

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'* E AİT
ESAT-6 VE CFP-10 PROTEİNLERİNİN
EKSPRESYONU,
FARKLI HASTA GRUPLARINDA IFN- γ VE IL-10
YANITLARININ SAPTANMASI**

Dr. HÜSEYİN ÇOBAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR – 2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'* E AİT
ESAT-6 VE CFP-10 PROTEİNLERİNİN
EKSPRESYONU,
FARKLI HASTA GRUPLARINDA IFN- γ VE IL-10
YANITLARININ SAPTANMASI**

Dr. HÜSEYİN ÇOBAN

Tez Danışmanı

Doç.Dr. NURAN ESEN

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2005.KB.SAG.021 sayı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Asistanlığım boyunca eğitimimde ve tezimle ilgili çalışmalarımda bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Doç.Dr. Nuran Esen'e, eğitimime katkılarından dolayı başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Hakan Abacıoğlu olmak üzere tüm değerli hocalarıma, aynı çalışma ortamını paylaşmaktan dolayı mutluluk duyduğum tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tezimle ilgili yardımlarından dolayı Yard. Doç. Dr. Mehmet Ali Öktem ve Araş. Gör. Hakan Baydur'a, hastalara ulaşmam konusunda değerli katkılarını esirgemeyen, Uzm.Dr. Ayriz Tuba Gündüz, Dr. Yelda Varol, Doç.Dr. Kadir Bacakoğlu, Öğr.Gör.Uzm.Dr. Ömer Demir, Dr. Özge Hatice Kuştutan ve Doç.Dr. Rıfat Özacar' a teşekkürlerimi sunarım.

Verdiği destek ve anlayış için sevgili babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	vii
RESİM LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. TÜBERKÜLOZ HASTALIĞININ TARİHÇESİ	5
4.2. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> 'İN TAKSONOMİSİ	8
4.3. TÜBERKÜLOZ HASTALIĞININ İMMÜNO-PATOGENEZİ.....	10
4.3.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in konak hücrelerine tutunmak için kullandığı reseptörler	10
4.3.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in konak hücrelerine tutunmak için kullandığı reseptörlerin enfeksiyon sürecine etkisi	11
4.3.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in sahip olduğu virulans faktörleri.....	12
4.3.4. Konak savunma mekanizmaları.....	14
4.3.4.1. Doğal bağışık yanıt.....	14
4.3.4.2. Edinilmiş bağışık yanıt	19
4.3.5. Konak bağışıklık sistemi ve tüberküloz basilinin etkileşimi	22
4.4. GEN KLONLAMA	22
4.4.1. Restriksiyon enzimlerinin seçimi	24
4.4.2. DNA ligasyonu.....	26
4.4.3. Transformasyon	27
4.4.4. Kolonilerin seçimi	27
4.4.5. Klonlamanın doğrulanması	27

4.4.6. Ekspresyon sisteminin belirlenmesi	28
4.4.7. Bakteriyel ekspresyon sistemleri	28
4.4.8. Ekspresyon vektörleri	28
4.4.9. Protein ekspresyonu.....	30
4.4.10. Proroteın ekspresyonunun kanıtlanması.....	31
4.4.10.1. SDS-PAGE	31
4.4.10.2. Western blotlama yöntemi.....	32
4.4.10.3. Koloni blotlama yöntemi	32
4.4.10.4. Dot-Blot yöntemi.....	32
4.4.11. Proteinlerin saflaştırılması.....	32
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
5.1. GEREÇ	35
5.1.1. Çalışma grubu.....	35
5.1.2. Ayraçlar	35
5.1.3. Ekipman.....	44
5.2. YÖNTEM	46
5.2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv suşuna ait DNA'nın eldesi.....	46
5.2.2. Protein kodlayan gen bölgesinin PZT ile çoğaltılması.....	46
5.2.3. pQE30 vektörünün saflaştırılması	48
5.2.4. PZT ürünlerinin saflaştırılması	49
5.2.5. Restriksiyon enzimleri ile kesim	49
5.2.6. Ligasyon	50
5.2.7. CaCl ₂ ile kompetan <i>Escherichia coli</i> hücrelerinin hazırlanması	50
5.2.8. Kompetan <i>Escherichia coli</i> hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu	50
5.2.9. Transformasyon sonrası üreyen kolonilerin yeni besiyerine inokülasyonu	51
5.2.10. Seçilen kolonilerden DNA eldesi	51
5.2.11. Dizileme primerleri kullanılarak elde edilen PZT ürünlerinin dizi analizi	51
5.2.12. Proteinlerin saflaştırılması.....	52

5.2.13. SDS-PAGE için örneklerin ve jelin hazırlanması	54
5.2.14. SDS-PAGE ve Western blotlama	56
5.2.15. Protein yoğunluklarının belirlenmesi	59
5.2.16. Protein preparatındaki endotoksin yoğunluğunun belirlenmesi	60
5.2.17. Heparinize kan örneklerinin toplanması ve antijenle uyarılması	60
5.2.18. Hücre kültürü ve plazmaların saklanması	61
5.2.19. IFN- γ ve IL-10 düzeylerinin plak ELISA yöntemi ile ölçülmesi	61
5.2.20. İstatistiksel analizler	62
6. BULGULAR	64
6.1. Plak ELISA yöntemi ile ölçülen sitokin düzeyleri	64
7. TARTIŞMA	84
7.1. SONUÇ	90
8. KAYNAKLAR	92
EK – 1 Etik kurul onayı	105
EK – 2 Sağlıklı kontrol grubu gönüllü bilgilendirme formu	106
EK – 3 Hasta grubu gönüllü bilgilendirme formu	107

TABLO LİSTESİ

Tablo 1	: TLR'ler ve ligantları	18
Tablo 2	: Restriksiyon enzimlerinin farklı tipleri ve çeşitli özellikleri	24
Tablo 3	: Grupların yaş ve cinsiyet dağılımları	66
Tablo 4	: Birinci Kontrol grubunun sitokin değerleri.....	67
Tablo 5	: İkinci Kontrol grubunun sitokin değerleri.....	68
Tablo 6	: İyileşen tbc hastalarının sitokin değerleri ve klinik verileri.....	69
Tablo 7	: Fibronodüler lezyonu olan hastaların sitokin değerleri ve klinik verileri	70
Tablo 8	: Plevral efüzyonu olanlar hastaların sitokin değerleri ve klinik verileri	71
Tablo 9	: Kaviter lezyonu olan hastaların sitokin değerleri ve klinik verileri.....	72
Tablo 10	: Çoklu kaviter lezyonu olan hastaların sitokin değerleri ve klinik verileri	73
Tablo 11	: Milier tutulumu olan hastaların sitokin değerleri ve klinik verileri	73
Tablo 12	: Nükseden tbc hastalığı olanların sitokin değerleri ve klinik verileri	73
Tablo 13	: Tedaviye ihtiyacı olan hastaların sitokin değerleri ve klinik verileri.....	74
Tablo 14	: Grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık testi sonuçları.....	79
Tablo 15	: Korelasyon analizi sonuçları	83
Tablo 16	: Çoklu doğrusal regresyon analizi sonuçlarının beta katsayı değerleri ve p değerleri	83

RESİM LİSTESİ

Resim 1	: Kolombia “Casa del Marqués de San Jorge” arkeoloji müzesinde bulunan mumya ve bilgisayarlı tomografi görüntüsü.....	6
Resim 2	: İtalya’nın Trieste kentindeki Pineta del Carso sanatoryumunda, temiz hava ve iyi beslenme koşulları sağlanan tüberküloz hastaları	7
Resim 3	: ESAT-6 ve CFP-10’a ait PZT ürünleri	48
Resim 4	: ESAT-6 ve CFP-10’a ait olası transforme kolonilerden elde edilen PZT ürünleri	51
Resim 5	: ESAT-6 ve CFP-10’a ait SDS-PAGE jel ve Western blotlama sonuçları	58
Resim 6	: Hastaların gruplandırılmasını sağlayan radyolojik bulgular	65

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki	9
Şekil 2	: Hücresel, sıvısal ve regülatör yanıtın ortaya çıkışı	21
Şekil 3	: PZT ürününün vektöre klonlanması ve konak hücrelerde çoğaltılması	23
Şekil 4	: <i>SacI</i> , restriksiyon enziminin kesim özelliği	25
Şekil 5	: <i>HincII</i> restriksiyon enziminin tanıma bölgesi	26
Şekil 6	: Akrilamit ve polimerleşen zincirin çapraz bağlarını sağlayan metilen-bis-akrilamit	31
Şekil 7	: 6-His tag taşıyan proteinler ile Ni-NTA agaroz etkileşimi	33
Şekil 8	: PQE30 ekspresyon vektörü	49
Şekil 9	: ESAT-6 ve CFP-10 taşıyan ekspresyon vektörlerine ait DNA dizi analizi sonuçları ve beklenen translasyon ürünlerinin aminoasit dizileri	52
Şekil 10	: ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin moleküler büyüklük hesaplaması	59
Şekil 11	: ESAT-6 ve CFP-10 protein preparatlarının yoğunlukları	59
Şekil 12	: OD ölçüm sonuçları kullanılarak sitokin değerlerinin hesaplandığı standart eğrileri	63
Şekil 13	: Birinci kontrol grubu ile karşılaştırılan sitokin yanıtı ortalamaları ve yaygınlık ölçütleri	77
Şekil 14	: İkinci kontrol grubu ile karşılaştırılan sitokin yanıtı ortalamaları ve yaygınlık ölçütleri	78
Şekil 15	: Sitokin yanıtları ile elde edilen ROC eğrileri	82

KISALTMALAR

A	: Adenin
AIDS	: “ <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> ”
AP	: “ <i>Alcaline Phosphatase</i> ”, Alkalen Fosfataz
BCG	: “ <i>Bacillus Calmette-Guerin</i> ”
C	: Sitozin
CD	: “ <i>Cluster of Differentiation</i> ”
CFP-10	: “ <i>Culture Filtrate Protein-10</i> ”
CR	: “ <i>Complement Receptor</i> ”
DC-SIGN	: “ <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular-adhesion-molecule-Grabbing Non-integrin</i> ”
Dectin	: “ <i>Dendritic Cell-associated C-type Lectin</i> ”
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: “ <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ”
EMB	: Etambutol
ESAT-6	: “ <i>Early secreted antigenic target-6</i> ”
FcεR	: “ <i>Fragment constant epsilon Receptor</i> ”
FGF-β	: “ <i>Fibroblast Growth Factor-beta</i> ”
GFP	: “ <i>Green fluorescent protein</i> ”
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
G	: Guanozin
HEK293	: “ <i>Human embryonic kidney cell line-293</i> ”
IFN-γ	: İnterferon-γ
IL-10	: İnterlökin-10
IPTG	: “ <i>Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i> ”
IRAK	: “ <i>IL-1 Receptor Associated Kinase</i> ”

JNK	: “ <i>c-Jun N-Terminal Kinaz</i> ”
INH	: İzoniazid
iNOS-2	: İndüklenebilir Nitrikoksit Sentaz-2
KBB	: Kulak - Burun - Boğaz
Langerin	: “ <i>Langerhans Cell-associated C-type Lectin</i> ”
LAM	: Lipoarabinomannan
LPS	: Lipopolisakkarit
MAP	: “ <i>Mitogen Activated Protein</i> ”
MBL	: Mannoza Bağlayan Lektin
MCP-1	: “ <i>Monocyte chemotactic protein-1</i> ”
MGL	: “ <i>Macrophage Spesifik Lectin</i> ”
MHC	: “ <i>Major Histocompatibility Complex</i> ”
MIP-1 α	: “ <i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i> ”
MR	: Mannoza Reseptörü
NF- κ B	: “ <i>Nuclear Factor-kappa B</i> ”
Ni-NTA	: Nikel-nitrilotriasetik asit
NO	: Nitrikoksit
NK	: “ <i>Naturel Killer</i> ”
Nramp	: “ <i>Naturel Resistance Associated Macrophage Protein</i> ”
OD	: Optik dansite
PAF	: “ <i>Platelet Activating Factor</i> ”
PAMP	: “ <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> ”
PAS	: Para Amino Salisilik asit
PI-3~P	: “ <i>Phosphatidyl Inositol 3- Phosphate</i> ”
PPD	: “ <i>Purified Protein Derivative</i> ”
PRR	: “ <i>Patogen recognition receptors</i> ”
PVDF	: Poli(viniliden diflorit)
PZA	: Pirazinamid

PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RD	: <i>“Region of Deletion”</i>
RIF	: Rifampisin
RT-PZT	: Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi
RvD	: “H37Rv-related deletions”
SapM	: <i>“28-kDa acid phosphatase of Mycobacterium tuberculosis”</i>
SDS-PAGE	: <i>“Sodium Dodecyl Sulphate-Polycarylamide Gel Electrophoresis”</i>
Sp-A	: S�rfaktan-A
T	: Timin
TACO	: <i>“Tryptophan Aspartate-containing Coat”</i>
TAK	: <i>“Transforming Unit Growth Factor-� Activated Kinase”</i>
TbD1	: <i>“Mycobacterium tuberculosis specific deletion-1”</i>
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF-�	: <i>“Transforming Growth Factor-beta”</i>
TLR	: <i>“Toll Like Receptor”</i>
TNF-�	: <i>“Tumor Necrosis Factor-alpha”</i>
VEGF	: “Vascular endothelial growth factor”

1 ÖZET

***Mycobacterium tuberculosis*' e ait ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin ekspresyonu, farklı hasta gruplarında IFN- γ ve IL-10 yanıtlarının saptanması**

Dr. Hüseyin Çoban, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

huseyin.coban@deu.edu.tr

Anahtar Sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, IFN- γ , IL-10.

Son yıllarda latent tüberküloz hastalığının tanısında *Mycobacterium tuberculosis*'e ait antijenlerin yer aldığı IFN- γ testleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu testlerde kullanılan ESAT-6, CFP-10 ve PPD gibi antijenik uyarılara karşı, çoğu yardımcı T lenfositler tarafından sentezlenen IFN- γ düzeyleri ölçülmektedir.

M. tuberculosis'e ait RD1 operonu tarafından sentezlenen ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerinin birlikte kullanıldığı IFN- γ testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin, tüberkülin deri testine kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu testlerde, BCG aşısı ve geçirilmiş tüberküloz dışı mikobakteriyel enfeksiyonlara bağlı yanlış pozitiflik oranları daha düşüktür. Latent tüberküloz hastalığının tanısında kullanılan tüberkülin deri testine kıyasla, daha iyi sonuçlar elde edilse de bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, çocuklarda, akciğer dışı tüberküloz olgularında ve tüberküloz hastalığının endemik olduğu bölgelerde, IFN- γ testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri azalmaktadır. Hastaların klinik bulgularına bağlı olarak IFN- γ yanıtlarında değişkenlik olması, bu testlerin kullanım alanını latent tüberküloz hastalığı tanısıyla sınırlamaktadır. Bu nedenle özellikle tüberküloz hastalığının endemik olduğu ülkelerde yaygın olarak kullanılamamaktadır.

Bu çalışmada *M. tuberculosis*'e ait ESAT-6 ve CFP-10 proteinleri klonlandı ve *MI5 Esheria coli* suşunda eksprese edildi. Ni-NTA agaroz afinite kromatografi tekniği ile saflaştırıldı. Elde edilen ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerine karşı farklı hasta gruplarında ortaya çıkan IFN- γ ve IL-10 yanıtları ile Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranları saptandı. İyileşen tüberküloz hastaları, fibronodüler lezyonu olanlar, plevral efüzyonu olanlar, kaviter lezyonu olanlar, çoklu kaviter lezyonu olanlar, milier tutulumu olanlar ve nükseden tüberküloz hastaları olarak gruplandırılan 78 hastanın sonuçları 34 kişiden oluşan sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Ayrıca sonuçlar, kontrol grubu içerisinde ülkemizin tüberküloz enfeksiyonu prevalansına uygun oranda IFN- γ yanıtları yüksek olan 10 kişinin çıkartılmasıyla elde edilen 2. kontrol grubuyla da tekrarlandı.

Δ IFN- γ ve Δ IL-10 yanıtları ile Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının, prognostik değeri olduğu bilinen klinik, radyolojik ve laboratuvar bulgularıyla uyumlu oldukları saptandı. IFN- γ testlerine ek olarak IL-10 gibi sıvısal ya da regülatör yanıtın göstergesi olan sitokinin ölçülmesinin, ayrıca tüberküloz basiline karşı geliştirilen bağışık yanıt durumunu göreceli olarak ortaya koyan Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının belirlenmesinin testin duyarlılık ve özgüllüğünü arttırdığı saptandı.

2 SUMMARY

Ekspression of *Mycobacterium tuberculosis* proteins ESAT-6 and CFP-10 and measurement of IFN- γ and IL-10 cytokine responses at different patient groups

Dr. Hüseyin Çoban, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, İzmir.

huseyin.coban@deu.edu.tr

Key Words : *Mycobacterium tuberculosis*, IFN- γ , IL-10.

Antigens including *Mycobacterium tuberculosis-specific* ESAT-6, CFP-10, and PPD are used in IFN- γ tests as an alternative to tuberculin skin test, for the diagnosis of latent tuberculosis disease. IFN- γ levels synthesized by T lymphocytes which are accessory in high proportion against the antigenic stimulations are measured.

It was established that the sensitivity and specificity of the IFN- γ tests in which concomitantly used with *M. tuberculosis-specific* ESAT-6 and CFP-10 synthesized by RD1 operon was higher compared to the tuberculin skin test. In addition, the false positivity rates related with BCG vaccination and previous nontuberculous mycobacterial infections were lower in these tests.

Although better results were obtained in the diagnosis of latent tuberculosis disease compared to tuberculin skin test, the sensitivity and specificity of the IFN- γ tests decreased in immunosuppressed individuals, children, cases with extra-pulmonary tuberculosis and endemic places for the tuberculosis disease.

Application area of the test may remain limited with the diagnosis of latent tuberculosis disease due to the variety of IFN- γ response related to patient clinic; hence this test is not used widely particularly in regions where tuberculosis disease is endemic.

In this study *M. tuberculosis-specific* ESAT-6 and CFP-10 proteins were cloned and were expressed in *MI5 Escherichia coli* strain. These proteins were purified by using Ni-NTA agarose affinity chromatography technique. IFN- γ and IL-10 responses and Δ IFN- γ / Δ IL-10 rates were obtained occurring in different patient groups against ESAT-6 and CFP-10 proteins.

The results of 78 patients referred as a group including the patients with fibronodular lesions, pleural effusion, cavity lesions, multiple cavity lesions, miliary involvement, recurrent tuberculosis, and recovered tuberculosis disease were compared with healthy control group consists of 34 person. These results were also compared with a second control group after the exclusion of 10 patient whose IFN- γ responses were high, according to the tuberculosis disease prevalence in our country.

It was obtained that the Δ IFN- γ and Δ IL-10 responses and Δ IFN- γ / Δ IL-10 rates were concordant with the clinical, radiological and laboratory findings having the prognostic value. In addition to the IFN- γ tests, it was also established that the measurement of a cytokine, the indicator of such IL-10 humoral or regulator response, determination of Δ IFN- γ / Δ IL-10 rates reflecting the immune response status against the tuberculosis bacillus increased the sensitivity and specificity.

3 GİRİŞ VE AMAC

Tüberküloz hastalığı, hala insanlığın en önemli sağlık sorunlarından biridir. Dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu düşünülmekte ve her yıl yaklaşık üç milyon kişi tüberküloz hastalığı sonucu ölmektedir [1]. Atenué *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suşu, *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı aşı olarak kullanılmaktadır. Bu aşının koruyuculuğu %0 ile 80 arasında değişmektedir [2]. Dünyanın pek çok yerinde kullanılan BCG suşlarının tekrarlanan pasajlar sonucunda genetik özelliklerinde değişimler olduğu saptanmıştır [3].

Tüberküloza ait saflaştırılmış protein türevi (PPD, “*Purified Protein Derivative*”) testinde kullanılan immünojen madde; BCG aşısı ve flora da bulunan tüberküloz dışı mikobakteri türleri ile ortak antijenik yapılar içerdiğinden testin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça değişkendir. *M. tuberculosis* kompleks üyeleri, BCG suşları ve diğer mikobakteri türleri arasındaki genetik farklılıklar aşı ve tanısal test geliştirmeye yönelik çalışmaların hedefleri olmuşlardır.

Sentetik peptitler, kolay kullanımları ve güvenli olmalarından dolayı aşı ve tanı testleri geliştirmeye yönelik çalışmalarda önemli alternatiflerdir. Sentetik peptitlerle hepatit A virusu, hepatit B virusu, influenza virusu, ayak-ağız hastalık virusu, köpek parvovirus gibi pek çok enfeksiyöz ajana karşı yapılan aşı çalışmaları başarıya ulaşmıştır [4-6].

M. tuberculosis enfeksiyonu sırasında tüberküloz basilince salgılanan antijenlerden ESAT-6 (“*Early Secretory Antigenic Target-6 kDa*”)’nın enfeksiyonun erken döneminde güçlü bir T hücre yanıtı oluşturduğu bir çok çalışmayla gösterilmiştir [7-9]. *M. tuberculosis* ve virulan *M. bovis*, ESAT-6 proteinini sentezledikleri halde *M. bovis* BCG aşı suşu bu proteini sentezlememektedir [10]. ESAT-6 proteini 95 aminoasit uzunluğundadır ve tüberküloz enfeksiyonu sırasında bağışık yanıtı uyaran dominant ve subdominant epitoplar taşımaktadır [11].

Antijen sunan ve T hücreleriyle etkileşen dendritik hücreler Th1 yanıtını uyaran IL-12, Th2 yanıtını uyaran IL-4 ile IL-10 ve T regülör yanıtını uyaran, yüzeylerinde kostimulatör moleküllerden CD80 ve CD86’yı sentezlemeksizin salgıladıkları IL-10 ile bağışık yanıtı yönlendirirler. İmmünize olan T hücreleri de IFN- γ (gamma), IL-10 ve IL-2 gibi sitokinler salgılamaktadırlar [12].

Tüberküloz hastalığının tanısına yönelik çalışmalar sıvısal yanıtın hastalığın kontrolündeki katkısının hücresel yanıtı göre daha az olduğunu göstermektedir [13].

Geçirilmiş hastalığın tüberkülin deri testi ile tanısı, BCG aşısı, PPD uygulamaları ve tüberküloz dışı mikobakterilerle karşılaşmış olmak gibi nedenlerle oldukça zordur. Uzun yıllardır uygulanmakta olan tüberkülin deri testinin duyarlılık ve özgüllüğü %50-60 düzeylerindedir. Tüberküloza özgü antijenlerin kullanıldığı ve hücresel bağışık yanıtın göstergesi olan IFN- γ sitokin düzeylerinin ölçümü ile daha iyi sonuçlar alınmıştır. Her ne kadar farklı antijenlerin bir arada kullanılması duyarlılık ve özgüllüğü %80'lere çıkarabilmişse de tek bir antijenle farklı sitokin düzeylerinin ölçülmesi çalışmaları daha başarılı sonuçlara ulaşmıştır. Örneğin, sadece ESAT-6 antijenine karşı sentezlenen IFN- γ ve CD40L düzeylerinin bir arada değerlendirildiği flow sitometrik çalışma sonuçları, geçirilmiş enfeksiyon tanısında duyarlılığı %100'e ve özgüllüğü de %88'e çıkarmıştır [14].

Bu çalışmanın amacı; ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin klonlanması, ekspresyon ve saflaştırmanın ardından çeşitli hasta gruplarında IFN- γ ve IL-10 yanıtlarının ELISA yöntemiyle ölçülmesidir.

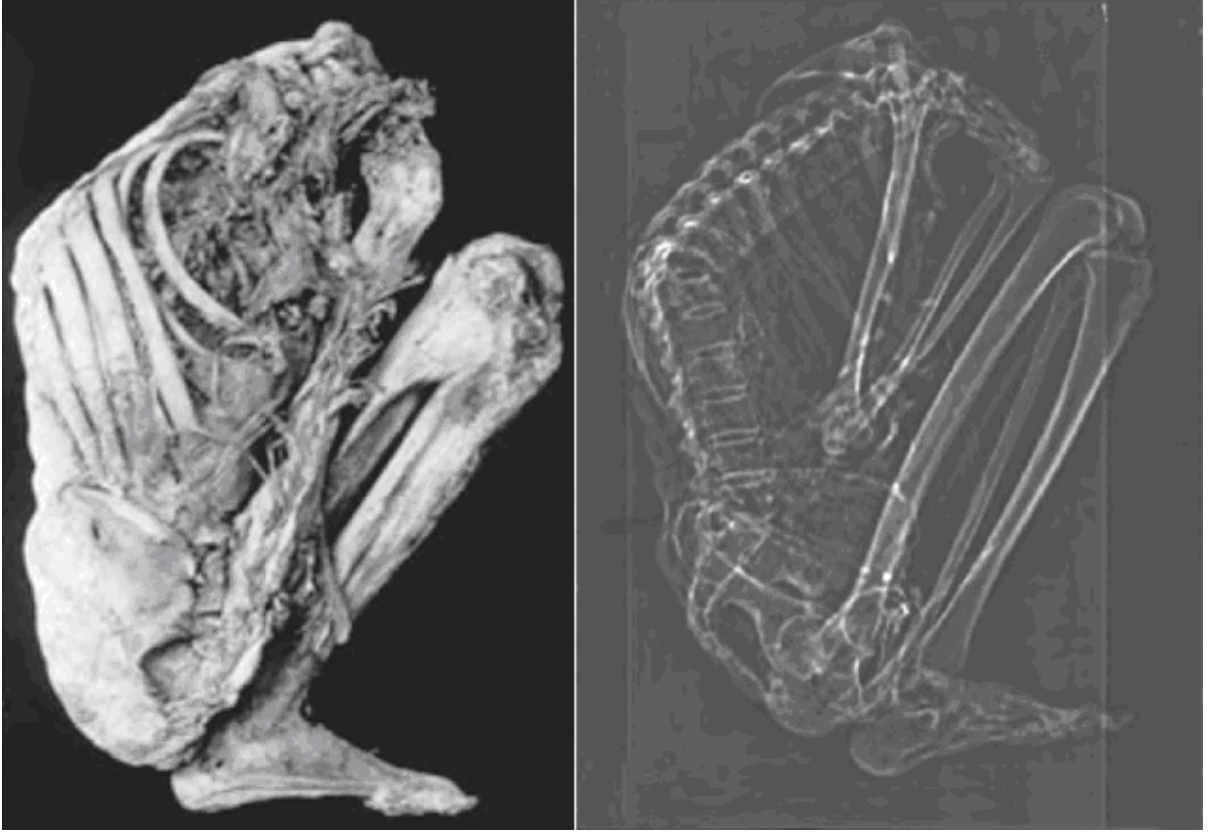
4. GENEL BİLGİLER

4.1. TÜBERKÜLOZ HASTALIĞININ TARİHÇESİ

Tüberküloz, *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, değişik klinik belirtilere sahip kronik, nekrozitan bir hastalıktır [1]. Tüm dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri tüberküloz basili ile enfekte durumdadır, her yıl 8 milyon yeni hasta ortaya çıkmakta ve yaklaşık 3 milyon kişi tüberküloz hastalığı sonucu ölmektedir [2].

Tüberküloz, geçmiş insanlık tarihi kadar eskilere dayanan bir hastalıktır ve halk sağlığı açısından önemli bir tehdit olmayı sürdürmektedir. Zaman zaman salgınlara neden olmuştur. Günümüzde özellikle kazanılmış bağışık yetmezlik sendromu (AIDS, “*Acquired Immune Deficiency Syndrome*”) insidansının arttığı bölgelerde salgın yapma özelliğini devam ettirmektedir [15]. Mikobakteriyel enfeksiyonların ilk kez M.Ö. 8000 yıllarında, insanların yerleşik toplum düzenine geçmeleri ve sığırları evcilleştirmesiyle birlikte ortaya çıktığı düşünülmektedir [16]. Mısır’da, M.Ö. 5000 yıllarına, Hindistan’da M.Ö. 3300 yıllarına ve Çin’de M.Ö. 2300 yıllarına ait kaynaklarda tüberkülozu düşündüren ifadeler bulunmaktadır. M.S. 700 civarında Peru’da ve Mısır’da bulunan mumyalarda Pott hastalığına dair bulgular saptanmıştır [Resim 1]. Lezyonlardan *M. tuberculosis* DNA’sı izole edilmiştir. Hipokrat (M.Ö. 460-377) hastalık için erime, tükenme anlamına gelen “*phtisis*” deyimini kullanmış. Hipokrat fitizis aforizmasında, bunun özellikle 18-35 yaşları arasında atak yapan bir hastalık olduğunu belirtmiştir. M.S. 174 yılında Roma imparatoru Marcus Aurelius’un hekimi Clarissimus Galen, kendisinden sonra 1000 yıl boyunca değişmeyen tedavi önerilerini ortaya koymuştur. Bu öneriler süt, temiz dağ havası, istirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları, venden kan alımı, sülük uygulaması, kusturucular, müshiller, kabartıcı maddelerle ciltte yaralar oluşturmak şeklinde özetlenebilir [16-18].

Rönesans’la beraber Avrupa’da tüberküloz konusunda yeni bilgiler ortaya çıkmıştır. Andreas Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların saptandığını bildirmiştir. F. Sylvius (1614-1672) ise fitizisli hastaların akciğerlerinde küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstermiş ve bunları “tüberkül” diye adlandırmıştır [17].



a.

b.

Resim 1:

a. Kolombia “Casa del Marqués de San Jorge” arkeoloji müzesinde bulunan mumya.

b. Mumyanın bilgisayarlı tomografi görüntüsü [18].

Hastalıkla ilgili düzenli kayıtlar 17. yüzyılın başından itibaren tutulmaya başlanmıştır. On yedinci ve on sekizinci yüzyıllarda sanayi devrimi; yoksul, yetersiz beslenen ve kalabalık barınma koşullarında yaşayan insanların sayısını arttırarak tüberküloz salgınlarının artmasına sebep olmuştur. Bu durum hastalığın İngiltere’den tüm batı ülkelerine yayılmasına yol açmış, batı Avrupalılar dünyaya yayıldıkça tüberküloz da yaygınlık kazanmıştır. A. Willemin 1865 yılında ilk kez tüberkülozlu hastaların kaviterlerinden alınan materyali tavşanlara inoküle ederek tüberküloz geliştiğini göstermiş, Robert Koch 1882’de tüberkülozun *M. tuberculosis* ile oluşan bir enfeksiyon hastalığı olduğunu kanıtlayarak yeni bir dönemi başlatmıştır [16,17].

İlk sanatoryumun 1854 yılında Almanya’da açılmasıyla tüberküloz tedavisinde farklı bir yaklaşım başlamıştır. Kısa bir süre sonra tüm Avrupa’da ve ABD’de yaygınlaşan bu

uygulamada dağ yamaçlarındaki kuruluşlarda zengin bir diyet, hafif egzersiz ve 8-12 saatlik dağ havasıyla temas sağlanmaktaydı. W. Roentgen'in 1895 yılında X ışınını bulması sonrası sanatoryumlar; radyolojik, bakteriyolojik ve floroskopik incelemelerin yapıldığı tüberküloz tanı, tedavi ve araştırma merkezleri haline gelmişlerdir [19].



a.



b.

