR' da HLA-B27(+) olarak bulunan 33 olgudan 4 tanesi negatif olarak saptandı. Konvansiyonel SSP-PCR' da negatif bulunan olguların tamamını Real Time PCR da negatif olarak tespit edildi. Konvansiyonel SSP-PCR' da HLA-B27 negatif olarak bulduğumuz olguların hiç biri Real Time PCR' da pozitif olarak saptanmadı.

	Konvansiyonel SSP-PCR		
	(+)	(-)	Toplam
Akım sitometri (+)	33	3	36
Akım sitometri (-)	0	24	24
Toplam	33	27	60

Neg. Pred.=24/24=% 100
Poz.Pred.=33/36=%91
Sensitivite=33/33=% 100
Spesifite=24/27=%89

Tablo 5 : Akım Sitometri ile Konvansiyonel SSP-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması.

	Konvansiyonel SSP-PCR		
	(+)	(-)	Toplam
Real-Time PCR (+)	29	0	29
Real-Time PCR (-)	4	27	31
Toplam	33	27	60

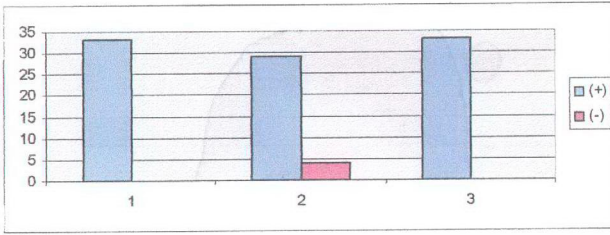
Neg. Pred.=27/31=% 88
Poz. Pred.=29/29=%100
Sensitivite=29/33=% 88
Spesifite=27/27=%100

Tablo 6 : Real Time PCR ile Konvansiyonel SSP-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması.

Gruplar	n	ort± B27 ekspresyonu	p
B27(+)	33	482.3±166.76	<0.001
Şüpheli B27(+)/B7(+)	12	243.49±47.24	
B27(+)	33	482.3±166.76	<0.001
B27(-)	27	143.1±17.94	
B7(+)/B27 Şüpheli(+)	12	243.49±47.24	<0.001
B7(-)/B27(-)	27	143.1±17.94	

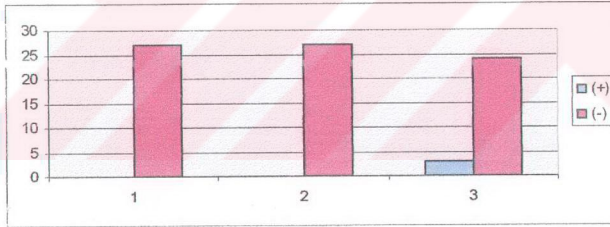
Tablo 7. Hücre Yüzeyindeki HLA-B27 Ekspresyonlarının (B27 Pozitif) , (B27 Şüpheli Pozitif / B7 Pozitif), (B27 Negatif / B7 Negatif) Hasta Gruplarında Karşılaştırılması.

HLA-B27 (+) 33 olgunun, HLA-B27 şüpheli pozitif ve HLA-B 7 (+) 12 olgunun hücre yüzeyindeki HLA-B27 ekspresyonunu karşılaştırıldığına P < 0.001 olup fark anlamlı bulunmuştur. HLA-B27 (+) 33 olgunun, HLA-B27(-) 27 olgunun hücre yüzeyindeki HLA-B27 ekspresyonu karşılaştırıldığına P < 0.001 olup fark anlamlı bulunmuştur. HLA-B7(+), B27 şüpheli (+) 12 olgunun HLA-B7(-)/ HLA-B27(-) olan 27 olgunun hücre yüzeyindeki HLA-B27 ekspresyonu karşılaştırıldığına P < 0.001 olup fark anlamlı bulunmuştur.



Şekil 12 : Konvansiyonel SSP-PCR' daki Pozitif Olguların Akım Sitometri ve Real Time PCR da Elde Edilen Sonuçların Grafiği.

1. Konvansiyonel SSP-PCR' daki pozitif olguların dağılımı.
2. Real Time PCR' da Konvansiyonel SSP- PCR' a göre pozitif/ negatif olguların dağılımı.
3. Akım sitometride Konvansiyonel SSP- PCR' a göre pozitif olguların dağılımı.



