



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MENENJİTLİ HASTALARDA İLTİHABİ CEVABIN ŞİDDETİNİ
ETKİLEYEN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN GEN İFADE
SEVİYELERİ VE GENOMİK BAKIMINDAN İNCELENMESİ**

**Serdar ÖZTUZCU
DOKTORA TEZİ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Prof.Dr.Ecir Ali ÇAKMAK

Prof.Dr.M.Yavuz COŞKUN

**Gaziantep
2009**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bakteriyel Menenjitler	5
2.1.2. Tanı	7
2.1.3. Bos Bulguları	7
2.1.4. Bos Basıncı	7
2.1.5. Bos Hücre Sayısı.....	8
2.1.6. Bos'un Biyokimyasal İncelemesi.....	8
2.2. Akut Viral Menenjitler.....	9
2.2.1. Tanı	10
2.3. Tüberküloz Menenjit.....	12
2.3.1. Patogenez ve Patoloji.....	13
2.3.2. Tanı ve Ayırıcı Tanı.....	13
2.4. İnterlökin 10.....	15
2.4.1. IL-10 Yapı, Üretim ve Fonksiyonları	16
2.4.2. Bulaşıcı Hastalıklarda IL-10'un Rolü.....	18
2.4.3. Makrofajlar	19
2.4.4. Düzenleyici T Hücreleri (Treg)	19
2.5. Sitokin Uyarısı Baskılayıcı Proteinler (SOCS).....	19
2.5.1. SOCS3	21
2.5.2. SOCS3 ve Doğal Bağışıklık	21
2.5.3. SOCS3 ve İltihabi Hastalıklar.....	22

2.5.4. SOCS Ailesi Proteinlerinin Beyin	
İltihabını Düzenlemesindeki Rolü	23
2.6. Nitrik Oksit (NO).....	25
2.6.1. Nitrik Oksit Sentetazlar (NOS).....	26
2.6.2 Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentetazlar Menenjit İlişkisi.....	28
2.7. Siklooksijenazlar (COX).....	29
2.7.1. Siklooksijenaz-1 (COX-1) (yapısal form)	30
2.7.2. Siklooksijenaz-2 (COX-2) (uyarılabılır form).....	31
2.7.3 .Siklooksijenaz-3 (COX-3)	32
2.7.4.Beyinde COX2 İfadesi.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1 Hastalık tanısı ve Örneklerin toplanması.....	33
3.2. Araştırma Yöntemleri	34
3.2.1. DNA izolasyonu	34
3.2.2. Real-time PCR	34
3.2.3. LightCycler floresan PCR Yöntemi ile Gen Çokyapılılığı Analizi	35
3.2.4. IL-10 gen çokyapılılığının Real-Time PCR ile tespiti.....	35
3.3.LightCycler floresan PCR Yöntemi ile Gen İfadesinin Tayini.....	36
3.3.1. Örneklerin hazırlanması.....	36
3.3.2. RNA izolasyonu.....	36
3.3.3. Ters Transkriptaz PCR yöntemi ile cDNA eldesi.....	37
3.3.4. PCR aşaması	37
3.3.5. Primer ve Probların Tasarımı.....	38
3.3.6. Real-Time PCR Tepkimesi	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. IL-10 özendirici bölgesi gen çok yapılılığı.....	40
4.2. Real Time PCR Yöntemi ile Hedef Gen İfadelerinin hesaplanması	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	50
6. KAYNAKLAR	55
7. ÖZGEÇMİŞ	68

ÖZET

Doktora Tezi

MENENJİTLİ HASTALARDA İLTİHABİ CEVABIN ŞİDDETİNİ ETKİLEYEN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN GEN İFADE SEVİYELERİ VE GENOMİK BAKIMINDAN İNCELENMESİ

Serdar ÖZTUZCU

Gaziantep Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Danışman: Prof. Dr. M.Yavuz COŞKUN

Nisan 2009 – 68 sayfa

Menenjit, çeşitli mikroorganizma ve virüslerin neden olduğu, beyin zarlarını ve beyin dokusunu zedeleyen, beyin omurilik sıvısında hücrel ve biyokimyasal değişikliklere sebep olan, klinikte çeşitli nörolojik bulgular gösteren iltihabi bir hastalıktır. Menenjit çok sık olmamasına rağmen, halen normal konakta gelişen en ciddi bulaşmadır. Hastalığın seyrinde ölüm ve tedavi sonrası kalıcı hasar olasılığı yüksektir. Her on hastadan biri kaybedilmekte ve yedi olgudan birinde sağırılık veya çeşitli beyin zedelenmeleri sonucu kalıcı hasarlara yol açmaktadır. Hayvan deneyleri ile geliştirilen menenjitlerde, bakterilerin sebep olduğu iltihap nedeni ile beyin omurilik sıvısına sızan lökositlerin, beyin dokusunda zedelenme gelişimine katkıda bulunduğu, beyin ödemi ve kafa içi basıncı arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, menenjit geçiren kişilerde, iltihabın şiddetini etkileyen moleküler mekanizmaların, genomik ve gen ifadesi seviyeleri açısından önemi araştırıldı. İltihabi yanıt şiddetinin artmasında etkili iNOS, nNOS, eNOS, COX2 genlerinin ifade seviyeleri çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada SOCS3 ve IL-10 gibi bağışıklık yanıtı baskılamada etkili genlerin ifadeleri ve IL-10 geninin özendirici bölgesindeki gen çok yapıllılığının hastalıkla ilişkisi araştırıldı. Çalışmanın sonucunda hasta kan ve BOS örneklerinde özellikle IL-10 gen ifadesinin kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde arttığı bulundu. Ancak IL-10 özendirici bölge gen çok yapıllılığında, kontrol grubuna göre bir farklılık tespit edilmedi. Yaptığımız çalışma insan beyin omurilik sıvısına sızan lökositlerin gen ifadesi düzeyinde araştırılan ilk çalışmadır. Bu ön çalışma sonuçlarına göre SOCS3, COX2, iNOS ve nNOS gen ifadeleri kontrol grubuna göre farklılık göstermedi. Menenjitli hastalarda, eNOS ve IL-10 gen ifadesinin anlamlı bir şekilde artması, iltihabi cevabın şiddetinin çok sıkı kontrol altında olduğu anlaşılmaktadır. Bu ön bulgular ile menenjit tedavi ve tanısında daha ileri moleküler çalışmaların devamının gerekliliği ve iltihabi gelişimin baskılanmasında görevli genlerin ifadelerinin yüksek oluşunun önemi anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: COX2, IL-10, Menenjit, NOS, Real Time PCR, SOCS3

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE MOLECULAR MECHANISMS AFFECTING THE SEVERITY OF INFLAMMATION IN TERMS OF GENOMIC AND GENE EXPRESSION LEVELS IN MENINGITIS PATIENTS

Serdar Öztüzcu

Gaziantep University, Institute of Medical Sciences
Medical Biology Department

Adviser: Prof. Dr. Ecir Ali Çakmak

Adviser: Prof. Dr. M.Yavuz Coşkun

April 2009 -68 Pages

Meningitis is an inflammatory disease caused by microorganisms and viruses with various clinical symptoms, which damages the brain tissue and membranes, and which induces biochemical and cellular changes in cerebrospinal fluid. Although it is not so prevalent, meningitis is still the most serious contagious disease for normal hosts. The possibility of death or permanent damage to patient is considerable, mortality rate is one in ten patients and permanent damages like deafness or various brain damages are one in seven patients. Experimental animal meningitis revealed that the leukocytes infiltrated in cerebrospinal fluid due to bacterial dissemination contributed to damage progression in brain tissue, increased brain edema and intracranial pressure. In this study, the importance of molecular mechanisms affecting the severity of inflammation at genomic and gene expression levels in meningitis patients was investigated. The genes effective in inflammatory response like iNOS, eNOS, nNOS, and COX2 were included in study. Additionally, the expression levels of SOCS3 and IL-10 genes, and 3 different polymorphic regions in IL-10 gene's promoter with the disease association were investigated. This preliminary results revealed that the eNOS and IL-10 gene expression in blood and cerebrospinal fluid samples from patients were significantly higher than control group. However, there were no differences in terms of polymorphism in promoter region between two groups. Our study is the first in literature for investigating the infiltrating leukocytes in cerebrospinal fluid at the gene expression level. Besides, SOCS3, COX2, iNOS, and nNOS genes expression levels were no different significantly in both groups. The significant increase of IL-10 and eNOS gene expression in meningitis patients suggests that the genes involved in inflammatory response were under tight repressive control. These preliminary findings revealed to continuation of advanced studies in meningitis diagnosis and treatment, also suggest the importance of the inhibitory activities in inflammatory response.

Keywords: COX2, IL-10, Meningitis, NOS, Real Time PCR, SOCS3

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince her türlü yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr.M.Yavuz COŞKUN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez danışmanım ve değerli büyüğüm Prof.Dr. Ecir Ali ÇAKMAK'a ve tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar ki süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, bilim insanı olmasının yanında benim için çok özel bir önemi olan sevgili hocam Prof.Dr.Ahmet ARSLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımnda laboratuvar imkanlarını sonuna kadar açan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman sıcak tebessümünü gösteren bir hoca ve ağabey Prof.Dr.Celalettin CAMCI'ya, sonsuz teşekkürler.

Örnek toplamada yardımlarını gördüğüm, Doç.Dr.Mustafa NAMIDURU'ya, Doç.Dr.Ercan SİVASLI'ya, Dr. Mesut PARLAK'a, istatiksel analizlerimde yardımcı olan Prof.Dr.Tuncay DEMİRYÜREK'e, bilimsel katkılarından dolayı Yrd.Doç.Dr. Beyhan CENGİZ'e, laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan Bio.Esma ÖZKARA ve Bio Ayşe KIZILYER'e, kendilerini tanımaktan ve aynı bölümde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum dostlarım Bio. Bülent GÖĞEBAKAN, Bio. Mehri İĞCİ ve Yusuf İĞCİYE teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarımnda sabır ve sevgiyle arkamda duran sevgili eşim Funda ÖZTUZCU'ya, canım çocuklarım Yaren'e, Onur'a ve tüm aileme teşekkür ederim.

TABLÖLER LİSTESİ

2.1. Nitrik oksit sentetazların genel özellikleri	27
3.1. Hamarat gen ve hedef genlerin primer dizileri ve problemleri.....	38
4.1. Hasta ve kontrol gruplarına ait yaş ortalamaları	40
4.2. IL-10 özendirici bölge G-1082A gen çok yapıllılığı	42
4.3. IL-10 özendirici bölge G-592A gen çok yapıllılığı	43
4.4. IL-10 özendirici bölge C -819T gen çok yapıllılığı	43
4.5. Menenjitli hastalar ile sağlıklı hastaların kan mRNA ifadelerinin karşılaştırılması	48
4.6. Menenjitli hastaların kan ve BOS örneklerindeki mRNA ifadelerinin karşılaştırılması	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

2.1. IL-10'un bağışıklık sistemi hücreleri üzerine etkileri.....	18
2.2. Makrofajlarda SOCS3 ve STAT3 yolağının lipopolisakkarid uyarısına cevabı...	22
2.3. Beyin iltihabının oluşumunu, çeşitli yolaklar tarafından kontrol edilmektedir	25
2.4. L-arjininin nitrik oksit sentetaz enzimi aracılığı ile L-sitrülin ve nitrik okside dönüşüm aşamaları	26
2.5. Eikosanoidlerin sentezi	30
4.1. IL-10 özendirici bölge G-1082A gen çok yapılılığı real time PCR analiz sonuçları.....	41
4.2. IL-10 özendirici bölge C-819T gen çok yapılılığı real time PCR analiz sonuçları	41
4.3. IL-10 özendirici bölge C-592A gen çok yapılılığı real time PCR analiz sonuçları	42
4.4. Hamarat gen (HPRT) gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları.....	45
4.5. eNOS gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları	45
4.6. IL-10 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları	46
4.7. iNOS gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları	46
4.8. SOCS3 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları	47
4.9. COX2 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları.....	47

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ADH	Antidiüretik Hormon
AP-1	Activator Protein 1
ARB	Aside Dirençli Bakteri
BH4	Tetrahidrobiopterin
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CAP	Community Acquired Pneumonia
CIS	Cytokine-inducible SH2 protein
COX	Siklooksijenaz
CSIF	Sitokin Sentez Kısıtlayıcı Faktör
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CTL	Sitotoksik T Hücrelerinin
CXCR4	Kemokin Reseptör 4
DNA	Deoksiribonükleotid
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzim İlintili İmmün Test)
eNOS	Epitelyal Nitrik Oksit Sentetaz
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
GM-CSF	Granülosit Makrofaj-Koloni Stimüle Eden Faktör
Gp130	Glikoprotein 130
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSV	Herpes Simpleks Virüs
IgA	İmmunoglobulin A
IgG1	İmmunoglobulin G1
IL-1	İnterlökin 1
IL-10	İnterlökin 10
IL-10R	IL-10 Yüzey Almacı
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
INF- γ	İnterferon Gama
IRS-1	İnsülin Receptor Substrate-1

iNOS	İnducible Nitrik Oksit Sentetaz
Jak1	Janus Kinaz 1
KIR	Kinaz İnhibitör Bölge
KO	Knock-Out
LIF	Lökosit İnhibitör Faktör
LNA	Locked Nucleic Acid
LOX	Lysyl Oxidase
LP	Lomber Ponksiyon (Girişim)
LPS	Lipopolisakkarid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NAP110	NOS-Associated Protein 1.10 kd
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
nNOS	Nöronal NOS
NO	Nitrik Oksit
NSAİİ	Nonsteroid Anti İnflamatuvar İlaç
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGH2	Prostaglandin H2
PLA2	Phospholipase A2
PML	Polimorfo Nükleer Hücre
PPD	Purified Protein Derivative (Tüberkülin Testi)
RBx-1	Ring-Box 1
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SLE	Sistemik Lupus Eritromatozus
SNP	Tek Baz Değişiklikleri
SOCS	Sitokin Uyarısı Baskılayıcı Proteinler
STAT3	Signal-Transducer And Activator Of Transcription Protein
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
Th1	T Helper (yardımcı) 1

Th2	T Helper (yardımcı) 2
Tm	Erime Eğrisi
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
Treg	Regulatory T cells (Düzenleyici T Hücreleri)
Tyk2	Tyrosine Kinase 2
Tyr	Tirozin
UPL	Universal Probelibrary

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Menenjit, çeşitli mikroorganizmaların ve virüslerin neden olduğu, beyin zarlarını ve beyin dokusunu zedeleyen, beyin omurilik sıvısında hücrel ve biyokimyasal değişiklikler ve klinikte nörolojik bulgular gösteren iltihabi bir hastalıktır (1). Menenjit hastalığında, beyni çevreleyen meningeal zarlarda ve spinal kord'da iltihap gelişir (2). Bakteri, virüs ve mantarlar gibi pek çok mikroorganizma menenjite yol açabilir (2). Menenjitte ölüm ve hastalığa tutulma sayısı çok yüksektir; her on olgudan biri kaybedilmekte ve yedi olgudan birinde sağırılık veya çeşitli beyin zedelenmeleri sonucu kalıcı hasarlara yol açmaktadır (2).

IL-10, iltihap oluşumu ile salgısal bağışık yanıt arasındaki düzenlemenin kontrolünde önemli rol oynar (3). Bu düzenlemeyi İnterlökin 1 beta (IL-1 β), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), granülosit makrofaj-koloni stimüle eden faktör (GM-CSF), inducible nitrik oksit sentetaz (iNOS) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) gibi öncü iltihap araçlarının salınışını kısıtlayarak yapar (4,5).

IL-10 üretiminin kişiler arasında fark göstermesinin, %50 ile %70 arasında genetik temelinin olduğu ifade edilmektedir (6). IL-10 üretiminde diğer önemli etken bulaşıcı hastalıklardır (6). Ayrıca vücut kütle indeksi, sigara içilmesi ve cinsiyet de üretimde etkilidir (6). Genetik yapıya göre IL-10 üretim kapasitesi, yüksek, orta ve düşük olarak sınıflandırılmıştır (7,8). IL-10 gen ifadesini, genin özendirici bölgesinde bulunan farklı gen çok yapılılıklarının (polimorfizm) etkilediği tespit edilmiştir (7). IL-10 geni özendirici bölgesinde bulunan, -1082 (G/A), -819 (C/T) ve -592 (C/A) tek baz değişimleri sonucu GCC, ACC, ATA olarak belirlenen üç farklı haplotipin IL-10 üretimin seviyesinde etkili oldukları gösterilmiştir (7). Yapılan bir çalışmada, hastane ortamından kaynaklanmayan pnömonili (community acquired pneumonia, CAP) hastalarda hastalık şiddeti ile IL-10 özendirici bölgesi gen çok yapılılığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (9). Hastalığın şiddetinin -1082GG genotipinde, -1082GA ve-1082AA genotiplerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (9). Hastalık sonrası hayatta kalan hastalarda, ölen hastalara göre A allelinin G alleleline göre belirgin bir şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir (9).

SOCS proteinleri sitokinlerin bağışıklık sistemi üzerine etkilerini düzenleyen, önemli bir hücre içi proteinleridir (10). SOCS proteinlerinin keşfi, sitokin-JAK-STAT yolağının negatif düzenlenmesi mekanizmalarının anlaşılmasını sağladı (11).

Bununla birlikte KO fare çalışmalarında SOCS proteinlerinin pek çok immünolojik ve patolojik süreçte önemli görevler üstlendiği tespit edildi (12). Bilinen 8 tane SOCS ailesi proteini vardır: CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 ve SOCS7 (11). Hem SOCS1 hem de SOCS3 kinaz inhibitör bölgeye (KIR) sahip olduklarından JAK-tirozin kinaz etkinliğini engelleyerek etki gösterirler (13). SOCS1, SH2 parçası ile doğrudan JAK proteininin uyarılma bölgesine bağlanırken, SOCS3, SH2 parçası ile sitokin almacına bağlanarak etkisini gösterir (14). SOCS3 proteininin, gp130'a Tyr757, leptin almacına Tyr985, eritropoetin almacına Tyr401, G-CSF almacına Tyr729, IL-12 almacına Tyr800 bölgelerinden bağlandığı gösterilmiştir (15). SOCS kutusu fonksiyon olarak ubiquitin-transferaz sisteminin bir üyesidir. SOCS kutusu Elongin B ve elongin C, cullin-5 veya cullin-2, RBx-1 ve E2 ile ilişki içindedir (11). SOCS ailesi proteinleri hen diğer SOCS kutusu içeren proteinler gibi E3 ubiquitin ligaz olarak etki gösterir hem de N-terminal bölge aracılı protein parçalaması yapabilir (11). SOCS3 proteini yapımı, LPS'ye cevap olarak IL-6 ve IL-10 tarafından güçlü bir şekilde uyarılır (11). Ancak SOCS3, IL-6 almacına bağlandığından seçici olarak sadece IL-6 uyarısını baskılar (11). SOCS3 IL-10 almacına bağlanmadığından bu uyarıyı baskılamaz (11). SOCS3 geni silinmiş makrofaj ve nötrofillerde, LPS uyarısı ile oluşan ani iltihaba karşı direnç gözlenmiştir (11). SOCS3 geni eksik farelerde IL6, STAT1'i ve INF cevap genlerinin ifadesini güçlü bir şekilde uyarır (11). SOCS3 geni eksik makrofajlarda IL-6'nın temel işlevinin değiştiği görülmüştür (11). Sonuç olarak SOCS3'ün, gp130 ilişkili sitokinlerin biyolojik işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır.

SOCS3 özellikle IL-6'nın rol aldığı patolojik iltihabi olayların baskılanmasında önemli görev almaktadır (11). İltihabi barsak hastalığı oluşturulmuş farelerin kalın bağırsağındaki epitelial hücrelerde ve lamina propria hücrelerinde, insan ülseratif kolit ve crohn hastalığında (11) , romatoid artrit hastaların sinovial fibroblastlarında STAT3 etkinliği ve SOCS3 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir.

İltihapta önemli moleküllerden birisi nitrik oksittir. Basit bir gaz olan nitrik oksit sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve dolaşım sistemi için önemli bir uyarı ileti moleküldür (16). Steroid hormonlar gibi, NO'de, hedef hücresinin plazma zarından doğrudan difüzyon ile girebilir (17). Yapılan araştırmalarda bakteriyel menenjitli hastaların beyin omurilik sıvılarında (BOS) ölçülen NO miktarının, viral menenjitli ve normal kişilerin BOS'una göre daha fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (18).

NO, nitrik oksit sentetaz enzimleri (NOS) tarafından sentezlenir (19). Üç farklı izoenzim tespit edilmiş olup bunlar nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve tetiklenebilir NOS (iNOS) olarak sınıflandırılmıştır (20). eNOS ve nNOS normal fizyolojik durumlarda salınmalarına karşın iNOS normal fizyolojik koşullarda salınmamaktadır (18). Ölüm sonrası immünohistokimyasal boyama yöntemi ile meningeal dokuda iNOS ve NO'nun arttığı gösterilmiştir (21). Deneysel olarak oluşturulan bakteriyel menenjitli hayvan modellerinde de NO ürünlerinin arttığı gözlenmiştir (22). Bu hayvan modellerinde NOS inhibitörlerinin kullanımından sonra beyin hasarı ve merkezi sinir sistemi karmaşık belirtilerinin daha çok arttığı, ölüm oranının ve hastalık şiddetinin arttığı gözlenmiştir (23). Hastalığın şiddetlenmesine özellikle NOS inhibitörlerinin seçici olmayıp tüm NOS'ları kısıtlaması nedeni ile konak savunması için önem taşıyan NO sentezinin tamamıyla engellenmesi neden olmaktadır (22). eNOS yetmezlikli farelerde yapılan deneysel çalışmalarda normal tip farelere göre yangı ve merkezi sinir sistemi karmaşık belirtilerinin şiddetlendiği görülmüştür (24). iNOS yetmezlikli farelerde iltihap şiddeti azalmış ve tedaviye yanıt artmıştır (23). Farklı NOS izoenzimleri farklı ve bazen zıt fizyolojik etkiler göstermektedir. Bu etki NO ürün miktarı ve özel bir bölgedeki kimyasal NO reaksiyonları sonucu farklı izoformların farklı miktarda gen bölgesinden ifadesi sonucu oluşur (22).

COX prostaglandin sentezinin hız sınırlayıcı enzimidir (25). Bu reaksiyonda, moleküler oksijen araşidonik aside eklenir ve prostaglandin G2 (PGG2) adlı kararsız ara ürün oluşur (25). Prostaglandin G2 (PGG2) COX'ın peroksidaz aktivitesi sayesinde hızlıca prostaglandin H2 (PGH2) ye dönüşür (25). Bundan sonra özgün izomerazlar PGH2'yi farklı prostaglandinlere ve tromboksanlara dönüştürür (25). COX-2 mRNA ve proteini dokularda normal koşullarda ölçülemeyecek kadar az miktarda bulunan, büyüme faktörleri, mitojenler, sitokinler, endotoksinler, interlökinler gibi uyarılarla artarak, patolojik ve iltihabi süreçlerde rol oynayan bir enzimdir (26).

Bu çalışmada özellikle iltihabın şiddetinin artmasında etkili iNOS, eNOS, nNOS, COX2 gibi proteinlerin ve iltihabın şiddetinin azalmasında etkili SOCS3, IL-10 gibi proteinlerin hem kanda hem de beyin omurilik sıvısına sızan hücrelerde mRNA düzeyinde gen ifadeleri tayin edilerek bağışıklık yanıt üzerindeki etkileri araştırıldı. Ayrıca IL-10 geninin özendirici bölgesindeki gen çok yapıllığının hastalıkla ilişkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriyel Menenjitler

Menenjit hastalığı bütün toplumlar için önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir(27). Solunum ve üriner sistem bulaşmaları kadar sık rastlanmamakla birlikte günümüzde hala çocuklar ve erişkinler bakteriyel menenjit nedeniyle ölmekte veya kalıcı nörolojik hasarlarla yaşamlarını sürdürmektedir (27). Bakteriyel menenjitler, santral sinir sistemine bulaşan çeşitli bakteriler ile meydana gelen ve meninkslerin iltihabına yol açan mikrobik bir hastalıktır (27). Gram pozitif ve gram negatif bakterilerdeki direnç durumu, öte yandan hastalığın büyük ölçüde önlenabilir olması hastalığın esas ve gelişiminin daha iyi aydınlatılması, farmakokinetik ve farmakodinamik arasındaki etkileşimin anlaşılması ve kötü gidişatlı hastaların belirlenmesi bakteriyel menenjit tanı ve tedavi tecrübesini etkileyen önemli gelişmelerdir (28).