Resim 2: a ve b. İtalya'nın Trieste kentindeki Pineta del Carso sanatoryumunda, temiz hava ve iyi beslenme koşulları sağlanan tüberküloz hastaları [19]

Yüzyılımızın başında tüberküloz tedavisinde cerrahi yaklaşımlar başlamıştır. Yirminci yüzyılın ilk yarısında tüberküloz tedavisine egemen olan sanatoryum ve cerrahi kollaps tedavisi yaklaşımı modern kemoterapinin başladığı 1950'li yıllardan itibaren giderek azalmıştır. F. Seibert 1930'lu yılların sonunda tüberkülini saflaştırmıştır ve yapılan tüberkülin deri testi ile tüberküloz enfeksiyonu saptanmaya başlanmıştır. Calmette ve Guérin isimli araştırmacıların 1921 yılında Fransa'da ilk tüberküloz aşısı BCG'yi geliştirmişlerdir. Bu aşı II. Dünya Savaşından sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [16,17,19].

Tüberküloz tarihinde yeni bir dönem 1940'ların ortasında ABD'de streptomisin ve İsveç'te PAS'ın bulunması ile başlamıştır. Tek başına kullanılan bu ilaçlara bir ay gibi kısa zaman içinde direnç gelişimi büyük hayal kırıklarına yol açmış ve yeni ilaç bulma çabalarını da zorunlu kılmıştır. 1952 yılında Robizek ve Selikof tarafından izoniazid (INH)'in bulunmasından sonra üç ilaçla 18-24 ay süren kombine tedavinin uygulanması sonucu tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. Daha sonra 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur [17].

Yetmişli yıllara gelindiğinde batı ülkelerinde tüberküloz sorununun artık bittiği ve hastalık eradikasyonunun yakında gerçekleşeceği düşünüldüyse de 1985 yılından itibaren bu ülkelerde tüberküloz insidansının ilk kez artmaya başladığı görülmüş ve hastalığın yeniden ortaya çıkması şaşkınlıkla karşılanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde kayıt sistemlerindeki yetersizlik nedeniyle 1950’li yıllar öncesindeki durum hakkında yeterince veri bulunmamaktadır. Bu ülkelerde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen ve erken tanı, tedavi ve aşılamaı öneren tüberküloz kontrol programları 1960’lardan sonra uygulanmaya başlanmış ancak 1990’lı yıllarda uygulanan programlarının yetersiz olduğu görülmüştür [16,17,19].

4.2. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS’İN TAKSONOMİSİ

Actinomycetales takımına ait *Mycobacteriaceae* ailesinden *Mycobacterium* cinsine ait bakterilerin temel özellikleri yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları, hücre duvarlarında bol miktarda lipit içermeleri ve genomlarında %59-65 oranında G+C bulunmasıdır. *Mycobacterium* cinsi içerisinde başlıca 2 patojen bulunmaktadır; *M. tuberculosis* (Koch, 1882) ve *M. leprae* (Hansen, 1874) [19,20].

Mikobakterilerin genomunda yer alan 20 farklı değişken bölgede meydana gelen insersiyon ve delesyonlar türler arasında rastgele bir dağılım göstermemektedir. İnsersiyon ve delesyonları dikkate alarak yapılan çalışmalarda filogenetik ilişkileri belirlenen yaklaşık 100 farklı mikobakteri türü olduğu saptanmıştır. Bakteriyolojik özellikleri ve moleküler düzeyde benzerlikleri bulunan yakın ilişkili türler kompleks başlığı altında toplanmaktadır [19,21].

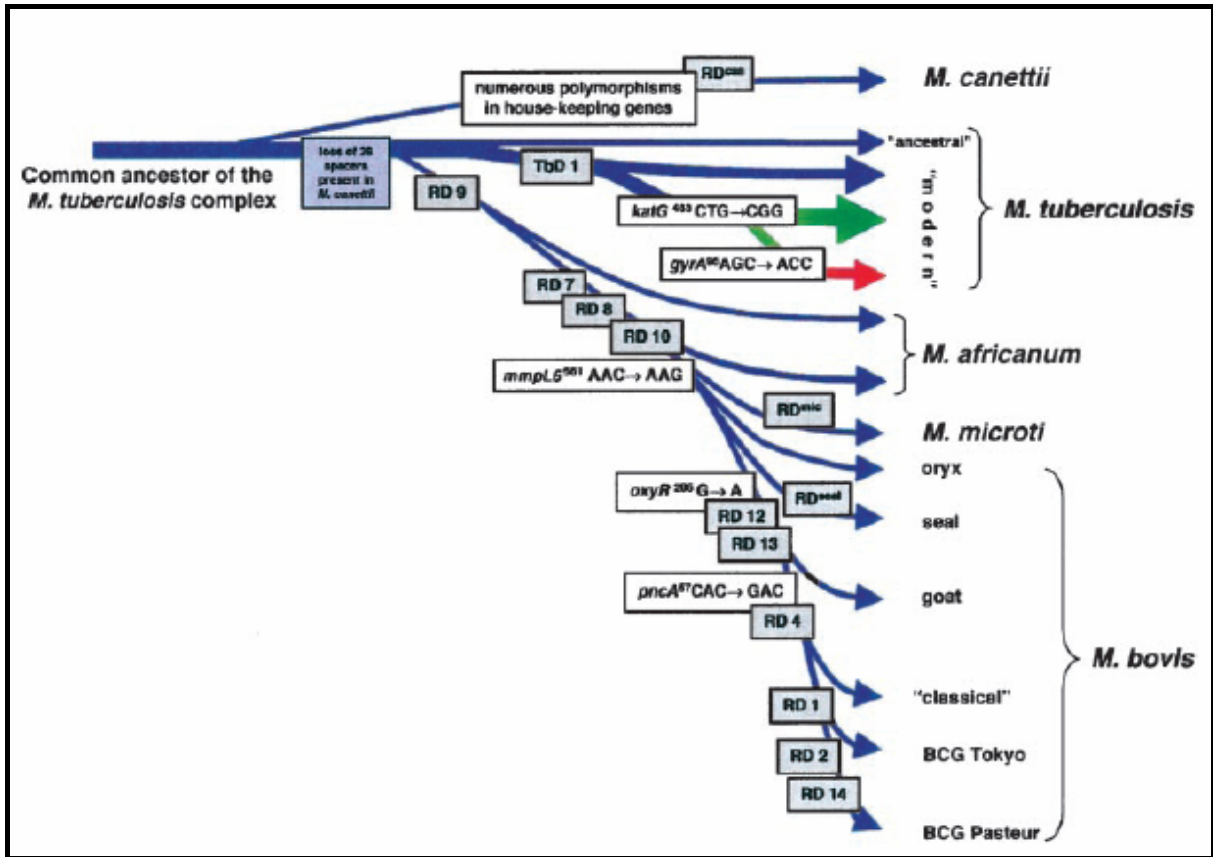
Evrin sürecinde *M. tuberculosis* kompleks türleri arasında meydana gelen bazı değişken gen bölge kayıpları, bu türlerin ayrışma noktalarıdır. *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan *M. canetti*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerine ait olan bu ayrışma noktaları incelendiğinde;

- *M. tuberculosis* kompleksinde meydana gelen ilk ayrışmanın 26 farklı gen bölgesindeki delesyon nedeni ile *M. canettii*’de olduğu gözlenir.
- RD9 bölgesini korumayı başaran *M. tuberculosis* diğer RD gen bölgelerini de koruyarak *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden ayrılmıştır. *M. tuberculosis*’in RvD1 bölgesinin kaybıyla H37Rv ortaya çıkmıştır. TbD1’deki ve

IS6110 gibi bazı polimorfik gen bölgelerinde kendilerine özgü paternler biçiminde meydana gelen delesyon ve insersiyonlar sonucunda “Beijing”, “Haarlem”, ve “African” diye adlandırılan modern *Mycobacterium tuberculosis* kökenleri ortaya çıkmıştır.

- RD9 bölgesini kaybeden *M. africanum*; RD7, RD8 ve RD10 bölgelerini koruyarak *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden ayrılmıştır.
- *M. microti*; RD12, RD13, RD14, RD4, RD2 ve RD1 gen bölgelerini korumuş ve böylece *M. bovis*’den ayrılmıştır.
- *M. bovis* RD12, RD13 ve RD4 bölgelerini kaybederek bazı türleri enfekte etme yeteneğini kaybetmiştir.
- *M. bovis*’in RD1, RD2 ve RD14 gen bölgelerini kaybetmesiyle atenüe BCG suşları ortaya çıkmıştır [20,21].

M. tuberculosis kompleks’de yar alan türler arasındaki filogenetik ilişki Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki [21]

4.3. TÜBERKÜLOZ HASTALIĞININ İMMÜNO-PATOGENEZİ

M. tuberculosis pek çok virulans özelliği ile zaman zaman konağın bağışıklık sisteminden kurtulabilen bir enfeksiyon etkenidir. Enfeksiyonun nasıl sonuçlanacağı, konağın savunma mekanizmaları ve basilin virulans faktörlerinin etkileşimiyle belirlenir. Enfeksiyon farklı tablolara neden olabilir. Birincisi; basil kendisini opsonize eden antimikrobiyal proteinlerle birleşir veya kendisini yok etme kapasitesinde olan konak hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücre içerisine alınır ve genellikle ortadan kaldırılır. Diğer tablo ise; tüberküloz basilinin, onu opsonize edebilecek proteinler yerine farklı işlevleri olanlarla birleşmesidir. Basilin tutunduğu reseptör, ortadan kaldırılmasını sağlayan uyarıları oluşturmakta yetersiz kalabilir. Hatta basil, tolerans gelişimine yol açacak bir hücre ya da reseptöre bağlanabilir. Ayrıca çeşitli genetik bozukluklara bağlı olarak konak savunması başarısız kalabilir. Basil böylece yaşamını sürdürerek çoğalmaya devam eder.

Bu etkileşimler sırasında, konak ve patojene ait bazı genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimleri ve bu genlerin işlevlerini ortaya koymayı amaçlayan çalışmalar giderek artmaktadır [22].

Sıklıkla solunum yoluyla alınan basil; dendritik hücreler, makrofajlar, nötrofiller ve tip II pnömositlerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere tutunmaktadır [23,24].

4.3.1. *Mycobacterium tuberculosis*'in konak hücrelerine tutunmak için kullandığı reseptörler

M. tuberculosis konak hücrelerine tutunmak için kullandığı reseptörler doğrudan ya da dolaylı olarak tutunabildiği reseptörlerdir.

Doğrudan tutunmak için kullandığı reseptörler;

1. Tüberküloz basili, yüzeyindeki terminal mannoz kalıntıları yoluyla mannoz reseptörlerine (MR) tutunabilir [25].
2. Konak hücrelerinin yüzeyinde bulunan fibronektinlere tutunur [26].
3. Basil salgıladığı 28-kDa büyüklüğündeki heparin bağlayan adezin ile hücre yüzeylerinde bulunan sülfatlanmış glikoz kalıntılarına tutunabilir [27].

4. Kompleman faktör 3b (C3b) ile opsonize olmaksızın kompleman reseptörlerinden CR3 ve CR4'e tutunabilir [28].

5. Tip A “scavenger” reseptörlere tutunabilir [29].

Dolaylı olarak tutunmak için kullandığı reseptörler;

1) Ig G tipi antikorlarla opsonize olmuş tüberküloz basili Fcγ reseptörüne tutunabilir [30].

2) Surfaktanın bir alt tipi olan Sp-A'ya bağlanan basil; makrofajlar, Tip II pnömositler ve nötrofillerin yüzeyinde bulunan surfaktan bağlayan reseptöre (CD14) tutunabilir [31]. Surfaktanın farklı bir alt tipi olan Sp-D tüberküloz basili CD14'e bağlanmasını engellemektedir. Alveoldeki surfaktan alt tiplerinin göreceli oranları, konağın tüberküloz basiline karşı duyarlılığı etkilemektedir [32].

3) Serum ve dokularda serbest olarak bulunan mannoz bağlayan lektinler (MBL) ile birleşen tüberküloz basili lektin yolu, klasik yol ya da alternatif yoldan aktive olan kompleman sistemi bileşeni C3b ile opsonize olarak kompleman reseptörlerine tutunur [33]. Tüberküloz hastalığına yakalanan kişilerin serum ve dokularındaki MBL düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır [33,34].

4.3.2. *Mycobacterium tuberculosis*'in konak hücrelerine tutunmak için kullandığı reseptörlerin enfeksiyon sürecine etkisi

Tutunabileceği hücre tipleri ve reseptörlerin çeşitliliği, basil önemli bir avantajdır ve ortadan kaldırılma sürecini etkilemektedir.

- **CR yolu ile tutunma;** IgG tipi antikorlarla opsonize olan tüberküloz basili Fcγ reseptörlerine bağlanarak hücrelere tutunması inflamatuvar yanıtı uyarırken kompleman reseptörlerine (CR) tutunması yeterli uyarıyı sağlayamamaktadır [35]. Kompleman reseptörlerinden de CR3 ve CR4 yoluyla hücrelere tutunması CR1 yoluyla tutunmasına göre inflamatuvar yanıtı daha iyi uyarmaktadır [36].

- **Sp-A yolu ile tutunma;** Surfaktan alt tiplerinde Sp-A ile bağlanarak dolaylı yoldan hücrelere tutunan basil, bu yolla nitrojen radikallerinin üretimini baskılamaktadır [37].

- **MR yolu ile tutunma;** Tüberküloz basili MR'ne tutunarak hücreye girişi oksijen radikallerinin üretimini baskılamakta ve inflamatuvar nitelikte olanlar yerine, anti-inflamatuvar nitelikte olan sitokin ve kemokinlerin sentezlenmesini sağlamaktadır [38,39]. Tüberküloz

basilinin atenüe formları hücrelere tutunmak için MR'lerini kullanamazlar, bu yüzden MR yoluyla bağlanmanın virulans genlerinin katkısıyla gerçekleştiği düşünülmektedir [25].

4.3.3. *Mycobacterium tuberculosis*'in sahip olduğu virulans faktörleri

Basil reseptöre tutunduktan sonra çeşitli sinyal yolları tetiklenirken fagozom içerisine alınır. Fagozomun oluşması, hücre içi trafiği ve lizozomla birleşmesi sürecini aydınlatmaya yönelik pek çok çalışma yapılmıştır.

- Konak hücrelerinin sentezlediği fosfatidil inozitol-3 kinazların fagozom ile lizozomun birleşmesini düzenleyici işlevleri vardır. Fagozomun yüzeyinde toplanan fosfatidil inozitol-3 kinazlar, fosfatidil inozitol 3 fosfat (PI-3~P) oluşumunu sağlamaktadırlar. PI-3~P'lar ise FYVE domainleri taşıyan proteinlere bağlanmaktadır. Bu proteinler; erken endozomun geç endozoma dönüşmesi için gereklidir [40]. Tüberküloz basilinin membranlarda PI-3~P toplanmasını engelleyerek erken endozomun geç endozoma dönüşmesini önlediği düşünülmektedir [41]. Bu virulans faktörü ile erken endozom belirleyicileri olan Rab5 ve Rab14 GTPaz'ların varlıklarını sürdürdüğü ancak geç endozom markırı Rab7 GTPase'ın ise ortaya çıkmadığı gösterilmiştir [42].
- Tüberküloz basili ökaryotik asit fosfatazlar ile benzer yapıda bir asit fosfataz sentezler. Sntezlediği SapM “28-kDa acid phosphatase of *M. tuberculosis*” fagozom membranında birikmekte olan PI-3~P'in fosfat bağlarını parçalayarak tüketir. Böylece FYVE domaini taşıyan proteinlerin fagozomla etkileşimini engelleyerek erken endozomun geç endozoma dönüşmesini durdurmaktadır [41].
- Tüberküloz basili ayrıca fagozom membranlarında sfingozin 1 fosfat (S-1~P) oluşumuna neden olan sfingozin kinazların toplanmasını engellemektedir. S-1~P, Ca^{2+} artışı ile tetiklenen sinyal yolu için gerekli bir moleküldür [43].
- Ökaryotik serin/treonin kinaz benzeri bir protein olan protein kinaz G'nin de fagozom ile lizozomun birleşmesini önlediği gösterilmiştir [44].
- Trehaloz dimikolat inflamatuvar yanıtı baskılayarak basilin hücre içinde canlı kalmasını kolaylaştırmaktadır [45].
- Tüberküloz basiline ait fosfatidil inozitol lipoarabinomannan, hücresel fosfatidil inozitol 3~P'in analogudur ve onun FYVE ve PX domainleri ile birleşmesini yarışmalı olarak engellemektedir. [46,47].

- Tüberküloz basili, membranının alt kısmında bulunan bir proteaz olan Rv2869c, lipid metabolizmasını ve membran lipid kompozisyonunu düzenlemektedir. Rv2869c gen bölgesinden yoksun hale getirilen tuberküloz basilleri virulans özelliklerini önemli ölçüde yitirmektedirler [48].
- Tüberküloz basilinin virulans özellikleri büyük oranda sitoplazmik zarın dışında kalan yapılar ve salgıladığı proteinlerce sağlanmaktadır. Bu proteinlerin amino ucundaki O-mannozil kalıntılarının konak ile kuracağı etkileşimde önemli işlevleri vardır [49]. Mikobakteri, stafilokok, streptokok ve listeria cinslerinde SecA proteininin SecA1 ve SecA2 gibi farklı varyasyonları bulunur. SecA2 gen bölgesinden yoksun hale getirilen tuberküloz suşlarının virulanslarını yitirdikleri ancak invitro kültür ortamlarında çoğalmalarında bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Daha sonra, kültür filtrat proteinleri incelendiğinde, reaktif oksijen radikallerini ortadan kaldırmaktan sorumlu 2 tuberküloz proteininin (ESAT-6 ve CFP-10) hala ortamda saptandığı gözlenmiştir. Bu durumun nedeni, her iki proteinin de sinyal sekanstan bağımsız sekresyon mekanizmaları kullanıyor olmalarıdır [50].
- ESAT-6 ve CFP-10 bir araya gelerek kararlı bir kompleks oluştururlar [51]. Bir araya gelen bu üniteler lipid bariyerlere saplanarak por formasyonu oluşturup hücrelerin lizisine neden olabilirler [52].
- RD1 “*Region of Deletion -1*” içerisinde ESAT-6 ve CFP-10’un dışındaki diğer proteinler sekresyon sistemi işlevi görmektedirler. ESAT-6 ve CFP-10’un sekresyonlarına katkıda bulunan espA (Rv3616c) gibi bazı proteinler ise RD1’in dışında yer almaktadırlar [53]. EspA (Rv3616c) geninden yoksun olan tuberküloz basilleri, RD1 gen bölgesini taşıdıkları halde RD1’den yoksunmuşçasına ESAT-6 ve CFP10’u sekrete etme özelliklerini kaybetmektedirler [54]. RD1 gen bölgesinden yoksun olan *M. smegmatis*’in yaptığı DNA konjugasyonunun yüksek düzeyde olması, ESAT-6 ve CFP-10 sekresyonu ile DNA konjugasyonu arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. [55,56].
- Mikobakteriyel sülfatidler ve çoklu açillenmiş trehaloz 2-sülfat deriveleri, fagozomun ve lizozom kaynaşmasını engellemektedirler [57].
- Fagozom içeriğinin pH’ı, onu çevreleyen proton pompaları sayesinde düşürülür. İçerik, asidik hidrolize uğramaya başlar, lizozomla kaynaşması ile enzimatik hidroliz (asit fosfataz, katepsin-D ve β -glukuronidaz gibi enzimlerin varlığında) devreye girmektedir [58].

- *M. tuberculosis* tarafından sentezlenen süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri reaktif oksijen radikallerinin etkisinden korunmasını sağlar [59].
- Ayrıca *M. tuberculosis* 'e ait sülfatidler, LAM ve fenolik glikolipid-I (PGL-I) iyi birer oksijen radikali çöpçüleridir [60,61].

4.3.4. Konak savunma mekanizmaları

Konak savunması, bağışıklık sistemi elemanların, farklı işlevleri ile sağlanır. Reseptörlerin uyarılması sonucu yanıtlar, gereken zamanda ve gereken düzeyde verilmelidir. Bağışık yanıt elemanları çok farklı roller üstlenebilirler. Gereken yanıtın ortaya çıkmasına ya da frenlenmesine katkı sağlayabilirler. Konağa ait genetik bozukluklar ya da patojene ait virulans faktörleri, yanıtızsızlığa, yanıt dengesizliklerine ya da konağa zarar verebilecek kadar yüksek düzeyde yanıtlara yol açabilirler.

4.3.4.1. Doğal bağışık yanıt

Yüksek yapılı canlılar ile hastalık etkenleri arasında binlerce yıldır süren ilişkiler onlara, özgül yapıları tanıyarak birbirlerine karşı tetikte olma yeteneği kazandırmıştır. Hayatta kalma yarışı, hastalık etkeni mikroorganizmaların virulans özelliklerinin, yüksek yapılı organizmaların da bağışıklık sistemi elemanlarının birbirlerine karşı evrimleşmelerini sağlamıştır. Doğal bağışık yanıt, patojen ve zararlı etkenlere karşı tek bir antijenik uyarandan ziyade bazı ortak antijenik yapıları tanıyarak etki göstermektedir.

Nötrofiller: Zararlı bir etkenle ilk karşılaşan hücrelerdendir. İnflamatuvar yanıtı tetikleyen kemokinleri sentezlerler. *M. tuberculosis*'in ortadan kaldırılmasında genellikle yetersiz kalsalar da fagositoz aktiviteleri, oksijene bağımlı öldürme mekanizmaları veya hücre dışı degranülasyon ürünleri ile konak bağışıklık sistemine katkı sağlarlar [62]. Ancak enfeksiyonun ileri dönemlerinde aşırı nötrofil göçü ile doku hasarının patolojik seviyelere ulaşması, hücresel yanıtın başarısızlığının göstergesidir [63].

Mast Hücreleri: Bu hücreler, genellikle allerjik reaksiyonlara neden olup, tip 2 yardımcı hücre yanıtının ortaya çıkmasını sağlarlar. Solunum, gastrointestinal ve üriner sistem mukozaları ile kan ve lenf damarlarının yakın çevresinde yerleşirler. Yüksek afiniteli IgE reseptörleri (FcεRI) taşımaktadırlar. Bu reseptörlerle IgE tipindeki antikorlara bağlanırlar. Mast hücreleri CD48 yüzey molekülleri ile TLR-4, TLR-2 gibi PAMP'leri sayesinde *M. tuberculosis* ile etkileşerek sonunda, histamin, triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, heparin, β-

heksoz amidaz, lökotrien C4, prostaglandin D2, platelet aktive edici faktör (PAF), tümör nekroze edici faktör alfa (TNF- α), transforme edici büyüme faktörü- beta (TGF- β), fibroblast büyüme faktörü-beta (FGF- β), damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-8 gibi kemoatraktan moleküller, kemokinler ve sitokinleri salgılayarak inflamatuvar yanıt katkı sağlarlar [64]. Abartılı yanıt vermeleri özellikle CD48 etkinliğinde sentezledikleri, histamin, β -heksoz amidaz, IL-6 ve TNF- α yoluyla nötrofil göçünü, sonuçta gastrointestinal sistem granuloamlarının oluştuğu patolojileri tetikleyebilir [65]. Bağışık yanıtı, özellikle sıvısal yanıt ve regülatör yanıt yönüne kaydırabilirler [66].

Makrofajlar: Tüberküloz basilini yok eden ve etkin bir bağışık yanıt gelişimini sağlayan en önemli hücrelerdir. Makrofajların tüberküloz basili ile etkileşimleri farklı reseptörleri sayesinde gerçekleşmektedir. Makrofaj reseptörlerinin en önemlileri Fc, kompleman, mannoz, sürfaktan, CD43, TLR-2 ve TLR-4 reseptörleridir [67]. Farklı reseptörlerin uyarılması birbirine benzemeyen etkiler oluşturabildiği için, bazıları enfeksiyonun üstesinden gelinmesinde dezavantaj olabilmektedir. Makrofaj hücre membranında bulunan kolesterol ve TACO “*tryptophan aspartate coat*” proteininin etkisi ile basilin reseptörlere bağlanma gücünü arttırarak, hücre içerisine alınmasını kolaylaştırmaktadır [68, 69]. Nitrojen ve oksijen radikalleri ve yardımcı T lenfositlerin desteği sayesinde öldürme yeteneği artan makrofajlar, konağın tüberküloz basilini yok etmesinde en önemli görevi üstlenen hücrelerdir.

Dendritik Hücreler: Dendritik hücreler edinilmiş bağışıklığın geliştirilmesinde büyük rol oynarlar. C-tipi lektin, Fc γ ve Fc ϵ reseptörlerini kullanarak reseptör bağımlı endositoz yoluyla hücre içine aldıkları *M. tuberculosis*’e ait antijenik yapıları işlemleyerek matürasyonlarını tamamlarlar. CCR7 kemokin reseptörleri sayesinde CCL19 ve CCL21 e karşı duyarlı hale gelmektedirler. CCR7 kemokin reseptörleri ile en yakın lenf noduna doğru göç ederler [70]. İşlemledikleri antijenleri, MHC I, MHC II ve CD1 molekülleri ile T lenfositlere sunarlar [71]. DC-SIGN (Dendritic Cell - Specific Intercellular-adhesion-molecule Grabbing Non-integrin) dendritik hücrelerin sahip olduğu en önemli C-tipi lektindir. Bu lektin mannoz kepli (mannose capped) lipoarabinomannana tutunmaktadır. Tek başına Mannoz kepli lipoarabinomannan DC-SIGN’lar ile reseptör bağımlı endositoz yoluyla hücre içerisine alınarak, IL-10 salınımına neden olurken, *M. tuberculosis*’e ait 19-kDa luk lipoprotein ile birlikte hücre içerisine alındıklarında TLR-2 etkinliği ile, IL-12, TNF- α ve IL-6 salınımına sebep olmaktadır [72].

Monositlerden köken alan dendritik hücrelerle yapılan çalışmalar; *M. tuberculosis* ile enfekte olduklarında CD1 moleküllerini sentezleme, dolayısıyla lipid yapıdaki antijenleri sunma düzeylerinin azaldığını göstermiştir [73].

Doğal Öldürücü (NK) “Natural Killer” Hücreler: Hedefledikleri hücreleri sitotoksik etkinlikleriyle öldürebilmektedirler. Yalnızca viral patojeneler ve tümör hücrelerine karşı doğal bağışık yanıt işlevi gördüğü düşünülen NK hücrlerinin aslında bakteriyel enfeksiyonlara karşı da çok önemli işlevlerinin olduğu anlaşılmıştır. Patojenlere karşı en erken IFN- γ yanıtı veren hücrelerdir. *M. tuberculosis* ile enfekte makrofajların, aktive olmalarını ve enfekte hücrelerin ölmelerini sağlarlar [74,75]. CD3-CD16+CD56- fenotipteki NK hücreleri edinilmiş bağışıklık yanıtıdan bağımsız olarak aktive olup CD56 ekspresyonlarını arttırabilmektedirler [74].

“CD1d restricted” doğal öldürücü hücreler: Bu hücreler lipid yapılı antijenlerin sunumunda kullanılan CD1 moleküllerini tanıyabilen değişmez V- α 24 reseptörüne sahiptirler. *M. tuberculosis*’e ait bir glikolipit olan α -galaktozilseramit makrofajlar tarafından CD1 molekülleriyle sunulduklarında kolayca aktive olmalarını sağlayarak IFN- γ sentezi, proliferasyon, anti-mikobakteriyel etkinliklerini ve litik aktivitelerini artırır. Anti-mikrobiyal peptitlerden granulizin, mikobakteri hücre duvarında hasar oluşturmaktadır [19].

Defensinler: Defensinler 30-50 aminoasit uzunlukta, antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkinlikleri olan peptitlerdir. Bu katyonik peptitler tüm myeloit ve epitelyal hücreler tarafından sentezlenebilmektedirler. Büyüklükleri, konformasyonel yapıları, sistein amino asitlerinin yerleşimi ve içerdikleri disülfid bağları gibi özelliklerine göre üç gruba ayrılırlar [76].

Fagositer hücrelerin içerisindeki mikroorganizmalar, defensinlerle oksijenden-bağımsız olarak hasara uğratılırlar. Defensinler küçük boyutlu olma avantajlarıyla da enfekte hücrelerin yüzeylerindeki reseptörleri yoluyla membranları aşarlar ve patojene ulaşırlar [77,78].

Kemokinler: Kemokinler, küçük (6-14 kDa) kemo-atraktan sitokinlerdir. Aminoasit dizilerindeki korunmuş sistein motiflerine göre, CC-, CXC, CX₃C ve C kemokinler olarak dört grupta incelenebilirler. CC grubuna dahil olan MCP-1 (CCL2) ve MIP-1 α (CCL3) gibi kemokinler monositler için güçlü kemoatraktan etkiye sahiptirler aynı zamanda, eozinofiller, bazofiller, NK hücreleri ve T hücreleri de bu kemokinlere iyi yanıt verirler [79].

CXC grubundan olan IL-8 (CXCL8) ise nötrofil, bazofil, eozinofil ve T lenfosit göçünü artırır. İnflamatuar kemokinler olarak da anılan bu iki grup kemokin, inflamatuar sinyallerden çeşitli sitokinelere (TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ) ve bakteriyel hücre duvarı yapı taşlarına (lipopolisakkarit, lipoteikoik asit, peptidoglikan ve lipoarabinomannan gibi) yanıt olarak sentezlenmektedirler [80].

Patojen tanıyan reseptörler: Patojen tanıyan reseptörler (PRR), patojenle ilişkili moleküler paternlere (PAMP) özgü, sinyal yollarını tetikleyen, evrimsel süreçte iyi korunmuş ve çoğu profesyonel antijen sunan hücreler ile bir kısmı çekirdekli hücrelerde bulunan reseptörlerdir. Bunlar hücre dışı ya da endozom iç yüzeylerde membransız yapılara bağlı olarak bulunan Toll benzeri reseptörler ve C-tipi lektin reseptörler ile sitoplazma içerisinde serbest olarak bulunan NOD benzeri reseptörlerdir [81,82].

Enfeksiyon etkenlerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınabilen lipit, protein ve karbonhidratlardan oluşan kendilerine özgü yapıları vardır. Koşulların baskısı altında mutasyonlarla, çok hızlı değişebilen yapıların dışında, mikroorganizmaların şekil ve metabolik işlevleri için önemli olduklarından kolay kolay değiştirilemeyen yapısal bileşenleri bulunmaktadır.

Doğal bağışıklık ve edinilmiş bağışıklık arasında sıkı ilişkilerin kurulması, pek çok hücre tarafından sağlanmaktadır. Bu hücrelerin yüzeylerinde ve sitoplazmalarında yer alan patojenle ilişkili moleküler paternleri (PAMP=Pathogen associated molecular patterns) tanıyan reseptörlerin (PRR) "*Patogen recognition receptors*" işlevi; çeşitli hücre içi sinyal yollarını etkileyerek, doğal ve edinilmiş bağışık yanıtın gelişimine, yol gösterici katkı sağlamaktır [82]. Bu katkılarını hücre yüzey teması, sitokin ve kemokin sentezi ve bunların otokrin ve parakrin etkileri ile gerçekleştirirler.