Şekil 13 : Konvansiyonel SSP- PCR' daki Negatif Olguların Akım Sitometri ve Real Time PCR da Elde Edilen Sonuçların Grafiği.

1. Konvansiyonel SSP-PCR' da negatif olguların dağılımı.
2. Real Time PCR' da Konvansiyonel SSP- PCR' a göre negatif olguların dağılımı.
3. Akım sitometride Konvansiyonel SSP- PCR' a göre pozitif/ negatif olguların dağılımı

TARTIŞMA

Çalışmamızda altın standart test olarak kabul edilen konvansiyonel SSP-PCR yöntemi ile 60 olguda elde ettiğimiz HLA-B27 sonuçlarını; akım sitometri ile elde edilen sonuçlar ve Real Time PCR ile elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştırdık. Pozitif ve negatif HLA-B27 test sonuçlarının sensitivite ve spesifitelerini, pozitif ve negatif prediktif değerlerini Akım sitometri ve Real Time PCR için hesapladık.

Konvansiyonel SSP-PCR yöntemi ile çalışılan 60 olgunun 33 tanesinde HLA-B27 pozitif, 27 tanesinde HLA-B27 negatif olarak saptandı.. Konvansiyonel SSP-PCR da pozitif olarak bulunan 33 olguda akım sitometri ile pozitif olarak bulundu. Konvansiyonel SSP-PCR da negatif bulunan 27 olgudan 3 olgu akım sitometride pozitif saptandı. Akım sitometrik olarak HLA-B27 bakmanın sensitivitesi $33/33=100\%$, spesifitesi $24/27=89\%$, pozitif prediktif değeri: $33/36=91\%$, negatif prediktif değeri: $24/24=100\%$ olarak saptandı. Yalancı negatiflik yok iken, yalancı pozitiflik 3 olguda (11%) bulundu. Lingenfelter ve arkadaşları yaptıkları 209 olgudaki çalışmada akım sitometrinin sensitivitesini 97.6% , spesifitesinide 95.9% saptamışlardır ve B7, B39, B37 ile kros reaksiyon bulmuşlardır (21). Ayrıca, Lingenfelter ve arkadaşları 169 HLA B27 negatif örneğin 7' sinde yalancı pozitiflik saptamışlardır (21). Ulrich G ise yazısında 300 olguda HLA-B7/HLA-B27 çift renkli analiz yaptıklarında akım sitometri ile yalancı negatiflik bulmadıklarını belirtmişlerdir ve bu çift renkli panelin kullanılmasını önermişlerdir (33).

Akım sitometride yalancı pozitiflik saptadığımız olguların Konvansiyonel SSP-PCR deki HLA-B allellere baktığımızda iki olgunun (B*51 , B*55) allellere sahip olduğunu belirlendi. Diğer olgunun ise (B*38, B*50) allelini taşıdığı belirlendi.Bu doku gruplarının akım sitometride monoklonal antikorlarla kross reaksiyon verdiği düşünüldü ve yalancı pozitifliğin bundan kaynaklandığını düşünüyoruz. Literatürde HLA-B7 nin en fazla kros reaksiyon verdiği belirtilmiştir ve biz bu nedenle iki renkli B7

ye karşıda monoklonal antikor içeren panel kullandık ve olguda B7 monoklonal antikorunu koymasaydık bundan kaynaklanabilecek ilave pozitiflik olacaktı. Anti HLA-B7 / HLA-B27 iki renkli antikor kombinasyonu ile kan örneklerinde akım sitometri yöntemiyle HLA-B27 pozitifliği araştırılmıştır. 300 örnekten elde edilen sonuçlar TERASAKİ mikrolenfositotoksiste referans metodu ile karşılaştırılmıştır. HLA-B7 ye karşı monoklonal antikor kullanılmasının akım sitometride oluşan kross reaksiyonların yalancı pozitif değerlendirmesini elimine ettiğini bulmuşlardır (30). Hoffman ve arkadaşlarında akım sitometri ile HLA-B27 bakarken iki farklı monoklonal antikor kullanmayı önermişlerdir ve HLA-B7 nin kros reaksiyon verdiğini açıkladılar (12). Bizim bulgularımız da akım sitometri ile HLA-B27 analizinde HLA-B7 ye karşı monoklonal antikorda içeren panel kullanmanın ülkemizde de gerekli olduğunu göstermiştir.