İltihabi bulaşma yapan bakterilerin çoğu bakteriyel menenjit de yapabilir (29). Ancak yine de altta yatan başka bir hastalık yoksa tüm bakteriyel menenjitlerin %80-85 kadarında etken *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* ve *Haemophilus influenzae*'dir (29). Bunlara öncül akut menenjit etkeni denmektedir. Geriye kalan %15-20 içerisinde *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (B grubu streptokoklar), *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Proteus* ve *Salmonella paratyphi* grubundaki bakteriler, *Bacillus anthracis* ve diğerleri bulunur (29). Yine bakteriler alt grubunda yer alan *Treponema pallidum*, leptospiralar, ve riketsiyalar akut menenjit yapabilirler. (29,30)

Yenidoğan döneminde görülen menenjit vakalarının %40'ı *E. coli* K1, %35'i grup B streptokoklar, %10 *Listeria monocytogenes* ve geri kalan kısmı ise diğer bakteriler ile meydana gelir (30).

Bakteriyel menenjitin oluşumuna yardımcı olan etkenler şunlardır:

1. BOS şanti olan hastalar (28,31,32)
2. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar (33,34)
3. Kafa incinmesi (32)
4. Ameliyat sonrası sinir cerrahisi hastaları (28,33)
5. Parameningeal cerehat içeren odaklar (28)
6. Meningosel, ensefalosel (28,33)

7. Dalağı alınmış, orak hücreli anemili hastalar (28,35)
9. Kompleman eksikliği (28)
10. Kafa kemiği iltihabı olan kişiler (28)

Menenjitte neden olan hastalık etmenleri beyne üç yoldan ulaşmaktadır:

1. Dış darbe, ameliyat, lomber girişimler (LP) esnasında direk olarak (28,29)
2. Beyne komşu organların (paranasal sinüsler, mastoid hücreleri, orta kulak) infeksiyonlarından komşuluk yoluyla (28,29)
3. Kan yolu ile (28,29)

Menenjit olgularının büyük bir kısmında (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E. coli* vb.) bakteriler bu üçüncü yoldan MSS'ne (merkezi sinir sistemi) ulaşmaktadır (28,29).

Kan yolu ile gelen bakterilerin menenjit oluşturma süreci 6 aşamayı içermektedir (28,29,36).

1. Nasofarinks ve orofarinks mukozasında epiteliyal hücrelere yapışması
2. Kolonizasyon, mukozal bariyerin aşılması
3. Bakterilerin fagositik hücreler ve bakteriolitik aktiviteden kurtularak kan dolaşımına yayılması
4. Subaraknoid aralığa geçmesi, çoğalması
5. BOS'a karışan bakterinin canlılığını koruması
6. Meninkslerde ve beyin dokusunda bakterilerin yerleşerek hastalığa neden olması

S. pneumoniae, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E. coli* gibi bakteriyel menenjit etkenlerinin sinir dokusuna yatkınlık gösterme potansiyelleri konakçının savunmasından kurtulma yeteneğiyle ilişkilidir (37) . Etken mikrop konakçının mukozal epitelinde kümeleştikten sonra damar içi boşluğa geçer ve arada canlı kalır (37). Daha sonra da kan beyin bariyerini geçerek BOS içinde yaşamaya başlar (37).

Hastalık etkeni mikroorganizmanın konakçı mukozasına yerleşmesinden BOS içinde çoğalmasına kadar gelişen bakteriyel sinir dokusuna yatkınlığa gelince; konağın plazma hücrelerinden salgılanan IgA'yı *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis* IgA proteaz salgılayarak etkisiz hale getirir (37). *N. meningitidis* ve *H. influenzae* nasofaringeal infeksiyona neden olduktan sonra silier epitel hücrelerini hasara uğrattır (37).

Mukus bariyeri ve silier yapıyı geçen *H. influenzae*, *N. meningitidis* ve birçok gram negatif mikroorganizma pilileri aracılığıyla mukozal epitele tutunarak kümeleşir (37).

Tutunma ve mukozal istiladan sonra damar içine giren menenjit etkenlerinin çoğunda polisakkarit yapıda bir kapsül vardır (28). Bu kapsül nötrofiller tarafından fagosite edilmeyi önler ve klasik komplemana bağlı bakterisit etkinliğe karşı direnç sağlayarak kan dolaşımında bakterinin varlığını kolaylaştırır (28). Orak hücreli anemi veya dalağı alınmış bireylerde alternatif kompleman sistemi bozulacağından dolayı *N. meningitidis* ile yayılımcı infeksiyon riski yüksektir (28). Menenjit hastalığında en az anlaşılan aşama bakterinin kan beyin bariyerini geçmesi ve BOS'a girmesidir. Özellikle *E. coli* menenjitlerinde gösterilen "S" fimbriyası gibi pililerin bu geçişte rolü olduğu ortaya konmuştur (37).

Kan beyin bariyeri; büyük moleküllerin, hücrelerin ve mikropların girişini engelleyerek denge görevini sağlar (27). Anatomik olarak koroid plexus, araknoid membran ve serebral kapiller endotelinden meydana gelir (27). Endotel hücreleri, perisit kökenli bazal membran, astrositik ve mikroglial çıkıntılar arasında sıkı bileşkeler söz konusudur (27). Menenjit etkeni bakteriler koroid plexus ve beyin kılcal damarı endotel hücreleri üzerindeki almaçlara yapışır (27). Daha sonra hücreler arası ve hücre içi yolla veya lökositleri istila ederek kapiller damarlar dışına göç sırasında subaraknoid mesafeye ulaşır (27). Bakterinin çoğalmasını engelleyen nötrofil, plazma hücresi, kompleman bileşenleri ve immunglobülinler olmadığından dolayı kolaylıkla çoğalır. Otoliz ile açığa çıkan lipopolisakkarit, teikoik asit ve peptidoglikanlar, iltihap sitokinlerinin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) salınmasını tetikler (28). Sitokin ve kemokinlere yanıt olarak nötrofillerin BOS'a geçişi başlar. Nötrofil göçü infeksiyonu sınırlandırma amacı gütse de menenjitte beyin ödeminin artışı, beyin kan akımının bozulması nedeniyle istenmeyen sonuçlar doğurur (28). Menenjit klinik olarak, BOS'daki mikroorganizmaya karşı konakçının verdiği cevapla ortaya çıkar (27).

Akut bakteriyel menenjitli hastalarda bakteriyeminin kaynağına ait bulgu saptamak çoğunlukla mümkün olmaz (29). Bu kaynak çoğunlukla üst ve alt solunum yollarıdır. Meningokok menenjitinde solunum sistemine ait bulgu pnömokok veya *H. influenzae* menenjitinden çok daha azdır (29). Pnömomokal menenjitlerin % 50 kadarı pnömoni, otit gibi birincil infeksiyonlardan sonra gelişen ikincil infeksiyonlardır (29). Bu nedenle akciğerler ve mikrobik endokardit yönünden kalp iyi değerlendirilmelidir (29). Aynı durum *H. influenzae* için de geçerlidir. Diğer taraftan menigokoksemi sırasında eklem, göz, perikard tutulumları olabilir.

H. influenzae menenjitinde hastalığın başlangıcında işitme kaybı gelişebilirse de bilinci yerinde olmayan hastada bunu saptamak kolay olmaz (29).

Hastalarda motor zihinsel bozukluklar ortaya çıkabilir (29). Bayılma, aşırı huzursuzluk, zihin bulanıklığı, sersemleme, koma, idrar-dışkı tutamama, felç, görme alanı bozuklukları ve diğer odaksal beyin belirtileri hastaların %10 kadarında görülebilir (29). N. oculomotorius, N. abducens, N. facialis veya N. statoacusticus felçleri sonucu düşüklük, şaşılık, pupillaların farklı büyüklükte olması, yüz felci, işitme kaybı, denge bozuklukları saptanabilir. 8. sinir hasarı hariç bu sinir hasarlanmalarının hemen hepsi şifa ile geri dönebilir nitelik taşırlar (29). Bakteriyel menenjitte işitme kaybı %5-40 oranında görülür. En ciddi işitme kaybı sıklıkla pnömokok menenjitinde gözlenir (29).

2.1.2. Tanı

Menenjit tanısı için BOS incelemesi zorunlu olduğundan menenjit düşünülen her hastaya LP yapılmalıdır (27).

2.1.3. Bos Bulguları

İltihaplı menenjitte BOS renginin bulanık olması şekerin düşük olması ve parçalı lökositlerden zengin olması temel bulgulardır (38). Ancak bunlar özellikle hastalığın erken döneminde görülmeyebilir. Bu nedenle şüpheli durumlarda 12-18 saat sonra yeniden LP yapılarak değerlendirme yararlı olur (38).

2.1.4. Bos Basıncı

BOS basıncı ölçülürken hastanın sakin olması gereklidir. Bebek ve küçük çocuklar genellikle ağlayıp rahat durmadıkları için açılış ve kapanış basınçları sağlıklı olarak ölçülemez (38). BOS basıncı normalde 180 mmH₂O basıncını geçmez (29). İltihaplı menenjitlerde basınç genellikle artmıştır. 600 mmH₂O değerini aşan bir basınç beyin ödemi, kafa içi irinli odak veya hidrosefaliyi akla getirir (29).

BOS görünümü, normalde BOS, berrak görünümündedir. Bakteriyel menenjitlerde genellikle bulanık görünümündedir (38). Bulanık görünmesi için mm³' te en az 500 hücre/mm³ olması gereklidir (38). Subaraknoid kanama, hiperbilirubinemi ve proteininin yüksek olduğu durumlarda BOS sarımsı görünümde olabilir (38).

2.1.5. Bos Hücre Sayısı

BOS alındıktan sonra hücre açısından hemen değerlendirilmelidir (38). Ortalama 1,5-2 saat içinde BOS'daki lökositler parçalanarak yok olurlar (12). Hücre sayımı için önce doğrudan sonra boyayarak sayım yapılması gereklidir (38).

Bakteriyel menenjitlerde BOS'da çokyapılı çekirdeği olan lenfositlerden (PML) zengin hücre artışı görülmesine karşın, bakteriyel geçişin olduğu ancak iltihabi cevabın henüz ortaya çıkmadığı erken dönemde yapılan LP'lerde BOS'da bulunmayacağı gibi biyokimyasal bulgular da normal sınırlarda olabilir (27). BOS'ta lökosit sayısının artışı iltihabı gösterdiği halde her zaman hastalığın şiddeti ile orantılı değildir (27). BOS'da bakteri sayısının yüksek olmasına karşın çok az sayıda lökosit saptanması kötüye gidişin işaretidir (27). LP yapılırken, BOS'un kanlı gelmesi; travmatik LP sebebiyle damar zedelenmesi neticesinde kanamaya bağlı olabileceği gibi, daha önceden varolan subaraknoid kanamaya da bağlı olabilir. Bu sebeple LP sırasında BOS'un kanlı geldiği görülür görülmez, arka arkaya 3-4 tüpe bir miktar BOS alınarak renginin açılıp açılmadığına bakılmalıdır (27).

2.1.6. BOS'un biyokimyasal incelemesi

BOS'ta rutin olarak protein ve şeker düzeyinin ölçülmesi gerekir (38). Bakteriyel menenjitlerde BOS proteinini artırır. Bu artış kan-beyin bariyerinin bozulmasına ve iltihaba bağlıdır (38). Proteinin çok arttığı durumlarda, BOS bir müddet bekletilirse, kendiliğinden pıhtılaşır (38).

Kanlı BOS'un şeker ve protein düzeylerine bakılabilir. Ancak sonuçları değerlendirirken kanama miktarının göz önüne alınması gereklidir. BOS'daki her 1000 eritrosit için 1 mg'lık protein artışı olur. (38)

BOS incelemeleri arasında en önemlilerinden birisi BOS şeker düzeyidir (38). Yanlış değerlendirmeye sebep olmamak için kan ve BOS örnekleri vakit geçirilmeden laboratuara ulaştırılmalıdır. BOS şekerinin doğru olarak değerlendirilmesi; bakteriyel ve viral menenjit ayırımında ve infeksiyonun şiddetinin, hastalığın gidişatının ve tedaviye cevabının değerlendirilebilmesinde önemlidir (38).

Genel olarak şeker ne kadar düşükse, infeksiyon o kadar ağırdır. Hafif bakteriyel menenjitlerde, şeker normal bulunabilir (38). Bazı pnömokoksik yeni doğan menenjitlerinde de hücresel cevap ve/veya şeker düzeyinde düşme görülmeyebilir. Ancak bazı küçük bebeklerde BOS steril ve kan şekeri normal olsa bile haftalarca BOS şekeri düşük olabilir (38).

BOS şeker düzeyi kan şekerine bağlı olduğundan mutlaka eş zamanlı kan şeker düzeyi ile birlikte değerlendirilmelidir (38). Eş zamanlı olarak alınacak kan şekeri mutlaka LP yapılmadan hemen önce alınmalıdır. Aksi halde LP yapılması sırasında ortaya çıkan stres durumu kan glikozunun yükselmesine ve yanlış değerlendirmeye sebep olabilir (38).

Yenidoğan döneminde, özellikle prematürelerde normal serum glikoz düzeyi düşük olabilir (20-40 mg/dl) (38). BOS glikozunun kan glikozuna oranı 7/8 olup, bazen zamanında ve erken yeni doğan bebeklerde %100'den fazladır. Büyük bebeklerde ve erişkinlerde BOS/ kan şekeri oranı 2/3'ün üzerindedir (38). Bakteriyel menenjitte BOS şekeri ve BOS/ kan şekeri oranı azalır (38).

Menenjitte BOS şekerinin düşük olmasının başlıca bilinen sebepleri; infeksiyon hastalığı nedeniyle beynin glikoz kullanımının artması ve kan-beyin glikoz taşınmasındaki bozukluklardır (27). Bakteri ve lökositlerin glikoz yıkıcı etki ile BOS şekerinin düştüğünü ileri süren görüş bugün pek kabul edilmemektedir (27). BOS şeker düzeyi, tedaviyle ilk düzelen laboratuvar bulgularındandır. BOS şekeri bakteriyel menenjit dışında diğer sebeplerle de düşük bulunabilir (27).

2.2. Akut Viral Menenjitler

Birçok nedene bağlı olarak gelişebilen aseptik menenjit, iltihabi meninks hastalığıdır (31). Beyin omurilik sıvısının rutin inceleme, boyama ve kültürlerinde bir nedenin gösterilemediği, BOS' da genellikle lenfositik nitelikte hücre artışının ve protein artımının belirlendiği durumlar aseptik menenjit olarak tanımlanır (39,40).

Virüsler aseptik menenjitin önde gelen nedenidir (39). Ayrıntılı tanısal incelemeler yapılmadığında, aseptik menenjit vakalarının yalnızca % 10'unda bir etken belirlenebilmektedir (39). Ancak ayrıntılı epidemiyolojik ve mikrobiyolojik araştırmalarla hastalarda %55-70' e ulaşan oranlarda viral bir etken saptanabilmektedir (31).

Enterovirüsler viral menenjitin ilk sıradaki nedenidir ve bir etkenin gösterilebildiği aseptik menenjit vakalarının %80-95'inden sorumludur (40,41).

Enterovirüslerden tip 1-3 poliovirüsler; A1-14, 16-18, 21, 22, 24 ve B1-6 "coxsackie virüsler"; tip 1-9, 11-27, 29-33 "echovirüsler" ve enterovirüs 71 ile menenjit gelişebilir (42). Enterovirüs menenjiti açısından en duyarlı yaş grubu önceden karşılaşmamaya bağlı bağışıklık eksikliği nedeniyle süt çocukları ve küçük çocuklardır (39). Sağlıklı bireylerde farklı enterovirüsler serotipleriyle birkaç kez menenjit gelişebilir (43).

Bağıışıklık yetmezliğı ve fizik egzersiz, enteroviral menenjitte zemin hazırlayabilen etmenlerdir (43).

Virüsler, kana bulaşma ertesinde kan-beyin bariyerini (KBB) aşarak MSS'ne ulaşır (27). MSS'nin virüslerce tutulumu çeşitli yollarla olabilir (27). MSS'ye ulaşım çoğı virüs için doğrudan KBB' nin temelini oluşturan beyin kılcal endotel hücreleri üzerinden olur (27). Bazı virüsler komşu glia ve nöronların enfeksiyonu öncesinde, doğrudan beyin küçük damar endotel hücrelerini enfekte eder (27). Bazı virüsler ise endotelial hücre enfeksiyonu olmaksızın başlangıçta glial hücreleri enfekte eder (27).

MSS'de hastalığın gelişimi, virüsün duyarlı hücreler tutunması ve girmesini, sinir sistemi içinde yayılımını ve hücresel değışikliklerin uyarılmasını gerektirir (27). Koroid pleksus üzerinden subaraknoid aralığa giriş ertesinde, virüs BOS içinde dağılarak meningeal ve ependimal hücreler ulaşır (27). Sonraki yayılım glial hücrelerin ve nöronların enfeksiyonu biçiminde gelişir (27). Virüsler dendrit, akson ve glia gibi yapılar ile hücreler arasındaki hücre dışı boşluklar boyunca yayılabilir, glia yoluyla nöronların yoğun akson ve dendrit dallanmaları ve ağı boyunca ilerleyebilir veya iltihaba yanıtta yer alan hareketli lökositlerde taşınabilir (27). Deneysel kanıtlar, virüs taşınmasının her tipini desteklemektedir. Çeşitli enfeksiyonlarda, viral ulaşım yollarının tümü değışik derecelerde yer alabilir (27).

MSS'de virüs kaynaklı enfeksiyon geliştiğinde, genellikle bir iltihabi hücre yanıtı ortaya çıkar. Ancak, iltihap hücrelerinin enfeksiyon alanında toplanmasına yol açan mekanizmalar ve MSS viral enfeksiyonlarındaki rolleri kısmen anlaşılabilmektedir (27). Başlangıçtaki iltihabi yanıtın, bağıışıklık açıdan özgül olduğı ve virüse karşı duyarlılaşmış bir lenfosit topluluğundan oluştugu düşünölmektedir. Bazı virüs kaynaklı MSS enfeksiyonlarında bağıışık bir yanıt gelişmeyebilir. Yanıt virüsün kendisinden çok konağın yaşına bağılı olabilir. Duyarlılaşmış lenfositler, olasılıkla, yayılan ya da endotel hücrelerden geçiş ile endotel yüzeyine taşınan, özgül bir virüs proteinine yanıt verirler ve iltihabi sitokinler salınır (27).

2.2.1. Tanı

Menenjitte uyumlu klinik bulguları olan, BOS'da beyaz küre bulunmayan ama enterovirus izole edilen hastalar bildirilmesine karşın, enteroviral menenjitli hastalarda hemen daima mononökleer pleositoz beklenir (31). BOS'daki hücre sayısı mm^3 'te birkaç ile bir kaç bin arasında olabilir; genellikle 100-1000/ mm^3 'tür (31). BOS'daki beyaz küre sayısı yükseldikçe, BOS'dan enterovirus izolasyonu olasılığı artar (31).

İnfeksiyonun erken döneminde, BOS’da sıklıkla nötrofiller hakimdir. İzleyen 6-48 saat içinde hızla lenfosit hakimiyeti gelişir. BOS proteininde yükselme, BOS glukoz düzeyinde azalma genellikle hafiftir. Ancak, her ikisi içinde oldukça uç değerler bildirilmiştir. (31)

Enteroviral menenjitin özgül tanısı, virusun BOS’dan doku kültüründe izolasyonuna bağlıdır (27). Yöntemin duyarlılığı, birçok “coxsackievirus” A serotipinin doku kültüründe çoğalma yetersizliği ve yavru fare bulaştırılması gerektirmesi nedeniyle, enteroviral serotipleri için yalnızca %65-75’tir (27). BOS’dan izolasyondaki güçlü, enterovirusların BOS’taki düşük titreleriyle de ilişkilidir. Enterovirüsler için BOS’dan ortalama üreme süresi 3,7-8,2 gündür (27).

Aseptik menenjitli bir hastada, orofarenks ya da dışkıdan enterovirus izolasyonu hastalık etmeni tanısı için değerlidir (27). İnfeksiyondan sonra virus boğazda bir hafta, dışkıda haftalar boyu bulunabilir (27). Ayrıca, enterovirus yaygınlığında sağlıklı kontrollerde de %7,5 oranda virus ağırlığı gösterilmiştir (27). Bu nedenle, virus izolasyonunun geçmiş bir infeksiyonu yansıtmaması olasılığı da söz konusudur (27). Ayrıca, BOS dışı viral kültürleri, enteroviral MSS infeksiyonunu belirlemede yararlı bulunmayan çalışmalar vardır (27). Bir çalışmada, enteroviruslar, akut bir hastalık nedeniyle hastaneye yatırılan ve BOS kültüründe üreme olmayan süt çocuklarıyla, BOS’tan enterovirus izole edilen süt çocuklarında BOS dışı yerlerden benzer oranlarda izole edilmiştir (27). Bu nedenle, izole edilen aynı soy için, tanıyı serolojik testler doğrulayabilir (27).

Çeşitli serotipler arasında ortak bir antijenin olmayışı ve virüsün vücut sıvılarındaki düşük konsantrasyonu, enterovirus infeksiyonunun immunoserolojik yöntemlerle hızlı tanısını zorlaştırır (27). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda poliklonal ya da monoklonal antikorların başarılı kullanımı bildirilmiştir (27). Tipe özgül IgM antikorların belirlenmesine yönelik testlerin özgüllüğü bugün için düşüktür (27). Enterovirus serotipleri için tamamlayıcı DNA nükleik asit “probe”ları geliştirilmiştir. Ancak, enterovirusların menenjitli hastalardaki düşük BOS titrelerinin sonucu olarak, duyarlılıkları %33’ü aşmamaktadır (27).

PCR, viral kültüre seçenek olarak, tanıda en çok umut veren yöntemdir (40). Enteroviral “reverse transcription-PCR” birçok klinik çalışmada test edilmiş, kültürden daha duyarlı ve enteroviral menenjit tanısında %94-100 özgül bulunmuştur. (40)

Kabakulak menenjitli hastalarda hemen daima BOS’da aşırı hücre artışı vardır (39).

Hücre sayısı genellikle $500/\text{mm}^3$ 'ten azdır ve hücrelerin %80'den çoğu lenfositir (39). Pleositoz haftalarca sürebilir (39). BOS protein düzeyleri, bazı serilerde hastaların yarısından çoğunda normal olarak bildirilmiştir. BOS glukoz düzeyi çoğu hastada normaldir, ancak hastaların %25'e yakınında azalmış bulunabilir (39). Akut ve havaleli serum örneklerinde, antikor titrelerinde dört katlık artış tanısız değer taşır (39). Kabakulak virusu, BOS doku kültüründe menenjitin başlangıcından itibaren en az bir hafta süreyle üretilebilir (39). Ancak, başarı %30-%50'dir. PCR gibi moleküler tanı yöntemlerinin, kabakulak tanısını gelecekte daha hızlı ve daha güvenilir kılacağı düşünülmektedir (39).

HSV tip-2 menenjitli hastalarda hücre sayısının $500/\text{mm}^3$ 'ün altında olduğu lenfositik bir menenjit ve normal bir BOS glikoz düzeyi görülür. Virus BOS'dan üretilebilir (31). PCR, HSV nedeni MSS tutulumlarının tanısında umut veren bir yöntemdir (31). PCR ile genital bulaşım belirti ve bulguları olmayan, tipik Mollaret menenjitli hastalarda HSV tip-2 varlığı gösterilmiştir (31). PCR herpes zoster menenjitli hastalarda BOS'da Varisella Zoster DNA'sının varlığını doğrulamak içinde kullanılmıştır (31).

Human immunodeficiency virus (HIV) ile bulaşmış hastalarda akut retroviral hastalık sırasında, BOS hücre sayısının genellikle $200/\text{mm}^3$ 'ün altında olduğu hafif bir lenfositik pleositoz görülür (31). Protein düzeyi hafif yükselmiştir (31). Glukoz düzeyi normaldir ya da hafifçe azalmıştır (31). BOS bulguları bazen iki hafta içinde düzelir. HIV, nörolojik bulguları olan ve olmayan HIV ile infekte hastalarda BOS'tan izole edilmiştir. HIV RNA menenjitli hastalarda BOS'da belirlenmiştir. (31)

Arboviral menenjitli hastalarda, BOS bulguları enterovirus infeksiyonundakilere benzer biçimdedir (40). Virus kan ve BOS'dan üretilebilir, ama tanı genellikle serumların kıyaslanmasıyla konur. (40)

2.3. Tüberküloz Menenjit

Tüberkülozun en ağır klinik formu, merkezi sinir sistemi tüberkülozudur (39). Tüberküloz menenjit olgularının çoğunluğunda etken *Mycobacterium tuberculosis*'dir (39). Bovin tipi tüberküloz basili çok az vakada etkindir (39). Atipik mikobakteriler de nadiren menenjit etkeni olabilirler (39). HIV bulaşmış hastalarda en sık mikobakteriyel etken *M.avium*' dir (39). *M. avium* karmaşık bulaşması, ileri evre HIV infeksiyonunda sık görülmesine rağmen, merkezi sinir sistemi tutulumu nadirdir (39).

