

283934

T. C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA HLA
ANTİJENLERİNİN DAĞILIMI**

Mikrobiyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

Arif HİKMET DEMİREL

ANKARA - 1982

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA HLA
ANTİJENLERİNİN DAĞILIMI

Mikrobiyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ARIF HİKMET DEMİREL

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ: Prof.Dr. AYFER GÜNALP

ANKARA - 1982

İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa No.:

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ VE YÖNTEM	24
BULGULAR	33
TARTIŞMA VE SONUÇ	36
ÖZET	40
KAYNAKLAR	41

G İ R İ Ő

Pleopatolojik araştırmalarda; tüberkölöz basilinin neolitik devirden beri insanlarda hastalık meydana getirdiği ve endüstriyel gelişme devirlerinde, kalabalık yaşam nedeniyle epidemiler oluştuğu bilinmektedir 4,12.

ROBERT KOCH'un yaşadığı devirlerde, Avrupada tüm ölümlerin 1/7 sini, gençlik çağındaki ölümlerin de 1/3 ünü tüberkölöz enfeksiyonu oluşturmaktadır.

Günümüzde az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde tüberkölöz sıklığının 100 000 de 10'un üzerinde olduğu, bunların bir çoğunda, sıklığın 100 000 de 300 sayısına kadar ulaştığı bildirilmektedir 16,41.

Özellikle tüberkölözün yaygın olduğu bölgelerde toplumun tümü virulan basille karşılaştığı halde % 90 nın üzerinde bir oranda enfeksiyon belirtsiz olarak geçmekte, % 0,01 ile % 0,3 kişide ise enfeksiyon tüberkölöz hastalığına dönüşmektedir 16,25.

Her hastalıkta olduğu gibi tüberkölözde da hazırlayıcı nedenler vardır. Bunların bilinmesi hastalıktan korunma açısından büyük bir önem taşımaktadır.

Sosyoekonomik yapı, çevresel faktörler, stres, psikolojik çöküntü gibi nedenlerin tüberküloza zemin hazırladığı bilinmektedir
25

İkizler ve kalıtsal özellikler açısından saflaştırılmış deney hayvanlarında yapılan çalışmalar, hastalığın meydana gelişinde rol oynayan faktörlerden birinin de kalıtım olabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle bazı araştırmacılar kalıtımla aktarıldığı bilinen kan grubu antijenlerinin tüberkülozlulardaki sıklığını araştırarak, kalıtımın tüberküloz oluşumundaki yerini saptamaya çalışmışlardır 4,34.

1945 te MEDEWAR ve arkadaşlarının farelerde yaptığı doku aktarımı çalışmaları sonucu alyuvarların dışındaki hücrelerde de bireyler arasında farklılıklar gösteren doku uygunluk antijenlerinin varlığı kanıtlanmıştır. Bunlar, kan grubu antijenlerinin tersine, granülosit, lenfosit, trombosit gibi çekirdekli hücrelerde bulunmaktadır. İnsanlarda bu antijenler; ak yuvarlarda, basit yöntemlerle belirlendiği için HLA (Human Leukocyt Antigens) adı verilmiştir 17.

Sonradan yapılan araştırmalar HLA ile immun yanıt (Ir = Immune respons) geninin ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur. Buna bağlı olarak bir çok araştırmacı; HLA ile enfeksiyon, otoimmun, neoplastik ve diğer hastalıkların yakınlığını inceleyerek, çeşitli hastalıklarda bazı antijenler arasında anlamlı bir ilişkinin varlığını bildirmişlerdir 3,18,24,36,37,42,43.

Biz de bu çalışmamızda; balgamla tüberküloz basili çıkaran 50 hastanın HLA antijenleri ile, kontrol olarak kullandığımız; mikroflim taramasından geçmiş, sağlıklı 50 kişinin HLA antijenlerinin dağılımını karşılaştırdık ve farklı HLA antijenlerine sahip kişilerin tüberküloza yakalanma açısından taşıdıkları rölatif riski saptadık.

GENEL BİLGİLER

Mikobakteriler tüm dünyada yaygın olarak bulunurlar. Bunlardan sadece bir kaç tanesi insan ve diğer hayvanlar için patojendir. İnsanda daha çok M. tüberkülozis (M. tuberculosis variete hominis) ve M. bovis etken olarak gözlenmektedir ¹⁰.

Tüberküloz basilini ilk defa 1982 de ROBERT KOCH izole etmiş, izole ettiği basilin kültür süzüntüsünü aşı amacıyla kullanmaya çalışmış ve bu çalışmalar sonucu OT'ü (Old Tuberculin) bulmuş, 1907 de VON PIRQUET bunu cilt testi antijeni olarak kullanmıştır. 1928 de ise SEIBRET kimyasal çöktürme yöntemiyle saf tüberkülini elde ederek buna PPD (Prufied Protein Derivates) adını vermiştir 8,11,41.

CALMETTE patates-gliserin-safra besiyerinde M. Bovis'in 230 aktarımı sonucu BCG (Bacille CALMETTE GUERIN) zayıflatılmış aşı suşunu uygulamaya sunmuş ve tüberkülozdan korunmada büyük ilerlemeler kaydedilmiştir ⁸.

1943 yılında streptomisinin bulunmasıyla tüberkülozun ilaçla tedavisinde bir çığır açılmıştır ¹¹.

Mikobakteriler: Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyandıklarında, birinci boya olan fenollü fuksini ısı karşısında alırlar ve boyayı asit-alkol karışımında bırakmazlar. Bu özelliklerinden dolayı tüberküloz basillerine aside dirençli bakteriler denilmektedir ².

Aside dirençlilik özelliği bakterinin biyokimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Bakteriye ait bazı biyokimyasal yapıların da konakçının bağışık yanıtını etkilediği bildirilmektedir. Bu maddeler şöyle sıralanabilir :

1- Kord faktörü (Trehalose - 6,6 - Dimycolic Acide):

Serpentin kord şeklinde üreyen bakterilerde görülür. Lökosit göçünü baskılar ve granüloma oluşumunu kamçılar.

2- Yüksek moleküllü lipidler ve balmumu benzeri maddeler:

Bakterinin aside dirençlilik özelliği, fagositoz gücüne karşı koyma yeteneği ve tüberküloz basili karşısında komplemanın aktive olamaması bu maddelerin varlığına bağlıdır.

3- Vaks D ve tüberküloproteiner :

Tüberkülin aşısı duyarlılığından sorumludurlar ¹³.

Tüberküloz basilleri daha çok akciğerde olmak üzere lenf bezleri, kemikler, beyin, meninksler ve diğer iç organlarda enfeksiyona neden olur ¹⁰.

FINDEL köpeklerde solunum yolu ile 62 adet basilin enfeksiyon meydana getirmesine karşın, gastrointestinal yoldan milyonlarca bakteri vermek gerektiğini bildirmiştir ³⁰.

CHAPIN 1910 da yayınladığı "Sources and Modes of Infection" adlı eserinde enfeksiyonların solunum yoluyla geçmesi fikrine karşı

çıkıp, bulaşın diğer yollarla olduğunu savunurken tüberkülozu bu savın dışında tutmuş, tüberküloz ve benzeri hastalıklarda solunum, yoluyla da enfeksiyon meydana gelebileceğini bildirmiştir 12,30.

1967 de "American Lung Association"ın tüberküloz konusunda yaptığı toplantıda, özellikle damlacık enfeksiyonunun tüberkülozda önemli olduğu kabul edilmiştir 12,30.

5 mikrondan küçük ve 1-3 basil kapsayan damlacıklar solunum yoluyla alındığında bakteriler alveollere kadar ulaşır. Daha büyük partiküller nazal ve bronşiyal geçiş sırasında mukosilyar yüzeyler tarafından tutulurlar 10,20.

Alveollere ulaşan tüberküloz basilleri alveoller makrofajlar tarafından fagosite edilir. Organizmaya yeterli oranda virulan tüberküloz basili girdiğinde makrofajlar enfeksiyonun meydana gelip gelmeyeceğini belirleyen kilit hücrelerdir 4,20.

Mononükleer fagositler; kemik iliği stem hücrelerinden çıkarılan hücrelerdir. Kan dolaşımındakilerine monosit denilmektedir. Monositlerin dokulara göçüp değişime uğramasıyla histiyositler meydana gelir 17,31.

Makrofaj ve lenfositler birbirleriyle yardımlaşarak görev yaparlar. Makrofajlar özgül olmayan bir yolla hücrel yanıt oluştururken lenfositler antijene özgül cevap oluştururlar 4,17,20.

T hücresi makrofaj ve antijen ilişkisi şu şekilde bir dizi meydana getirir :

Antijen → Makrofaj → (Yoğunlaştırılmış antijen) → Duyarlı T Hücresi → (lenfokinler) → Makrofajlar → Aktive olmuş makrofaj → Güçlü fagositoz ve bakterinin parçalanması ⁴.

Tüberkülin negatif kişilerde tüberküloz basilinin alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilmesi; yaş, kalıtım ve beslenme gibi nedenlere bağlı olarak değişmektedir ^{4,20}.

Fagositoz 2 kademedeyme meydana gelir. 1 nci basamakta makrofaj, reseptörleriyle basili tutar. 2 nci basamakta bakteri makrofaj içine alınıp parçalanır ^{4,17,20}.

Bakterinin yutulma işleminde; makrofajın yüzeyinde bakterinin tutunduğu bölgede bir cep meydana gelir. Sonra bu cebin iki kenarı birleşerek bakterinin etrafında bir vakuol oluşur. Buna fagozom adı verilmektedir. Şayet konak bağışık ise lizozomlar vakuole açılır. Meydana gelen bu yeni oluşuma fagolizozom denilmektedir. Fagolizozom içindeki parçalayıcı enzimler tüberküloz basilini parçalayarak öldürür. Meydana gelen bakteri artıklarıyla lizozomal enzimler hücreler arası boşluğa salınır ^{2,17,31}.

