

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

91993

AKTİF TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA  
TEDAVİ ÖNCESİ VE TEDAVİ SÜRESİNCE  
IFN-GAMMA VE IL-2 DÜZEYLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU  
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Mustafa BERKTAŞ

VAN-2000

**I.C. YÜKSEKÖĞRETİM  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**1. ÖNSÖZ**

Tüm asistanlık sürem boyunca yardımlarını esirgemeyen Temel Bilimler ve Anabilim Dalı Başkanımız sayın **Prof. Dr. A. Enes DALKILIÇ** başta olmak üzere, bu çalışmanın hazırlanmasında her konuda büyük destek ve özverilerde bulunarak canla başla çalışan tez yöneticim sayın **Doç. Dr. Mustafa BERKTAŞ**'a, asistanlık eğitimimde katkıları bulunan sayın **Yrd. Doç. Dr. Hamza BOZKURT**'a ve **Uz. Dr. Tevfik YAVUZ**'a, çalışmamdaki ELISA deneylerinde yardımcı olan sayın **Bio. Şafak ANDIÇ**'e, serumların toplanmasında büyük gayret gösteren Van Verem Savaş Dispanseri personeline, fakültemizdeki Göğüs Hastalıkları bölümündeki asistanlara ve laboratuvarımızdaki tüm çalışma arkadaşlarım ile sayın **Hikmet SÖYLER**'e teşekkürlerimi bildirmeyi bir borç bilirim.

**Dr.Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU**

9/993

## 2. ÖZET

Bu çalışma aktif tüberkülozlu hastalarda, hastaların klinik seyri sırasında hücrel immünite göstergeleri olan sitokinlerin nasıl bir değişim gösterdiğini incelemek amacıyla planlanmıştır.

Bu nedenle 18 aktif tüberküloz hastasından, tedavinin başında ve iki aylık süre sonunda, kan örnekleri alınarak, ELISA yöntemiyle serumlarında IL-2 ve IFN- $\gamma$  seviyelerine bakılmıştır.

Yapılan araştırma sonucunda; hastalardan tedavi öncesi alınan ilk serum örneklerinde IL-2'nin 15-980 pg/ml, ikinci serum örneklerinde ise 15-490 pg/ml arasında olduğu, IFN- $\gamma$  için ilk serumlarda 15-22,2 pg/ml, ikinci serumlarda ise 15-28.5 pg/ml arasında olduğu saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre, iki sitokinden IFN- $\gamma$ 'nın tedavi öncesi ve iki aylık tedavi sonrası ölçülen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ( $p > 0.05$ ), IL-2 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ).

Aktif tüberkülozlu hastalarda IL-2 seviyelerinde tedavinin ikinci ayında alınan değerlerin, tedavi öncesi değerlere göre bariz olarak azaldığı; fakat IFN- $\gamma$  seviyesinde, tedavi öncesi ve iki aylık tedavi sonrasında anlamlı bir değişikliğin olmadığı sonucuna varılmıştır.

### 3. SUMMARY

This study was planned in order to investigate the change of the cytokines, which are signs of cell mediated immunity, during the clinical course of active tuberculosis.

For this purpose, blood samples were drawn from 18 patients with active tuberculosis at the therapy beginning and two months after therapy and the IL-2 and IFN- $\gamma$  levels were evaluated with the ELISA method.

In the result of the study, IL-2 levels in pre-treatment serum samples of the patients was found to be 15-980 pq/ml, and in second serum samples 15-490 pq/ml; IFN- $\gamma$  in pre-treatment serum samples 15-22.2 pq/ml and in second serum samples 15-28.5 pq/ml.

The cytokine IFN- $\gamma$  didn't change statistically ( $p>0.05$ ) before therapy and after two months of therapy, but the other investigated cytokine IL-2 changed statistically considerably ( $p<0.01$ ).

In conclusion, IL-2 levels of patients with active tuberculosis decreased significantly after two months of therapy, but the levels of IFN- $\gamma$  didn't change.

#### 4. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (tb) bugün hala dünyada hayatı tehdit eden en önemli bakteri hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ile Tüberküloz ve Akciğer Hastalıkları Uluslararası Federasyonu (IUATLD)'nun saptamalarına göre, çoğu üçüncü dünya ülkelerinde olmak üzere dünyada yaklaşık bir milyar yediyüz milyon kişi *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb) ile enfektedir (1).

Basili taşıyanların 20 milyonu aktif tb'ludur. Bunların yılda üç milyondan fazlası ölmektedir. Her yıl sekiz milyon yeni tb vakası ortaya çıkmaktadır ve bunların üç milyonu bulaştırıcıdır. Coğrafi dağılım düzensizdir; en yüksek hasta sayısı Asya'da bulunmaktadır. Tüberküloz tüm dünyada tek başına ölüme neden olan hastalıkların başında gelmektedir. Bazı Avrupa ülkelerinde, son yıllarda tb vakalarının arttığı görülmektedir. Tb enfeksiyonlarına karşı savunmasız bir vücut yapısına sahip olan HIV virüsü taşıyan insanların sayısındaki artış ve tb vakalarının yoğun ilaç tedavisine zor cevap vermesi, bu vakaların yayılmasına sebebiyet vermektedir. 1882 yılında Koch tarafından tb'un sebebinin açıklanmasından beri hastalık en önemli sağlık problemi olarak kalmaya ve dünyanın en çok zarar gördüğü hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir (2).

Bu yüzyılın ikinci yarısında kemoterapi etkisiyle endüstrileşmiş ülkelerde tb morbidite ve mortalitesinde anlamlı bir düşüş olmuştur (1,3).

1994'de DSÖ, üç milyondan fazla yeni tb olgusu bildirmiş olup olguların dörtte biri Asya ve Afrika kökenlidir. DSÖ'ne göre tb hastalarının %95'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. DSÖ, tb'u 'dünya çapında acil durum' olarak ilan etmiştir; gelecek 10 yılda 30 milyondan çok insanın tb'dan öleceği tahmin edilmektedir (1).

Tb ve HIV'in birlikte görülmesi, bazı ülkelerde tb insidansında belirgin artışa neden olmuştur. Bağışıklık sistemini bozma yeteneğinden dolayı HIV, tb enfeksiyonunun hastalığa dönüşmesinde belirgin bir risk faktörüdür. Dünyada (çoğu Afrikada olmak üzere) beş milyon insanın HIV+M.tb ile enfekte olduğu hesaplanmıştır(1). HIV-pozitif ve tüberkülin-pozitif olan kişilerin aktif hastalık geliştirme riskinin yılda % 7-10, HIV negatif tb'lularda ise hayat boyu % 5-10 olduğu saptanmıştır. Nozokomiyal salgınlardaki olguların % 80'inden fazlası HIV ile enfekte kişilerdir (1).

Tb'de yeni korku, çoğul dirençli (MDR) M.tb olmuştur. Bu suşlar rifampin ve izoniazid (INH)'e dirençlidir. Tb'de HIV ile birlikte çoğul ilaç direnci görülmemiştir. Daha

önceden MDR-tb yavaş ilerleyici, genellikle akciğerle sınırlı iken, HIV' li kişilerde sistemik, zor tedavi edilebilen ve erken mortalite gösteren bir şekildedir (1).

Uygunsuz antitüberküloz ilaç kullanımına bağlı olarak MDR-tb salgınları bildirilmiştir. MDR-tb prevalansı, standardize edilmiş kemoterapi rejimlerinin kullanılmadığı ülkelerde daha yüksektir. Tb programının iyi ve etkili uygulandığı ülkelerde yeni hastalar arasındaki MDR prevalansı % 1'in altındadır (1)

Direnç oluşumunun engellenmesinde birinci koşul, hastaların düzenli ilaç almalarını sağlamaktır (1).

Bu medikal problemin şiddetine rağmen, M.tb ajanlarına karşı immün koruyucu mekanizma insanlarda tam olarak açıklanamamıştır. Hayvan modellerinde M.tb'a bağlı ajanlara karşı, koruyucu immün savunma, acilen CD4+ T lenfositlerinden sitokinlerin üretimi ve aktive makrofajlarla hücre içi mikobakterilerin öldürülmesidir. Tüberkülozda vücut savunmasında çok yaygın bir antikor yanıtı oluşmaktadır, ama bunun konakçıda herhangi bir yararının olmadığı görülmüştür (4,5).

Çalışma, alınan çeşitli önlemler ve teknolojik gelişmelere uygun olarak bir ara insidansında belirgin azalma gözlenen tb enfeksiyonlarının giderek daha fazla önem kazanmaya başlaması nedeniyle bu enfeksiyonların seyrinde hücrel immunitenin rolünün araştırılması amacıyla planlanmıştır.

## 5. GENEL BİLGİLER

Tb hastalığı günümüzde o kadar ilerlemiştir ki, neredeyse kontrol edilemez hale gelmiştir. İnfeksiyonun yaygınlığı, mikroorganizmanın konak savunmasından kaçarak, makrofajlara girip hücre içinde yaşamasından ileri gelir. HeLa hücrelerini istila edebilmesi dikkate alınırsa M.tb'un memeli hücrelerine girebilmesi için sadece bakteriyel faktörlerin yeterli olduğu anlaşılmaktadır (6-8).

Genus içinde yer alan bakterilerin, boyanma karakterleri, en belirgin özelliklerinden birisidir. Hücre duvar yapılarında bol miktarda lipid bulunduğu için, boyayı zor alırlar; ancak bir defa boyandıklarında boyayı kolay kolay bırakmaz ve asit-alkol karışımı ile yapılan dekolorizasyona direnç gösterirler. Bu nedenle aside dirençli bakteriler (ARB) olarak anılırlar. Bakteri kolonisinden hazırlanan preparatlarda sıklıkla granüler veya boncuk dizisi şeklinde, düzensiz boyanmış olarak görülürler. Bazı türler ise aside duyarlıdır. M.tb, silindir şeklinde, uçları yuvarlak, 0.3-0.6 µm. boyunda, düz veya hafif kıvrık, ince bir basildir. Eski kültürlerden ve kazeöz lenf bezlerinden yapılan preparatlarda dallanmış, filamentöz veya kokoidal formda görülebilir. Klinik örneklerde tek tek veya ikili üçlü küçük gruplar halinde bulunur. *M. bovis* ise daha kalın ve kısadır. Bazen nokta gibi granüllü, bazen uzun şekillerde görülür (9,10).

M.tb, hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür. Hücre duvar yapısının büyük bölümünü oluşturan lipidlerin hidrofobik özelliğinden dolayı bakteriyolojik boyalarla zor boyanırlar. Yeni lezyonlardan ve genç kültürlerden gram ile hazırlanan preparatlarda bazen çok zayıf ve düzensiz olarak boyanabilirse de *Mycobacterium*(Myc)'ların gram boyanma özelliklerinden bahsedilemez. M. tb, aside ve alkole dirençli bir bakteridir (11).

Laboratuvara getirilen materyal asit-fast boyası ile boyanmaktadır. Pozitif sonuçların değerlendirilmesi için karbolfüksin boyasını (Ziehl-Neelsen veya kinyoun) takiben yapılan auramine O boyası en çok kullanılan tekniktir. Bir çok laboratuvar mikobakteriyel hücrenin konsantrasyonunu sağlamak için NaCl-NaOH ile balgam örneğinin dekontaminasyon ve sindirim işlemini gerçekleştirmektedirler. Bu işlemlerden sonra sindirilmiş balgam örneği sıvı besiyerine ve Löwenstein-Jensen kültürüne veya Middlebrook agara ekilebilmektedir. Sıvı kültürlerinde BACTEC 460 cihazı, Septi-Check veya MGIT kültür sistemleri kullanılabilir (11).

Bakteri hücre duvarındaki yüksek konsantrasyondaki lipid oranı, güçlü asit ve alkali solüsyonlarına karşı bakteriyi örnekteki diğer patojenlere karşı daha rezistan hale getirmektedir (11).

### 5.1. *M. tuberculosis*' in Hücre Yapısı

**5.1.1. Sitoplazmik Zar:** Elektron Mikroskopi (EM) çalışmaları stoplazmik zarın iki elektron yoğun tabaka ve arada transparan bir bölge görüntüsü ile klasik iki tabakalı (bilayer) stoplazmik zar görünümüne benzerlik gösterdiği ortaya koymaktadır. Sitoplazmik zarın iki tabakasının simetrik olmadığı, dıştaki elektron yoğun tabakanın daha kalın olduğu gözlemlenmiştir. Bu kalınlığın karbonhidratlar, muhtemelen fosfatidil inozitol, mannozidler ve lipoarabinomannan moleküllerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Sitoplazmik zarın lipid yapısında; kardiolipin, fosfatidiletanolamin; tri-, tetra-, penta-, açılmiş monofosfoinositollerin bulunduğu gösterilmiştir (12).

**5.1.2. Bakteri Hücre Duvarı:** Duvar yapısının ana iskeletini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. Bu yapıya arabinogalaktan molekülleri fosfodiester bağları ile bağlanmakta, ucunda da mikolik asitler yer almaktadır. Mikolik asitler ise değişik lipid, glikolipit ve bazı proteinler ile sonlanmaktadır. Ayrıca Paul Beveridge'ye göre(1992); duvar yapısı, en içte bir elektron yoğun tabaka, ortada elektron transparan tabaka, en dışta elektron opak tabaka içerir (12).

**5.1.2.1. Elektron yoğun tabaka:** Bu tabaka en içte yer alır ve temel yapısı peptidoglikandır. Bu yapıda N-asetil glikozamin(NAGA) ve N-asetilmuramik (NAMA) asitler, beta 1-4 bağları ile bağlanarak temel yapıyı oluştururlar. Myc'da N-asetil muramik asit yerine N-glikolil muramik asit (NGMA) yer alır. Glikolil yapısı nedeniyle bakteri lizozoma dirençlidir. Peptidoglikan yapısının tetrapeptid yan zincirinin 3. pozisyonunda diaminopimelik asit (DAP) yer alır. DAP'in karboksil grubunun metal iyonlarını bağladığı ve elektron yoğunluğun bu yapı ile ilgili olduğu düşünülmektedir (12).

Myc'lerin antijen yapılarından biri de 65 kDa antijeni olup bu protein ısı ve şok proteinlerinden biridir. Hayvanlarda geç tip aşırı duyarlılığa neden olmaktadır. Otoimmün hastalıklarda da rol oynamaktadır. Bu otoimmün yanıt insan doku antijenleri ile çapraz reaksiyon vermesinden kaynaklanmaktadır (12).



Peptidoglikana bağlı olarak çeşitli aminoasitler yer alır. Bu aminoasitlerin oranının %15'ler dolayında olduğu ortaya konmuştur. Egemen olan aminoasit poly-alfa-I-glutamate'dır. Peptidoglikana kovalent bağla bağlanır. Bu aminoasidin inklüzyon cismi olarak işlev görebileceği düşünölmektedir. Deterjan ve bir çok solventte özünmez. Duvar yapısında yer alan proteinler nedeniyle, hücre duvarına etkili olabilmek için önce proteazlar ile işlem gerekir. Ayrıca triflorometanosulfanik asit glikozit bağlarına selektif olarak etkilidir (12).

**5.1.2.2. Elektron transparan tabaka:** Orta tabakadır. Arabinogalaktonmikolat moleküllerinden oluşur. Hücre duvar kütesinin % 35'ini oluşturur. Koruyucu bariyer görevi görür. Güçlü hidrofobiktir. Bu özelliği nedeniyle suda eriyen boyalar penetre olamaz, ayrıca elektron mikroskopta kullanılan boyalar ile de boyanmadığı için elektron transparan olarak görülür. Kuvvetle immunojenidir. Esnek moleküler yapıları nedeniyle bakterinin gerek immunojen gerekse de porin yapısında yer alarak önemli özellik kazandırdığı kabul edilmektedir. Mikolatın ayrılması durumunda peptidoglikan ve arabinogalakton gümüş ile boyanabilir, çünkü mikolat, boyanın arabinogalaktona ulaşmasına engel olur (12).

**5.1.2.3. Elektron opak tabaka:** Kalınlık ve elektron dansite yönünden farklılık gösterebilir. Fibriler, granüler veya homojen yapıda olabilir. Bu durum, hazırlama ve boyama yöntemleri, üreme koşulları veya tür farkına bağlı olabilir. Dış tabakanın yapısında temel elemanın mikolik asit olduğu bilinmektedir. Mikolik asitler, yüksek moleköl ağırlıklı alfa-alkil, beta-hidroksi yağ asitleridir. R1 ve R2 olarak iki önemli radikali vardır. R1, 22-24 karbonlu ve linear yapıdadır. R2 ise ortalama 60 karbonlu kompleks bir yapı gösterir (12).

Mikobakteriyel mikolik asitler, 70-90 karbonlu olan en büyük mikolik asitlerdir. Yan zincirleri 20-24 karbonlu olup en uzun yan zincirlerdir. Ana iskeletten metil dalları ile ayrılır ve ansatüre kısımları vardır. Hidrokarbon zincirlerinin birbirine paralel olarak yerleştiği ve metil uçlarının hücre yüzeyine doğru uzandığı kabul edilmektedir. Bu yapılanma bakterinin hidrofobik özelliğini, ayrıca stabilize edici bir ajan olmadan sıvı ortamda kümelenme, diğer bir deyişle, granüler üreme özelliklerini açıklamaktadır (12).

Hücre zarfında yer alan 2. büyük ve önemli molekül lipoarabinomannan (LAM)dır. *M. tb* ve *Mycobacterium lepra*'nın önemli antijenlerindedir. Antijenik özelliği, arabinoz ünitelerinin sağladığı gösterilmiştir. LAM'ın varlığı *M.tb*'de bir virulans faktörü olarak kabul edilmemektedir. Ancak konak immün yanıtında önemli olduğu, çünkü makrofajda bakterinin yaşamını sürdürmesine yardımcı olduğu kabul edilmektedir (12,14,15).

**5.1.3. Lipitler:** *Mycobacterium*'ların pekçok özellikli komponentleri arasında, lipitlerin diğer bakteriler ile kıyaslandığında ayrı bir yeri olduğu görülür. *Myc*'lar yüksek oranda lipit içermektedir ve doku proteazlarına karşı dirençlidirler. Aside dirençliliği onu proteolitik enzimlerden korumaktadır. Başlıca lipitleri; mikolik asit, balmumu, fosfolipitler, trehalozlar, glikolipitler, lipoglikan ve lipoproteinlerdir (12,14).

#### **5.1.4. Trehalozlar:**

**5.1.4.1. Kord faktörü:** Trehaloz-6-6'-dimikolat yapısındadır. Kord faktörü ile ilgili çeşitli biyolojik aktiviteler tanımlanmıştır. Tüberküloza karşı bağışıklığın, basilin ribonükleik asidi (RNA) ile meydana geldiği, aşırı duyarlılığın ise tüberkülo-protein antijeni ile geliştiği gösterilmiştir. Bunların çoğu sitokin salınımına bağlı olaylardır. Başlıcaları; sistemik toksisite, makrofaj kemotaktik faktörlerin salınımı, lökosit migrasyon inhibisyonu olarak sıralanabilir (12,16,17).

**5.1.4.2. Sulfolipitler:** Virulans derecesi ve sulfolipit arasındaki ilişkinin, fagosom aktivasyonunu inhibe ederek bakterinin intrasellüler yaşamını sürdürmesine katkıda bulunduğu söylenebilir (12).

**5.1.4.3. Mikolipenik asit:** Sadece virulan suşlar tarafından oluşturulur. Lökosit migrasyonunu önemli oranda azaltır. Çok dallı yapısı nedeniyle esterlerin hidrolizi güçtür, bu nedenle bakteri, konağın katabolizmasından korunur (12).

**5.1.4.4. Lipoglikanlar:** Lipit taşıyıcısı olarak işlev görerek uzun zincirli yağ asitlerinin sentezine olanak sağlar (12).

### 5.1.5. Glikolipitler:

**5.1.5.1. Lipooligosakkaritler:** Lipooligosakkaritler, serovarların dominant epitoplarını oluşturur ve önemli yüzey antijenleridir. *M. smegmatis* ve *M. kansasii*' de tam olarak tanımlanmıştır (12).

**5.1.5.2. Fenolikglikolipitler:** Glikozil üniteleri, Myc'lara tür ve antijenik özelliğini verirler (12).

**5.1.5.3. Polar glikopeptidolipitler:** Mikosit C yapısındadır. Kısa bir oligosakkarit molekülü haptenik özelliğini sağlar. *M. avium*'da iyi tanımlanmıştır (12).

**5.1.6. Protein ve antijenler:** Purified Protein Derivative (PPD), hücre duvarında proteinlerde yer almaktadır. Bir takım önemli işlevleri vardır. Başlıcaları; hücre bölünmesinde rol alan enzimler ve duvar polimerlerinin sentezinde yer almak, atıkların hücre duvarından geçişinde rol oynamak, porinleri oluşturmak ve antijenik özellik sağlamak olarak özetlenebilir (12).

## 5.2. *Mycobacterium*'ların Sınıflandırılması

Günümüzde tüberkülozu sınıflandırabilmek için bir çok yöntem düşünülmüş olup, bunlardan biri, insanda oluşturduğu hastalığın türü ve şiddetine göre, diğeri ise kültürde üreme özelliklerine göre yapılan sınıflandırmadır.

Bunlardan Runyon'un sınıflandırması Myc'ların besiyerinde ışıқта ve karanlıkta üremelerine ve hızlarına göre yapılmıştır (11).

**Tablo 5.1. *Mycobacterium*'ların Runyon'a göre klasifikasyonu.**

RUNYON'un klasifikasyon şeması:
<b>Grup I - Fotokromojenler</b> : Işığa gereksinim duyar ve sarı renkte koloni oluştururlar.
<b>Grup II- Skotokromojenler:</b> Işığa gereksinim duymaz ve kavuniçi renkte koloni oluştururlar.
<b>Grup III- Nonfotokromojenler:</b> Büyümesi ışıkla ilgili olmayanlar.
<b>Grup IV- Hızlı büyüyenler.</b>

Tüberküloz kompleksini oluşturan Myc'lar ile diğer Myc'ların grup içerikleri Tablo 5.2'de verilmiştir (11).