Tüberküloz menenjitin görülme sıklığı toplumda tüberkülozun yaygınlığı ile paraleldir (27). Her yaşta görülebilir. Çocukluk çağında, özellikle ilk beş yaşta sık görülür (27).

Genellikle ilk infeksiyonun yan etkisi olarak gelişir (27). Erişkin yaş gurubunda ise, her yaşta görülmesine rağmen en fazla 25-45 yaş arasında görülmektedir (27). HIV'li hastalarda tüberküloz önemli bir bulaşma etkenidir (27). HIV bulaşmış tüberküloz hastalarında, tüberküloz menenjit gelişme oranı, HIV bulaşmamış tüberkülozlu hastalara göre daha yüksektir (27). Bu oran HIV bulaşmış olanlarda %10 iken, HIV bulaşmamışlarda %2'dir (27).

2.3.1. Patogeneze ve Patoloji

Tüberküloz menenjit ilk bulaşımın erken veya geç yan etkisi olarak gelişir (27). Kronik tüberküloz seyri esnasında veya tedavi edilmeyen hastalarda terminal yan etki olarak da gelişebilir (27). Her iki durumda da infeksiyon MSS'ne dolaşım yoluyla ulaşır (27).

Beslenme bozukluğu, alkolizm, diyabet ve hücresel bağışıklığın baskılanması tüberküloz görülme sıklığını arttırmaktadır (27). Bu faktörlerin tüberküloz menenjit gelişmesindeki rolü tam açık değildir (27).

Tüberküloz menenjitte lezyon daha çok beyin bazal yüzündeki meninksleri tutar, konveks kısmı pek etkilemez. Yoğun salgı interpedinküler ve pontin sisternaları doldurur (43). Bu, lateral sulkuslara ve sisterna ambiens, arkada sisterna magna ve önde de kiazmatik sisternaya kadar uzanır (43). Bazal kısımda kafa çiftleri ve büyük damarlar, ventriküllerde koroid pleksuslar salgı ile kaplanır (43). Mikroskopik olarak, salgı, kazeifikasyon odakları ile lenfosit ve plazma hücrelerinden zengin bir özellik gösterir (17). Vaskülit, tüberküloz menenjitin önemli karakteridir (43). Bazal damarlar, hem arterler hem de venler tutulur (43). Lokal ven ve arteriyel vaskülitler anevrizmalara, trombozis ve fokal hemorajik infarktlara yol açabilir (43). Salgı ile kaplı alanların altında beyin dokusunda da iltihabi değişiklik gözlenir; ödem, perivasküler infiltrasyon ve mikrogial reaksiyon (44). Vaskülitte bağlı iskemik değişikliklerden infarktüse kadar giden beyin dokusu patolojisi gözlenir (44). Hemen hemen bütün tüberküloz menenjit vakalarında az da olsa hidrocefali gözlenir (44). Salgıya bağlı BOS dolaşımı bozulur. Hastalığın geç döneminde ise araknoid yapışıklığa bağlı hidrocefali gelişir (44).

2.3.2. Tanı ve Ayırıcı Tanı

Tüberküloz menenjit tanısında rutin laboratuvar testleri çok yardımcı olmaz. Hafif anemi ve çoğunlukla normal lökosit sayısı gözlenir (45). Kan çökme hızı genellikle yüksektir. Uygunsuz ADH salgınımına bağlı hiponatremi ve hipokloremi görülebilir (45).

PPD deri testi vakaların çoğunda negatiftir (45). Akciğer grafisinde, erişkinlerde %25-30 oranında yeni veya eski akciğer tüberkülozuna ait bulgular saptanır (45). Menenjit olgularında, diğer organ tüberkülozu varlığının gösterilmesi tüberküloz menenjit olasılığını düşündürmelidir (45). HIV ile infekte hastalarda akciğer grafisinde hiler adenopati, diğer hasta gruplarına göre daha yüksek oranda görülür. PPD pozitiflik oranı da, HIV ile infekte hastalarda daha düşüktür (46).

Tüberküloz menenjit tanısında BOS tetkiki esastır (39). BOS basıncı artar (39). Görünüm renksiz veya ksantokromik olabilir (39). Hücre sayısında orta derecede artış olur (39). Genellikle hücre sayısı $500/\text{mm}^3$ altındadır (39). Nadiren $1200/\text{mm}^3$ üstüne çıkabilir (39). Hücrelerin çoğunluğunu lenfositler oluşturur (39). Erken dönemde polimorfonükleer lökositler hakim olabilir, tekrar edilen LP'de lenfositlerin arttığı gözlenir (39). BOS oda ısısında bekletildiğinde fibrin ağı oluşumu gözlenir (39). BOS'ta protein seviyesi artar, genellikle 100-500 mg/dL arasındadır (39). Glukoz seviyesi düşer, genellikle 40 mg/dL altındadır. BOS sedimentinde aside dirençli bakteri (ARB) gösterilmesi erken tanı için çok önemlidir (39). BOS çökeltisinin Ziehl-Neelson metoduyla boyanan preparatlarında ARB pozitifliği %10-40 arasında değişir. Art arda dört ayrı BOS örneğinin incelenmesi ile ARB pozitifliği oranı %90'a çıkmaktadır (39). BOS çökeltisinin auramin-rodamin fluokrom boyası ile boyanarak incelenmesi, ARB pozitiflik oranını arttırmaktadır (39). Tüberküloz menenjitin kesin tanısı BOS kültüründeki tüberküloz basilinin üretilmesi ile konur (39). Ancak erken tanıda yardımcı değildir (39). Otomatik sistemlerle yapılan kültürlerde, bakterinin üremesi 1-2 haftaya kadar inmektedir (39).

Tüberküloz menenjitin erken tanısında BOS'da adenin deaminaz aktivitesinin yükselmesinin gösterilmesi, lateks aglütinasyonu veya ELISA yöntemi ile BOS'da mikobakteriyel antijenlerin gösterilmesi erken tanıda yardımcıdır (47). BOS'da Gen-Probe teknolojisi ve PCR yöntemleri ile *M. tuberculosis* DNA'sı aranması erken tanı yöntemleri arasında rutin kullanıma girme aşamasındadır. (48)

Yeni radyolojik görüntüleme yöntemleri CT ve MRI gibi tüberküloz oluşumu, hidrocefali gelişmesi, baziller araknoidit ve serebral infarktüsü görüntülemeye yardımcı yöntemlerdir (27).

Tüberküloz menenjitin ayırıcı tanısında; fungal menenjitler, iyi tedavi edilmemiş pürülan menenjitler, viral menenjit ve ansefalitler, beyin apsesi, nörosifiliz, listeria meningoansefaliti, nörobruselloz, nöroborelyoz, santral sinir sistemi sarkoidozu, lenfoma ve lösemik infiltrasyonlar düşünülmelidir (44).

2.4. İnterlökin 10

İnterlökin 10 (IL-10), ilk kez sitokin sentez kısıtlayıcı faktör (CSIF) olarak tarif edilmiştir (49). IL-10 bağışıklık yanıtı çok yönlü düzenleyen önemli bir bağışıklık baskılayıcı sitokindir (3). IL-10, iltihap oluşumu ile salgısal bağışık yanıt arasındaki düzenlemenin kontrolünde önemli rol oynar (3). Bu düzenlemeyi İnterlökin 1 beta (IL-1 β), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), granülosit makrofaj-koloni stimüle eden faktör (GM-CSF), inducible nitrik oksit sentetaz (iNOS) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) gibi öncü iltihap araçlarının salınışını kısıtlayarak yapar (4,5). IL-10 temelde myeloid kökenli hücreler tarafından, daha az olarak da T ve B lenfositleri tarafından sürekli üretilir (50).

IL-10 bazı hastalıkların gelişimine zemin hazırlayan diğer bağışık yanıt araçlarının üretimini de düzenleyebilir (3). Bağışık yanıtın baskılanmasına aracılık eden sitokinlerin üretimindeki ince farklılıklar T lenfositlerinin Th1 veya Th2 yönündeki farklılaşmasında anahtar bir rol oynayabilir (49). Örneğin doku nakli sonrası doku reddinde yüksek IL-10 seviyesi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (51). Ayrıca sistemik lupus eritromatozus (SLE) (52), bulaşıcı hastalıklar (53), tümör ilişkili bağışıklık baskılama (54), gibi durumlarda IL-10 seviyesinin arttığı gözlenmiştir. İltihabi kalın bağırsak hastalığı (55), sedef hastalığı deri değişimleri (56), yaygın astım (57), gibi hastalıklarda IL-10 seviyesi düşük tespit edilmiştir.

IL-10 üretiminin kişiler arasında fark göstermesinin, %50 ile %70 arasında genetik temelinin olduğu ifade edilmektedir (6). IL-10 üretiminde diğer önemli etken bulaşıcı hastalıklardır (6). Ayrıca vücut kütle indeksi, sigara içilmesi ve cinsiyet de üretimde etkilidir (6).

IL-10 geni 1'inci kromozomun uzun kolu 1q31-32 bölgesinde bulunmaktadır (58). Genin özendirici (promoter) bölgesi transkripsiyon başlama bölgesinin yaklaşık 5 kb yukarısındadır ve burada bilinen en az 23 tane tek baz değişiklikleri (SNP) saptanmıştır (58,59). Yapılan çalışmalarda, insan çevresel kan hücreleri vücut dışında mitoz uyarıcılarına maruz bırakıldığında, bireyler arasında IL-10 üretebilme kapasiteleri arasında dikkate değer fark bulunmuştur (60,61). Bu farklılığın sebebinin genetik temelli olduğunu düşündürmektedir. Tek yumurta ikizleri, çift yumurta ikizleri ve akraba olmayan bireyler arasında yapılan çalışmalar sonucu IL-10 üretiminde kalıtsal faktörlerin rol aldığı gösterilmiştir (6). Genetik yapıya göre IL-10 üretim kapasitesi, yüksek, orta ve düşük olarak sınıflandırılmıştır (7,8).

IL-10 gen ifadesini, genin özendirici bölgesinde bulunan farklı gen çok yapılılıklarının (polimorfizm) etkilediği tespit edilmiştir (7). IL-10 geni özendirici bölgesinde bulunan, -1082 (G/A), -819 (C/T) ve -592 (C/A) tek baz değişimleri sonucu GCC, ACC, ATA olarak belirlenen üç farklı haplotipin IL-10 üretimin seviyesinde etkili oldukları gösterilmiştir (7). Deneysel çalışmalarda çevresel kan hücreleri, LPS (56), concocovalin A (8,61) fitohemaglutinin (60) veya anti-CD3 gibi çeşitli mitoz uyarıcılar ile uyarıldığında GCC haplotipinin yüksek, ACC haplotipinin orta ve ATA haplotipinin düşük IL-10 ürettiği gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, hastane ortamından kaynaklanmayan pnömonili (community acquired pneumonia, CAP) hastalarda hastalık şiddeti ile IL-10 özendirici bölgesi gen çok yapılılığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (9). Hastalığın şiddetinin -1082GG genotipinde, -1082GA ve -1082AA genotiplerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (9). Hastalık sonrası hayatta kalan hastalarda, ölen hastalara göre A allelinin G alleleline göre belirgin bir şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir (9). Daha sonra yapılan bir çalışmada, hastane dışı pnömokokal hastalığı olan kişilerde, -1082G allelinin pnömokok kaynaklı septik sok için yüksek risk taşıdığını göstermişlerdir (62). Başka bir çalışmada, yoğun bakım hastalarda -592A allelinin düşük IL-10 üretimi ve yüksek ölüm oranını ile anlamlı ilişkisinin olduğu gösterilmiştir (63). Yine *Mycobacterium tuberculosis* bulaşması olan hastalarda yapılan bir çalışmada -1082G allelinin hastalığa direncin azalmasında ve hastalığın gelişmesinde belirgin bir şekilde etkisinin olduğu saptanmıştır (64). Sağlıklı kan bağıışı yapan kişilerin EBV serotipi pozitif ve negatif olanlar tespit edilmiş, bu kişilerden EBV seronegatif olanların diğer gruptan daha fazla -1082G alleli taşıyanlardan oluştuğu gözlenmiştir (65). Bu da -1082 allelinin EBV için koruyucu bir görev aldığını göstermektedir.

2.4.1. IL-10 Yapı, Üretim ve Fonksiyonları

IL-10, tip I interferonlar (INF) ve INF γ 'nın oluşturduğu sınıf II helikal sitokin ailesinin bir üyesidir (66). Ana yapı olarak sağ el anti paralel dörtlü heliks kümesi özelliği gösterir (66,67). İlk kez sitokin sentez inhibitör faktör olarak tarif edilmiştir ve IL-19,20,22,24 ve 26'dan oluşan beş sitokin ile aynı kökenden gelen ancak farklı işlevi olan (paralog) özellik göstermektedir (8,61). Viral IL-10, Epstein-Barr virüs (EBV) (68) ve yedi üyesi olan büyük DNA virüslerini (herpes virüs, poxvirüs) içeren bir grup virüs tarafından üretilir (61). İnsan IL-10 ve virüs IL-10 sınıflandırılması DNA dizi analizi ve protein üç boyutlu yapılarına göre yapılmıştır (66).

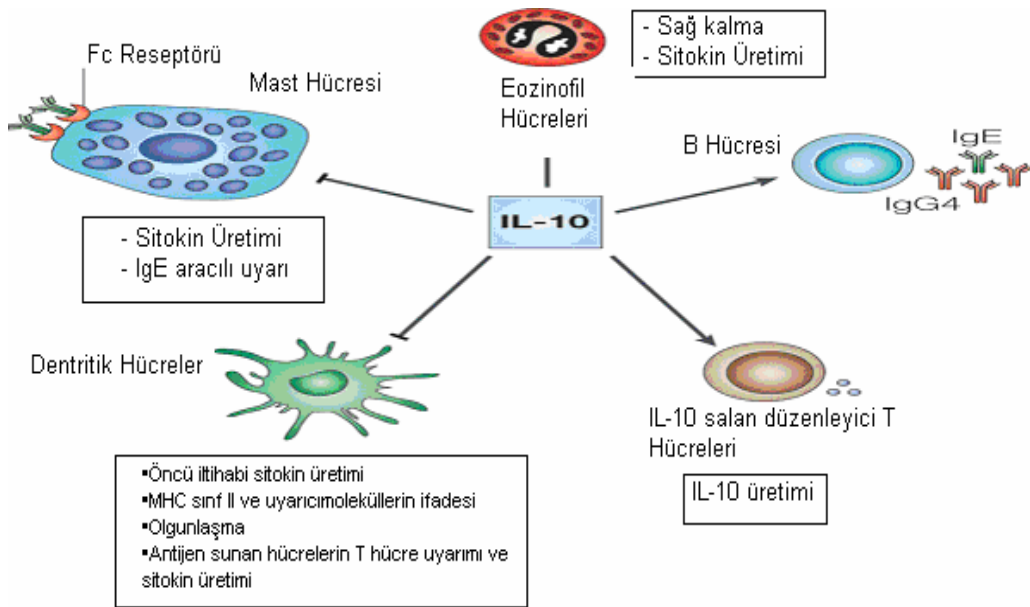
Viral IL-10 ile insan IL-10 arasında %80'den %20'ye kadar dizi benzerliği görülmektedir (66). İnsan IL-10 toplam 37 kD büyüklüğünde olan birbirine eş iki alt üiteden oluşur (66). Her alt üite 18.5 kD büyüklüğündedir ve 160 amino asitten oluşur (66).

IL-10 hücrel etisini IL-10 yüzey almacına (IL-10R) bağlanarak etisini gösterir (67). α -sarmal (helikal) sitokin almacı IL-10R, hücre yüzeyi bağlanma parçası, zar içini geçen kıvrım ve hücre içi parçadan oluşmuştur (67). IL-10R ile janus kinaz 1 (Jak1) ve tyrosine kinase 2 (Tyk2) birlikte bulunur ve STAT3'ü (Signal-transducer and activator of transcription protein) aktive ederler. STAT3, IL-10'un reseptörüne bağlanması sonucu aktif hale geçmiş olur ve IL-10'un doğal ve edinilmiş bağışıklık sistemi üzerinde gösterdiği inhibitör etkinin sağlanması için gerekli moleküllerin gen ifadesinin oluşmasını sağlar (8,61). IL-10, iltihap oluşumunun önemli elemanlarından olan çok çekirdekli nötrofiller, monositler ve makrofajlar tarafından iltihap aracılarının üretimini engellerken, iltihap önleyici moleküllerin ifadesini artırır (69). IL-10'un bağışıklık hücreleri üzerine etkileri sekil-1'de şematize edilmiştir (70). IL-10'un iltihap önleyici rolü, IL-10 geni eksik farelerde barsak bakteri antijenlerine karşı uygunsuz bir bağışık yanıtın oluşması sonucu kronik iltihabi bowel hastalığının gelişmesi ile gösterildi (71). IL-10, antijen sunan hücreler ve T hücrelerine etki ederek edinilmiş bağışıklığı düzenlerler. Antijen sunan hücrelerde hem IL-12 ve IL-18 üretimini engelleyerek hem de temel doku uyuşum bileşeni (major histocompatibility complex, MHC) sınıf II ifadesini azaltarak bağışıklığı baskılar. Ayrıca IL-10, monosit kökenli dendritik hücre farklılaşmasını azaltır, plazmasitik dendritik hücrelerin programlanmış hücre ölümüne uğramasına neden olur ve kemokin almaçlarının yüzey ifadesini etkileyerek dentritik hücre göçünü azaltırlar (69). IL-10, IL-2, IL-5, Tümör nekrozu faktörü (TNF) ve kemokin reseptör 4 (CXCR4) ifadelerini kısıtlayarak doğrudan CD4+ T hücrelerinin fonksiyonunu etkileyebilir (72). Mini dizilim tekniği (Mikroarray) çalışmaları IL-10'un NK ve CD8+ sitotoksik T hücrelerinin (CTL) doğrudan uyarıcısı olduğunu göstermiştir (73). IL-10, nuclear factor kappa B (NF κ B) ve activator protein 1 (AP-1) 'i CD8+ sitotoksik T hücrelerinde aktive edeken monosit ve CD4+ T hücrelerinde inhibe edeler (69). IL-10, fare ve insan B hücrelerini, MHC sınıf II ifadesini artırarak uyarırlar ve hayat sürelerini uzatırlar. IL-10, immunglobülün G1 (IgG1) ve IgG3 için anahtar rol oynarken Transforming growth factor beta (TGF β), IgA1 ve IgA2 için anahtar rol oynar (69).

Anti-CD40 antikoru ile IgA yetmezliği oluşturulan hastalarda, IL-10 ile yeniden IgA oluşumu sağlanabilmiştir (69). IL-10, B hücrelerinin uyarılmasını sağlayarak dolaşımdaki IgA'nın artmasına neden olur (74).

2.4.2. Bulaşıcı Hastalıklarda IL-10'un Rolü

Mikrop bulaşması sonrası oluşan hastalıkların iyileşmesi konağın etkene karşı oluşturabileceği koruyucu bağışık yanıtı bağlıdır. Örneğin bağışık yanıtın bozulduğu bağışıklık yetmezliği olan hastalarda mikrop bulaşması sonrası oluşan hastalıklar kontrol edilemez hale gelir. Bununla birlikte mikrop bulaşması sonrası oluşan hastalıklara karşı oluşabilecek şiddetli bağışık yanıt, hastaya ciddi rahatsızlık verebilecek bölgesel veya sistemik doku yıkımlarını tetikleyebilir. Diğer yandan bulaşma ile oluşan zararların önlenmesi ve bağışık yanıtın şekillenmesini sağlayacak bağışıklık düzenleyici mekanizmalara ihtiyaç vardır. IL-10 bağışıklık sisteminin önemli düzenleyici moleküllerinden biridir (75). Pek çok bakteri, virüs, parazit veya onların ürünleri, konak hücreleri tarafından IL-10 üretimini uyarabilir. IL-10'un hücresel ve viral formları bulunmaktadır. Viral çeşidinin, konağın bağışıklık sisteminden kaçmayı sağlayan moleküler bir tuzak olarak görev aldığına inanılmaktadır (76).



Şekil 2.1. IL-10'un bağışıklık sistemi hücreleri üzerine etkileri. Eozinofil ve mast hücrelerinin etkilerini azaltarak alerji oluşumunu önlerken, dendritik hücrelerden öncü iltihap moleküllerinin salınmasını kısıtlayarak doku hasarını önlemektedir (70).

IL-10, virüs, bakteri, mantar, protozoa ve helmit gibi etkenlerin neden olduğu hastalıklarda bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli anahtar rol oynamaktadır. Toksoplazma (77), Trypanosoma (78,79), Plasmodium (80,81), Mycobacterium (82), HSV (83) bulaşmalarında doku hasarına sebep olan aşırı Th1 ve CD8+ T cevabının baskılanmasında önemli bir etki göstermektedir. IL-10 yokluğunda bir çok bulaşıcı hastalıkta ölümcül ağır doku hasarı gözlenmektedir (84,85). Aksine aşırı IL-10 üretimi, öncü iltihap uyarıcıları salınımının engellenmesi sonucu etkenin bağışıklık sisteminin kontrolünden kaçmasına sebep olmakta, bu da şiddetli ve ani ölümlere yada süregelen, iyileşmeyen hastalıklara neden olmaktadır (86). Örneğin antijen sunan hücrelerden IL-10 ‘un aşırı ifadesi, *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, ve *M. Avium* gibi etmenlerin kontrolsüz olarak çoğalmasına neden olmaktadır (87).

2.4.3. Makrofajlar

Makrofajlar hem iltihap oluşumunu hazırlama ile hem de fibrotik cevap geliştirme özellikleri ile mikrop bulaşmasına karşı önemli görevleri olan hücrelerdir (88). Ancak bulaşıcı hastalık etmenleri de makrofaj işlevlerini atlatmayı sağlayan bir takım yöntemler geliştirmişlerdir ve ayrıca makrofajlarda önemli IL-10 kaynaklarındandır. Vücut dışı yapılan bir çalışmada, IgG ile kaplanmış *Leishmania amastigotes* etkeni ile veya diğer bağışık bileşenleri ile Fc almacı bağlanmasını takiben IL-10 üretimi yapması ile tanımlanan “düzenleyici makrofajlar” tanımlanmıştır (84,89). Makrofaj kökenli IL-10, *M.avium* bulaşmış hücrelerin programlanmış hücre ölümünü engelleyerek mikrop sağ kalımını arttırmış olur (90).

2.4.4. Düzenleyici T Hücreleri (Treg)

Doğal Treg hücreleri yüzeylerinde yüksek miktarda CD25 ifade eden hücrelerdir ve timusta sürekli olarak üretilirler. Treg hücreleri mikrop bulaşması hastalıklarında bağışıklık sisteminin neden olduğu hasarları önleyen hücrelerdir (91). Treg hücreleri yüksek miktarda IL-10 üretebilen hücrelerdir. IL-10 üreten Treg hücreleri, bulaşıcı hastalık etkenlerinin yok edilmesi ile doku hasarı oluşması arasındaki hassas dengeyi düzenleyen önemli hücrelerdir (92).

2.5. Sitokin Uyarısı Baskılayıcı Proteinler (SOCS)

Sitokinler, bağışıklık hücrelerinin etkin hale gelmeleri, farklılaşmaları, çoğalmaları ve hayatlarını sürdürebilmelerini içeren birçok fizyolojik cevabı düzenlerler (93).

Sitokinler genellikle janus kinaz (JAK1, JAK2, JAK3 ve Tyk2) almaçlarına bağlanarak etkilerini gösterirler. Sitokinin almaca bağlanmasının ardından JAK'in hücre içi kısmı fosforile olur ve daha sonra STAT proteinleri fosforile edilerek etkinleşirler (94). JAK-STAT hücre içi iletim yolağı SOCS proteinleri tarafından engellenir (12,95). SOCS proteinleri sitokinlerin bağışıklık sistemi üzerine etkilerini düzenleyen, önemli bir hücre içi proteinleridir (10). SOCS proteinlerinin keşfi, sitokin-JAK-STAT yolağının negatif düzenlenmesi mekanizmalarının anlaşılmasını sağladı (11). Bununla birlikte KO fare çalışmalarında SOCS proteinlerinin pek çok immünolojik ve patolojik süreçte önemli görevler üslendiği tespit edildi (11).

Bilinen 8 tane SOCS ailesi proteini vardır: CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 ve SOCS7 (11). Her birinde merkezi bir SH1 kısmı, farklı uzunluklarda aminoterminal kısmı ve SOCS kutusu (SOCS box) olarak bilinen 40 aminoasitlik karboksiterminal kısmı bulunmaktadır (11). SOCS ailesi proteinlerinden en iyi tanımlananlar CIS, SOCS1, SOCS2 ve SOCS3'dir (11).