Antijenle karşılaşan makrofajlar kendine özgü bir yolla antijeni yoğunlaştırıp belirgin hale getirdikten sonra B ve T hücrelerine sunmaktadır. Makrofajların uyardığı T hücreleri; ya yardımcı (Helper) ve baskılayıcı (Supressor) T hücreleri diye adlandırılan regülatör hücrelere veya gecikmiş tipte aşırı duyarlıktan da sorumlu olduğu kabul edilen sitolitik hücreye dönüşür ^{4,17,20,31}.

Makrofajların antijen sunma fonksiyonu genetik kontrol altındadır. Konakçındaki makrofajların ancak bir bölümü antijeni

böyle bir şekilde lenfositlere aktarmaktadır ⁴.

Makrofajların uyardığı B lenfositini plazma hücreğine dönüşerek antikor salgılamakta, T hücrelerinden farklılaşan sitolitik hücreler de lenfokin adı verilen bazı mediyatör maddeler salgılayarak makrofajları aktive ederler. Aktive olmuş makrofajlar belkide süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi oksijenli maddeler üretirek belirgin bir biçimde tüberküloz basillerini yutup parçalarlar ⁴.

Şayet tüberküloz basilinin makrofaj içinde üremesi sınırlandırılırsa, enfeksiyonda sınırlı kalmakta, aksi takdirde, basil makrofaj içinde 6-12 saatte bir olmak üzere hızla çoğalarak makrofajın ölümüne, parçalanan makrofajdan bol miktarda proteolitik enzimin hücreler arası boşluğa dökülmesine ve büyük bir doku yıkımına neden olmaktadır ^{4,20}.

Makrofajlar aktif bir salgı hücresidir. Kompleman proteinleri, lizozomal enzimler, nötral proteazlar, interferon, plazminojen aktivatörleri ve lenfositlerin örgütlenmesini sağlayan diğer regülatör maddeleri salgırlarlar. Regülatör maddeler T ve B hücrelerinin farklılaşmasını uyardığı gibi B lenfositlerinin plazma hücreğine dönüşüp antikor salgılamasını ve yangılı bölgenin yeniden damarlanmasını da sağlayabilir ⁴.

Antikorların tüberküloza bağışıklıktaki rolü ya hiç veya çok az olarak kabul edilmektedir.

T lenfositlerinin bağışık cevaba etkisi pozitif veya negatif olabilir. Antijenik uyarımın başlangıç döneminde; sitolitik T hücreleriyle regülatör T hücrelerinin etkinliğine göre bağışık

yanıtın gücü belirlenir ^{4,10}.

Aktive makrofajlar, tüberküloza dirençte en etkin hücrelerdir. Bununla beraber virulan tüberküloz basilleri bu hücreler içinde de üreyebilir veya uzun süre canlı kalabilir. Makrofajlar içinde çoğalarak bu hücreyi parçalayıp hücreler arası boşluğa dökülen bakteriler, bölgeye kemotaktik olarak gelen diğer makrofajlara tutunurlar. Bu böyle devam edince, bölgede makrofaj ve lenfositler toplanır. Lezyonun ortasında kazeifikasyon nekrozu, kenarda epiteloid hücreler, arada Langhans tipi dev hücreler, dışta makrofajlar ve lenfositlerin bulunduğu bir tüberkül meydana gelir. Bunun ilişkili olduğu lenf nodülünün de olaya katılmasıyla primer kompleks veya GHON kompleksi meydana gelir ^{4,10,20}.

T lenfositleri tarafından özgül antijenlere veya fitohe-maglutinin, conconavallin A gibi mitojenik maddelere karşı salgılanan lenfokinler aktif biyolojik maddelerdir. Bu maddeler şu şekilde sıralanabilir :

MIF (Macrophage Migration Inhibition Factor)

MAF (Macrophage Activating Factor)

Kemotaktik faktör

Mitojenik faktörler

Lenfotoksin

Transfer faktörü

İnterferon v.b. ^{17,20,31}.

Tüberkülozda granülomanın meydana gelişinde en büyük rolü:T hücresi ve salgıladığı lenfokinler oynar. Granülomanın devamı

yerel süregen uyarıya bağlıdır. Bu uyarıyı ise tüberküloz basilinin balmumu benzeri maddeleri yapar ²⁰.

Tüberküloz granülomasındaki makrofajların ayrı ayrı görevleri vardır. Bazıları fagositozda rol alıp bakterileri öldürürken, bazıları antijeni T lenfositlerine sunmakta, bazıları notral proteazları, bazıları; koloni uyarıcı faktör salgıyarak, kemik iliğinden mononükleer lökositlerin ve granülositlerin üretilmesini kamçılarılar ²⁰.

Aktif kazeöz tüberkülozda makrofajlar hızla yenilenirler. 10 gün gibi bir sürede konakçıdaki makrofajların % 90 nının yenilediği bildirilmektedir ²⁰.

Duyarlı organizmaya az miktarda basil girdiğinde; hızlandırılmış tüberkül oluşumu ve genellikle basilin ölümü meydana gelirken, çok miktarda bakteri alındığında, aşırı duyarlık reaksiyonu ve doku yıkımı gözlenir. Bu sonuç konakçının zararınadır. Akciğer tüberkülozundaki kazeifikasyon, likefaksiyon ve doku yıkımı hücrel immünitinin konağın zararına işlemesine bağlı olarak meydana gelmektedir ^{4,20}.

1689 da RICHARD MARTON'un yayınladığı "Phtisologia" adlı kitabında tüberkülozu hazırlayan bir çok faktörün bulunduğunu, kondisyonun, beslenmenin bedensel ve ruhsal dinlenmenin hastalığa önem taşıdığını bildirmiştir ²⁵.

Sosyo-ekonomik yapı tüberkülozu etkileyen önemli bir faktördür. Denizcilere oranla kolej öğrencilerinde çok düşük oranda tüberküloza rastlanmaktadır ⁹.

Şehirlerde, kalabalık yerlerde ve açık tüberkülozluların fazla sayıda bulunduğu yerlerde yaşam tüberküloza zemin hazırlamaktadır⁹.

Psikosomatik tıbbin gelişmesi; stres ve psikolojik çöküntünün de tüberkülozu hazırlayan önemli birer neden olduğunu açığa çıkarmıştır²⁵.

Yaşla tüberkülozun ilişkisi incelendiğinde; süt çocuklarında primer tüberkülozdan sonra çok ağır tüberküloz tabloları, menenjit tüberkülozu ve milyer tüberkülozun meydana geldiği, 5 yaşla blüç çağı arasında tüberküloza yakalanma oranının düştüğü, blüçdan sonra gençlerde bir yükselmenin meydana geldiği, sonra oranın tekrar azaldığı görülmektedir⁴¹.

Tüberkülozun erkeklerde kadınlardan daha fazla görülmesi, dışarıyla temasın erkeklerde daha fazla olmasına bağlanmıştır⁹.

Bir çok yazar ırkların direnç açısından farklı olduğunu bildirmiştir. Bugün genellikle ırklar ve milletler arasında tüberküloz morbidite ve mortalite farkının; sosyal, ekonomik ve kültürel değişkenliğe bağlı olduğu kanısı yaygındır^{34,35,41}.

Tüberkülozla kalıtımın ilişkisini belirlemek amacıyla Almanya, İsviçre, Amerika ve Arjantin'de gözlenen tüberkülozlu 617 tek yumurta ikizinde tedavi süresince yapılan incelemelerde, hastalığın iyileşmesinde ve seyir durumundaki benzerlik ayrı yumurta ikizlerine kıyasla farklı bulunmuştur. VERSCHUER'in araştırmalarında ise tek yumurta ikizlerinden; yalnız her iki çocuğun hastalığa yakalanmış olması değil, aynı zamanda lezyonların lokali-

zasyonu bakımından da eşitlik gözlemiştir. Halbuki bu uygunluk ayrı yumurta ikizlerinde görülmemektedir. Gerçekten ayrı yumurta ikizlerinde tüberkülozdan ölüm oranının tek yumurta ikizlerinden 16 kez az bulunması genetik etkinin rolünü ortaya koymaktadır. KALLMAN ve REISNER tek yumurta ikizlerinin tüberküloza direnç ve duyarlılık açısından ayrı yumurta ikizlerine oranla 6 kez benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. 308 ailenin 200 ayrı 78 tek yumurta ikizlerinde yaptıkları araştırmada; tüberküloz morbiditesini birinci grupta % 25,6 ikinci grupta % 87,3 bulmaları genetik yapının önemini göstermektedir ³⁴.

Sağlam ve tüberkülozlu ailelerin çocuklarında yayılış oranı da farklı bulunmuştur. Ebeveynlerinden biri tüberkülozlu ailelerin çocuklarında sağlam ailelere göre % 60-70 kez, her iki ebeveyni hasta ailelerin çocuklarında ise % 100 kez varan sıklıkta tüberküloz yayılımı olduğu bildirilmiştir ³⁴.

DUBOS çalışmalarında bazı dokuların tüberküloza direncinin, bazı kimyasal maddelere bağlı olduğunu göstermiştir. Bunlar arasında böbrekten elde edilen spermin, speramin ve spermidin gibi bileşimler, bazı timus polipeptidleri bulunmaktadır. Bu maddeler 1/100 000 konsantrasyonda bile ortamdaki mikobakteriler için öldürücü etki meydana getirmektedirler. İkizlerde ve tüberkülozlu aile çocuklarında yapılan çalışmaların sonuçları ile bu bilgiler birleştirilince dokulardaki duyarlılık ve direncin kalıtımla belirlenen kimyasal yapılara bağlı olabileceği kanısı doğmaktadır ³⁴.