- **Toll benzeri reseptörler (TLR) "*Toll like receptors*":** TLR'ler *Caenorabditis elegans*'tan memelilere değin bulunan PRR 'lerdir [83]. TLR'ler tip I integral membran glikoproteinleri ailesindendirler. Hücre dışında yer alan lüsen zengin tekrarlayan (LRR) "*Leucine rich repeat*" diziler taşıyan domeinlere sahiptirler. IL-1 reseptör analogu olan ve kısaca TIR "*Toll IL-1 Receptor*" adı verilen hücre içi sinyal iletiminden sorumlu bir domein taşırlar [84]. Hücre dışında yer alan LRR domeinleri ise; her biri 24-29 aminoasit uzunluğunda olan, 19-25 kez tekrarlayan, XLXXLXLXX, XØXXØXXXXFXXLX (Ø= hidrofobik aminoasitler) korunmuş motifleri içermektedirler. LRR domeinleri fizyolojik koşullarda

ligandı ile çukur yüzeyi ile bağlantı kuran at nalı benzeri bir yapıdadırlar. Yalnızca çift iplikli RNA'yı tanıyan TLR3'ün LRR domeini, ligandı ile tümsek yüzeyi ile ilişki kurmaktadır [85]. TLR'ler ve tanıdıkları ligantları tablo 1'de gösterilmiştir.

TLR	TLR'lerin tanıdığı PAMP	PAMP'ların ait olduğu türler
TLR1/TLR2	Triaçil-lipopeptitler	Bakteriler ve Mikobakteriler
TLR2	Peptidoglikan	Gram pozitif bakteriler
TLR2	Porinler	<i>Neisseria</i>
TLR2	Lipoarabinomannan	Mikobakteriler
TLR2	Fosfolipomannan	<i>Candida albicans</i>
TLR2	tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>
TLR2	Hemaglutinin	Kızamık virusu
TLR2 ve TLR4	Glukuronoksilomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>
TLR3	dsRNA	Viruslar
TLR4	LPS	Gram negatif bakteriler
TLR4	Mannan	<i>Candida albicans</i>
TLR4	Glikoinozitolfosfolipitler	<i>Trypanosoma</i>
TLR4	Zarf proteinleri	RSV, MMTV
TLR4	Isı-şok proteinleri 60, 70	Konak hücreler
TLR4	Fibrinojen	Konak hücreler
TLR5	Flajellin	Flajellalı bakteriler
TLR6/TLR2	Diaçil lipopeptitler	<i>Mycoplasma</i>
TLR6/TLR2	Lipoteikoikasıit	Grup B Streptokoklar
TLR6/TLR2	Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TLR7 ve TLR8	ssRNA	RNA virusları
TLR9	CpG-DNA	Bakteriler ve Mikobakteriler
TLR9	Hemozoin	<i>Plasmodium</i>
TLR9	DNA	Viruslar
TLR11	Profilin-benzeri moleküller	<i>Toxoplasma gondii</i>

Tablo 1: TLR'ler ve ligantları [82]

TLR'ler genellikle hücrenin dış yüzey membranlarında eksprese edilirlerken, nükleik asitleri tanıyan TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 yalnızca endozom ve fagozomların lümenlerine bakan yüzlerinde, membran yapılarına bağlı olarak eksprese edilirler [83,85]. Genel olarak TLR'ler tarafından kullanılan iki farklı hücre içi sinyal yolu vardır. Bu yollardan birisi

transkripsiyon faktörü NF- κ B nin aktivasyonu ile sonlanır. NF- κ B, inflamasyonu tetikleyen pek çok gen için etkili bir transkripsiyon faktörüdür. Diğer yol MAP kinaz p38 ve Jun N terminal kinaz (JNK) ların aktive olduğu yoldur ki bu kinazlar transkripsiyonu artırır ve AU tekrarları içeren mRNA'ların stabil kalmalarını sağlayarak ömürlerini uzatırlar [86,87].

M. tuberculosis CD14'ün desteğine ihtiyaç duymaksızın TLR 2 ve TLR4 ile bağımsız ligant etkileşimi kurmakta ve hücre içi ikincil sinyallerin doğmasına sebep olmaktadır [88].

- **C-Tipi Lektin Reseptörler “C-Type Lectin Receptors”:** Çoğu dendritik hücreler ve makrofajların yüzeyinde sentezlenmekte olan bu reseptörler hücre-hücre adezyon molekülü olarak işlev görmelerinin yanında MHC I , MHC II ya da CD1 yoluyla antijen sunumu için görev yapan reseptör bağımlı endositoz noktalarıdır. Bir yandan da patojeni tanıma işlevlerini yerine getirmektedirler. C-tipi lektin reseptörler; MR (Mannoz reseptörleri), Langerin “*Langerhans Cell-associated C-type Lectin*”, DC-SIGN, Dectin “*Dendritic Cell-associated C-type lectin*”, MGL “*Macrophage specific Lectin*” farklı hücrelerde bulunurlar ve mannoz yapısında olan ya da ona benzeyen N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin ve β -glukanları, Lewis X, A, B, Y, antijenlerini, HIV, HCV, SARS ve Filovirusların zarf yapılarını, bakteriler ve parazitere ait yapıları tanıyabilirler [81].

- **NOD benzeri reseptörler “Nucleotide-binding Oligomerisation Domain-Like Receptors”:** NOD benzeri reseptörler TLR'ler ya da C-tipi lektin reseptörler gibi membranlarda bulunmazlar. Sitoplazma içerisinde serbest olarak dolaşırlar. İki farklı domainleri bulunur. Bunlardan birisi nükleotid yapılarla oligomerizasyon kurabilen ve peptidoglikanın yapısında yer alan γ -Dglutamil-mezo-diaminopimelik asit ve muramil dipeptit gibi ligantları tanıyan domeindir. Diğer domain ise IL-1 β ve IL-18 gibi sitokin ekspresyonunu ya da apoptozu sağlayacak sinyalleri başlatabilmektedir. [82].

4.3.4.2. Edinilmiş bağışık yanıt

Edinilmiş bağışıklık doğal bağışıklık elemanlarının uyarılmasıyla tetiklenen, T ve B lenfositlerin işlev gördüğü, çok fazla sayıda antijenik determinantı tanıyabilecek kapasitede olan repertuarın arasından değişken gen parçalarının yeniden düzenlenmesi ve klonal seçilimi ile sürdürülen, tek bir antijenik determinanta karşı oluşan bellek özelliği bulunan bir yanıttır. Hücresel bağışık yanıt, T hücre aktivasyonu ve bunların efektör işlevleri ile yürütülür. Sıvısal bağışık yanıt ise B lenfosit olgunlaşması ve antikör sentezi ile sağlanmaktadır. Her iki tip edinilmiş bağışık yanıt hücreleri arasında önemli etkileşimler gerçekleşmektedir. Yardımcı T

lenfositler antikor gelişimine, immünglobulin izotipi değişimine ve bellek oluşumuna katkı sağlarlarken, B lenfositler ise antijen sunan hücreler olarak T lenfositlere destek olurlar [12,89]. Doğal ve edinilmiş bağışıklık sisteminin etkileşimi ile sentezlenen sitokinler sonucun hücrel ve sıvısal ve regülatör bağış yanıtların ortaya çıkışı Şekil 2’de gösterilmiştir.

- **Sıvısal Bağışık Yanıt:** *M. tuberculosis* hücre içi bir patojen olduğu için sıvısal bağışık yanıt patojenin üstesinden gelinmesinde tek başına yeterli değildir. Ancak enfeksiyonun ilk dönemlerinde antikorlar, opsonizasyon, kompleman aktivasyonu, sitokin yanıtlarının artırılması, antikor bağımlı sitotoksikite, artmış antijen sunumu ve yaratılan bu mikro çevre sayesinde tüberküloz basilinin özellikle mukozal yolla alınmasını önleyebilmektedirler.

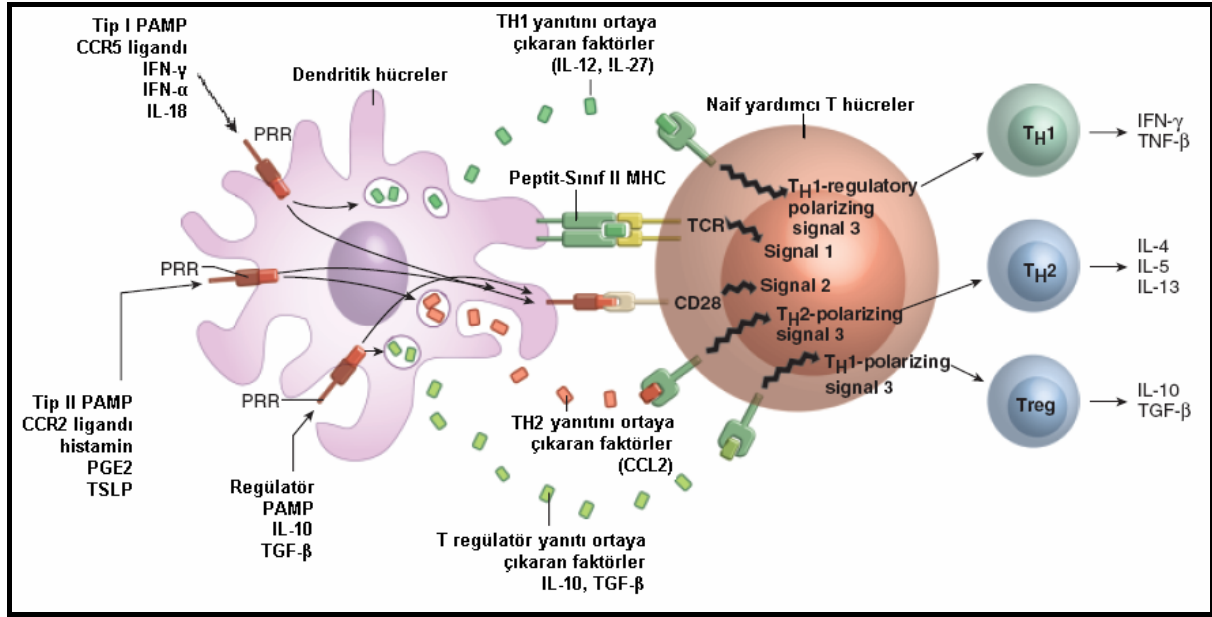
Sıvısal bağışık yanıtın göstergesi olan antikor düzeyinin ölçümü, kullanımı kolay ve ucuz bir yöntem olduğu için pek çok hastalığın tanısında kullanılmaktadır. 1898 yılında Arlöing, tüberküloz hastalarının serumları ile tüberküloz basillerinin aglutinasyon verdiğini göstermiştir [90,19]. 1970’li yıllardan beri pek çok araştırmacı ELISA yöntemi ile tanı koymak amacı ile en uygun *M. tuberculosis* antijenlerini ve optimum kullanım koşullarını belirlemeye çalışmışlardır. Kültür filtratı, bakteriyel ekstraktlar, tüberkülin ve bunun saflaştırılmış deriveleri (PPD), Lipopolisakkarit ve glikolipitler, ESAT-6, CFP-10, 19-kDa, 14-kDa, 16-kDa, 38-kDa, MTB64, MTB-48, MTB81, MPT51, A-60, TB15.3, Ag-85, lipoarabinomannan ve diaçiltrehaloz gibi antijenlere karşı serolojik yanıtlar araştırılmışsa da henüz yeterli duyarlılık ve özgüllükte olan bir serolojik test geliştirilememiştir [90,91].

- **Hücrel Bağışık Yanıt:** *M. tuberculosis* enfekte ettiği hücre içerisinde çoğu patojenin ortadan kaldırılmasını sağlayan mekanizmaların üstesinden gelerek uzun yıllar “dormant” basil biçiminde hayatta kalabilmektedir. Hücrel bağışık yanıt, latent tüberküloz basilinin enfeksiyon hastalığı oluşturmalarını engelleyerek kontrol altında tutar.

Makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücrelerin MHC II molekülleriyle sunduğu antijeni tanıyan CD4+ yardımcı T lenfositler, IFN- γ ve çeşitli sitokinler salarak makrofajları aktive ederler. Böylece aktif makrofajların içerdikleri basilleri öldürme yetenekleri artar. Bunun yanında CD4+ T lenfositler CD95 Fas ligandı yoluyla da enfekte hücrelerin apoptozunu sağlamaktadırlar [92].

Lenf düğümlerinde CD4+ yardımcı T lenfositlerle olgun dendritik hücreler etkileştiğinde CD8+ sitotoksik T lenfositler de işlevsel hale gelmektedirler. CD8+ sitotoksik T lenfositler MHC I ile antijen sunumuna yanıt olarak, başta IFN- γ olmak üzere çeşitli sitokinler

salgılar. Ayrıca perforin, granzim ve granulizini ile enfekte hücreler ve tüberküloz basiline karşı sitolitik aktivite gösterirler [19].



Şekil 2: Hücresel, sıvısal ve regülatör yanıtın ortaya çıkışı [91]

CD4+ hücreler içerisinde CD25 molekülünü yüksek düzeyde sentezleyen regülatör T lenfositler bulunmaktadır. Regülatör T lenfositler yüzey temasıyla hem CD4+ hem de CD8+ T lenfositleri baskılamakta, yalnızca IFN- γ sentezini değil T hücre proliferasyonunu da durdurmaktadırlar. Çoğunlukla CD4+ CD25+ fenotipik özellik gösteren bu T lenfosit alt grubu otoimmün reaksiyonları önleyen periferik toleransı sağlamaktadırlar [93,94].

- **Gamma/Delta T lenfositler:** Çoğu CD4- CD8- fenotipindeki bu T lenfositler CD1 ile antijen sunan hücreleri tanıyabilen, daha önceleri tamamının regülatör oldukları düşünülen gamma / delta (γ/δ) T hücre reseptörlerine sahiptirler. Bu hücrelerle yapılan araştırmalarda, dendritik hücreler tarafından sentezlenen IL-23'e yanıt olarak IL-17 ve IFN- γ sentezledikleri, Fas ligand ve perforin yoluyla sitolitik aktivite gösterdikleri ve antijen sunabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca sentezledikleri anti enflamatuar sitokinlerle tüberküloz basili ile enfekte dokularda zamanla CD4 veya CD8 reseptörleri taşıyan T lenfositlerinin yerini alarak enfeksiyonun sınırlandırılmasına ve enflamasyonun sona ermesine katkı sağlamaktadırlar [19,95,96].

4.3.5. Konak bağışıklık sistemi ve tüberküloz basilinin etkileşimi

Reaktif oksijen ve nitrojen radikalleri tüberküloz basiline karşı savaşı defans mekanizmalarının en önemlilerindendir. IFN- γ , TNF- α ve 1,25 dihidroksi kolekalsiferol (vitamin D₃), varlığında yapımı artan indüklenbilir nitrikoksit sentaz-2 (iNOS-2) enzimi; arjinini substrat olarak kullanarak reaktif nitrojen radikallerinin oluşumunu sağlamaktadır [97]. Doğal dirençten sorumlu, makrofaj proteini (Nramp) “*natural resistance associated macrophage protein*” sitozoldeki nitritleri fagozomlara taşır. Nitritler burada nitrik okside dönüştürülmektedirler. Nramp proteini mutasyonlarının *M. tuberculosis*’e karşı olan duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir [98].

İnflamatuar yanıt ve yapımı tetiklenen pek çok kemokin ve sitokin varlığı nötrofillerin, NK hücrelerinin, γ/δ T lenfositlerinin ve α/β T lenfositlerinin inflamasyonun olduğu dokulara göçünü sağlamaktadır. Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) etkisi ile fagositöz yetenekleri artan nötrofiller ürettikleri defensiler gibi moleküllerin yardımıyla makrofajlardan bağımsız olarak mikobakterileri öldürebilirler [99,100].

Benzer biçimde NK hücreleri de savunmaya katkı sağlamaktadır. Patojeni ve patojenle enfekte makrofajları doğrudan lizis ile öldürebilirler. NK hücreleri, *invivo* koşullarda enfeksiyonun üstesinden gelinmesinde önemli rolü olan hücrelerdir. IL-2 ile aktive olan NK hücreleri sitotoksik etkilerini kat kat artırırlar [101]. Sentezledikleri IFN- γ ’da, tüberküloz basili ile enfekte hücrelerin apoptozuna neden olur [102].

4.4. GEN KLONLAMA

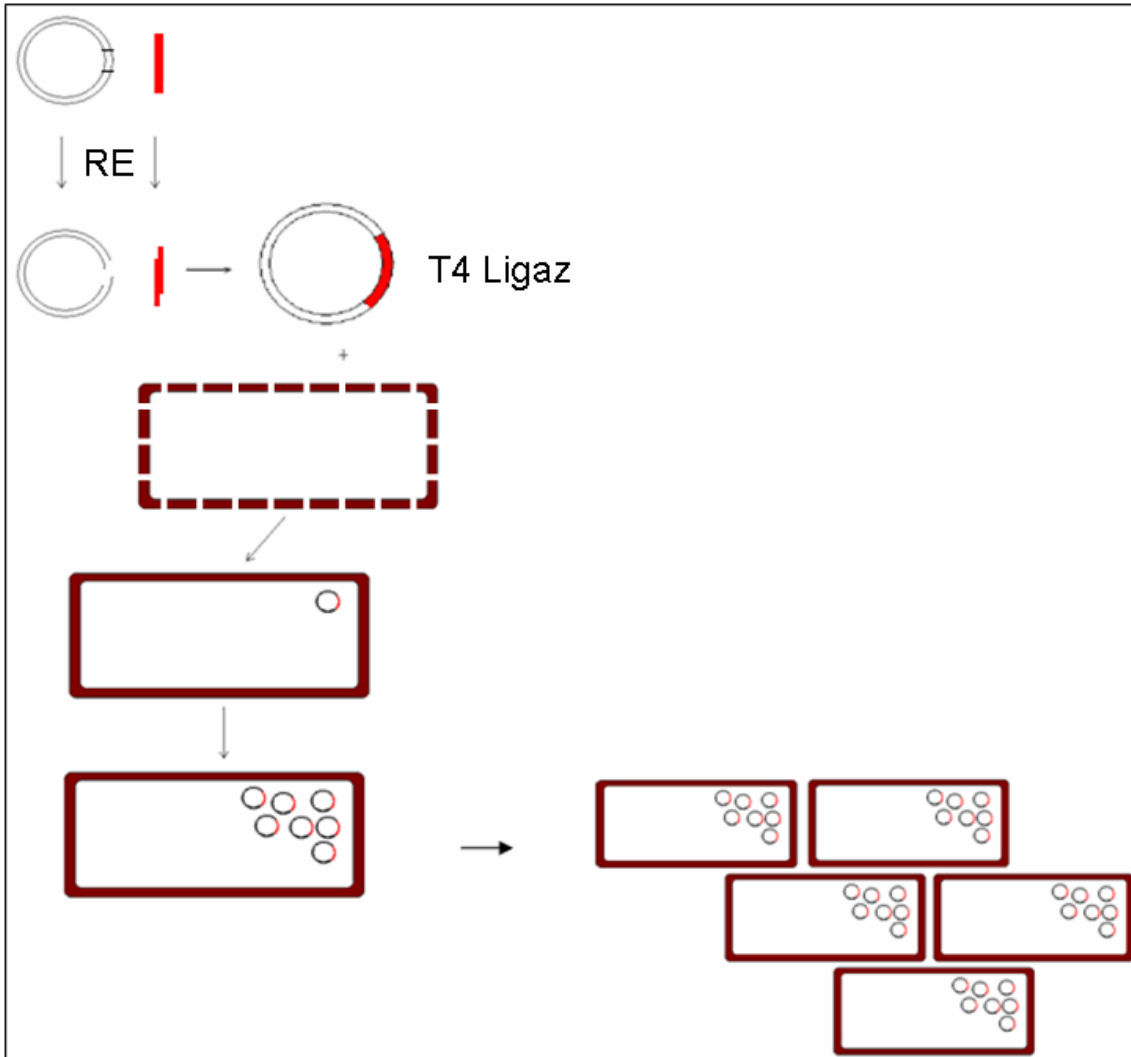
Gen klonlama; bir genetik bilginin (DNA) başka bir organizmaya aktarılması anlamına gelir. Klonlama sonrası aktarılan genetik bilginin yapısal ve işlevsel özellikleri araştırılabilir. Bu genetik bilginin kendisinden ve ürünlerinden faydalanılabilir [103].

Uygulama basamakları [Şekil 3];

- Genetik bilgi; dokulardan, hücrelerden ya da füzyon PZT yöntemi ile laboratuvar şartlarında izole edilir.
- Genetik bilgi DNA ise PZT, RNA ise RT-PZT ile çoğaltılır.

- PZT ürünlerinin vektör içerisine yerleşmesini sağlayacak yapışkan ya da küt uçların elde edilmesi için, hem PZT ürünü hem de vektör, bir veya iki restriksiyon enzimi ile kesilir.
- Restriksiyon enzimleriyle kesilmiş PZT ürünleri ve vektör bir araya getirilir.
- DNA ligaz enzimi kullanılarak kovalan bağlı rekombinant bir vektörün oluşması sağlanır.
- Konak hücreye aktarılan rekombinant vektör, sadece vektörün içerdiği özelliğe uygun seçici koşullar altında canlı kalabilen konak hücrelerle beraber çoğaltılır.

Bu vektör, konak hücrelerden izole edilebilir, başka konak hücelere aktarılabilir, içerdiği genetik bilginin transkripsiyon ve translasyon ürünleri araştırma amacıyla ya da ticari amaçla kullanılabilir [103,104].



Şekil 3: PZT ürününün vektöre klonlanması ve konak hücrelerde çoğaltılması

4.4.1. Restriksiyon enzimlerinin seçimi

Klonlama işlemi, vektöre ait çoklu klonlama sahasının incelenmesi ile başlar. Klonlanacak DNA dizisinin, vektör içerisinde yerleştirilmesi için en az bir restriksiyon enzimi kullanılır.

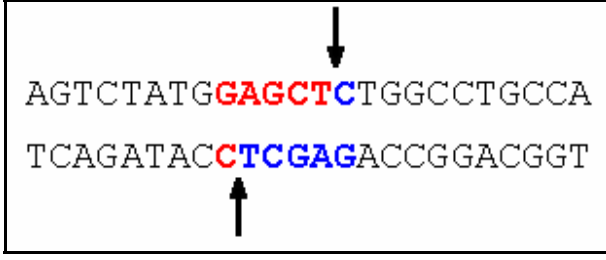
Restriksiyon enzimleri; metilaz aktiviteleri, alt ünite yapıları, kesim özgüllükleri ve kofaktör ihtiyaçlarına göre; tip I, tip II, tip III ve homing endonükleazlar olarak incelenirler [105]. Restriksiyon enzimlerinin farklı tipleri ve çeşitli özellikleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

	Tanıma Dizileri	Kesim noktası Tanıma dizisinin	İhtiyaç duydıkları	Diğer işlevleri
Tip I restriksiyon enzimleri	Asimetrik	Dışarısından	ATP, Mg^{2+} , adomet	Metilasyon
Tip II restriksiyon enzimleri	Simetrik	İçerisinden	Mg^{2+}	-
Tip III restriksiyon enzimleri	Asimetrik	Dışarısından	ATP	Metilasyon, modifikasyon
Homing endonükleazlar	Uzun ve Asimetrik	Özgül değil	Protein, RNA	DNA’nın yapılanması

Tablo 2: Restriksiyon enzimlerinin farklı tipleri ve çeşitli özellikleri [106]

Klonlama çalışmalarında genellikle, tip II restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır. Homodimerik yapıda olan bu enzimler çift iplikli DNA’yı küt bazen de yapışkan uçlar bırakacak biçimde keserler [Şekil 4].

Çoklu klonlama sahasını kesebilecek restriksiyon enzimlerinden bir veya iki tanesi belirlenmelidir.



Şekil 4. *SacI*, restriksiyon enziminin kesim özelliği: Tanıma dizisi 6 nükleotid uzunluktaki 5'-**GAGCTC**-3'dir ve enzim her iki iplikte bulunan bu diziyi 5. (T) ve 6. (C) nükleotitlerin arasından keser, böylece geride yapışkan uçlar bırakır.

Bu sırada dikkat edilmesi gereken noktalar şunlardır;

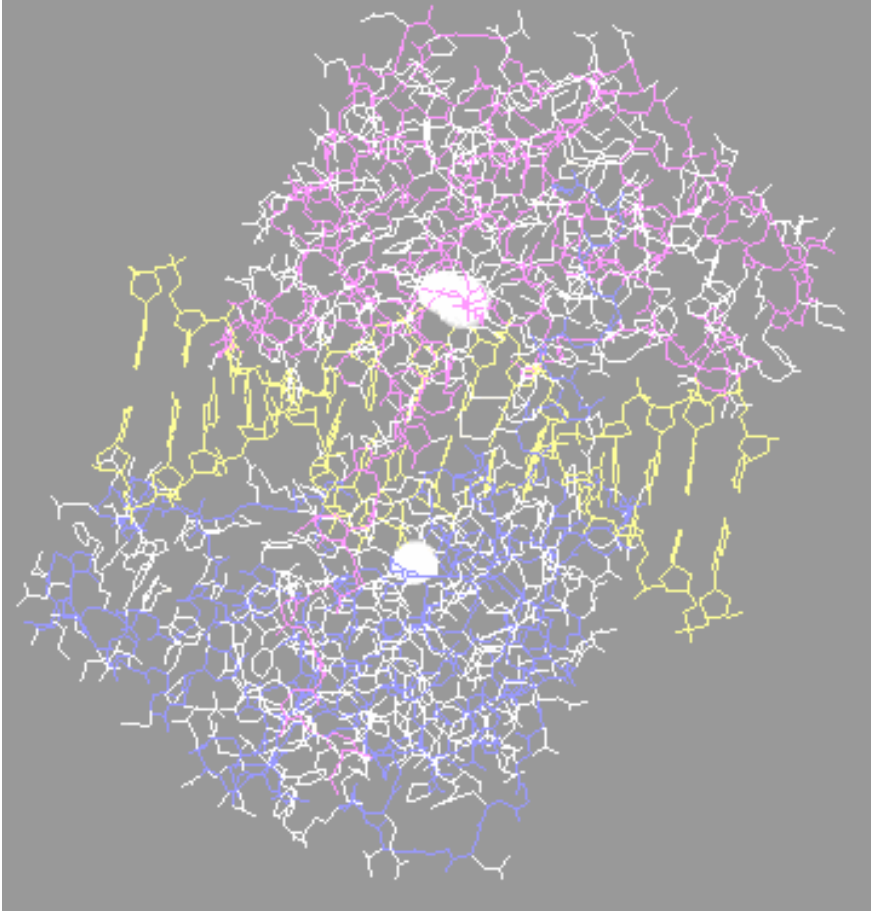
- Çoklu klonlama sahasında tanıma dizisi bulunan restriksiyon enzimlerinin içinde klonlanacak DNA dizisini istenmeyen bir noktadan kesenleri varsa bu enzimler kullanılmamalıdır.
- Klonlanacak genin amino ya da karboksi uçlarına yeni füzyon proteinlerinin eklenmesi planlanıyorsa insert'ün amino ya da karboksi uçlarında restriksiyon enzimi tanıma dizileri bırakılmalıdır. Bunun yerine kullanılacak primerlerin uçlarına başka restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri eklenebilir.
- Çok yakın komşuluktaki tanıma dizilerine sahip restriksiyon enzimleri kullanılmamalıdır. Tanıma dizileri birbirinden uzakta olan restriksiyon enzimleri tercih edilmelidir [Şekil 5].

PZT ile çoğaltılacak gen bölgesi için kullanılacak primerlerin uçlarında restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri bulunmalıdır. Hem klonlama vektörü hem de klonlanacak gene ait PZT ürünleri restriksiyon enzimleriyle, uygun tampon, sıcaklık ve sürelerde kesilirler. Kesim ürünleri, jel elektroforezi ile ayrımlanarak jelden ya da DNA bağlayıcı kolonlar kullanılarak reaksiyon ürününden saflaştırılırlar. Böylece; kısa DNA parçalarından, enzimlerden, tuzlardan ve primerlerden arındırılmış olurlar.

Bu işlemler sırasında dikkat edilmesi gereken noktalar;

- Bağlayıcı kolon temizleme yöntemi uygulanıyorsa, artık DNA parçalarının boyu, kolonun bağlayabildiği en küçük DNA parçasından (örneğin; 70 bp) daha küçük olmalıdır.

Jelden ekstraksiyon yöntemi uygulanıyorsa, oluşabilecek pirimidin dimerleri ligasyonu engelleyeceğinden UV transluminatörle çalışma süresi mümkün olduğunca kısa tutulmalıdır.



Şekil 5: *HincII* restriksiyon enziminin tanıma sahası 6 nükleotid uzunluktaki 5'-**GTTACC**-3' dizisidir. Ancak çift iplikli DNA'da 14 nükleotid uzunluktaki 5'-GCCG**GTTA**ACCGGC-3' bölgeye bağlanır [107].

4.4.2. DNA ligasyonu

PZT ürünü ile vektörün uygun yoğunluk ve oranlarda bir araya getirilir. Ardından uygulanacak ligasyon basamağıyla vektör ve insert kovalent bağlı bir DNA molekülü haline gelir. T4 DNA ligaz enzimi çift iplikli DNA'nın 5' ucunda yer alan fosfat grubunu ATP kullanarak 3'-OH grubuna bağlamaktadır.

T4 ligaz enzimi yapışkan uçların ligasyon reaksiyonlarını, küt uçlarındakinden 10 kat daha verimli biçimde gerçekleştirir. Bu nedenle 20 µl'lik bir reaksiyon karışımına 1 ünite yerine 0,1 ünite eklenen T4 ligaz enzimi, küt uçlar yerine daha çok yapışkan uçların ligasyonunu sağlar.

4.4.3. Transformasyon

Ligasyon reaksiyonu ürünlerinin transforme olmaya hazır hale getirilmiş (kompetan) konak hücrelere aktarılmasıdır. Konak hücrelerin kompetan hale getirilmesi için farklı yöntemler kullanılabilir.

a) Fiziksel Yöntemler

- Por açılması yöntemleri: Bu işlem sırasında CaCl_2 , RbCl_2 veya düşük voltajlı elektrik akımı ile hücre çeperlerinde oluşturulan yarık ve cepler sayesinde vektör DNA'sı içeriye girebilmektedir.
- Mikroenjeksiyon yöntemi: Vektör DNA'sı, hedeflenen hücreye mikropipetler kullanılarak inoküle edilmektedir.
- Biyolistik yöntemler: Vektör DNA'sı ile kaplanmış ağır metal tanecikleri mikroprojektil cihazlarla hücrelere fırlatılmaktadır.

b) Kimyasal Yöntemler

Bu yöntemde kalsiyumfosfat ile çöktürülen vektör DNA'sı konak hücrelerine eklenir. Konak hücre membranına tutunan vektör DNA'sı hücreler tarafından içeriye alınır.

c) Füzyon Yöntemleri: Lipozomlar ve eritrositler gibi hücre membranları ile özdeş yapılar içerisindeki vektör; hedef hücrelere membran kaynaşması ile aktarılır.