CIS bu ailenin ilk tanımlanan üyesidir. CIS ve SOCS2 etkinleşmiş (fosforile olmuş) sitokin almaçlarının trozin kalıntılarına bağlanır. Bu şekilde STAT proteinleri defosforile edilerek sitokin iletimi etkisizleştirilir (96,97).

SOCS5, IL-4 almaca bağlanarak JAK1'i etkisizleştirerek IL-4 uyarısını durdurur (98). Hem SOCS1 hem de SOCS3 kinaz inhibitör bölgeye (KIR) sahip olduklarından JAK-tirozin kinaz etkinliğini engellyerek etki gösterirler (13). SOCS1, SH2 parçası ile doğrudan JAK proteininin uyarılma bölgesine bağlanırken, SOCS3, SH2 parçası ile sitokin almaca bağlanarak etkisini gösterir (14). SOCS3 proteininin, gp130'a Tyr757, leptin almaca Tyr985, eritropoetin almaca Tyr401, G-CSF almaca Tyr729, IL-12 almaca Tyr800 bölgelerinden bağlandığı gösterilmiştir (15). SOCS kutusu fonksiyon olarak ubikutin-transferaz sisteminin bir üyesidir. SOCS kutusu Elongin B ve elongin C, cullin-5 veya cullin-2, RBx-1 ve E2 ile ilişki içindedir (11). SOCS ailesi proteinleri hen diğer SOCS kutusu içeren proteinler gibi E3 ubikutin ligaz olarak etki gösterir hem de N-terminal bölge aracılı protein parçalaması yapabilir (11). Örneğin SOCS1'in SOCS kutusu hem onkojenik etki gösteren TEL-JAK'ın baskılanmasını yaparken hem de doğal tip JAK2'nin parçalanmasını sağlar. Genetik olarak sadece SOCS1 kutusu eksik olarak üretilen farelerin, SOCS1 geninin tamamı eksik fareler gibi iltihabi hastalık geliştirdiği tespit edilmiştir (11). SOCS1 ve SOCS3'ün IRS-1 ve IRS-2'nin parçalanmasını sağlayarak insülin uyarısını azalttığı gösterilmiştir (99,100).

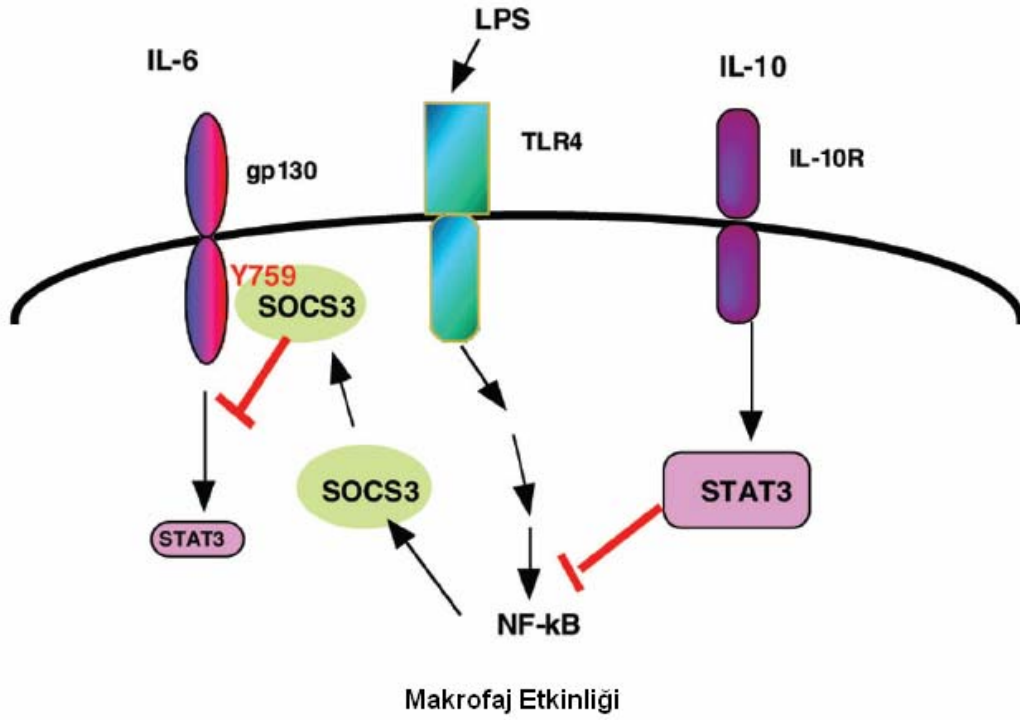
2.5.1. SOCS3

SOCS3 KO fareler, embriyonik gelişimleri sırasında plasental fonksiyon bozukluğundan dolayı ölmüşlerdir (101,102). Embriyonik ölüme sebep olan SOCS3 delesyonlu fareler tetraploid kurtarma süreci ile yaşatılabilmektedir. Bu çalışmalarda SOCS3'ün embriyonik gelişim açısından temel gereksinim olmadığı, plasental gelişim için temel gereksinim olduğu anlaşılmıştır. Kurtarılmış SOCS3 eksik fareler kalp küçülmesine bağlı prenatal ölüm göstermişlerdir. Buradan SOCS3'ün LIF almacını veya gp130 iletimini düzenlediği ortaya çıkmaktadır (11). SOCS3 KO farelerde yapılan çalışmalar SOCS3'ün IL-6 (103) ve G-CSF'in (104,105) önemli bir negatif düzenleyicisi olduğunu göstermiştir.

2.5.2. SOCS3 ve Doğal Bağışıklık

IL-6, öncül iltihabi bir sitokindir ve pek çok iltihabi hastalıkta önemli görevleri vardır (11). IL-10, bağışıklık sistemini düzenleyen bir sitokindir ve iltihap önleyici rol oynar (11). Bir transkripsiyon faktörü olan STAT3 hem IL-6 hem de IL-10'un işlev göstermesinde temel proteinlerdir (106). Bu iki karşı etkili sitokinin etkisini STAT3 üzerinden göstermesinin mekanizması tam olarak açık değildir.

Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda karşıt etki gösteren bu iki sitokinin düzenleyicisi olarak SOCS3 proteini gösterilmiştir. SOCS3 geni eksik veya gp130 almacı SOCS3 bağlanma bölgesinde (Y759F) bir mutasyon taşıyan makrofajlarda hem IL-10 hem de IL-6'da LPS uyarısına bağlı TNF- α üretimi baskılanmıştır (11). SOCS3 proteini yapımı, LPS'ye cevap olarak IL-6 ve IL-10 tarafından güçlü bir şekilde uyarılır (11). Ancak SOCS3, IL-6 almacına bağlandığından seçici olarak sadece IL-6 uyarısını baskılar (şekil-2) (11). SOCS3 IL-10 almacına bağlanmadığından bu uyarıyı baskılamaz (11). SOCS3 geni silinmiş makrofaj ve nötrofillerde, LPS uyarısı ile oluşan ani iltihaba karşı direnç gözlenmiştir (11). SOCS3 geni eksik farelerde IL6, STAT1'i ve INF cevap genlerinin ifadesini güçlü bir şekilde uyarır (11). SOCS3 geni eksik makrofajlarda IL-6'nın temel işlevinin değiştiği görülmüştür (11). Sonuç olarak SOCS3'ün, gp130 ilişkili sitokinlerin biyolojik işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 2.2. Makrofajlarda SOCS3 ve STAT3 yolağının lipopolisakkarid uyarısına cevabı (11). SOCS3, IL-10 uyarısına etki etmezken IL-6 cevabını güçlü bir şekilde baskılamaktadır.

2.5.3. SOCS3 ve İltihabi Hastalıklar

SOCS3 özellikle IL-6'nın rol aldığı patolojik iltihabi olayların baskılanmasında önemli görev almaktadır (11). İltihabi barsak hastalığı oluşturulmuş farelerin kalın bağırsağındaki epitelyal hücrelerde ve lamina propria hücrelerinde, insan ülseratif kolit ve crohn hastalığında (11), romatoid artrit hastaların sinovial fibroblastlarında STAT3 etkinliği ve SOCS3 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Kolit oluşturulmuş farelerde yapılan çalışmalarda STAT3 etkinliği SOCS3 etkinliğinden bir gün önce başlamıştır (11). STAT3 etkinliği üçüncü ve beşinci günlerde açıkça artıp daha sonra azalırken, SOCS3 ifadesi en yüksek seviyeye beşinci günde ulaşmıştır (11). STAT3 fosforilasyonu SOCS3 ifadesinden önce oluşmakta daha sonra negatif geri etki ile SOCS3 ifadesi STAT3 etkinliğini azaltmaktadır (11).

Adenoviral gen transferi ile SOCS3'ün yüksek ifadesinin deneysel artrit gelişimini önlediği gösterilmiştir (107). IL-6/STAT3 yolağı, çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin üretimini arttırarak, doku hiperplazisi, fibroblast çoğalmasını sağlayarak ve osteoklast etkinliğini arttırarak hastalıkların kronikleşmesinde önemli katkı sağlamaktadır. SOCS3 ifadesi, IL-6 etkisi ile oluşan STAT3 işlevselliğini azaltarak kronik iltihabi hastalıkların oluşum sürecine negatif yönde etki etmektedir.

Gp130 alması üzerindeki SOCS3 bağlanma bölgesinde mutasyon yapılan deneysel çalışmada RA benzeri eklem hastalığı gelişiminin arttığı gözlenmiştir (108). Bu etki muhtemelen sinoviyal fibroblastların etkinliğinin artmasından dolayı gerçekleşmektedir. Gp130-JAK-STAT yolağına etki eden mekanizmaların tespit edilmesi, yeni iltihap önleyici ilaçların geliştirilmesinde önemli açılımlar sağlayabilir. Diğer yandan SOCS3 ifadesinin artması alerjik yanıtı şiddetlendirebilir (11). Transgenik T hücrelerinde SOCS3 ifadesinin artması Th1 gelişimini engellemiş, Th2 gelişimini arttırmıştır (109). Astımlı ve atopik dermatitli hastaların T lenfositlerinde SOCS3 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (11). T hücrelerinde SOCS3 ifadesinin, Th1/Th2 oranının düzenlenmesinde, dolayısı ile otoimmün iltihabi hastalık süreçlerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

2.5.4. SOCS Ailesi Proteinlerinin Beyin İltihabını Düzenlemesindeki Rolü

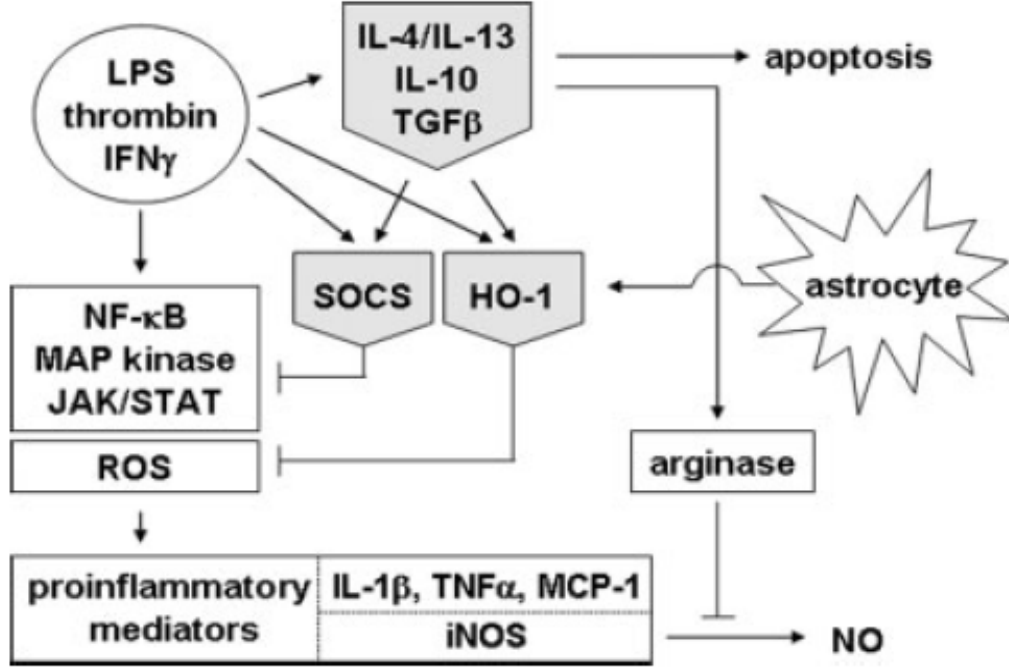
SOCS ailesi proteinleri, iltihabın önemli negatif düzenleyicilerindendir (110). SOCS proteinleri başlangıçta iltihap başlatıcı bir protein olan $INF\gamma$ ile muamele edilen makrofajlarda tanımlanmıştır. LPS (111) ve CpG DNA (112) gibi diğer iltihap uyarıcılar da SOCS ifadesi oluşumuna neden olmaktadır. Mikroglia ve astrosit hücreleri trombin gibi iltihap uyarıcılara maruz kaldıklarında 30 dakika ile 1-2 saat arasında hemen CIS, SOCS1 ve SOCS3 ifadesi gerçekleşmektedir (113).

SOCS1 yetmezlikli farede $INF\gamma$ 'ya aşırı duyarlılık gözlenmekte ve SOCS3 mutasyonu koliti şiddetlendirmektedir (114). $INF\gamma$, JAK/STAT yolağı ile SOCS oluşumuna neden olur (115). Bunun dışında başka yollarda SOCS ifadesini sağlayabilir. CpG DNA, Makrofajlarda MAPK/ERK sinyal ileti yolağı ile SOCS1 ve SOCS3 ifadesini sağlayabilir (116). LPS dolaylı olarak $INF\alpha/\beta$ yolu ile SOCS ifadesini sağlayabilir (117). Astrositlerde, trombin ile PLA2, COX2 ve LOX aracılığı ile üretilen reaktif oksijen türleri etkisi ile CIS ifadesi gerçekleştirilir (119). JAK/STAT, ERK/p38MAPK, PKLE ve ROS mikroglia ve makrofajlardan öncü iltihap araçlarının ifadesini sağlayan önemli sinyal ileti yollarıdır (118). PLA2, COX2 ve LOX önemli iltihap araçları olan prostoglandinler ve leukotreinlerin üretimini katalizler (119). Görüldüğü gibi SOCS ve iltihap oluşturucular aynı sinyal ileti yolağını kullanmakta ve iltihap sırasında aynı anda oluşmaktadır.

COX2 aracılığı ile üretilen 15dPGJ2, SOCS1 ve SOCS3'ü artırır ve bu proteinler astrositlerde STAT1 ve STAT3'ün aktivasyonunu azaltır (119). Retinoik asit, LXA4 ve ATL iltihap önleyici etkilerini SOCS ifadesi aracılığı ile göstermektedirler (119).

RA, mikrogliyalarda hem INF γ aracılıklı STAT1 ve STAT3 aktivasyonunu kısıtlarlar hem de MCP-1 ve INF γ -IP-10 gibi kemokinlerin ifadesi ile SOCS1, SOCS3 aracılıklı baskılama yaparlar (119).

İltihap oluşumuna karşı cevap oluşturmada SOCS aracılıklı yanıt, en az üç farklı yol ile gerçekleştirilmektedir (119). İlk olarak SOCS, INF γ tarafından uyarılan JAK/STAT yolağını baskılar (120). SOCS, INF γ uyarısı ile sürekli olarak ifade edilerek negatif geri beslenme ile INF γ aracılıklı iltihabi cevabı baskılar (119). Özellikle SOCS1 ve SOCS3, JAK'ın uyarılma bölgesini etkileyerek veya JAK ve STAT'ın bağlanma bölgelerini kapatarak JAK/STAT yolağını baskılar (119). SOCS proteinlerinin, JAK/STAT yolağı dışında kullandığı ikinci yolak, iNOS, COX2 ve TNF α gibi öncü iltihabi araçların ifadesini arttırılmasında önemli bir rol oynayan nüklear faktör κ B (NF- κ B)'nin işlevsel hale gelmesini baskılamasıdır (119). SOCS1, NF- κ B'nin bir bileşeni olan p65'in parçalanmasında ubiquitin ligaz görevi üstlenir (121). RAW264.7 makrofajlarında aşırı SOCS1 ifadesi, hem STAT hem de NF- κ B üzerindeki baskılayıcı etkisinden dolayı INF γ 'nın etkisi ile ifade olan MHC sınıf II, CD40 ve TNF α 'nın etkilerini baskılar (119). Bu bulguyu destekleyen deneysel çalışmada SOCS yetmezliğinde, NF- κ B ifadesi artmış ve NO ile TNF α seviyeleri yükselmiştir (122). SOCS ifadesinin etkilediği üçüncü yolak p38 MAPK yolağıdır (119). LPS ve TNF α 'a cevap olarak belirgin bir şekilde işlevsel hale gelen MAPK yolağı SOCS proteinleri tarafından baskılanır (119). Mikrogliyalarda trombinin SOCS3 ifadesini arttırması, MAPK yolağının baskılanmasına ve LPS etkisi ile iNOS/NO üretimi azalması bağlıdır (123).



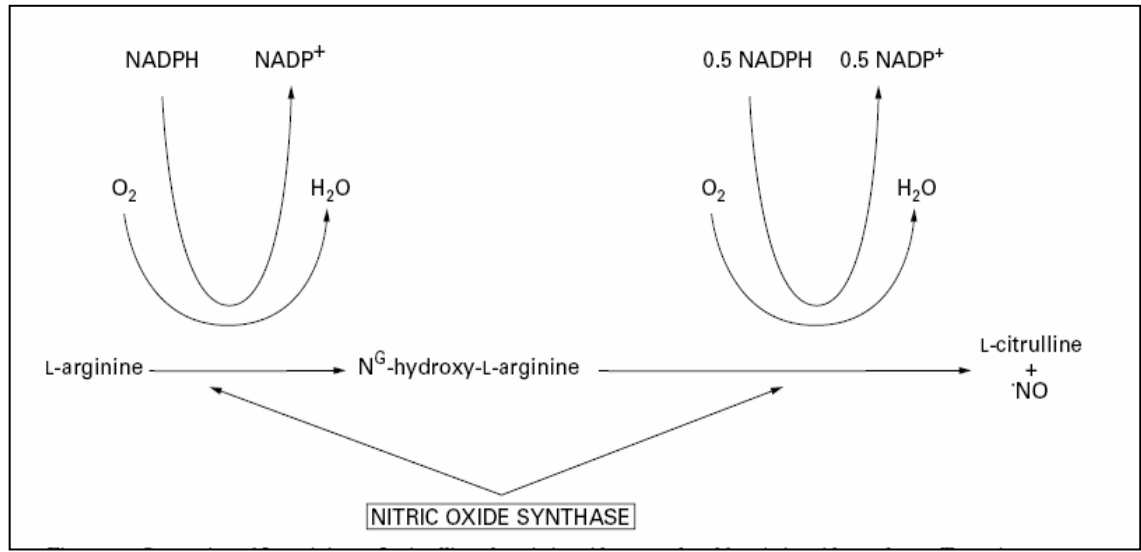
Sekil 2.3. Beyin iltihabının oluşumunu, çeşitli yollar tarafından kontrol edilmektedir (119). Özellikle SOCS proteinleri NF- κB, JAK/STAT ve MAP kinaz'a negatif yönde etki ederek öncü iltihabi proteinlerin ifadesini engellemektedir.

Beyin iltihabında SOCS proteinlerinin etkisi üzerine güncel çalışmalar henüz yeterli değildir. Vücut dışı yapılan çalışmalarda astrosit ve mikroglia hücrelerinde SOCS ifadesi gösterilmesine rağmen beyin omurilik bariyerini geçen bağışıklık hücrelerinde özellikle SOCS1 ve SOCS3 ifadesinin etkileri henüz açıklanmamıştır. Menenjit gibi beyin iltihabının sebep olduğu yıkıcı aşırı etkilerde SOCS proteinin rolü mRNA düzeyinde araştırılması gereklidir.

2.6. Nitrik Oksit (NO)

İltihapta önemli moleküllerden birisi nitrik oksittir. Basit bir gaz olan nitrik oksit sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve dolaşım sistemi için önemli bir uyarı ileti moleküldür (16). Steroid hormonlar gibi, NO'de, hedef hücresinin plazma zarından doğrudan difüzyon ile girebilir (17). Bununla birlikte NO'in etkisinin moleküler temeli, steroidlerden farklıdır. NO transkripsiyonu düzenleyen bir alıcı proteine bağlanmak yerine hücre içi hedef enzimlerin işlevini değiştirir (16). NO arjinin amino asidinden nitrik oksit sentetaz enzimi tarafından sentezlenir. Bir kez sentezlenince, NO hücreden dışarıya çıkar ve komşu hücreleri bölgesel olarak etkileyebilir (16).

NO'nin etkisi, çok kararsız olması ve yarılanma ömrünün yalnızca birkaç saniye sürmesi nedeniyle bu gibi bölgesel etkiler ile sınırlıdır. NO'nin ana hücre içi hedefi guanil siklazdır. NO bu enzimin aktif merkezindeki bir "hem" grubuna bağlanır, bir ikincil mesajcı olan siklik GMP sentezini uyarır. Ek olarak NO sistein kalıntılarının nitrozillenmesi ile bazı hedef proteinlerin yapısını doğrudan etkileyebilir (16). NO'nin etkisini tanımlayan en iyi örneklerden birisi, kan damarlarının genişlemesi için uyarı iletimidir (17).



Şekil 2.4. L-arjininin nitrik oksit sentetaz enzimi aracılığı ile L-sitrülin ve nitrik okside dönüşüm aşamaları (21).

Bu olaydaki birinci basamak, kan damarlarının, duvarındaki sinir hücrelerinin sonlarından, asetilkolin gibi bir sinir ileticilerinin salınımıdır (17). Bu sinir ileticileri endotel hücreleri üzerinde NO sentezini uyarıcı etki yapar (17). Böylece N guanil siklazı işlevselleştireceği yer olan komşu düz kas hücrelerine yayılım olur ve sonuçta kas hücrelerinin gevşemesini ve kan damarlarının genişlemesini uyaran siklik GMP sentezlenir (16). Örneğin, NO penil dikleşmesine yol açan kan damarlarının genişlemesi için sinyal iletiminden sorumludur (16). NO, damar genişlemesi, konak savunması, hücrel çoğalma gibi birçok hücrel mekanizmalarda rol alır. Ancak yüksek miktarlarda NO dokular için zararlı bir özelliğe sahiptir (17).

2.6.1. Nitrik Oksit Sentetazlar (NOS)

NO, nitrik oksit sentetaz enzimleri (NOS) tarafından sentezlenir (19). Üç farklı izoenzim tespit edilmiş olup bunlar nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve tetiklenebilir NOS (iNOS) olarak sınıflandırılmıştır (18).

eNOS ve nNOS normal fizyolojik durumlarda salınmalarına karşın iNOS normal fizyolojik koşullarda salınmamaktadır (20). iNOS daralma, yaralanma, otoimmün hastalıklar ve yangı gibi çeşitli durumlarda sitokinleri ve diğer bağışıklık uyaranları güçlü bir şekilde etkilemektedir (124,128,129). iNOS lipopolisakkarit ve INF gama gibi çeşitli iltihaba yol açan proteinler ile bir kez uyarıldığı zaman diğer NOS'lardan çok daha fazla ve hızlı bir şekilde NO sentezi yapar. iNOS böylece antimikrobiyal etki yapmakla birlikte konak dokularında da yıkıma sebep olur (125).

Tablo 2.1. Nitrik oksit sentetazların genel özellikleri (21)

İzoform	İsimlendirme	moleküler ağırlık (kD) (Monomer olarak)	Hücre içi yerleşim	Üretildiği hücreler	üretim
nNOS	Nöronal NOS				
	ncNOS	155	Membran	Nöronlar, adrenal medulla, böbrek makula densa, glia astrositler	Sürekli
	NOS1				
	NOS tip I				
iNOS	İnducible NOS				
	NOS2	125-135	sitoplazma	Makrofajlar, lökositler, monositler, endotel, düz kas, nötrofiller, astrositler, mikrogliya, hepatositler, küpffer hücreleri fibroblastlar	Uyarı ile
	NOS tip II				
eNOS	Endotelial NOS				
	ecNOS	135	Membran (inaktif)	Endotel hücreleri	
	NOS3		Stoplazma (etkin)	trombositler	sürekli
	NOS tip III			düz kas hücreleri	

Nitrik oksit sentetazlar protein sonrası parçalama mekanizması ile kontrol edilirler (126). Üç NOS formu da sadece homodimer halinde etkin hale gelirler (22). Dimerizasyon için kalmodilin bağlanması gerekmektedir. iNOS ve nNOS dimerizasyonu, tetrahidrobiopterin'in (BH4) bağlanması halinde sabit hale gelir (22). Merkezi sinir sistemi proteini olan kalirin, makrofajlar tarafından üretilen NAP110 gibi proteinler NOS izoformlarının dimerizasyonunu önleyerek protein sonrası kontrol mekanizmasında görev alırlar (127). eNOS izoformu endotelial hücrelerin golgi cisimciği ve plazmalemma vezikülleri membranlarında bulunmaktadır (22).

eNOS'un etkinliği bu bölgelerde bulunan bazı proteinlerin negatif veya pozitif etkisine göre değişmektedir (22). eNOS'un hücre içi düzenlenmesi doğrudan NO üretimini etkilemektedir. Etkinleşmiş fagositler tarafından oluşturulan oksitlenmiş yada hipokloride olmuş düşük yoğunluklu lipoproteinler eNOS ifadesini ve işlevlerini azaltırlar (22). Plazma mebrasında eNOS ifadesinin azalması endotel hücrelerinde NO üretimini azaltır (22). Endotel hücrelerinde NO üretiminin azalması, atherosikleroz oluşumunda önemli anahtar rol oynamaktadır. NOS etkinliğini düzenleyen en önemli faktör arginindir (22). NO üretimi hücre dışı L-arginin varlığına bağıldır. Hücre dışı arginin miktarı arginaz enzimi tarafından düzenlenir (22). Makrofajlarda ve dentritik hücrelerde TGF- β ve LPS arginaz ifadesini güçlü bir şekilde artırır (22). Yine bu hücreler arginin üretimi için sitrülünü kullanabilirler.