LURIE, melezleme çalışmalarından elde ettiği homozigot tavşan türleriyle yaptığı deneylerde; bazı türlerin tüberküloza

duyarlı, bazılarının ise dirençli olduğunu saptamıştır ³⁵.

HALBER ve HIRSZFELD, tüberkülozla kalıtımın ilişkisini belirlemek amacıyla; tüberkülozlularda ABO kan gruplarının dağılımını incelemiş, anlamlı bir sonuç elde edememiştir. SAHA, BANER, JEE ve JAIN yaptıkları araştırmalarda; O kan grubunda olanların tüberküloza daha dirençli, AB grubunun ise en fazla riske sahip olduğunu bildirmiştir ⁴.

Günümüzde kalıtımı en güzel belirleyen antijenler doku uygunluk antijenleridir. Bu antijenlerin sentezini denetleyen genlerin yer aldığı kromozom bölgesine MHC (Major Histo Compatibility Complex) denilmektedir ^{6,29,33}.

1958 de PAYNE ve VAN ROOD bir kaç defa gebe kalmış kadınların serumunda lökositlere karşı antikor saptanmıştır. Lökositlerde mevcut olan bu antijenlerin daha sonra diğer dokularda da bulunduğu göz önüne alınarak bunlara doku uygunluk ve transplantasyon antijenleri adı verilmiştir. 1967 de bu antijenlerin simgesi konusunda anlaşmaya varılarak HLA diye isimlendirilmiştir. HLA sisteminde 5 gen bölgesi vardır. Bunlar; HLA-A,B,C,D ve DR dir. Bu genler ABO kan grubunda olduğu gibi kodominant genlerdir ve MENDEL yasalarına göre soydan soya geçer. Çocuktaki genlerin bir kısmı anneden diğer kısmı ise babadan geçmez. Bu 5 odaya ait özelliklerin hepsi aynı güçte olduğundan fenotipe yansır ^{17,21,29,33}.

HLA genlerinin kontrol ettiği antijenler tek yumurta ikizleri hariç diğer bütün bireylerde değişiklik gösterir. Farklı doku antijenlerine sahip kişiler arasında yapılan doku aktarımları

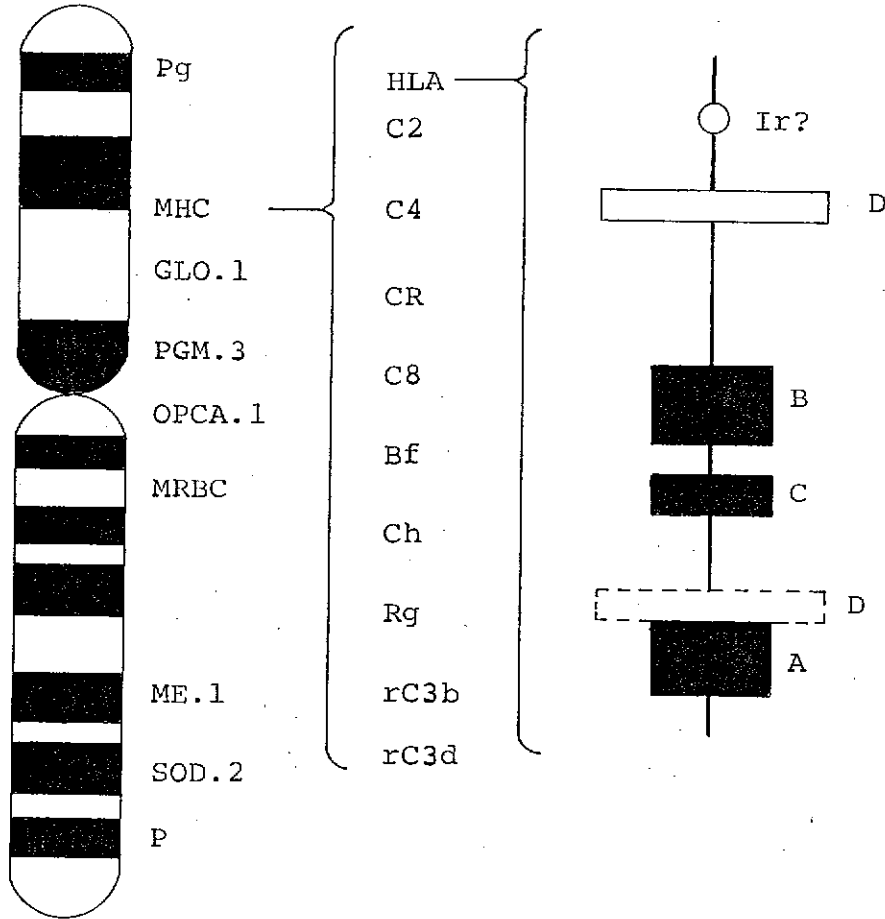
yabancı dokunun atılmasıyla sonlanır. HLA-A ve B antijenleri yönünden bir çok dokuda yapılan deneyler, bu antijenlerin herhangi bir dokuya özgül olmadığını ortaya koymuştur. HLA antijenleri sadece olgun eritrositlerde DNA yokluğuna bağlı olarak ortadan kalkmaktadır. Doku uygunluk antijenleri düşük miktarda olmak üzere plazma ve idrarda da bulunmaktadır 17,22,29,33.

HLA antijenleri hücre mebranında serbest olarak bulunmaktadır. Flöresan işaretli antiserumla karşılaştırıldığında antijenler hücrenin bir ucunda birleşirler ve "Capping" olayı gözlenir. Bu deney değişik HLA antijenlerinin farklı moleküller halinde hücre yüzeyinde bulunduğunu göstermek açısından uygun bir yöntemdir. HLA-A,B ve C birbirinden bağımsız olarak "capping" meydana getirirler 29.

HLA-A,B,C antijenleri hücre zarına gömülü olarak bulunur. 44 000 molekül ağırlığında glikoprotein ve 15 000 molekül ağırlığında polipeptit yapısında olan iki parçadan meydana gelmiştir 5,6,29,37.

İnsanda HLA genleri; şekil : 1 de görüldüğü gibi 6 nolu kromozomun kısa kolu üzerindeki MHC odağında bulunmaktadır. Bunlardan HLA-A,B,C ve DR odağına ait antijenler serolojik yöntemlerle tanımlanmaktadır.

Serolojik yöntemlerle tanımlanan HLA antiserumları; çok doğum yapmış kadınlardan, defalarca kan transfüzyonu yapılan kişilerden, yabancı lenfosit veya doku aktarımı yapılan gönüllülerden ve bilinen HLA antijenlerini maymunlara vererek elde edilir 5,6,29,33.



Şekil : 1 İnsanda 6 nolu kromozomun haritası.

MHC	İnsanda major doku uygunluk kompleksi
Pg	Pepsinojen
GLO.1.	Gloksalaz.1.
PGM.3.	Fosfoglikomutaz 3.
OPCA.1.	Olivopontoserebellar atrofi 1
MRBC	B hücreesindeki, maymun hücrelerine karşı reseptör
ME 1.	Malik enzim 1
SOD.2.	Süperoksidadiz dismutaz 2
P	P kan grubu
C_2, C_4, C_8	Kompleman komponentleri
Bf	Properdin faktör B
Ch	Chido kan grubu
Rg	Roger kan grubu
rC3b	C3b için reseptör
rC3d	C3d için reseptör

Doku aktarımında; serolojik yöntemlerle belirlenen antijenler uygun olduğu halde yine de transplantın atıldığı gözlenmiştir. Bunun sebepleri araştırılırken karşılıklı lenfosit kültürü, MLC (Mixed Lymphocyte Culture) reaksiyonu tanımlanmıştır. Bu reaksiyonda birbirine yabancı lenfositler karşılıklı antijenik uyarı meydana getirerek diğerinin blast hale dönmesini sağlamaktadır. MLC reaksiyonu D odağına ait ve lenfositler tarafından tanınabilen HLA antijenlerini ortaya çıkarmaktadır ^{21,31}.

1964-1977 arası 7 defa toplanan uluslar arası doku uygunluk simpozyumlarında; elde edilen antijenler ve antikolar karşılıklı olarak değerlendirilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü'nün kurduğu adlandırma komitesi eldeki antijenleri isimlendirmiştir. Bu toplantılar sırasında kesinlik kazanmayan antijenlere W(Workshop) simgesinin verilmesi kararlaştırılmıştır ^{29,33}.

1977 deki son toplantıda; HLA-A odağına ait 20, HLA-B odağına ait 33, HLA-C odağına ait 6, HLA-D odağına ait 11 ve HLA-DR odağına ait 7 olmak üzere toplam 77 antijen bildirilmiştir. Bunlar sırasıyla Tablo : I de görülmektedir ²⁹.

HLA antijenlerini belirlemek amacıyla çeşitli yöntemler tarif edilmiştir.