4.4.4. Kolonilerin seçimi

Vektörü içeren konak hücrelerin hayatta kalabileceği seçici ortamlar kullanılarak çoğaltılır. Transformasyon sonrası vektörü taşıyan koloniler zamanla seçici besiyerinin niteliğini değiştirirler (örneğin; β -laktamaz salgılayarak) ve zamanla çevrelerinde satellit koloniler oluşabilir. Transforme olduğu düşünülen koloniler, gecikilmeden yeni seçici ortamlara aktarılmalıdır.

4.4.5. Klonlamanın doğrulanması

Vektör içerisine, insert'ün doğru yönde ve uygun çerçevede yerleştiği sekanslama ile gösterilebilir. Bu amaçla vektöre özgü primerlerle başlayan ve insert'i kapsayan DNA dizisi sekanslanmalıdır. Proteine özgü antikorların kullanıldığı koloni-blotlama; istenilen proteinin eksprese edildiğini ve proteini en iyi düzeyde eksprese eden kolonileri gösteren daha kolay uygulanabilir bir yöntemdir.

4.4.6. Ekspresyon sisteminin belirlenmesi

Klonlanan genin, içine sokulduğu konakta yeteri kadar eksprese olması gereklidir. Bu amaçla pek çok ekspresyon sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemlerin her birinin bazı dezavantajları olduğundan rekombinant protein üretimi, hala yeni tasarımlara açık bir teknolojidir. Ekspresyon sisteminin klonlanan protein için uygun olup olmadığına dikkat edilmelidir. Ekspresyon sisteminin seçilmesi önemli bir basamaktır. Translasyon sonrası modifikasyonlara ne düzeyde gereksinim duyulduğu bilinmelidir.

Karboksi-terminal glikozilasyon gibi karbonhidrat kalıntılarının protein uçlarına eklenme basamakları organizmaya göre farklılıklar gösterebilir. Örneğin mikobakteri türlerine ait bazı proteinlere eklenen terminal karbohidrat kalıntıları *E. coli* içerisinde eksprese edildiklerinde gerçekleşmediğinden, konak hücre olarak patojen olmayan, *Mycobacterium smegmatis* tercih edilebilmektedir [108].

Proteini daha ucuza maledebilmek özellikle ticari amaçlı ekspresyon sistemlerinde tercih sebebidir.

4.4.7. Bakteriyel ekspresyon sistemleri

Pahalı olmayan koşullarda iyi optimize edilmiş, kolay uygulanabilir yöntemlerle hücre proteinlerinin %50 kadarını rekombinant protein olarak eksprese edildiği sistemlerdir [109-111]. Proteinler genellikle sitoplazmada yoğunlaşırlar. Sekrete edilebilmelerini sağlayan sinyal sekansları içeriyorlarsa periplazmik aralıkta yoğunlaşırlar. Periplazmik aralıkta disülfid-oksidoredüktaz etkinliği daha yüksek olduğundan, proteinlerdeki disülfid köprüleri daha yüksek oranda kurulmaktadır. Bakteriyel proteazlar sitoplazmada daha yoğun olarak bulunmaktadır. Periplazmik aralıkta şaperonların daha yoğun, proteazların ise düşük yoğunlukta olması, sentezlenen proteinin stabilizasyonunun daha iyi olmasını ve proteolitik degradasyonunun daha az olmasını sağlar [112-114].

4.4.8. Ekspresyon vektörleri

Çeşitli promotör bölgelerinin kontrolü altında eksprese edilecek proteine ait genetik bilginin yerleşeceği çoklu klonlama sahası bulunur. Bu sahalarda pek çok restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerini içermektedir.

Bu bölgelerin amino ya da karboksi uçlarında proteinlerin afinite kromatografileri ile saflaştırılabilmelerini sağlayan peptit parçalarını kodlayan DNA dizileri bulunabilir. Bu parçalar, 6-histidin, FLAG ya da c-myc gibi kısa peptit dizileri olabileceği gibi DHFR, Green fluorescent protein (GFP), alkalen fosfataz (AP) gibi daha büyük ve işlevsel proteinler olabilir.

Bazı proteinlerin, seçilen ekspresyon sistemine toksik etkileri olabilir. Kimi zaman, bu tür ekspresyon zorlukları bazı önlemlerle ortadan kaldırılabilir. Bu amaçla, proteinin toksik etkilerini ortaya çıkaracak kadar birikmesini engellemek için, baskılayıcı maddeler kullanılabilir.

Ekspresyon vektörü, klonlanan genin yabancı bir konakta başarılı biçimde ifade edilmesi için gereken çeşitli ekspresyon sinyallerini içerir. Bu nedenle, transkripsiyon ürünü olan mRNA yı sentezleyen RNA polimeraz, promotör bölgeye bağlanabilmesini kolaylaştıran bazı proteinlere gereksinim duyar. Transkripsiyon etkinliğinin düzenlenmesinde promotör tipleri çok önemlidir. Kuvvetli promotörlerde transkripsiyon etkinliği yüksektir.

Transkripsiyon işlevi düzenlenebilen ekspresyon vektörlerinde, promotör bölgesine bağlanacak olan RNA polimeraz enzimi, mRNA sentezlemeye başlayacağı noktaya gelene kadar ilerlerken önce operatör gen bölgesini aşmak zorunda kalır. İndüksiyon (uyarma) veya represyon (baskılama), moleküllerin operatör bölgeye bağlanması veya önceden buraya bağlanmış bir kompleksi uzaklaştırmaları ile olur.

E. coli'de sık kullanılan ekspresyon vektörlerine ait promotörler

Lac β -galaktozidazı şifreleyen lacZ geninin promotörü.

Trp Triptofan sentezi gen kümesinin promotörü.

Tac rp/lac promotör melezleri biçiminde rekombine edilmiş kuvvetli promotör.

λ PL λ fajına ait kuvvetli promotör.

T7 T7 fajı RNA polimerazına özgü, kuvvetli promotörlerdir.

Ekspresyon vektörleri; afinite kromatografilerinde saflaştırma işlemlerini kolaylaştıran, eksprese edilecek proteinin çözünürlüğünü arttıran veya sekrete edilmesini sağlayan peptit dizileri taşıyabilir. Füzyon proteinlerin oluşturulması sırasında translasyon için doğru okuma çerçevesinin sağlanması önemlidir. Eksprese edilmesi istenen proteinlerle füzyon proteinlerinin aralarına proteinaz tanıma sekansları (örneğin enterokinaz enziminin tanıma dizisi) yerleştirilebilir. Böylece proteinazlar kullanılarak proteinler birbirlerinden ayrılabilirler.

Organel varlığını gerektiren translasyon sonrası modifikasyonların prokaryotik konak hücrelerde yapılamaması önemli bir kısıtlılıktır.

Rekombinant proteinin doğru şekilde katlanamaması, disülfid bağlarının yeterince oluşmaması ve inklüzyon cisimcikleri meydana gelmesi gibi sorunların çözümünde, fazla miktarda şaperon proteinleri sentezleyen *E. coli* konak hücre suşlarının kullanımı tercih edilebilir. Rekombinant proteinin hızla yıkımı söz konusu olduğunda, bazı proteinazlarca mutant *E. coli* suşları da kullanılabilir.

Rekombinant proteinlerin hücre içi yerleşimlerini amaca uygun olarak değiştirmek gerekebilir. Protein yapısının korunmasında etkili olan özellikler (Örneğin, fare proinsulininin *E. coli*'deki yarı ömrü sitoplazmada ~2 dakika iken periplazmik aralıkta yaklaşık 10 kat daha uzun), protein sekresyonunu sağlayan sinyal sekansların kullanımını zorunlu kılmaktadır.

4.4.9. Protein ekspresyonu

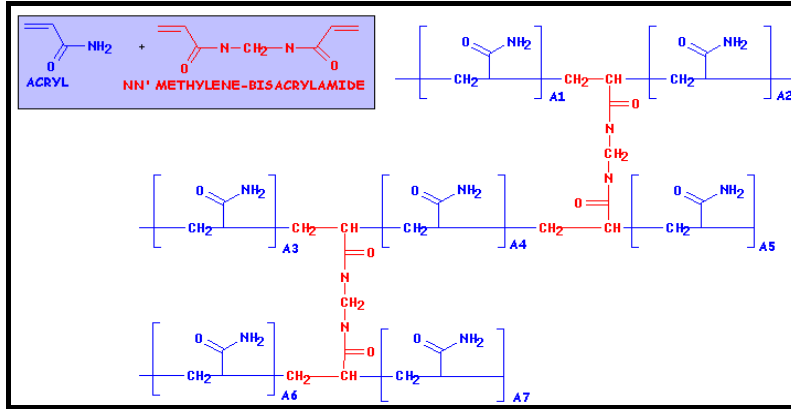
Vektör içerisine klonlanan gen genellikle, IPTG, arabinoz gibi maddelerle uyarılabilen bir operatör bölge tarafından kontrol edilir. Uygun beslenme şartları, sıcaklık, logaritmik üreme fazındaki hücre yoğunluğu ($OD_{600}=0,4-0,8$), uyarıcı madde yoğunluğu ve uyarılma süresi gibi parametreler değiştirilerek en verimli ekspresyon koşulu belirlenir. Hücrelerin logaritmik faza ulaşıncaya kadar inkübe edildikleri sıcaklık, proteinlerin uyarıcı madde olmadan gerçekleşen bazal ekspresyon düzeylerini etkilemektedir. Bu amaçla konak hücre için toksik etki gösteren proteinlerin ekspresyon koşulları düzenlenirken uyarılma öncesi bazal ekspresyonu azaltmak amacıyla sıcaklığın 15°C'ye kadar düşürülmesi gerekebilir. Aşırı hidrofobik yapıda olduğu bilinen ve kontrol vektörü taşıyan konak hücrelere kıyasla hızlı üreme fazı daha uzun olan proteinin konak hücre için toksik olabileceği düşünülmelidir. Toksik etki gösteren proteinlerin ekspresyonlarının başarısını arttırmak için, uyarım öncesi ulaşılması hedeflenen hücre yoğunluğunun azaltılması, ortama operatörü baskılayıcı maddeler (örneğin %1 glikoz) eklenmesi, konak hücrelerin supresör sentezleyen plazmitler (Örneğin Lac supresörü sentezleyen pREP4) ile transformasyonu gibi önlemler alınabilir.

4.4.10. Protein ekspresyonunun kanıtlanması

Hücrelerin uyarılma öncesi ve sonrası protein içerikleri karşılaştırılmaktadır. Önce hücresel proteinler SDS-PAGE ile ayrımlanarak doğru büyüklükteki bant varlığı araştırılır. Daha sonra Western blotlama yöntemi ile jeldeki proteinler bir membrana aktararak saptanır. Bununla birlikte protein ekspresyonunun olup olmadığını anlamak için, pek çok koloniyi aynı anda taramamızı sağlayan dot blotlama ve koloni blotlama gibi hızlı yöntemler de bulunmaktadır.

4.4.10.1. SDS-PAGE

Bu amaçla genellikle glisin veya trisin SDS-PAGE sistemleri kullanılmaktadır. Aralarındaki fark tamponların içindeki Trisin ya da Glisin varlığıdır. Her iki sistemin ortak özellikleri içeriklerinde tek zincir oluşturacak biçimde polimerleşebilen akrilamit ve polimer zincirlerin birbirlerine çapraz bağlayarak ağ benzeri bir yapı oluşumunu sağlayan metilen-bis-akrilamittir [Şekil 6]. Bu reaksiyon, akrilamit ve metilen-bis-akrilamitin bir arada bulunduğu solüsyonlarda kendiliğinden ve yavaş olarak gerçekleşmektedir. Polimerleşmenin hızlı olabilmesi için ortamda serbest sülfat radikallerine ihtiyaç vardır. TEMED (Tetrametiletilendiamin), amonyum persülfatın serbest sülfat radikallerine ayrışmasını sağlar ($S_2O_8^{2-} + e^- \text{---(TEMED)} \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{\cdot-}$). Bu amaçla ortama TEMED ve taze hazırlanmış amonyumpersülfat da eklenmektedir.



Şekil 6: Akrilamit ve polimerleşen zincirin çapraz bağlarını sağlayan metilen-bis-akrilamit [115].

Polimerize olan jelin yüzdesi içeriğindeki akrilamit ile belirlenir. Glisin veya Trisin-SDS-PAGE sistemleri 1 ile 500 kDa büyüklükteki proteinlerin ayrımlanmalarını sağlarlar. Ancak 30 kDa'dan küçük proteinlerin ayrımlanmasında Trisin-SDS-PAGE sistemi daha iyi çözünürlük sağlamaktadır. Bunun nedeni Trisin ve Glisinin fonksiyonel gruplarının pK

değerlerinin (**Glisin** $pK_{a1}= 2,34$, $pK_{a2}= 9,6$; **Trisin** $pK_a= 8,15$) başka bir deyişle, peşlerinden sürükledikleri iyonların elektroforetik hareketliliğinin proteinlerin hareketliliğine oranlarının, farklı olmasına bağlıdır.

4.4.10.2. Western blotlama yöntemi

SDS-PAGE sonrası jelde yürütülerek ayrımlanan protein bantları ıslak veya yarı kuru elektrotransfer sistemleriyle nitroselüloz ya da PVDF membranlara aktarılırlar. Daha sonra varlığını göstermek istediğimiz proteine özgü enzim işaretli antikorlarla inkübasyon ve bloklama işlemleri gerçekleştirilir. Eğer kullanılan birincil antikor enzim işaretli değilse, enzim işaretli olan ikincil antikorla inkübe edilir. Inkübasyon sonrası renk ya da ışımaya veren substratlar kullanılarak saptama yapılır. Işıma veren bir substrat kullanılmış ise fotoğraf filmi veya kemiluminesan aktiviteyi saptayan CCD kameraya sahip görüntüleme cihazları kullanılabilir.

4.4.10.3. Koloni blotlama yöntemi

Transformasyon sonrası seçici ortama aktarılan hücrelerin 16 saat inkübasyonu sonrası oluşan kolonileri üzerine besiyeri plağı boyutunda nitroselülöz membran kapatılır. Kaldırılan nitroselülöz membran IPTG ve antibiyotik içeren yeni besiyerine aktarılır. Dört saatlik inkübasyon sonrası istenilen proteinin eksprese olup olmadığı ve düzeyini anlamaya yönelik olarak nitroselülöz membranda saptama işlemine geçilir.

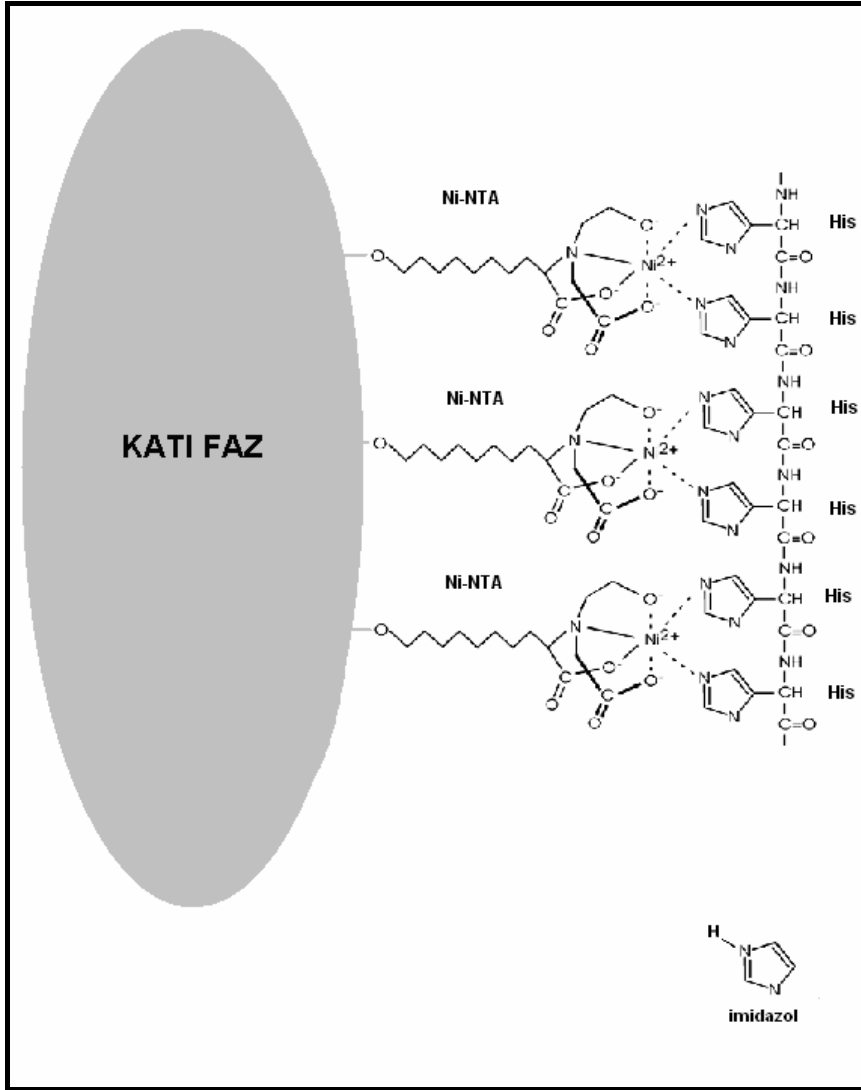
4.4.10.4. Dot-Blot yöntemi

Koloni blotlama yöntemindeki gibi nitroselülöz membran kullanılır. Hücre lizatı ya da saflaştırılmış protein preparatı nitroselülöz membrana damlatılır ve havada kurutulduktan sonra bloklama işleminin ardından proteine özgü enzim işaretli antikorlar kullanılarak saptama işlemine geçilir.

4.4.11. Proteinlerin saflaştırılması

Ni-NTA afinite kromatografi tekniğinde; proteinlerin amino veya karboksi terminal uçlarında yer alan histidin amino asiti tekrarı sayesinde proteinler, her biri 2 ayrı Histidin amino asitini bağlayan nikel-nitrilotriasetik asit molekülleriyle kaplı katı faza tutunurlar.

Protein içeren lizatin kromarografi matriksine eklenmesinden sonra pH'ı giderek düşürülen tamponlarla yıkama basamaklarına geçilir. Yıkama tamponlarının içerikleri ve pH düzeyleri, arındırılmak istenen konak hücre kalıntılarına göre değiştirilebilir. Son olarak nikel-nitrilotriasetik asit molekülündeki nikel atomunun hidrojen bağları, elüsyon tamponunun pH'ı düşürülerek ya da histidin amino asitinin analogu olan imidazol ile doyurulur. Böylece proteinler matriksi bırakarak elüsyon tamponuna geçerler [Şekil 7].



Şekil 7: 6-His tag taşıyan proteinler ile Ni-NTA agaroz etkileşimi.

Protein preparatındaki endotoksin varlığı antijen sunan hücreler ve T lenfositlerden sitokin salınımına yol açar. Endotoksin düzeyi bazal sitokin sentezini arttıracak seviyenin altında olmalıdır (< 3 EU endotoksin / 1 µg protein yani < 300 pg endotoksin / 1 µg protein). Protein preparatının içindeki endotoksin düzeyini ölçmek amacıyla çeşitli yöntemler

kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisinde; LPS varlığında uyarılarak alkalen fosfataz sentezleyen hücre hattı (TLR4 ve koreseptörleri olan MD2 ve CD14 genleri ile NF- κ B promotör kontrolündeki alkalen fosfataz geni ile transfekte edilmiş HEK293 hücreleri) kullanılmaktadır. Diğer bir yöntemde ise “*Limulus polyhemus of horseshoe crab*” özütü kullanılır. *Limulus polyhemus*’un özütü ortama endotoksin eklendiğinde pıhtılaşmaktadır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Çalışma grubu

Çalışmaya Nisan 2007 ile Haziran 2007 tarihleri arasında Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi polikliniğine gelen ve tüberküloz servisine yatırılan hastalar ile Haziran 2007 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi, KBB (Kulak burun boğaz) ve Üroloji servislerine cerrahi operasyon amacıyla yatırılan hastalar dahil edildi.

Çalışmaya alınan hasta ve sağlıklı gönüllü bireylerin klinik özellikleri

Çalışmaya Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden katılanlar; klinik, radyolojik ya da laboratuvar bulguları ile tüberküloz tanısı almışlardı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden; sol kollarında BCG aşı skarı bulunan, tüberküloz hastalığı ya da yakın temas öyküsü bulunmayan, malignite saptanmamış, bağışıklık sistemini baskılayan herhangi bir tedavi almayan ayrıca akciğer grafilerinde tüberkülozla ilişkili radyolojik bir bulgu saptanmayan gönüllüler çalışmaya alındı.

Etik kurul onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik kurullarınca çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik açıdan bir sakınca olmadığı belirlendi.

5.1.2. Ayraçlar

Ampisilin stok solüsyonu (100 mg / ml)

Ampisilin (Applichem A0839,0010)	1 g
Distile su	10 ml'ye tamamlandı.
10 adet ependorfa, 1'er ml dağıtılarak -20 °C'de saklandı.	

Kanamisin stok solüsyonu (50 mg / ml)

Kanamisin (Applichem A1493,0025)	0,5 g
Distile su	10 ml'ye tamamlandı.
10 adet ependorfa, 1'er ml dağıtılarak -20 °C'de saklandı.	

Luria-Bertani (LB) agar (Applichem A0927,9010) Oda sıcaklığında saklandı.

Ampisilinli (100 µg/ml) ve Kanamisinli (25 µg/ml) LB agar hazırlanışı

20g LB agar distile su ile 500ml'ye tamamlandı, otoklavlandı.

100 mg/ml'lik ampisilin stok solüsyonundan 500µl'si ve 50 mg/ml'lik kanamisin stok solüsyonundan 250 µl'si 50-55°C'ye kadar soğutulan LB agar içerisine eklenerek karıştırıldı. LB Agar plaklara dökülerek +4 derecede saklandı.

LB Broth (Sigma L3022) Oda sıcaklığında saklandı.

Ampisilinli (100 µg/ml) ve Kanamisinli (25 µg/ml) LB broth hazırlanışı

10g LB broth distile su ile 500ml'ye tamamlandı, otoklavlandı.

100 mg/ml'lik ampisilin stok solüsyonundan 500µl'si ve 50 mg/ml'lik kanamisin stok solüsyonundan 250 µl'si LB broth içerisine eklendi.

+4 °C'de saklandı.

Glikoz çözeltisi (2M)

D-Glikoz Monohidrat (Riedel-de Haen 5996-10-1) 3,96 g

Distile su 10 ml'ye tamamlandı.

+4 °C'de saklandı.

SOB besiyeri

Tripton 20 g

Maya Özütü 5 g

NaCl (Applichem A2942,0500) 0.5 g

Distile su 1000 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlandı. Daha sonra içerisine

Filtre edilen 1M MgCl₂ çözeltisinden 10 ml

Filtre edilen 1M MgSO₄ çözeltisinden 10 ml

eklendi ve +4°C'de saklandı.

SOC besiyeri

Filtre edilmiş 2M'lik Glikoz stok çözeltisi 1 ml

SOB besiyeri 99 ml

SOC besiyeri taze hazırlanarak kullanılır.

EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu (500 mM)

Na₂EDTA (Sigma E5134) 18,6 g

Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

EDTA pH=8'de erir. pH'ı ayarlamak için 100 mM'lık NaOH kullanıldı. Otoklavlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Isopropanol (Applichem A3928, 0500PE) Oda sıcaklığında saklandı.

%70'lik Etanol

%96 EtOH (TEREOS – SDA Brabant F02390) 73 ml

Distile su 27 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

Agaroz (Sigma A9539) Oda sıcaklığında saklandı.

Tris-EDTA (TE 1X) pH=8

Tris-HCL (Sigma T5941) 1,576 g

500 mM EDTA 2 ml

Bi-distile su 1000 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

Tris-Borik asit-EDTA (TBE 5X)

Trizma base (Sigma T1503) 54 g

Borik asit (Sigma B6768) 27,5 g

500 mM EDTA 20 ml

Distile su 1000 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

Etidyum bromit 1000X solüsyonu (5 mg/ml)

Etidyum bromit (Sigma E8751) 0,5 g

Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı, oda sıcaklığında saklandı.

Jel yükleme tamponu (Fermentas #R0629) -20 °C'de saklandı

Magnezyum sülfat çözeltisi (1M)

MgSO₄-H₂O (Applichem A1811,0500) 12,04 g

Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Magnezyum klorit çözeltisi (1M)

MgCl₂-6H₂O (Applichem A4425,1000) 20,33 g

Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) stok çözeltisi (100 mM)

IPTG (Applichem A1008,0001) 0,238 g

Distile su 10 ml'ye tamamlandı.

10 adet ependorfa, 1'er ml dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

Proteaz inhibitör kokteyli (Sigma P8849) -20 °C'de saklandı.

Ni-NTA kolon kromatografisinde kullanılan tamponlar;

Tampon B (pH=8,0)

Tris (Applichem A2264, 0500) 0,121 g

NaH₂PO₄ (Applichem A2944,1000) 1,56 g

Üre (Applichem A1049,1000) 48,05 g

Nonidet P-40 (Applichem A1694,0250) 0,5 ml
Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Tampon C (pH=6,3)

Tris (Applichem A2264, 0500) 0,121 g
NaH₂PO₄ (Applichem A2944,1000) 1,56 g
Üre (Applichem A1049,1000) 48,05 g
Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Tampon D (pH=8,0)

Tris (Applichem A2264, 0500) 0,121 g
Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Tampon R (pH=8,0)

Tris (Applichem A2264, 0500) 0,121 g
2-propanol (Applichem A3465, 1000) 60 ml
Distile su 40 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

Tampon E (pH=4,5)

Triflorasetikasit (Applichem A0697,0100) 1 ml
Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Diyaliz Membranı (Chemicon Tube-O-Dialyzer 2047) +4 °C'de saklandı.

Akrilamit, bis-akrilamit tamponu (AB-3)

Akrilamit (Applichem A3812, 0500) 48,0 g

Bis-Akrilamit (Applichem A3636, 0100) 1,5 g

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı 7 - 10 °C'de saklandı.

10X anot tamponu (pH=8,9)

Tris (Applichem A2264, 0500) 12,11 g

Hidro klorik asit (Applichem A1437, 2500) 0,225 M

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 7-10 °C'de saklandı.

10X katot tamponu (pH=8,25)

Tris (Applichem A2264, 0500) 12,11 g

Trisin (Applichem A3954, 0500) 17,92 g

SDS (Applichem A2263,0100) 1,0 g

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 7-10 °C'de saklandı.

3X jel tamponu (pH=8,9)

Tris (Applichem A2264, 0500) 36,33 g

Hidro klorik asit (Applichem A1437, 2500) 1,0 M

SDS (Applichem A2263,0100) 0,3 g

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 7-10 °C'de saklandı.

2 X SDS-PAGE örnek tamponu

500 mM Tris-HCL çözeltisi pH=6,8 2,5 ml

Gliserol (Applichem A2926,1000) 2,0 ml

β-merkaptotanol (Applichem A1108,0250) 0,4 ml

Bromfenol mavisi (Applichem A2331,0025) 0,02 g

SDS (Applichem A2263,0100) 0,4 g

Distile su ile 10 ml'ye tamamlandı ve 500 µl'lik hacimlerde -20 °C'de saklandı.

SDS-PAGE jeli fiksasyon çözeltisi

Amonyum asetat (Merck KGaA A140015) 0,77 g

Metanol (Sigma-Aldrich 34885)	50 ml
Glasial Asetik Asit (Merck KGaA K23695156)	10 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Jeli Coomassie-blue boya çözeltisi

Coomassie blue G-250 (Applichem A3480,0025)	0.25 g
Glasial asetik asit (Merck KGaA K23695156)	10 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE jeli Coomassie blue boyasından arındırma çözeltisi

Glasial Asetik asit (Merck KGaA K23695156)	10 ml
Distile su	90 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

PBS

NaCl (Applichem A2942,1000)	8.03 g
KCl (Applichem A2939,1000)	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ (Applichem A2943,1000)	1.42 g
KH ₂ PO ₄ (Applichem A2946,1000)	0.25 g

Distile su ile 10000 ml'ye tamamlandı ve Oda sıcaklığında saklandı.

PBS-t

Tween-20	0,5 ml
PBS	1000 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

Bloklama solüsyonu

Yağsız Süt tozu	5 g
-----------------	-----

PBS-t 100 ml

Taze hazırlandı.

HPP ile konjuge Anti-His antikör solüsyonu

HPP ile konjuge Anti-His antikoru(Invitrogen R941-25) 3 µl

Bloklama solüsyonu 10 ml

Taze hazırlandı

Fitohemagglutinin (Biochrom ag M 5030) -20 °C’de saklandı.

100 bp DNA ladder (Fermentas SM0241) -20 °C’de saklandı.

1 kb DNA ladder (Fermentas #SM0318) -20 °C’de saklandı

2 mM dNTP karışımı (Fermentas #R0241) -20 °C’de saklandı

Pfu DNA polimeraz (Promega #EP0502) -20 °C’de saklandı

Fast Digest BamH I (Fermentas ER 0058) -20 °C’de saklandı

Fast Digest Hind III (Fermentas ER 0508) -20 °C’de saklandı

Nükleospin plazmit DNA ekstraksiyon kiti (M&N 740 588,50)

A1 solüsyonu RNAz A eklenerek +4 °C’de saklandı.

Diğer solüsyonlar ve kolonlar ise oda sıcaklığında saklandı.

PZT ürünü temizleme kiti (GeneMark DP04-50) Oda sıcaklığında saklandı.

İnsan IFN-γ ELISA kiti (eBioscience 88-7316-88)

İnsan IFN-γ standartları -80 °C’de saklandı

Diğer Solüsyonlar +4 °C’de saklandı.

İnsan IL-10 ELISA kiti (eBioscience 88-7106-88)

İnsan IL-10 standartları -80 °C’de saklandı

Diğer Solüsyonlar +4 °C’de saklandı.

Heparinli kan tüpü

BD-Vacutainer Sodyum Heparin’li 8002864

Oda sıcaklığında saklandı.

ELISA plağı (96 kuyucuklu) (eBioscience Nunc Maxisorp 44-2404-21)

Oda sıcaklığında saklandı.

ELISA plağı (24 kuyucuklu) (Greiner bio-one 662160)

Oda sıcaklığında saklandı.

ELISA plağı kaplama filmi (Sigma 369667-100EA) Oda sıcaklığında saklandı.

Protein konsantrasyonu saptama kiti:

a) **Bicinchoninic asit solüsyonu** (Sigma B9643) Oda sıcaklığında saklandı.

b) **Bakır (II) sülfat solüsyonu** (Sigma C2284) Oda sıcaklığında saklandı.

c) **Protein standart solüsyonları** (Sigma 0914-SAMP) +4 °C’de saklandı.

HRP ile konjuge mouse-anti-(amino terminal) 6xHis antikoru :

Invitrogen R941-25, +4 °C’de saklandı.

Amino ucunda 6xHis taşıyan DHFR :

pQE40 vektörü ile M15 *E. coli* suşunda eksprese edildi ve -20 °C’de saklandı.

Bakteri suşları ve ekspresyon vektörleri:

M15 *E.coli* suşu hem klonlama hem de ekspresyon için konak hücre olarak kullanıldı.

pQE30 ekspresyon vektörü JM109 *E. coli* suşu içerisinde çoğaltıldı.