Sitokinler, bağışık bileşenler, mikrobik ve viral ürünler (proteinler, lipitler, polisakkaritler), ferritine bağlanmamış demir, oksijen basıncı, çevresel pH ve çeşitli antibiyotikler gibi etkenler iNOS ifadesi üzerinde etkindirler (128). IL-12 makrofajlarda iNOS üretimini artırır. M.tüberkülosis lipoproteini, gram negatif bakteri flagellini, Salmonella typhimurium SopE2 proteini, bakteriyal DNA, CpG içeren oligodeoksinükleotidler ve çeşitli parazitlerin DNA'sının makrofajlarda NO üretimini uyardığı tespit edilmiştir (129).

2.6.2 Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentetazlar Menenjit İlişkisi

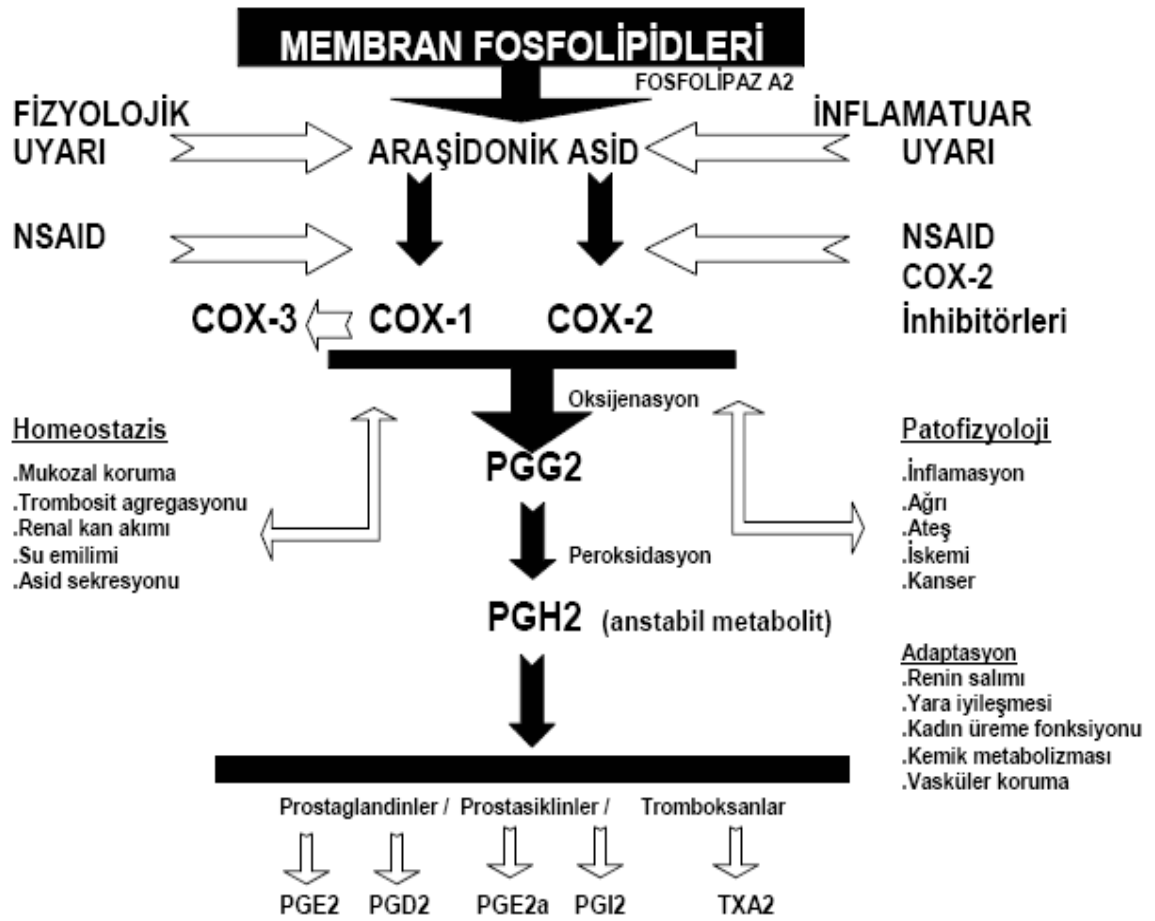
Bakteriyal menenjitte iltihap TNF α ve IL-1 β gibi öncül iltihap sitokinlerinin bölgesel olarak üretimi ile başlatılır. Öncül iltihap sitokinlerinin üretimini, nöronlar, glia hücreleri ve lökositlerden salınan NO uyarmaktadır (21). Yapılan araştırmalarda bakteriyel menenjitli hastaların beyin omurilik sıvılarında (BOS) ölçülen NO miktarının, viral menenjitli ve normal kişilerin BOS'una göre daha fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (18). Ölüm sonrası immünohistokimyasal boyama yöntemi ile meningial dokuda iNOS ve NO'ın arttığı gösterilmiştir (21). Ayrıca deneysel çalışmalarda iNOS inhibitörleri kullanılarak kan beyin bariyerinin yıkılması, beyin ödemi ve doku hasarının azaltıldığı görülmüştür (23).

Deneysel olarak oluşturulan bakteriyel menenjitli hayvan modellerinde de NO ürünlerinin arttığı gözlenmiştir (130). Bu hayvan modellerinde NOS inhibitörlerinin kullanımından sonra beyin hasarı ve merkezi sinir sistemi karmaşık belirtilerinin daha çok arttığı, ölüm oranının ve hastalık şiddetinin arttığı gözlenmiştir (22).

Hastalığın şiddetlenmesine özellikle NOS inhibitörlerinin seçici olmayıp tüm NOS'ları kısıtlaması nedeni ile konak savunması için önem taşıyan NO sentezinin tamamıyla engellenmesi neden olmaktadır (22). eNOS yetmezlikli farelerde yapılan deneysel çalışmalarda normal tip farelere göre yangı ve merkezi sinir sistemi karmaşık belirtilerinin şiddetlendiği görülmüştür (24). iNOS yetmezlikli farelerde iltihap şiddeti azalmış ve tedaviye yanıt artmıştır (24). Farklı NOS izoenzimleri farklı ve bazen zıt fizyolojik etkiler göstermektedir. Bu etki NO ürün miktarı ve özel bir bölgedeki kimyasal NO reaksiyonları sonucu farklı izoformların farklı miktarda gen bölgesinden ifadesi sonucu oluşur (21).

2.7. Siklooksijenazlar (COX)

Prostaglandinlerin öncülü olan araşidonik asid, hücre membranı fosfolipidlerinin içinde ester olarak bulunan 20 karbonlu çoklu doymamış bir yağ asitidir (131). Prostaglandin sentezinde ilk basamak fosfolipaz A2 ile fosfolipidlerinin hidrolizi ile serbest araşidonik asidin salınımıdır (25). İkinci reaksiyon ise COX enziminin siklooksijenaz aktivitesi ile katalizlenen reaksiyondur (25). COX prostaglandin sentezinin hız sınırlayıcı enzimidir (25). Bu reaksiyonda, moleküler oksijen araşidonik aside eklenir ve prostaglandin G2 (PGG2) adlı kararsız ara ürün oluşur (25). Prostaglandin G2 (PGG2) COX'ın peroksidaz aktivitesi sayesinde hızlıca prostaglandin H2 (PGH2) ye dönüşür (25). Bundan sonra özgün izomerazlar PGH2'yi farklı prostaglandinlere ve tromboksanlara dönüştürür (25) (Şekil 4).



Şekil 2.5. Eikosanoidlerin sentezi, COX enziminin prostaglandin, prostasiklin ve tromboksanların biyosentezindeki bifonksiyonel rolü ve fizyolojik-patofizyolojik etkileri Siklooksijenaz (COX) enziminin temel özellikleri (25)

COX enziminin farklı genler tarafından kodlanan üç izoformu vardır (COX-1, COX-2 ve COX-3) (25). Bu isoformlar birçok açıdan birbirinden farklıdır.

2.7.1. Siklooksijenaz-1 (COX-1) (yapısal form)

Vücudun hemen her dokusunda normal koşullarda bulunan, birçok fizyolojik işleve sahip yapısal bir enzimdir (132). Temel işlevi hemostatik düzenleme için prostaglandin öncüllerini sağlamaktır (25). Prostaglandinler, gastrik mukozanın bütünlüğünün sürdürülmesi, böbrek kan akışının düzenlenmesi, trombosit fonksiyonları gibi normal fizyolojik fonksiyonları kontrol eder (25). COX-1'in mide ve böbrekte normal fizyolojik etkisi, kan akımındaki değişiklikler ile ilişkilidir (25). Kan hacmi azaldığında, böbrekten anjiotensin salınır ve diğer faktörlerin etkisiyle de sistemik vazokonstriksiyon ile kan basıncı düzenlenir (25). Anjiotensin böbrekte prostaglandin sentezini uyarır. COX-1 böbrekte glomerülde ve toplayıcı kanalda ifade olur.

İfadesi uyarı ile 2-4 kat artabilir, glikokortikoidlerle COX-1 düzeyleri çok az etkilenir (25). Prostaglandinlerin etkisiyle vazodilatasyon oluşur ve böylece sistemik vazokonstriksiyon durumlarında böbrek kan akımı ve glomerül filtrasyonu devam eder (25). NSAİİ alan hastalarda bu koruyucu etki ortadan kalktığından böbrek iskemisi ve böbrek hasarı oluşabilir (133). COX-1, 9q32-q33.3 nolu insan kromozomu üzerinde yerleşiktir. 11 ekzon içerir ve yaklaşık 68kDa ağırlığında proteini sentezleyen 2.8 kb mRNA'yı üretir.

2.7.2. Siklooksijenaz-2 (COX-2) (uyarılabilir form)

COX-2 mRNA ve proteini ise dokularda normal koşullarda ölçülemeyecek kadar az miktarda bulunan, büyüme faktörleri, mitojenler, sitokinler, endotoksinler, interlökinler gibi uyarılarla artarak, patolojik ve iltihabi süreçlerde rol oynayan bir enzimdir (26). COX-2 üretimi hızlı uyarılan, düzenlenmesi sıkı olarak kontrol edilen bir maddedir. COX-2 ifadesinin, vücutta onkogenleri, büyüme faktörlerini ve tümör geliştiricileri uyardığı gösterilmiştir (25). COX-2 değişik organ ve sistemlerde farklı etkiler gösterebilmektedir (25). Sinir sisteminde prostaglandin sentezinin preoptik alandaki ısı duyarlı nöronlar üzerinde rol oynadığını düşünen bazı araştırmacılar, COX-2 özgün NSAİİ ile COX-2 ifadesini azaltarak ateş yükselmesini engellemişlerdir (25). COX-2'nin ayrıca merkezi sinir sistemi gelişimi, öğrenme, hafıza ve nöronlar arasında bağlantıda rolü olduğuna inanılmaktadır (25). Böbreklerde yapılan bir çalışmada COX-2'nin, makula densa ve medullanın interstisyel hücrelerde ifade edildiği gösterilmiştir. Etkisi tam olarak bilinmemekle beraber, tubuloglomeruler geribildirim ve renin yapımında önemli etkileri olabilir (25). Gastrointestinal sistemde, epitel hücrelerinin uyardığı COX-2 salınımı prostaglandin yapımını yükselterek, intestinal epitelden mukozal sıvı salgılanması, bakterilerden temizlenme ve ülser iyileşmesini sağlama gibi etkileri vardır (25). Uterin prostaglandinler myometriumda ritmik kasılmaya neden olurlar. Overlerdeki ovulasyon esnasında folikülün yırtılması için COX-2 gerekmektedir (25). Kemiklerde iyileşme döneminde ve osteoblastik farklılaşma sırasında, osteoblastlarda bulunan COX-2'nin rolü olduğu düşünülmektedir (25). COX-2 geni, 1q25.2-q25.3 numaralı insan kromozomu üzerinde yer alır. 10 ekzonlu 8 kb'lik bir gendir (134). Yaklaşık 68 kDa ağırlığında bir proteini kodlayan 4.1-4.5 kb'lik mRNA'yı kopyalar. COX-1 ve COX-2 genleri her ne kadar iki farklı kromozom üzerinde yer alsalar da DNA, RNA ve protein düzeylerinde yüksek oranda ilişkilidirler (134). COX-1 576, COX-2 587 aminoasitten oluşur.

Her iki enzim de membran içi glikoprotein homodimerleri şeklindedirler ve endoplazmik retikulumun lümenal yüzeyinde ve nükleer zarda bulunurlar (25). COX2, araşidonik asit metabolizmasında önemli bir enzim olup iltihabın şiddetini arttırmaktadır. COX2 üreten hücreler prostoglandinler ve proanjiogenik proteinler yaparak apoptotik uyarıya direnç kazanırlar. Son yapılan çalışmalarda N. Gonorrhoeae bulaşmış üretral epitel hücrelerinde COX2 ifadesinde artış olduğu gözlenmiştir (135).

2.7.3. Siklooksijenaz-3 (COX-3)

Serebral kortekste fazlaca bulunan, asetaminofene duyarlı bir COX-1 değişkenidir (136).

2.7.4. Beyinde COX2 İfadesi

Normal şartlarda COX2, vücudun birçok organında ya yoktur ya da çok az sentezlenir. Ancak memeli beyinde COX2 mRNA belirgin şekilde ifade edilmektedir (137). Ölmüş insan beyinde COX2 aracılıklı üretilen prostoglandinler orta seviyede tespit edilmiştir (138). Normal beyinde COX2 proteini nöron hücreleri ve dentritik hücreler tarafından sentezlenmektedir (139). Serebral korteks, hippokampus ve serebellum nöronlarında düşük ve sabit seviyede COX2 ifade edilirken, glia ve endotel hücrelerinde ifade edilmemektedir (139). İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda toksik uyarı ile beyinde aşırı COX2 ifadesi sağlanmıştır (139). Ayrıca antioksidan kullanılarak beyinde COX2 protein ifadesinin mRNA düzeyinde azalması sağlanmıştır (139).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hastalık tanısı ve Örneklerin toplanması

Bu araştırmada, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji Anabilim Dalı ve Gaziantep Çocuk Hastalıkları Hastanesine başvuran, menenjit tanısı almış hastalar çalışmaya alınmıştır. Menenjit tanısı için rutin olarak alınan kan ve BOS örnekleri çalışmada kullanılmıştır.

Akut menenjit tanısı, öykü, fizik muayene bulguları (ateş, baş ağrısı, bulantı, kusma, ense sertliği, Kernig ve Brudzinsky bulguları, konvülziyon, döküntü, bölgesel nörolojik bulgular) ve BOS bulguları (basınç, görünüm, hücre sayısı ve tipi, Pandy reaksiyonu, protein, glukoz seviyeleri, BOS'un Gram, Giemsa, Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyamaları, BOS kültürü, BOS'un serolojik incelenmesi) ile konuldu.

Ani gelişen bakteriyel menenjit olgularının tanısında pürülan menenjit düşündüren BOS bulguları (bulanık görünüm, polimorfonükleer lökosit (PMNL) hâkimiyeti, protein yüksekliği, glukoz düşüklüğü), ayrıca BOS kültüründe etkenin izole edilmesi ile tanı konuldu. Etken izole edilemeyen durumlarda hastalar, BOS bulguları ve klinik gidişe göre değerlendirildi.

Tüberküloz menenjit olgularında BOS'un EZN boyamasında aside dirençli basil (ARB) görülmesi, BOS kültüründe Löwenstein-Jensen besiyerinde Mycobacterium tuberculosis üremesi BOS'ta protein yüksekliği yanında glukoz düşüklüğü olması ve lenfosit hakimiyeti ile tanı konuldu.

Viral menenjitlerde ise klinik gidiş, BOS bulguları (berrak görünüm, devam eden lenfosit hâkimiyeti, BOS glikozunun eş zamanlı kan glikozuna oranının $\geq 0,6$ olması, proteinin normal veya hafif artmış olması), akut bakteriyel menenjite yönelik başlanmış olan antibiyotik tedavisine yanıt alınamaması ile tanı konuldu. Ateş yüksekliği olan olgularda BOS kültürü alındığında eş zamanlı olarak kan kültürü de alındı.

Bütün olgularda zemin hazırlayan hastalık ve nörolojik tutulum açısından kulak burun boğaz ve nöroloji görüş alışverişi ile ayrıntılı inceleme yapılmıştır. Olguların çoğu bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile değerlendirildi. LP yapılmadan önce kafa içi basınç artışı açısından göz dibi incelenerek papilödem varlığı araştırıldı veya beyin BT'si ile değerlendirildi.

3.2. Araştırma Yöntemleri:

3.2.1. DNA İzolasyonu

5 ml EDTA'lı kan üzerine 5 ml (kendi hacmi kadar) arıtılmış soğuk su eklenir ve yavaşça 5 dak. alt-üst edilir. 4000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilir, santrifüj sonunda süpernatant dökülür. Çökeltinin hacmi kadar tekrar arıtılmış soğuk su eklenir ve 4000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilir. Süpernatant dökülerek aynı işlem üç kez tekrarlanır. Süpernatant atılır, pelete 3 ml üreli parçalama çözeltisi eklenir (Üre Lysis Buffer). Pelet tamamen çözülür. 400 µl %20'lik SDS (sodium dodecyl sulphate) eklenir. 100 µl 10mg/ml proteinaz K eklenip, 1 gece için 37 °C'deki hibridizasyon fırınında bekletilir. Ertesi gün hibridizasyon fırınından alınan örneklerle 2 ml 5M NaCl eklenir. Üzerlerine 14 ml kloroform konularak 4000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilir. Santrifüj sonunda üç ayrı faz oluşur. En üst faz temiz bir tüpe alınarak hacmi kadar soğuk etil alkol eklenir. Etil alkolde yumak şeklinde oluşumu gözlenen DNA'lar içinde 1ml. %70'lik etil alkol bulunan 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınır. Tüpler 10 dk. 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA'ların tüpün dibine yapışması sağlanır. Üzerindeki alkol dökülerek tekrar 1ml. %70'lik etilalkol eklenir. Bu işlem üç kez tekrarlanır. Yıkama işleminden sonra alkol tamamen dökülerek tüpler ağzı açık olarak vakumlu kurutucuya yerleştirilir ve bir saat kurutulur. Kuruyan DNA'ların üzerine miktarına göre (400 µl) dH₂O eklenerek +4 derecede bir gece çözünmeye bırakılır daha sonra -20 derin dondurucuya kaldırılır (140).

3.2.2. Real-Time PCR

Real-time PCR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur (141). Gen ifadesinin analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve gözlemleyen floresan isaretili prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir (141). Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda "kinetik PCR", "homojen PCR", "kantitatif Real-time PCR" gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (142). Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır.

Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (143, 144)

3.2.3. LightCycler floresan PCR Yöntemi ile Gen Çokyapılılığı Analizi

LightCycler floresan PCR yöntemi (Roche, Mannheim, Almanya) alışılmış polimeraz zincir reaksiyonunu floresan ölçüm sistemini bir araya getirerek, DNA çoğalmasının eş-zamanlı izlenmesini sağlamaktadır (141) . Bu yöntemde, normal PCR’da kullanılan primerlere ek olarak, floresan işaretleli iki prob kullanılmaktadır. Problardan bir tanesi, polimorfizm içeren bölgeye özđün tasarlanırken, diğeri hemen bunun yakınında (1 baz çifti uzaklıkta) yerleştirilmiştir (143). Bu yöntemde genotiplerin ayırt edilmesi “erime eğrisi analizi” (melting curve analysis) ile gerçekleştirilmektedir (144). Bunun için, PCR’da DNA çoğalmasının tamamlanmasından sonra, sıcaklık çok yavaş bir şekilde yükseltilerek her bir örnek için erime eğrisi oluşturulmuştur (144). Sıcaklık yükseltilmesi sırasında normal dizi ile polimorfizm içeren dizinin ayırımı gerçekleşmektedir (144). Polimorfizm içeren dizi ile floresan işaretleli prob arasında oluşan ikileşme yanlış bir eşleşme (mismatch) içerdüğinden, normal dizi ile prob arasında oluşan ikileşmeye oranla daha az karardır (144). Bu durum, polimorfizm içeren ikileşmenin daha düşük bir erime noktasına (melting point) sahip olmasına ve dolayısıyla sıcaklık yükseltilmesi sırasında daha düşük bir sıcaklıkta ayrışmasına yol açmaktadır (144). Matematiksel bir dönüşüm kullanılarak erime eğrilerinden floresan değeriinin negatif türevinin sıcaklığa göre değışimini veren profiller elde edilmekte ve değışik allellere ait farklı erime sıcaklıkları gösteren tepeler izlenmektedir (144).

3.2.4. IL-10 Gen Çokyapılılığının Real-Time PCR ile Tespiti

IL-10 özendirici bölgesi gen çokyapılılığını tespit etmek için hasta ve kontrollerin periferik kanlarından izole edilen DNA örnekleri kullanıldı. Real time PCR çalışması için IL10 Toolset (Genes-4U AG, Winterthur, Switzerland) kiti kullanıldı. IL-10 özendirici bölgede C-592A, C-819T, G-1082A gen çokyapılılıkları araştırıldı. Real time PCR için hibridizasyon karışımı (Taq polimeraz, reaksiyon tamponu, nükleotid karışımı), MgCl₂, primerler, proble ve 1 µl genomik DNA toplam 20 µl hacimde karıştırılarak kapillerlere aktarıldı.

Kapiller tüpler LightCycler® 2.0 real time PCR cihazına yerleştirildi. 95 °C’de 10 dakika denatürasyon yapıldı. Daha sonra 50 döngü amplifikasyon için 95 °C 10 s denatürasyon, 50 °C 10 s anealing, 72 °C 15 s extansiyon yapıldı. Çoğalmanın tamamlanmasından sonra, sıcaklık saniyede 0.2°C artırılarak 40°C’den 85°C’ye yükseltilmesiyle erime eğrileri oluşturuldu. Floresan/sıcaklık negatif türevinin sıcaklığa göre çizilmesiyle de, erime eğrileri, erime tepelerine dönüştürüldü.

3.3.LightCycler floresan PCR Yöntemi ile Gen İfadesinin Tayini

3.3.1. Örneklerin Hazırlanması

Gen ifadesinin ölçümü için sayımsal PCR yöntemi, mRNA üzerinden gerçekleştirilebilir. İstenilen dokudan çeşitli yöntemlerle tüm RNA elde edilir. RNA elde edilirken kullanılan yöntemlerde genellikle DNA bulaşığı saptanır (141). İki farklı örnek arasında gözlenen farklı değerler, örneklerin DNA bulaşıklık seviyeleri arasındaki farklılıktan kaynaklanabilir (144). Bu nedenle elde edilen total RNA örnekleri DNase enzimi ile muamele edilerek DNA bulaşımı giderilmelidir (144). DNase enziminin cDNA sentezi öncesi ortamdan uzaklaştırılması da reaksiyon özgüllüğü açısından önemlidir (144). Elde edilen RNA’nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ile derişimi ise UV spektrofotometresiyle tespit edilebilir (144). Miktar tayininin başarılı olması, en çok RNA’nın kalitesine bağlıdır (144). Miktar tayini işlemi genellikle DNase enzimi ile işlemiş 1 µg total RNA üzerinden sentezlenen cDNA ile gerçekleştirilir. cDNA sentezi için Ters Transkriptaz PCR yöntemi kullanılır (144). Bu yöntemde özgün primerler ve ‘Revers Transkriptaz’ enzimi kullanılarak total RNA’dan cDNA elde edilir (144).