I- Lenfositotoksosite testi :

Periferik lenfositler, HLA antiserumları ve tavşan komplemanı karıştırılır. Lenfosit yüzeyindeki antijenlerle birleşen özgül antikolar komplemanı aktive eder. Sonuçta hücre zarı zedelenir. İlave edilen boya maddesi lenfositler içine girerek

TABLO : I- 1977 SİMPOZYUMUNDA KABUL EDİLEN HLA ANTİJENLERİ

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-DR
HLA-A1	HLA-BW4	HLA-BW41	HLA-DW1	HLA-DRW1
HLA-A2	HLA-B5	HLA-BW42	HLA-DW2	HLA-DRW2
HLA-A3	HLA-BW6	HLA-BW44	HLA-DW3	HLA-DRW3
HLA-A9	HLA-B7	HLA-BW45	HLA-DW4	HLA-DRW4
HLA-A10	HLA-B8	HLA-BW46	HLA-DW5	HLA-DRW5
HLA-A11	HLA-B12	HLA-BW47	HLA-DW6	HLA-DRW6
HLA-AW19	HLA-B13	HLA-BW48	HLA-DW7	HLA-DRW7
HLA-AW23	HLA-B14	HLA-BW49	HLA-DW8	
HLA-AW24	HLA-B15	HLA-BW50	HLA-DW9	
HLA-A25	HLA-BW16	HLA-BW51	HLA-DW10	
HLA-A26	HLA-B17	HLA-BW52	HLA-DW11	
HLA-A28	HLA-B18	HLA-BW53		
HLA-A29	HLA-BW21	HLA-BW54		
HLA-AW30	HLA-BW22			
HLA-AW31	HLA-B27			
HLA-AW32	HLA-BW25			
HLA-AW33	HLA-B37			
HLA-AW34	HLA-BW28			
HLA-AW36	HLA-BW39			
HLA-AW43	HLA-B40			

$$20 + 33 + 6 + 11 + 7 = 77$$

hücreyi boyar. Eğer antiserum özgül değilse hücreler canlı kalır ve boya almaz. Bu test için bir mikroteknik geliştirilmiştir. Mikrottest hem ekonomik hemde kolay uygulanır niteliktedir 1,14,17,26,29

II- Lökoglütinasyon testi :

Lökosit süspansiyonu; HLA test antiserumları ile karıştırılıp 37°C de enkübe edilir. Eğer antiserum lökositlere özgülse aglütinasyon meydana gelir. Değerlendirme mikroskopla yapılır 17,29.

III- Trombositlerle yapılan kompleman birleşmesi testi :

Trombositlerle HLA antiserumları ve kompleman teste sokulur. Şayet antiserumlar trombositlere özgülse kompleman harcanır, sonradan ilave edilen hemolitik sistem içindeki eritrositler parçalanmaz. Bunun tersine eritrositler parçalanarak hemoliz meydana gelirse trombositteki antijen kullanılan antiseruma özgül değildir 17,29.

IV- HLA-D antijenlerinin belirlenmesinde baş vurulan MLC testi :

Alıcının veya vericinin lenfositlerinden birinin x ışını veya mitomisinle üreme yeteneği durdurularak diğeriyle karşılaştırılır. Farklı yapıdaki lenfositler birbirlerini uyarırlar. Baskılanmamış lenfositler bu uyarıdan sonra blast hale dönüşerek yeniden üreme yeteneği kazanırlar. Bu sırada ortamda bulunan radyoaktif timidin DNA sentezinde harcanır. Sonuçta harcanan timidin özel bir sayaçla ölçülerek test değerlendirilir 14,29.

V- HLA-DR antijenlerinin belirlenmesinde baş vurulan testler :

Bu antijenler B lenfositlerinde bulunduğu halde T lenfositlerinde bulunmaz. HLA-DR antijenlerinin belirlenmesinde kullanılan, güçlü ve özgül antiserumların elde edilmesi HLA-A,B,C antiserumlarına göre çok güçtür ^{7,21}.

VAN ROOD ve arkadaşları B lenfositlerini ayrı olarak elde etmeden DR antijenlerini belirleyen çift renkli bir flöresan anti-kor tekniği tarif etmiştir. Buna göre lenfositler önce flöresin izotiyosiyanatla işaretli anti human globülinle karşılaştırılır. Böylece ortamdaki B lenfositleri işaretlenir. Sonra kırmızı flöresan veren ethidyum bromidle işaretli anti DR serumları kullanılarak sitotoksosite testi yapılır. Kırmızı renkli flöresan ölü B lenfositlerini gösterir ²¹.

Günümüzde HLA-DR antijenlerini belirlemek için daha çok hypaque-ficoll yöntemi ile B lenfositleri elde edilmekte ve HLA-A,B,C serolojisindeki lenfositotoksosite testine benzer bir test uygulanmaktadır ²¹.

MHC nin transplantasyon antijenleri dışındaki sistemlerde de rol oynadığı, ilk defa 1964 te LILLY tarafından bildirilmiştir. Araştırmacı farelerde yaptığı deneylerde; H-2k antijenine sahip farelerin "Gross leukemia" virusuna duyarlı, H-2b antijenine sahip farelerin ise dirençli olduğunu göstermiştir. Daha sonraları bir çok araştırmacı insanlarda 100 den fazla hastalıkla HLA nin ilişkisini araştırmış ve bunların yarısına yakın bir bölümünde anlamlı ilişki belirtilmiştir ³⁷.

HLA hastalık ilişkisini belirlemede her antijene sahip kişinin hastalığa yakalanma yönünden taşıdığı risk hesaplanır ki buna rölatif risk denmektedir 33,37,43.

$$\text{Rölatif risk} = \frac{(\% \text{ Antijen pozitif hasta})(\% \text{ Antijen pozitif kontrol})}{(\% \text{ Antijen negatif hasta})(\% \text{ Antijen negatif kontrol})}$$

HLA ile hastalıklar arasındaki ilişki konusunda bir çok görüş ileriye sürülmüştür :

Bazı hastalıklar veya konakçıya giren hastalık etkenleri; konakçıya ait antijenleri değiştirebilir. Bu değişiklik immun sistemi uyarır ve farklılaşmış hücreler ortadan kaldırılır. Otoimmun hastalıklarda bunu görmekteyiz 37.

Konakçının karşılaştığı etkenin antijenik yapısı HLA antijenlerine benzeyebilir. Bu taktirde immun cevap meydana gelmez ve etken rahatça çoğalarak konakçıya zarar verir 37.

Bir başka görüşe göre HLA ile Ir geni ilişkilidir ve değişik HLA antijenine sahip kişinin immun yanıt yeteneği de farklıdır. Farelerde ve diğer bazı hayvanlarda Ir geninin MHC nin içinde olduğu kanıtlanmıştır. İnsanlarda Ir geninin varlığı kesin olarak kanıtlanmamasına karşın, diğer hayvanlarınkinin benzeri MHC ne sahip olmaları Ir geninin de var olacağıнын bir kanıtı olarak kabul edilmektedir 29,37.

İnsanlarda Ir geninin HLA-D veya B odağının yakınında olacağı düşünülmektedir 37.

ZINKERNAGEL'e göre HLA-D ve DR antijenleri T hücrelerinin cevabını belirler. Önceden de değinildiği gibi hücre içi paraziti olan bazı bakteri ve viruslar için T lenfosit cevabı çok önemlidir ⁴³.

Bir başka görüşe göre HLA determinantlarının hücrede reseptör görevi yaptığı varsayılmaktadır.

Nijeryada DUFFY negatif kan grubunda olan kişilerin tropikal sıtmaya yakalanmadıkları görülmüştür. Bu şahısların eritrositlerinde Plazmodium falsiparum'a özgü reseptörler bulunmadığı için hastalığa yakalanmadıkları varsayılmaktadır. Bazı HLA determinantlarının buna benzer bir şekilde hücrede reseptör görevi yapabileceği bildirilmektedir ³⁷.

Tüberkülozda da, özellikle makrofajlarda buna benzer bir mekanizmanın rol alabileceği düşünülebilir.

MHC içindeki bazı genlerin C₂ ve C₄ ü kontrol ettiği bilinmektedir. Bir başka görüşe göre bu bölgedeki bir bozukluk belkide hastalıkların meydana gelmesini kolaylaştırmaktadır ³⁷.

Tablo : II te görüldüğü gibi bir çok araştırmacı; ankilozon spondilit, Reiter hastalığı, Yersinya artriti, Salmonella artriti, psöriyatik artrit, akut anteriyör üveit, psöriyazis vulgaris, dermatitis herpefiformis, sistemik lupus eritematozis, tirotoksikoz, juvenil insüline bağlı diyabet, ülseratif kolit miyestenia gravis, mültipl sklerozis ve Behçet hastalığında bazı HLA antijenlerinin sıklığını anlamlı bulmuştur. Bu antijenler çoğunlukla 3-15 arasında bir rölatif risk taşımaktadır ^{15,18,19,23,27,32,37,38,39,40,43}.

TABLO : II- ÇEŞİTLİ HASTALIKLARDA SIKLIKLA GÖRÜLEN HLA ANTİJENLERİ
VE BU ANTİJENLERİN TAŞIDIĞI RÖLATİF RİSK ORANI

HASTALIKLAR	HLA Tipi:	Rölatif Risk
Ankilozan spondilit	B27	90
Reiter hastalığı	B27	36
Yersinya artriti	B27	18
Salmonella artriti	B27	18
Anteriyör üveit	B27	9
Psöriyazis	B27	4
Psöriyazis vulgaris	CW6	4
Myasteniye gravis	B8	4
	DW3	4
Jüvenil diyabet	B8	2
	DW3	4
	DW4	4
Tirotoksikozis	B8	2
	DW3	4
İdyopatik Adison hastalığı	38	4
	DW3	9
Çöliyak hastalığı	B8	9
	DW3	7
Dermatitis herpetiformis	B8	9
	DW3	14
Subakut tiroiditis	BW35	17
Mütipl siklerozis	B7	2
	DW2	4
Romatoid artrit	DW4	4
İdyopatik homokromomatozis	A3	8
	B14	8
Kronik aktif hepatit	B8	7
	DRW2	8
Testiküler teratokarsinoma	DW7	8
Hipertansiyonsuz kardiyomiyopati	B12	31
Sistemik lupus eritematozis	DRW2	4
	DRW3	3

Bazı araştırmacılar da enfeksiyon hastalıklarında doku uygunluk antijenlerinin dağılımını incelemiştir. Bu çalışmalarda; hepatitis B virus, M. lepra (tüberköloid tipi), kızamıkçık, iek aşısı, kızamık, plazmodyum falsiparum, Solmonella, şigella, Meningokok ve Herpes simpleks enfeksiyonlarında, bazı HLA antijenlerinin sıklığını anlamlı bulmuşlardır 24,36,42.