**Tablo 5.2. *Mycobacterium*'larda tasnif edilen bazı türler.**

<b>Tasnif Edilen Bazı suşları:</b>
<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi</b>
<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. bovis</i>
<i>M. africanum</i>
<i>M. ulcerans</i>
<b>Fotokromojenler</b>
<i>M. kansasii</i>
<i>M. marinum</i>
<i>M. simiae</i>
<i>M. genevansense</i>
<i>M. asiaticum</i>
<b>Skotokromojenler</b>
<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. szulgai</i>
<i>M. xenopi</i>
<i>M. celatum</i>
<i>M. gordonae</i>
<i>M. flavescens</i>
<b>Nonfotokromojenler</b>
<i>M. avium/intracellulare complex</i>
<i>M. paratuberculosis</i>
<i>M. terrae-triviale</i>
<i>M. shimoidae</i>
<b>Hızlı büyüyenler</b>
<i>M. fortuitum/chelonea complex</i>
<i>M. thermoresistibile</i>

**Tablo 5.3. Bazı *Mycobacterium*'ların Özellikleri.**

İsim	Patojenite	Grubu	Özelliği
<i>M.tuberculosis</i>	+++		İnsan tüberkülozu sebebi, oldukça bulaştırıcı
<i>M.bovis</i>	+++		Sığır ve insan tüberküloz etkeni, avirulan suşları BCG aşısı için kullanılmaktadır.
<i>M.ulcerans</i>	+++		Cilt enfeksiyonu ile ilişkilidir.
<i>M.africanum</i>	+++		<i>M.bovis</i> ile <i>M.tuberculosis</i> arasında bir formdur.
<i>M.kansasii</i>	+++	I-FC	Nadir, pigmentsiz, skotokromojenik ve niacin +
<i>M.marinum</i>	+++	I-FC	<i>M.balnei</i> ve <i>M.platypeoclus</i> ile ilişkili cilt enfeksiyonları yapmaktadır.
<i>M.simiae</i>	++	I-FC	Fakültatif patojen, fotoreaktivitesi stabil değil, niacin+
<i>M.genavense</i>	++		Sadece sıvı kültürlerde ürer. AIDS'li hastalarda yaygın pulmoner hastalıktan sorumlu olabilir.
<i>M.asiaticum</i>	++	I-FC	<i>M.simiae</i> benzer fakat antijenik olarak farklıdır.
<i>M.scrofulaceum</i>	++	II-SC	<i>M.marinum</i> ile servikal adenit sebebi olabilir.
<i>M.szulgai</i>	+++	25°C FC/ 37°C SC	Kronik pulmoner ve ekstra pulmoner hastalık ile ilişkilidir, hücre duvarının lipid kompozisyonu ile ayrılır.
<i>M.xenopi</i>	++	III-NFC	<i>M.littorale</i> , <i>M.xenopi</i> gibi yavaş büyür; en iyi 42°C'de
<i>M.celatum</i>	+		AIDS'li hastalarda solunum yolu enfeksiyonundan sorumlu, <i>M.xenopi</i> ile benzer
<i>M.gordonae</i>	0/+	II-SC	Genellikle insanlar için patojenik.
<i>M.thermo-Resistible</i>	+	II-SC	52°C'de ürer. Potansiyel olarak patojen, yavaş büyür.
<i>M.avium/intracel lulare complex</i>	+++	III-NFC	Genellikle ilaca rezistan, sıklıkla AIDS'li hastalarda enfeksiyon sebebi.
<i>M.terrae</i>	Nadir	III-NFC	<i>M.triviale</i> ile ilişkili olabilir.
<i>M.shimoidea</i>	+		<i>M.terrae</i> complexe benzer. Nadiren pulmoner enfeksiyon yapar.
<i>M.triviale</i>	0/+	III-NFC	Atipik mycobacterium olarak adlandırılır.
<i>M.malmoense</i>	+++	III-NFC	Yavaş büyüyen mycobacteriumdur, genellikle pulmoner hastalık etkenidir.
<i>M.haemophilum</i>	+++	III-NFC	İmmünsüprese hastalarda genellikle cilt enfeksiyonlarından sorumludur.
<i>M.fortuitum</i>	+	IV-RG	İmmünsüprese bir konakta hastalık yapabilir, nozokomiyal hastalık sebebi olabilir.
<i>M.cheloneae</i>	+	IV-RG	Genellikle deri enfeksiyonu yapabilir, nozokomiyal enfeksiyon sebebi olabilir.

FC: Fotokromojen SC: Skotokromojen NFC: Nonfotokromojen RG: Hızlı üreyen

### 5.3. Mycobacterilerin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri:

Tb bakterilerini tanımlayabilmek için onları uygun besiyerlerinde üretmemiz gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli besiyerleri kullanılmaktadır. Bu besiyerleri şöyle sınıflandırılabilir.

### 5.4. Non-selektif *Mycobacterium*'ların izolasyonunda kullanılan besiyerleri (11).

Besiyeri	İçerik
Löwenstein-Jensen:	Koagüle tüm yumurta, tuz, gliserol, patates unu.
Petragnani:	Koagüle tüm yumurta, yumurta sarısı, süt, patates, patates unu, gliserol.
American Thoracic Society Medium:	Koagüle taze yumurta sarısı, patates unu, gliserol.
Middlebrook 7H10:	Tuz, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, dekstroz.
Middlebrook 7H11:	Tuz, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, Katalaz, gliserol, %0.1 kazein hidrolizat.

### 5.5. Selektif *Mycobacterium*'ların izolasyonunda kullanılan besiyerleri(11).

Besiyeri	İçerik
Modifiye Löwenstein-Jensen:	Koagüle tüm yumurta; tuz, gliserol, patates unu, RNA-5mg/100ml.
Löwenstein-Jensen:	Koagüle tüm yumurta, tuz, gliserol, patates unu.
Middlebrook 7H10:	Tuz, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, glukoz.
Selektif 7H11(Mitchison's medium):	Tuz, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, glukoz, kazeinhidrolizat.

## 5.4. *Mycobacterium*'ların Mikroskopik İncelenmesinde Kullanılan Boyama

### Yöntemleri:

Bu besiyerlerinde üretilen *Mycobacterium*'ların mikroskopta incelenmesi amacıyla çeşitli boyama yöntemleri kullanılabilir. Bunlar arasında önemli 3 yöntem;

1. Ziehl-Neelson
2. Soğuk Kinyoun
3. Auramine Flurochrome olarak verilebilir (11).

### 5.4.1. Ziehl-Neelson Boyama Yöntemi:

#### Kullanılan boyalar:

a) Karbolfuksin = 10 ml %90-95' lik etanolde 3 gr bazik fuksin çözünür. Fenolün %5'lik sıvı solüsyonundan 90 ml eklenir.

b)Asit alkol = 97 ml'lik %90-95'lik etanole yavaşça 3 ml'lik konsantre HCl eklenir. Solüsyon gayet sıcak olmalı.

c)Ters boya için metilen mavisi = 100 ml distile suda, 0.3 gr metilen mavisi çözülür.

**Boyamanın yapılışı:** Havada kurutulmuş smear sıcakta fikse edilir ve üzerine 5-7 damla karbolfuksin eriyiğinden damlatılır, fakat boya kurumamalıdır. Alttan ısıtılırken boyadan gaz çıkışı devam etmeli fakat kaynamamaya özen gösterilmelidir. Daha sonra 2 dakika asit-alkol ile dekolorize edilir. Bundan sonra zıt boya olarak zemini boyamak için 1-2 dakika metilen mavisi ile muamele edilir. Havada kurutulup, mikroskopta 100 X immersiyon objektifiyle incelenir (11).

**5.4.2. Soğuk Kinyoun Boyası:** Bu boyama yöntemi, Ziehl-Neelson boyama yöntemi ile benzer boyalar içerir. Farklı olarak; karbol fuksin boyasında, %90-95 lik etanolün 20 ml'sine 4 gr bazik fuksin katılmaktadır. Fenolün %9'luk sıvı solüsyonundan 100 ml eklenir (11).

**Boyamanın yapılışı:** Bu boyama yönteminde, boya preparat üzerine döküldüğünde ısıtmadan 5 dakika süreyle kendi haline bırakılır. Boya alttan ısıtılmaz (11).

### 5.4.3. Auramine Fluorochrome boyası:

#### Kullanılan boyalar:

- Fenolik auramin = %90-95'lik etanolün 10 ml'sinde 0.1 gr auramine O eritilir. 87 ml'lik distile sudaki 3 gr'lık fenol solüsyonu eklenir. Kahverengi bir kutuda boya saklanır.
- Asit-alkol = %70'lik alkolün 100 ml'sine 0.5 ml konsantre alkol eklenir.
- Potasyum permanganat = 100 ml'lik distile suda, 0.5 gr potasyum permanganat eritilir.

**Boyamanın yapılışı:** Isıyla tespit edilen preparat, karbol-auramine ile 15 dakika ısıtılmadan muamele edilir. Suyla boya akıtıldıktan sonra, dekolorize etmek için asit alkol ile 2 dakika muamele edilir. Daha sonra tekrar suyla yıkanarak, potasyum permanganat ile 2-4 dakika süreyle boyanır. Sonra tekrar suyla yıkanır. Sonuçta cıva kaynaklı ışık (25x) ve BG-12 filtresi ile ya da kuvvetli mavi ışıkta incelenir. Karanlık alanda Myc'lar turuncu-portakal rengi şeklinde gözükürler (11).

Boyanmış preperatlardaki basilin yoğunluğu, klinisyenler için vakanın değerlendirilmesinde önem taşımaktadır. Mikroskopik inceleme, aşağıdaki şekilde değerlendirilerek sonuç verilebilir (11).

**Tablo 5.6. Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları.**

Gözlenen basil sayısı	Sonuç
0	Negatif(-)
300 alanda 1-2 adet	(+/-)
100 alanda 1-9 adet	(1+)
10 alanda 1-9 adet	(2+)
1-9 alanda	(3+)
1 alanda 9'dan fazla	(4+)

### 5.5. Kültürde Üreyen Myc'ların Tanımlanmasında Kullanılan Teknikler:

Mikobakteri türlerinin izolasyonunda kullanılan konvansiyonel tekniklerin yanında moleküler teknikler de kullanılmaktadır. Klinik laboratuvarlarda kullanılan üç büyük moleküler teknik aşağıdaki şekilde kullanılmaktadır.



1- DNA probalar kullanılarak yapılan klinik örneklerden kültürde üreyenlerin teyit edilmesi amacıyla.

2- Myc. subtiplerinin ve DNA parmakizinin saptanması için RFLP (Restriction fragment length polymorphism) yönteminin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması amacıyla.

3- Balgamda ve diğer klinik örneklerde nükleik asit amplifikasyon (PCR) ve hibridizasyon yöntemleri kullanılarak M.tb r-RNA'nın direk olarak saptanması amacıyla.

Yukarıda bahsedilen moleküler tekniklerin yanında konvansiyonel teknikler de, günümüzde Myc'lerin tanımlanmasında çok büyük öneme sahiptir, çünkü moleküler tekniklerin her laboratuvarında kullanılması maliyet ve uygulama güçlüğü açısından bir kısıtlama getirmektedir. Tablo 2.5.1'de Mikobakterilerin identifikasyonlarında kullanılan çeşitli özellikler verilmektedir.



Mikobakteriler	Optimum ısı ve büyüme zamanı	Büyümede pigmentasyon		Niacin test	Nitrat Redüksiyonu	10 günlük tween 80 hidrolizi	Katalaz		3 günlük aril-sülfataz	üreaz	Pirazinamidaz	Fe Uptake	Büyüme		
		ışık	karanlık				Semi kantitatif	PH 7.0 68°C					T <sub>2</sub> H 1µg/ml	%5 NaCl 28 °C	Mac Conkey Agar
<i>M.tuberculosis</i>	37°C 12-25g	KS	KS	+	+	D	<45	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>M.afRICANUM</i>	37°C 31-42g	KS	KS	D	D	-	>45	-	-	D	-	-	+	-	-
<i>M.bovis</i>	37°C 24-40g	KS	KS	D	-	-	<45	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>M.ulcerans</i>	32°C 28-60g	KS	KS	-	-	-	>45	+	-	D	-	-	+	-	-
<i>M.kansasii</i>	37°C 10-20g	S	KS	-	+	+	>45	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>M.marinum</i>	30°C 5-14g	S	KS	D	-	+	>45	-	D	+	+	-	+	-	-
<i>M.simiae</i>	37°C 7-14g	S	KS	+	-	+/-	>45	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>M.asiaticum</i>	37°C 10-21g	S	KS	-	-	+	>45	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>M.szulgai</i>	37°C 12-25g	K	S-37°C K,52.5°C	-	+	D	>45	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>M.scrofulaceum</i>	37°C 10g	S	S	-	-	-	>45	+	-	+	D	-	+	-	-
<i>M.gordoniae</i>	37°C 10g	K	K	-	-	+	>45	+	-	-	D	-	+	-	-
<i>M.thermoresistibile</i>	45°C 7g	S	S	-	+	+	>45	+	-	+	D	-	+	+	-
<i>M.flavescens</i>	37°C 7-10g	S	S	-	+	+	>45	+	-	+	+	-	+	D	-
<i>M.xenopi</i>	42°C 14-28g	S	S	-	-	-	<45	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>M.aviumcomplex</i>	37°C 10-21g	K	K	-	-	-	<45	-	-	-	+	-	+	-	D
<i>M.heamophilum</i>	30°C 14-21g	GRI	GRI	-	-	-	<45	-	-	-	+	-	+	-	-

Tablo 5.7. Mikobakterilerin identifikasyonlarında kullanılan çeşitli özellikler.

Mikobakteriler	Optimum ısı ve büyüme zamanı	Büyümede pigmentasyon		Niacin test	Nitrat Redüksiyonu	10 günlük tween 80 hidrolizi	Katalaz		3 günlük aril-sülfataz	Üreaz	Pirazinamidaz	Fe Uptake	Büyüme		
		Işık	Karanlık				Semi kantitatif	PH 7.0 68°C					T <sub>2</sub> H 1µg/ml	%5 NaCl 28°C	Mac Conkey Agar
<i>M.maltinoense</i>	37°C 21-28g	KS	KS	-	-	+	<45		-	D		-	+	-	
<i>M.sibirica</i>	37°C 14-28g	KS	KS	-	-	+	<45		-		+	-	+	-	
<i>M.genavense</i>	37°C 14-28g	KS	KS	-	-	+	>45	+	-	+	+	-	+	-	
<i>M.celatum</i>	37°C 14-28g	KS	KS	-	-	-	<45	+	+	-	+	-	+	-	
<i>M.gastri</i>	37°C 10-21g	KS	KS	-	-	+	<45	-	-	+	-	-	+	-	
<i>M.terrae complex</i>	37°C 10-21g	KS	KS	-	D	+	>45	+	+	-	D	-	+	-	D
<i>M.triviale</i>	37°C 10-21g	KS	KS	-	+	+	>45	+	D	-	D	-	+	+	
<i>M.fortuitum</i>	37°C 3-5g	KS	KS	-	+	D	>45	+	+	+	+	+		+	+
<i>M.chelonae</i>															
<i>spp.chelonae</i>	28°C 3-5g	KS	KS	D	-	D	>45	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>spp.abscessus</i>	35°C 3-5g	KS	KS	-	-	D	>45	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M.smegmatis</i>	37°C 3-5g	K	K	-	+	+	>45	+	-			+	+	-	

KS :kahverengisarı

S :sarı

K :kavuniçi

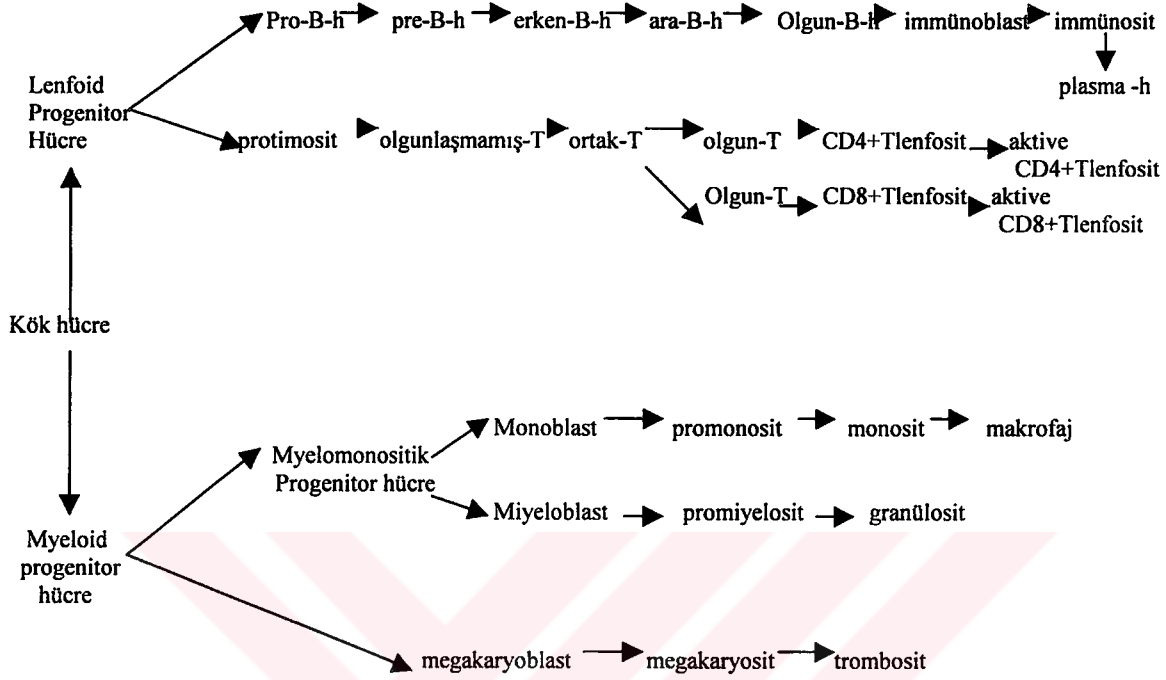
D :değişken

Boş yerler : Çok az yada saptanamayan

Tablo 5.7. Mikobakterilerin identifikasyonlarında kullanılan çeşitli özellikler(devam).

## 5.6. Beyaz Seri Kan Hücrelerinin Gelişimi (19)

Enfeksiyonlara karşı verilen bağışık yanıtta önemli rolleri olan beyaz seri kan hücrelerinin gelişimi aşağıda şematize edilmiştir.



Şekil 5.1. Beyaz Seri Kan Hücrelerinin Gelişimi.

**Lenfositler (İmmünozitler):** Lenfositler, 9-12 mikron çapında, spesifik immünitiden sorumlu hücrelerdir. Giemsa ile boyandığında kromatin yapısı koyu, yuvarlak ve büyük nükleusla onun etrafında dar bir sitoplazma şeridinden oluşur. Sitoplazmasında azürofilik(lizozomal) granüller bulunabilir. Ribozomlar bol olduğundan sitoplazma güçlü bir bazofili göstermektedir. İnsan vücudunda total  $10^{12}$  kadar lenfosit bulunduğu ve hergün yaklaşık 2 milyon yeni T hüresinin ve 20 milyon yeni B hüresinin yapıldığı hesaplanmıştır. Total lenfositlerin %2 kadarını periferik kan lenfositleri oluşturmaktadır. Lenfositlerin çok büyük bir bölümü lenfoid organlarda bulunur. Periferik kanda, lökositlerin %20-30 kadarını lenfositler oluştururlar. Genel olarak, viral hastalıklarda (özellikle Enfeksiyöz Mononükleoz, Sitomegalovirüs enfeksiyonu..), bazı bakteriyel hastalıklarda (özellikle boğmaca, tüberküloz. v.s.), enfeksiyon hastalıklarının nekahat döneminde ve nütropeni ile giden hallerde mutlak sayıları veya lökositler içindeki dağılım oranları artar (19,20).

Kuşlarda, son barsakta (kloakada) yer almış bir lenfoid organ olan bursa of Fabricius'a bağımlı gelişme göstererek hüneral (antikora dayalı) immüniteyi oluşturan

lenfositlere B lenfositleri (B hücreleri); timusa bağımlı gelişme göstererek sellüler (hücrelere dayalı) immüniteyi oluşturan lenfositlere de T lenfositleri (T hücreleri) denmektedir. Bursa'nın memelilerdeki karşılığının fetal karaciğer ve erişkin kemikiliği olduğu kabul edilmektedir. B hücreleri humoral immüniteden sorumludur. T hücreleri ise hücrel immüniteden sorumludur. B-hücrelerinin gelişmesinde etkili olan sitokinler; IL-2,4,5,6,7 ve IL-10'dur. B lenfositlerin %60-70'i, 7-10 günde ölmektedir. Küçük bir bölümü daha uzun yaşar, bir kısmı da spesifik antijenik uyarıyı tanıyıp saklayan bellek hücrelerini oluşturur. Antijenle yeniden karşılaştıklarında süratle çoğalıp immün yanıtın daha çabuk ve etkili oluşmasını sağlarlar (19,21).

Timustan periferde geçen T hücreleri sekonder lenfoid dokulara yerleşerek burada çoğalırlar. Periferdeki T hücre sayısının stabil tutulması, timik prekürsör havuzuna bağlı olmaksızın, periferde hücre bölünmesi ile sürdürülür. T hücre repertuarı timusta şekillenir. Fakat T hücre özelliklerinin bundan sonraki seleksiyonu periferde olgun T hücrelerinin ekspansiyonu ile sağlanır. CD4+ yüzey markırı taşıyan subpopülasyon, geç duyarlıktan sorumlu efektör hücrelerle, sitotoksik ve süpreser T hücrelerinin olgunlaşmasına yardımcı T hücrelerini kapsamaktadır. Bunlar; B hücrelerinin antikor yapan plasma hücrelerine dönmelerini de indüke eder. Bu nedenle CD4 markırı taşıyan bu lenfositlere T helper/indüktör hücreleri denmektedir (19).