Olgularımızdaki HLA-B27' nin hücre yüzeyindeki pozitifliğinin yanısıra; pozitifliğin kuvvetini gösteren ortalama floresans yoğunluğunda analiz ettik. HLA-B27(+) olgulardaki ortalama floresans yoğunluğu $482,30 \pm 166,76$ olarak bulundu. HLA-B7 (+) olgulardaki ortalama floresans yoğunluğu $243,49 \pm 47,24$ bulundu. HLA-B27 (-) olguların ortalama floresans yoğunluğu $143,1 \pm 17,94$ bulundu. Şüpheli HLA-B27(+) olguların ise floresans yoğunluğu $224,54 \pm 5,81$ olarak bulundu. Bu bulgular bize gerçek HLA-B27(+)’ liğinde HLA-B27’ nin hücre yüzeyindeki ortalama floresans yoğunluğunun; HLA-B27 şüpheli pozitif olgulara göre belirgin yüksek olduğunu görülmektedir. Kross reaksiyondaki hücre yüzeyindeki HLA-B27 pozitifliğinin derecesi gerçek HLA-B27’ ye göre düşük olduğundan bu olgular kolaylıkla pozitiflik derecesine göre ayırtedilebilmektedir. Bu olgulardaki şüpheli pozitifliğin başka bir testle negatif olduğu kanıtlanması gerekmektedir. Bizim şüpheli olgularımızın tümünde Real Time PCR ve konvansiyel SSP-PCR’ da negatifdi ve uyum içerisindeydi. Vardığımız sonuç şüpheli pozitif olgularda hızlı ve doğru sonuç verdiği için Real Time PCR’ ın bu olgularda kullanılması gerekmektedir.

Toplumlardaki HLA-B antijenlerinin farklı olasılıkta olması nedeni ile her ülkedeki HLA-B27 antijen testinde kross reaksiyon verecek antikorların sıklığının farklı olacağıda beklenen bir durumdur. 50 klinik laboratuarda HLA-B27 akım sitometrik olarak 1995'den beri çalışılmakta olup elde ettikleri verileri yayınlamışlardır(20). Sonuçlar göstermiştir ki HLA-B27 monoklonal antikorlar kross reaktif olarak majör problem oluşturmaktadır. HLA-B antijenlerinin serolojik kross reaktif antijenleri (HLA-B7, B12, B13, B16, B17, B22, B37, B40, B41, B42, B47 ve B48) ve kross reaktif olmayan antijenler (B5, B8, B14, B15, B21 ve B35) dir. (20,25). Bizim çalışmamız az sayıda olmakla birlikte B*51 , B*55 antijenlerinde ülkemiz için kros reaksiyon veren antijenler olarak düşünülmesi gerektiğini göstermiştir. Bonnaud ve arkadaşları akım sitometri ile sorun olduğunda, doğru HLA-B27 fenotiplemesi için DNA tiplemesi ile gerektiğinde desteklenmesinin gerekli olduğunu açıklamışlardır(5). Konvansiyonel SSP-PCR ile pozitif olan daha çok sayıda olguda yapılacak akım sitometri HLA-B27 testi ile antijenlerin kros reaksiyon özelliğinin açıklığa kavuşturulacağını düşünüyoruz.

Konvansiyonel SSP-PCR da pozitif bulunan 33 olgunun Real Time PCR da 29 tanesi pozitif olarak bulunurken 4 olgu negatif olarak bulundu. Konvansiyonel SSP-PCR ile negatif bulunan 27 olgunun tamamı Real Time PCR ile negatif olarak bulundu . Real Time PCR ile HLA-B27 bakmanın sensitivitesi: $29/33= \% 88$, spesifitesi: $27/27= \%100$, pozitif prediktif değeri: $29/29= \%100$, negatif prediktif değeri: $29/33= \% 88$ olarak saptandı. Yalancı pozitiflik yok iken, yalancı negatiflik 4 olguda (%12) saptandı. HLA-B27 antijeni saptanmasında Real Time PCR teknolojisi rutinde kullanılabilinecek hızlı yeni bir teknolojidir (5). Burada SYBR Green I boyası ile amplifikasyona bağlı olarak oluşan artışla floresans yoğunluğu ölçülür. Tm noktasına göre HLA-B27 pozitif ve negatif sonuçlar belirlenir. Bu yöntemle HLA-B27 saptanmasını araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu teknolojinin avantajı kapalı sistem olmasıdır ve kontaminasyon riski minimaldir. Bu teknoloji Light Cyclers PCR (Roche Diagnostics) SYBR Green I boyası(DNA yı bağlar) nı kullanır. Bu metodun dezavantajının spesifik amplifikasyonlardan ayırt edilemeyen nonspesifik amplifikasyonların olması denmektedir (29). Bu metot da canlı hücreye gereksinim yoktur ve DNA yı ekstrakte etmeden önce kan örneğın birkaç gün +4 C”de bekleyebilir.