3.3.2. RNA izolasyonu

Kan ve BOS örneklerinden RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Örnekler hücre sayısı 1×10^6 hücreye ayarlanarak PBS (fosfat tampon çözeltisi) ile 200 µl’ye sulandırıldı. Üzerine 400 µl lysis/binding tampon (4,5 M guanidine-HCl, 50 mM tris-HCl, triton X-100, pH 6,6) eklenerek 15 saniye vortekslendi. Karışım polipropilen filtreli tüplere aktarıldı ve 15 saniye 8000xg hızda santrifüj edilerek filtreden geçen kısım atıldı. 90 µl DNase tamponu (1M NaCl, 20 mM tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH7,0) ve 10 µl DNase I (10 KU) karışımı hazırlanarak filtre üzerine dökülüp 15 dakika oda ısısında bekletildi.

Filtre üzerine 500 µl birinci yıkama çözeltisi (5 M guadin hidroklorid, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) eklenerek 15 saniye 8000xg hızda santrifüj edilerek filtreden geçen kısım atıldı. Filtre üzerine 500 µl ikinci yıkama çözeltisi (20 mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5) eklenerek 15 saniye 8000xg hızda santrifüj edilerek filtreden geçen kısım atıldı. Filtre üzerine yine 200 µl ikinci yıkama çözeltisi eklenerek 2 dakika 13000xg hızda santrifüj edilerek filtreden geçen kısım atıldı. Filtre yeni bir toplama tüpüne geçirilerek üzerine 100 µl steril çift distile su eklenerek 8000xg hızda santrifüj edililip filtreden geçen kısım toplandı. Elde edilen RNA UV spektrofotometre ile ölçüldü (145).

3.3.3. Ters Transkriptaz PCR Yöntemi ile cDNA Eldesi

RNA örneklerden cDNA sentezi First Strand cDNA sentez (AMV) kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon için 2 µl 10x reaksiyon tamponu (100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,3), 4 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl deoksiniükleotid karışımı (dATP, dCTP, dTTP, dGTP, her birinden 10 mM), 2 µl random primer (0,02 A₂₆₀ ünite/µl), 1µl RNase inhibitör (50 ünite/µl), 0.8 µl AMV reverse transkriptaz, 1 µl örnek RNA, 7,7 µl distile su karışımı hazırlandı. Karışım techne PCR cihazına koyularak 25°C’de 10 dakika, 42 °C’de 60 dakika, 99 °C’de 5 dakika ve 4 °C’de 5 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA –80 °C’de çalışma yapılabilecek kadar saklandı.

3.3.4. PCR Aşaması

Göreceli gen sayımında, çalışılacak her örnek için iki farklı karışım hazırlanır. Karışımlardan ilki “hamarat (house keeping) gen” adı verilen ifadesi sabit gen primerlerini içerirken, ikincisi ifadesi ölçülecek gene ait primerleri içerir (144). Yani tüm örnekler hem incelenecek genle hem de ‘housekeeping gen’le çoğaltım yapılır (144). Bu ikinci örnek iç kontrol olarak da adlandırılmaktadır (144). PCR sonunda araştırılan genin değeri, iç kontrol genin değerine oranlanarak ölçülür ve düzenlenir (144). PCR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığı “erime eğrisi” yöntemi ile kontrol edilmelidir (144). Erime ısı (T_m), bir çoğalma ürünü genin %50’sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir ve bu değer genin dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir (144). Erime eğrisi yöntemi de bu özellikten yararlanarak, PCR sonunda elde edilen çoğalma eğrilerinin gen ürünü mü yoksa primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığını belirler (144).

3.3.5. Primer ve Probların Tasarımı

Hedef genlerin ifade tayini için tablo-2’de verilen primer ve problemler tasarlandı. Primer ve problemlerin tasarımı için www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl web sayfası kullanıldı. Buradan elde edilen diziler Pubmed NCBI nükleotid dizileri ile karşılaştırılarak doğrulukları tespit edildi. Primerler IDT (Integrated DNA Technologies, Belçika) firmasına sentezletirildi.

Çalışmada Universal ProbeLibrary (UPL) problemleri kullanıldı (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya). UPL problemleri 8-9 nükleotidlik kısa dizileri olarak, kilitli nükleotid (Locked Nucleic Acid; LNA) teknolojisi kullanılmıştır. Kısa nükleotid dizilerine sahip olduklarından geniş bir ısı aralığında kullanılabilir. Bu özellikleri ile her bir probe 7000’in üzerinde transkripti tespit için kullanılabilir. İnsan genomundaki tüm transkriptler 165 farklı UPL probe ile tespit edilebilir.

Tablo 3.1. Hamarat gen ve hedef genlerin primer dizileri ve problemleri

Gen	Primer Dizisi	UPL Probe	NCBI nükleotid no
HPRT1	5' - tgacctgattatattgcataacc-3'	Probe 23	NM_000194.1
	5' -cgagcaagacgttcagtcct-3'		
nNOS	5' -ctgtgacaactcccgctaca-3'	Probe 65	NM_000620.1
	5' -acgtcttcctcatgtctaagttca-3'		
eNOS	5' -gaccctcaccgctacaacat-3'	Probe 5	NM_000603.3
	5' -ccgggtatccaggtccat-3'		
iNOS	5' -cacaggtctcttctggttg-3'	Probe 16	NM_000625.3
	5' -ttcttactgtgggcttg-3'		
SOCS3	5' -agacttcgattcgggacca-3'	Probe 36	NM_003955.3
	5' -aacttgctgtgggtgacca-3'		
COX2	5' -cttcacgcatcagttttcaag-3'	Probe 23	AY462100.1
	5' -tcaccgtaaatatgatttaagtccac-3'		
IL-10	5' -tgggggagaacctgaagac-3'	Probe 30	NM_000572.2
	5' -ccttgctctgtttcacagg-3'		

3.3.6. Real-Time PCR Tepkimesi

Real time PCR tepkimesi için 14 µl ditile su, 0,2 µl UPL probe (10 µM), 0,4 µl forward primer (10 µM), 0,4 µl reverse primer (10 µM), 4 µl Lightcyler Taqman master (faststart Taq DNA polimeraz, tampon, MgCl₂, dNTP karışımı), 1 µl örnek cDNA karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım kapiller tüplere aktarıldı. Kapiller tüpler LightCycler® 2.0 real time PCR cihazına yerleştirildi. 95 °C’de 10 dakika denatürasyon yapıldı. Daha sonra 45 döngü amplifikasyon için 95 °C 10 s denatürasyon, 60 °C 30 s anealing, 72 °C 1 s ekstansiyon yapıldı. Son aşamada bir döngü 40 °C 30 s tutulup PCR sonlandırıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya, menenjit tanısı almış 61 birey, menenjit geçirmemiş 64 birey alınmıştır. Menenjitli hastalardan 34 tanesi onsekiz yaş altı çocuk, 29 tanesi onsekiz yaş üstü yetişkin grubuydu. Çocuk grubunda, 24 bakteriyal menenjit, 4 tüberküloz menenjit, 6 viral menenjit tanısı almış hasta vardı. Yetişkin grubunda, 14 bakteriyal menenjit, 13 tüberküloz menenjit tanısı almış hasta vardı. Çalışılan gruplar ile ilgili bilgiler tablo-3'de verilmiştir. Çalışmada, hasta grubunun kan ve BOS örneklerinden RNA izolasyonu, hasta ve kontrol grubu kan örneklerinden RNA ve DNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinden Ters Transkriptaz PCR yöntemi ile cDNA yapıldı.

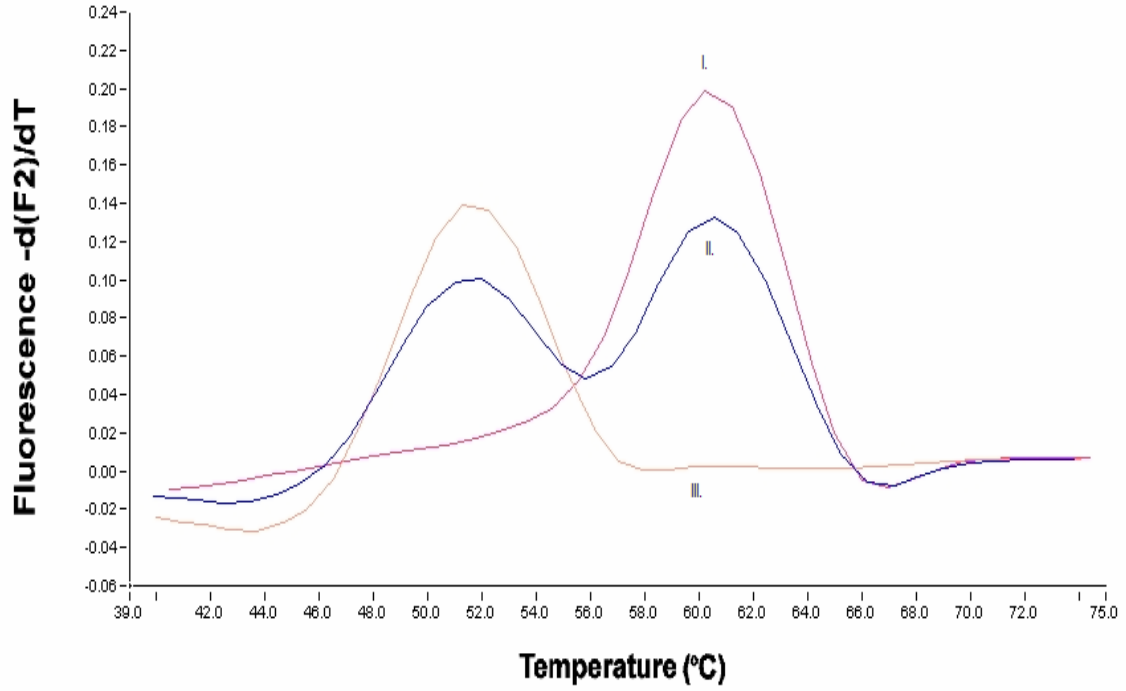
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarına ait yaş ortalamaları

	Hasta Sayısı	Yaş ortalaması	Bakteriyal menenjit	Tüberküloz menenjit	Viral menenjit
Çocuk grubu	34	3.94 ± 3.81	24	4	6
Yetişkin grubu	27	48.37 ± 14.13	14	13	0
Çocuk Kontrol grubu	32	5.03 ± 3.88	-	-	-
Yetişkin Kontrol grubu	32	49.09 ± 13.30	-	-	-

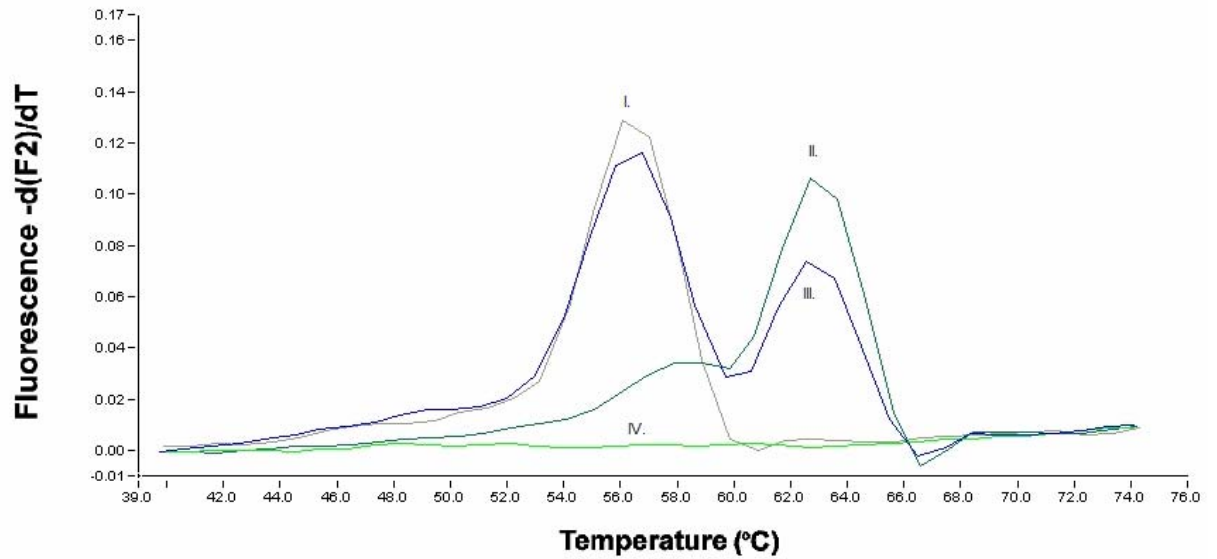
4.1. IL-10 Özendirici Bölgesi Gen Çokyapılılığı

IL-10 özendirici bölgesi gen çokyapılılığını araştırmak amacı ile hasta ve kontrol grubu DNA örneklerinden C-592A, C-819T, G-1082A, gen bölgeleri çalışıldı. Real time PCR yöntemi ile çoğalmanın tamamlanmasından sonra, sıcaklık saniyede 0.2°C artırılarak 40°C'den 85°C'ye yükseltilmesiyle erime eğrileri oluşturuldu. Floresan/sıcaklık negatif türevinin sıcaklığa göre çizilmesiyle de, erime eğrileri, erime tepelerine dönüştürüldü. Erime eğrileri tepeleri ilgili bölgeler için şekil 5,6 ve 7'de gösterilmiştir. Bu verilere göre örneklerin özendirici bölge genotipleri belirlendi. Elde edilen veriler Graphpad Instat istatistik programı ile ki-kare testi p anlamlılık değerleri hesaplandı. Hasta ve kontrol grubu arasında özendirici bölge C-592A gen çok yapılılığı P anlamlılık değeri genotip için 0.173, özendirici bölge C-819T gen çok yapılılığı P anlamlılık değeri genotip için 0.383, özendirici bölge G-

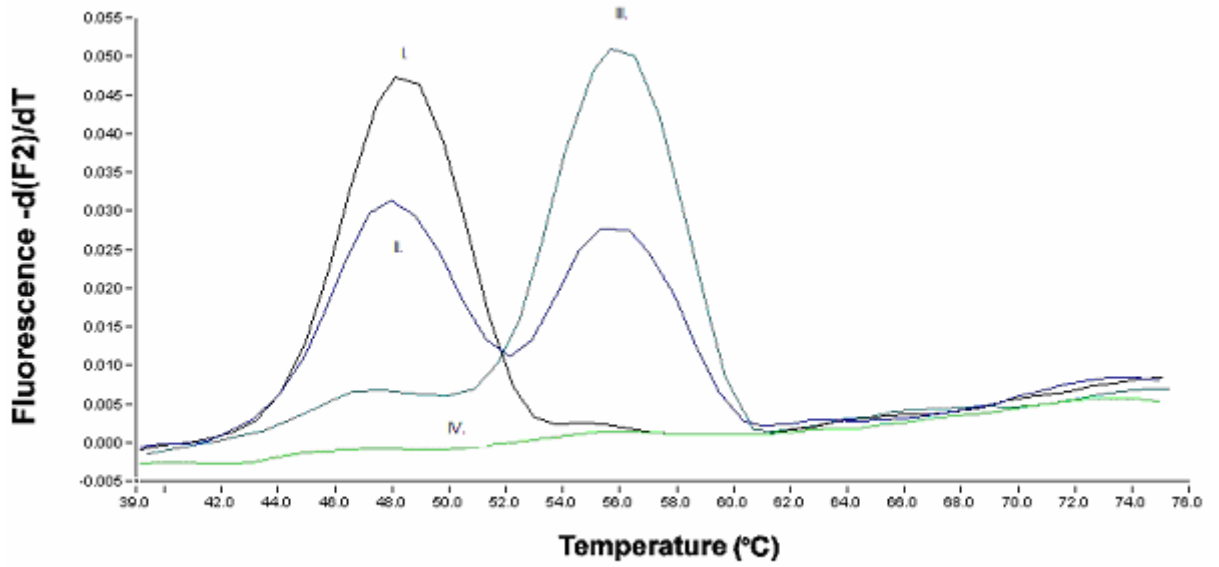
1082A gen çok yapılılığı P anlamlılık değeri genotip için 0.105 bulundu. Bu sonuçlara göre IL-10 özendirici bölge gen çokyapılılığı hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bşır fark bulunamadı. Özendirici bölgedeki bu üç bölgenin real time PCR çalışmaları ile ilgili istatistiksel sonuçlar tablo-4,5,6’da verilmiştir.



Şekil 4.1. IL-10 özendirici bölge G-1082A gen çokyapılılığı real time PCR analiz sonuçları. I. Homozigot GG, II. Heterozigot GA, III. Homozigot AA.



Şekil 4.2. IL-10 özendirici bölge C-819T gen çokyapılılığı real time PCR analiz sonuçları. I. Homozigot TT, II. Heterozigot TC, III. Heterozigot CC, IV. Negatif kontrol.



Şekil 4.3. IL-10 özendirici bölge C-592A gen çokyapılılığı real time PCR analiz sonuçları. I. Homozigot AA, II. Heterozigot AG, III. Heterozigot GG, IV. Negatif kontrol.

Tablo 4.2. IL-10 özendirici bölge G-1082A gen çok yapıllığı. A allelinin artışı ile menenjit arasında bir ilişkinin varlığı görülebiliyorsa, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Genotip/ Allel	Kontrol (n=64) n (%)	Hasta (Menenjit) (n=61) n (%)	P	OR (95% CI)
A/A	34 (53.1)	40 (65.5)		1.00
A/G	27 (42.2)	17 (27.9)	0.105	0.535 (0.250-1.144)
G/G	3 (4.7)	4 (6.6)	1.000	1.133 (0.237-5.424)
A	95 (74.2)	97 (79.5)		1.00
G	33 (25.8)	25 (20.5)	0.322	0.742 (0.411-1.341)

Tablo 4.3. IL-10 özendirici bölge G-592A gen çok yapılılığı. Genotiplerde allellerin dağılımı birbirine çok yakın seyretmiştir.

Genotip/ Allel	Kontrol (n=64) n (%)	Hasta (Menenjit) (n=61) n (%)	P	OR (95% CI)
A/A	7 (10.9)	10 (16.4)		1.00
C/A	31 (48.5)	20 (32.8)	0.173	0.452 (0.148-1.381)
C/C	26 (40.6)	31 (50,8)	0.788	0.835 (0.278-2.502)
A	45 (35.2)	40 (32.8)		1.00
C	83 (64.8)	82 (67.2)	0.693	1.111 (0.658-1.877)

Tablo 4.4. IL-10 özendirici bölge C -819T gen çok yapılılığı. Genotiplerde allellerin dağılımı birbirine çok yakın seyretmiştir.

Genotip/ Allel	Kontrol (n=64) n (%)	Hasta (Menenjit) (n=61) n (%)	P	OR (95% CI)
C/C	26 (40.6)	31 (50,8)		1.00
T/C	26 (40.6)	22 (36.1)	0.383	0.710 (0.328-1.534)
T/T	7 (10,9)	8 (13.1)	1.000	0.959 (0.306-2.999)
C	83 (64.8)	84 (68.9)		1.00
T	45 (35,2)	38 (31.1)	0.501	0.834 (0.492-1.415)

4.2. Real Time PCR Yöntemi ile Hedef Gen İfadelerinin Hesaplanması

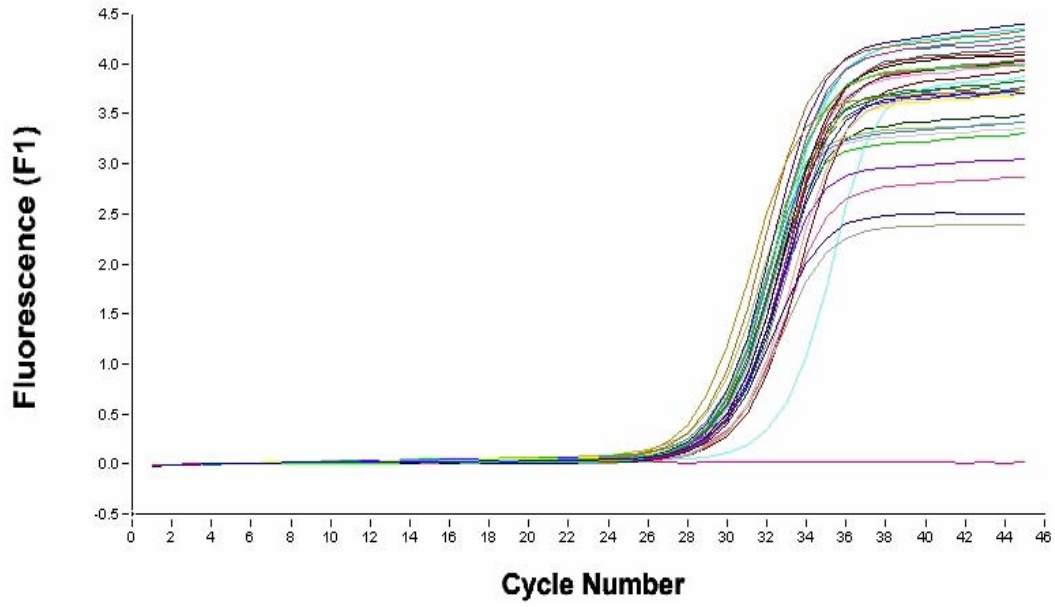
Çalışmada, hasta kan, BOS örneklerinden elde edilen RNA örnekleri ve kontrol grubu kan örneklerinden elde edilen RNA örnekleri kullanıldı. RNA elde edilirken kullanılan yöntemlerde genellikle DNA bulaşığı saptanır (140). İki farklı örnek arasında gözlenen farklı değerler, örneklerin DNA bulaşıklık seviyeleri arasındaki farklılıktan kaynaklanabilir (143). Bu nedenle elde edilen total RNA örnekleri DNase enzimi ile muamele edilerek DNA bulaşımı giderildi. Elde edilen RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ile derişimi ise UV spektrofotometresiyle tespit edildi. Miktar tayini işlemi DNase enzimi ile işlemiş 1 µg total RNA üzerinden sentezlenen cDNA ile gerçekleştirildi. cDNA sentezi için Ters Transkriptaz PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde özgün primerler ve 'Revers Transkriptaz' enzimi kullanılarak total RNA'dan cDNA elde edildi. Daha sonra real time PCR yöntemi ile gen ifade düzeyleri belirlendi. Her örnek için iki kez real time PCR reaksiyonu yapılarak sonuçlar kontrol edildi. Oluşan reaksiyon eğrileri ile her örneğin çoğalma döngüleri hesaplandı. Örnekler için anlık çoğaltımın başladığı eğriler tespit edildi. Hamarat gen ve hedef genler için real time PCR analiz sonuçları şekiller 8,9,10,11'de verilmiştir.

Her örnek için hedef gen CT (Threshold Cycle) ve hamarat gen CT değerleri tespit edilip ΔCT oranları hesaplandı (Roche Applied Science, Technical Note, No. LC 16/2005)

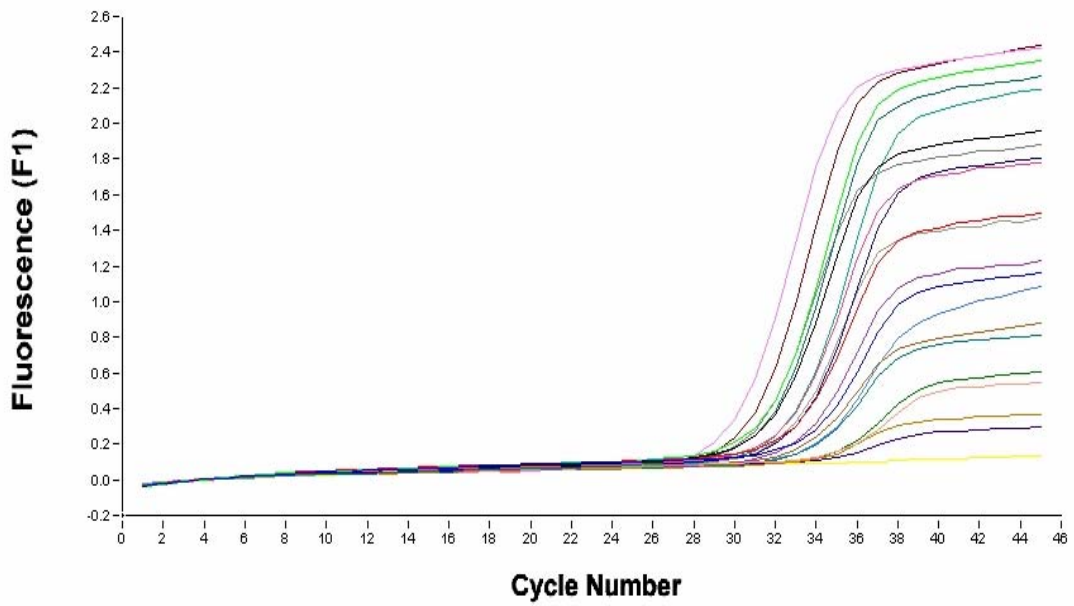
$$\Delta CT (\text{örnek}) = CT (\text{Hedef gen}) - CT (\text{hamarat gen})$$

Kopya sayısı = $(2^{\Delta CT} - 1) \times 100$, formülü ile hesaplandı.