Az sayıda araştırmacı ise klinik tüberkölözde HLA antijenlerinin sıklığını araştırmıştır. Bunlardan ROZENTHAL ve arkadaşları HLA-A ve B odağı antijenlerinin dağılımında anlamlı bir sıklık saptayamamıştır. SELBY ve arkadaşları HLA-B8 de bir artma gözlemiştir. AL ARIF ve arkadaşları da Kuzey Amerika zencilerinde yaptığı araştırmalarda HLA-BW15 in anlamlı bir sıklıkta (rölatif risk = 7) olduğunu bildirmiştir 3.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda; bu gün HLA antijenlerinin serolojik yöntemlerle belirlenmesinde en çok kullanılan mikro lenfositotoksisite testi seçilmiş ve kaynaklara uygun şekilde uygulanmasına özen gösterilmiştir.

Mikro lenfositotoksisite testi TERESAKİ ve Mc CELLAND'ın çalışmalarından kaynaklanan ekonomik ve kolay uygulanan bir testtir. Lenfositler periferik kandan ayrılıp antiserumlarla enkübe edilir. Daha sonra ortama tavşan komplemanı ilave edilir. Sonuçta özgül antiserumların bulunduğu kuyularda hücrelerin ölümü görülür. Hücre ölümü oranını belirlemek için; boyama, faz-kontrast mikroskopi, radyoaktif maddelerin atılımı gibi yöntemlere baş vurulmaktadır. Biz çalışmamızda boyama yöntemini uyguladık 14,22.

TERESAKI PLAKLARI KULLANILARAK YAPILAN MİKRO LENSİTOTOKSİSİTE TESTİ :

GEREÇLER :

- İçerisinde 18-20 adet cam boncuk bulunan 50 ml lik erlenmayerler; alınan kanın defibrinasyonu amacıyla kullanılır. Defibrinasyon yeni alınan kanın yavaş bir şekilde çalkalanmasıyla sağlanır. Tam defibrinasyon 15-20 dakikada meydana gelir. Defibrinasyon mikro lenfositotoksisite testi için lenfosit hazırlamada baş vurulan en ideal yöntemdir. Bu işlemle çok miktarda lenfosit elde

edilirken, trombositlerin lenfositlere karışması büyük bir oranda engellenmektedir. Defibrinasyonda kullanılan cam boncuklu erlenmayerlerin steril olması testin güvenliğini artırır.

- Plastik Falcon 3034 - Mikrotest (TERESAKI) Plakları: Bu plaklarda kesitleri (V) şeklinde olan 60 kuyucuk vardır ve her kuyucuk 10 mikrolitre sıvı alabilecek büyüklüktedir.

- Santrifüj : Kolları tam olarak açılabilen santrifüj olmalıdır.

- HAMILTON enjektörü (PB 600) : 50 mikrolitrelik olup düğmesine her basıldığında 1 mikrolitre şırınga eder.

- Hücre sayma kâmarası (NAUBAUER)

- Doku kültürü mikroskobu (Inverted microscop): TERESAKI plaklarına konan yağ tabakası ve kuyucukların derinliği nedeniyle normal ışık mikroskobuyla, lenfositleri üstten görmek imkansızdır. Bunun için objektiflerinin çalışma aralığı fazla olan doku kültürü mikroskobu kullanılmalıdır.

- Lenfosit ayırımı için Pharmacia Fine Chemicals AB' den sağlanan 100 ml lik Ficoll paque preparatı kullanılmıştır.

- Mineral yağ (Likid parafin) : Özgül ağırlığı 0,87-0,89 olmalıdır (Shell ondina 33)

- Kompleman birleşmesi testi sulandırma tamponu (Oxoid BR-16) : Bir tablet 100 ml sıcak distile suda eritilerek hazırlanır (pH : 7,2)

- PBS (Phosphate Buffered Salin) : Bu amaçla DULBECCO-A (Oxoid BR-14a) kullanılmıştır. 10 tablet 1 litre distile suda eritilir, 10 dakika 115°C de otoklavda sterilize edilir. pH sı yaklaşık 7,3 olan bu solüsyonda sterilizasyon sonucu erimeyen mad-

delerin meydana getirdiği çökelek bulunmamalıdır.

- DULBECO-B (Oxoid SR-39) Ampul (Mineral salt solution):

Kalsiyum klorid	0,1 gr.
Magnezyum klorid (6 sulu)	0,1 gr.
Distile su	5 ml.

- DULBECO fosfat tamponu :

DULBECO A solüsyonu	1 lt
DULBECO B solüsyonu	5 ml

- Tripan mavisi solüsyonu :

Tripan mavisinin sudaki % 2 lik solüsyonundan	1 kısım
PBS	6 kısım

Bu karışım santrifüje edilerek üst kısım kullanılmıştır.

- HLA antiserumları : Kullanılan antiserumlar BEHRING

INSTITUTE'den sağlanmıştır. TERASAKI yöntemi ile çalışıldığından bu yönteme uygun olan T serisi antiserumlar kullanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız antiserumlar; yeni isimleri ve eski sinonimleriyle Tablo : III te gösterilmiştir. Çalışmamızda HLA antiserumlarıyla birlikte pozitif ve negatif kontrol serumları, 0,5 ml miktarında ve liyofilize halde temin edilmiştir.

- Tavşan komplemanı : BEHRING INSTITUTE'den 1 ml lik, liyofilize flakonlar halinde sağlanan tavşan komplemanı kullanılmıştır.

DENEYİN YAPILIŞI :

A. PLAKLARIN HAZIRLANMASI :

- Falcon 3034 TERESAKI plastik plaklarının her birine 7-8 ml likid parafin konularak kuyucuklar parafinle kaplanır.

TABLO : III- ÇALIŞMAMIZDA KULLANDIĞIMIZ HLA ANTİJENLERİ VE YENİ SİNONİMLERİ

Seri	Kullanılan Antiserum	
	Yeni İsimleri	Eski Sinonimi
HLA-A SERİSİ	HLA-A1	HL-A1
	HLA-A2	HL-A2
	HLA-A3	HL-A3
	HLA-A9	HL-A9
	HLA-AW25	HL-A10 (W25)
	HLA-AW25 + AW26 + AW32	HL-A10(W25 + 26) + W32
	HLA-A11	HLA-A11
	HLA-A2 + A28	HL-A2 + 28
HLA-B SERİSİ	HLA-B5	HL-A5
	HLA-B7	HL-A7
	HLA-B8	HL-A8
	HLA-B12	HL-A12
	HLA-B13	HL-A13
	HLA-B14	HL-A14
	HLA-BW15	HL-W15
	HLA-BW17	HL-A17
	HLA-B27	HL-A27
	HLA-B7 + B27	HL-A7 + 27
	HLA-B5 + BW35	HL-A5 + W5
	HLA-BW37	HL- (TY)
	HLA-BW40 + B13	W10 + HL-A13
HLA-C SERİSİ	HLA-CW3	
	HLA-CW4	

- Plaklar hafif eğilerek parafinin fazlası alınır, kalan parafin, kuyuları doldurup, ince bir tabaka halinde plağın yüzeyini kaplamalıdır.

- HLA antiserumları 0,5 er ml miktarında steril distile su ile sulandırılarak belli bir plana göre her kuyucuğa ayri bir antiserum olmak üzere HAMILTON enjektörünün iynesi parafin altına, kuyucuğun dibine daldırılmak suretiyle 1 er mikrolitre antiserum yerleştirilir.

- Plaklar derin dondurucuda (-25 - 60derecede) saklanır. Çalışılacağı zaman gerektiği kadar plak çıkartılarak çözülmeye bırakılır.

B. LENFOSİTLERİN AYIRIMI :

- Cam boncuklu erlenmayerlere 15-20 ml düz kan alınır.
- 15-20 dakika nazikçe çaklanarak defibrine edilir.
- Defibrine kanla PBS eşit oranda karıştırılır.
- 15x100 mm lik tercihan plastik tüpe 5 ml Ficoll-paque konur.

- PBS ile karıştırılmış kandan 7 ml miktarında alınıp tüpün kenarından yavaşça Ficoll-paque ile karıştırılmaksızın üstte bir tabaka oluşturacak şekilde boşaltılır.

- 3000 RPM de 30 dakika santrifüje edilir. Santrifüj işlemi sonunda; üstte plazma, sonra lenfositler, altında ficoll-paque, bunun altında granülositler, en altta eritrositler bulunur.

- Puarlı bir pipetle lenfosit tabakası dikkatlice alınarak diğer bir tüpe aktarılır. Bu işlem sırasında serumun alınma-

sında sakınca yoktur. Ancak asla ficoll-paque alınmalıdır.

- Bu karışım üzerine bir kaç ml kompleman birleşmesi testi tampon solüsyonundan konulup 2500 devirde 7-8 dakika santrifüje edilir. Çökeleğin üzerindeki sıvı atılır.

- Bu işlem 3 kez tekrarlanarak lenfositler yıkanır her defasında hücreler süspansiyon haline getirilir.

- Son kez üst sıvı atıldıktan sonra lenfosit kümesinin büyüklüğüne göre 0,2-0,3 ml tampon solüsyon konarak hücreler süspansiyon haline getirilir.