Antijen, istirahat halindeki Th hücrelerini stimüle ettiğinde hücre, IL-2, IFN- $\gamma$  veya IL-4 etkisi altında Th1 ve Th2 fenotipi oluşturacak biçimde prolifer ve diferansiye olur ve Th1 ve Th2 oranı değişir. Th1 hücrelerinin asıl fonksiyonu, Th1 tipi sitokinlerle makrofajların fagositoz ve mikrop öldürme yeteneklerini güçlendirerek enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlamaktır. Th2 subset hücreleri ise, B hücrelerini, IgM, kompleman fikse etmeyen IgG<sub>4</sub> ve IgE sentezine yöneltirler. Dolayısı ile, bu hücreler, akut ve kronik enflamasyonu ve geç tipte hücrel hipersensitiviteyi inhibe ederler. Bunlar, Th1 hücrelerinin aksine çoğunlukla CD30 markeri taşırlar (19).

Th2 subpopülasyonundaki lenfositler IgE dahil, antikor yapımına etkin olarak katılırlar ve eozinofiliyi indüklerler. Th1 subpopülasyonundaki lenfositler ise, özellikle opsanizan antikor yapımına yardımcı olmakla beraber, asıl sitolitik aktivite gösterirler. Th2 klonlarının esas itibarıyla humoral immün cevapların; Th1 klonlarının ise, sellüler immün cevapların oluşmasında etkin rol oynadıkları anlaşılmaktadır. Bir Th subset klonunun sentezlediği sitokinler, diğer subset Th klonunun sentezlediği sitokinlerin yapımını aşağıya

çekebilir. Mesala, IL-12 ve IFN- $\gamma$ , Th2 hücrelerini baskılar; fakat Th1 hücrelerini stimüle ederler (19).

Sitotoksik T (Tc) lenfositleri: virüs, parazit ve bakteri ile enfekte hücreler, tümör hücreleri, doku ve organ transplant hücreleri gibi, organizmaya zararlı veya yabancı hücrelere doğrudan saldırırlar. Bu hücreler hedef hücrelere, yüzeylerindeki spesifik reseptör moleküller aracılığı ile bağlanırlar ve onların membranlarının bütünlüğünü bozup hücreyi lizise uğratarak öldürürler. Öldürme olayı, Tc hücreleri için MHC uygunluğu ile sınırlanmıştır. Sitotoksik T lenfositlerinde İmmünoglobulin için Fc reseptörü bulunmaz. Bu nedenle de antikor-bağımlı hücrel sitotoksiste göstermezler (19).

Süpresör T (Ts) lenfositleri ise, sitotoksik ve helper T hücre etkinliğini baskılayarak immün reaksiyonların aşırıya kaçmasına izin vermezler. Bu hücrelerin, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  sentezleyerek IL-2 sentezleyen T hücrelerini baskıladıkları düşünülmektedir (19)

### **5.7. Sitokinler:**

Doğal ve spesifik immüitenin büyük bir bölümünü yöneten protein hormonlara sitokin adı verilir. Doğal immüitede etkili sitokinler mononükleer fagositler tarafından üretilir bunlara sıklıkla monokin adı verilir. Monokinler direk olarak mikroorganizmalarla karşılaşan monosit ve makrofajlar tarafından üretilir. Bunlar antijen uyarımı sonucunda, T hücre cevabıyla mononükleer fagositler tarafından sekrete edilmektedir (20).

Spesifik immüitedeki sitokinlerin çoğu aktive edilmiş T lenfositleri tarafından üretilmektedir. Bunlara lenfokinler adı verilmektedir. T hücreleri birçok sitokin üretmekte ve bunlar çeşitli lenfosit popülasyonunun farklılaşması, büyümesi ve düzenlenmesinde, T hücrelerine bağlı immün cevapta önemli roller üstlenmektedirler. T hücrelerinden çıkan sitokinlerin temel fonksiyonu, inflamatuvar hücrelerin düzenlenmesi ve aktivasyonudur. Bunlar, mononükleer fagositler, nötrofiller ve eozinofillerdir. Bu sitokinler inflamatuvar hücreler ve immün sistem arasındaki ilişkiyi sağlamaktadır. Lenfositler ve mononükleer fagositler ayrıca başka sitokinler de üretmektedirler. Bunlara koloni sitümülan faktör adı verilmektedir. Bunlar kemik iliğindeki immatür lökositlerin farklılaşması ve büyümesini uyarmaktadırlar. İnflamatuvar reaksiyon esnasında yok olan hücrelerin yerine ilave lökositlerin konulmasını da sağlamaktadırlar (20).

Sitokinler, immün sistemin içerdiği hücreler arasında iletişim sağlayan ve bu hücrelerce salgılanan, düşük molekül ağırlıklı, protein yada glikoprotein yapısındaki

maddelerdir. Hedef hücrelerin yüzeyindeki (ya da çözülmüş haldeki), kendileri için özgül reseptörlere bağlanırlar, ileti aktarım yollarını harekete geçirirler ve hedef hücrede gen ekspresyonunda değişikliklere yol açarak etkinlik gösterirler (22).

Kimi kez belli bir sitokin, kendisini üreten hücrenin yüzeyinde bulunan, yine kendisi için özgül olan reseptöre bağlanarak etki gösterir ki, buna otokrin etki adı verilir. Yakında bulunan bir hedef hücre üzerindeki reseptöre bağlanarak ortaya çıkan etkiye parakrin etki, vücudun uzak bir bölgesinde bulunan bir hedef hücre üzerindeki etkiye ise endokrin etki adı verilir (22).

Aynı türden hedef hücreler üzerinde ayrı biyolojik etkilere sahip bir sitokinin pleitropik etkisinden, iki sitokinin birlikte etkisinin onların bir başlarına olan etkilerinin toplamından daha fazla olması halinde sinerjik etkiden, bir sitokinin etkilerinin bir başka sitokinin etkilerini söndürmesi yada dengeleyerek yok kılması halinde de antagonistik etkiden bahsedilir. Bazı durumlarda ise, iki yada daha çok sitokinin benzer etkileri görülür ki buna fazlalık (redundant) etki adı verilir (22).

Sitokinlerin salınması özgül bir uyarı ile başlar. Bu uyarılar arasında bakterilere ilişkin ürünler, viruslar, öteki sitokinler, çeşitli antijenik yapılar, doku hasarı ürünleri, ultraviyole ışığı vb. sayılabilir. Sitokinlerin non spesifik doğasının non-spesifik immünite içerisinde spesifik bir biçimde özelleştirilmesi çeşitli yollardan gerçekleşmektedir. Bu yolların başında hücreler üzerinde sitokin reseptörü ekspresyonundaki özenli düzenleme gelmektedir. Sitokin reseptörü sıklıkla ve ancak antijenle etkileşime girmiş hücrelerden eksprese edilir. Bir başka yol, etkili yoğunlukta sitokin üretimi için hücre-hücre etkileşiminin gerekliliğidir. Örneklense, T hücreler, antijen sunan hücreler üzerindeki MHC –antijen kompleksi varlığında, hedef hücrede etkili olacak yeterli yoğunlukta sitokin üretirler. Öte yandan kan dolaşımına ya da başka hücre dışı sıvılara salınan sitokinlerin yarı ömrünün kısalığı da işlevlerin özgül olma niteliğine katkıda bulunurlar.

Sitokin reseptörlerinin çoğu iki ya da daha çok membran proteinden oluşmaktadır ki genellikle, bunlardan sadece bir tanesi özgül bağlanma (özel ligand-özgül reseptör) özelliği göstermektedir. Öteki proteinler ise liganda bağlanmazlar, ama sinyalin oluşumu ve aktarımında rol alırlar. Liganda özgül subünitin ligandla bağlanması subünitlerin oligomerizasyonuna, bir başka deyişle, onların sitoplazmik parçalarının birleşmelerine yol açar. Birkaçı (IL-8R, TGF- $\beta$ R vb) dışında sitokin reseptörleri klasik sinyalleme yollarını (cAMP-proteinkinaz A, cGMP-protein kinaz G vb) kullanmazlar. Bunun yerine, Janus

ailesi tirozin kinazları (JAK) adı verilen reseptörle ilişkili sitoplazmik protein tirozin kinazları aktive ederler. Bunlar da ya STAT (signal transducers and activators of transcription) ailesi üyelerin yada Ras-mitogen-activated protein kinaz cascadinı aktive ederler. Sitokin reseptörleri 6 grup altında incelenir:

a) Ig reseptör süper ailesi: IL-1R (interlökin).

b) Hematopoetin reseptör süper ailesi: IL-2R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-9R, GM-CSF-R(granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör), LIF-R(leukemia inhibitory factor), OSM-R(Onkostatin).

c) TNF reseptör süper ailesi: TNF-R(tümör nekroze edici faktör), LT- $\alpha$ R,(lenfotoksin) LT- $\beta$ R.

d) G-proteinle bileşik reseptör süper ailesi: IL-8R, öteki kemokinler.

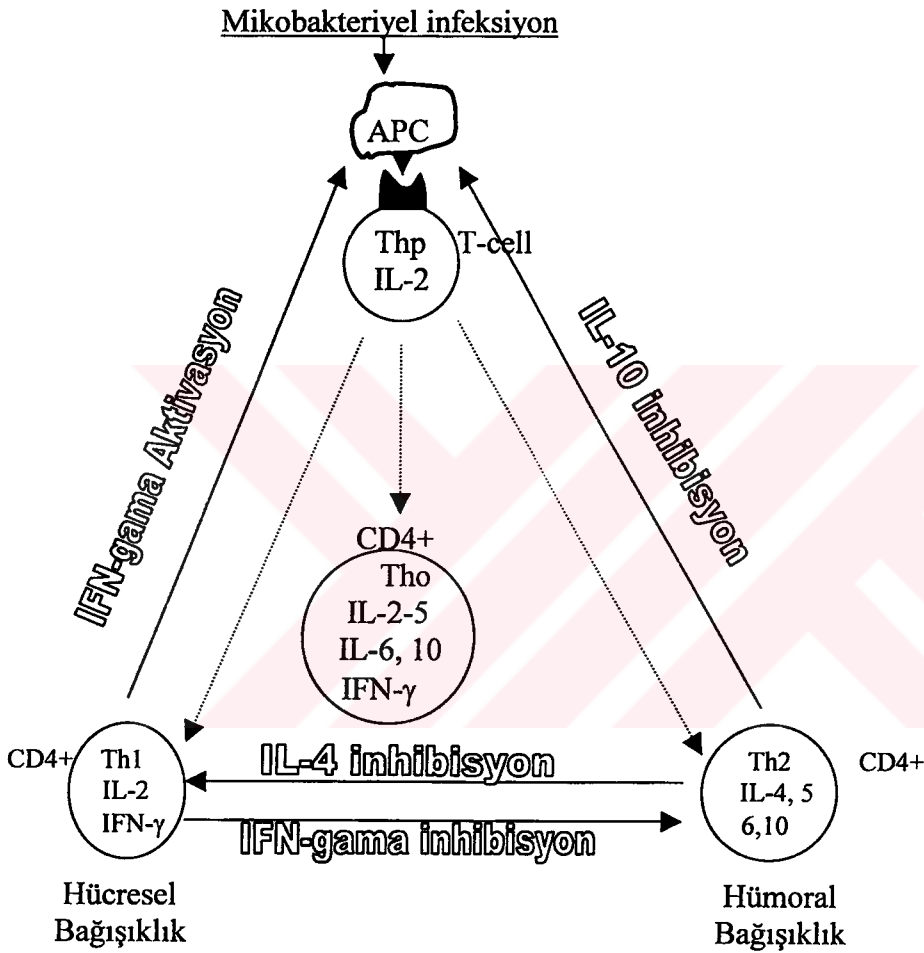
e) TGF- $\beta$ R reseptör süper ailesi: TGF- $\beta$ R(transforming growth factor).

f) IFN reseptör süper ailesi: IFN- $\alpha$ R, IFN- $\beta$ R, IFN- $\gamma$ R(22).

Antijenle stimüle edilmiş yardımcı T (T helper, Th) hücrelerin belli sitokinlerin varlığında ayrı kalıplar gösteren sitokin gruplarını ürettikleri bulunmuş ve bu kalıplara göre Th hücreleri iki bölüğe ayrılmışlardır. Th1 hücreler IFN- $\gamma$ , IL-2, ve TNF- $\beta$  üretirlerken(tip 1 yanıt), Th2 hücreler IL-4,5,6,9,10,13 üretmektedirler(Tip 2 yanıt). Ek olarak, Th1 ve Th2 sitokinlerin karışımını üreten Th hücrelere Th0 adı verilmiştir. Ayrıca yüksek miktarlarda TGF- $\beta$  üreten T hücre alt bölümü de Th3 olarak adlandırılmaktadır. GM-CSF, IL-3, TNF- $\alpha$  ve kemokinler gibi birçok sitokin bütünü Th hücre alt hücre alt bölükleri tarafından üretebildikleri gösterilmiştir. Yine, CD8+ T hücrelerin de CD4+ Th hücrelerde gözlenen benzer belli sitokin kalıpları sergilediği saptanmıştır. CD8+ T hücrelerin çoğunluğu Th1 hücrelerin ürettikleri sitokinleri üretirler ve Tc1 olarak adlandırılırlar. Th2 benzerleri de Tc2 olarak tanımlanırlar. TCR, T Hücresi üzerinde bulunan antijene özgü reseptördür. 43 kilodalton bir  $\beta$  zincirinden oluşan bir heterodimerdir. Her zincirin dış birimleri ve stoplazmik uzantıları vardır. Öte yandan, TCR $\gamma/\delta$  hücrelerden IFN- $\gamma$  üretenler T $\gamma\delta$ -1, IL-4 üretenler ise T $\gamma\delta$ -2 olarak adlandırılmışlardır. TCR, T hücrelerinin çoğunda (%95)  $\alpha\beta$  TCR şeklinde , az bir kısmında ise (%5)  $\gamma\delta$  heterodimeri şeklinde bulunur.  $\gamma\delta$  TCR'nin CD4+ ve CD8+ ile bir ilişkisi yoktur. Lenfosit dışındaki hücrelerde benzer sitokin kalıpları sergileyerek sitokin kaynaklı süreçlere katkıda bulunmaktadırlar.  $\alpha$  zinciri 14. kromozom,  $\beta$  zinciri ise 7. kromozomda kodlanmıştır. V bölgesi için V,D,J egzonlarının, C bölgesi için ise bir C geninin yeniden düzenlenmesi gerekir. NK hücreler, IFN- $\gamma$  salgılayarak T



hücrelerin Th1 hücelere diferansiyasyonunu harekete geçirirler, B hüceler ile Mast hüceleri de IL-4 ve IL-10 üreterek Th2 yanıtların oluşumuna katılırlar. Makrofajlar ise, birçok proinflamatuvar sitokini(IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , kemokinler) üretmelerinin yanında hem IL-12 salgılayarak Tip 1, hem de IL-10 üreterek Tip 2 yanıtları harekete geçirir (22, 23, 24).



APC: Antijen sunan hücre,  
 GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni sitümulan faktör,  
 Thp: T helper hücre prekürsörü,

**Şekil 5.2. Mikobakteriyel infeksiyonlarda Th1 ve Th2 yanıtı.**

Antijen tanındıktan sonra T hücelerinden IL-2 sekrete edilir. Bundan sonra T hüceleri iki gruba ayrılmaktadır. CD4+ Th1 hüceleri IL-2 ve IFN- $\gamma$  sekrete ederken,

CD4<sup>+</sup> Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 üretirler. Her iki Th1 ve Th2 hücre grupları ise IL-3, GM-CSF ve TNF- $\alpha$  üretmektedirler. CD4<sup>+</sup> Th0 hücreleri Th1 ve Th2 hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptir. Th1 hücreleri makrofaj aktivasyonunu IFN- $\gamma$  ve geç hiper sensitivite ile yapmaktadırlar. Th2 hücreleri ise IL-10 ile makrofaj inhibisyonu ve antikor üretimi sağlamaktadırlar. Th1 hücrelerinde üretilen IFN- $\gamma$ , Th2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedirler. Bunun yanında Th2 hücrelerinden üretilen IL-4 hücreleri Th1 hücrelerinin artışıını inhibe etmektedirler (2).

Myc'a spesifik insan T hücre klonlarının üretimi invitro sitokinlerin Th1 paterni ile olmaktadır. Bunlar IFN- $\gamma$  ve IL-2 dir (25).

Th1 sitokinler olan IFN- $\gamma$  ve IL-2, kandan plevral sıvıda daha fazla bulunmaktadır. PCR analizleri ile IL-4 seviyesinin kanda, plevral sıvıdan daha az oranda bulunduğu saptanmıştır. IFN- $\gamma$  konsantrasyonu da, plevral sıvıda kana göre daha yüksektir, fakat IL-2,4,5 saptanamamaktadır. M.tb'la stimüle edilen plevral sıvıdaki hücrelerin süpernatantındaki IFN- $\gamma$  ve IL-2 konsantrasyonu, stimüle edilmiş periferik kan mononükleer hücrelerinin süpernatantındaki konsantrasyonundan daha büyük bulunmuştur. M.tb'a karşı insan immün cevabı daha iyi anlaşılmıştır. Buradaki, T hücre subpopülasyonu ve sitokinler, tüberküloz infeksiyonuna direnci oluşturmaktadırlar (26).

M.tb'e karşı oluşan immünolojik direnç, T lenfositleri ve makrofajlar arasında uyumlu bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Bu ilişkide baskın olarak T hücreleri ve mononükleer hücrelerin ürettiği sitokinler aracılık etmektedirler. İnsandaki mikobakterilere karşı immünolojik dirence aracılık eden spesifik sitokinler tam olarak tanımlanamamıştır. Bununla birlikte en çok rolü olan sitokinler Th1 sitokinlerdir. Bunlar da IFN- $\gamma$  ve IL-2 dir. Diğer veriler antimikobakteriyel immün yanıtta sitokinlerin çok geniş bir spektrumda bulunduğudur. Tüberküloz plevritli hastaların plevral yüzeylerinde CD4<sup>+</sup> T hücreleri selektif konsantrasyondadır ve M.tb'e cevapta sekrete IFN- $\gamma$  ve T hücre proliferasyonu bulunmaktadır (26).

Sitokinler, 6 başlık altında toplanmaktadır (22):

- a) İnterlökinler: IL-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14 ve LMW BCGF(düşük molekül ağırlıklı B hücre büyüme faktörü) ile IL-15,16,17,18.
- b) Tümör nekroz edici faktörler: TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ (LT- $\alpha$ ), LT- $\beta$ .
- c) İnterferonlar: IFN- $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ .

d) Koloni stimüle edici faktörler:GM-CSF(granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör), G-CSF(granülosit koloni stimüle edici faktör), M-CSF(makrofaj koloni stimüle edici faktör).

e) Kemokinler: (IL-8), GRO(Growth regulated oncogene)  $\alpha/\beta/\gamma$ , ENA(epitelyal nötrofil active edici peptid)-78, PBP(platelet basic protein), CTAP(konnektif dokuyu aktive edici protein) III, NAP(nötrofil aktive edici protein)-2, LAPF4(platelet factor),  $\beta$ -thromboglobulin, MIG(IFN- $\gamma$  ile indüklenmiş monokin), PF4, IP-10, SDF(stromal hücreden türeyen faktör)-1 $\alpha/\beta$ , MCP(monosit kemotaktik faktör)-1/2/3/4, MIP(makrofaj inflamatuvar protein)-1 $\alpha/\beta$ , HCC1(CC kemokin faktörü), CCF18, RANTES(regulated on activation, normal T-expressed and secreted), Eotaxin, Lymphotactin..

f) Diğer sitokinler: TGF- $\beta$ , LIF, OSM, MIF(migration inhibitory factor), PDGF(Platelet derived growth factor), SCF(stem cell factor), CT1(kardiyotrofin), EBV-3(Epstein Barr Virus induced gene) (22).

Tablo 5.8'de sitokinlerin çeşitli özellikleri verilmektedir (27).

Sitokin	Molekül ağırlığı	Kaynağı	Aktivitesi
IL-1 $\alpha,\beta$	17.5	Makrofaj, T/B lenfositleri, APC	İmmüniteyi artırma. T/B lenfosit farklılaşması
IL-2	15.5	T ve büyük granüllü lenfositler	T/B lenfosit gelişme faktörü
IL-3	14-28	T lenfositler makrofajlar	Hematopoetik gelişme faktörü
IL-4	20	TH lenfositler	T/B lenfosit gelişme faktörü
IL-5	18	TH lenfositler	B lenfosit ve eozinofil stimülasyonu
IL-6	22-3	Fibroblast monositler	İnflamasyon
IL-7	25	Stromal hücreler	Lenfosit gelişme faktörü
IL-8	8.8	Makrofajlar, T lenfositler	Nötrofil ve T lenfosit kemotaksisi
IL-9		T lenfositler	T lenfosit proliferasyonu
IL-10		T lenfositler mast hücreleri	Sitokin sentez inhibitörü
G-CSF	18-22	Monositler fibroblastlar	Myeloid gelişme faktörü
M-CSF	18-26	Monositler fibroblastlar	Makrofaj gelişme faktörü
GM-CSF	14-38	T lenfositler monositler	Monomyelotik gelişme faktörü
INF $\alpha$	18-20	Lökositler	Antiviral etki
INF- $\beta$	25	Fibroblastlar	Antiviral etki
INF $\gamma$	20-25	T lenfositler NK hücreleri	İmmünomodülatör
TNF $\alpha$	17	Makrofajlar	İnflamasyon, tümörisidal
TNF $\beta$	18	T lenfositler	Tümörisidal
TGF $\beta$	25	Trombositler, T lenfositler, makrofajlar	İmmünosüpresyon

Tablo 5.8. Sitokinlerin Çeşitli Özellikleri

### 5.7.1. İnterlökün-2:

Orijinal olarak T hücre büyüme faktörü olarak isimlendirilen İnterlökün-2 (IL-2), hücre siklusunun S fazındaki G1 de T lenfositlerin devamından sorumlu temel sitokindir. IL-2, CD4+ T hücrelerinde, daha az olarak da CD8+ T hücrelerinde yapılmaktadır. IL-2'nin etkileri bazı hücrelerde kendi yapımı içindir, bu fonksiyonlarına otokrin büyüme faktörü denmektedir. IL-2, CD4+ ve CD8+ T lenfositleri üzerine etkisi nedeniyle bu sitokine, parakrin büyüme faktörü adı da verilmektedir. Fizyolojik immün yanıt esnasında IL-2 kanda bulunmaktadır. Bu etkisi nedeniyle de endokrin büyüme faktörü olarak tanımlanmaktadır (20).