Akım sitometrik yöntemde laboratuara gelen örneği aynı gün çalışmak gerekir. Neticelerin yorumlanması kolaydır ve antikoru diğer antijenlerle akım sitometride olduğu gibi kross reaktivitesi yoktur. Konvansiyonel SSP-PCR metoduna göre çok daha kısa sürede fazla sayıda hasta örneği çalışılır. Tüm PCR çalışmalarında olduğu gibi bu yöntemin de en önemli sorunu örnek den örneğe kontaminasyon olma riskidir. Taq Man-PCR' da HLA-B27 bakmanın bizim baktığımız Real Time PCR benzeri bir diğer yöntemidir ve yapılan çalışmalarda bu yönteminde hızlı ve güvenilir olduğu açıklanmıştır (29).

Biz laboratuvarımızda Real Time PCR ile HLA-B27 bakmayı optimize edip HLA-B27 tanısındaki değerini saptamaya çalıştık. Real Time PCR yöntemi ile HLA-B27 bakarken yalancı pozitiflik saptamadık. Literatürde de yapılan çalışmalarda yalancı pozitifliğin görülmediği belirtilmektedir. HLA-B27 yi 4 olguda yalancı negatif bulduk. Bu değer literatüre göre yüksek olup az sayıda da olsa yapılan çalışmalarda literatürde sensitiviteninde, spesifite gibi % 100 e yakın olduğu belirtilmektedir. Bizim çalışmalarımızdaki yalancı negatifliğin yöntemin yeni olmasından dolayı DNA eldesindeki acemiliklerden kaynaklandığını düşünüyoruz. Tecrübelerimizin artması bu sorunu ortadan kaldıracaktır. Elde ettiğimiz sonuçlar; Akım sitometride şüpheli pozitiflik saptanan olgularda Real Time PCR metodunun uygulabileceğini göstermiştir.

SONUÇ

Araştırmamızda; Real Time PCR ile HLA-B27 bakmayı optimize ederek HLA-B27 tanısındaki değeri saptamaya çalışılmıştır ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1- Real Time PCR yöntemi ile; HLA-B27 bakarken yalancı pozitiflik saptanmamıştır, Real Time PCR yönteminde 4 olguda yalancı negatiflik bulunmuştur (%12), Real Time PCR HLA-B27 bakmanın sensitivitesi % 88, spesifitesi % 100, pozitif prediktif değeri % 100 ve negatif prediktif değeri % 88 olarak bulunmuştur. Akım sitometrideki şüpheli pozitiflik saptanan olgularda Real Time PCR metodunun güvenle kullanılabilir bir metot olduğu sonucu elde edilmiştir.

2- Akım sitometride; HLA-B27 bakarken yalancı negatiflik saptanmamıştır, Akım sitometride HLA-B27 bakarken 3 olguda yalancı pozitiflik görülmüştür (%11), Akım sitometri ile HLA-B27 bakmanın sensitivitesi % 100, spesifitesi % 89, pozitif prediktif değeri % 91 ve negatif prediktif değeri % 100 dür.

3- Akım sitometri ile; HLA-B27(+) olgulardaki HLA-B27 ekspresyonu $482, 30 \pm 166$ olarak bulunurken, HLA-B7(+)/ HLA-B27 şüpheli pozitif (gerçekte HLA-B27 negatif) olgulardaki HLA-B27 ekspresyonu $243,49 \pm 47$, HLA-B27(-) olguların HLA-B27 ekspresyonu $143,1 \pm 17$, olup aralarında önemli istatistiksel fark saptanmıştır. Bu bulguya göre HLA-B27 ekspresyon miktarının Akım sitometri de HLA-B27 yalancı pozitif olguları ayırt etmek mümkün olmaktadır.