Suş	Genotip
JM109 <i>E. coli</i>	F' <i>traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺ B⁺/e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) relA1 supE44 recA1</i> (Promega)
M15 <i>E. coli</i>	Nal ^s Str ^s Rif ^s <i>lac ara gal mtl F⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i> (Qiagen)
Top10 <i>E. coli</i>	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r)endA1 nupG</i> (Invitrogen)
BL21 star <i>E. coli</i>	F - ompT hsdS B (r B - m B -) gal dcm rne131 (Invitrogen)

Vektör

pQE30(Qiagen)

pREP4 (Qiagen)

pet100/D-TOPO (Invitrogen)

5.1.3. Ekipman

Distile su cihazı :

Şimşek Labortechnik SS200

Jel görüntüleme cihazı :

VILBER LOURMAT 0519563

Santrifüj cihazı :

Heraeus Labofuge 400R

Kromatografi kolonu:

Polypropylene columns Qiagen 34964

Kromatografi matriksi:

Ni-NTA Agarose Qiagen 30250

Elektro-blotlama cihazı:

Elektro-blotter Sigma Semi-dry blotter Z340502

Yatay jel elektroforez cihazı:

Thermo Minicell Submarine Gel System EC320

Dikey jel elektroforez cihazı:

Thermo Mini Vertical Gel System EC120

Etüv:

Heraeus 63450

Güvenlik kabini:

Bilser BLF 2000

Mikroskop:

Nikon Eclipse E400

PCR Isı Döngü Cihazı:

Techne TC-412

Sonikasyon cihazı:

Sonics Vibra-cell VC 100

Vorteks cihazı:

IKA NC 28405

Çalkalayıcı:

Labnet S 1000-A-220

DNA dizileme analizi cihazı:

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

DNA dizileme analizi cihazında kullanılan karışım:

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit Amersham

ELISA plak yıkayıcı:

ASYS Atlantis G021101

ELISA plak okuyucu:

ORGANON TEKNIKA Microwell System OT 2305

Spektrofotometre:

Thermo Multiscan Spectrum 1500-457

5.2. YÖNTEM

5.2.1 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşuna ait DNA'nın eldesi

Klonlanacak proteinlere ait gen bölgeleri *M. tuberculosis*'in kromozomal DNA'sından PZT ile çoğaltılarak elde edildi.

Ekstraksiyon basamakları:

1. *M. tuberculosis* H37Rv suşuna ait iyi üremiş 1 koloni güvenlik kabininde, vidalı kapaklı ependorfta bulunan 1 ml serum fizyolojik içerisine alındı, 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı.
2. Çökelti üzerine 250 µl TE tamponu eklenerek vortekslendi.
3. 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
4. Çökelti üzerine 250 µl TE tamponu eklenerek, 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. 11.000 g de 1 dakika santrifüj edildi
6. Süpernatant kısım DNA ekstraktı olarak -20 °C'de saklandı.

5.2.2. Protein kodlayan gen bölgesinin PZT ile çoğaltılması

Klonlanacak proteine ait gen bölgesi *M. tuberculosis* H37Rv suşuna ait kromozomal DNA'dan PZT ile çoğaltılarak elde edildi.

Primerler;

ESAT-6 ileri 5'-TTGGGATCCATGACAGAGCAG-3' ,

ESAT-6 geri 5'-ATAAAGCTTCTATGCGAACATCC-3'

BamHI ve HindIII restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerini içermektedirler. [116].

10X pfu tamponu (MgSO₄ de içerir) 10 µl

2mM dNTP karışımı 10 µl

ESAT-6 ileri primeri 5 µl

ESAT-6 geri primeri 5 µl

Pfu DNA polimeraz (1,25 U/50 µl) 1 µl

Distile su 65 µl

H37Rv suşu DNA ekstraktı 4 µl

PZT karışımı hazırlanarak,

95 °C’de 5 dakika ilk denatürasyon

95 °C’de 1 dakika	}	35 döngü
66 °C’de 1 dakika		
72 °C’de 1 dakika		

72 °C’de 7 dakika son uzatma

+4 °C’de bekleme programıyla çoğaltma gerçekleştirildi.

Primerler;

CFP-10 ileri 5’-TTGGGATCCATGGCAGAGATGAAG-3’ ,

CFP-10 geri 5’-ATAAAGCTTTCAGAAGCCCATTTCGC-3’

BamHI ve HindIII restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerini içermektedirler. [116].

10X pfu tamponu (MgSO₄ de içerir) 10 µl

2mM dNTP karışımı 10 µl

CFP-10 ileri primeri 5 µl

CFP-10 geri primeri 5 µl

Pfu DNA polimeraz (1,25 U/50 µl) 1 µl

Distile su 65 µl

H37Rv suşu DNA ekstraktı 4 µl

PZT karışımı hazırlanarak,

95 °C’de 5 dakika ilk denatürasyon

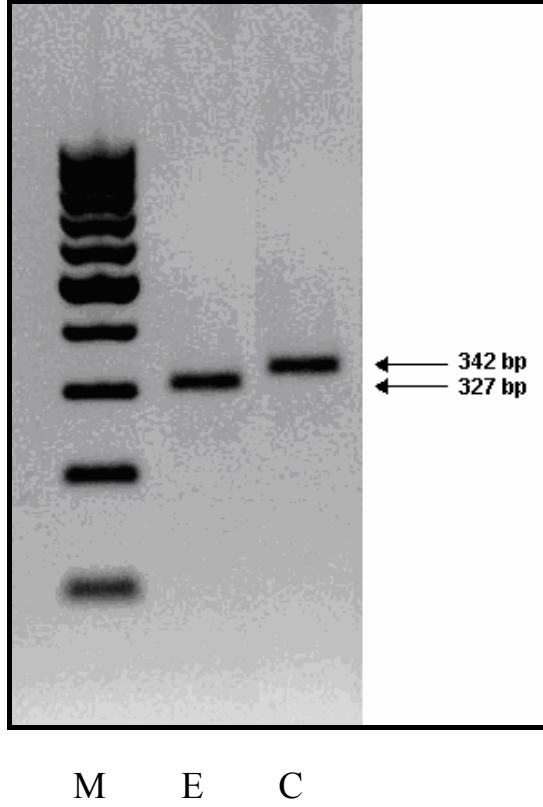
95 °C’de 1 dakika	}	35 döngü
66 °C’de 1 dakika		
72 °C’de 1 dakika		

72 °C’de 7 dakika son uzatma

+4 °C’de bekleme programıyla çoğaltma gerçekleştirildi.

3’-5’ ekzonükleaz aktivitesi olan Pfu DNA polimeraz enzimi Taq DNA polimeraz enzimine kıyasla çok daha hatasız PZT ürünü elde edilmesini sağlamaktadır.

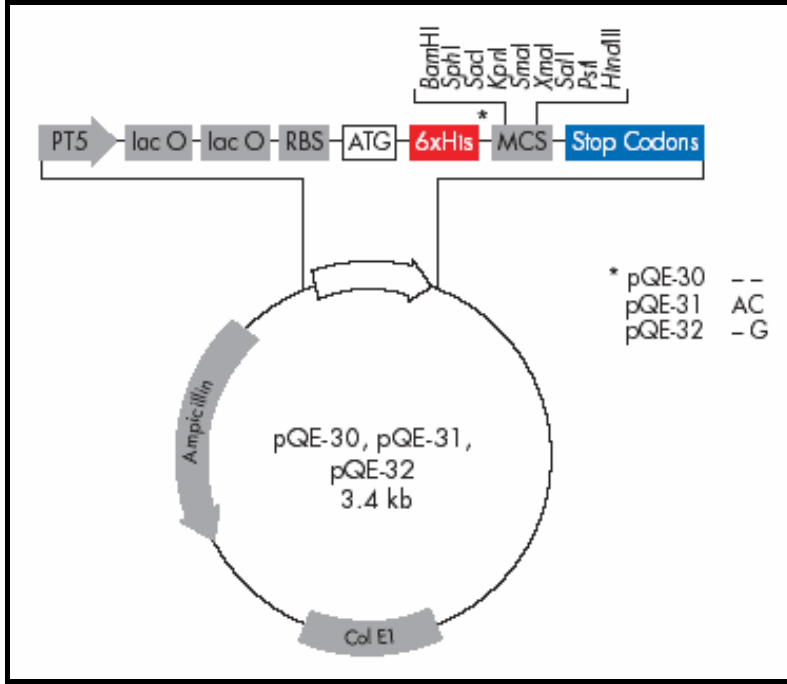
ESAT-6 ve CFP-10 PZT ürünlerinin %2’lik agaroz jel fotoğrafı Resim 3’de görülmektedir



Resim 3: ESAT-6 ve CFP-10’a ait PZT ürünleri; M: Marker, E: ESAT-6, C: CFP-10.

5.2.3. pQE30 vektörünün saflaştırılması

-80 °C’de stoklanmış, pQE30 [Şekil 8] ekspresyon vektörünü içeren JM109 *E. coli* hücreleri 100 µg / ml Ampisilin içeren 10 ml LB broth içerisinde, 37°C’de bir gece inkübe edildi. Miniprep plazmit ekstraksiyon kiti ile izole edildi.



Şekil 8: PQE30 ekspresyon vektörü

5.2.4 PZT ürünlerinin saflaştırılması

90 µl PZT ürünü üzerine 300 µl bağlayıcı “*binding*” tampon eklendi ve hafifçe vortekslendi.

Karışım saflaştırma kolonuna aktararak 11.000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpteki sıvı atıldı ve kolon 250 µl yıkama tamponu ile iki kez yıkandı. Yıkama sonrası 11.000 g’de 2 dakika santrifüj edilerek etanol içerikli yıkama tamponu ortamdan olabildiğince uzaklaştırıldı. Yeni ependorf’a aktarılan kolon üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklenerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. 11.000 g’de 1 dakika santrifüj edilerek PZT ürünü saflaştırılmış oldu.

Saflaştırılan PZT ürünü %2’lik, pQE30 ekspresyon vektörü de %1 lik agaroz jel elektroforezi sonrası, mass ruler bantları ile karşılaştırılarak yapılan hesaplama ile 100 ng / µl lik yoğunluğa getirildi.

5.2.5 Restriksiyon enzimleri ile kesim

Plazmit veya PZT ürünü (100 ng / µl)	2 µl
BamHI	1 µl
HindIII	1 µl
10X Restriksiyon enzim tamponu	2 µl

Distile su 14 µl

Karışım 37 °C’de 40 dakika inkübe edildi.

PZT ve plazmit kesim ürünleri, aynı kolon saflaştırma protokolü ile saflaştırıldı.

5.2.6. Ligasyon

Vektör	(30 fmol / µl)	1 µl
PZT ürünü	(30 fmol / µl)	3 µl
5X ligaz reaksiyon tamponu		4 µl
T4 Ligaz enzimi (1 U / µl)		0,5 µl
Distile su		11,5 µl

Karışım 25 °C’de 1 saat inkübe edildi.

5.2.7. CaCl₂ ile kompetan *Escherichia coli* hücrelerinin hazırlanması

25 µg / ml kanamisin içeren LB broth içerisinde 37 °C de bir gecelik kültürden,

1 ml → 50 ml 25 µg / ml kanamisin içeren LB sıvı besiyerine eklendi.

37 °C de 4,5 saat (OD600 ≈ 0,4 – 0,5) inkübe edildi.

20 ml kültür → Soğutulmuş falkonda 4000 g’de +4 °C 10 dakika santrifüj edildi.

Çökelti 10 ml 100 mM CaCl₂ (soğuk) çözeltisinde süspanse edildi

Buz üzerinde 30 dakika bekletildi.

4000 g’de +4 °C 10 dakika santrifüj edildi.

Çökelti 1 ml 100 mM CaCl₂ (soğuk) çözeltisinde süspanse edildi

100 µl’lik hacimlerde buz üzerindeki ependorflara alındı.

5.2.8. Kompetan *Escherichia coli* hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu

20 µl ligasyon ürünü 100 µl kompetan M15 *E. coli* hücrelerinin üzerine tek hamlede konuldu, pipetaj yapmadan hafifçe karıştırılarak bir kez masaya vuruldu. Buz üzerinde 30 dakika bekletildi. 42 °C’de 90 saniye bekletildi ve çalkalamadan tekrar buz üzerine alındı.

5 dakika bekletildikten sonra, üzerine 250 µl, daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş SOC besiyeri eklenerek 200 rpm de 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra 100 µl ve 200 µl

hacimlerde 25 µg / ml kanamisin ve 100 µg / ml ampicilin içeren LB agar yüzeyine, bir ucu alevde eğilmiş cam baget kullanılarak yayıldı.

5.2.9. Transformasyon sonrası üreyen kolonilerin yeni besiyerine inokülasyonu

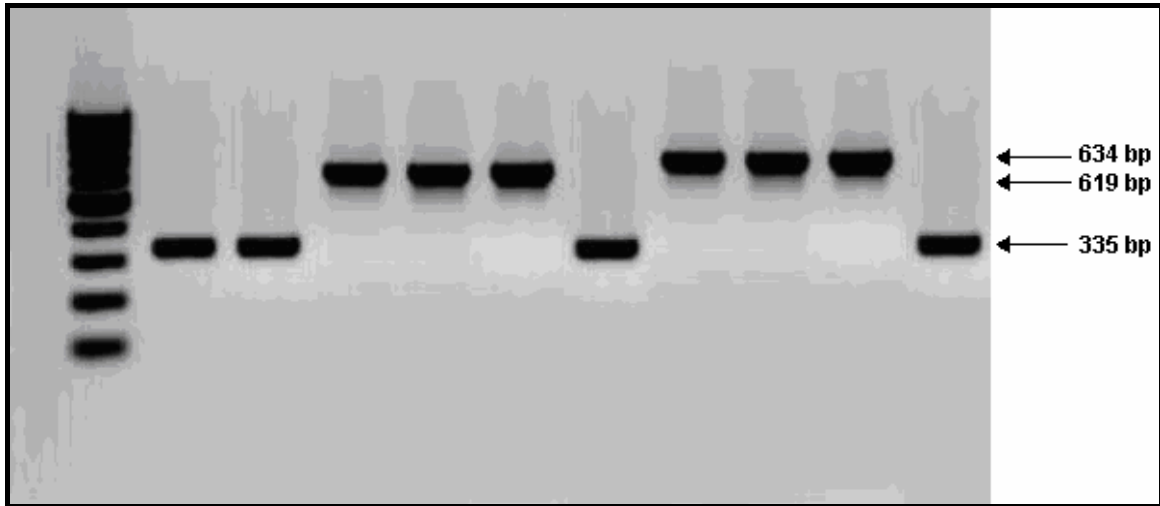
Transformasyon sonrası 14. saatte ve 17. saatte belirginleşmeye başlanan koloniler (ESAT-6 ile olası transforme M15 hücre kolonileri 43 adet ve CFP-10 ile olası transforme M15 hücre kolonileri 56 adet idi) pastör fırınında steril hale getirilmiş kürdanlar kullanılarak alt yüzü camayazar ile düzgün karelere bölünmüş antibiyotikli LB agar yüzeyine ve ependorflardaki antibiyotikli LB sıvı besiyerine inoküle edilerek 37 °C’ de bir gece inkübe edildi. LB agar yüzeyine alınan replikalar DNA dizileme sonuçları ortaya çıkana kadar +4°C’de saklandı.

5.2.10. Seçilen kolonilerden DNA eldesi

Ependorflara alınan replikaların 11.000 g’de santrifüjlenerek elde edilen hücre çökeltileri 250 µl steril distile su eklenerek 10 dakika kaynatıldı. 11.000g’de tekrar santrifüjlenerek bu kez süpernatant kısımları DNA ekstraktı olarak -20 °C’de saklandı.

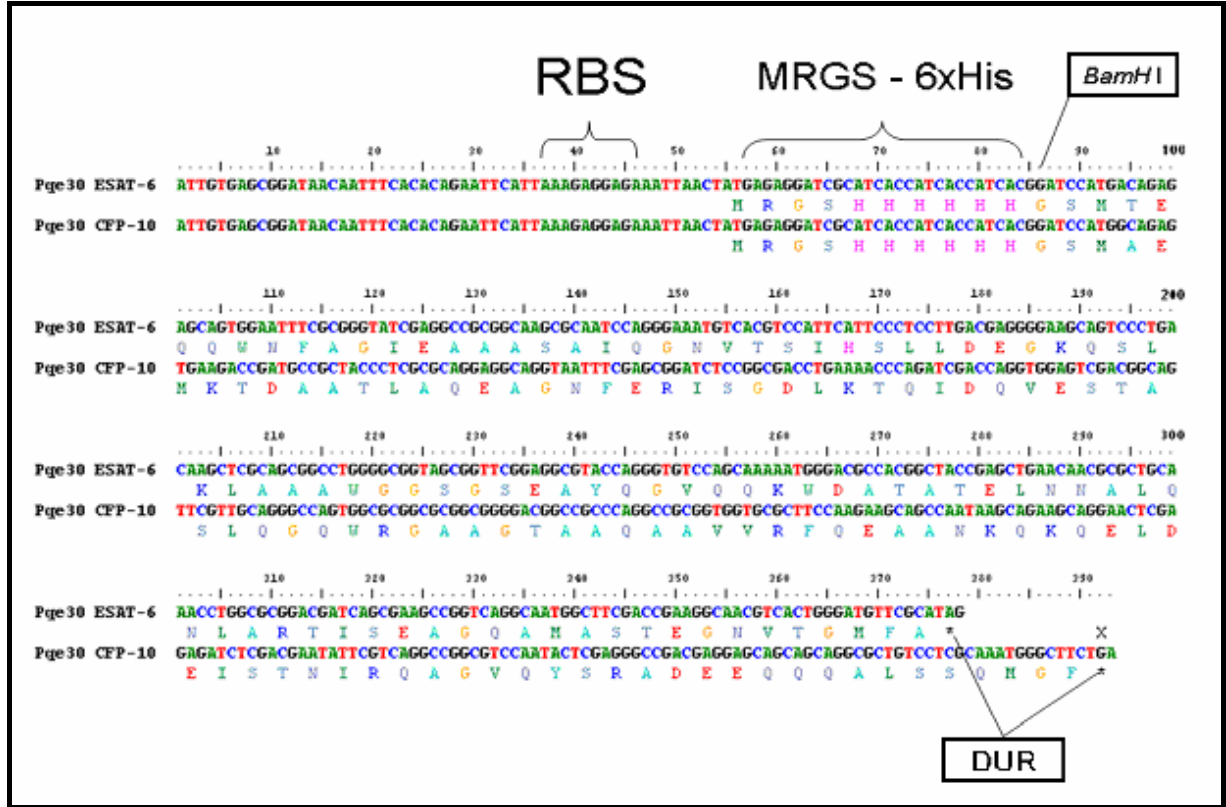
5.2.11. Dizileme primerleri kullanılarak elde edilen PZT ürünlerinin dizi analizi

ESAT-6 ve CFP-10’a ait olası transforme kolonilerden rastgele seçilen 5’er tanesine ait DNA izolatları ile dizileme primerleri kullanılarak elde edilen PZT ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütüldü. Jel fotoğrafı Resim 4’de gösterilmektedir.



Resim 4: ESAT-6 ve CFP-10’a ait, olası transforme kolonilerden elde edilen PZT ürünleri; sırasıyla; Marker, E1, E2, E3, E4, E5, C1, C2, C3, C4, C5 (ESAT-6 içeren bantlar 619 bp, CFP-10 içeren bantlar 634 bp, insert içermeyen bantlar ise 335 bp büyüklüktedir).

ESAT-6 ve CFP-10'a ait doğru büyüklükte PZT bantlarına sahip (olasılıkla ileri dizileme primeri ile başlayıp geri dizileme primeri ile biten, insert'ü içeren DNA bantını taşıyan) plazmitler miniprep plazmit ekstraksiyon kiti kullanılarak ekstrakte edildi ve DNA dizi analizleri yapıldı.



Şekil 9: ESAT-6 ve CFP-10 taşıyan ekspresyon vektörlerine ait DNA dizi analizi sonuçları ve beklenen translasyon ürünlerinin aminoasit dizileri (RBS:Ribozomal bağlanma sahası)

Doğru yönlü ve çerçeve kayması olmadan yerleşebilen DNA'ları içeren plazmitlerin dizileme sonuçları ve beklenen translasyon ürünlerinin aminoasit dizileri Şekil 9'da görülmektedir.

Uygun plazmitleri taşıyan M15 *E. coli* hücreleri +4 °C' deki replikalari kullanılarak 900 µl antibiyotikli LB sıvı besiyeri içeren ependorflara inoküle edildi. 8 saat 37 °C 'de inkübe edildi. Üzerine 100 µl %50 lik gliserol eklenerek -80 °C'de saklandı.

5.2.12. Proteinlerin saflaştırılması

1. Transforme hücreler, -80 °C'de saklanan %5 gliserollü stoktan, 100 µg/ml ampisilin, 25 µg/ml kanamisin içeren LB sıvı besiyeri içerisine alınarak bir gece inkübe edildi.

2. 50 katı hacmindeki 100 µg/ml ampicilin, 25 µg/ml kanamisin içeren yeni LB sıvı besiyerine aktarıldı.
3. 37 °C de 200 rpm de OD₆₀₀=0,7 oluncaya dek inkübe edildi.
4. 1 mM IPTG eklendi ve 37 °C’de 200 rpm de 4 saat daha inkübe edildi.
5. +4 °C’de, 4000 g’de 7 dakika santrifüj yapıldı, elde edilen hücre çöktelleri -70 °C’de saklandı.
6. 50 ml hacimdeki kültürden elde edilen çöktelti üzerine 30 µl proteaz inhibitör kokteyli eklendi.
7. Buz üzerinde 5-10 dakika erimesi beklendi.
8. Üzerine 1500 µl hacimde % 0,5 NP-40 içeren tampon B eklenerek köpürtmeden vortekslendi ve homojenizasyonu sağlandı.
9. Karışım buz üzerinde soğutulmuş ependorfa aktarıldı.
10. +4 °C’de , % 70 amplitütte, 1 saniye sonikasyon 1 saniye bekleme dönemleri ile 1 dakika süren sonikasyon işlemi 3 kez tekrarlandı.
11. Oda sıcaklığında 1 saat süre ile köpürtmeden vortekslenerek, inklüzyon cisimciklerinin olabildiğince açılması sağlandı.
12. 10.000 g’de, 25 dakika santrifüj yapıldı.
13. Hücre lizatının süpernatant kısmı alınarak, buz üzerinde soğutulmuş yeni bir ependorfa aktarıldı.
14. 1200 µl süpernatana 300 µl kullanıma hazır (%50 lik) Ni-NTA agaroz eklenerek 200 rpm’de, 1 saat köpürtmeden vortekslendi ve karışım boş kromatografi kolonuna aktarıldı.
15. Karışımı içeren kolon, 700 g de 2 dk santrifüj yapıldı, süzülen kısım -20 °C’de saklandı.
16. 1200 µl tampon C eklenerek, 700 g’de 2 dk. santrifüj yapıldı, birinci yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C’de saklandı.
17. 1200 µl tampon C eklenerek, 700 g’de 2 dk. santrifüj yapıldı, ikinci yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C’de saklandı.
18. 1200 µl tampon C eklenerek, 700 g’de 2 dk. santrifüj yapıldı, üçüncü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C’de saklandı.

19. 1200 µl tampon R eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı, 1. İP'lü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
20. 1200 µl tampon D eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı, 1. İP'süz yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
21. 1200 µl tampon R eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı, 2. İP'lü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
22. 1200 µl tampon D eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı, 2. İP'süz yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
23. 1200 µl tampon R eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı, 3. İP'lü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
24. 1200 µl tampon D eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı, 3. İP'süz yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
25. 1200 µl tampon R eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı, 4. İP'lü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
26. 1200 µl tampon D eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı, 4. İP'süz yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
27. 150 µl % 1'lik TFA eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı ve elüe edildi.
28. 150 µl % 1'lik TFA eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı ve önceki elüsyona ilave edildi.
29. 150 µl % 1'lik TFA eklenerek, 700 g'de 2 dk. santrifüj yapıldı ve önceki elüsyona ilave edildi.
30. Elüsyon karışımlarının 20 µl'si SDS-PAGE için -20 °C'de saklandı.
31. Elüsyon karışımının kalan kısmına, iki defa, 50 ml PBS'e karşı diyaliz uygulandı.
32. Yaklaşık 500 µl olan protein preparatı, 50 µl hacimlerde alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

5.2.13. SDS-PAGE için örneklerin ve jelin hazırlanması

%10 luk Tris-Trisin SDS poliakrilamit jelin hazırlanması

- Cam levhalar jelin cama yapışmasını önlemek için izopropanol ile silindi ve cam levhaların arasına aralayıcı ("*spacer*") yerleştirildi.

- % 10 lik ayırma jelinin hazırlanışı;

Distile su	3,7 ml
AB-3 Tamponu	2,0 ml
3X Jel Tamponu	3,3 ml
Gliserol	1,0 ml
Amonyum persülfat (% 10)	50 µl
TEMED	5 µl

Çalkalanarak homojenizasyonu sağlandı ve hemen döküldü.

Polimerizasyonu sırasında hava kabarcığı oluşmaması için üzerine izopropanol eklendi, 1 saat sonra dökülerek 5 dakika kuruması beklendi.

- %4'lük yığma jelinin hazırlanışı;

Distile su	4,0 ml
AB-3 Tamponu	0,5 ml
3X Jel Tamponu	1,5 ml
Amonyum persülfat (% 10)	45 µl
TEMED	5 µl

Çalkalanarak homojenizasyonu sağlandı. Jel hemen döküldü ve taraklar yerleştirildi.

1 saat yığma jelinin polimerize olması için beklendi ve taraklar dikkatlice çıkartıldı.

Su banyosu 95 °C' ye ayarlandı.

- Hücre lizatı, lizatın matriksten süzüntüsü, yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı kısımlar ve diyaliz sonrası elde edilen protein preparatlarının üzerine kendilerine eşit hacimde 2X SDS-PAGE örnek tamponu eklendi. Örnekler 95 °C'de 7 dakika kaynatıldı ve 12.000 g'de 10 saniye santrifüj yapıldı.

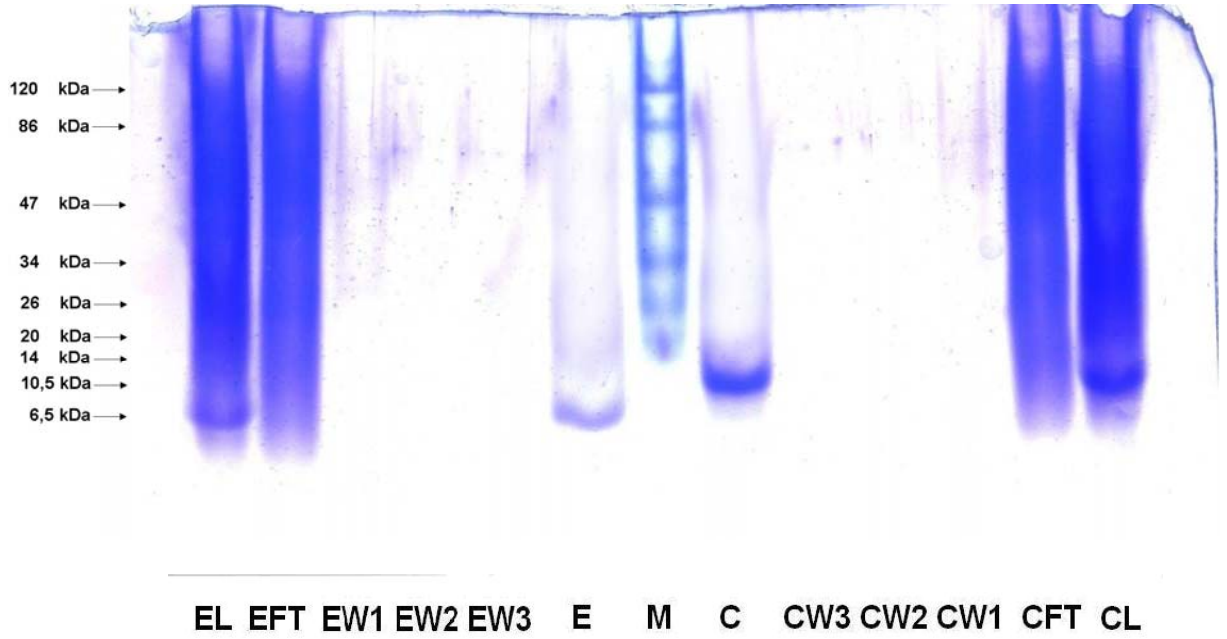
5.2.14. SDS-PAGE ve Western blotlama

1. Marker ve süpernatantlardan 10'ar µl yüklendi.
2. 100 voltta marker bantlarının istenilen büyüklükteki proteinleri ayırt ettirecek uzaklığa geldiği 50. dakikada elektroforez işlemi durduruldu ve jellerden birisi boyandı diğeri ile blotlama işlemine geçildi.
3. Jel ile aynı boyutta iki adet kurutma kağıdı Tricine SDS-PAGE katot transfer tamponu ile ıslatılarak elektroblotter üzerine yerleştirildi.
4. Jel ile aynı boyutta kesilmiş PVDF membran, metanolde 5 dakika bekletildikten sonra SDS-PAGE katot transfer tamponu ile ıslatıldı ve transfer tamponu ile ıslatılmış kurutma kağıtlarının üzerine yerleştirildi.
5. Jel, PVDF membranın üzerine yerleştirildi.
6. Jel ile aynı boyutta iki adet kurutma kağıdı yine SDS-PAGE katot transfer tamponu ile ıslatılarak jelin üzerine yerleştirildi.
7. Son olarak bir cam tüp üzerinde yuvarlanarak, katmanların arasındaki hava kabarcıkları giderildi.
8. Elektro-blotter cihazının anot kutbuna bağlı kapağı kapatıldı.
9. Jel boyutuna göre 5,5 miliamper / cm² 'lik akımda 1 saat boyunca elektrotransfer işlemi gerçekleştirildi.
10. Karıştırıcı üzerinde, 30 ml bloklama solüsyonu içerisinde bir gece +4 °C'de inkübe edildi.
11. Bloklama solüsyonu ile 3 / 10.000 oranında seyreltilen HRP ile konjuge mouse anti-his antikoru içeren kaba alınan PVDF membran oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
12. PVDF membran % 0,5 Tween20 içeren PBS ile çalkalayıcıda 10 dakika boyunca 6 kez yıkandı.
13. Temiz bir cam yüzeyine alınan PVDF membran üzerine taze hazırlanan ve luminol içeren substrat eklendi.
14. 5 dakika sonra karanlık odada asetatlar arasında film kasetinde yerleştirilen PVDF membranın üzerine fotoğraf filmi konularak film kaseti kapatıldı.