IL-2, insandaki 4'üncü kromozomdaki 14-17 kD glikoprotein ağırlığındaki tek gende şifre edilmiştir. Olgun proteinin hacmindeki farklılık aşağı yukarı 130 aminoasitten fazla olabilen glikosilastin'in değişebilen büyüklüğüne bağlıdır. Saf IL-2 bir globüler protein ihtiva eden çift, birbirine paralel 2 $\alpha$  heliksin katlanması ile oluşmuştur. Herbir tabaka birbiri etrafında zayıfça dönerek bağlanmıştır. Tüm sitokinlerde bu  $\alpha$  heliks motifi bulunmakta, WSXWS (triptofan-serin-x-triptofan-serin) dizilimli reseptörler ile ilişkiye girmektedir. Bunlar, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF gibi sitokinlerdir. IL-2 sentezi genellikle geçicidir. Aktivasyondan 4 saat sonra, sekresyonun erken piki oluşmaktadır(20).

Lenfositlerdeki IL-2'nin temel etkileri:

a) IL-2, T lenfositleri için en büyük otokrin büyüme faktörüdür. Aktive edilmiş CD4+ T hücrelerinden sentezlenen IL-2'nin miktarı, T hücrelerine bağlı olarak verilecek immün yanıtın düzeyi ile orantılıdır. IL-2, IFN- $\gamma$  ve lenfotoksin gibi diğer T hücrelerinden türemiş sitokinlerin sentezini stimüle etmektedir. IL-2 sentezindeki yetersizliğin, antijen spesifik T hücre anerjisine bağlı olduğu tarif edilmiştir. IL-2, T hücrelerindeki IL-2 reseptör proteinlerine bağlanarak etki eder. Bu sistem belki tüm sitokin reseptörlerinin en iyi anlaşılanaıdır (20).

IL-2, T hücrelerinde 2 farklı yüzey proteinine bağlanır. Birincisi tanımlanmamıştır, buna IL-2R $\alpha$  denmektedir. 55 kDa polipeptid yapıdadır (p55). Etkisi T hücre aktivasyonu üzerinedir ve orijinal olarak Tac (T aktivasyonu için) antijen olarak adlandırılmaktadır. IL-2R $\alpha$ , yaklaşık  $10^{-8}$  M'lik bir kDa ile IL-2 ye bağlanmaktadır. IL-2, sadece IL-2R $\alpha$  reseptörü bulunan hücrelere bağlanmakta, fakat saptanabilen herhangi bir biyolojik etkiye yol açmamaktadır (20).

IL-2'nin bağlandığı ikinci protein, IL-2R $\beta$  olarak adlandırılmakta ve 70-75 kDa ağırlığında (p70 veya p75 olarak söylenebilir) olup, WSXWS şeklinde karakterize edilen reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu reseptörlere IL-2'nin bağlanma affinitesi IL-2R $\alpha$  dan daha yüksektir ve yaklaşık  $10^{-9}$  M'lik bir kDa ile bağlanmaktadır. IL-2R $\beta$ , IL-2R $\gamma$  adı verilen 64 kD'luk bir polipeptid ile ilişkili olarak yapılmaktadır. Bu reseptör de WSXWS ailesinin bir üyesidir (20).

Hem IL-2R $\alpha$ , hem de IL-2R $\beta\gamma$ 'yı çoğaltan hücreler yaklaşık  $10^{-11}$ M'lik bir kDa ile IL-2'ye çok sıkı bağlanırlar. IL-2'nin bağlanma ve büyüme stimülasyonunun her ikisi de IL-2R $\alpha$  veya IL-2R $\beta$ 'ya karşı oluşan antikörler ile bloke edilebilir. Bu, IL-2R $\alpha$  formunun IL-2R $\beta\gamma$  ile bir kompleks halinde olduğu sonucunu doğurmaktadır. IL-2 için, IL-2R $\beta\gamma$ 'nın aktivitesi artabilir ve IL-2, düşük konsantrasyonlarda bile büyümeye neden olabilir. IL-2'nin IL-2R $\alpha$ 'ya ilk bağlanmasının daha hızlı olduğuna ve bunun IL-2R $\beta\gamma$  ile ilişkili olarak kolaylaştığına inanılmaktadır. Sonuçta T hücreleri IL-2R $\alpha$ 'yı değil, IL-2R $\beta\gamma$ 'yı çoğaltırlar ve bunu sadece yüksek miktardaki IL-2 seviyesi ile yapmaktadırlar. Antijen reseptör aracılı T hücre aktivasyonu IL-2R $\alpha$ 'yı hızla oluşturabilir. Bu nedenle büyüme stimülasyonu için ihtiyaç olunan IL-2 konsantrasyonu azalabilir. Gerçekten IL-2 kendi kendine IL-2R $\alpha$ 'nın sentezinin artmasına yardım edebilir (20).

b) IL-2, NK hücrelerinin büyümesini stimüle ederek lenfokinle aktive olan öldürücü hücreler (LAK)'in sitolitik fonksiyonlarını artırır. NK hücreleri, T hücrelerine benzer şekilde IL-2R $\beta\gamma$ 'yı üretebilir ve yüksek düzeyde IL-2 ile stimüle olabilirler. NK hücreleri bununla birlikte IL-2R $\alpha$ 'yı yapamamaktadır. Aktivasyondan sonra IL-2 gereksinimi azalmaktadır. IL-2, sadece yüksek konsantrasyonlarında LAK hücre formasyonuna yol açabilir. IL-2 diğer sitokinler ile benzerdir, bariz olarak IL-12 ile NK hücrelerinden IFN- $\gamma$ 'nın sekresyonunu sağlamaktadır (20).

c) IL-2, insan B hücreleri üzerine büyüme faktörü görevi görerek çoğalmalarını sağlar. Aynı zamanda antikör sentezi için B hücrelerini stimüle eder. IL-2 reseptör proteinleri mononükleer fagositlerde saptanmıştır. Bununla birlikte bu hücrelerdeki IL-2'nin spesifik fonksiyonu tanımlanamamıştır. Kronik T hücre stimülasyonu IL-2R $\alpha$ 'nın yayılmasına yol açar. Yayılan reseptör proteinleri serbest IL-2'ye bağlanabilir. Klinik olarak IL-2R $\alpha$ 'nın serumdaki dağılmış seviyesinin artışı antijenik stimülasyonun güçlü bir markıdır. Organ transplantasyonlarındaki akut rejeksiyonlarda görüldüğü gibi, HTLV-1

(human T lymphotropic virus) ile infekte T hücreleri de IL-2R $\alpha$ 'nın sentezini aktive eder ve serumdaki IL-2R $\alpha$ 'nın dağılımına yol açar (20).

Son zamanlarda IL-2'nin insanlardaki enfeksiyon hastalıklarında immünomodülatör olarak kullanımı artış göstermiştir. Bu sitokinin, lenfoid hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonunu sağladığı gösterilmiştir (28).

Çoğul ilaç rezistansı olan hastalarda düşük doz rekombinant human IL-2 (rhu-2) kombinasyonu, antimikrobial cevabın güçlenmesini sağlamaktadır. İlave IL-2 tedavisi ile balgam basil yükünün ve canlı mikobakterilerin azaldığı, bazı hastalarda semptomların ve akciğer radyolojik görüntünün düzeldiği gözlemlenmiştir. Bu gelişmelerin yanında, IL-2'nin periferik kan lökositlerinde CD25 ve CD56 artışını sağladığı da gözlemlenmiştir (29,30).

**5.7.2. İnterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ):** Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), immün veya Tip II interferon olarak da adlandırılabilir. Aşağı yukarı 21-24 kDa subünitleri ihtiva eden bir homodimerik glikoproteindir. Her bir subünit, birkaç gende şifrelenmiş 18 kDa'luk bir polipeptid ile ilişkilidir. IFN- $\gamma$  naif (Th0) ve Th1 CD4+ yardımcı T hücrelerinden, hemen tüm CD8+ T hücrelerinden ve NK hücrelerinden yapılmaktadır. IFN- $\gamma$ , T hücre yetersizliği olan farelerdeki bu durumun temel kaynağıdır. Tip I IFN ile pek çok aktivitede IFN- $\gamma$ 'nın da payı vardır. Özellikle antiviral durumlarda IFN- $\gamma$  yapılmakta olup virüsle infekte hücreler üzerinde antiproliferatif etki göstermektedir. IFN- $\gamma$  tek hücreli yüzey reseptörlerine bağlanabilmektedir. IFN- $\gamma$  immün düzenlemede birçok özellikleri ile Tip I IFN'dan fonksiyonel olarak ayrılmaktadır. Özellikleri şunlardır (20).

a) IFN- $\gamma$  mononükleer fagositlerin güçlü aktivatörüdür. Enzim sentezini direk indükleyerek, fagosite edilmiş mikropların makrofajlarca öldürülmesine ve solunum patlamasına yol açmaktadır. İkinci sinyal süresince LPS ve TNF kadar etkili olarak tümör hücrelerinin makrofajlarca öldürülmesini sağlamaktadırlar. Mononükleer fagositlerde fonksiyonel değişikliklere yol açan sitokinlere makrofaj aktive edici faktör (MAF) denmektedir. IFN- $\gamma$  temel MAF'tır ve T hücrelerin aktive ettiği makrofajları sağlamaktadır. Diğer MAF'lar; GM-CSF ve daha az olarak da IL-1 ve TNF'dir. IFN- $\gamma$ 'nın tam aktivasyonu, makrofajlarca fagosite edilen mikropların öldürülmesini, sadece bir bölümünün aktivasyonu ise tümör hücrelerinin yok edilmesini sağlamaktadır (20).

b) IFN- $\gamma$  sınıf I MHC molekül yapımı ile artmaktadır. Tip I IFN'dan farkı budur. Buradaki neden, class II MHC molekülerinden yapılan hücre tiplerinin geniş bir çeşitlilik göstermesidir. Bu etkiler hücrel ve humoral bağışıklığın her ikisini de arttırabilir (20).

c) IFN- $\gamma$ 'nın etkileri direk olarak T ve B lenfositler üzerinedir ve onların farklılaşmasını sağlar. IFN- $\gamma$  saf CD4+ T hücrelerinin Th1 alt ünitesine farklılaşmasını sağlar ve Th2 hücre proliferasyonunu inhibe eder. IFN- $\gamma$ , aynı zamanda CD8+ Tc'lerin maturasyonu için gerekli olan sitokinlerden biridir. Ayrıca B hücrelerinin IgG2a ve IgG3 alt ünitelerine dönüşümünde de rol oynar ve IgG1 ve IgE dönüşümünü engeller (20).

d) IFN- $\gamma$  solunum patlamasını düzenleyerek nötrofilleri aktive eder. Fakat TNF ve lenfotoksine kıyasla nötrofiller için daha az aktivatör etki gösterir (20).

e) IFN- $\gamma$ , NK hücrelerinin sitolitik aktivitelerini Tip 1 IFN'a oranla daha fazla stimüle eder (20).

f) IFN- $\gamma$ , CD4+ T lenfosit adezyonunu arttırıp, morfolojik değişikliklerle lenfosit ekstrasvazyonunu sağlayarak vasküler endotelial hücreler için aktivatörlük yapar.

IFN- $\gamma$ 'nın bu değişik aktivitelerinin etkisi ile, Th2 ve eozinofilden zengin reaksiyonlar baskılanırken, Th1 ve makrofajdan zengin inflamatuvar reaksiyonların gelişmesi sağlanır (20).

IFN- $\gamma$ , farelerde temel koruyucu sitokindir (31).

IFN- $\gamma$ , CD4+ lenfositler tarafından yapılan ve koruyucu immünitede maksimum rolü olan bir sitokindir. CD4+ lenfositler ile canlı mikobakteriler ya da mikobakteriyel antijenler ile temas kuran makrofajlar tarafından oluşturulmaktadır (32).

Farelerde canlı mikobakteri ve kültür filtratında büyüyen mikobakteriler koruyucu immün cevabı indüklemektedirler (33).

### 5.8. Tüberkülozda İmmun Yanıt:

Mikobakterilerin makrofajlarda yıllarca canlı kaldıktan sonra reaktivasyona ve klinik hastalığın başlamasına neden olabileceğini biliyoruz. Tüberküloz basilleri solunum yolundan akciğerlere aerosol partiküllerle ulaşırlar. Primer enfeksiyondan sonra manifest hastalık veya daha sonraki bir dönemde reaktivasyon olup olmayacağı konağın savunma durumuna bağlı kalır. Basiller akciğere ulaştığında asemptomatik küçük bir granülomatöz odak (Ghon odağı) ortaya çıkar. Ghon odağı onu direne eden lenf düğümleri ile primer

kompleks oluşturur. Bu odak basilleri içinde saklayarak konak savunmasından da koruyabilir (1,8).

*M. tuberculosis*, makrofajlara, kompleman 1 ve 3 reseptörleri, vitronektin, fibronektin reseptörleri ve belki başka yüzey moleküllerine de bağlanarak fagozom içine girer. Fakat basil, antimikrobik solunum patlaması yolunu tetikleyen Fc reseptörlerine bağlanmaz (1)

Mononükleer fagositlerin endozomal kompartmanlarına da yerleşen canlı mikobakteriler orada çoğalabilir ya da konakçı hücreyi parçalayabilir (34).

Fagozom genellikle lizozim ile birleşmez ve fagozomun pH'sı, proton-ATPaz veziküllerinin dışlanması nedeniyle daha fazla asidik olmaksızın 6.5 dolayında kalır. Bu da mikobakterinin yaşaması için uygun bir pH dır (1).

Mikobakterinin duvar yapısında yer alan komponentler, bakterinin, kendisini konağın immun saldırısına karşı korumasında önemli rol oynamaktadır. Mikobakterinin makrofaj aracılığı ile öldürülmesini önleyen başlıca mekanizmalar şunlardır (2):

- a) Lizozom füzyonunun inhibisyonu.
- b) Makrofaj aktivasyonunun inhibisyonu (Protein kinaz C'nin inhibe edilmesi ve IFN-gama etkisinin bloke edilmesi ile).
- c) Hücre içi sindirilmeye direnç ( $O_2$  toplayıcıları LAM ve fenolik glikolipit-1 ile).
- d) Enzim indüksiyonu (Katalaz ve süperoksit dismutaz ile).
- e) Stres yanıtı (Hsp 65 ve Hsp 70 indüksiyonu ile).

Özellikle mikobakterilerde bulunan, arabinoz ve mannoz içeren fosforile duvar lipopolisakkaridi olan lipoarabinomannan (LAM), mikobakterilere karşı verilen erken immun yanıtta önemlidir. Ayrıca T hücre sitokinleri tarafından aktive edilen makrofajlar, reaktif oksijen ve nitrojen aracılığı yanında intrasellüler demir seviyesinin de kontrolü ile mikobakteriyi öldürmektedir (2).

*M. tuberculosis*'in diğer komponentleri de (örneğin, duvar yapısında yer alan lipid sulfatitler) protein kinaz C'yi ve reaktif oksijen intermediyerlerini inhibe ederler. Yine, D-arabinogalaktanın tüberkülozlu hastalarda, monositlerin efektör fonksiyonlarını aşağı çektiği ve PPD ile indüklenen lenfosit proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (8)

Pulmoner tüberküloz, granülomatöz inflamasyon sonucunda fibrozis ve doku hasarı ile karakterizedir. Tüberkülozda verilen hücrel immun yanıtta, T lenfosit ve makrofaj aktivasyonu ile gecikmiş tip hipersensitivite mevcuttur (35)



Th1 hücre klonları IL-2, IFN- $\gamma$  ve lenfotoksin üretir. Fakat IL-4 ve IL-5'i az üretirler ya da hiç üretmezler. Th2 klonları ise IL-4 ve IL-5 üretir, fakat az olarak IL-2 ve IFN- $\gamma$  üretimi gösterir ya da hiç üretmeyebilirler. IFN- $\gamma$ , mikobakterilere karşı gelişen hücreyel immün yanıtta saptanan en önemli sitokindir. IFN- $\gamma$ , tüberkülozlu hastaların plevral sıvılarında bulunabilmektedir. IL-2'nin solubl reseptörleri pulmoner tüberkülozun hastalık aktivitesi ile yükselmektedir (36,37).

Monositlerde mikobakteri tarafından indüklenen PGE<sub>2</sub> ise lenfositlerde IFN- $\gamma$  yapımını inhibe eder ve mikrobisidal fonksiyonların aktivasyonunu baskılar. *M.tuberculosis*'in çeşitli duvar komponentlerinin (PPD, monosit aktive edici faktör, fosfolipidler..), birbirini modüle edebilen birçok sitokin ve diğer mediyatörün, T lenfositleri, monosit ve makrofajlardan sentezlenip salınmasını tetiklediği söylenebilir (8).

Sitokinlerin ve diğer mononükleer hücre ürünlerinin intrasellüler mikobakteri üremesinin baskılanması yönünden makrofaj aktivasyonu üzerine etkileri;

a) Aktive edenler: IL-2, IL-4, 1.25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Kalsitriol :Provitamin D), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ .

b) Baskılayanlar: IL-1, IL-3, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>.

LAM'ın, T hücrelerinde sitokin (IL-2, IL-3, IL-4 ve IFN- $\gamma$ ) indüksiyonu yapmasına karşılık, PPD ve intakt tüberküloz basilinin kendisi IFN- $\gamma$ , IL-2 ve IL-3 indüksiyonu yapabilmektedir. Mikobakteriyel virülans, mikobakterilerin koruyucu (Th1 tipi) sitokin yapımını indükleme kapasitesi ile ters orantılıdır ve TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  bu süreçte santral rol oynarlar. Farelerde koruyucu Th1 yanıtlarını, muhtemelen, inflamasyonu sınırlamaya yönelik Th2 yanıtı izler (8).

Spesifik immünitenin oluşmasında ilk adım T hücre reseptörüne antijen sunumudur. Burada peptid antijenlerinin sunumunda bilinen yol izlenir. Buna karşılık non-peptid antijenlerin, MHC sistemine benzeyen ancak bu sistemin tamamen dışında kalan non-polimorfik bazı moleküllerle özel T hücre reseptörlerine sunulduğu yeni olarak anlaşılmıştır. Bunlardan biri CD1 molekülü olup mikobakteriye ait mikolik asit, LAM ve izopentenil fosfat grupları gibi non-peptid antijenlerin T lenfositlerine sunulmasında çalıştığı bildirilmiştir. CD1 molekülleri, timusta, dentritik antijen sunan hücrelerde, B hücrelerinde ve aktive monositlerde eksprese edilir. Diğer taraftan,  $\gamma$ - $\delta$  T hücrelerinin mikobakteri antijenlerine karşı güçlü proliferasyon gösterdikleri ve bu hücrelerin, küçük non-peptid antijenleri tanıdıkları belirlenmiştir. Makrofajları aktive eden sitokinleri (IFN- $\gamma$ ,

GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) sentezleyen  $\gamma$ - $\delta$  T hücrelerinin, antimikobakteriyel immün dirençte rol aldıkları ileri sürülmüştür (8).

Mikobakteriler, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> hücrelerin (NK hücreleri) proliferasyonunu da indüklemektedirler. Bu hücrelerin, MHC sınırlamasına ve antijene bağımlı olmaksızın, hedef hücreler için güçlü sitolitik etki gösterdikleri bilinmektedir. Buna rağmen, olayların gelişimi içinde, bu çeşitli hücrelerin birlikte çalışması ile ortaya çıkan primer ve sekonder immün yanıt kinetiklerinin ne olduğunu söylemek pek kolay değildir (8).

Bugünkü bilgilerimize göre, tüberküloza karşı savunmada humoral immün yanıtın önemli bir yeri yoktur. Tüberkülozda gelişen granülomatöz reaksiyon, mikroorganizmanın yayılımını sınırlayan koruyucu bir immün yanıttır ve TNF- $\alpha$ 'nın etkisi altında gelişir. Granülomatöz reaksiyonun tetiklenmesinde "granüloma inisyasyon faktörü" denen 20 kDa'luk bir molekülün de yer aldığı bildirilmiştir (8).

Tüberkülozda genetik yatkınlık da çok önemlidir. IFN- $\gamma$ R1 geninde nokta mutasyon sonucu, hücre yüzeyinde reseptör oluşmaması durumunda IFN- $\gamma$ , makrofajlarda TNF- $\alpha$  sekresyonunu indükleyemez, mikobakterisidal mekanizmaları harekete geçiremez ve bunun sonucunda kaliteli granüloma oluşamaz. Bu kişilerde tüberküloza genetik duyarlılık vardır ve mikobakteri infeksiyonları fatal seyreder (8).

Hastalık eksaserbasyon ve remisyonlar arasında dalgalanmalar göstererek ilerler. T hücre yanıtları yerel farklılıklar gösterir. Bu kompartmanlaşma, yüksek PPD yanıtı, IFN- $\gamma$  yapımı ve bellek T hücre yapımında ortaya çıkar ve *M. tuberculosis*'e karşı yerel hücrel immünitenin önemli rolü olduğunu gösterir (8).

Bellek hücreleri düşük düzeyde aktivasyon markırı (IL-2R ve MHC-Klas II molekülleri) eksprese ederler ve hücre siklusuna girmede aceleci davranmazlar. Tüberküloz efüzyonlarında ise bu hücreler yoğun olarak olay bölgesinde yoğunlaşırlar. Plevral sıvıda IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve 1.25(OH)<sub>2</sub> (D3 vitamini) yüksek düzeyde saptanmıştır. Tüberküloz menenjitte beyin omurilik sıvısı (BOS)' ında solübl IL-2R düzeyi , akut bakteriyel ve viral menenjitteki düzeyin hayli üzerindedir. Spesifik tedavi ile lenfomonositler inflamasyon geriledikçe bu düzeyler azalma gösterir (8).