4- HLA-B27 antijeninin; HLA-B7 Antijeni ile kross reaksiyon vermesinin yanı sıra HLA-B38, -B50,-B51,-B55 antijenleri ile de kross reaksiyon vermektedir.

KAYNAKLAR

1. Akkoç N., Klasik Olmayan HLA Molekülleri, Bildiri Özetleri Kitabı/ Abstrak Book, HLA SSO ve PRA Uygulaması. IV. HLA Sistemi ve Tranplantasyon İmmünoloji Sempozyumu (Ankara, 15-16 Nisan 2004)
2. Baxter L.A. HLA Testing Using Molecular Genetics Tools , Molecular Genetics in Allen RW and AuBuchon, Molecular Genetics Diagnosis and Research , 81-114 (1995)
3. Benjamin D. Schwartz. The HLA Majör Histocompatibility Complex in clinical immünology principles and pratice . wolume I , 94-111 (1996)
4. Benjamin R., Parhm P, HLA-B27 and Disease: a consequence of inadvertent antigen presentation? İn clinics of north America Spondyloarthropathies, Khan A.M . volume18 Number 1 ,11-19 (1992)
5. Bonnaud G, Aupeptit C, Preux PM, Cogne M, Drouef M, Optimisation of HLA-B27 testing by asscition of flow cytometry and DNA testing. Clin Rheumatol ;18(1):23-7 (1999)
6. Dalva K. Her Yerde Karşımda; Nedir Bu HLA Tiplendirimi? Bildiri Özetleri Kitabı/ Abstrak Book, HLA SSO ve PRA Uygulaması. IV. HLA Sistemi ve Tranplantasyon İmmünoloji Sempozyumu (Ankara,15-16 Nisan 2004)
7. Durmaz D. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji , 2. Baskı, 38-41 ,Ankara (2001)
8. Erken E. HLA Ekspresyonu ve İmmun Fonksiyonu, Bildiri Özetleri Kitabı/ Abstrak Book, HLA SSO ve PRA Uygulaması. IV. HLA Sistemi ve Tranplantasyon İmmünoloji Sempozyumu (Ankara, 15-16 Nisan 2004)
9. Gebizlioğlu Ö.L Genetik İstatistik, Bildiri Özetleri Kitabı/ Abstrak Book, HLA SSO ve PRA Uygulaması, IV. HLA Sistemi ve Tranplantasyon İmmünoloji Sempozyumu (Ankara, 15-16 Nisan 2004)
10. Graham R.Taylor Polymerase chain reaction: basic principles and automation.in PCR A Aproctical Approach. ,Mc Pherson, quirke and Taylor G.R 1 (1991)

11. Gülbas Z. Flow Cytometri (Akım Sitometri) Prensipleri ve Kullanım Alanları, Hematolojide Uygulamalı Hücre Kültür Teknikleri Kurs Kitabı, 108-118 (Trabzon , 20-25 ocak 2003)
12. Hoffman JJ. Janssen WC. HLA-B27 phenotyping with flow cytometry : further improvement by multiple monoclonal antibodies. Clin Chem. :43(10):1975-81 – (1997)
13. Horsburgh T, Martin S, Robson AJ. The application of Flow cytometry to histocompatibility testing. Transpl Immunol 8(1):3-15 (2000)
14. İkinciöğulları A. HLA Espresyon Eksiklikleri, Bildiri Özetleri Kitabı/ Abstrak Book, HLA SSO ve PRA uygulaması. IV. HLA Sistemi ve Tranplantasyon İmmünoloji Sempozyumu (Ankara,15-16 Nisan 2004)
15. Janssen WC., Rouwen JA, Hoffmann JJ. Improved flow cytometric method for HLA-B27 typing. Ann Clin Biochem :29(pt6) : 663-7 (1992)
16. Kahan B.D and Ponticelli C. İmmunogenetics, Histocompatibility, and crossmatching for kidney transplantation in Principles and Practice of Renal Transplantation Majör Histocompatibility Complex : Kyodo Pte Ltd. Singapore; 1-41 (2001)
17. Kılıçturgay K. İmmünoloji 3. Baskı, 53-64, Bursa (2003)
18. Klein J. & Sato A. British of the Majör Histocompatibility Complex Scand.J. Immunol; 47,199-209 (1998)
19. Kuon W., Sieper J. Identification of HLA-B27 restricted peptides in reactive arthritis and other spondyloarthropathies : computer algorithms and fluorescent activated cell sorting analysis as tools for hunting of HLA-B27-restricted chlamydial and autologous crossreactive peptides involved in reactive arthritis and ankylosing spondylitis Rheum Dis Clin N Am 29, 595-611 (2003)
20. Levering WH., Wind H Sintnicolaask., Hooijkaas H, Gratoma JW. Flow cytometric HLA-B27 screening cross-reactivity patterns of commercially available anti-HLA-B27 monoclonal antibodies with orther HLA-B27 antigens. Cytometry. ; 54B(1):28-38 (2003)
21. Lingenfelter B, Fuller TC, Hartung L, Hunter J, Wittwer C, HLA-B27 screening by flowcytometry. Cytometry 15;22(2) 146-9 (1995)
22. Macardle PJ, Mc Evoy R, Jovanovich S. HLA-B27 exression by flow cytometry: an analysis of 7 years quality assurance data J Immunol Methods -21; 243(1-2)51-7 (2000)