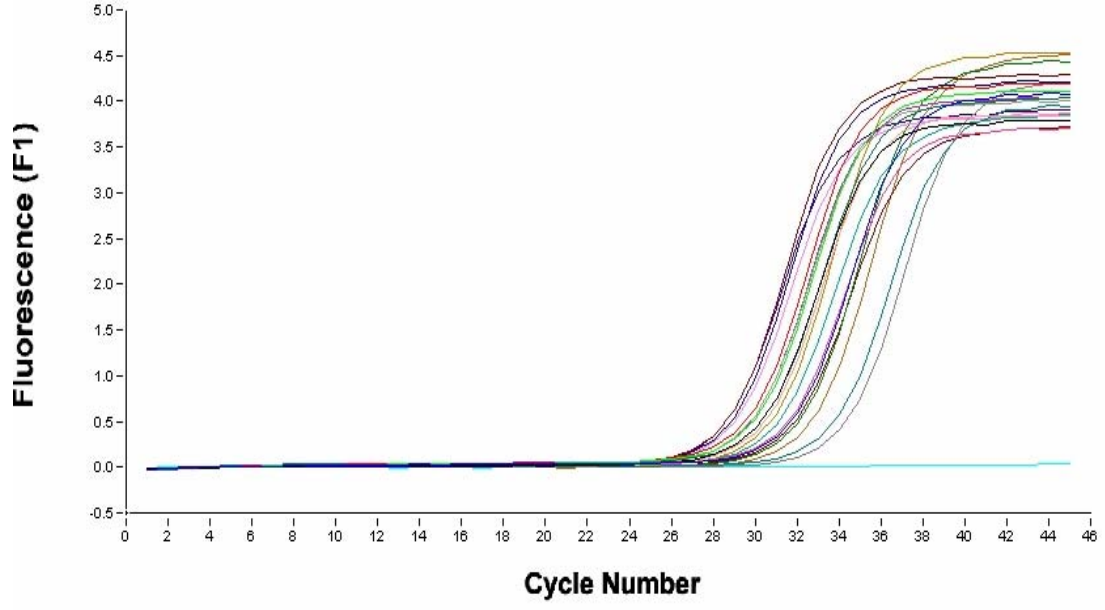
Tüm örneklerden elde edilen veriler Graphpad Instat istatistik programı kullanılarak Mann–Whitney U testi ile istatistiksel analizleri yapıldı. nNOS ifadesi hasta ve kontrol grubunda hiç ifade edilmemekteydi. iNOS ifadesi 40 hastanın kan örneğinde 12 hastanın BOS örneklerinde tespit edildi. Ancak kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P=0.5104$). eNOS ifadesi tüm hastaların kan ve BOS örneklerinde tespit edildi. Hasta ve kontrol arasında eNOS ifadesi anlamlı bir şekilde artmıştı ($P=0.0367$). Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu IL-10 gen ifadeleri arasında anlamlı bir fark tespit ettik ($P<0.0001$). Ayrıca BOS'a sızmış lokositlerdeki IL-10 gen ifadesi, hasta kanındaki IL-10 gen ifadesine göre belirgin bir şekilde artmıştı ($p<0.0001$). COX2 gen ifadesinin hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farkının tespit edemedik ($p=0.6478$). SOCS3 gen ifadesinde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edemedik ($P=0.3942$).



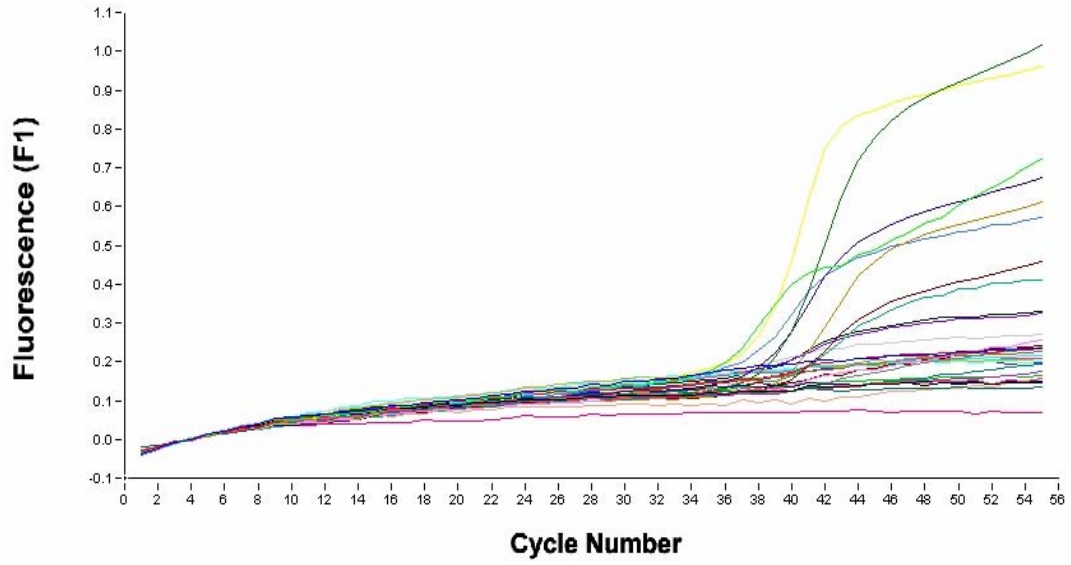
Şekil 4.4. Hamarat gen (HPRT) gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları. Farklı deneylemelerde hamarat gen ifadesinin değişimi gösterilmektedir.



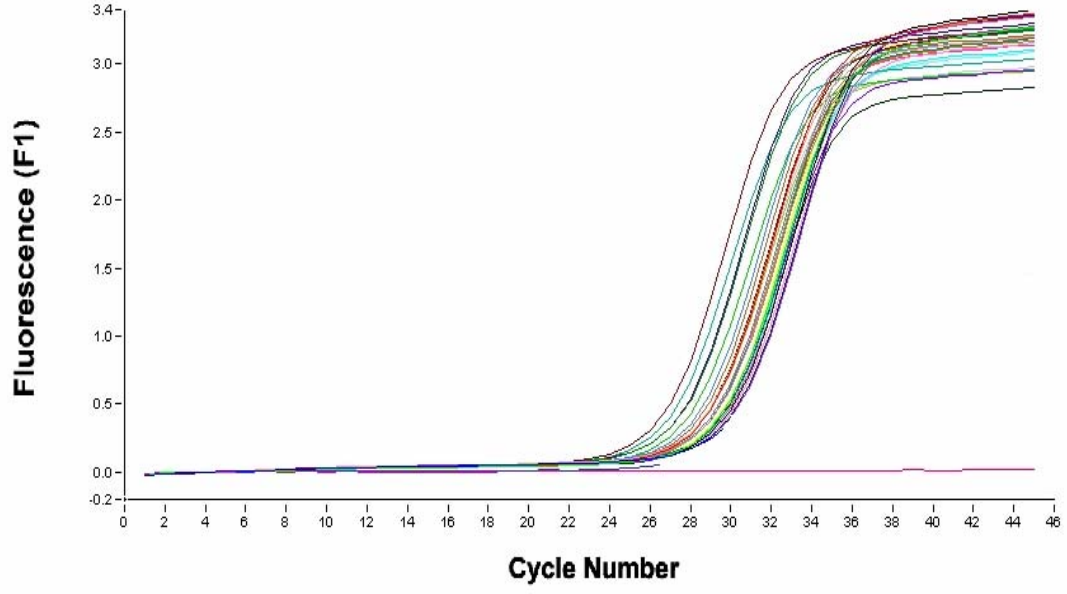
Şekil 4.5. eNOS gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları. eNOS gen ifadesi oldukça farklılık göstermektedir. Kimi örneklerde çok az ifade edilirken, bazılarında hamarat genler kadar ifade edilebilmektedir.



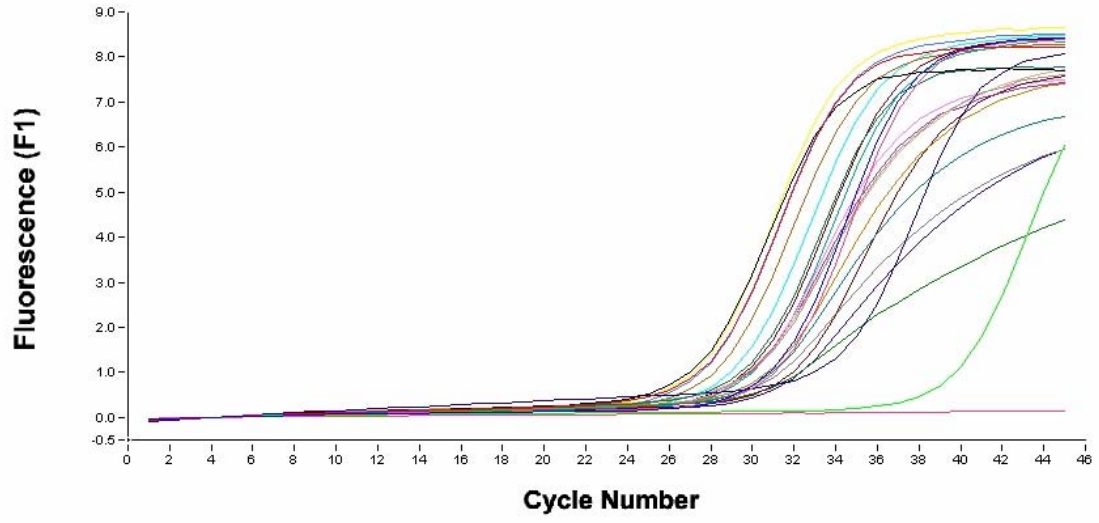
Şekil 4.6. IL-10 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları. Farklı deneymelerde IL-10 gen ifadesinin değişimi gösterilmektedir.



Şekil 4.7. iNOS gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları. iNOS gen ifadesi eğrilerden anlaşılacağı gibi hasta ve kontrollerde genelde çok az ifade edilmiştir.



Şekil 4.8. SOCS3 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları. SOCS3 gen ifadesi hamarat gen kadar veya daha fazla tüm hücrelerde ifade edilmektedir.



Şekil 4.9. COX2 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları. COX2 gen ifadesi çoğu örnekte hamarat gen kadar ifade edilmektedir.

Tablo 4.5. Menenjitli hastalar ile sağlıklı hastaların kan mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. nNOS ifadesi hasta ve kontrol grubunda hiç ifade edilmemekteydi. iNOS ifadesi 40 hastanın kan örneğinde ve kontrol grubundan 27 kan örneğinde tespit edildi. eNOS, IL-10, COX2 ve SOCS3 ifadesi tüm hastaların kan ve BOS örneklerinde tespit edildi.

iNOS [*]	Kontrol (n=27) Median (min-max)	Hastalar (n=40) Median (min-max)	P ^{**}
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	9.04 (1.52-13.19)	9.52 (1.52-12.71)	0.5104
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	0.19 (0.01-34.87)	0.14 (0.01-34.87)	0.5104
eNOS	Kontrol (n=64) Median (min-max)	Hastalar (n=61) Median (min-max)	P ^{**}
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	3.37 (0.62-6.71)	3.03 (0.14-10.44)	0.0367
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	9.64 (0.95-65.06)	12.24 (0.07-90.75)	0.0367
COX2	Kontrol (n=64) Median (min-max)	Hastalar (n=61) Median (min-max)	P ^{**}
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	0.55 (-2.23-4.38)	0.94 (-2.51-4.78)	0.6478
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	68.09 (4.80-469.13)	52.12 (3.63-569.62)	0.6478
SOCS3 ^{***}	Kontrol (n=64) Median (min-max)	Hastalar (n=61) Median (min-max)	P ^{**}
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	-0.59 (-3.27-2.82)	-0.56 (-3.67-5.80)	0.3942
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	151 (14.16-964.65)	147 (1.79-1272.90)	0.3942
IL-10	Kontrol (n=64) Median (min-max)	Hastalar (n=61) Median (min-max)	P ^{**}
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)} -$ $Ct \text{ (hamarat gen)}$	6.51 (3.09-12.62)	5.47 (-0.16-7.52)	<0.0001
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	1.10 (0.02-11.74)	2.26 (0.54-111.73)	<0.0001

* iNos gen ifadesi kontrollerde 27 bireyde, hastalarda da 40 bireyde gözlenmiştir.

** Mann-Whitney U testi

*** SOCS3'ün gen ifadesi kontrol ve hastalarda hamarat genden daha yüksek düzeyde ifade edilmiştir

Tablo 4.6. Menenjitli hastaların kan ve BOS örneklerindeki mRNA ifadelerinin karşılaştırılması. nNOS ifadesi hasta ve kontrol grubunda hiç ifade edilmemekteydi. iNOS ifadesi 40 hastanın kan örneğinde, 12 hastanın BOS örneğinde tespit edildi. BOS’da hasta grubu IL-10 ifadesi hasta kanına göre çok yüksek düzeyde ifade edilmiştir. COX2 ifadesi BOS’a sızan lokositlerde artmıştır.

iNOS	Hasta Kan (n=40) Median (min–max)	Hasta BOS (n=12) Median (min–max)	P*
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	9.52 (1.52-12.71)	8.15 (1.05-12.09)	0.6406
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	0.14 (0.01-34.87)	0.52 (0.01-48.30)	0.6406
eNOS	Hasta Kan (n=61) Median (min–max)	Hasta BOS (n=61) Median (min–max)	P*
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	3.03 (0.14-10.44)	3.05 (-1.65-5.98)	0.8218
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	12.24 (0.07-90.75)	12.07 (1.58-313.83)	0.8218
COX2	Hasta Kan (n=61) Median (min–max)	Hasta BOS (n=61) Median (min–max)	P*
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	0.94 (-2.51-4.78)	2.42 (-6.90-8.59)	0.0014
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	52.12 (3.64-569.62)	18.68 (0.25-11943)	0.0014
SOCS3	Hasta Kan (n=61) Median (min–max)	Hasta BOS (n=61) Median (min–max)	P*
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	-0.56 (-3.67-5,8)	-0.62 (-5.68-7)	0.6671
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	147.43 (1.80-1272.90)	164.72 (0.78-51625)	0.4798
IL-10	Hasta Kan (n=61) Median (min–max)	Hasta BOS (n=61) Median (min–max)	P*
$\Delta CT = Ct \text{ (Hedef gen)}$ $- Ct \text{ (hamarat gen)}$	5.47 (-0.16-7.52)	1.98 (-7.31-5.3)	<0.0001
Kopya sayısı = $2^{-\Delta CT}$	2.25 (0.54-112)	25.34 (2.54-15868)	<0.0001

* Mann–Whitney U testi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Menenjit, çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu, beyin zarlarını ve beyin dokusunu zedeleyen, beyin omurilik sıvısında hücrel ve biyokimyasal değişiklikler ve klinikte nörolojik bulgularla karakterize akut veya kronik gidişli iltihabi bir hastalıktır (1). Menenjit hastalığında, beyni çevreleyen meningeal zarlarda ve spinal kord'da iltihap gelişir (2). Bakteri, virus ve mantarlar gibi pek çok mikroorganizma menenjite yol açabilir (1). Menenjit çok sık olmamasına rağmen, sonuçları itibarı ile en ciddi mikrobik hastalıklardan biridir. Ölüm ve hastalığa tutulma sayısı çok yüksektir; her on olgudan biri kaybedilmekte ve yedi olgudan birinde sağırılık veya çeşitli beyin zedelenmeleri sonucu kalıcı hasarlara yol açmaktadır (2). Menenjitte bağışıklık yanıt kişiden kişiye farklılık göstermekte ve farklı şiddetlerde iltihap gelişmektedir. Buna bağlı olarak ölümler ve hastalık sonrası kalıcı bazı hasarların görülmesi kişiden kişiye farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmaya, menenjit tanısı almış 61 birey, menenjit geçirmemiş 64 birey alınmıştır. Menenjitli hastalardan 34 tanesi onsekiz yaş altı çocuk, 29 tanesi onsekiz yaş üstü yetişkin grubuydu. Çocuk grubunda, 24 bakteriyal menenjit, 4 tüberküloz menenjit, 6 viral menenjit tanısı almış hasta vardı. Yetişkin grubunda, 14 bakteriyal menenjit, 13 tüberküloz menenjit tanısı almış hasta vardı

Deneysel menenjitlerde bakterilerin sebep olduğu iltihap nedeni ile beyin omurilik sıvısına sızan lökositlerin beyin dokusunda zedelenme gelişimine katkıda bulunduğu, beyin ödemi ve kafa içi basıncı arttırdığı gösterilmiştir (146). Beyin omurilik sıvısına sızan lökositlerin, hastalığın gidişatı üzerinde önemli etkileri olmasında birçok moleküler mekanizmanın rolü vardır. Çalışmamızda özellikle bu moleküler mekanizmalardan bazılarının menenjitli hastalardaki ifadelerinin etkisini araştırmayı hedefledik. Çünkü bu moleküler mekanizmaların etkisi hastalığın gidişatını önemli bir şekilde etkilemektedir. Özellikle iltihabın şiddetini arttıran veya azaltan proteinlerin ifadesi hastalığın tanı ve tedavisinde önemli açılımlar sağlayabilir. Çalışmamızda, özellikle iltihabın şiddetini arttıran iNOS, eNOS, nNOS, COX2 gibi proteinlerin ve iltihabın şiddetini azaltan SOCS3, IL-10 gibi proteinlerin hem periferik kanda hem de beyin omurilik sıvısına sızan lökositlerde mRNA düzeyinde gen ifadeleri tayin edilerek bağışıklık yanıt değerlendirilmiştir.

İltihapta önemli moleküllerden birisi nitrik oksittir. Basit bir gaz olan nitrik oksit sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve dolaşım sistemi için önemli bir uyarı ileti moleküldür (16).

Steroid hormonlar gibi, NO'de, hedef hücresinin plazma zarından doğrudan difüzyon ile girebilir (17). NO, damar genişlemesi, konak savunması, hücresel çoğalma gibi birçok hücresel mekanizmalarda rol alır. Ancak yüksek miktarlarda NO dokular için zararlı bir özelliğe sahiptir (127).

NO, nitrik oksit sentetaz enzimleri (NOS) tarafından sentezlenir (19). Üç farklı izoenzim tespit edilmiş olup bunlar nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve tetiklenebilir NOS (iNOS) olarak sınıflandırılmıştır (18). Yapılan araştırmalarda bakteriyel menenjitli hastaların beyin omurilik sıvılarında ölçülen NO miktarının, viral menenjitli ve normal kişilerin BOS'una göre daha fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (18). Çalışmamızda, menenjitli hastaların hem tam kan örneklerinde hem de BOS'a geçmiş hücrelerde nitrikoksit sentetazların gen ifadelerini araştırdık. nNOS ifadesi hasta ve kontrol grubunda hiç ifade edilmemekteydi. Bu bulgu, nNOS gen ifadesi bakımından, periferik kanın kullanılmasının uygun olmadığını göstermektedir. iNOS ifadesi 40 hastanın kan örneğinde 12 hastanın BOS örneklerinde tespit edildi. Ancak kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P=0.5104$) (tablo-7). eNOS ifadesi tüm hastaların kan ve BOS örneklerinde tespit edildi. Hasta ve kontrol arasında anlamlı bir fark bulundu ($P=0.0367$) (tablo-7). eNOS'un hücre içi düzenlenmesi doğrudan NO üretimini etkilemektedir (127). eNOS ifadesinin artması NO üretiminin artmasına sebep olacağından menenjitli hastalarda eNOS ifadesinin önemli bir yeri olduğunu göstermektedir.

Deneyisel olarak oluşturulan bakteriyel menenjitli hayvan modellerinde NOS inhibitörlerinin kullanımından sonra beyin hasarı ve merkezi sinir sistemi karmaşık belirtilerinin daha çok arttığı, ölüm oranının ve hastalık şiddetinin arttığı gözlenmiştir (134). Hastalığın şiddetlenmesine özellikle NOS inhibitörlerinin seçici olmayıp tüm NOS'ları kısıtlaması nedeni ile konak savunması için önem taşıyan NO sentezinin tamamıyla engellenmesi neden olmaktadır (134). eNOS yetmezlikli farelerde yapılan deneyisel çalışmalarda normal tip farelere göre yangı ve merkezi sinir sistemi karmaşık belirtilerinin şiddetlendiği görülmüştür (24). Yaptığımız çalışma bu çalışmaları doğrular niteliktedir. Menenjitli hastalarda sağlıklı insanlara göre eNOS ifadesinin artması hastalık şiddetini azaltmasında önemli bir etken olarak değerlendirilebilir.

IL-10 bağışıklık yanıtı çok yönlü düzenleyen önemli bir bağışıklık baskılayıcı sitokindir (3). IL-10, iltihap oluşumu ile salgısal bağışık yanıt arasındaki düzenlemenin kontrolünde önemli rol oynar (3). Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu IL-10 gen ifadeleri arasında anlamlı bir fark tespit ettik ($P<0.0001$) (tablo-7). Menenjit

hastalarında IL-10 gen ifadesi ciddi bir şekilde artmıştı. Bu bulgu menenjitli hastalarda bulaşma sonucu gelişen bağışıklık yanıtın şiddetini azaltmak için IL-10'un etkin bir şekilde kullanıldığını göstermektedir. Ayrıca BOS'a sızmış lökositlerdeki IL-10 gen ifadesi hasta kanındaki IL-10 gen ifadesine göre belirgin bir şekilde artmıştı ($p<0.0001$) (tablo-7). Bu bulgu menenjit hastalığında hastalığın gidişatını önemli bir şekilde etkileyen hücresel olaylarda IL-10'un önemini ortaya koymaktadır. Çünkü deneysel çalışmalar beyin omurilik sıvısına sızan lökositlerin beyin dokusunda zedelenme gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir (146). Mikrop bulaşması sonrası oluşan hastalıkların iyileşmesi konağın etkene karşı oluşturabileceği koruyucu bağışık yanıtı bağlıdır. Örneğin bağışık yanıtın bozulduğu bağışıklık yetmezliği olan hastalarda mikrop bulaşması sonrası oluşan hastalıklar kontrol edilemez hale gelir. Bununla birlikte mikrop bulaşması sonrası oluşan hastalıklara karşı oluşabilecek şiddetli bağışıklık yanıtı, hastaya ciddi rahatsızlık verebilecek bölgesel veya sistemik doku yıkımlarını tetikleyebilir. IL-10, bağışıklık sisteminin önemli düzenleyici moleküllerinden biridir (3). Bu düzenlemeyi İnterlökin 1 beta (IL-1 β), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), granülosit makrofaj-koloni stimüle eden faktör (GM-CSF), inducible nitrik oksit sentetaz (iNOS) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) gibi öncü iltihap araçlarının salınımını kısıtlayarak yapar (4,5). Çalışmayı planlarken hedef olarak seçtiğimiz ve gen ifade düzeyinin artmasını beklediğimiz COX2, iNOS, SOCS3 gibi genlerin ifadelerinin kontrol grubuna göre farklı çıkmamasının sebebi artmış IL-10 gen ifadesinden dolayı olabilir. Bu genlerin ifadeleri muhtemelen IL-10 tarafından baskılanmakta ve bağışıklık yanıtının şiddeti azaltılmaya çalışılmaktadır (tablo-7).

IL-10, virüs, bakteri, mantar, protozoa ve helmit gibi etkenlerin neden olduğu hastalıklarda bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli anahtar rol oynamaktadır. Toksoplazma (77), Trypanosoma (78), Plasmodium (80), Mycobacterium (82), HSV (83) bulaşmalarında doku hasarına sebep olan aşırı Th1 ve sitotoksik T hücre cevabının baskılanmasında önemli bir etki göstermektedir. Yaptığımız çalışma insan beyin omurilik sıvısına sızan lökositlerin gen ifadesi düzeyinde araştıran ilk çalışmadır ve menenjit gibi bir bulaşma hastalığında IL-10 gen ifadesinin arttığını göstermektedir. Bu bulgu menenjit tedavi ve tanısında IL-10 ile ilgili ileri çalışmalara ışık tutabilir.

Yapılan çalışmalarda, insan çevresel kan hücreleri vücut dışında mitoz uyarıcılarına maruz bırakıldığında, bireyler arasında IL-10 üretebilme kapasiteleri arasında dikkate değer fark bulunmuştur (60). Genetik yapıya göre IL-10 üretim kapasitesi, yüksek, orta

ve düşük olarak sınıflandırılmıştır (40). IL-10 gen ifadesini, genin özendirici bölgesinde bulunan farklı gen çok yapılılıklarının (polimorfizm) etkilediği tespit edilmiştir (7).