Tüberküloz, hücrel immün yanıtla (T lenfositler, makrofajlar ve bunlardan salınan sitokinlerle) kontrol edilebilen hücre içi infeksiyonların tipik bir örneğidir. İnfeksiyon zengin bir antikor yanıtı oluşturmakla birlikte, humoral immünitenin konakçı

savunmasına anlamlı bir katkısı yoktur. İnhalasyon yoluyla alınan ve alveole yerleşen tüberküloz basili, alveoler makrofajlarca fagosite edilir. Makrofajların sindirme ve yok etme etkilerinden değişik mekanizmalarla kurtulabilmeyi başaran basiller (virulan basiller), fagozomlarda çoğalmaya başlar. İlk iki haftada konakçıda hiçbir immün yanıt oluşmaz ve basiller makrofaj içinde, alveol boşluğunda ve bu dönemde lenfo-hemotojen yolla yayıldığı odaklarda, immün yanıt gelişinceye kadar serbestçe çoğalırlar. Makrofajlar içinde küçük parçalara ayrılan ve işlenen basilin antijenik yapılarından bazıları (epitoplara), makrofajın sitoplazmasında major histocompatibility komplekse (MHC) bağlanır ve bu yapı, makrofaj hücre yüzeyine taşınır. Daha sonra makrofajlar, basil antijenlerini MHC molekülleri ile birlikte T lenfositlerine sunarlar. Salgıladıkları IL-1 ve T hücrelerinden salgılanan IL-2 ile T hücreleri çoğalır. T helper (CD4+) lenfositler, MHC Klas-II molekülleri ile kendisine sunulan antijenleri tanıırken, supressör ve sitotoksik T lenfositler (CD8+) ancak MHC Klas-I molekülleri ile kendilerine sunulan antijenleri tanıyabilmektedir.  $\gamma$ - $\delta$  T lenfositler ise, basili bir bütün olarak tanıyabilmekte ve bu tanıma işlemi MHC Klas-I ve II molekülleri ile sınırlanmaktadır. Alveolar makrofajların tb basilini öldürme gücüne karşı basil; sülfatidler, kord faktörü ve diğer asidik lipidlerle kendini korur. Antijen MHC kompleksi ile bağlanan antijene özgül T lenfositler, bundan sonra aktive olurlar ve ürettikleri IL-2 ile benzer şekilde reaksiyon veren bir T lenfosit klonu oluştururlar. Bu klon, *M. tuberculosis* basil antijenleri ile uyarıldığında, koruyucu immünitinin, gecikmiş aşırı duyarlılığın, sitolizisin, antikor üretimi ve hafıza hücrelerinin uyarılması veya süpresyonu gibi değişik immünolojik reaksiyonlara katılır (38,39).

İnsanlarda *M. tuberculosis* infeksiyonuna karşı gelişen hücresel immün yanıtın düzenlenmesinde esas sorumlu T hücre alt grubu, T helper (CD4+) lenfositlerdir. Basil antijenleri ile karşılaşan CD4+ T lenfositler, IL-2 üreterek klonal genişleme göstermekte, sitokinler üreterek (IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , MIF, GM-CSF) inaktif durumdaki makrofajları aktive etmekte ve böylece hücre içi basil çoğalmasını etkin olarak kontrol etmektedir. CD4+ T lenfositler, B lenfositleri ve CD8+ sitotoksik/supressör T lenfositleri de aktive ederken, bellekli CD4+ T hücrelerinin de oluşmasını sağlamaktadır. Bellekli T lenfositler, tüberküloz basili ile oluşacak daha sonraki karşılaşmalarda (reenfeksiyon) konakçıda koruma sağlayabilmektedir. CD4+ T lenfositler, basil ile infekte makrofajların lizisine de aracılık etmekte ve bu sitotoksik aktiviteleri infeksiyonun başlangıcından yaklaşık 6 hafta sonra en üst düzeye çıkmaktadır. Bu durum basil ile yüklü makrofajlarla CD4+ T

lenfositler arasındaki etkileşimin, değişik sonuçlara yol açabildiğini göstermektedir. Lezyonlarda bulunan basillerin sayısı, basil antijenlerinin tipi ve miktarı ile aktive makrofajlardan salınan sitokinlerin (IL-10, TNF- $\beta$ ), CD4+ lenfositlerin ağırlıklı olarak hangi biçimde aktivite göstereceğini (makrofaj aktivasyonu veya makrofaj harabiyeti) belirledikleri düşünülmektedir (38).

T helper (Th) lenfositlerin iki alt grubu (Th1 ve Th2), makrofaj aktivasyonu konusunda birbirlerine karşıt etki göstermektedir. Th1 lenfositler, aktivasyonları ve klonal genişlemeleri sonucu IFN- $\gamma$ , IL-2 ve TNF- $\beta$  gibi lenfokinler salgılamaktadırlar. Bu lenfositler sinerjik etki göstererek antijenin bulunduğu yerde makrofajları toplar ve aktive ederler. Böylece aktive olmuş makrofajların içlerinde taşıdıkları basilleri yok edebilmelerini sağlarlar. Th2 lenfositler ise, makrofaj aktivasyonunu suprese eden IL-10 ve diğer lenfokinleri (IL-4,5,6) üretirler. Th1/Th2 oranı, sunulan antijenin tipinden ve miktarından etkilenir. Makrofajların basil antijenlerini Th2 değil de Th1 lenfositlerine sunmalarının, makrofajlarca üretilen IL-2 nedeniyle gerçekleştiğini ileri süren görüşler bulunmaktadır. Çünkü IL-12, Th1 lenfositlerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlamaktadır. Th1 lenfositlerden salınan IL-2, T lenfositler için bir büyüme faktörüdür ve bu hücrelerin klonal genişlemesini sağlar. Buna ek olarak, makrofajların mikrobisidal gücünü de artırır. Tüberkülozda hücre aracılıklı immün yanıt (cell mediated immunity, CMI) için makrofajları aktive eden esas hücreler Th1 hücrelerdir. Th2 lenfositler daha çok B lenfositlerin antikor üretimine yardımcı olmaktadır. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık (delayed type hypersensitivity, DTH)' dan sorumlu hücreler, Th1 ve Th2 sitokin kalıplarına göre sınıflandırılmamıştır. Fakat, sitotoksik antijene özgü CD4+ ve CD8+ T hücreleriyle, antijene özgü olmayan doğal öldürücü (natural killer, NK) hücrelerin DTH gelişiminde rol oynadıklarına inanılmaktadır. PNL, K ve NK hücreleri, granümatöz inflamasyon alanına monositlerden önce gelerek monositler için kemotaktik ve aktivatör olabilen bazı faktörler salarlar. K hücrelerinin yüzeyinde ise Fc reseptörü bulunmaktadır. Th1 lenfositlerden salınan IFN- $\gamma$ , makrofajlarda bulunan 1- $\alpha$  hidroksilaz enzimini uyarır. Bu enzim inaktif olan 25-hidroksi vitamin D3 ü, aktif 1,25 hidroksi vitamin D3' e (calcitriol) dönüştürür. Kalsitriol, hem makrofajların hücre içi basil çoğalmasını önleme yeteneklerini artırır, hem de bu hücrelerden TNF- $\alpha$  ve diğer sitokinlerin salınmasını sağlar. TNF- $\alpha$ , makrofajların mikrobisidal aktivitesini artırma işlevi yanında granülom oluşumunda da rol oynar. Duyarlı makrofajlardan TNF salınımını artıran bir diğer etken de *M. tuberculosis*'in kendisi ve

basil duvarında bulunan lipoarabinomannan-B (LAM) dır. Mikobakterilerle karşılaşan aktive makrofajlardan salınan TNF- $\alpha$ 'nın çevrede bulunan doku hücrelerinde harabiyete neden olabileceği ileri sürülmüştür (38,17,20).

Tüberkülozda zengin bir antikor yanıtı oluşmakta ve de bunun konakçı savunmasına anlamlı bir katkısı olmamaktadır. Hastalıkta gözlenen patolojik değişiklikler büyük oranda yerel basil antijen konsantrasyonuna ve aşırı duyarlılık reaksiyonunun derecesine bağlıdır. Aktive olan makrofajların büyüklükleri artar, hücredeki mitokondrilerin, lizozomların sayısı ve süperoksit üretimi artar. Aktive olan makrofajlarda yüksek düzeyde biriken litik enzimler ve reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri (özellikle NO), makrofajların basilleri yok edebilme yeteneklerini ileri derecede artırır. Fakat, çevre dokulara yayıldıklarında doku nekrozuna neden olabilirler. Aktive makrofajlardan birçok düzenleyici faktör (TNF- $\alpha$ , platelet kökenli büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ ) sekrete edilmekte ve bu ürünler lenfositten salınan proteinlerle (IFN- $\gamma$ , migrasyon inhibe edici faktör) konakçının patolojik ve klinik yanıtını belirlemektedir (38,40).

İnhalasyon yolu ile alınan ve alveole yerleşen tüberküloz basili öncelikle burada bulunan alveoler makrofajlarca karşılaşmaktadır. Basille karşılaşan makrofajlar önce proteolitik enzimler ve diğer metabolitleri üretir, böylece mikobakterileri yok etme gücünü artırır. Daha sonra makrofajlar tarafından bir seri sitokin salınır (IL-1,6,8,10,TNF- $\alpha$ ,GM-CSF vb). Bu sitokinler hem güçlü immün düzenleyici işlev görürler hem de tüberküloza özgü bir çok klinik tablonun ortaya çıkmasına katkıda bulunurlar. IL-1, IL-8, TNF ve GM-CSF proinflamatuvar moleküllerdir ve lenfositlerin ve monositlerin lezyon bölgesinde toplanmasını kolaylaştırırlar. IL-1 endojen bir pirojendir ve tüberküloza özgü ateşin oluşumuna katkıda bulunur. IL-6, aktive B lenfositlerden immünglobulin üretimini artırır ve tüberkülozlu hastalarda sıkça rastlanan hiperglobulinemiye neden olur. TNF- $\alpha$  ise, IFN- $\gamma$  ile birlikte *M.tuberculosis* için bakterisidal olan nitrik oksit metabolitlerinin üretimini artırır, granülom oluşumuna büyük katkıda bulunur. Diğer taraftan TNF birçok immünopatolojik olayın (ateş, kilo kaybı ve tüberküloza özgü doku nekrozlarının) gelişmesine de neden olmaktadır. İmmünosüpresif etkili sitokinlerden IL-10, monosit ve lenfositlerden sitokin salınımını inhibe eder, TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) ise T hücre proliferasyonunu ve makrofaj efektör fonksiyonunu inhibe eder. Bu son iki sitokin kontrol edilemeyen inflamatuvar yanıtta, aşırı inflamasyon ve doku nekrozunu önleyebilir.

Fakat, immünsupresif sitokinlerin aşırı yapımı, enfeksiyonun kontrolünde yetersizliğe neden olabilir (38).

Sitotoksik T lenfositler (CD8+) ve doğal öldürücü hücreler (NK), antikor bağımlı sitotoksik hücre etkileşimleri kadar, kazeöz nekroz gelişiminde de rol oynayabilirler. Doku yıkımına, muhtemelen pıhtılaşma olayları (anoksiye yol açarak), makrofajlardan salınan reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri (özellikle NO) TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$  gibi sitokinler katkıda bulunmaktadır. NO küçük, dayanıksız, potansiyel olarak toksik, hücre membranından kolaylıkla geçebilen diatomik bir serbest radikaldir. Tüberkülozun patofizyolojik gelişiminde rolü vardır. Başlıca NO salan hücre tipleri; endotel hücreleri, bazı nöronlar, periferik kan nötrofilleri ve mast hücreleridir. NO sentezi sonucu mikroorganizma üzerine toksik etki gelişir. Mikrobial enfeksiyonlarda direkt olarak bakteristatik/bakterisid etki göstermek ve indirekt olarak T lenfosit proliferasyonunu önlemek suretiyle iki yönlü bir role sahip olduğu saptanmıştır. Tüberküloz immünpatolojisine katılan bir diğer T lenfosit alt grubu ise, istirahat halindeki T lenfositlerin %5'ini oluşturan  $\gamma$ - $\delta$  T lenfositlerdir. Bu lenfosit alt grubundaki yüzey reseptörü,  $\alpha$ - $\beta$  zincirlerine değil,  $\gamma$ - $\delta$  zincirlerine sahiptir. Mikobakteriyel antijenlere karşı gelişen primer yanıtta,  $\gamma$ - $\delta$  T lenfositler,  $\alpha$ - $\beta$  antijen reseptörü taşıyan lenfositlere (CD4+ ve CD8+ T lenfositler) göre, daha önemli rol oynamaktadırlar. Bu lenfositlerin,  $\alpha$ - $\beta$  T lenfositlerin yanıtı gelişmeden önce, primer enfeksiyonun kontrolüne katkıda bulunduğu inanılmaktadır.  $\gamma$ - $\delta$  T lenfositler, TNF, IL-2,4,5,10 gibi sitokinler üretir ve *M. tuberculosis* ile infekte hedef hücreleri lize ederler. Bu hücrelerin makrofaj birikimini artırdığı, bu nedenle granülom oluşumuna katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür. Fakat bu T lenfosit alt grubunun, hastalığın daha sonraki aşamalarında nasıl bir rol oynadığı henüz bilinmemektedir (38,41).

### 5.9. Tüberkülozda tedavi:

Antitüberküloz ajanlar da denilen tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçları üç gruba ayırabiliriz:

- a) Birincil seçenek antitüberküloz ajanlar,
- b) İkincil seçenek antitüberküloz ajanlar,
- c) Tüberkülozda etkili oldukları kabul edilen, bir kısmı günümüzde kullanılan ve araştırma evresinde olan ajanlar.

### 5.9.1. Birincil seçenek antitüberküloz ajanlar:

**5.9.1.1. İzoniazid (INH):** Güçlü, ucuz, biyoyararlılığı mükemmel hücre içi penetrasyonu ve dar etki spektrumu ile ideal bir antimikrobial ilaçtır. Buna rağmen *Mycobacterium tuberculosis* bu ilaca karşı yüksek oranda ( $10^6$ da bir) spontan direnç geliştirme özelliğine sahiptir (42).

Akciğer tb'lu hastalarda en fazla basil ( $10^7$ - $10^9$ ) kavitelere bulunmaktadır ve direnç gelişiminden en çok bu basiller sorumludur. Bunlar yüksek metabolik aktivite gösteren, hızlı çoğalan basillerdir. Hastalığın akciğer içinde yayılmasından ve balgamda basil pozitifliğinden sorumludurlar. INH bu basil topluluğuna en güçlü bakterisidal etkiyi gösteren ilaçtır. Bu etki tedavinin ilk iki günü sırasında bakteri ölümünü sağlar ki, buna "erken bakterisidal etki" adı verilmektedir (42).

INH bir ön ilaçtır, aktivasyonu için Kat G geninin ürünü olan katalaz-peroksidaz enzimine ihtiyaç vardır. Aktif hale geçen INH, Inh-A geninin ürünü olan ve doymuş uzun zincirli yağ asitlerinin sentezinden sorumlu olan enoyl-ACP-redüktaz'ı inhibe eder. Böylece hücre duvarı sentezi için önemli olan mikolat yapımındaki yağ asitlerin uzaması engellenir. Ayrıca normalde bakteriyi koruyucu rolü olan katalaz-peroksidaz enziminin INH tarafından inhibisyonu diğer bir etki mekanizması olarak düşünülmektedir (42).

**Farmakokinetik:** Oral yoldan alındıktan sonra, tamama yakını absorbe olur ve bir-iki saatte serumda pik düzeye ulaşır. Karaciğerde asetillenerek inaktive olur. Yarılanma ömrü yavaş asetilleneyen kişilerde üç; hızlı asetilleneyenlerde ise bir saattir. INH miktarının ancak %30-60'ı vücutta aktif olarak etkilidir. BOS, amniyotik sıvı ve anne sütü dahil, tüm vücut sıvılarına iyi geçer. Kazeifiye dokulara ve makrofaj içerisine de geçmektedir (42).

**İlaç etkileşimleri:** Fenitoin ile birlikte kullanıldığında, atılımını yavaşlattığından fenitoinin etkisini artırır. Pirimidon ve karbamazepin'in serum düzeyleri de INH tedavisi sırasında yükselebilir. Son zamanlarda, hastaların tedaviye uyumunu arttırmak amacıyla deri altına INH implantasyonu yapılarak ilacın sürekli olarak vücuda salınmasına çalışılmaktadır (42).

**5.9.1.2. Rifampin:** Rifampin daha çok tb tedavisinde kullanılan ansamisin grubundan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Bu ilaç esas olarak, solit kazeöz lezyonlarda bulunan, sayıları  $10^5$  den az olan, aralıklı olarak çoğalan ve çok kısa süre metabolik aktivite gösteren basillere etkilidir. Bu basiller hastalığın nüksünden sorumlu

olduğundan, bu etkiye “sterilizan etki” denir. Bu etkinin klinik önemi, gerekli tedavi süresini belirlediği için, büyüktür (42).

**Etki mekanizması ve direnç gelişimi:** Rifampin rpoβ geninin ürettiği DNA bağımlı RNA polimeraz enzimini, katalitik merkezin bulunduğu beta subünitesine bağlanarak inhibe eder. Rifampine direnç %96-98 oranında bu gendeki mutasyonla oluşmaktadır (42).

**Farmakokinetik:** Oral ve parenteral şekilleri vardır. Oral alımından sonra boş midede tama yakın emilir. Yiyecek varlığında emilimi azalır. Serumda 1.5-2 saatte pik konsantrasyona ulaşır. Karaciğerde asetillenerek inaktive olur. Sadece %30'u idrarla atıldığından böbrek yetmezliğinde doz ayarlamasına gerek yoktur. BOS dahil tüm vücut sıvılarına iyi geçmektedir. Rifampin birçok ilacın metabolizmasından sorumlu karaciğer enzimlerinin en güçlü indükleyicilerinden biridir. Böylece bir çok ilacın serum düzeyini düşürür (42).

**5.9.1.3. Streptomisin:** Geniş spektrumlu bir aminoglikozit olan streptomisin, tb tedavisinde ilk kullanılan ilaçtır (42).

**Etki mekanizması ve Direnç Gelişimi:** Bu ilaç, *M. tuberculosis*'e ekstrasellüler, alkali ortamda bakterisid etkilidir, ancak hücreleri penetre edemez. Streptomisin bakteri ribozumuna bağlanarak protein sentezini inhibe eder. *M. tuberculosis*'de streptomisin direncinden %80 oranında ribozomal protein S12'yi kodlayan rpsL geninde ya da 16S rRNA'yı kodlayan rrs genindeki mutasyonlar sorumludur. Dirençli suşların %20'sinde herhangi bir mutasyon saptanmaması, başka direnç mekanizmalarında varlığını göstermektedir (42).

**Farmakokinetik:** Aminoglikozitlerin en önemli özelliği, intravenöz veya intramüsküler uygulama zorunluluğu ile büyüklükleri ve katyonik yüklerinden dolayı birçok membranı geçememeleridir. BOS'ta etkili düzeye ulaşmaları zordur. Prostatit, endoftalmit ve peritonit durumlarında da zayıf doku penetrasyonu mevcuttur. Buralardaki tb enfeksiyonunun etkili tedavisi için direkt uygulanmalıdır (42).

Streptomisinin tama yakın kısmı böbreklerle atıldığından böbrek yetmezliğinde birikerek toksisiteye neden olur. Aminoglikozitler plasantayı geçerek, malformasyonlar (en sık 8. Kranial sinir hasarı) yapar. Streptomisin *M. tuberculosis*'e ekstrasellüler ve alkali ortamda etkilidir (42).



**5.9.1.4. Pirazinamid:** *M. tuberculosis*'e asit ortamda, akut inflamasyon alanları ve makrofaj içerisinde bulunan, sayıları  $10^5$ 'den az olan, çok yavaş çoğalan, düşük metabolik aktiviteye sahip basillere etkilidir. Rifampin gibi sterilizan etkiye sahiptir (42).

Pirazinamid bir ön ilaçtır ve intrasellüler ortamda pirazinamidaz enzimi ile pirazinoik aside dönüşür. Pirazinamide duyarlılık ya da direnç *M. tuberculosis*'in amidaz aktivitesi ile korelasyon göstermektedir. Bu ilaca dirençli olan suşların çoğunda azalmış ya da kaybolmuş amidaz aktivitesi saptanmıştır. Bunun sonucunda pirazinamidaz aktif şekle dönüşmemektedir (42).

**Farmakokinetik:** Sadece oral şekli bulunmaktadır. Oral alımından sonra iki saatte pik serum konsantrasyonuna ulaşır. Yarılanma ömrü 23 saati bulmaktadır. BOS dahil, tüm vücuda iyi dağılır. %40'ı pirazinoik asid, %3'ü pirazinamid olarak idrarla atılmaktadır (42).

**5.9.1.5. Ethambutol:** Bu ilacın etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. İlk yayınlarda ethambutolun hücre duvarına bağlandığı bildirilmiştir. Son zamanlarda ethambutolun etki mekanizmasının, hücre duvarının oluşumunda önemli olan arabinogalakton sentezinin inhibisyonu olduğu gösterilmiştir (42).

Ethambutol genellikle kullanıldığı dozlarda bakteriyostatik etkili olmakla birlikte, intermitten tedavide uygulandığı yüksek dozlarda bakterisit etki göstermektedir (42).

**Farmakokinetik:** Oral şekilde alınmaktadır. Gastrointestinal sistem (GİS)' den hızla emilir, 2-4 saatte serum pik konsantrasyonuna ulaşır. Dokuların çoğuna iyi penetre olmakla birlikte meninkslere geçemez. İlacın %65'i idrarla, diğer %20-25'i dışkı ile atılır (42).