- Sayma kamarası ile sayım yapılır. Canlı hücreler sayılmalıdır. Canlı hücreler ölü hücrelerden parlaklılarıyla ayrılırlar, gerektiğinde tripan mavisıyla boyanarak ölü oranı saptanabilir. Ölü hücreler % 10'u geçmemelidir. Sayılan hücre miktarına oranlanarak milimetreküpte 1000-2000 hücre olacak şekilde süspansiyon hazırlanır.

- Hazırlanan hücreler beklenmeden teste sokulmalıdır.

Çalışmamızda HLA-A,B ve C odaklarına ait sağlayabildiğimiz antiserumlarla 50 klinik tüberkülozlu, 50 de kontrol olmak üzere 100 kişinin HLA antijenlerini saptadık. Bu kişileri; askerlik görevini yapmak için yurdumuzun değişik yörelerinden gelen erlerden seçtik. Hem tüberkülozlu grubu, hemde kontrol grubunu 20-24 yaşlar arasındaki kişiler oluşturmaktadır.

Tüberkülozlu hastaların tümünü; balgamında tüberküloz basili çıkaran kişilerden seçtik. Kontrol grubumuzdakiler ise; mik-

roflim taramasından geçmiş, sağlıklı, hiç bir şikayeti olmayan erlerden seçildi.

C- LENFOSİTOKSİSİTE TESTİNİN YAPILIŞI :

- HAMILTON enjektörleri ve pipetler tampon solüsyonu ile defalarca yıkanarak temizlenir.

- Önceden hazırlanmış olan lenfosit süspansiyonundan her kuyucukta bulunan antiserum yanına 1 mikrolitre olmak üzere konur.

37 derecede 30 dakika enkübasyona bırakılır

- Enkübasyondan sonra 1 ml lik flakonlar halinde liyofilize edilmiş olan tavşan komplemanı 1 ml distile su ile sulandırılır ve bekletilmeden her kuyucuğa 5 er mikrolitre miktarında konur.

(Plakların hazırlanmasında ve test sırasında HAMILTON enjektörüyle kuyulara; antiserumlar, lenfosit süspansiyonu ve kompleman konurken bu maddeler yerine hava kabarcığı şırınga etmemeğe özen gösterilmelidir).

37 derecede 60 dakika enkübasyona bırakılır

D. PLAKLARIN BOYANMASI :

- Puarlı bir pastör pipeti aracılığıyla, sıvı parafin altındaki solüsyon sadece hücreler kalacak şekilde çekilir.

- Kuyucuklardaki parafin azalmışsa, plak dikkatlice yeniden parafinlenir.

- Her kuyucuktaki parafin altına 1 mikrolitre tripan mavisi solüsyonundan enjekte edilir.

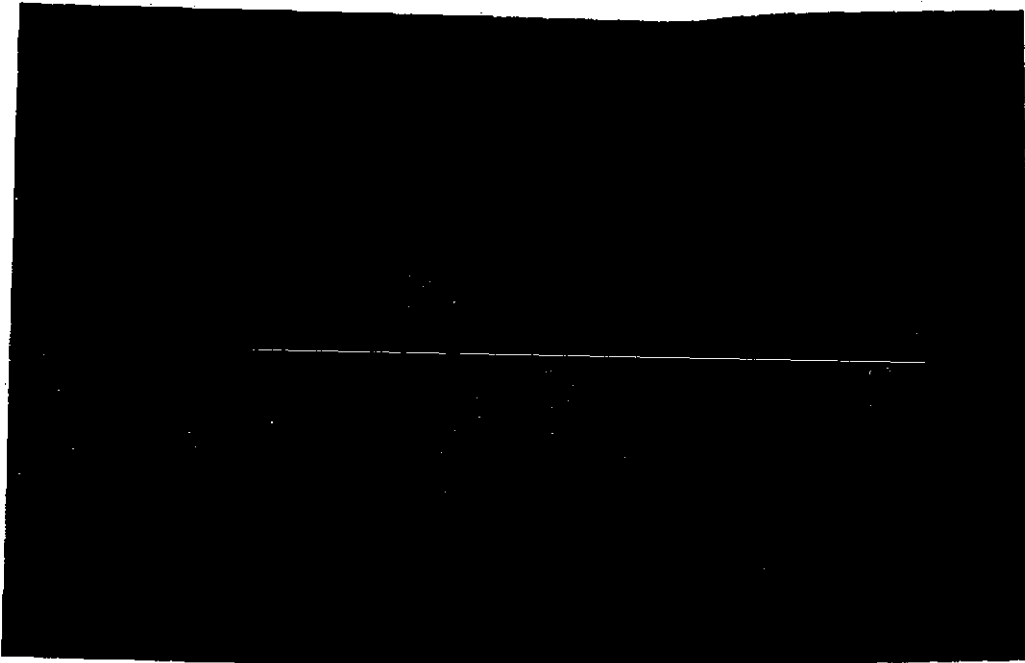
Oda ısısında 10 dakika bekletilir

- Değerlendirme işlemi doku kültürü mikroskobunda x20-x40 objektiflerle yapılır.

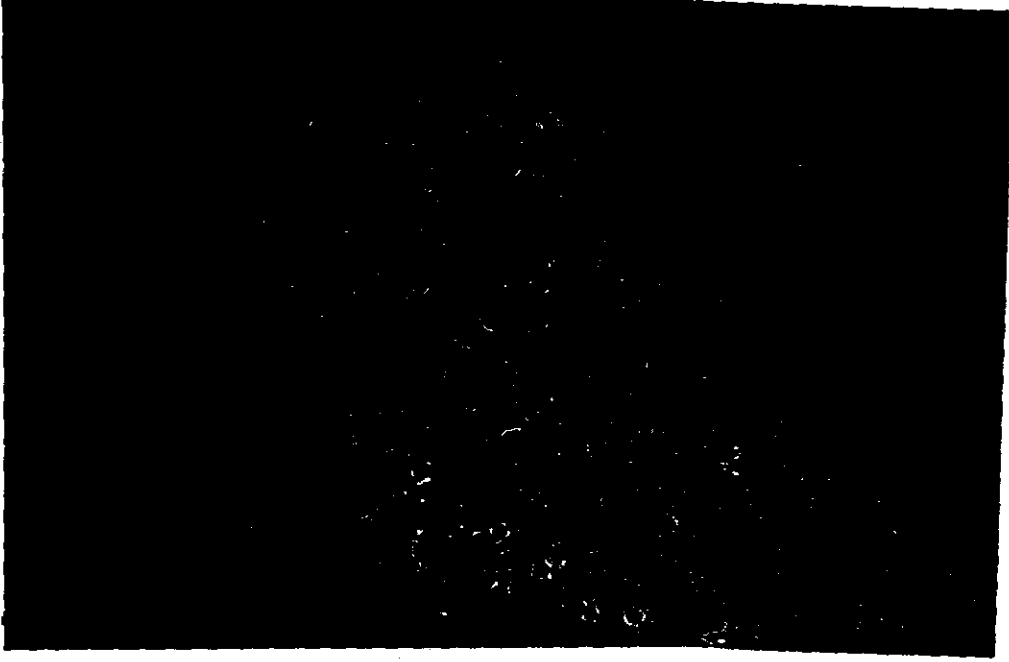
- Boyanmış hücreler ölü hücrelerdir. Daha büyük ve mat görünümde dirler (Resim : 1). Canlı hücreler; parlak, şeffaf, daha küçük ve boyanmamış olarak görülürler (Resim : 2)

- Değerlendirmeler pozitif ve negatif kontroller göz önüne alınarak yapılmalıdır.

- Çalışmamızda ölü hücre oranı % 75'in üstünde olan kuyucuklar pozitif olarak kabul edilmiştir.



Resim : 1- Mikroskopta pozitif bir kuyucuğun görünümü



Resim : 2- Mikroskopta negatif bir kuyucuğun görünümü

B U L G U L A R

Bu çalışmamızda HLA-A,B ve C odaklarına ait, sağlayabildiğimiz antiserumlarla; 50 klinik tüberkülozlu olguda ve 50 sağlam kontrolde olmak üzere toplam 100 kişinin HLA antijenlerini mikro lenfositotosisite yöntemi ile araştırdık.

Tüberkülozla olguların tümü daha evvel de belirtildiği gibi balgamında tüberküloz basili çıkan olgulardan seçilmiş ve röntgen filimleri çekilerek klinik tüberkülozun varlığı doğrulanmıştır. Keza kontrol grubunu oluşturan kişiler de mikroflim taramasından geçirilmiştir.

Kullanılan antiserumların bazılarının monovalan olmasına karşılık bazıları di ve trivalandır. Karşılaştırdığımız diğer araştırmacıların kullandığı antiserumlarda bu şekildedir ^{14,28}.

Tablo IV'te görüldüğü gibi, normallerde saptadığımız her antijenin sıklığı, diğer araştırmacıların bulguları ile kıyaslandığında; bazı antijenlerde farklılıklar bulunmasına karşın çoğunlukla bir paralellik gözlenmiştir. Normal popülasyonda HLA-A2 + A28 antijenleri % 40 ile en yüksek sıklıkta bulunmuştur. ÖZERKAN'ın bulguları bu sonucu doğrulamaktadır²⁸. Bununla birlikte HLA-B27 ve HLA-BW15 antijenleri % 6 ile en düşük sıklık gösteren antijenlerdir.