IL-10 geni özendirici bölgesinde bulunan, -1082 (G/A), -819 (C/T) ve -592 (C/A) tek baz değişimleri sonucu GCC, ACC, ATA olarak belirlenen üç farklı haplotipin IL-10 üretimin seviyesinde etkili oldukları gösterilmiştir (7). Çalışmamızda IL-10 özendirici bölgesindeki bu üç farklı genotipin menenjit hastalığı ile ilgisini araştırdık. Ancak hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulamadık. Gen çokyapılılık araştırmalarına göre hasta sayımızın az olması sonuçlarımızı etkilemiş olabilir. Hasta ve kontrol sayısının artırılması bu sonuçları etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda hedef aldığımız bir diğer gen COX2 geniydi. COX prostaglandin sentezinin hız sınırlayıcı enzimidir (26). COX-2 mRNA ve proteini ise dokularda normal koşullarda ölçülemeyecek kadar az miktarda bulunan, büyüme faktörleri, mitojenler, sitokinler, endotoksinler, interlökinler gibi uyarılarla artarak, patolojik ve iltihabi süreçlerde rol oynayan bir enzimidir (27). COX2, araşidonik asit metabolizmasında önemli bir enzim olup iltihabın şiddetini arttırmaktadır. COX2 üreten hücreler prostoglandinler ve proanjiogenik proteinler üreterek apoptotik uyarıya direnç kazanırlar (27). Karen Robinson ve arkadaşları (147) tarafından yapılan bir çalışmada sağlıklı kişilerin kanlarını *Neisseria meningitidis* MSPs (Meningococcal secreted proteins) proteini ile muamele edip oluşan gen ifadeleri araştırılmıştır (147). Çalışma sonucunda ifade düzeyi en çok artan genin COX2 olduğu tespit edilmiştir (147). Yaptığımız çalışmada COX2 gen ifadesinin hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farkının olmadığını bulduk ($P=0.6478$) (tablo-7). BOS'a sızan lökositlerde hasta kanına göre COX2 ifadesi artmıştı ($P=0.0014$) (tablo-7). Çalışmamızın başında COX2 ifadesinin çok fazla artmasını beklemekteydik. Ancak IL-10 ifadesinin hasta grubunda yüksek olması COX2 ifadesinin artmasını engellemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışma deneysel çalışmalardan farklı olmasına rağmen insan menenjit hastalığında COX2 düzeyinin kontrol altında olduğunu göstermesi açısından önemli bir bulgudur.

SOCS proteinleri sitokinlerin bağışıklık sistemi üzerine etkilerini düzenleyen, önemli bir hücre içi proteinleridir (10). SOCS proteinlerinin keşfi, sitokin-JAK-STAT yolağının negatif olarak düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasını sağladı (11). Bununla birlikte KO fare çalışmalarında SOCS proteinlerinin pek çok immünolojik ve patolojik süreçte önemli görevler üslendiği tespit edildi (12). SOCS3 proteini yapımı, LPS'ye cevap olarak IL-6 ve IL-10 tarafından uyandırılır (12). Ancak SOCS3, IL-6 almasına

bağlandığından seçici olarak sadece IL-6 uyarısını baskılar (12). SOCS3 IL-10 almasına bağlanmadığından bu uyarıyı baskılamaz (12). SOCS3 geni silinmiş makrofaj ve nötrofillerde, LPS uyarısı ile oluşan ani iltihaba karşı direnç gözlenmiştir (12).

Çalışmamızda menenjitli hastalarda iltihabın şiddetini etkileyeceğini düşündüğümüz SOCS3 gen ifadesini araştırdık. Ancak hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edemedik ($P=0.3942$) (tablo-7).

Sonuç olarak,

1. Bu çalışma insan beyin omurilik sıvısına sızan lökositlerin gen ifadesi düzeyinde araştıran ilk çalışmadır.
2. İltihabın şiddetini etkileyen bağışıklık yanıtı son derece karmaşık ve bir çok mekanizmanın etkisi altındadır. Menenjit hastalığının klinik özelliklerini aydınlatıcı tanı yöntemleri üzerinde çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir.
3. Yaptığımız çalışmada menenjit hastalığında, iltihabın şiddetini etkileyebilecek bir takım moleküler mekanizmaların davranışını sergilemeye çalıştık. Özellikle menenjitte IL-10 gen ifadesinin gerek kan gerekse BOS'a sızan lökositler seviyesinde arttığı anlaşılmıştır.
4. Çalışma sonuçlarına göre SOCS3, COX2, iNOS ve nNOS gen ifadeleri kontrol grubuna göre farklılık göstermemekteydi. IL-10 ifadesindeki artışın iltihabın şiddetinde önemli etki eden iNOS ve COX2 gibi önemli iltihap öncüllerin ifadesinin sıkı kontrol altında tutulduğu anlaşılmıştır.
5. eNOS gen ifadesinin hasta periferik kanında kontrol grubuna göre artmış olduğunu tespit ettik. Menenjitli hastalarda sağlıklı insanlara göre eNOS ifadesinin artması iltihabi yanıt şiddetinin azaltılmasında IL-10 ile birlikte önemli bir etken olduğu bu çalışma ile ortaya çıkmıştır.
6. Menenjitli hastalarda, BOS'a sızmış lökositlerdeki COX2 ifadesi hastaların periferik kanına göre artmıştı. Yaptığımız çalışma deneysel çalışmalardan farklı olmasına rağmen insan menenjit hastalığında COX2 düzeyinin kontrol altında olduğunu göstermesi açısından önemli bir bulgudur.
7. Bir çok sitokin ve proteinler bölgesel etki göstermekte ve hemen yıkılmaktadır. mRNA düzeyinde gen ifadesi araştırmaları diğer moleküler ve serolojik çalışmalara önemli katkıda bulunabilmektedir. Bu ön çalışma ile hedef proteinlerin genomik ve gen ifadesi düzeyinde bakılması yöntemi oturtulmuştur. Bu yöntemin rutin olarak tanı ve tedavi sonrası takipde kullanılabilecek deneyim laboratuvarımıza kazandırılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Oktar M, Kliniğimizde Son Altı Yıldır İzlenen Menenjit Olgularının Değerlendirilmesi. 2006, Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık tezi, 62 sayfa, İstanbul, (Doç. Dr. Turan ASLAN).
2. Karna G, Ceyhan M, Kara A., Menenjit I etiyopatogenezi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2003; 46: 57-66.
3. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. Transplantation 2003; 15:711-7.
4. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001; 19: 683.
5. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991; 174: 1209.
6. Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors – a twin study. Genes Immu 2002; 3: 407–413.
7. Plothow A, Benvenuto R, Contieri FLC, Bicalho MG. Frequencies at Three Polymorphic Sites of Interleukin-10 Gene Promoter in Brazilian Renal Recipients. Transplantation Proceedings 2003; 35: 2908–2910.
8. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alpha. Hepatology 1999; 30: 526.
9. Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, Bella A, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. Thorax 2003; 58: 154–156.
10. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. Annu Rev Immunol 2004; 22:503-529.
11. Yoshimura A, Nishinakamura H, Matsumura Y, Hanada T, Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins, Arthritis Research Therapy 2005; 7 : 100-10

12. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:143- 164.
13. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999; 18: 1309-1320.
14. Giordanetto F, Kroemer RT. A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). *Protein Eng* 2003; 16:115-124.
15. Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K, Behrmann I, Tsiaris W, Sasaki A, Schneider-Mergener J. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 2003; 278:661-671.
16. M.Sakızlı, N.Atabet. Hücre: Moleküler Yaklaşım, üçüncü baskı, İzmir kitapevi, İzmir, 2006
17. Bachofen K, Kuhn A. The rol of nitric oxide. *Rheumatology* 2006; 45:17-19.
18. Leib SL, Kim YS, Black SM, Tureen JH, Tauber MG. Inducible nitric oxide synthase and the effect of aminoguanidine in experimental neonatal meningitis. *J Infect Dis* 1998;177:692–700.
19. Buster BL, Weintrob AC, Townsend GC, Scheld WM. Potential role of nitric oxide in the pathophysiology of experimental bacterial meningitis in rats. *Infect Immun* 1995; 63:3835–39.
20. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411:217–30.
21. Burgner D, Rockett K, Kwiatkowsk D. Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child* 1999; 81:185–188
22. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2001; 10: 907-916.
23. Amaee FR, Comis SD, Osborne MP, Drew S, Tarlow MJ. Possible involvement of nitric oxide in the sensorineural hearing loss of bacterial meningitis. *Acta Otolaryngol* 1997; 117:329–36.
24. Staudt LM. Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system. *Trends Immunol* 2001; 22:35–40.

25. Saygılı G. Kolorektal Karsinomlarda Siklooksijenaz-2 (COX-2) Enziminin Boyanma Paterni ve Yaygınlığının Prognostik Parametrelerle Karşılaştırılması. 2007, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık tez,i 78 sayfa, İstanbul, (Doç.Dr.Fevziye Kabukcuoğlu).
26. Ishikawa TO, Jain N, Herschman HR., Feedback regulation of cyclooxygenase-2 transcription ex vivo and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 16:534-8.
26. Timoty H, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 7384-8.
27. Vatansever NT. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniğinde Yatırılarak İzlenen Menenjitli Olguların Değerlendirilmesi. 2006, Sağlık Bakanlığı Tepecik Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, 93 sayfa, İzmir, (Doç.Dr.Şükran Köse).
28. Uzun Ö. Nasıl Tedavi Edelim, Akut Bakteriyel Menenjit, *Hacettepe Tıp Dergisi* 2001; 32: 260-271.
29. Altay G. Akut Bakteriyel Menenjitler. Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M. (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2002: p.991-07.
30. Karakartal G. Santral sinir sistemi enfeksiyonlarına genel bakış. Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: p.873.
31. Tunkel AR, Kaufman BA, Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Sixth ed., New York, Churchill Livingstone, 2005, 1126-1131.
32. Sadigh M, Gardner P, Leipzig TJ, Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. Infectious Diseases Third ed. Philadelphia, Lippicott Williams & Wilkins 2004; 1303-1307.
33. Kriss TC, Kris VM, Worf BC. Recurrent meningitidis. *Pediatr Infect Dis J*. 1995; 14: 697-700
34. Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Annu Rev Med*. 1993; 44: 103-20.
35. Krugman S, Katz SL, Gershon AA, Wilfert CM. Infectious Diseases of Children. Ninth Edition 1992; 14: 246-59.
36. Erol S, Çetin K. Bakteriyel menenjitlerde inflamatuvar mekanizmalar. *Flora* 2001; 6: 22-29.

37. Kurt H. Akut bakteriyel menenjitler. Flora 1996; 3: 177-87.
38. Kanra G, Akalın E. Akut Bakteriyel İnfeksiyonlara Yaklaşım. Güneş Kitabevi, Ankara, 1993: p.44-65.
39. Betts RF, Chapman WS, Penn RL. 5. baskı. Merkezi sinir sistemi infeksiyonları. İnfeksiyon Hastalıklarına Pratik Yaklaşımlar, 2005: p.169-80.
40. Baum SG, Koll B., Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. Infectious Diseases. Third ed. Philadelphia, Lippicott Williams & Wilkins, 2004: 1286-92.
41. Sawyer MH., Enterovirus infections: diagnosis and treatment. Pediatr Infect Dis J 1999; 18: 1033-45.
42. James DC, Ralph DF, James DC. Textbook of Pediatric Infectious Diseases 1987; 478-83.
43. Arısoy ES, Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitapevleri, 2002; 1007-14.
44. Haas DW, Prez R MD, Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and practice of infectious disease. New York, Churchill Livingstone 1995; 2213.
45. Kent SJ, Crove SM, Yung A, Lucas CR, Mijch AM. Tuberculous meningitis. Clin Infect Dis 1993; 17: 897.
46. Berenguer J, Moreno S, Laguna F. Tuberculous meningitis in patients infected with the human immunodeficiency virus. N Engl J Med 1992; 326: 668.
47. Erol S, Kaya A, Yılmaz Ş. Tüberküloz menenjitte beyin omurilik sıvısında antijen 60'a karşı oluşan Ig G antikorlarının tanı değeri. Flora 1998; 3: 248-52.
48. Bonington A, Strang JIG, Klapper PE, Use of Roche Amplikor Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 1998; 36: 1251-54.
49. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp. Med. 1989; 170:2081-95.
50. Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. J Immunol 2000; 165: 292.
51. Cartwright NH, Demaine AG, Hurlock NJ, Cytokine secretion in mixed lymphocyte culture: a prognostic indicator of renal allograft rejection in addition to HLA mismatching. Transpl Immunol 2000; 8: 109.

52. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 565.
53. Westendorp RGJ, Langermans JAM, Huizinga TWJ. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 170.
54. Fortis C, Foppoli M, Gianotti L. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumors. *Cancer Lett* 1996; 104: 1.
55. Koss K, Satsangi J, Fanning GC. Cytokine (TNF α , LT α and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000; 1: 185.
56. Reich K, Garbe C, Blaschke V. Response of psoriasis to interleukin- 10 is associated with suppression of cutaneous type 1 inflammation, downregulation of the epidermal interleukin-8/CXCR2 pathway and normalization of keratinocyte maturation. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 319.
57. Lim S, Crawley E, Woo P. Haplotype associated with low interleukin- 10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 1998; 352: 113.
58. Kube D, Rieth H, Eskdale J, Kremsner PG, Gallagher G. Structural characterisation of the distal 50 flanking region of the human interleukin-10 gene. *Genes Immu* 2001; 2: 181– 190.
59. Lazarus R, Klimecki WT, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Brown A, Martinez F, Weiss ST. Single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene: differences in frequencies, linkage disequilibrium patterns, and haplotypes in three United States ethnic groups. *Genomics* 2002; 80: 223–228.
60. Cartwright NH, Demaine A, Jahromi M. A study of cytokine protein secretion, frequency of cytokine expressing cells and IFN- γ gene polymorphisms in normal individuals. *Transplantation* 1999; 68: 1546.
61. Turner DM, Williams DM, Sankaran D. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1.
62. Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, Seitzer U, Kothe H, Maass M, Zabel P, Dalhoff K. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Resp Crit Care Med* 2003; 168: 476–480.
63. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A , Webster NR. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin- 10 expression and survival in critically ill patients. *Crit. Care Med* 2003; 31: 34–38.

64. Ates Ö, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarıkaya A., Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α Gene Polymorphisms in Tuberculosis, *J Clin Immunol* 2007; 28: 232-236.
65. Helminen M, Lahdenpohja N, Hurme M, Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein–Barr virus infection. *J Infect Dis* 1999; 180: 496–499.
66. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 929–79.
67. Walter MR. Structural analysis of IL-10 and type I interferon family members and their complexes with receptor. *Adv Protein Chem* 2004; 68: 171–223.
68. Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 1990; 250: 830–32.
69. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coff man RL, O’Garra A. Interleukin- 10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683–765.
70. Hawrylowicz CM., O’Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 271-283.
71. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10- deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263–74.
72. Sundstedt A, Hoiden I, Rosendahl A, Kalland T, van Rooijen N, Dohlsten M. Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol* 1997; 158: 180–86.
73. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 2003; 24: 36–43.
74. Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 3–15.
75. Mege JL, Meghari S, Honstettre A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:557-69.
76. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 2002; 23: 89–96.
77. Gazzinelli RT, Wysocka S, Hieny T, Scharton-Kersten A, Cheever R, Kuhn W , Muller G, Trinchieri A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4-T cells

- and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- β . J Immunol 1996; 157: 798–805.
78. Hunter CA, Ellis-Neyes T, Slifer S, Kanaly G, Grunig M, Fort D, Rennick FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 1997; 158: 3311–3316.
 79. Magez S, Stijlemans G, Caljon HP, De Baetselier P. Control of experimental *Trypanosoma brucei* infections occurs independently of lymphotoxin- induction. Infect Immun 2002; 70: 1342–1351.
 80. Grau GE, Fajardo PF, Piguet B, Allet PH, Lambert P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. Science 1987; 237: 1210–1212.
 81. Rudin W, Favre N, Bordmann G, Ryffel B. Interferon- γ is essential for the development of cerebral malaria. Eur. J. Immunol 1997; 27: 810–815.
 82. Bekker LG, Maartens G, Steyn L, Kaplan G. Selective increase in plasma tumor necrosis factor alfa and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. J Infect Dis. 1998; 178: 580–584.
 83. Suvas S, Azkur AK, Kim BS, Kumaraguru U, Rouse BT. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. J Immunol 2004; 172: 4123–4132.
 84. Li C, Corraliza I, Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. Infect Immun 1999; 67: 4435–4442.
 85. Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alfa and exacerbated by anti-transforming growth factor- β antibodies. Infect. Immun 2003; 71: 4850–4856.
 86. Roque S, Nobrega C, Appelberg R, Correia-Neves M, IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Mycobacterium avium* infection and influences efficacy of antibiotic therapy. J. Immunol 2007; 178: 8028–8035.
 87. Groux H, Cottrez F, Rouleau M, Mauze S, Antonenko S, Hurst S, McNeil T, Bigler M, Roncarolo MG, Coffman RL. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. J Immunol 1999; 162: 1723–1729.

88. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukocyte Biol* 2006; 80: 1298–1307.
89. Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001; 166: 1141–1147.
90. Balcewicz-Sablinska MK, Gan H, Remold HG. Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with *Mycobacterium avium* attenuates mycobacteria- induced apoptosis by reduction of TNF- α activity. *J Infect Dis* 1999; 180: 1230–1237.
91. Sakaguchi S., Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self., *Nat. Immunol.*, 2005, 6: 345–352.
92. Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, Sher A. Bacteria-triggered CD4+ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med* 2002; 196: 505–515.
93. Nicola NA: *Guidebook to Cytokines and Their Receptors*. Oxford: Oxford University Press; 1994.
94. Ihle JN. Cytokine receptor signaling. *Nature* 1995; 377: 591-594.
95. Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 410-416.
96. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* 1995; 14:2816-2826.
97. Ram PA, Waxman DJ. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 1999; 274:35553-35561.
98. Seki Y, Hayashi K, Matsumoto A, Seki N, Tsukada J, Ransom J, Naka T, Kishimoto T, Yoshimura A, Kubo M. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13003-13008.
99. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002; 277:42394-42398.
100. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of

insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004; 24:5434-5446.

101. Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 98:9324-9329.

102. Takahashi Y, Carpino N, Cross JC, Torres M, Parganas E, Ihle JN. SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *EMBO J* 2003; 22:372-384.

103. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 2003; 4:551-556.

104. Kimura A, Kinjyo I, Matsumura Y, Mori H, Mashima R, Harada M, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A. SOCS3 is a physiological negative regulator for granulopoiesis and G-CSF receptor signaling. *J Biol Chem* 2004; 297:6905-6910.

105. Croker BA, Metcalf D, Robb L, Wei W, Mifsud S, DiRago L, Cluse LA, Sutherland KD, Hartley L, Williams E. SOCS3 is a critical physiological negative regulator of G-CSF signaling and emergency granulopoiesis. *Immunity* 2004; 20:153-165.

106. Egan PJ, Lawlor KE, Alexander WS, Wicks IP, Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis and T cell activation. *J Clin Invest* 2003; 111:915-924.

107. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1781-1788.

108. Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, Kobayashi H, Park SJ, Saeki Y, Kitamura Y. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2002; 196:979-990.

109. Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K. SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses. *Nat Med* 2003; 9:1047-1054.

110. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:503–529.
111. Crespo A, Filla MB, Russell SW, Murphy WJ. Indirect induction of suppressor of cytokine signalling-1 in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide: partial role of autocrine/paracrine interferon- alpha/beta. *Biochem J* 2000; 349:99–104.
112. Dalpke AH, Oppen S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol* 2001; 166: 7082–7089.
113. Ji KA, Yang MS, Jou I, Shong MH, Joe EH. Thrombin induces expression of cytokine-induced SH2 protein (CIS) in rat brain astrocytes: involvement of phospholipase A2, cyclooxygenase, and lipoxygenase. *Glia* 2004; 48:102–111.
114. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW, Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 1999; 98:597–608.
115. Gatto L, Berlatto C, Poli V, Tininini S, Kinjyo I, Yoshimura A, Cassatella MA, Bazzoni F. Analysis of SOCS-3 promoter responses to interferon gamma. *J Biol Chem* 2004; 279:13746–13754.
116. Dalpke AH, Oppen S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol* 2001; 166:7082–7089.
117. Crespo A, Filla MB, Russell SW, Murphy WJ. Indirect induction of suppressor of cytokine signalling-1 in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide: partial role of autocrine/paracrine interferon- alpha/beta. *Biochem J* 2000; 349:99–104.
118. Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH. Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia* 2004; 48:197–206.
119. Yang M, Min K, Joe E. Multiple Mechanisms That Prevent Excessive Brain Inflammation. *Journal of Neuroscience Research* 2007; 85: 2298–2305.
120. Federici M, Giustizieri ML, Scarponi C, Girolomoni G, Albanesi C. Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol* 2002; 169:434–442.

121. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S, Lu KP. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 2003; 12:1413–1426.
122. Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, Mori H, Aki D, Ohishi M, Yoshida H, Kubo M, Yoshimura A. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* 2002; 17:583–591.
123. Yang MS, Lee J, Ji KA, Min KJ, Lee MA, Jou I, Joe E. Thrombin induces suppressor of cytokine signaling 3 expression in brain microglia via protein kinase Cdelta activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317:811–816.
- 124.. Koedel UR, Paul FW, Kastenbauer S, Huang HW. Lack of Endothelial Nitric Oxide Synthase Aggravates Murine Pneumococcal Meningitis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2001; 60: 1041-1050.
125. Mayhan WG. Inhibition of nitric oxide synthase does not alter basal permeability of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2000; 855:143–49.
126. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 323–350.
127. Tochio H, Ohki S, Zhang Q, Li M, Zhang M. Solution structure of a protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Nature Structural Biol* 1998; 5: 965–969.
128. Mori N. Expression of human inducible nitric oxide synthase gene in T-cell lines infected with human T cell leukemia virus type I and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1999; 94: 2862–2870.
129. Shoda LKM. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor- α and nitric oxide. *Infect Immun* 2001; 69: 2162–2171
130. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 66–75.
131. William D, David L, Michael G. Cyclooxygenases : structural, cellular and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry* 2000; 69: 145-181.
132. Schafer AI. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol* 1995; 35: 209-219.
133. Zambraski EJ, The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function :experimental studies in animals. *Semin. Nephrol* 1995;15: 205-213.

134. Timoty H, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 7384-8.
135. Binnicker, MJ, Williams RD, Apicella MA. Infection of human urethral epithelium with *Neisseria gonorrhoeae* elicits an upregulation of host anti-apoptotic factors and protects cells from staurosporine-induced apoptosis. *Cell Microbiol* 2003; 5: 549–560.
136. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos K, Nathan K, Tomsik J, Elton S, Simmons L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS* 2002; 99: 13926–13931.
137. Feng YX, Yoshimura T, Wilson CB. Modulation of neutrophil influx in glomerulonephritis in the rat with anti-macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) antibody. *J Clin Invest* 1995; 95: 1009–1017.
138. Ogorochi T, Narumiya S, Mizuno N, Yamashita K, Miyazak H, Hayaishi O. Regional distribution of prostaglandins D2, E2, and F2 alpha and related enzymes in postmortem human brain. *J Neurochem* 1984; 43: 71–82.
139. Strauss KI, Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. *Brain Behavior and Immunity* 2008; 22: 285–298
140. Kızılyer A. Matriks Gla Protein (Mgp) Geni Çokyapılılığının Böbrek Taşı Hastalarında Araştırılması. 2007, Yüksek Lisans Tezi, 61 sayfa, Gaziantep Üniversitesi, (Prof.Dr.Ahmet Arslan).
141. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6: 995- 1001.
142. Bustin SA, Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-93.
143. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K. The real-time polymerase chain reaction . *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.
144. Günel T, Gen Anlatımının Kantitatif Analizi, Real-Time PCR. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007; 27:763-767
145. Bouzin C, Clotman F, Renauld JC, Lemaigre FP, Rousseau GG. The oncut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6 controls B lymphopoiesis in fetal liver. *J Immunol* 2003; 171: 1297-303.
146. Tuomanen EI, Saukkonon K, Sande S, Cioffe C, Wright SD. Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated

with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 959-968.

147. Robinson K, Taraktsoglou M, Kherie SJ, Rowe KG. Secreted proteins from *Neisseria meningitidis* mediate differential human gene expression and immune activation. *Cellular Microbiology* 2004; 6: 927–938.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Gaziantep’de doğdu. İlk ve orta öğretiminden sonra girmiş olduğu İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünü 1993 yılında bitirdi. Daha sonra 1995 yılında İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 1998 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji laboratuvarında uzman olarak göreve başladı. 2004 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Tıbbi Biyoloji ve Genetik doktora programına başladı. Halen Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Merkez Laboratuvarı Moleküler Genetik Tanı ve Hematoloji Laboratuvarında uzman kadrosunda görev yapmaktadır. Evli ve iki çocuğu vardır.