## 6. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz kliniği ile Van Verem Savaş Derneğine başvuran klinik ve laboratuvar olarak akciğer tüberkülozu tanısı konmuş ve ilk defa bu hastalığa yakalanan 18 yetişkin hasta üzerinde yapıldı. Bu hastaların hastalıklarıyla ilgili klasik tedaviye [INH (izoniazid) + RIF (rifampisin) + EMB (ethambutol) + MPZ (morfozanamid) + SM (streptomisin)] başlanmadan önce ve ortalama 2 ay sonra hastalardan ikinci kez alınan 5'cc lik kanlar derhal laboratuvara getirildi. Burada 5 dakika 13000Xg de santrifüje edilerek serum ayrıldı, ayrılan bu serumlar steril ependorf tüplerin içine konuldu ve çalışma yapılana kadar derin dondurucuda -70°C'de saklandı.

Çalışmada IFN- $\gamma$  ve IL-2 seviyesini saptamak için ELISA yöntemi kullanıldı. Bu sitokinlerin serumda tespit edilmesinde IFN- $\gamma$  (Katolog No: 1 920 995) ve IL-2 (Katolog No:1 534 483) ELISA (Boehringer Mannheim-Almanya) kitleri kullanıldı. Test, streptavidin kaplı küçük çukurlu kaplarda insan İnterferon- $\gamma$  ve IL-2'nin kantitatif olarak invitro saptamak için yapılan fotometrik ELISA yöntemidir.

### İlave Ekipmanlar:

- a) Pipetler,
- b) Karıştırıcı (mikroplate için),
- c) Okuyucu (mikroplate için) = Anthos Labtec Instruments A 5022-LP 400 (Salzburg-Austria),
- d) Yıkayıcı (mikroplate için) = LP 35 Plate Washer Sanofi Diagnostic Pasteur (Adil Instruments, Strasbourg-Schiltighiem- France).

Testin Prensipleri: h-IL-2 ve h-IFN- $\gamma$ , antikor saptayıcı peroksidaz konjugat ve biotinle işaretli yakalayıcı antikor ile aynı zamanda bağlanır. Bu kompleks biotin işaretleyici antikor vasıtasıyla, yüzeyi streptavidin kaplı mikroplate'e bağlanır. Yıkamayı takiben peroksidaza bağlanan substrat tetramethylbenzidine (TMB) fotometrik olarak okunur. Ve test edilen numunedeki saptanmak istenen markırların konsantrasyonlarına göre miktarı renk yoğunluğuna göre değerlendirilir.

### **Çalışılan Kitin İçeriği Ve Çalışma Prensipleri:**

Heriki test için yapılan ELISA yönteminde testde kullanılan içerik ve yöntem aynıdır. Sadece kullanılan solüsyonlar aranan markıra spesifiktir, bu yüzden aşağıda anlatılacak olan test içeriği ve yöntemden ortak olarak bahsedilecektir.

**ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay):** ELISA yöntemi özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanır. Antijen ve antikor bağlanması özgül olduğu için elimizde neye özgül olduğunu bildiğimiz antijen var ise bununla örnekteki antikorun varlığını, tipini ve miktarını, antikor var ise bununla da örneklerdeki antijen varlığını ve miktarını saptayabiliriz. Değişik şekillerde tanımlanan ELISA yöntemleri (ör. Kompetitif ve non kompetitif ELISA, indirekt ELISA, sandwich ELISA, makro ve mikro-ELISA, avidin-biyotin ekli ELISA yöntemi) uygulanmaktadır.

Aşağıda örnek olarak serumda antikor aramak için yapılan indirekt mikro ELISA testinin basamakları açıklanarak ELISA yönteminin esas tanımlanacaktır. Serumda antijen aranacağı zamanda aynı işlemler yapılır ancak plakta antikor kaplı olmalıdır. ELISA yöntemi basamakları:

1. Katı faz olarak 96 çukurlu düz tabanlı polistren plaklar kullanılabilir. Katı faza bilinen bir antijen bağlanır. Katı faza antijen bağlandığı için hazırlanan ELISA plağı ile serum örneklerinde bu antijene özgül antikor varlığı araştırılır.

2. Antijen bağlı çukurlara serum örnekleri eklenerek oda ısısında veya 37°C'de belirli bir süre bekletilir. İnkübasyon sonunda çukurlara eklenmiş olan serum örnekleri dökülerek çukurlar tamponlanmış sıvı ile yıkanır. Çukura eklenen serum içerisinde özgül antikor var ise katı fazdaki antijene bağlandığı için yıkama işlemi ile ortamdaki uzaklaştırılmaz. Çukura eklenen serum örneğinde özgül antikor yok ise katı fazdaki antijene bağlanma olmaz ve yıkama işlemi ile eklenen serum örneği tamamen temizlenmiş olur.

3. Katı fazdaki antijene bağlanmış olan IgG yapısındaki antikoru saptamak amacı ile çukurlara Fc kısmı enzim ile işaretli anti-IgG antikoru eklenir. Katı fazdaki antijene bağlanmış olan IgM yapısındaki antikorları saptamak için ise üzerinde enzim ile işaretli anti-IgM antikoru eklenir. Enzim ile işaretli anti-IgG veya anti-IgM antikorları konjugat

olarak tanımlanır. Konjugat yapısına eklenen enzim genellikle peroksidazdır. Ancak alkalin fosfataz, glukoz oksidaz, beta D-galaktozidaz gibi başka enzimler de işaretleme için kullanılmaktadır. Bu aşamada çukurlara konjugat eklendikten sonra plak belirli bir süre bekletilir. İnkübasyon sonunda çukurlara eklenen konjugat dökülür ve tamponlanmış su ile birkaç kez ikinci yıkama işlemi yapılır. Eklenmiş olan konjugat katı fazdaki antijene bağlanmış olan özgül antikora bağlandığı için ikinci yıkama işlemi ile çukurdan uzaklaştırılmaz.

4. İkinci yıkama işlemi sonrasında ortama bağlı kalan konjugatın gösterilmesi amacıyla çukurlara konjugattaki enzime uygun substrat ve reaksiyonun görünür hale gelmesi için kromojen içeren karışım eklenir. Örneğin konjugattaki enzim peroksidaz enzimi ise enzim substratı olarak ortofenilen diamino benzidin (OPD) veya tetrametil benzidin (TMB) gibi kromojen madde içeren hidrojen peroksit kullanılır. Çukurlara eklenmiş renksiz enzim substratı belirli bir süre sonrasında konjugattaki enzimin etkisiyle renklenir. Örneğin enzim substratı kullanılan  $H_2O_2$ +OPD karışımı sarı renge döndürür. Enzim aktivitesini durdurmak amacıyla  $H_2SO_4$  eklenir ve oluşan rengin koyuluğu (optik dansitesi) ELISA okuyucusunda uygun filtre kullanılarak değerlendirilir. Çukurlarda oluşan rengin koyuluğu serum örneğindeki antikorun miktarı ile doğru orantılıdır. Serumda katı faza bağlı antijene özgül antikor yoksa, 3. aşamada eklenen konjugatın ortamda bağlı kalması mümkün olamayacağı için ikinci yıkama işlemi ile atılır ve çukura enzim substratı eklendiği halde renklenme olmaz. Plaktaki bazı çukurlara miktarını bildiğimiz standart antikor eklenirse, bu çukurlardan elde edilen optik dansite eğrisi ile içeriği bilinmeyen örneklerdeki antikor miktarı saptanabilir (9).

**Test Prosedürü:** Aşağıda verilen tablolarda test prosedürleri açıklanmaktadır.

**Tablo 6.1. Test İçeriği : (IL-2 ve IFN- $\gamma$ 'ya spesifik olarak kullanılan ortak içerik).**

Şişe/kap	İçerik	Fonksiyon bilgisi
1 mavi	Anti-hIL-2 veya anti-hIFN- $\gamma$ için biotin	hIL-2 için F(ab') <sub>2</sub> -fragmentli koyunlardan yapılmış poliklonal antikorlar, hIFN- $\gamma$ için fareden yapılmış monoklonal antikorlar, beyaz liyofilizat halde. antikor bağlı doğal ve rekombinant hIFN- $\gamma$ veya hIL-2 antikor yakalayıcı
2 kırmızı	Anti-hIL-2 veya anti-hIFN- $\gamma$ peroksidaz (HRP)	hIL-2 için monoklonal antikorlar farelerden (klon B-G5), hIFN- $\gamma$ için monoklonal antikorlar farelerden, peroksidazlı Fab-fragmentli konjugat, beyaz liyofilizat. antikor saptayıcı
3a-3f portakal	hIL-2 veya hIFN- $\gamma$ için standart	BSA ihtiva eden bir serum analog matrikste 0 ile 800 pg/ml hIL-2 veya hIFN- $\gamma$ , tampon, koruyucular; beyaz liyofilizat halinde. hIL-2 standart
4 menekşe	hIL-2 veya hIFN- $\gamma$ kontrol serumu	300 pg/ml civarında hIL-2 veya hIFN- $\gamma$ ; beyaz liyofilizat halinde pozitif kontrol
5 kırmızı	İnkübasyon tamponu	100 ml kullanılmaya hazır berrak solüsyon. dilüsyon tamponu
6 beyaz	Yıkama tamponu	İki tablet beyaz
7 kahve rengi	TMB substrat solüsyonu	8ml, kullanılmaya hazır, hafif sarıca; berrak solüsyon.
8 renksiz	TMB stop Solüsyon	8ml, kullanıma hazır, 0.94 N sülfirik asit; berrak solüsyon
9	Mikro plate	96 streptavidin kaplı kuyucuklar
10	Adezif kaplayıcı	2 adet

TMB=Tetramethylbenzidine,  
POD=Peroxidase

**Tablo 6.2. Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması.**

<b>Solüsyon</b>	<b>İçerik</b>	<b>Çalışma solüsyonlarının Tekrar hazırlanması</b>	<b>Solüsyon Stabilitesi</b>
1	Anti-hIFN- $\gamma$ veya Anti-hIL-2 Biotin Şişe 1	1.2 ml bidistile suda liyofilizat eritilir. 10 dakika oda ısısında yavaşça karıştırılır fakat vortex yapılmaz. Berrak ve hafifçe sarı solüsyon oluşur.	4°C de bir ay
2	Anti-hIFN- $\gamma$ veya Anti-hIL-2 HRP Şişe 2	1.2 bidistile suda liyofilizat 10 dakika oda ısısında hafifçe karıştırılır. Fakat vortex yapılmaz. Berrak hafif sarıca renk oluşur.	4°C de bir ay
3a-3f	hIFN- $\gamma$ veya hIL-2 Standart Şişe 3a-3f	0.5 ml bidistile suda liyofilizat 10 dakika karıştırılır fakat vortex yapılmaz. Renksiz berrak solüsyon oluşmaktadır.	4°C de bir ay -20°C ve -70°C de 6 ay
4	hIFN- $\gamma$ veya hIL-2 kontrol serum Şişe 4	0.5 ml bidistile suda liyofilizat 10 dakika hafifçe karıştırılır.Vortexlenmemeli Hafif bulanık ve sarıca su oluşur.	4°C de bir ay -20 °C ve -70 °C de 6 ay
5	İnkübasyon Tamponu Şişe 5	100 ml Kullanıma hazır hafif bulanık renksiz.	
6	Yıkama Tamponu Şişe 6	2 lt bidistile suda bir tablet eritilir. Berrak renksiz solüsyon.	4°C de bir ay
7	TMB tampon solüsyonu Şişe 7	25 ml kullanıma hazır berrak renksiz portakal renginde.	
8	TMB Durdurma solüsyonu Şişe 8	8 ml kullanıma hazır, renksiz berrak solüsyon	
9	İmmüno reajent	10 kuyucuk için (2.2ml),100 $\mu$ l anti-hIFN- $\gamma$ veya IL-2 –HRP (solüsyon2) ile 2 ml inkübasyon tamponundan ekleyip karıştırılacak daha sonra üzerlerine100 $\mu$ l anti-hIFN- $\gamma$ veya hIL-2-biotin (solüsyon 1) eklenip karıştırılacak fakat vortexlenmeyecek. Berrak renksiz .	4°C de 8 saat

**Çalışma yöntemi:** Yukarıda basit olarak gösterilen tabloda hazırlanan çalışma solüsyonları, plate'deki çukurlara uygun olarak konur. Daha sonra  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen serumlar oda ısısına ( $20-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) çıkarılıp çözünmesi sağlanır. Serumlar çözüldüğünde çalışmaya başlanabilir.

**Tablo 6.3. ELISA Çalışma Plate'i.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B1	B1	P1	P1								
<b>B</b>	Sa	Sa										
<b>C</b>	Sb	Sb										
<b>D</b>	Sc	Sc										
<b>E</b>	Sd	Sd										
<b>F</b>	Se	Se										
<b>G</b>	Sf	Sf										
<b>H</b>	P0	P0									P40	P40

B1 = Kör (sadece substrat için)

Sa-Sf = Standart 3a-3f (hIFN- $\gamma$  veya hIL-2 için standart)

P0 =Pozitif kontrol(hIFN veya hIL-2 için kontrol serumu)

P1-P40= Örnekler 1-40

Burada sadece 40 örnek için yapılan çalışma gösterilmiştir. Bu çalışma 96 kuyucuklu plate üzerinde yapılmıştır. Burada her bir hastanın serumu iki kuyucuğa konularak çift çalışıldı.

**Çalışma prensibi:** Test prospektüsünde verilen çalışma prensibi ile ilgili bilgiler aşağıda tablo şeklinde verilmektedir.

**Tablo 6.4. Çalışma Prensibi.**

Sıra	Yapılanlar	Volüm	Zaman
1	Solüsyonlar 3a-3f –4 ile serumlar uygun kuyucuklara konur	20 µl	
2	Solüsyon 9 (immünoreajent) eklenir.Üzerleri folyo ile kaplanır. 350 rpm de karıştırılarak inkübe edilir.	200 µl	2 h
3	Plate'in üzerindeki sıvılar aspirasyon yoluyla yada hafifçe bir kağıdın üzerine vurularak boşaltılır.Solüsyon 6 ile 3 kez yıkanır(yıkama tamponu).	3x300	3x1 dakika
4	Solüsyon 7 eklenir. Üzerine yapışkan folyo kaplanır, 350 rpm de, oda ısısında, karanlıkta karıştırılıp inkübe edilir.	200 µl	10-25 dakika
5	Fotometrik Ölçüm		
	450-690 nm dalga boyunda	50 µl stop solüsyon 8'den kuyucuklara konur. 1 dakika karıştırılarak inkübe ettirilir. Stop solüsyon eklendikten 5 dakika içinde ölçüm yapılır. Not: 5 dakika sonra renkte solukluk olabilir.	
	370nm dalga boyunda	Solüsyon 8 (stop solüsyondan konmaz). TMB substrat konulduktan sonra ölçüm yapılır.	



## 7. BULGULAR

Çalışılan serumlardaki IFN- $\gamma$  ve IL-2'nin kandaki değerlerini bulmak için logaritmik cetvel kullanarak ilk önce standartların absorbands değerleri kaydedilmiş ve onların serumdaki pg/ml cinsinden bilinen değerleri ile cetvelde standart eğri elde edilmiştir. Bu standart eğri üzerinde çalışmada kullanılan hasta serumlarına ait absorbands değerlerin izdüşümü alınarak, kandaki miktarlarının pg/ml cinsinden değerleri bulunmuştur.

7.1. IFN- $\gamma$  testinde ELISA yöntemiyle ölçülen standart ve serum absorbands değerleri: IFN- $\gamma$  testinde blank ve standartlarla alınan absorbands değerleri Tablo 7.1.'de verilmiştir.

**Tablo 7.1. IFN- $\gamma$  testinde blank ve standartlarla alınan absorbands değerleri**

Standartların absorbands değerleri:	Standartların kandaki bilinen pg/ml değerleri:
Blank: 0.086	
Pozitif kontrol: 0.581	141.0 pg/ml
Standart 1 : -0.007	0.1 pg/ml
Standart 2 : 0.066	19.0 pg/ml
Standart 3 : 0.232	65.0 pg/ml
Standart 4 : 0.551	170.0 pg/ml
Standart 5 : 1.290	393.0 pg/ml
Standart 6 : 2.055	856.0 pg/ml

ELISA yöntemiyle IFN- $\gamma$  testi uygulanan hasta serumlarında ölçülen absorbands değerleri ile logaritmik cetvele uyarlanarak pg/ml cinsinden bulunan karşılıkları Tablo 7.2.'de verilmiştir.

**Tablo 7.2. ELISA yöntemiyle IFN- $\gamma$  testi uygulanan hasta serumlarında ölçülen absorbans değerleri ile logaritmik cetvele uyarlandıktan sonra elde edilen pg/ml cinsinden karşılıkları.**

Hasta No	1.serum		2.serum	
	Absorbans değer	pg/ml karşılık değer	Absorbans değer	pg/ml karşılık değer
1.	0.060	16.5	-0.009	< 15
2.	0.080	22.2	0.008	< 15
3.	0.024	< 15.0	-0.010	< 15
4.	0.017	< 15.0	-0.006	< 15
5.	0.056	15.0	0.042	< 15
6.	0.025	< 15.0	-0.004	< 15
7.	0.010	< 15.0	-0.005	< 15
8.	0.007	< 15.0	-0.008	< 15
9.	0.057	15.5	-0.003	< 15
10.	0.051	< 15.0	0.028	< 15
11.	0.069	19.2	0.025	< 15
12.	0.048	< 15.0	0.044	< 15
13.	0.047	< 15.0	0.010	< 15
14.	0.026	< 15.0	0.005	< 15
15.	0.006	< 15.0	0.004	< 15
16.	0.078	21.5	0.102	28.5
17.	0.013	< 15.0	-0.002	< 15
18.	0.014	< 15.0	-0.010	< 15

**7.2. IL-2 testinde ELISA yöntemiyle ölçülen standart ve serum absorbans**

**değerleri:**

IL-2 testinde ölçülen absorbans değerler Tablo 7.3.'de verilmiştir.

**Tablo 7.3. IL-2 testinde blank ve standartlarla alınan absorbans değerleri**

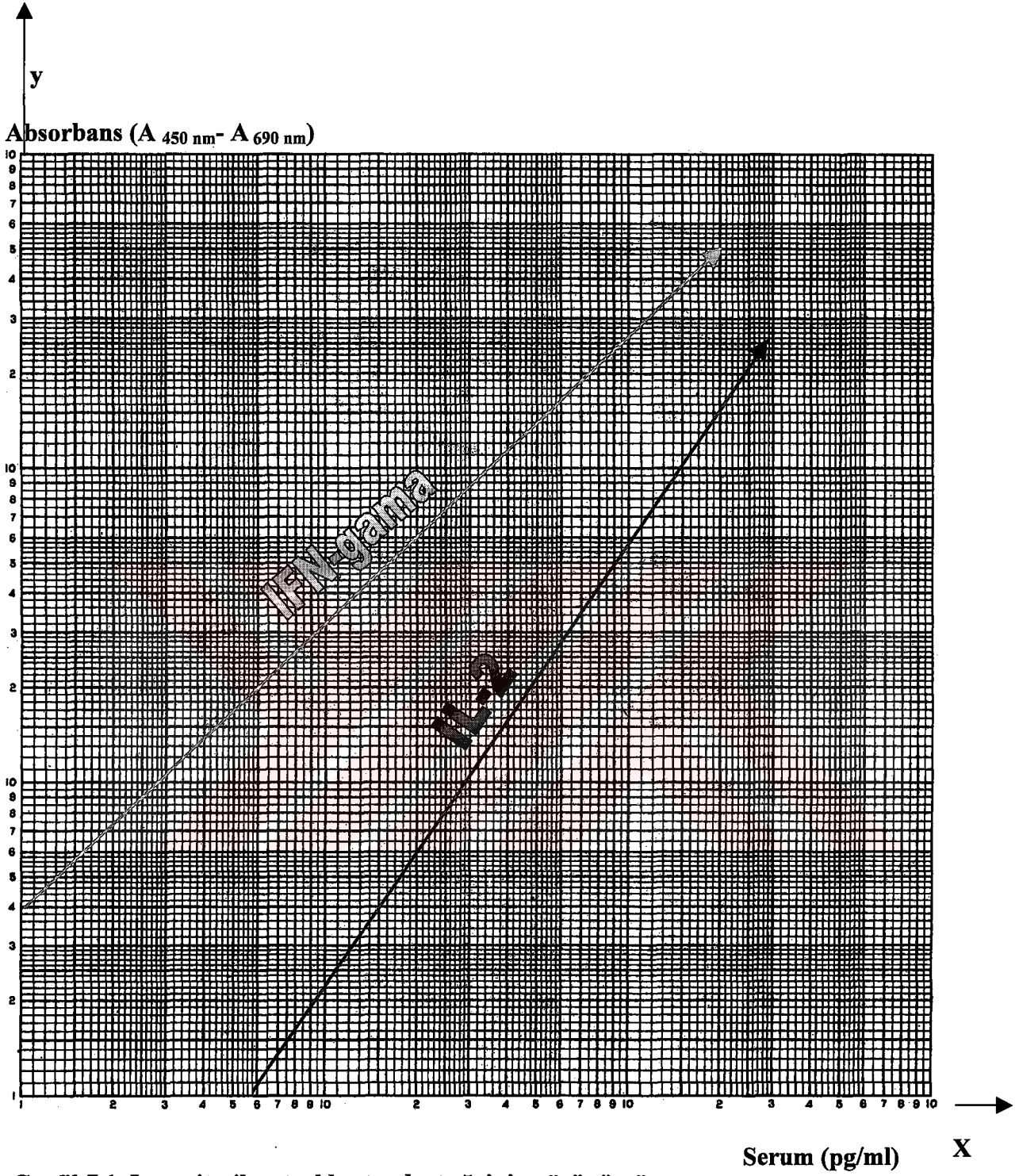
Standartların absorbans değerleri:		Standartların kandaki bilinen pg/ml değerleri:	
Blank: 0.055			
Pozitif kontrol:	0.249	372.0	pg/ml
Standart 1 :	0.005	0.001	pg/ml
Standart 2 :	0.008	34.0	pg/ml
Standart 3 :	0.022	88.0	pg/ml
Standart 4 :	0.010	183.0	pg/ml
Standart 5 :	0.139	350.0	pg/ml
Standart 6 :	0.439	673.0	pg/ml

ELISA yöntemiyle IL-2 testi uygulanan hasta serumlarında ölçülen absorban değerleri ile logaritmik cetvele uyarlanarak pg/ml cinsinden bulunan karşılıkları Tablo 7.4'de verilmiştir.