TABLO : IV. BAZI ARAŞTIRICILARIN TÜRK TOPLUMUNDAN ELDE ETTİĞİ NORMAL DEĞERLER VE ÇALIŞMAMIZIN SONUÇLARI

HLA Antijenleri	% Normaller			% Tbc.	Relatif Risk
	I (*)	II (**)	III (***)		
A1	17.1	30	12	12	1
A2	28.9	53	26	28	1.10
A2 + A28	11.8	53-16	40	44	1.17
A3	21	20	24	24	1
A9	18.4	18	22	20	0.88
A11	14.4	15	20	14	0.65
AW25	7.9	3	8	10	1.27
AW25 + AW26 + AW32	9.2		20	18	0.87
B5	43.4	27	14	24	1.93
B5 + BW35	19.7	27-17	32	26	0.74
B7	5.2	19	6	8	1.33
B7 + B27	13.1	19-16	20	18	0.87
B27	7.9	16	6	4	0.65
B8	11.8	11	8	10	1.27
B12	9.2	20	20	16	0.76
B13	7.9	10	16	12	0.71
B40 + B13	10.5	9-10	10	14	1.46
B14	11.8	11	8	6	0.73
BW15	7.9		6	18	3.43
BW17	6.5	9	16	10	0.58
BW37	15.7		18	12	0.62
CW3	3.9		10	6	0.57
CW4	28.9		30	44	1.88

(*) Dr.İ.Hakkı Dündar'ın çalışmasından alınan normal değerler

(**) Dr. Korkut Özerkan'ın çalışmasından alınan normal değerler

(***) Bizim çalışmamızdaki normal değerler

Nitekim DÜNDAR tarafından da bu antijenlerin sıklığı % 7,9 olarak saptanmıştır ¹⁴.

Elde ettiğimiz değerlere uygulanan ki-kare testi, sonuçların istatistiki açıdan değer taşımadığını açığa çıkarmıştır. Ancak antijenlerin sıklığı rölatif risk açısından incelendiğinde, BW15 antijeni 3,43 rölatif risk ile dikkat çekici bulunmuştur. Nitekim AL ARIF'de aynı antijenin rölatif riskini 7 olarak saptamıştır ³.

HLA-BW15 için saptadığımız rölatif risk; hastalıkla bu antijen arasında zayıf bir ilişkiyi göstermekle beraber literatür bulguları ve diğer antijenlerin rölatif risk oranlarının düşüklüğü dikkate alınınca; saptadığımız 3,43 lük rölatif riskin oldukça anlamlı bir sonuç olarak kabul edileceğine inanmaktayız.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kalıtımın hastalıklardaki rolü uzun yıllardan beri bilinmektedir. İkizler ve deney hayvanlarında yapılan araştırmalar tüberküloz hastalığında da genetik faktörlerin önemli olduğunu göstermiştir. Bir çok araştırmacı kalıtımla aktarıldığı bilinen kan grubu antijenlerinin tüberkülozdaki sıklığını araştırarak kalıtımın tüberküloz oluşumundaki yerini saptamaya çalışmışlardır. Günümüzde hastalıklarla genetik faktörlerin ilişkisini incelemek amacıyla HLA antijenlerine baş vurulmaktadır ^{4,34}.

Enfeksiyon hastalıklarının HLA ile ilişkisi çeşitli teorilerle açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlardan doğruluğu kabul edilen; Ir geninin HLA yakınında veya bitişiğinde olması teorisi-dir. Bazı araştırmacılar, Ir geninin D odağı veya B odağı bitişiğinde olabileceğini bildirmektedirler ⁴³. Bu taktirde, D veya B odağına ait antijenler bağışık yanıtın niceliğini belirleyen bir işaret olabilir. Bizim çalışmamızda da; HLA-BW15, klinik tüberküloz açısından en yüksek rölatif riske sahip antijen olarak saptanmıştır (Rölatif risk = 3,43). Bunun B odağına ait bir antijen olması belkide elde ettiğimiz bulguya daha fazla bir anlam kazandırmaktadır.

Bir diğer görüşe göre HLA antijenleri hücrede reseptör görevi yapmaktadır ³⁷. Makrofajlar tüberküloz basilinin yerleşip

üremek için seçtiği bir hücredir. DUFFY negatif kişilerin eritrositlerinde, plazmodyum falsiparuma özgü reseptör yokluğuna bağlı olarak; bu kişilerde tropikal sıtma görülmemektedir³⁷. Belki klinik tüberkülozda da buna benzer bir mekanizma rol oynamaktadır. Yani, bazı HLA antijenlerine sahip kişilerin makrofajlarındaki uygun reseptörler basilin hücreye kolayca girmesini sağlamaktadır.

Çalışmamızda HLA antijenlerini saptadığımız kişiler askerlik görevini yapmak amacıyla yurdumuzun dört bir yanından gelen erlerden seçildiği için; gerek kontrollerden, gerekse klinik tüberkülozlulardan elde ettiğimiz değerlerin, toplumumuzun gerçek değerlerine yakın bir nitelikte olduğuna inanmaktayız.

Tablo : III'te görüldüğü gibi hastalıkla HLA ilişkisi; çoğunlukla 3-15 arasında bir rölatif risk taşımaktadır. ZINKARNAGEL'e göre hastalıklarda 5 ten büyük rölatif riske sahip antijenler anlamlı, 2-5 arası ise az anlamlı rölatif riskli antijenler olarak kabul edilmektedir⁴³. Buna göre bizim çalışmamızdaki BW15 az anlamlı rölatif riskli antijen grubuna girmektedir.

Klinik tüberkülozda HLA antijenleri dağılımına ait çalışmalara göz atıldığında; ROZENTHALL, tüberkülozlularda HLA dağılımında bir farklılık gözlenmediğini, SELBY ve arkadaşları ise; tüberkülozlularda HLA-B8 antijeninin diğerlerine oranla daha yüksek bir sıklıkta saptandığını bildirmiştir. Tablo : III te görüldüğü gibi, HLA-B8 antijeni bir çok hastalıkta yüksek rölatif risk taşımaktadır. Bu nedenle; tüberküloz için sepsifik kabul edilmemesi gerekir. AL ARIEF ve arkadaşları, kuzey Amerikalı zencilerde yapti-

ğı araştırmada tüberkülozlularda HLA-BW15'i rölatif riski 7 olmak üzere yüksek bir sıklıkta bulmuştur ³. Her ne kadar alışmamızda BW15 antiijeninin rölatif riski AL ARIF'in sonuçları kadar yüksek değilsede; her iki çalışmanın, birbirini destekler nitelikte olmasının değer taşıdığına inanmaktayız.

Tüberkülozda humoral bağışıklığın önem taşımadığı bilinmektedir. Burada, önemli olan hücre sel bağışıklıktır. WOLF bazı HLA-D ve DR antiijenlerine sahip kişilerin hücre içi paraziti enfeksiyonlarına yakalanma açısından yüksek rölatif risk taşıdıklarını bildirmiştir. Bu araştırmacı HLA-D ve DR odağına ait genlerin T. lenfositlerin yeteneğini belirlediğine inanmaktadır ³⁷. AL ARIF'in çalışmasında D ve DR antiserumları kullanılmamıştır. Biz de D ve DR antiijenlerini saptama olanağı bulamadık. Bu nedenle AL ARIF'in de vurguladığı gibi, belkide HLA-BW15 klinik tüberküloza duyarlılığı gösteren ikincil bir işarettir.

HLA-BW15 konusunda kesin bir söz söyleyebilmek için; bu antiijene sahip tüberkülozluların ailelerinde HLA ve tüberküloz taraması yapmanın gerekli olduğuna inanmaktayız. Bizim alışmamızdaki BW15 lilerin aileleri uzakta olduğu için aile taraması yapılamadığı gibi, kendilerinden elde ettiğimiz bilgilerin yetersizliği nedeniyle bu konu değerlendirilememiştir. Ayrıca, konuya tam bir açıklık getirmek için ; Dünyadaki çeşitli etnik gruplar içindeki klinik tüberkülozlularda HLA dağılımını inceleyen ve bilinen bütün HLA antiijenlerini kapsayan araştırmalar yapmanın gerektiğine inanmaktayız.

Elde ettiğimiz değerlere uygulanan ki-kare testi; sonuçlarımızın, istatistiki açıdan anlamlı olmadığını açığa çıkarmıştır.

Daha çok kişiyi kapsayan çalışmaların, bu sakıncayı da ortadan kaldıracağını dūřunmekteyiz.

Bu gūn, ankilozon spondilitte HLA-B27 antijeni bir tanı kriteri gibi kabul edilmektedir. Tūberkūlozda her nekadard BW15 major bir tanı kriteri sayılmasa da, bu antijenesahip kiřilerin, tūberkūlozdan korunma açısından ōzenle takip edilmesinin yararlı olacađı kanısındayız.

Ö Z E T

Uzun yıllardan beri çeşitli hastalıklarda genetik predipozisyonun önemli olduğu bilinmektedir. Günümüzde kalıtımın en güzel işaretleri HLA antijenleridir. Bu nedenle; bir çok araştırmacı çeşitli hastalıklarda HLA antijenlerini araştırarak bu hastalıklarla genetiğin ilişkisini belirlemeye çalışmıştır. Ir geninin HLA odakları ile ilişkili olabileceği konusundaki varsayım enfeksiyon hastalıklarında da HLA antijenlerini araştırmayı caziphale getirmiştir. Bu bilginin ışığında, çeşitli enfeksiyon hastalıklarında HLA dağılımı araştırılırken, bir kaç araştırmacı da, tüberkülozlularda HLA antijenlerini incelemiştir.

Biz de, klinik tüberkülozda; HLA antijenlerinin dağılımını araştırarak, her antijene sahip kişinin tüberküloza yakalanma açısından taşıdığı rölatif riski saptamayı amaçladık. Bu amaçla, aynı yaş grubundan olmak üzere sağlıklı 50 kişi ile, klinik tüberkülozlu 50 kişide TERASAKI'nin mikro lenfositotoksisite testini uygulayarak HLA-A, B, C odaklarına ait antijenleri araştırdık.