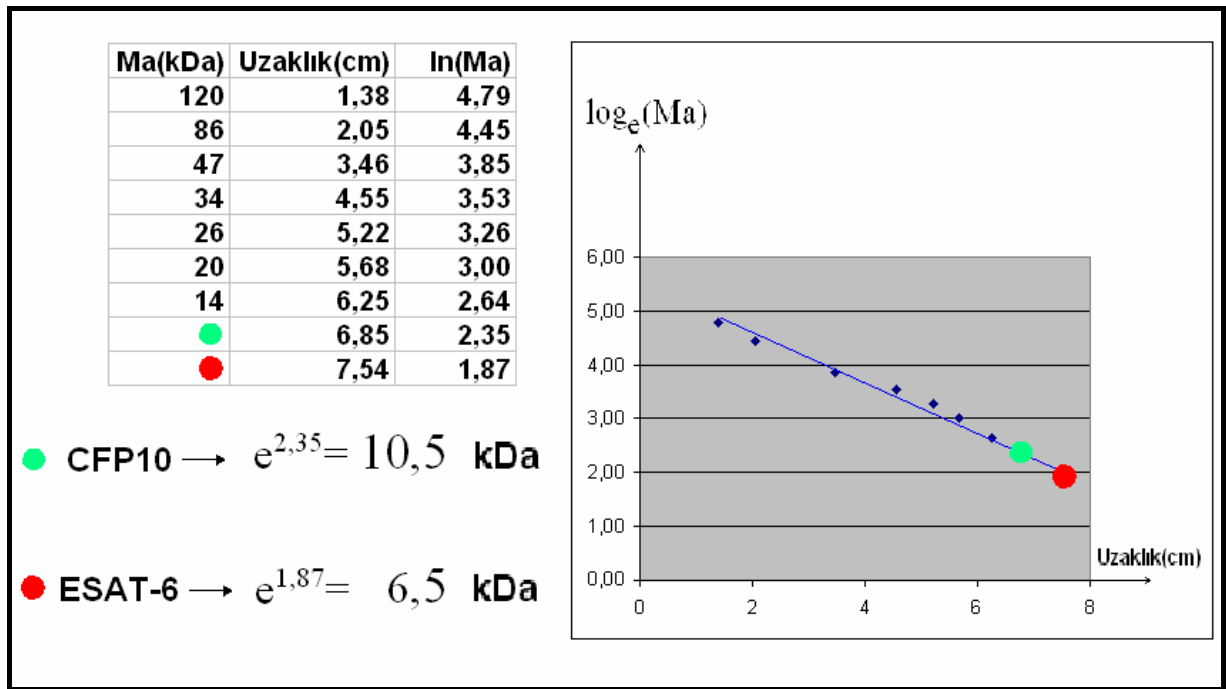
15. 10 dakika, 3 dakika, 1 dakika ve 20 saniyelik sürelerde aynı işlem tekrarlanarak en uygun pozlanma süresinde renklenen fotoğraf kağıdı saklandı.
16. Western blotlama işlemine alınmayan diğer jel ise karıştırıcıda fiksasyon tamponu içerisinde oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
17. %0,025'lik Commasie Blue boya çözeltisine alınan jel karıştırıcıda oda sıcaklığında 30 dakika boyandı.
18. Jel, karıştırıcı üzerinde ve oda sıcaklığında, yarım saat arayla yenilenen boya arındırıcı çözelti içerisinde bir gece bekletildi.

ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerini eksprese eden hücre lizatları, yıkama ve elüsyon ürünlerine ait SDS-PAGE jel ve Western blotlama fotoğrafı Resim 5'de gösterilmektedir.

ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin moleküler büyüklük cetveli kullanılarak yapılan büyüklük hesaplaması Şekil 10'da gösterilmektedir.



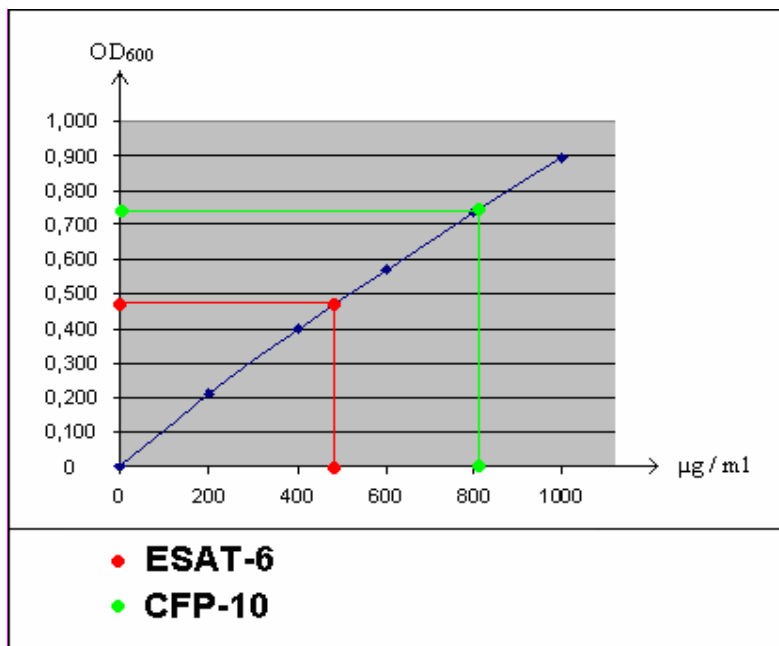
Resim 5: ESAT-6 ve CFP-10 ‘ a ait SDS-PAGE jel ve Western blotlama sonuçları; EL:ESAT-6 hücre lizatı, EFT: ESAT-6 matriksten inen kısım, EW1: ESAT-6 birinci yıkama, EW2: ESAT-6 ikinci yıkama, EW3: ESAT-6 üçüncü yıkama, E: ESAT-6 protein preparatı, M:Marker, C: CFP-10 protein preparatı, CW3: CFP-10 üçüncü yıkama, CW2: CFP-10 ikinci yıkama, CW1: CFP-10 birinci yıkama, CFT: CFP-10 matriksten inen kısım, CL:CFP-10 hücre lizatı.



Şekil 10: ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin moleküler büyüklük hesaplaması.

5.2.15. Protein yoğunluklarının belirlenmesi

Elde edilen protein preparatlarının yoğunluğu ölçülürken protein preparatı ve BSA ile hazırlanan standartların üzerine eşit hacimde BCA protein konsantrasyon saptama indikatörü eklendi. 37 °C’de 2 saat inkübasyondan sonra ortaya çıkan renklenme 562 nm dalga boyunda, spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart OD değerlerine göre çizilen eğri üzerinde örneklerin OD değeri ve karşılık gelen protein konsantrasyonları belirlendi. BSA standartları ve protein preparatlarının OD değerleri Şekil 11’da gösterilmektedir.



Şekil 11: ESAT-6 ve CFP-10 protein preparatlarının yoğunlukları

5.2.16. Protein preparatındaki endotoksin yoğunluğunun belirlenmesi

Elde edilen protein preparatındaki endotoksin yoğunluğu belirlenirken önce protein preparatları 1 µg / ml konsantrasyonda olacakları şekilde PBS ile sulandırıldı. Daha sonra hem protein preparatları (1/1 – 1/2 - 1/4 - 1/8 – 1/16 – 1/32 – 1/64 – 1/128) ve hem de endotoksin standartları (400 – 40 – 4 - 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,06 – 0,03 – 0,015 EU / ml) ile hazırlanan dilasyonların üzerine eşit hacimde amebosit lizatı çalışma çözeltisi eklendi. 37 °C’de 1 saatlik inkübasyondan sonra jelleşmenin olduğu tüpler not edildi.

Standart pozitiflik sınırı: 0,125 EU/ml pozitif, 0,06 EU/ml negatif

ESAT-6 için 1 / 4 dilüsyonda jelleşme pozitif

1 / 8 dilüsyonda jelleşme negatifti.

1/4 ünde 0,125 EU / ml ise 1/1 inde $4 \times 0,125 \text{ EU} = 0,5 \text{ EU}$ endotoksin bulunmaktaydı.

Yani; 1 µg ESAT-6 içerisinde 0,5 EU = 0,05 ng endotoksin bulunmaktaydı.

CFP-10 için 1 / 2 dilüsyonda jelleşme pozitif

1 / 4 dilüsyonda jelleşme negatifti.

1/2’sinde 0,125 EU / ml ise 1/1 inde $2 \times 0,125 \text{ EU} = 0,25 \text{ EU}$ endotoksin bulunmaktaydı.

Yani; 1 µg CFP-10 içerisinde 0,25 EU = 0,025 ng endotoksin bulunmaktaydı.

Böylece her iki protein preparatının da 1 µg protein içerisinde 0,3 ng’dan daha az endotoksin içerdiğinden, hücre kültürü çalışmalarına uygun oldukları saptandı [9] .

5.2.17. Heparinize kan örneklerinin toplanması ve antijenle uyarılması

Hasta ve kontrol grubundan toplam 10 ml heparinize kan örnekleri alındı ve 24-kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına, her hasta için kullanılan 6 kuyucuğa 1’er ml dağıtıldı.

1. kuyucuğa antijen eklenmedi
2. kuyucuğa 1 µg/ml ESAT-6 eklendi
3. kuyucuğa 1 µg/ml CFP-10 eklendi
4. kuyucuğa 1 µg/ml ESAT-6 ve 1 µg/ml CFP-10 eklendi

5. kuyucuğa 1 µg/ml DHFR eklendi

6. kuyucuğa 1,5 µg/ml fito-hemaglutinin eklendi

5.2.18. Hücre kültürü ve plazmaların saklanması

Kültür plakları çalkalayıcı üzerinde 100 rpm’de 90 saniye karıştırılarak 37°C’de 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyonları sonrasında bazı kuyucuklardaki (%15-20) heparinize kan örneklerinin yüzeylerinde yeşilimsi ince bir tabaka oluştuğu görüldü. Bu kuyucukların süpernatant kısımları kanlı agara ekildi ve üreme saptanmadı. Gram boyalı preparatlarında, bakteri ya da mantar hücrelerine rastlanmadı, ayrıca antijen eklenmemiş olanlarda IFN-γ veya IL-10 yanıtlarında yükselme veya azalma saptanmadı.

Hücre kültürü plaklarının plazma kısımları steril ependorflara alınarak -80°C’de saklandı.

5.2.19 IFN-γ ve IL-10 düzeylerinin plak ELISA yöntemi ile ölçülmesi

1. IFN-γ ve IL-10’a ait yakalayıcı “*capture*” antikorlar, kaplama tamponu ile 1 / 250 oranında dilüe edilerek düz tabanlı 96 kuyucuklu plaklara 100’er µl dağıtıldı.
2. +4 °C’de bir gece inkübe edildi.
3. 300 µl yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
4. 200 µl deney çözeltisi eklenilerek oda sıcaklığında 1 saat bloklandı.
5. 300 µl yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
6. Deney çözeltisinde dilüe edilen insan IFN-γ ve insan IL-10 standartları 100 µl hacimlerde, ve hasta örnekleri gerektiğinde deney çözeltisi ile dilüe edilerek 100’er µl hacimlerde kuyucuklara dağıtıldı (Hem standartlar hem de örnekler ikişer kez çalışıldı. Her iki sonucun varyasyon katsayısı (standart sapma / ortalama) %10 ve üzerinde olan örnekler ise üç kez çalışıldı).
7. Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
8. 300 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
9. Biotinle konjuge IFN-γ ve IL-10’a ait saptama “*detection*” antikorları, deney çözeltisi ile 1 / 250 oranında dilüe edilerek kuyucuklara 100’er µl dağıtıldı.
10. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

11. 300 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
12. Avidin ile konjuge Horse Radish Peroksidaz enzimi, deney çözeltisi ile 1 / 250 oranında dilüe edilerek kuyucuklara 100'er µl dağıtıldı.
13. Oda sıcaklığında 30 dakika saat inkübe edildi.
14. 300 µl yıkama tamponu ile 7 kez yıkandı.
15. Tetrametilmenzidin süstratı kuyucuklara 100'er µl dağıtıldı.
16. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
17. 1 M H₂SO₄ tepkime durdurucu çözeltiden kuyucuklara 50'şer µl dağıtıldı.
18. ELISA plak okuyucuda 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutuldu.
19. Standart ve hasta örnek kuyucuklarında elde edilen OD değerleri kaydedildi.

Standartlar ve hasta örnekleri ikişer kez çalışıldı. Elde edilen iki ölçüm değerinin standart sapması bu iki değerin ortalamasının %10'undan büyük ise üçüncü kez çalışıldı. Hasta örnekleri testin kantitatif ölçüm sınırlarının üzerinde ise uygun oranda seyreltilerek yeniden çalışıldı.

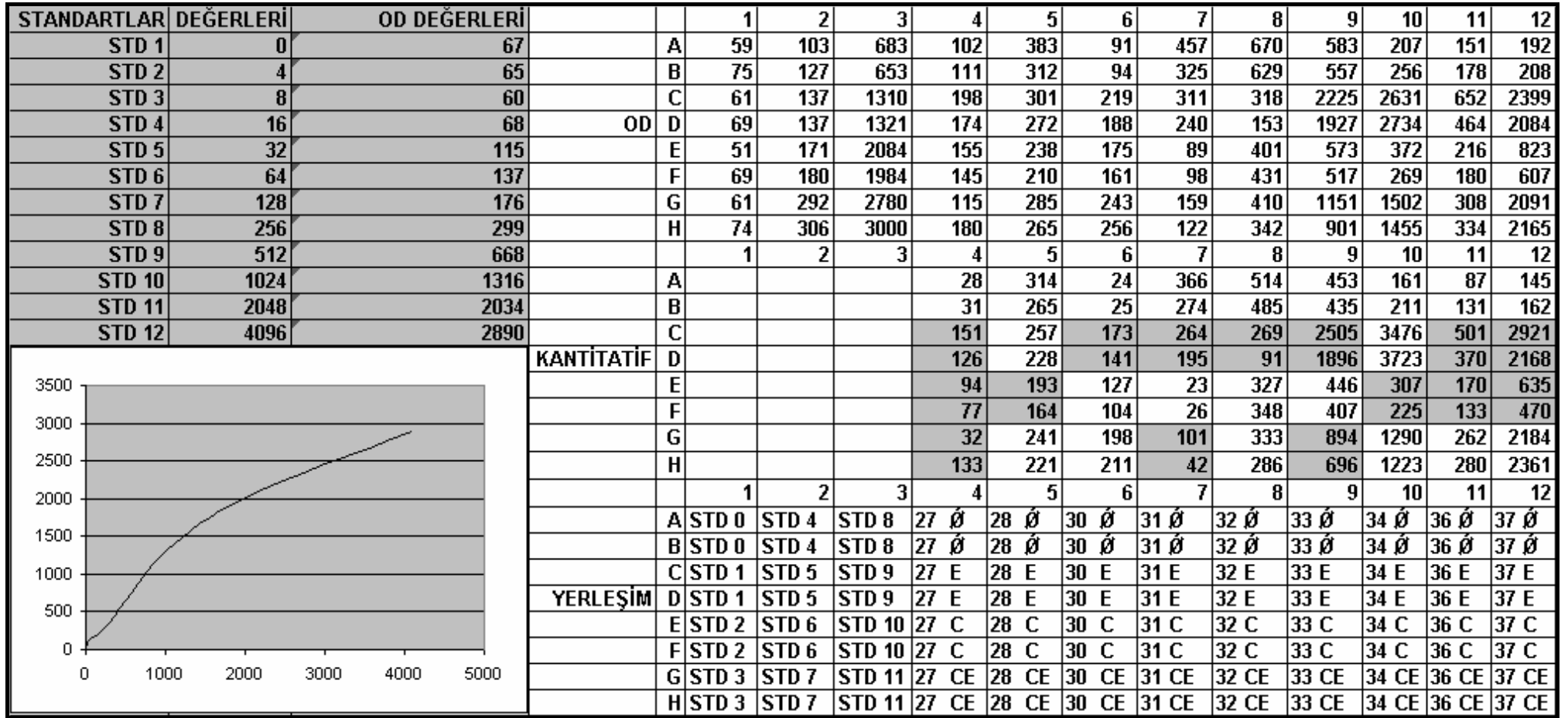
Standart eğrilerinin çizilmesi ve sonuçların hesaplanmasında Microsoft® Office Excel 2003 yazılım kullanıldı.

İkişer kat seyreltilerek hazırlanan standart kuyucuklarında ölçülen OD değerleri kullanılarak standart eğriler çizildi. Hasta kuyucuklarında elde edilen OD ölçümlerinin ortalamaları standart eğrilere yerleştirilerek sitokin değerleri hesaplandı [Şekil 12].

5.2.20. İstatistiksel analizler

Kontrol ve hasta gruplarının ortalamaları arasındaki farkın önemlilik testleri **T-testi** ile, parametrik yöntemlere uymayan koşullarda ise **Mann-Whitney U testi** ile ölçüldü.

Sitokin değerlerinin kavite boyutu gibi parametrik değişkenlerle olan korelasyon ilişkileri **Pearson korelasyon analizi** kullanılarak ölçüldü. Sitokin değerleri ile hastaların parametrik koşulları karşılamayan değişkenlerinin korelasyon ilişkileri ise **Spearman korelasyon analizi** ile ölçüldü. Hastaların radyolojik bulgularının sitokin değerlerinin ortaya çıkmasına sağladığı katkılar ve anlamlılık düzeyleri ise çoklu doğrusal regresyon analizi kullanılarak ölçüldü. İstatistiksel analizler sırasında “**SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version**” kullanıldı.



Şekil 12 : OD ölçüm sonuçları kullanılarak sitokin değerlerinin hesaplandığı standart eğrileri. Elde edilen iki ölçüm değerinin standart sapması bu iki değerin ortalamasının %10'undan büyük ise (gri renkli kuyucuklar) örnekler üçüncü kez çalışıldı.

6. BULGULAR

6.1. Plak ELISA yöntemi ile ölçülen sitokin düzeyleri

Antijenik uyarımlarla elde edilen sitokin değerleri ile, antijenik uyarımın bulunmadığı kuyucuklarda elde edilen bazal sitokin değerlerinin farkları alındı. Böylece ESAT-6, CFP-10 ve ESAT-6 + CFP-10 uyarımlarının ortaya çıkardıkları Δ IFN- γ ve Δ IL-10 değerleri hesaplandı. Sitokin değerlerine ek olarak Δ IFN- γ ve Δ IL-10 düzeylerinin, ortaya çıkan yanıtlardaki göreceli hakimiyetlerini ortaya çıkarmak amacıyla Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranları hesaplandı.

Hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyet dağılımına sahip, öykü, klinik ve radyolojik özelliklerine göre tüberküloz enfeksiyonu kanıtı bulunmayan sağlıklı kişilerden oluşan 34 kişinin tamamı kontrol grubu olarak kabul edildi. Bir sonraki basamakta ise, bu kontrol grubunun içinden, ülkemizin epidemiyolojik verilerinden faydalanılarak, *M. tuberculosis* enfeksiyon prevalansına (% 25-30) uygun oranda ve yüksek Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranına sahip 10 kişilik (% 29) bir grup çıkartıldı. Böylece 24 kişiden oluşan 2. kontrol grubu elde edildi. Tüm istatistiksel karşılaştırma analizleri bir kez de bu yeni kontrol grubuyla tekrarlandı.

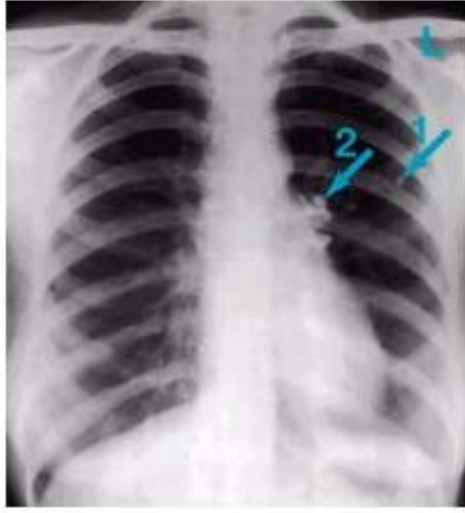
Dr Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi tüberküloz servisindeki klinisyen hekimlerin; klinik, laboratuvar ve radyolojik gözlemleri dikkate alındığında, 78 hasta birbirlerinden bağımsız 6 grupta toplandı.

1. İyileşen tüberküloz hastaları (n: 4)
2. Sadece fibronodüler lezyonu olanlar (n: 30)
3. Plevral efüzyonu olanlar (n: 14)
4. Kaviter lezyonu olanlar (n: 23)
5. Çoklu kaviter lezyonu olanlar (n: 5)
6. Milier tutulumu olanlar (n: 2)

Bu grupların yanında tüm tüberküloz hastalarının içerisinde iki grup daha belirlendi,

7. Nükseden tüberküloz hastalığı olanlar (n: 15)
8. Tedaviye ihtiyacı olan hastalar (n: 74)

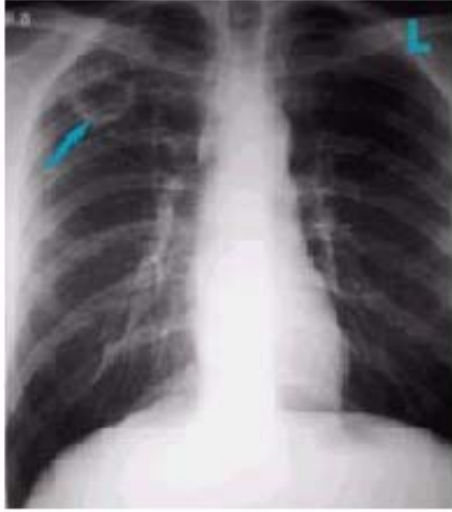
Hastaların gruplanmasını sağlayan radyolojik bulgularına dair örnekler Resim 6'da gösterilmektedir.



a



b



c



d



e

Resim 6: Hastaların gruplandırılmasını sağlayan radyolojik bulgular: a; Fibronodüler lezyon, b; plevral efüzyon, c; kaviter lezyon, d; çoklu kaviter lezyon, e; milier tutulum.

Tüm grupların yaş ve cinsiyet dağılımları tablo 3’de gösterilmektedir.

GRUP	SAYI	ERKEK n (%)	KADIN n (%)	YAŞ ORTALAMASI
KONTROL GRUBU 1	34	26 (76)	8 (24)	43,26
KONTROL GRUBU 2	24	19 (79)	5 (21)	45,63
1. İYİLEŞEN TÜBERKÜLOZ HASTALARI	4	3 (75)	1 (25)	47,25
2. SADECE FİBRONODÜLER LEZYONU OLANLAR	30	21 (70)	9 (30)	45,50
3. PLEVRAL EFÜZYONU OLANLAR	14	11 (79)	3 (21)	43,43
4. KAVİTER LEZYONU OLANLAR	23	18 (78)	5 (22)	49,09
5. ÇOKLU KAVİTER LEZYONU OLANLAR	5	4 (80)	1 (20)	35,40
6. MİLİER TUTULUMU OLANLAR	2	2 (100)	0 (0)	48,00
7. NÜKSEDEN TÜBERKÜLOZ HASTALIĞI OLANLAR	15	13 (87)	2 (13)	39,00
8. TEDAVİYE İHTİYACI OLAN HASTALAR	74	56 (76)	18 (24)	45,61

Tablo 3: Grupların yaş ve cinsiyet dağılımları.

Kontrol ve tüberküloz hasta gruplarının sitokin değerleri (Δ IFN- γ , Δ IL-10 ve Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranları) Tablo 4 – Tablo 13’de gösterilmektedir.

Tablo 4: Birinci kontrol grubunun sitokin değerleri (pg / ml).									
	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10
1	41	20	143	648	21	916	0,06	0,95	0,16
2	644	433	453	1441	865	1843	0,45	0,50	0,25
3	1030	24	244	829	95	932	1,24	0,26	0,26
4	239	297	158	263	365	1140	0,91	0,81	0,14
5	424	8	1174	252	174	420	1,68	0,05	2,79
6	119	19	125	211	21	184	0,57	0,93	0,68
7	361	204	388	328	185	258	1,10	1,10	1,50
8	124	234	722	235	113	422	0,53	2,06	1,71
9	201	145	181	262	58	114	0,77	2,49	1,58
10	1391	29	739	616	20	528	2,26	1,47	1,40
11	1242	641	1825	904	233	1405	1,37	2,74	1,30
12	2658	172	2054	1170	113	1078	2,27	1,52	1,91
13	576	162	343	448	61	114	1,28	2,62	2,98
14	410	453	1172	235	164	388	1,74	2,75	3,02
15	945	193	783	529	34	524	1,79	5,51	1,49
16	85	0	84	9	1	14	8,42	0,50	5,53
17	1752	230	1752	484	90	667	3,61	2,53	2,63
18	1506	1019	1673	1066	136	664	1,41	7,43	2,52
19	372	204	1519	205	67	257	1,82	3,03	5,89
20	1215	666	1177	507	55	708	2,40	11,94	1,66
21	3291	1486	3570	1173	190	1593	2,80	7,78	2,24
22	1375	1150	2996	468	168	1018	2,94	6,81	2,94
23	163	239	419	126	30	66	1,29	7,67	6,23
24	532	240	265	62	63	88	8,41	3,74	2,98
25	582	3147	1886	762	48	562	0,76	64,36	3,35
26	3309	1422	2530	802	82	908	4,12	17,16	2,79
27	168	1299	1529	107	69	221	1,56	18,67	6,88
28	1626	773	2176	182	51	1038	8,90	14,87	2,10
29	828	128	1165	62	9	164	13,10	13,39	7,07
30	4218	870	769	110	41	226	38,12	20,67	3,38
31	4045	3600	4245	646	59	483	6,25	59,87	8,77
32	1924	741	2740	136	41	200	14,00	17,52	13,62
33	8031	1422	7726	356	115	460	22,52	12,23	16,76
34	3962	883	4257	111	23	376	35,37	37,17	11,29

Tablo 5: İkinci kontrol grubunun sitokin değerleri (pg / ml).									
	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10
1	41	20	143	648	21	916	0,06	0,95	0,16
2	644	433	453	1441	865	1843	0,45	0,50	0,25
3	1030	24	244	829	95	932	1,24	0,26	0,26
4	239	297	158	263	365	1140	0,91	0,81	0,14
5	424	8	1174	252	174	420	1,68	0,05	2,79
6	119	19	125	211	21	184	0,57	0,93	0,68
7	361	204	388	328	185	258	1,10	1,10	1,50
8	124	234	722	235	113	422	0,53	2,06	1,71
9	201	145	181	262	58	114	0,77	2,49	1,58
10	1391	29	739	616	20	528	2,26	1,47	1,40
11	1242	641	1825	904	233	1405	1,37	2,74	1,30
12	2658	172	2054	1170	113	1078	2,27	1,52	1,91
13	576	162	343	448	61	114	1,28	2,62	2,98
14	410	453	1172	235	164	388	1,74	2,75	3,02
15	945	193	783	529	34	524	1,79	5,51	1,49
16	85	0	84	9	1	14	8,42	0,50	5,53
17	1752	230	1752	484	90	667	3,61	2,53	2,63
18	1506	1019	1673	1066	136	664	1,41	7,43	2,52
19	372	204	1519	205	67	257	1,82	3,03	5,89
20	1215	666	1177	507	55	708	2,40	11,94	1,66
21	3291	1486	3570	1173	190	1593	2,80	7,78	2,24
22	1375	1150	2996	468	168	1018	2,94	6,81	2,94
23	163	239	419	126	30	66	1,29	7,67	6,23
24	532	240	265	62	63	88	8,41	3,74	2,98

Tablo 6: İyileşen tüberküloz hastalarının sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri																
	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
1	3002	1802	3727	616	25	620	4,87	68,91	6,00	-	-	+	-	-	0	0
2	4086	1703	4086	65	49	592	62,27	34,23	6,89	-	-	+	-	-	0	0
3	4210	3623	4210	15	2	30	255,74	1200,07	134,04	-	-	+	-	-	0	0
4	3800	942	3446	78	26	69	48,01	34,99	49,38	-		+	-	-	0	0

Tablo 7: Sadece fibronodüler lezyonu olan hastaların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri																
	ΔE IFN-γ	ΔC IFN-γ	ΔEC IFN-γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN-γ / ΔE IL-10	ΔC IFN-γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN-γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
1	79	891	911	45	47	180	1,73	18,78	5,05	+	+	-	+	-	0	0
2	68	52	187	178	22	538	0,39	2,27	0,35	+	+	-	+	-	0	0
3	378	556	911	457	278	52	0,83	2,00	17,26	+	+	-	+	-	0	0
4	110	28	63	108	41	86	1,02	0,70	0,74	-	+	+	+	-	0	0
5	10	11	26	44	6	65	0,24	1,73	0,40	-	+	+	+	-	0	0
6	325	163	136	560	27	403	0,58	5,91	0,34	+	+	+	+	-	0	0
7	116	0	37	42	19	71	2,70	0,05	0,53	-	+	+	+	-	0	0
8	1084	226	1035	941	369	637	1,15	0,61	1,62	-	+	+	+	-	0	0
9	157	111	192	389	14	202	0,41	7,48	0,95	-	+	+	+	-	0	0
10	26	0	0	346	0	0	0,08	1,00	1,00	+	+	+	+	-	0	0
11	49	40	62	84	0	182	0,59	41,46	0,34	+	+	+	+	-	0	0
12	507	62	626	99	13	124	5,07	4,56	4,99	+	+	+	+	-	0	0
13	56	0	301	59	0	67	0,95	1,00	4,47	-	+	-	+	-	0	0
14	207	23	211	484	51	838	0,43	0,47	0,25	+	+	-	+	-	0	0
15	817	50	1013	150	14	173	5,40	3,49	5,83	+	+	-	+	-	0	0
16	472	327	1341	50	3	91	9,22	75,31	14,54	+	+	-	+	-	0	0
17	1450	3800	4001	202	31	461	7,13	119,80	8,67	+	+	-	+	-	0	0
18	1018	325	1306	21	6	50	46,27	44,31	25,54	+	+	-	+	-	0	0
19	301	814	676	315	57	530	0,96	14,08	1,27	-	+	-	+	-	0	0
20	39	0	25	677	0	750	0,06	1,00	0,03	+	-	-	+	-	0	0
21	8385	5195	6170	494	53	490	16,93	96,05	12,58	-	+	-	+	-	0	0
22	51	34	137	156	60	80	0,33	0,57	1,70	+	+	-	+	-	0	0
23	6	36	58	292	50	280	0,02	0,72	0,21	+	+	-	+	-	0	0
24	36	88	70	0	0	0	36,89	88,92	70,93	-	+	-	+	-	0	0
25	230	150	321	26	18	20	8,54	7,90	15,10	+	+	-	+	-	0	0
26	3940	94	3058	302	187	282	13,02	0,51	10,81	+	+	-	+	-	0	0
27	4149	322	1664	114	25	193	36,13	12,44	8,60	+	+	-	+	-	0	0
28	79	1356	1424	709	117	780	0,11	11,48	1,82	+		-	+	-	0	0
29	1507	844	1353	249	34	213	6,03	24,02	6,32	+		-	+	-	0	0
30	1499	3335	7622	767	15	1961	1,95	211,89	3,88	+	+	-	+	-	0	0