23. Michelle A.M. Bon, Arletta van Oeveren- Dybicz and Frank. A.J.T.M Genotyping of HLA-B27 by Real Time PCR without Hibridization Probes. Clin Chem. : 46(7): 1000-2 (2000)
24. Oguz F. HLA-DR ve DP Allellerinin DNA Düzeyinde Belirlenmesi, (Doktora Tezi) İstanbul Ün . Tibbi Biyoloji ABD ,(İst-1998)
25. Oguz F. Klasik HLA Antijenleri, Bildiri Özetleri Kitabı/ Abstrak Book, HLA SSO ve PRA Uygulaması. IV. HLA Sistemi ve Tranplantasyon İmmünoloji Sempozyomu (Ankara,15-16 Nisan 2004)
26. Oguz F., Diler S., Kılıçaslan T., Güre E., Çarin M. PCR-SSP Yöntemiyle HLA-B27 Sıklığının Araştırılması.(İst Ün.) 5. Ulusal Tibbi Biyoloji Kongresi Poster, 21-24 Eylül, İzmir (1998)Özdamar K. SPSS ile biyoistatistik. 5. yenilenmiş baskı 454-455, Eskişehir (2003)
27. Özdamar K. SPSS ile biyoistatistik. Yenilenmiş 5. baskı 454-455 Eskişehir (2003)
28. Sebik F. İmmünoloji Sistemine Genel Bakış, Klinik Romatoloji, Gümüşdiş G., Doğanavşargil E. , 27-33 İstanbul (1999)
29. Sylvain K, Aurelie H, marc M, Christophe R. Rapid screening for HLA-B27 by a Taq man-PCR assay using sequ spesifik primers and a minor groove binder probe, a novel type of trade mark probe. J Immunol Methods 287(1-2)179-86 (2004)
30. Tiemann C.,Vogel A., Dufaux B., Zimmer M., Krone JR., Hagedom HJ. Rapid DNA Typing of HLA-B27 allale By Real-Time PCR using Light Cycler Tecnology. Clin Lab.,47:131-134 (2001)
31. Trapani,J.A.,Vaughan,H.A.,Tait, B.D., Mc Kenzie, I.F.C., 'Immunoradiometric assay for the rapid detection of HLA-B27', Immunol.Cell.Biol.,66,215-219 (1988)
32. Turgay M. HLA ve Otoimmun Hastalıklar, Bildiri Özetleri Kitabı/ Abstrak Book, HLA SSO ve PRA Uygulaması. IV. HLA Sistemi ve Transplantasyon İmmünoloji Sempozyomu (Ankara,15-16 Nisan 2004)
33. Ulrich G. (Use of fow cytometry for HLA-B27 phenotyping: study of a HLAB7/HLAB27 double marker technique) Immunol ,29(1). 11-4 Paris (1997)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hatice BAŞYİĞİT

Doğum yeri ve tarihi : Eskişehir 1966

Medeni Durumu : Bekar

Öğrenim :

İlkokul : 1973-1977 Barbaros İlkokulu, Eskişehir

Orta Öğrenim : 1977-1983 Tepebaşı Lisesi, Eskişehir

Yüksek Öğrenim : 1985-1987 Uludağ Üniversitesi, SHMY Okulu Tıbbi Lab.

1995-1999 Dumlupınar Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji

* Halen Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Doku Tiplendirme (PCR) Laboratuvarında çalışmaktayım.