Sonuçlarımız rölatif risk açısından değerlendirildiğinde; 3,43 ile, HLA-BW15 en yüksek rölatif riskli antijen olarak bulunmuştur. Nitekim AL ARIF'te tüberkülozda aynı antijenin rölatif riskini 7 olarak bildirmiştir. Her ne kadar elde ettiğimiz rölatif risk, AL ARIF'inki kadar yüksek değilse de iki çalışmanın birbirini destekler nitelikte olması anlamlıdır.

Sonuçta; HLA-BW15 antijenine sahip kişilerin diğerlerine oranla; tüberküloza daha yatkın oldukları göz önüne alınarak, tüberkülozdan korunma açısından daha dikkatli takip edilmelerinin gerekli olduğu kanısındayız. Ayrıca, Dünyadaki çeşitli gruplar içindeki tüberkülozlularda bilinen tüm HLA antiserumları ile çok kişiyi kapsayan araştırmaların yanında HLA-BW15 antijenine sahip tüberkülozluların ailelerinde HLA ve tüberküloz taraması yapmanın konuya daha fazla açıklık getireceğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- 1- AGBEDOR A., JOHANNES D.: The HL-A System and Tissue Typing.
Laboratory Notes for Medical Diagnostics. Behring Institute
1976.
- 2- AKMAN M., GÜLMEZOĞLU E.: Tıbbi Mikrobiyoloji. II. Baskı
Hacettepe Üniversitesi yayınları (A-15) 1976; 325-35.
- 3- AL-ARIF L.I., GOLDSTEIN R.A., AFFRONTI L.F., JANICKI B.W.:
HLA-BW15 and Tuberculosis in a North American Black
population. Am. Rev. Resp. Dis. 120: 1275-78, 1979.
- 4- BATES J.H.: Tuberculosis : Susceptibility and Resistans Am.
Rev. Resp. Dis 125 (3) : 20-24, 1982.
- 5- BODMER W.F.: The HLA System Intraduction. British Med. Bul.
34 (3) : 213-16, 1978.
- 6- BRIGHT S., MURNO A.: The Major Histocompatibility System.
The Immune System-a course on the molecular an cellular
basis of immunity- Edited By HOBART M.J. and Mc CONNELL I. Black
well Sci. Pub. 1975; 228-38.

- 7- CALDWELL J.L.: Genetic Regulation of Immune Responses, Basic and Clinical Immunology. Second Ed. Edited By. FUDENBERG H.H., STITES D.D. Lange Medical Publication 1978; 155-64.
- 8- COLLINS F.M.: The Immunology of Tuberculosis. Am. Rev. Resp. Dis. 125 (3): 42-49, 1982.
- 9- COMSTOCK G.W.: Epidemiology of Tuberculosis Am. Rev. Resp. Dis. 125(3): 8-15, 1982.
- 10- CRUCKSHANK R., DUGUID J.P., MARMIRON B.P., SWAIN RHA.: Medical Microbiology. Volume I Twelfth Ed. Churchill Livingstone Edinburgh and London 1973; 285-88.
- 11- DANIEL TM.: Robert Koch, Tuberculosis, and the Sub-sequent History of Medicine 125(3):1-5, 1982.
- 12- DES PREZ R.: Diseases Due to Mycobacteria. Cecil Textbook of Medicine. Fifteenth Ed. Edited By. BEESON P.B., Mc DERMOTT W., WYNGAARDEN J.B. W.B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto 1979; 479-84.
- 13- DRUTZ D., GRAYBILL J.R.: Tüberculosis, Basic and Clinical Immunology Second Ed. Edited By. FUNDENBERG H.H., STITES D.D.: Lange Medical Publication 1978; 607-608.
- 14- DÜNDAR I.H.: Hepatitlerin kronikleşmesi ile Doku Uygunluk Anti-jenlerinin ilişkisi. G.A.T.A. Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği. Doçentlik Tezi. 1979; 5-70.
- 15- ERSOY F., BERKEL A.İ., FIRAT T., KAZAKOĞLU, H.: Behçet Hastalığında Doku Grupları (HL-A) İmmünoloji, III. Ulusal Imm. Kong. Aralık-1976; 10-16.

- 16- GRAZYBOWSKI S.: Impact of Tuberculosis on Human Health in the World. Am. Rev. Resp. Dis. 125(3):125-26,1982.
- 17- GÜLMEZOĞLU E.: Bağışıklığın temelleri. 2 nci Baskı. Hacettepe Üniversitesi yayınları (A-16) 1979; 13-15, 155-157.
- 18- HARRIS R.: HL-A and Disease. The Immune System-a course on the molecular an cellular basis of immunity- EditedBy. HOBART MJ. and Mc CONNELL I. Blackwell Sci. Pub. 1975; 261-71.
- 19- HOBART MJ. Mc CONNELL I.: Immunogenetics. The Immune System-a course on the molecular and cellular basis of immunity- EditedBy. HOBART MJ. and Mc CONNELL I. Blackwell Sci.Pub. 1975; 225-27.
- 20- JR DANNEBERG A.M. : Patogenesis of Pulmonary Tüberculosis. Am. Rev. Resp. Dis. 125(3): 25-29,1982.
- 21- KISSMEYER F.: The HLA System an Overview. Triangle. 20(3): 59-69, 1981.
- 22- KÖKSAL, A.: İdiyopatik, Tekrarlayan, Spontan Abortus ile HLA Antijenlerinin İlişkisi. G.A.T.A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği. Doçentlik Tezi. 1980; 3-16.
- 23- Mc DEVITT O.H., BODMER W.F.: HLA, Immun Response Genes and Disease. The Lancet. 1: 1269-1274,1974.
- 24- MEYERS-ELLIOTT R.H., ELLIOT J.H., MAXWELL W.A., PETTIT T.H., O'DAY D.M., TERASAKI, P.I., BERNACO, D.: HLA Antigens in Recurrent Stromal Herpes Simplex Virus Keratitis. Am. Jour. Opht. 89: 54-57,1982.

- 25- MIDDLEBROOK G.: Tüberculosis and Medical Science Am. Rev. Resp. Dis. 125 (3): 5-7, 1982.
- 26- MITTAL K.K., MICKEY M.R., SINGAL D.P., TERESAKI, P.I.: Serotyping for Homotransplantation. Transplantation 6(8): 913-27, 1968.
- 27- OHNO S., NAKAYAMA E., SIGIURA S., ITAKURA K., AOKI K., AIZAWA M.: Spesific Histocompatibility Antigens Associated With Behçet's Disease Am. Jour. Opht. 80(4): 636-40, 1975.
- 28- ÖZERKAN, K.: Türkiye'de Doku Antijenleri. Hacettepe Tıp/Cerrahi Bülteni, 7:83-100, 1974.
- 29- PERKINS H.A.: The Human Major Histocompatibility Complex (MHC) Basic and Clinical Immunology. Second Ed. Edited By FUDENBERG H.H., STITES DD. Lange Medical Publication 1978; 165-74.
- 30- RILEY R.L.: Disease Transmission and Contagion Control. Am. Rev. Resp. Dis. 125(3): 16-19, 1982.
- 31- ROITT, I.: Essential Immunology. Third Ed. Blackwell Scient Publ. 1977; 225-63.
- 32- SACHS J.A., CUDWORTH A.G., JARAQUEMADA D., GORSUCH A.N., FESTENSTEIN H.: Type I Diabetes and the HLA-D Locus. Diabetologia. 18:41-43, 1980.
- 33- TANGÜN Y.: Doku Grupları (HLA Sistemi). Temel ve Klinik İmmünoloji. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Ders Kitapları Cilt 16. Sanal Matbaacılık İstanbul. 1981; 46-53.

- 34- TEZOK ÖF. Genetikte Temel Prensipler ve İnsan Genetiğindeki Değerlendirilmeleri. Çelik Cilt Matbaası İstanbul 1977; 369,432-33.
- 35- VİDİNEL İ.: Akciğer Hastalıkları II. Baskı. Ege Üniversitesi Matbaası Bornova 1975; 190-203.
- 36- VRIES RRP., VANROOD JJ. Views and Concepts. HLA and Infections Diseases. Arch. Dermatol Res. 264: 89-95,1979.
- 37- WOLF WC., DUPONT D., YUNIS EJ. HLA and Disease : Current Concepts. Human Pathol. 11(4):332-36,1980.
- 38- YAZICI DH., AKOKAN G.: Romatizmal Hastalıklar ve Doku Antijenleri. İmmünoloji. III. Ulusal İmm. Kong. Aralık-1976;;219-24.
- 39- YAZICI DH., AKOKAN G., MÜFTÜOĞLU A.: Behçet Hastalığı ve Doku Antijenleri. İmmünoloji. III. Ulusal İmm. Kong. Aralık-1976; 8-9.
- 40- YAZICI D.H., CHAMBERLAIN M.A., SCHREUDER T., D'AMARO J., MÜFTÜOĞLU M.: HLA Antigens in Behçet's Disease: a reappraisal by a comparative study of Turkish and British patients Ann. Rheum. Dis. 39 : 344-48, 1980.
- 41- YAZICIOĞLU S.: Tüberküloz Teşhis ve Tedavi. Diyarbakır Üniversitesi Basımevi. 1981; 31-38.
- 42- ZERVAS J., VALASSI-ADAM H., CONSTANDOPOULOS C.: Histocompatibility Leukocyte Antigens in Children With Meningococcal Meningitis. The Jour. Infect. Dis. 6:854,1981.

- 43- ZINKERNAGE R.M.: Associations Between Major Histocompatibility Antigenes and Susceptibility to Disease Ann. Rev. Microbiol. 33: 201-13,1979.