Tablo 8: Plevral efüzyonu olanlar hastaların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri																
	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
1	2775	483	2120	59	3	69	46,32	124,84	30,26	+	+	-	+	+	0	0
2	86	17	22	57	38	98	1,50	0,47	0,23	-	+	-	-	+	1	5
3	999	0	1091	167	84	226	5,95	0,01	4,80	+	-	+	+	+	2	7
4	510	117	694	19	1	88	25,40	52,58	7,85	+	+	+	-	+	0	0
5	33	36	493	98	26	475	0,34	1,36	1,04	-	+	+	-	+	0	0
6	2083	418	1777	262	53	369	7,92	7,78	4,80	+	+	-	-	+	1	2
7	890	257	874	90	36	90	9,78	6,89	9,66	+	+	-	-	+	1	2
8	1506	1254	1756	428	285	1600	3,51	4,39	1,10	-	-	-	-	+	0	0
9	51	0	46	20	1	65	2,53	0,47	0,72	-	+	-	+	+	0	0
10	150	91	180	404	48	577	0,37	1,88	0,31	+	+	-	+	+	0	0
11	115	45	57	84	14	104	1,36	2,97	0,55	-	+	-	-	+	0	0
12	237	12	326	428	105	452	0,55	0,12	0,72	+	+	-	+	+	0	0
13	706	297	371	281	142	393	2,51	2,08	0,94	+	+	-	+	+	0	0
14	3414	124	1070	58	6	88	58,06	19,18	12,05	+		-	+	+	0	0

Tablo 9: Kaviter lezyonu olan hastaların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri																
	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
1	1413	1020	3351	61	21	118	22,95	46,47	28,28	+	+	-	+	-	1	10
2	53	77	183	2	317	3	20,73	0,24	43,19	+	+	-	+	-	3	7
3	1027	504	1700	247	69	389	4,14	7,19	4,36	+	+	+	-	-	1	2
4	1614	706	1639	36	6	72	44,14	107,25	22,45	+	+	+	-	-	5	5
5	576	675	1591	191	40	172	3,01	16,44	9,19	+		+	-	-	1	4
6	33	4	11	57	18	73	0,59	0,24	0,16	+	+	-	+	-	1	6
7	11	1	13	999	309	1423	0,01	0,01	0,01	+	+	-	-	-	1	6
8	586	199	330	46	13	73	12,47	14,73	4,49	-	+	-	+	-	2	6
9	1204	43	959	337	29	446	3,57	1,47	2,15	+	+	-	+	-	2	5
10	90	10	57	346	62	379	0,26	0,18	0,15	+	+	-	-	-	3	5
11	122	64	106	225	383	752	0,54	0,17	0,14	+	+	-	+	-	1	5
12	995	907	1482	696	121	849	1,43	7,41	1,74	+	+	-	+	-	2	4
13	3127	4702	6852	74	50	98	41,59	93,03	69,51	+	+	-	-	-	1	4
14	82	162	375	114	1	71	0,72	90,82	5,23	+	+	-	+	-	1	4
15	499	1051	1166	555	130	398	0,90	8,04	2,93	+	+	-	+	-	2	4
16	8099	4199	7474	1477	188	1607	5,48	22,17	4,65	+	+	-	-	-	1	4
17	2382	3656	4234	305	31	404	7,79	115,46	10,45	-	+	-	-	-	1	4
18	3784	1911	3991	62	19	187	60,24	95,25	21,22	+	+	-	+	-	1	3
19	120	192	250	263	96	303	0,46	1,98	0,83	+		-	+	-	2	3
20	226	43	244	126	44	975	1,78	0,97	0,25	+	+	-	-	-	1	3
21	336	633	393	225	67	543	1,49	9,26	0,73	+	+	-	-	-	1	3
22	149	8	89	256	13	143	0,58	0,61	0,63	+	+	-	-	-	1	3
23	589	525	950	979	460	1142	0,60	1,14	0,83	-	+	-	+	-	1	2

Tablo 10: Çoklu kaviter lezyonu olan hastaların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri																
	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
1	0	0	0	65	10	95	0,02	0,09	0,01	+	+	-	-	-	>5	1
2	0	0	0	239	2	165	0,00	0,31	0,01	+	+	-	-	-	>5	1
3	152	243	655	628	29	1023	0,24	8,11	0,64	+	+	-	-	-	>5	1
4	73	63	167	786	79	1601	0,09	0,80	0,10	+	+	-	-	-	>5	1
5	3879	2689	2794	259	84	336	14,93	31,81	8,30	+	+	-	-	-	>5	1

Tablo 11: Milier tutulumu olan hastaların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri																
	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
1	95	125	132	718	59	947	0,13	2,09	0,14	+	+	-	-	-	>5	0,3
2	9	5	44	193	55	572	0,05	0,11	0,08	+	+	-	+	-	>5	0,3

Tablo 12: Nükseden tüberküloz hastalığı olanların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri																
	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
1	110	28	63	108	41	86	1,02	0,70	0,74	-	+	+	+	-	0	0
2	1027	504	1700	247	69	389	4,14	7,19	4,36	+	+	+	-	-	1	2
3	1614	706	1639	36	6	72	44,14	107,25	22,45	+	+	+	-	-	5	5
4	576	675	1591	191	40	172	3,01	16,44	9,19	+		+	-	-	1	4
5	999	0	1091	167	84	226	5,95	0,01	4,80	+	-	+	+	+	2	7
6	510	117	694	19	1	88	25,40	52,58	7,85	+	+	+	-	+	0	0
7	33	36	493	98	26	475	0,34	1,36	1,04	-	+	+	-	+	0	0
8	10	11	26	44	6	65	0,24	1,73	0,40	-	+	+	+	-	0	0
9	325	163	136	560	27	403	0,58	5,91	0,34	+	+	+	+	-	0	0
10	116	0	37	42	19	71	2,70	0,05	0,53	-	+	+	+	-	0	0
11	1084	226	1035	941	369	637	1,15	0,61	1,62	-	+	+	+	-	0	0
12	157	111	192	389	14	202	0,41	7,48	0,95	-	+	+	+	-	0	0
13	26	0	0	346	0	0	0,08	1,00	1,00	+	+	+	+	-	0	0
14	49	40	62	84	0	182	0,59	41,46	0,34	+	+	+	+	-	0	0
15	507	62	626	99	13	124	5,07	4,56	4,99	+	+	+	+	-	0	0

Tablo 13: Tedaviye ihtiyacı olan hastaların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri

	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
1	2775	483	2120	59	3	69	46,32	124,84	30,26	+	+	-	+	+	0	0
2	86	17	22	57	38	98	1,50	0,47	0,23	-	+	-	-	+	1	5
3	2083	418	1777	262	53	369	7,92	7,78	4,80	+	+	-	-	+	1	2
4	890	257	874	90	36	90	9,78	6,89	9,66	+	+	-	-	+	1	2
5	1506	1254	1756	428	285	1600	3,51	4,39	1,10	-	-	-	-	+	0	0
6	51	0	46	20	1	65	2,53	0,47	0,72	-	+	-	+	+	0	0
7	150	91	180	404	48	577	0,37	1,88	0,31	+	+	-	+	+	0	0
8	115	45	57	84	14	104	1,36	2,97	0,55	-	+	-	-	+	0	0
9	237	12	326	428	105	452	0,55	0,12	0,72	+	+	-	+	+	0	0
10	706	297	371	281	142	393	2,51	2,08	0,94	+	+	-	+	+	0	0
11	3414	124	1070	58	6	88	58,06	19,18	12,05	+		-	+	+	0	0
12	79	891	911	45	47	180	1,73	18,78	5,05	+	+	-	+	-	0	0
13	68	52	187	178	22	538	0,39	2,27	0,35	+	+	-	+	-	0	0
14	110	28	63	108	41	86	1,02	0,70	0,74	-	+	-	+	-	0	0
15	378	556	911	457	278	52	0,83	2,00	17,26	+	+	-	+	-	0	0
16	56	0	301	59	0	67	0,95	1,00	4,47	-	+	-	+	-	0	0
17	325	163	136	560	27	403	0,58	5,91	0,34	+	+	-	+	-	0	0
18	207	23	211	484	51	838	0,43	0,47	0,25	+	+	-	+	-	0	0
19	10	11	26	44	6	65	0,24	1,73	0,40	-	+	-	+	-	0	0
20	817	50	1013	150	14	173	5,40	3,49	5,83	+	+	-	+	-	0	0
21	472	327	1341	50	3	91	9,22	75,31	14,54	+	+	-	+	-	0	0
22	1450	3800	4001	202	31	461	7,13	119,80	8,67	+	+	-	+	-	0	0
23	1018	325	1306	21	6	50	46,27	44,31	25,54	+	+	-	+	-	0	0
24	301	814	676	315	57	530	0,96	14,08	1,27	-	+	-	+	-	0	0
25	39	0	25	677	0	750	0,06	1,00	0,03	+	-	-	+	-	0	0
26	8385	5195	6170	494	53	490	16,93	96,05	12,58	-	+	-	+	-	0	0
27	51	34	137	156	60	80	0,33	0,57	1,70	+	+	-	+	-	0	0
28	6	36	58	292	50	280	0,02	0,72	0,21	+	+	-	+	-	0	0
29	36	88	70	0	0	0	36,89	88,92	70,93	-	+	-	+	-	0	0
30	230	150	321	26	18	20	8,54	7,90	15,10	+	+	-	+	-	0	0
31	3940	94	3058	302	187	282	13,02	0,51	10,81	+	+	-	+	-	0	0

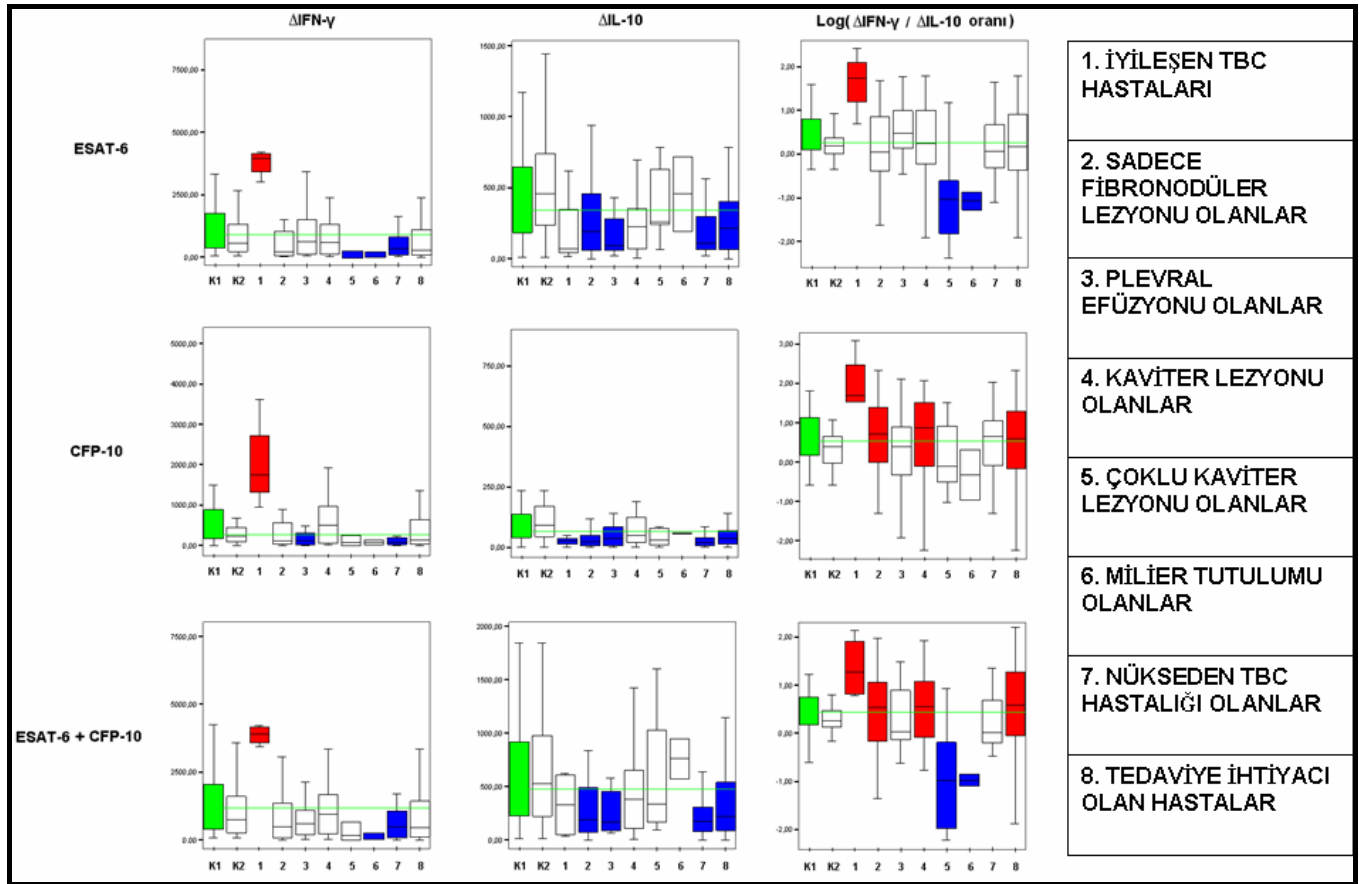
Tablo 13: Tedaviye ihtiyacı olan hastaların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri (devamı)

	ΔE IFN-γ	ΔC IFN-γ	ΔEC IFN-γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN-γ / ΔE IL-10	ΔC IFN-γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN-γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
32	4149	322	1664	114	25	193	36,13	12,44	8,60	+	+	-	+	-	0	0
33	79	1356	1424	709	117	780	0,11	11,48	1,82	+		-	+	-	0	0
34	1507	844	1353	249	34	213	6,03	24,02	6,32	+		-	+	-	0	0
35	1499	3335	7622	767	15	1961	1,95	211,89	3,88	+	+	-	+	-	0	0
36	1413	1020	3351	61	21	118	22,95	46,47	28,28	+	+	-	+	-	1	10
37	53	77	183	2	317	3	20,73	0,24	43,19	+	+	-	+	-	3	7
38	33	4	11	57	18	73	0,59	0,24	0,16	+	+	-	+	-	1	6
39	11	1	13	999	309	1423	0,01	0,01	0,01	+	+	-	-	-	1	6
40	586	199	330	46	13	73	12,47	14,73	4,49	-	+	-	+	-	2	6
41	1204	43	959	337	29	446	3,57	1,47	2,15	+	+	-	+	-	2	5
42	90	10	57	346	62	379	0,26	0,18	0,15	+	+	-	-	-	3	5
43	122	64	106	225	383	752	0,54	0,17	0,14	+	+	-	+	-	1	5
44	995	907	1482	696	121	849	1,43	7,41	1,74	+	+	-	+	-	2	4
45	3127	4702	6852	74	50	98	41,59	93,03	69,51	+	+	-	-	-	1	4
46	82	162	375	114	1	71	0,72	90,82	5,23	+	+	-	+	-	1	4
47	499	1051	1166	555	130	398	0,90	8,04	2,93	+	+	-	+	-	2	4
48	8099	4199	7474	1477	188	1607	5,48	22,17	4,65	+	+	-	-	-	1	4
49	2382	3656	4234	305	31	404	7,79	115,46	10,45	-	+	-	-	-	1	4
50	3784	1911	3991	62	19	187	60,24	95,25	21,22	+	+	-	+	-	1	3
51	120	192	250	263	96	303	0,46	1,98	0,83	+		-	+	-	2	3
52	226	43	244	126	44	975	1,78	0,97	0,25	+	+	-	-	-	1	3
53	336	633	393	225	67	543	1,49	9,26	0,73	+	+	-	-	-	1	3
54	149	8	89	256	13	143	0,58	0,61	0,63	+	+	-	-	-	1	3
55	1027	504	1700	247	69	389	4,14	7,19	4,36	+	+	-	-	-	1	2
56	589	525	950	979	460	1142	0,60	1,14	0,83	-	+	-	+	-	1	2
57	0	0	0	65	10	95	0,02	0,09	0,01	+	+	-	-	-	0	0
58	0	0	0	239	2	165	0,00	0,31	0,01	+	+	-	-	-	0	0
59	152	243	655	628	29	1023	0,24	8,11	0,64	+	+	-	-	-	0	0
60	73	63	167	786	79	1601	0,09	0,80	0,10	+	+	-	-	-	0	0
61	3879	2689	2794	259	84	336	14,93	31,81	8,30	+	+	-	-	-	0	0
62	95	125	132	718	59	947	0,13	2,09	0,14	+	+	-	-	-	0	0

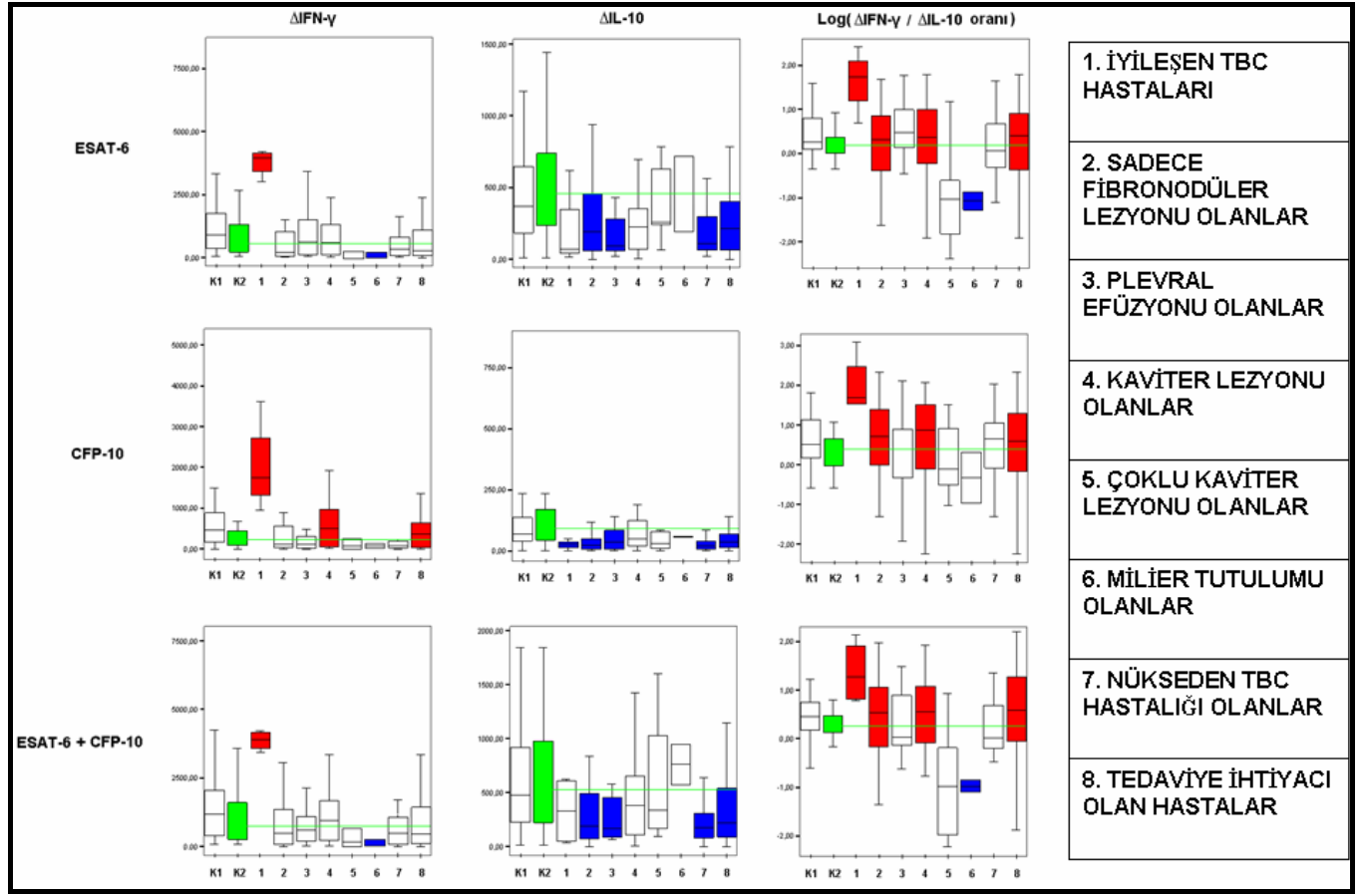
Tablo 13: Tedaviye ihtiyacı olan hastaların sitokin değerleri (pg / ml) ve klinik verileri (devamı)

	ΔE IFN- γ	ΔC IFN- γ	ΔEC IFN- γ	ΔE IL-10	ΔC IL-10	ΔEC IL-10	ΔE IFN- γ / ΔE IL-10	ΔC IFN- γ / ΔC IL-10	ΔEC IFN- γ / ΔEC IL-10	ARB	KÜLTÜR	SEKEL	FİBRO.NODÜ LER LEZYON	PLEV.RAL EFFÜZYON	KAV.İTE ADEDİ	EN BÜYÜK KAVİTE ÇAPI
63	9	5	44	193	55	572	0,05	0,11	0,08	+	+	-	+	-	0	0
64	999	0	1091	167	84	226	5,95	0,01	4,80	+	-	+	+	+	2	7
65	510	117	694	19	1	88	25,40	52,58	7,85	+	+	+	-	+	0	0
66	33	36	493	98	26	475	0,34	1,36	1,04	-	+	+	-	+	0	0
67	116	0	37	42	19	71	2,70	0,05	0,53	-	+	+	+	-	0	0
68	1084	226	1035	941	369	637	1,15	0,61	1,62	-	+	+	+	-	0	0
69	157	111	192	389	14	202	0,41	7,48	0,95	-	+	+	+	-	0	0
70	26	0	0	346	0	0	0,08	1,00	1,00	+	+	+	+	-	0	0
71	49	40	62	84	0	182	0,59	41,46	0,34	+	+	+	+	-	0	0
72	507	62	626	99	13	124	5,07	4,56	4,99	+	+	+	+	-	0	0
73	1614	706	1639	36	6	72	44,14	107,25	22,45	+	+	+	-	-	5	5
74	576	675	1591	191	40	172	3,01	16,44	9,19	+		+	-	-	1	4

Δ IFN- γ , Δ IL-10 ve Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının ortalamaları ve yaygınlık ölçütleri, kum torbası grafiklerle ifade edildi. Koordinant sistemine daha kolay yerleştirilebilmeleri amacıyla Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranları yerine on tabanına göre logaritma değerleri kullanıldı [Şekil 13, Şekil 14].



Şekil 13: Birinci kontrol grubu ile karşılaştırılan sitokin yanıtı ortalamaları ve yaygınlık ölçütleri. Yeşil renkli boyanan kutucuklar birinci kontrol grubunu, kırmızı renkli kutucuklar birinci kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunan değerleri, mavi renkli kutucuklar ise birinci kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunan değerleri göstermektedir.



Şekil 14: İkinci kontrol grubu ile karşılaştırılan sitokin yanıtı ortalamaları ve yaygınlık ölçütleri. Yeşil renkli boyanan kutucuklar ikinci kontrol grubunu, kırmızı renkli kutucuklar ikinci kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunan değerleri, mavi renkli kutucuklar ise ikinci kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunan değerleri göstermektedir.

Grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık testi sonuçları Tablo 14’de gösterilmektedir.

	n	ORT. E ΔIFN-γ		ORT. C ΔIFN-γ		ORT. EC ΔIFN-γ		ORT. E ΔIL-10		ORT. C ΔIL-10		ORT. EC ΔIL-10		ORT. E ΔIFN-γ / ΔIL-10 ORANI		ORT. C ΔIFN-γ / ΔIL-10 ORANI		ORT. EC ΔIFN-γ / ΔIL-10 ORANI	
1. KONTROL GRUBU	34	1452,694		663,334		1558,250		463,100		113,546		587,651		5,760		10,385		3,817	
2. KONTROL GRUBU	24	862,431		344,508		998,260		519,653		138,444		639,211		2,130		3,217		2,241	
ORTALAMALARI KARŞILAŞTIRILAN GRUPLAR			P DEĞERİ		P DEĞERİ		P DEĞERİ		P DEĞERİ		P DEĞERİ		P DEĞERİ		P DEĞERİ		P DEĞERİ		P DEĞERİ
İYİLEŞEN TBC HASTALARI İLE 1. KONTROL GRUBU	4	3774,193	0,0070	2017,723	0,0040	3867,001	0,0050	193,486	0,0740	25,482	0,0350	327,813	0,2970	92,722	0,0020	334,550	0,0010	49,079	0,0040
İYİLEŞEN TBC HASTALARI İLE 2. KONTROL GRUBU			0,0000		0,0010		0,0000		0,0820		0,0290		0,2350		0,0000		0,0000		0,0000
SADECE FİBRONODÜLER LEZYONU OLANLAR İLE 1. KONTROL GRUBU	30	904,925	0,1044	631,101	0,4513	1164,506	0,1798	278,680	0,0114	51,893	0,0273	326,655	0,0093	6,838	0,3432	26,684	0,0411	7,538	0,0776
SADECE FİBRONODÜLER LEZYONU OLANLAR İLE 2. KONTROL GRUBU			0,4567		0,1218		0,3432		0,0043		0,0106		0,0071		0,0216		0,0059		0,0210
PLEVRAL EFÜZYONU OLANLAR İLE 1. KONTROL GRUBU	14	968,174	0,2520	225,080	0,0201	776,963	0,0696	175,388	0,0029	60,166	0,0447	335,274	0,0254	11,865	0,4142	16,073	0,4749	5,360	0,5553
PLEVRAL EFÜZYONU OLANLAR İLE 2. KONTROL GRUBU			0,7770		0,2120		0,5010		0,0010		0,0250		0,0340		0,0820		0,6650		0,8930
KAVİTER LEZYONU OLANLAR İLE 1. KONTROL GRUBU	23	1178,999	0,2820	925,797	0,1869	1627,816	0,4444	333,904	0,1020	108,206	0,4460	461,612	0,1566	10,237	0,1254	27,850	0,0299	10,156	0,0462
KAVİTER LEZYONU OLANLAR İLE 2. KONTROL GRUBU			0,2222		0,0315		0,1026		0,0514		0,2553		0,1074		0,0152		0,0041		0,0185
ÇOKLU KAVİTER LEZYONU OLANLAR İLE 1. KONTROL GRUBU	5	820,691	0,0350	598,978	0,2390	723,177	0,0890	395,232	0,8870	40,807	0,1280	643,753	0,9190	3,058	0,0270	8,224	0,3340	1,812	0,0310
ÇOKLU KAVİTER LEZYONU OLANLAR İLE 2. KONTROL GRUBU			0,0780		0,4820		0,2010		0,6740		0,0680		0,9330		0,0510		0,7580		0,0680
MİLİER TUTULUMU OLANLAR İLE 1. KONTROL GRUBU	2	52,265	0,0130	64,901	0,0630	87,819	0,0130	455,514	0,9710	57,290	0,6670	759,396	0,3840	0,093	0,0060	1,099	0,1560	0,109	0,0030
MİLİER TUTULUMU OLANLAR İLE 2. KONTROL GRUBU			0,0250		0,1230		0,0250		0,8120		0,3940		0,5540		0,0120		0,3020		0,0060
NÜKSEDE TBC HASTALIĞI OLANLAR İLE 1. KONTROL GRUBU	15	476,250	0,0084	178,645	0,0046	625,576	0,0087	224,700	0,0092	47,668	0,0015	212,859	0,0017	6,322	0,3509	16,556	0,6882	4,041	0,3975
NÜKSEDE TBC HASTALIĞI OLANLAR İLE 2. KONTROL GRUBU			0,0710		0,0810		0,1030		0,0040		0,0010		0,0030		0,9890		0,4320		0,9890
TEDAVİYE İHTİYACI OLAN HASTALAR İLE 1. KONTROL GRUBU	74	973,340	0,0813	628,408	0,4377	1176,269	0,1391	288,957	0,0095	70,358	0,0411	403,353	0,0238	8,408	0,1280	23,100	0,0107	7,352	0,0197
TEDAVİYE İHTİYACI OLAN HASTALAR İLE 2. KONTROL GRUBU			0,3746		0,0370		0,3163		0,0013		0,0099		0,0148		0,0003		0,0000		0,0010

Tablo 14: Grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık testi sonuçları

Hastaların uyaranlara karşı elde edilen sitokin yanıtları kullanılarak hem birinci, hem de ikinci kontrol grubuyla karşılaştırılarak ROC eğrileri elde edildi. Ayrıca ROC eğrileri ile elde edilen duyarlılık ve seçicilik düzeylerinde önce çoklu kaviteli, milier tutulumu olan ya da nükseden tüberküloz hastaları dışlanarak tekrarlandı. Daha sonra yalnızca çoklu kaviteli, milier tutulumu olan ya da nükseden tüberküloz hastaları ile oluşturulan hasta grubuyla tekrarlandı.

IFN- γ yanıtlarının zayıf olduğu grubun (çoklu kaviter lezyonu olan, milier tutulumu olan ya da nükseden tüberküloz hastalığı bulunanların) dışarıda bırakılmasıyla Δ IFN- γ değerlerinin duyarlılık ve özgüllükleri artarken Δ IL-10 sonuçlarının duyarlılık ve özgüllükleri azaldı. Yalnızca IFN- γ yanıtlarının zayıf olduğu grubun değerlendirmeye alınmasıyla Δ IL-10 sonuçlarının duyarlılık ve özgüllükleri artarken Δ IFN- γ değerlerinin duyarlılık ve özgüllükleri azaldı. Ancak bu iki durumda da Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının duyarlılık ve özgüllükleri etkilenmedi [Şekil 15].

Tedavi süreleri ile sitokin değerlerinin ortalamaları arasındaki ilişki incelendiğinde; 5 ile 17 gün arasında tedavi alanlarla daha uzun süre tedavi olanların arasında anlamlı farklar bulundu.

ESAT-6'ya karşı 6 ile 17 günden daha az süredir tedavi görenlerin Δ IFN- γ ortalamaları 6 ile 17 günden daha fazla süredir tedavi görenlere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

ESAT-6'ya karşı 5 ile 10 günden daha az süredir tedavi görenlerin Δ IL-10 ortalamaları, 5 ile 10 günden daha fazla süredir tedavi görenlere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

ESAT-6'ya karşı Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranları ile tedavi süreleri arasında ilişki saptanmadı.

CFP-10'a karşı 11 ile 17 günden daha az süredir tedavi görenlerin Δ IFN- γ ortalamaları, 11 ile 17 günden daha fazla süredir tedavi görenlere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

CFP-10'a karşı Δ IL-10 değerleri ile tedavi süreleri arasında ilişki saptanmadı.

CFP-10'a karşı 11 ile 17 günden daha az süredir tedavi görenlerin Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının ortalamaları, 11 ile 17 günden daha fazla süredir tedavi görenlere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

ESAT-6 ve CFP-10'un bir arada kullanılmalarına karşı 9 ile 17 günden daha az süredir tedavi görenlerin Δ IFN- γ ortalamaları, 9 ile 17 günden daha fazla süredir tedavi görenlere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

ESAT-6 ve CFP-10'un bir arada kullanılmalarına karşı Δ IL-10 değerleri ile tedavi süreleri arasında ilişki saptanmadı.

ESAT-6 ve CFP-10'un bir arada kullanılmalarına karşı Δ IFN- γ / Δ IL-10 değerleri ile tedavi süreleri arasında ilişki saptanmadı.