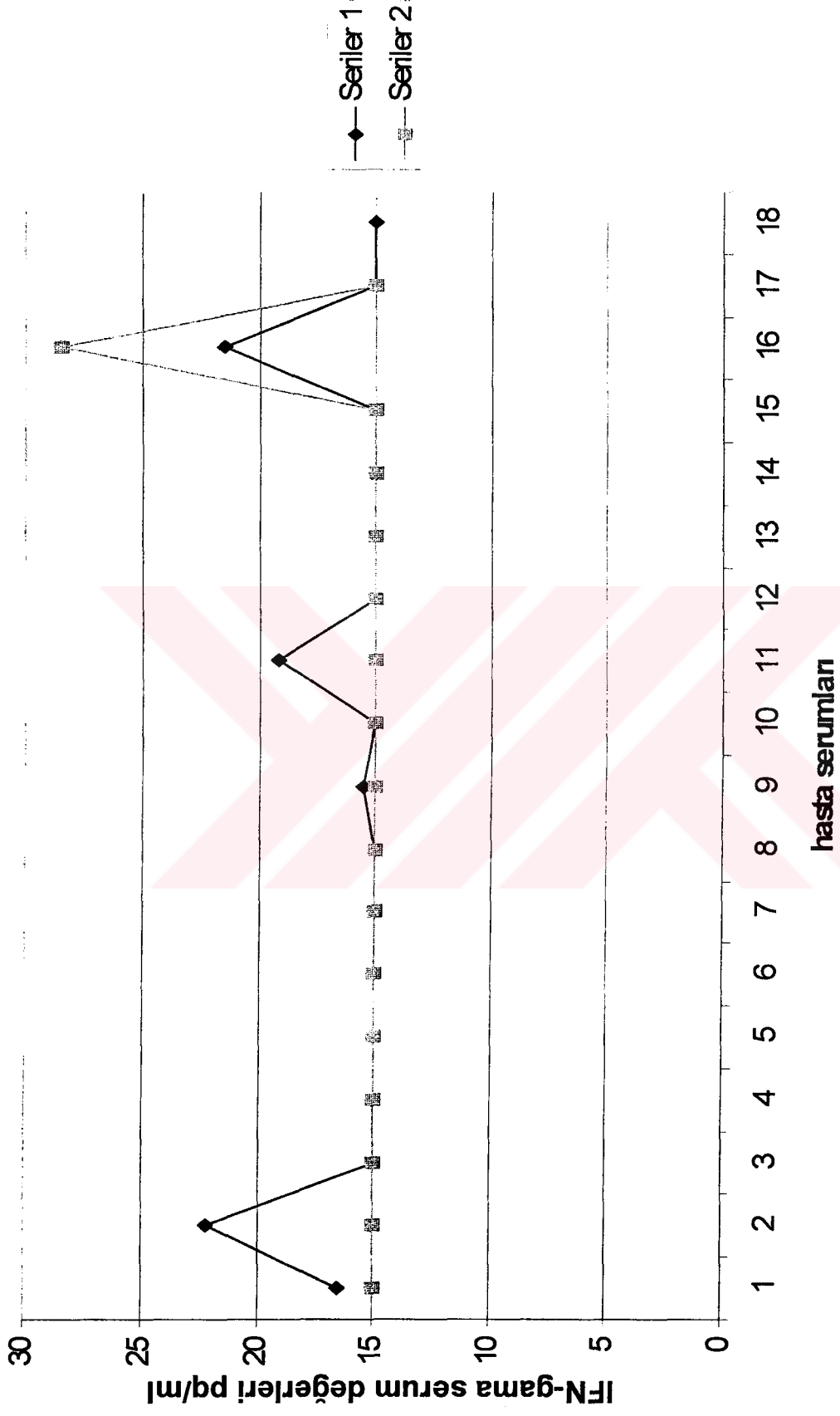
**Tablo 7.4. ELISA yöntemiyle IL-2 testi uygulanan hasta serumlarında ölçülen absorban değerleri ile logaritmik cetvele uyarlandıktan sonra elde edilen pg/ml cinsinden karşılıkları.**

Hasta No	1.serum		2.serum	
	Absorbans değer	pg/ml karşılık değer	Absorbans değer	pg/ml karşılık değer
1.	0.094	255	0.026	105
2.	0.013	65	0.002	< 15
3.	0.013	65	0.011	58
4.	0.012	60	0.011	58
5.	0.041	190	0.011	58
6.	0.006	< 15.0	0.001	< 15
7.	0.021	90	0.004	< 15
8.	0.035	130	0.023	95
9.	0.012	60	0.026	105
10.	0.654	980	0.238	490
11.	0.103	270	0.026	105
12.	0.015	72	0.040	140
13.	0.026	105	0.007	< 15
14.	0.034	125	0.013	65
15.	0.032	120	0.014	69
16.	0.054	172	0.028	110
17.	0.024	100	0.031	118
18.	0.032	120	0.011	58

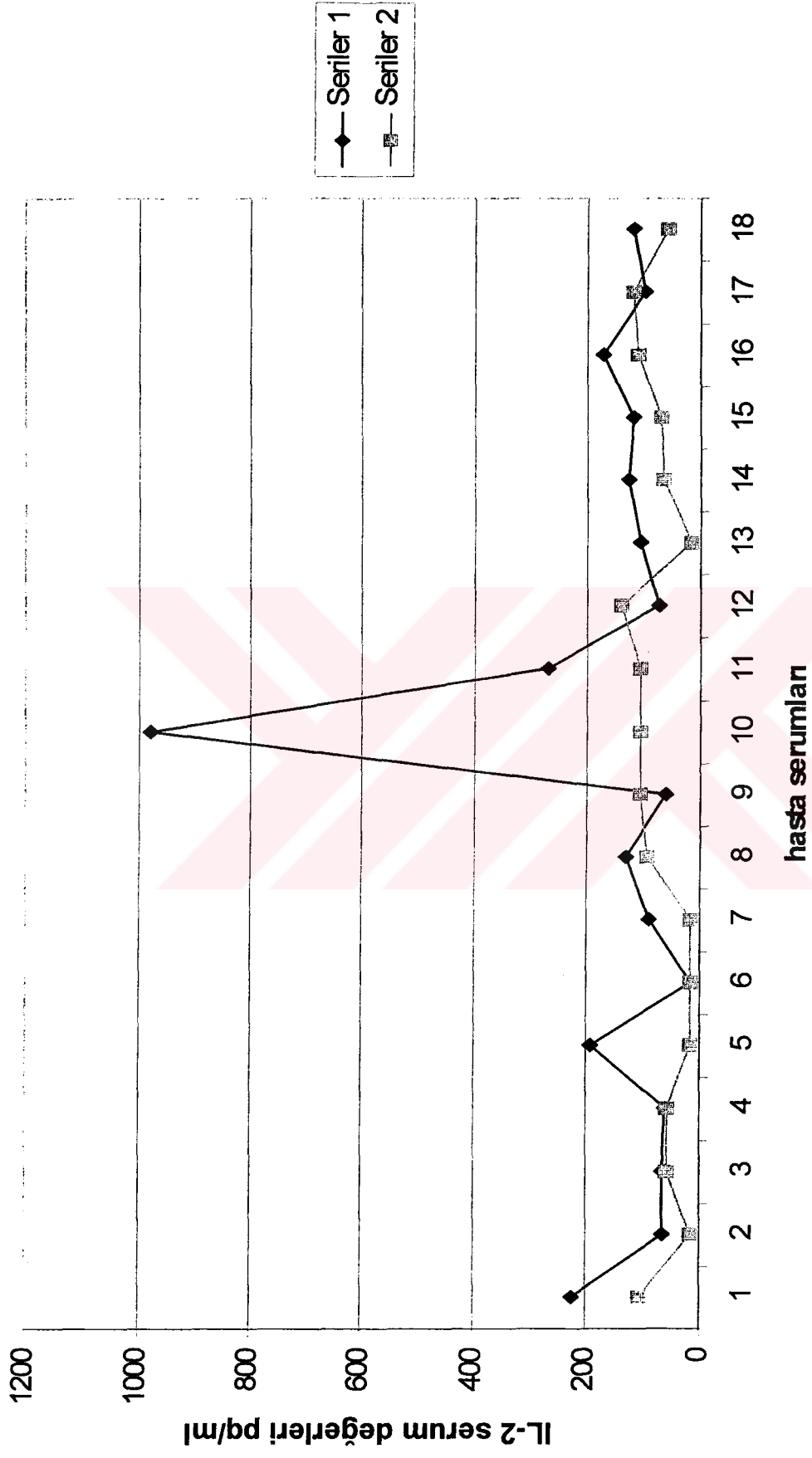
**7.3. Standart Eğrinin Elde Edilmesi:** Aşağıda, logaritmik cetvelde standartların kan serum seviyeleri ile absorban değerlerine göre standart eğriler çizilmiştir. Bu eğrilerden, üstteki IFN- $\gamma$ 'ya, alttaki ise IL-2'ye aittir. ELISA yöntemi ile absorban değerleri saptanan örneklerin kandaki değerlerinin (pg/ml olarak) hesaplanması gerçekleşmiştir. Bu iki eğri baz alınarak örneklerin absorban değerleri ile kandaki IFN- $\gamma$  seviyesi bulunmak istendiğinde absorban değeri (y) koordinatından bulunup, çizilen standart eğri ile çakışan yerde aşağıdaki (x) koordinatı gelindiğinde o örnekteki serum IFN- $\gamma$  seviyesi hesaplanmış olmaktadır. Aynı şekilde hesaplamak istediğimiz örnekteki IL-2 seviyesi de IFN- $\gamma$ 'daki gibi koordinatlar yardımı ile hesaplanmaktadır.



Grafik7.1. Logaritmik cetvelde standart eğrinin görünümü

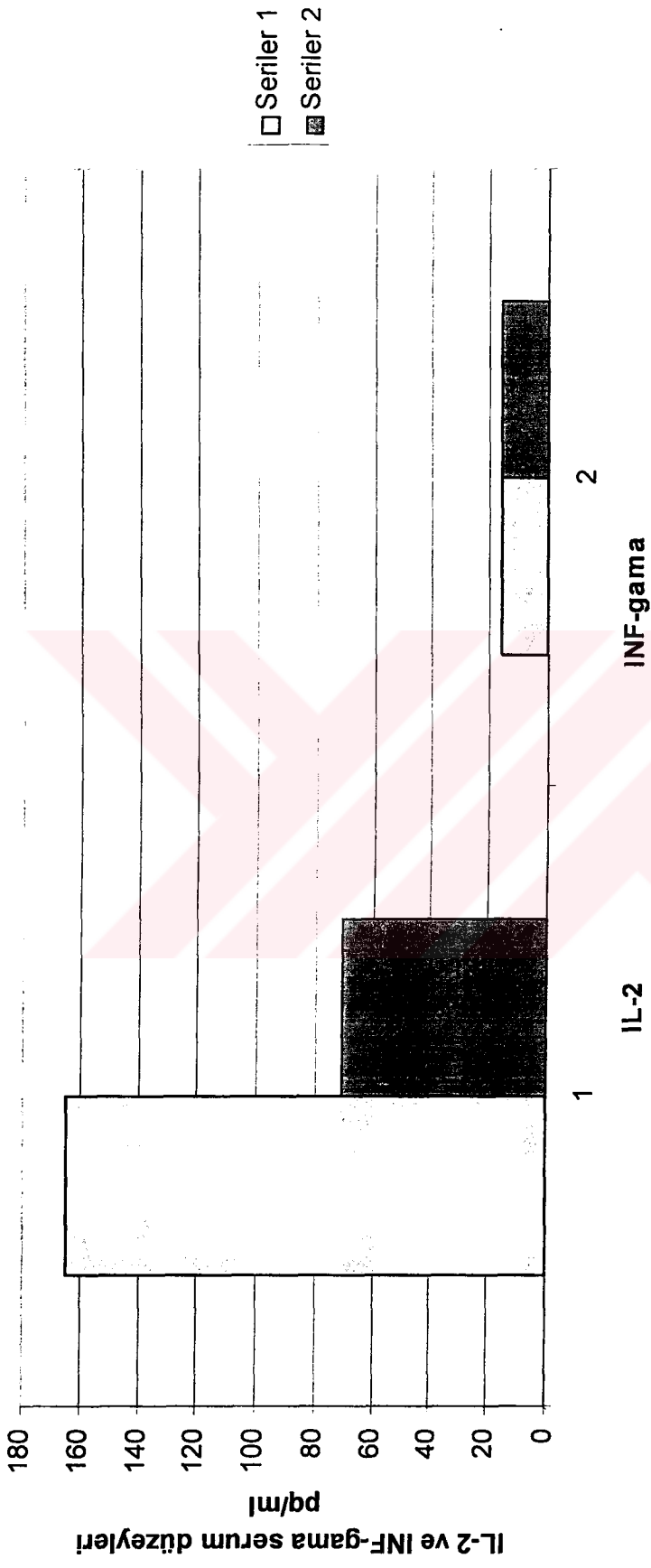


**Grafik7.2. Birinci ve ikinci hasta serum serilerinden alınan interferon gama sonuçları.**



Grafik 7.3. Birinci ve ikinci hasta serum serülerinden alınan IL-2 sonuçları.

## IL-2 ve INF-gama'nın serumdaki değerlerinin karşılaştırılması



Grafik 7.4. IL-2 ve IFN- $\gamma$ 'nın Serum Değerlerinin Karşılaştırılması.

Yukarıda sonuçların toplu olarak verildiği şemada; mavi ile gösterilen sütunlar 1. serumların ortalama değerlerini, bordo ile gösterilen sütunlar ise 2. serumların ortalama değerlerini göstermektedir. Burada IL-2 değerlerinin 1. serumda daha yüksek oranda olduğu, 2. serum serisinde alınan IL-2 değerlerinin ise daha az olduğu görülmektedir. IFN-gama değerlerinin ise 1. ve 2. serum serilerinde değişmediği ve her iki seride de düşük düzeyde olduğu görülmektedir.

IL-2 ve IFN- $\gamma$  için ELISA yönteminde kullanılan standartların ölçüm aralığı 15-800pg/ml arasındadır. Bu nedenle ölçümü yapılan serumdaki IL-2 ve IFN- $\gamma$  değerleri bu aralıklarda normal oran olarak değerlendirilmiştir. Ölçümü yapılan serumların özellikle IFN- $\gamma$  testinde ilk ve sonraki serumlarda alınan değerler, standartların en alt sınır seviyesi olan 15 pg/ml'nin de altında bulunmuştur. Bu yüzden 15 pg/ml değerinin altında bulunan değerler istatistiksel veri olarak 15pg/ml olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, istatistiksel anlamlılığını test etmek amacıyla 15 pg/ml altında bulunan değerlerin 0 pg/ml olarak alınması durumunda da iki değer arasında anlamlı bir fark olmamıştır.

Analizler normal dağılım göstermediği için istatistiksel çalışmalarda Wilcoxon test yöntemi uygulanmıştır. Bu değerlendirmeler Minitab paket programı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda;

a) IFN-gama için yapılan istatistiksel değerlendirmede; tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki IFN-gama seviyesinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. ( $p > 0.05$ ).

b) IL-2 için yapılan istatistiksel değerlendirmede; tedavi öncesi ve tedavi sonrasında IL-2 seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.01$ ).



## 8. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnhalasyon yoluyla alınan tüberküloz basilinin alveolar hücrelere gelip burada alveolar makrofajlarla tanışmalarından sonra, makrofajların sindiriminden kurtulan basiller (virulan basiller), fagozomlarda çoğalır. Makrofajlar içinde küçük parçalara ayrılarak, sitoplazmada epitoplari ile MHC kompleksine bağlanır ve bununla birlikte T lenfositlerine sunulurlar. Antijen ile birlikte bağlanan MHC kompleksi sonrasında, T hücreleri aktive olurlar. Ürettikleri IL-2 ile sadece bu antijene karşı reaksiyon veren bir T lenfosit klonu oluştururlar. Bu klon, *M.tuberculosis* basili antijenleri ile uyarıldığında, koruyucu immünitinin, gecikmiş aşırı duyarlılığın, sitolizin, antikor üretimi ve hafıza hücrelerinin uyarılması veya süpresyonu gibi değişik immünolojik reaksiyonlara katılır. Basille karşılaşan CD4+ T lenfositler IL-2 üreterek klonal genişleme, çeşitli sitokinler üreterek de, inaktif durumdaki makrofajları aktive eder ve hücre içi basil çoğalmasını etkin olarak kontrol ederler. Buradan da anlaşılacağı gibi tüberküloz enfeksiyonunun başında makrofajlar tarafından çok yoğun olarak T lenfositlerinin uyarımı sağlanmaktadır. Bunun sonucunda makrofajlar sitokin üretimini artırarak bakterilerin öldürülmesinde aktif rol oynarlar. Tüberküloz hastalarına yapılan antibiyotik tedavisinde, tüberküloz basillerinin öldürülmesi sonucunda bakteri sayısında azalma sağlanacağından makrofajlar tarafından T lenfositlerinin uyarımı da azalacaktır (38).

Hücresele immün cevapta, T hücrelerinin aktivasyonu ile sitokinlerin (IL-2 ve IFN- $\gamma$ ) üretimi gerçekleşmektedir. Birçok çalışma, aktif tüberkülozlu ve ilerlemiş hastalıklarda PBMC (peripheral blood mononuclear cells) hücrelerinden IL-2 üretimi ve proliferasyonunun azaldığını göstermiştir (43).

IL-2 ve IFN- $\gamma$ 'nın, tüberküloz gibi intrasellüler ajanlara karşı koruyucu cevabı düzenleme işinde aracılık ettiği düşünülmektedir. Burada IL-2 proliferasyonuna ait veriler mevcuttur. Bu hastalardaki IFN- $\gamma$  yetersizliği hakkında birçok potansiyel mekanizma açıklanmıştır. Bu mekanizmalar;

1- CD4 hücre sayısı düşük hastalarda, IFN- $\gamma$  üretim kabiliyeti olan antijene spesifik hücrelerin sayısındaki azalma saptanmaktadır. Nitekim, tüberkülozlu hastalarda IFN- $\gamma$  düzeyleri ölçülmüş ve bazı hastalarda IFN- $\gamma$  yetersizliği olduğu gösterilmiştir (44,45).

2- Yine yapılan bazı invitro çalışmalar; optimal IFN- $\gamma$  üretimi için IL-2 varlığının gerekli olduğunu göstermiştir(46).

3- HIV enfeksiyonlu ve tüberkülozlu hastalarda IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  veya IFN- $\gamma$  gibi bazı sitokinlerin üretiminin azaldığı, tip 2 sitokinlerin üretiminin ise arttığı gösterilmiştir (47). MDRTB' lu hastalarda gözlemlenen CD4 lenfositopeninin, hastalığın şiddeti ve düşük IL-2/IFN- $\gamma$  üretimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(48). Bir çalışmada IL-12'nin, IFN- $\gamma$  seviyesini antijene spesifik olarak arttırdığı görülmüştür. MDRTB'lu hastaların tedavilerinde birçok farmakolojik ajanın birlikte ve uzun süreli tedavisine gereksinim vardır. CD4+ T hücre miktarı düşük hastalar sitokin tedavisine aday hastalardır (49).

İnatçı yaygın nontüberküloz mikobakteriyel enfeksiyonlarda IFN- $\gamma$ , konvansiyonel tedavi ile kombine edilebilir(50).  $\gamma\delta$  T hücreleri, CD4+ T hücrelerine göre IFN- $\gamma$  üretiminde daha etkindirler. Yüksek miktarda IFN- $\gamma$ , intrasellüler bakterilerden koruyucu immünite ile ilişki içindedir (51)

Bir çalışmada, MDRTB'lu hastalarda optimal çok ilaçlı antitüberküloz tedaviye ek olarak, düşük doz rhu IL-2(recombinant human interleukin-2)'nin kombine edilmesinin tedaviyle alınan sonuçlara olumlu etki yaptığı gözlenmiştir. Burada immünolojik yanıtta düzelmeye ek olarak klinik, bakteriyolojik ve radyolojik değişikliklerde de olumlu değişikliklerin olduğu; balgamda bakteriyolojik yükün, göğüs radyolojik sonuçlarının düzeldiği ve hastaların %60'ında semptomların azaldığı saptanmıştır(29,30). Rhu IL-2 etkisi ile mikobakteriyel antijenlere karşı lenfosit proliferasyonunun geliştiği ve periferik kanda CD56(NK) ile CD25 (düşük affiniteli IL-2R) yayılımının arttığı gösterilmiştir. IFN- $\gamma$  ve IL-2'nin mikobakteriyel enfeksiyonlarda hücre aracılığı ile gerçekleşen immüntenin gelişmesinde en büyük role sahip olduğu gösterilmiştir (52).

IFN- $\gamma$  üretimi, tüberküloz plörezili hastaların lezyon bölgesindeki plevral sıvılarında yoğun olarak bulunmaktadır(26). IFN- $\gamma$  makrofaj aktivasyonuna en çok katkıda bulunan sitokindir. İn-vivo olarak *M. tuberculosis*'in kontrolünde en önemli rolü, IFN- $\gamma$ 'nın aktive ettiği fagositler oynamaktadır (52). IFN- $\gamma$  ve IL-2 için yapılan m-RNA analizlerinde, Tbc plörezili hastaların plevra sıvılarında, periferik kana göre bu markırların daha yüksek oranda oldukları tespit edilmiştir. IFN- $\gamma$ 'nın plevral sıvıdaki düzeyi, serum düzeyinden 15 kat daha yüksek olarak saptanmıştır. Plevral sıvıdaki lenfositlerin *M. tuberculosis* ile uyarıldıklarında, plevral lenfositlerdeki IFN- $\gamma$  ve IL-2 düzeylerinin,

periferik kan lenfositlerinden daha yüksek olduğu ve IFN- $\gamma$  m-RNA üreten hücrelerin sıklığının da plevral sıvıda, kana göre 20-60 kat fazla olduğu gösterilmiştir (26).

Yapılan bir çalışmada, Tbc'lu hastaların 2/3'ünde mitojenik lektinlerle sitümülasyon sonrası PBL(peripheral blood leukocytes)'lerindeki IFN- $\gamma$  seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Tbc'lu hastalardaki IFN- $\gamma$  yapım eksikliği, lepromatöz lepralı hastalardaki benzer yetersizliği anımsatmaktadır(53). IFN- $\gamma$  ve IL-2'nin plevral yüzeydeki üretimi, *M.tb*'a karşı immün defansı arttırmayı amaçlamaktadır. Mürin makrofajların aktivasyonu ile IFN- $\gamma$  seviyesi artar. *M. bovis* ve *M. tuberculosis* ajanlarına karşı adoptif immünite de, mürin T hücrelerinin fonksiyonel markını olan IFN- $\gamma$ 'nın üretiminin artışı ile gerçekleşmektedir. Bununla birlikte insan makrofajlarında invitro olarak yapılan deneylerde antimikobakteriyel aktivitenin IFN- $\gamma$  kapasitesi ile birlikte arttığı saptanmıştır (26).

Saf donör hücrelerinde, IFN- $\gamma$  mRNA'nın kaynağı olan T hücrelerine spesifik IL-2'nin, mikobakteriyel ajanlara karşı verilen yanıtta, proliferasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. IFN- $\gamma$ , NK hücreleri ve aktive edilmiş  $\gamma\delta$  T hücreleri kadar, aktive edilmiş  $\alpha\beta$  T hücreleri tarafından yapıldığı bilinen bir sitokindir. Yapılan bir çalışmada, NK hücreler veya  $\gamma\delta$  T hücrelerin, periferik kandaki IFN- $\gamma$  mRNA'nın muhtemel kaynağı olduğu gösterilmiştir. Tbc hastalarında azalmış proliferatif yanıtı uygun olarak hücrelerden açığa çıkan IFN- $\gamma$  mRNA'nın miktarının da relatif olarak düşük veya azalmış olduğu, bunun da NK hücreleri ya da T hücre aktivasyonunda azalma ile sonuçlanacağı gösterilmiştir. Sonuçta aktif tb'lu hastalardaki PBMC hücrelerinde, HIV tip 1 enfeksiyonlu ya da lepromatöz lepralı hastalarda olduğu gibi NK hücre sayısının ve aktivitesinin normal insanlara göre azaldığı tespit edilmiştir. Nitekim düşük doz IL-2 tedavisini takiben PBMC hücrelerinde, lepralı hastalarda, NK hücrelerinde 6 kat artma; HIV hastalarının IL-2 terapisi ile PBMC hücrelerinde IL-2R<sup>+</sup> veya CD56'nın oranında veya sayısında önemli değişiklikler olmaksızın, lenfosit aktive eden öldürücü hücre aktivitesi ve NK hücrelerinde artma saptanmıştır (54).

Yapılan bir çalışmada; 7 tb hastasının 4'ündeki lenfositler tedavi öncesi çoğalamamıştır. Bunlarda tedavi sonrası çoğalma gözlenmiştir. Bunun yanında bu 4 hastanın 3'ündeki hücreler IFN- $\gamma$  geni üretmişler, bunlardan 2'si ise düşük düzeyde IFN- $\gamma$  oluşturmuşlardır. Böylelikle IFN- $\gamma$  üretimindeki birincil yetersizlik geçici fenomen olarak

hipotez edilebilir, muhtemelen genetik olarak diğerlerine geçiş gözlenir ve tedavi sonrası hiçbir değişiklik gözlenmez. Bu çalışmada ayrıca tedavi sonrası tüm tb'li hastalarda IL-10 üretiminde azalma olduğu da gösterilmiştir. IFN- $\gamma$  üretimindeki değişiklikler ile IL-10 yapımındaki azalmanın, tb'nin farklı bölümlerinde sitokin yapımında değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir. Bu farklılıkların tedavi sonrası azalan antijenik yüklenme ile ilgili olduğu söylenmektedir (31). Pulmoner tüberküloz; IL-2 ve IFN- $\gamma$ 'nın üretimindeki azalmayla, periferik kan mononükleer hücrelerindeki, pürifiye protein derivelerinin (PPD) stimüle ettiği blastogenezisin azalması ile karakterizedir (55).

Tüberkülozun immünolojisi hakkında uzun yıllardır in-vivo ve in-vitro koşullarda çalışılmaktadır. *M. tuberculosis* antijenlerine karşı hayvanlarda ve insanlarda hastalığın seyri süresince gelişen lenfosit proliferasyon yanıtları incelenmiştir. Ölü bakteriler immün sistemi aktive etmeye sahip olsalar da uzun süreli hücresel immüniteyi aktive etmeğe yetememektedirler. Serumda lenfositler üzerine baskılayıcı etki yapan çeşitli faktörler bulunduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında; antijen antikor kompleksleri, gebelikle ilişkili serum glikoproteinleri, spesifik antikorlar, serum albumini, CRP, seks hormonları, HLA antikorları, serum amiloid A, T hücre antikorları, malign olaylarda ve kronik enfeksiyonlarda artan  $\alpha$ -globulin, prostaglandinler, suprafizyolojik dozda interferon, glukokortikoidler, aspirin, klorokin gibi bazı ilaçları sayabiliriz. Glukokortikoidler, lenfositlerin sayısını lenfositleri başka kompartımanda tutarak (sekestre ederek) azaltırlar. Suprafarmakolojik dozda verildiğinde ise, lenfolitik etki yaparlar. Yine HIV, *Toxoplasma gondii*, *Ebstein Barr* virüsü, *Cytomegalovirus*(CMV), *Respiratory Syncytial Virus*(RSV) gibi bazı enfeksiyon etkenlerinin de, T süprese hücre popülasyonunu arttırarak, CD4/CD8 oranını düşürmek suretiyle ve sitokin sentezini bozarak immün baskılama yaptıkları gösterilmiştir. Rifampin, lenfositlerin immün reaksiyon yeteneklerini bozarak sağaltım süresince tüberküline olan duyarlılığı süprese eder (56,57).

T hücrelerinin aktivasyonunda kullanılan süreç basit bir olay değildir. Bir epitopun T hücre reseptörüne bağlanması, o epitopun hangi sınıf iletim yolunu uyardığına bağımlı olarak tam bir aktivasyon veya sadece bazı lenfokinlerin üretildiği kısmi bir aktivasyona neden olabileceği gibi, herhangi bir aktivite de görülmeyebilir. Aktivasyon; T lenfositlerin proliferasyonunu, sitokinlerin salınımını ve efektör hücrelerin iş görmesini içerir. Bu çoğalma ile lenfositler yabancı antijenle savaşabilir. Proliferasyon büyüme faktörleri

aracılığı ile meydana gelir ki bunların başında IL-2 gelmektedir. Bu nedenle IL-2 artışı aktivasyonun bir kanıtı olarak değerlendirilmektedir (58,59).

Yapılan IL-2 ve IFN- $\gamma$  sitokin tedavilerinde; bu tedavilerde IL-2 yi ve IFN- $\gamma$ ' yı tek olarak vermekle oluşan makrofaj aktivasyonu ile hiç sitokin vermeden makrofajların kendi haline bırakıldıklarında makrofaj içindeki tüberküloz bakterisinin üremesi gözlenmiş ve bunların tek olarak verilmesi ile makrofajların hiç uyarılmadan bırakıldığı şekil arasında anlamlı bir iyileşme farkı bulunamamıştır. Fakat yine yapılan bir çalışmada bu sitokinleri bir arada vermekle bunların kendi aralarında sinerjik bir etki oluşturduğu ve çok büyük oranda mikrobisid etki oluşturduğu gözlenmiştir (60).

Aktif tüberküloz ile inaktif tüberküloz arasındaki sitokinlerin değerlerine bakılan bir çalışmada; çalışılan IFN- $\gamma$  ve IL-12 değerinin anlamlı bir şekilde yüksek bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma bronko alveolar lavajda, insitu hibridizasyon tekniğine göre yapılmıştır. Bunun yanında yapılan başka bir çalışmada ise; IL-2, IL-4 ve IL-5 düzeyinde ise aktif ve inaktif tüberküloz arasında herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır(25). IL-2'nin periferik T lenfositlerini indükleyerek IFN- $\gamma$  ürettikleri gösterilmiştir. Plevral sıvıdaki yüksek IFN- $\gamma$  seviyesi, hem IL-2'nin uyarması hem de antijenik stimülasyonla gerçekleşmektedir (61).

Sitokinler için yapılmış çalışmalar çok geniş ve kapsamlıdır. Tüberkülozlu hastalarda yapılan çalışmalarda sitokinlerin önemli bir makrofaj uyarıcı faktör olduğu ve onların içinde bulunan tüberküloz basillerinin öldürülmesinde güçlü bir görev üstlendiği bir gerçektir.

Sitokinlerin genel özelliklerinden bahsettiğimiz bölümlerde ve bu çalışma konusunda olduğu gibi, sitokinlerle yapılan çalışmalardan, IL-2 ve IFN- $\gamma$  seviyelerinin tüberkülozda ortaya çıkan Th1 hücresel yanıtta önemli bir görevleri olduğu ve basillerin yok edilmesinde T hücrelerine aracılık ettiği görülmektedir.

Bu çalışmada amaç; M.tb ile hastalığa yakalanan erişkin kişilerdeki tedavi öncesi ve 2 aylık 4'lü (INH + SM + RP + EMB) tedavi sonrası serumlarındaki IL-2 ve IFN- $\gamma$  seviyelerinin ölçülmesiydi. Bu nedenle alınan örneklerde bakılan serum sitokin değerlerinde tedavi öncesi ve 2-aylık tedavi sonrasında IFN- $\gamma$  seviyesinde anlamlı bir değişiklik görülmez iken, IL-2 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak; ilk defa tüberküloz hastalığına yakalanan kişilerde M.tb'un vücuda girmesinden sonra IL-2 seviyesinde anlamlı, IFN- $\gamma$  seviyesinde ise çok az bir yükselme olduğu saptanmıştır. Yapılan 2 aylık tüberküloz tedavisini takiben sitokin değerlerinde ve özellikle IL-2 seviyesinde istatistik olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Yapılan tedavi sonucunda hücre içindeki canlı basil oranının büyük ölçüde azalmasının T lenfositlerinden salınan sitokin miktarında da azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Sitokinlerin makrofajlar içindeki canlı basillerin öldürülmesindeki rolü göz önüne alınarak ilaç tedavisinin yanında IL-2 ile tedavinin kombine edilmesinin, hastadaki basillerin yok edilmesinde büyük katkısı olacağı, yapılan benzer çalışmalara ek olarak bu çalışma ile de ortaya konulmuştur. Ayrıca her ne kadar IFN- $\gamma$  seviyelerinde anlamlı olmayan değerler saptanmış olsa da, antitüberküloz tedavinin desteklenmesinde tek başına IL-2 vermektense, hücrel immun yanıtta pozitif etkileri gözönüne alınarak tedaviye IFN- $\gamma$ 'nın da eklenmesinin tüberküloz hastalığına karşı savaşta destek sağlayacağı düşünülebilir.



## 9. KAYNAKLAR

1. Anđ Ö, Erturan Z, Uzun M. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz. İnfek Derg 1997; 11:4, 1-5.
2. Munk ME, Emoto M. Function of T-cell subsets and cytokines in Mycobacterial infections. Eur Respir J 1995; 8(20): 668-675.
3. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercule 1991; 72:1-3.
4. Orme IM, Anderson P, Boom H. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1993; 167:1481-1497.
5. Saçılık SF. Tüberkülozun Serolojik Tanısında Son Gelişmeler. Mikrobiol Bült 1993; 27:85-88.
6. World Health Organization, Tuberculosis Control, Technical Report Series, No 671, 1974, Geneva.
7. Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L. Tuberculosis in the AIDS era. Clin Mic Rev 1995; 8(2):180-99.
8. Kılıçturgay K. Tüberkülozda Immunopatogenez. İnfek Derg 1997; 11:4, 7-12.
9. Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Ustaçelebi Ş.(Ed.), In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999; 419-455.
10. Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM. Tuberculosis In: Zinsser Microbiology; 20<sup>th</sup> edition. 1992; 145-152.
11. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC, Winn Jr WC. *Mycobacteria*, Color Atlas And Textbook of Diagnostic Microbiology. 5<sup>th</sup> edition. Lippincott, Philadelphia-New York, 1997; 893-952
12. Gedikoğlu S. *Mycobacterium tuberculosis*’in hücre yapısı. İnfek Derg 1997; 11:4, 13-18.
13. Young DB, Garbe TR. Heat shock proteins and antigens of *M.tuberculosis*. Infect Immunity 1991; 59(9): 3086-3093.
14. Edwards D, Kirkpatrick CH. The Immunology of Mycobacterial Diseases. Am Rev Respir Dis 1986; 134: 1062-1067.

15. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach. ASM Press, Washington D.C, 1995; 307-319.
16. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Mycobacteria. In Shanahan JF(Ed)., Baily and Scott's Diagnostic Microbiology, 9<sup>th</sup> ed.; St. Louis, Missouri, Mosby-Year Book, Inc. 1994; 590-633.
17. Ezer G. Tüberküloz İmmünitesi. Klimik Derg 1995; 2(1): 157-160.
18. Ellner JJ. Rewiew: The Immun Response in Human Tuberculosis- Implications for tuberculosis Control. J Infect Dis 1997; 176: 1351-1359.
19. Kılıçturgay K.; İmmünoloji, Güneş-Nobel Kitabevi, Bursa, 1997.
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders 2<sup>nd</sup> ed., Philadelphia, 1994; 136-186.
21. Benjamin L. Genes VII, Ch 36, Cell Cycle and Growth Regulation. Oxford Univ. Pr 1997; 1089-1128.
22. Yenen O.Ş. Sitokinlere Genel Bakış. XXVIII. Türk Mikrobiyol. Kong.,4-9 Ekim Antalya 1999; 39-42.
23. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology, 4<sup>th</sup> ed. Mosby, London, 1996; 28(11).
24. Male D, Cooke A, Owen M. Advanced Immunology, 3<sup>rd</sup> ed, Mosby, London. 1996; 8(2-15), 10(12).
25. Robinson DS, Ying S, Taylor IK, Wangoo A, Mitchell DM, Kay AB, Hamid Q, Shaw RJ. Evidence for a Th 1-like bronchoalveolar T-cell subset and predominance of interferon-gama gene activation in pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1994; 149: 989-993.
26. Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. Infect Immun 1993; (8): 3482-3489.
27. Özbal Y.; Temel İmmünoloji, Nobel Tıp Kitabevi .1994.
28. Smith KA. Interleukin-2. Annu Rev Immunol 1984; 2:319-333.
29. Johnson BJ, Ress SR, Willcox P, Pati B.P, Lorgat F, Stead P, Saha R, Lukey P. Laochumroonvorapong L, Corral L, Kaplan G. Clinical and immune responses of tuberculosis patients treated with low-dose IL-2 and multidrug therapy. Cytokines Mol Ther 1995; 1:185-196.



30. Johnson BJ, Bekker LG, Rickman R, Brown S, Lessor M, Ress S, Willcox P, Steyn L, Kaplan G. rhuIL-2 adjunctive therapy in multidrug resistant tuberculosis: a comparison of two treatment regimes and placebo . *Tubercule Lung Dis* 1997; 78(3-4):195-203.
31. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-Kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*1998;(1): 176-180.
32. Anderson P, Herron I. Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1993; 61:844-851.
33. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 1992; 56:648-661.
34. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Ann Rev Immunol* 1993; 11:129-163.
35. Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986;1062-1071.
36. Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Tworney PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN- $\gamma$  in Tuberculosis pleuritis. *J Immunol* 1990;145:149-154.
37. Chan CHS, Lai K-N, Leung JCK, Lai CKW. T lymphocyte activation in patients with active tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:458-460.
38. Kocabaş A, Akciğer Tüberkülozu. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevi*, 1996; 396-443.
39. Karaca Ö, Rota S. Tüberküloz İmmünolojisi. *Klinik Derg* 1995;8(2): 59-62.
40. Wandell PE. Serodiagnosis of tuberculosis by Radioimmunassay. *Am Rev Respir Dis* 1981;124: 582-585.
41. Gülay Z, Abacıoğlu YH, Yuluğ N. Nitric oxide generation by human macrophages in response to spesific and nonspesific stimulation in tuberculosis. *İnfek Derg* 1995; 9(1-2): 112-117.
42. Erturan Z. Antitüberküloz İlaçlar. *İnfek Derg* 1997; 11(4): 35-42.
43. Shiratsuchi H, Okuda Y, Tsuyuguchi I. Recombinant human interleukin-2 reverses in vitro-deficient cell-mediated immune responses to tuberculin purified protein derivative by lymphocytes of tuberculous patient. *Infect Immun* 1987; 55(9):2126-2131.

44. Onwubalili JK, Scott GM, Robinson AR. Deficient immune interferon production in tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1985; 59:405-411.
45. Vilcek J, Klion A, Henriksen-de Steffano D, Zemtsov A, Davidson DM, Davidson M, Freidman-Klein AE, Le J. Defective  $\gamma$ -interferon production in peripheral blood leukocytes of patients with acute tuberculosis. *J Clin Immunol* 1986; 6(2):146-151.
46. Seder RA, Grabstein KH, Berzofsky JA, McDyer JF. Cytokine interactions in human immunodeficiency virus-infected individuals: Roles of interleukin (IL)-2, IL-12, and IL-15. *J. Exp Med* 1995; 182(4):1067-1077.
47. Zhang M, Gong J, Iyer DV, Jones BE, Modlin RL, Barnes PF. T-cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection., *J. Clin. Invest.* 1994; 94(6):2435-2442.
48. Laurence J, Mitra D, Steiner M, Lynch DH, Siegel FP, Staiano-Coico. Apoptotic depletion of CD4<sup>+</sup> T cells in idiopathic CD4<sup>+</sup> T cell in idiopathic CD4<sup>+</sup> T lymphocytopeniae. *J Clin Invest* 1996; 97(3):672-680.
49. McDyer JF, Hackley MN, Walsh TE, Cook JL, Seder RA. Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4<sup>+</sup> T cell counts have impaired Th1 responses. *J Immun* 1997; 158:492-500.
50. Holland SM, Eisenstein MD, Kuhns DB, Turner ML, Fleisher TA, Strober W, Gallin JI. Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon  $\gamma$ . *N Engl J Med* 1994; 330(19):1348-1355.
51. Tsukaguchi K, Balaji KN, Boom WH. CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  t cell  $\gamma\delta$  T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J Immun* 1995; 154:1786-1796.
52. Johnson BJ, Estrada I, Shen Z, Ress S, Willcox P, Colston MJ, Kaplan G. Differential gene expression in response to adjunctive recombinant human interleukin-2 immunotherapy in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Infect Immun* 1998; 7: 2426-2433.
53. Noguera N, Kaplan G, Levy E, Sarno EN, Kaushner P, Granelli-Piperno A, Vieira L, Gould VC, Levis W, Steinman R, Yip YK, Cohn ZA. Defective gamma interferon production in leprosy. *J Exp Med* 1983; 158: 2165-2170.

54. Johnson BJ, McMurray DN. Cytokine gene by cultures of human lymphocytes with autologous *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect Immun* 1994; 4: 1444-1450.
55. Ellner JJ. Regulation of the human immune response during tuberculosis. Review *J Lab Clin Med* 1997; 130:469-475.
56. Genç S, Uçan ES, Bahar İH, Akkoçlu A, Cimrin AH. Rifampisine bağlı trombositopeni. *Tüberk Toraks* 1994; 42(2):145-146.
57. Ural O, Fındık D, Satılmaz İ. Rifampin tedavisi alan tüberkülozlu hastalarda antirifampisin antikörlerinin araştırılması. *İnfeksi Derg* 1995; 9(1-2):108-111.
58. Akdiş AC, Ünsal M, Helvacı S, Mıstık R, Akalın H, Kılıçturgay K. Soluble interleukin-2 receptor levels in various forms of tuberculosis. *İnfek Derg* 1993; 7(3-4): 333-336.
59. Ito M, Shirasaka T, Kokubu T. Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in tuberculous pleural effusions. *Chest* 1990; 97(5):1141-1143.
60. Belosevic M, Davis CE, Meltzen MS, Nancy CA. Lymphokines that induce resistance to infection. *J Immunol* 1988; 141: 890-896.
61. Kasahara T, Hooks JJ, Dougherty SF, Oppenheim JJ. Interleukin-2-mediated immune interferon (IFN- $\gamma$ ) production by human T cells subsets. *J Immunol* 1983; 130:1784-1789.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1966 Yılında Lüleburgaz'da doğdu. İlk ,orta, liseyi Lüleburgaz'da tamamladı. 1983 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdi. 1989 yılında Tıp Fakültesi'ni bitirdi. Aynı yıl Kasım ayında gittiği Kars ili Susuz ilçesi Yolboyu köyünde 2 yıl çalışarak mecburi hizmetini tamamladı. Kars'ta kaldığı süre içinde Sağlık Ocağı'nda ve merkezde Lepra-Frengi tabibliği yaptı. Bu süre içinde lepralı hastalarla özel olarak ilgilendi. 1991 yılı Kasım ayında Edirne Göğüs Hastanesi'nde göreve başladı. 1994-1995 yılları arasında askerliğini İzmir'de yaptı. 1996 yılı Eylül döneminde girdiği Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanarak Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladı. Halen aynı yerde göreve devam etmektedir. Yabancı dili ingilizcedir.