Δ IFN- γ , Δ IL-10 ve Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının hastaların; yaş, cinsiyet, ARB pozitifliği, kültür pozitifliği ve radyolojik bulguları ile korelasyonları incelendiğinde, uyaran olarak ESAT-6 tek başına veya CFP-10'la birlikte kullanıldığında Δ IFN- γ yanıtları ile kültür pozitifliği arasında orta düzeyde ve ters yönde bir korelasyon olduğu saptandı.

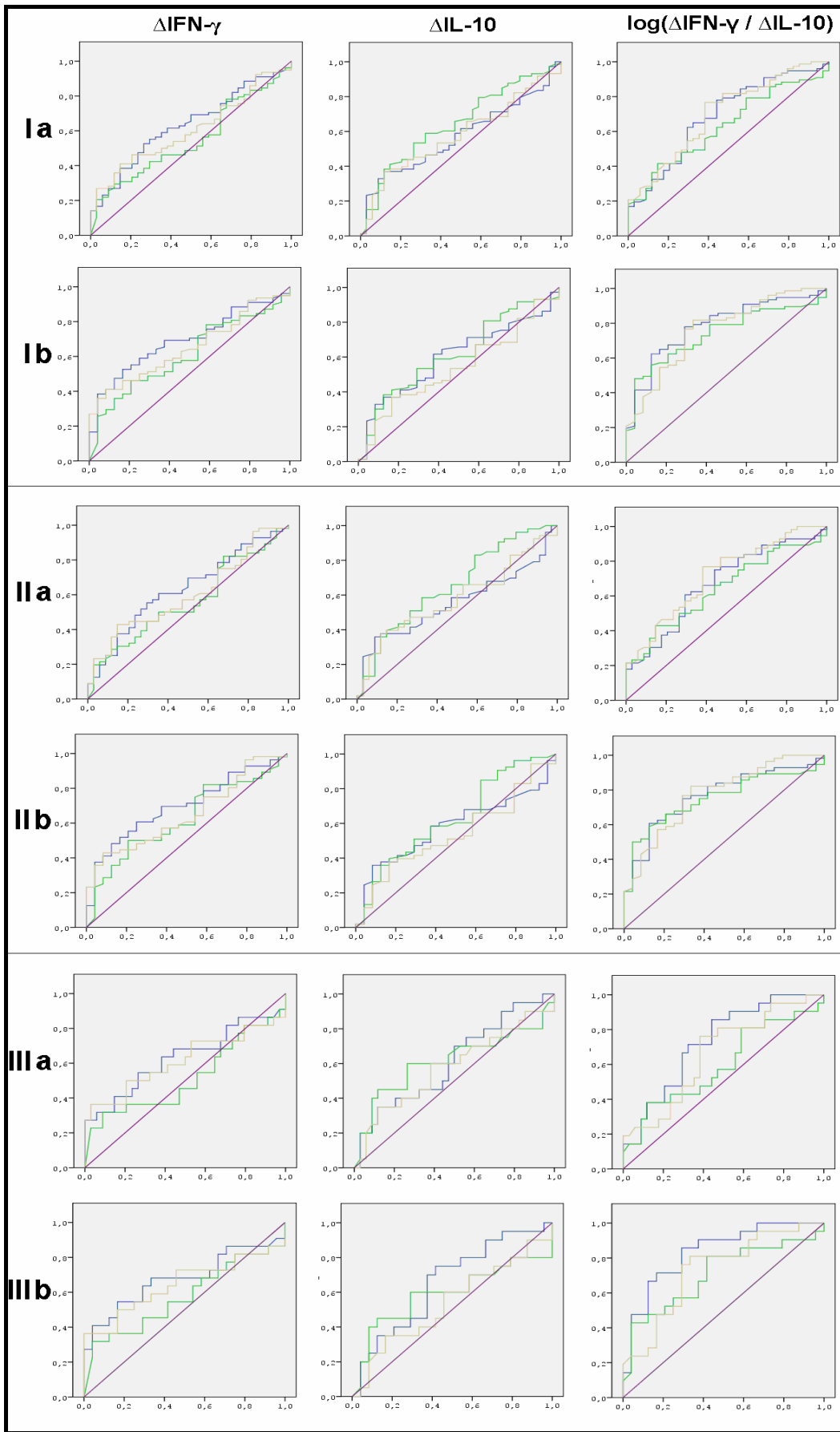
Uyaran olarak CFP-10 kullanıldığında Δ IL-10 yanıtları ile kavite adedi ve en büyük kavite çapıyla orta düzeyde ve aynı yönde korelasyon olduğu, sekel varlığı ile arasında ise orta düzeyde ancak ters yönde bir korelasyon olduğu saptandı.

Uyaran olarak CFP-10 tek başına veya ESAT-6 ile birlikte kullanıldığında Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranları ile kavite adedi arasında orta düzeyde ve ters yönde bir korelasyon olduğu saptandı.

Korelasyon analizi sonuçları Tablo 15'de gösterildi.

Δ IFN- γ , Δ IL-10 ve Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarıyla hastaların radyolojik bulguları arasında doğrusal regresyon ilişkisi bulunup bulunmadığı incelendi;

Çoklu doğrusal regresyon analizi sonuçlarının beta katsayı ve p değerleri Tablo 16'da gösterildi.



Şekil 15: Sitokin yanıtları ile elde edilen ROC eğrileri. I; Tüm tbc hastaları, II; çoklu kaviter lezyonlular, milier tutulumu olanlar ve nükseden tbc hastaları hariç tüm tbc hastaları, III; çoklu kaviter lezyonlular, milier tutulumu olanlar ve nükseden tbc hastaları, a; birinci kontrol grubu ile karşılaştırma sonuçları, b; ikinci kontrol grubu ile karşılaştırma sonuçlarını, mavi grafikler ESAT-6 ile, yeşil renkli grafikler CFP-10 ile, tutuncu renkli grafikler ESAT-6 ve CFP-10'un bir arada kullanılması ile elde edilen sitokin yanıtlarını göstermektedir.

KORELASYON ANALİZİ		Kültür Pozitifliği	Sekel	Fibro-Noduler Lezyon	Plörezi	Kavite Adedi	En büyük kavite çapı
E Δ IFN- γ	Katsayısı	-0,244	0,074	-0,138	0,064	-0,082	-0,023
	P değeri	0,019	0,259	0,114	0,289	0,237	0,420
C Δ IFN- γ	Katsayısı	-0,104	-0,050	-0,152	-0,148	-0,033	0,028
	P değeri	0,192	0,333	0,092	0,098	0,387	0,405
EC Δ IFN- γ	Katsayısı	-0,218	0,035	-0,120	-0,027	-0,090	0,056
	P değeri	0,033	0,380	0,148	0,406	0,217	0,313
E Δ IL-10	Katsayısı	-0,048	-0,157	-0,048	-0,151	0,134	0,003
	P değeri	0,343	0,086	0,338	0,094	0,122	0,490
C Δ IL-10	Katsayısı	0,016	-0,217	-0,073	-0,008	0,277	0,211
	P değeri	0,448	0,028	0,263	0,472	0,007	0,032
EC Δ IL-10	Katsayısı	-0,160	-0,187	-0,178	-0,060	0,188	0,001
	P değeri	0,090	0,051	0,059	0,301	0,050	0,497
E Δ IFN- γ / Δ IL-10 ORANI	Katsayısı	-0,167	0,097	-0,053	0,132	-0,152	-0,058
	P değeri	0,081	0,199	0,323	0,125	0,092	0,308
C Δ IFN- γ / Δ IL-10 ORANI	Katsayısı	-0,074	0,072	-0,082	-0,108	-0,198	-0,077
	P değeri	0,269	0,265	0,238	0,174	0,041	0,253
EC Δ IFN- γ / Δ IL-10 ORANI	Kat sayısı	-0,093	0,089	0,064	-0,015	-0,210	0,038
	P değeri	0,218	0,220	0,290	0,449	0,033	0,372

Tablo 15: Korelasyon analizi sonuçları (sarı ile boyananlar ters yöndeki, kırmızı ile boyananlar ise aynı yöndeki anlamlı korelasyonları göstermektedir)

ÇOKLU DOĞRUSAL REGRESYON ANALİZİ		Sekel	Fibro-Noduler Lezyon	Plörezi	Kavite Adedi	En büyük kavite çapı
Δ E IFN- γ	Beta katsayısı	-307,949	-1.039,594	-583,392	-208,648	-24,148
	P değeri	0,516	0,024	0,268	0,057	0,781
Δ CIFN- γ	Beta katsayısı	-503,751	-925,778	-925,913	-174,288	-7,302
	P değeri	0,117	0,003	0,010	0,019	0,900
Δ ECIFN- γ	Beta katsayısı	-473,484	-1.299,886	-1.162,002	-297,736	32,850
	P değeri	0,326	0,006	0,032	0,008	0,709
Δ E IL-10	Beta katsayısı	-104,943	-73,760	-148,397	5,206	-8,311
	P değeri	0,196	0,342	0,101	0,778	0,575
Δ C IL-10	Beta katsayısı	-26,105	10,815	-6,011	-2,178	8,823
	P değeri	0,342	0,680	0,843	0,728	0,082
Δ EC IL-10	Beta katsayısı	-261,737	-231,512	-129,271	8,478	-18,462
	P değeri	0,028	0,041	0,320	0,751	0,390
E Δ IFN- γ / Δ IL-10 ORANI	Beta katsayısı	10,708	-13,959	-5,685	-2,449	-0,504
	P değeri	0,235	0,107	0,568	0,234	0,759
C Δ IFN- γ / Δ IL-10 ORANI	Beta katsayısı	35,113	-61,390	-49,792	-10,790	-4,005
	P değeri	0,367	0,101	0,249	0,226	0,574
EC Δ IFN- γ / Δ IL-10 ORANI	Beta katsayısı	2,439	-8,192	-8,054	-2,022	0,435
	P değeri	0,663	0,129	0,196	0,117	0,672

Tablo 16: Çoklu doğrusal regresyon analizi sonuçlarının beta katsayı değerleri ve p değerleri (gri ile boyananlar, anlamlı doğrusal regresyon ilişkisi bulunan verileri göstermektedir).

7. TARTIŞMA

Latent tüberküloz hastalığının tanısında tüberkülin deri testine alternatif olarak kullanılmaya başlanan IFN- γ testlerinde, *M. tuberculosis*’e özgü olan veya olmayan antijenler kullanılmaktadır. Antijenik uyarana karşı büyük oranda yardımcı T lenfositler tarafından sentezlenen IFN- γ düzeyleri saptanmaktadır.

Tüberküloz hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarıyla yapılan çalışmalarda; *M. tuberculosis*’e ait RD1 operonu tarafından sentezlenen ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerinin birlikte kullanıldığı IFN- γ testlerinin özgüllüğünün, tüberkülin deri testine kıyasla yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu testlede, BCG aşısı ve geçirilmiş tüberküloz dışı mikobakteriyel enfeksiyonlara bağlı yanlış pozitiflik oranları düşüktür.

Latent tüberküloz hastalığının tanısında kullanılan tüberkülin deri testine kıyasla, daha iyi sonuçlar elde edilse de, bazı çalışmalarda bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, çocuklarda, akciğer dışı tüberküloz olgularında ve tüberküloz hastalığının endemik olduğu bölgelerde yaşayan bireylerde IFN- γ testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük olabildiği gösterilmiştir.

Hücre kültürü kuyucuklarında, IFN- γ sentezleyen ve leke oluşturan yardımcı T lenfosit kolonilerinin sayıldığı ELISPOT testleri ile IFN- γ düzeylerinin ölçüldüğü ELISA testlerinin ticari formları bulunmaktadır ve maliyetleri yüksektir. Bu maliyetleri düşürebilmek, farklı çalışmalar için kullanılması planlanan klonlama, ekspresyon, protein saflaştırma ve tam kan hücre kültürü yöntemlerinin optimizasyonu amacıyla deney düzeneklerinin laboratuvarımızda hazırlanmasına karar verildi. Çeşitli aşamalarda karşılaşılan sorunlar, literatür desteğiyle uygulanan çözüm yöntemleri kullanılarak aşıldı.

Pet100/D-Topo-ekspresyon vektörüne klonlanan ESAT-6 geni ile beklenen DNA dizi analizi sonuçları elde edilmesine rağmen konak hücre olarak seçilen BL21 Star *E. coli* suşunda SDS-PAGE ile saptanacak düzeyde ekspresyon sağlanamadı. Farklı bir vektör (pQE30) ve konak hücresi (*MI5 E. coli* suşu) kullanıldı.

1 ml heparinize kan örneklerinde NO (Nitrik oksit) düzeyleri Δ IFN- γ değerleri 8000 pg’ın üzerinde olan hastalarda bile saptanma sınırının altında bulundu.

His-tag afinite kromatografi teknikleriyle elde edilen protein preparatı; endotoksin, protein, DNA gibi konak hücreye ait kalıntılardan önemli ölçüde arındırılmaktadır. Yine de

protein preparatında, hücre kültürü koşullarında poliklonal T lenfosit yanıtına yol açacak düzeyde endotoksin bulunabilmektedir. Protein preparatını endotoksinden arındırmak amacıyla kullanılan matrikslerinin maliyeti çok yüksektir. Oysa Franken ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada, protein preparatındaki endotoksin düzeyinin sadece izopropanol kullanılarak düşürülebildiği gösterilmiştir [117]. Bu yöntemde, endotoksinin proteinlerden uzaklaştırılmasında, Ni-NTA matriksine bağlanmış durumdaki proteinlere izopropanolün %60 yoğunluktaki tamponu ile fazladan 4 yıkama basamağı daha uygulanmaktadır. Böylece protein saflaştırılması sırasında kullanılan afinite matrikslerinin maliyeti yarıya düşürülmektedir. Üstelik fazladan uygulanan bu yıkama basamakları sırasında üre içermeyen tamponlar kullanıldığından, proteinlerin yeniden katlanmaları (“*refolding*”i) da sağlanmaktadır [116, 117]. Bu çalışmada Ni-NTA matriksine bağlanan proteinlerin %60 izopropanol içeren tamponla yıkanmasıyla endotoksin düzeylerinin 80 ile 160 kat azaldığı saptandı.

Sitokin yanıtlarının, duyarlılık ve özgüllüğünü en yüksek düzeylere çıkartacak sınır değerleri “*cut-off*”, çalışmalar arasında değişkenlik göstermektedir ve bazı çalışmalarda elde edilen sonuçlar birbirleriyle de çelişkilidir. Tüm bu değişkenlik ve çelişkilere sebep olan kısıtlılıkların en önemlisi; klinik, laboratuvar ve radyolojik tanıları bakımından farklı kategorilere giren yeterli hasta sayısına ulaşılamamasıdır. Farklı klinik seyir ve bağışık yanıt durumuna sahip tüberküloz olgularının ortak gruplarda değerlendirilmeleri de çalışmalar arasında uyumsuzluklara neden olmaktadır. Hasta sayılarının yetersiz olduğu çalışmalarda, parametrik testler yerine non-parametrik testlerin kullanılması istatistiksel anlamlılık düzeylerini düşürmektedir. Bu sorun, yeterli hasta sayısı ve klinik çeşitliliğin sağlandığı çok merkezli çalışmalarla aşılabılır.

Özellikle tüberkülin deri testi uygulamadan sadece öykü, klinik ve radyolojik bulgularla oluşturulan kontrol gruplarının yer aldığı çalışmalarda, popülasyondaki *M. tuberculosis* enfeksiyon prevalansına bağlı olarak eşik değerlerde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu farklılıklar açısından, araştırma makeleleri ya da birçok çalışma sonucunu aynı anda değerlendirmemizi sağlayan sistematik derlemelerde görüş birliği sağlanamamıştır [118,119].

Çalışmalardaki değişkenlik ya da çelişkilerin diğer sebepleri ise, ticari testlerin kısıtlılıkları olabilir. Bu kısıtlılıkların en önemlileri, uyaran olarak kullanılan antijenlerin az sayıda olması (ESAT-6, CFP-10, PPD) ve de yalnızca IFN- γ yanıtlarının saptanabiliyor

olmasıdır. Kullanılan antijenlerin az sayıda olması sorunu, tek başlarına değil, antijen kokteylleri şeklinde uygulanmalarıyla aşılabilmektedir. Tek başına IFN- γ yanıtlarının saptanması ise, antijene karşı yalnızca hücresel yanıtı ölçebilmektedir. Oysa ki, bağışık yanıt ve hastalığın klinik seyrindeki, farklılıklara bağlı olarak sıvısal ya da regülatör yanıtın baskın olduğu durumlar atlanabilir. Bu sitokin paternleri, farklı bağışık yanıt durumlarının göstergesi olarak anlam taşıyabileceğinden, hasta ve toplum sağlığının korunmasında, tanı, tedavi ve takip stratejilerine yön verebilirler.

Bu çalışmada *M. tuberculosis*'e ait ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin hem tek başlarına, hem de bir arada kullanılmalarına karşı ortaya çıkan sitokin yanıtları saptandı. Hücresel bağışık yanıtın değerlendirilmesini sağlayan sitokinlerden IFN- γ ve sıvısal bağışık yanıt veya regülatör yanıtın değerlendirilmesini sağlayan sitokinlerden IL-10 değerleri ölçüldü.

Antijen olarak kullanılan farklı uyaranlar sitokin yanıtlarını ölçen çalışmalarda antijenler $\mu\text{g} / \text{ml}$ cinsinden eşit miktarlarda uygulanmaktadır. Hastalarda ortaya çıkan yanıtlar kısıtlı sayıda epitopa özgü olabildiğinden uyarıcı epitop miktarı arasında büyük farklar ortaya çıkabilmektedir. ESAT-6, 97 aminoasit uzunlukta, CFP-10 ise 102 aminoasit uzunlukta olduğundan aralarındaki büyüklük farkı ihmal edilebilir düzeydedir. Ancak $\mu\text{g}/\text{ml}$ cinsinden eşit miktarda uygulanan 6 kDa'luk bir antijenin uyarıcı epitop yoğunluğu, 40 kDa'luk bir antijenin uyarıcı epitop yoğunluğundan yaklaşık 7 kat fazladır. 23 kDa'luk MPT64, 30 kDa'luk Ag85B veya 71 kDa'luk Rv3876 gibi büyük proteinler ve 6 kDa'luk ESAT-6 gibi küçük proteinlerle bir arada yapılan çalışmalarda uygulanan antijen miktarının pmol cinsinden eşit olmasına dikkat edilmesi gereklidir.

Sonuçların analizleri yapılırken, antijenik uyaranla elde edilen sitokin yanıtları ile antijenik uyaranın bulunmadığı koşullardaki sitokin yanıtları arasındaki farklar ($\Delta\text{IFN-}\gamma$ ve $\Delta\text{IL-10}$ değerleri) dikkate alındı. $\Delta\text{IFN-}\gamma$ ve $\Delta\text{IL-10}$ yanıtlarının eşik değerleri bulunan tek yönlü değişkenler olduklarından, eşik değerlere yakın düzeylerde anlamlarını yitiren verilere dönüştükleri saptandı. Bu sorunu aşmaya yönelik olarak, sitokin yanıtlarının eşik değerlerle olan ilişkilerinden bağımsız, ancak diğer sitokin yanıtı ile göreceli farkını ortaya koyabilecek yeni bir değişken tanımlanmaya çalışıldı. Bu nedenle " $\Delta\text{IFN-}\gamma / \Delta\text{IL-10}$ " oranları da analizlere katıldı.

Farklı hasta gruplarının birinci kontrol grubu ile karşılaştırılmaları sonucunda; iyi prognostik öneme sahip radyolojik bulgular taşıyan hastaların Δ IFN- γ yanıtlarının daha baskın olduğu saptanırken, kötü prognostik öneme sahip radyolojik bulgular taşıyan hastaların ise Δ IL-10 yanıtlarının daha baskın olduğu saptandı.

İyileşmiş hasta grubunun tüm antijenik uyarılara karşı Δ IFN- γ yanıtlarının anlamlı düzeyde yüksek bulunması, CFP-10 uyarısına karşı Δ IL-10 yanıtlarının anlamlı düzeyde düşük bulunması ve tüm antijenik uyarılara karşı Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının da anlamlı düzeyde yüksek bulunması;

- **İyileşmiş hasta grubunda, ESAT-6 ve CFP-10'a karşı hem güçlü Th1 yanıtının olduğunu, hem de Th1 yanıtının Th2 veya Treg yanıtından göreceli olarak daha yüksek olduğunu göstermektedir.**

Sadece fibronodüler lezyonu olan hasta grubunun, antijenik uyarılara karşı Δ IFN- γ yanıtlarında anlamlı bir fark bulunmaması, CFP-10 uyarısına karşı Δ IL-10 yanıtlarının anlamlı düzeyde düşük bulunması ve CFP-10'un tek başına veya ESAT-6 ile birlikte uygulanmasında Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının anlamlı düzeyde yüksek bulunması;

- **Sadece fibronodüler lezyonu olan hasta grubunda, ESAT-6 ve CFP-10'a karşı güçlü Th1 yanıtları bulunmasa bile, Th1 yanıtının Th2 veya Treg yanıtından göreceli olarak daha yüksek olduğu söylenebilir.**

Plevral efüzyonu olan hasta grubunun CFP-10 uyarısına karşı Δ IFN- γ yanıtlarının anlamlı düzeyde düşük bulunması, tüm antijenik uyarılara karşı Δ IL-10 yanıtlarının anlamlı düzeyde düşük bulunması ve antijenik uyarılara karşı Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranları arasında anlamlı düzeyde bir fark bulunmaması;

- **Plevral efüzyonu olan hasta grubunda, CFP-10'a karşı güçlü Th1 yanıtının bulunmadığını ve Th2 veya Treg yanıtlarının zayıf olduğunu ifade eder.**

Çoklu kaviter lezyonu olan hasta grubunun ESAT-6 uyarısına karşı Δ IFN- γ yanıtları ve ESAT-6 ya da CFP-10 ile birlikte kullanılmasıyla ortaya çıkan Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının anlamlı düzeyde düşük bulunması;

- **Çoklu kaviter lezyonu olan hasta grubunda, ESAT-6'ya karşı hem Th1 yanıtının düşük olduğunu hem de Th1 yanıtlarının Th2 veya Treg yanıtından göreceli olarak daha düşük olduğunu ifade etmektedir.**

Milier tutulumu olan hasta grubunun ESAT-6 veya CFP-10 ile birlikte kullanılması ile Δ IFN- γ yanıtlarının ve Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının anlamlı düzeyde düşük bulunması;

- **Milier tutulumu olan hasta grubunda; ESAT-6'nın tek başına veya CFP-10 ile birlikte uygulanmasına karşı hem Th1 yanıtının düşük olduğu, hem de Th1 yanıtının Th2 veya Treg'den göreceli olarak daha düşük olduğu söylenebilir.**

Nükseden tüberküloz hastalığı olanlarda tüm antijenik uyarılara karşı hem Δ IFN- γ yanıtlarının hem de Δ IL-10 yanıtlarının anlamlı düzeyde düşük bulunması;

- **Bu hasta grubunda, ESAT-6 ve CFP-10'a karşı Th1 ve Th2 yanıtsızlığının olduğunu göstermektedir.**

Tedaviye ihtiyacı olan tüm tüberküloz hastalarında antijenik uyarılara karşı Δ IFN- γ yanıtlarında anlamlı bir fark bulunmaması, CFP-10 veya ESAT-6 ile birlikte kullanılmasıyla Δ IL-10 yanıtlarının anlamlı düzeyde düşük bulunması ve CFP-10 veya ESAT-6 ile birlikte uygulanmasında Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının anlamlı düzeyde yüksek bulunması;

- **Tedaviye ihtiyacı olan tüm tüberküloz hastalarında, CFP-10 veya ESAT-6 ile birlikte uygulanmasına karşı güçlü Th1 yanıtı bulunmasa bile Th1 yanıtlarının Th2 veya Treg'den göreceli olarak daha yüksek olduğunu ifade eder.**

Yeni kontrol grubu ile yapılan analizler, önceki analizlere göre avantajlı bakış açıları sundu. Önceki analizlerde anlamlı bulunan sonuçların çoğu pekişti, anlamlılık sınırında olan bazı bulgular ise, anlamlı düzeylere geldi. Çoklu kaviter lezyonu olan ve nükseden tüberküloz hastalığı olan grupların Δ IFN- γ yanıtları, 34 kişilik kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmasına rağmen ikinci kontrol grubuna göre (24 kişilik ikinci kontrol grubunun Δ IFN- γ yanıtları düşük olduğu için) çoklu kaviter lezyonu olan ve nükseden tüberküloz hastalığı olanların IFN- γ yanıtlarının düşüklüğü anlamlı bulunmadı.

Hem Δ IFN- γ değerlerinin hemde Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının, daha önceki klinik çalışmalarla belirlenen ve prognostik değerlerinin olduğu bilinen, tek başına fibronodüler lezyon varlığı ile aynı yönde korelasyonlarının olduğu saptandı. Ayrıca Δ IFN- γ değerleri ve Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının kötü prognostik bulgulardan olan çoklu kaviter lezyon ve milier tutulum varlığıyla ters yönde korelasyonlarının olduğu saptandı

Aynı konuda yapılmış diğer çalışmalara ek olarak kullandığımız IFN- γ / Δ IL-10 oranı değerlerinin, Δ IFN- γ yanıtları ile benzer sonuçlarının olduğu saptandı. Ancak Δ IFN- γ

yanıtlarının ortaya çıkaramadığı, gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonu olan plevral efüzyon varlığı ile $\Delta\text{IFN-}\gamma$ / $\Delta\text{IL-10}$ oranları arasında aynı yönde ve orta düzeyde bir korelasyon olduğu saptandı.

Literatürde, tedavi sonrası sitokin yanıtlarının düştüğünü gösteren çalışmalar [120] ve tedavi ile sitokin yanıtlarının yükseldiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [121,122]. Bu çalışmada 6-17 günden fazla süredir tedavi alanların $\Delta\text{IFN-}\gamma$ ve $\Delta\text{IL-10}$ yanıt ortalamaları daha düşük bulundu. $\text{IFN-}\gamma$ / IL-10 oranları arasında tedavi sürelerine göre ortalamalar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak bu sonuçlar tedavilerinin farklı günlerindeki hastalardan bir kez alınan kan örnekleri ile elde edildiği için rastlantısal olabilir. Tedavi sürelerinin sitokin yanıtlarıyla olan ilişkileri, hastaların sitokin yanıtlarının tedavi öncesi ve tedavilerinin farklı dönemlerinde ölçülmesiyle elde edilebilir.

Klinik özellikleri farklı olan hastalara yapılan çalışmalarda $\text{IFN-}\gamma$ yanıtlarının duyarlılığı %32 ile %78 arasında değişebilmektedir [118]. Farklı klinik özelliklerden etkilenen bu duyarlılık değişkenliğine son meta-analiz ve derlemelerde özellikle değinilmektedir. Hasta kliniğine bağlı duyarlılık değişkenlikleri $\text{IFN-}\gamma$ deneylerinin kullanım alanlarını latent tüberküloz hastalığı tanısıyla sınırlandırmaktadır [119]. Özellikle tüberküloz hastalığının endemik olduğu ülkelerde hala yeterince yaygın olarak kullanılmamaktadır. $\text{IFN-}\gamma$ testlerinde ek olarak IL-10 gibi sıvısal ya da regülatör yanıtın göstergesi olan bir sitokinin ölçülmesi ve $\Delta\text{IFN-}\gamma$ / $\Delta\text{IL-10}$ oranlarının anlamının belirtilmesi, bu testlerin duyarlılıklarını, özgüllüklerini ve prognostik değerlerini artıracaktır.

7.1. SONUÇ

- Pet100/D-TOPO vektörüne klonlanan ESAT-6 geni DNA dizi analizi ile doğrulandı ancak BL21 (DE3) star *E. coli* suşunda SDS-PAGE ile saptanacak düzeyde protein ekspresyonu sağlanamadı.
- 1 ml heparinize kan örneklerinde NO (Nitrik oksit) düzeyleri (Δ IFN- γ değerleri 8000 pg'ın üzerinde olan hastalarda bile) saptanma sınırının altında bulundu.
- Ni-NTA matriksine bağlanan proteinler, %60 izopropanol içeren tamponla yıkandığında endotoksin düzeyleri 80 ile 160 kat azaldı.
- PPD testinin duyarlılığının %65 olduğu ve sağlıklı bireylere uygulanmasının gelecekte yalancı PPD pozitifliklerine sebep olabileceği göz önüne alındığında; tüm kontrol grubunu PPD testi negatif bireylerden oluşturmak yerine IFN- γ değerleri yüksek ve toplumdaki tüberküloz prevalansına uygun oranda bir grubun dışlanması tercih edilebilir.
- Tek başına IFN- γ yanıtlarının saptanması yalnızca hücresel yanıtı ölçebilmektedir. IL-10 gibi sıvısal ya da regülatör yanıtın göstergesi olan bir sitokinin ölçülmesi hastanın bağışık yanıt durumunu, klinik özelliklerini ve prognozunu yansıtabilmektedir
- Δ IFN- γ ve Δ IL-10 yanıtları eşik değerleri bulunan tek yönlü değişkenler oldukları için eşik değerlere yakın düzeylerde (Örneğin; Nükseden tüberküloz hastaları çoklu kaviter lezyonu olan hastalar ve milier tutulumu olan hastalarda) anlamlarını yitiren verilere dönüşmektedirler. Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının saptanması yanıtsızlığın göreceli olarak anlamlandırılmasını sağlamak ve tek başlarına sitokin ölçüm sonuçlarının dezavantajını ortadan kaldırmaktadır.
- Prognostik değerleri olduğu bilinen radyolojik bulgular ile sitokin yanıtları arasında uyum olduğu saptandı. Kavite adedi ve enbüyük kavite çapının artması ile IL-10 yanıtları arasında aynı yönde ve orta düzeyde bir korelasyon olduğu saptandı. Kavite adedi ve kültür pozitifliği ile IFN- γ yanıtları arasında ise ters yönde ve orta düzeyde bir korelasyon olduğu saptandı.
- Klinik, laboratuvar ve radyolojik bulgular ile sitokin yanıtları tam olarak açıklanamamaktadır. Ancak sekel ve fibronodüler lezyonun bulunmasının IL-10 yanıtlarını azaltacak yönde, fibronodüler lezyon, plorezi ve kavite bulunmasının ise IFN- γ yanıtlarını azaltacak yönde beta katsayı değerlerine sahip anlamlı doğrusal regresyon ilişkileri saptandı.

- Hasta kliniğine bağlı duyarlılık değişkenlikleri, IFN- γ deneylerinin kullanım alanlarını latent tüberküloz hastalığı tanısıyla sınırlandırmakta ve özellikle tüberküloz hastalığının endemik olduğu ülkelerde hala yeterince yaygın olarak kullanılamamaktadır. IFN- γ testlerine ek olarak IL-10 gibi sıvısal ya da regülatör yanıtın göstergesi olan bir sitokinin ölçülmesi ve Δ IFN- γ / Δ IL-10 oranlarının anlamının belirtilmesi, bu testlerin duyarlılıklarını, özgüllüklerini ve prognostik değerlerini artıracaktır.

8. KAYNAKLAR

1. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/pdf/full_report_correctedversion.pdf
2. Fine, P. E., Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995. 346: 1339-1345.
3. M. A. Behr, M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane, P. M. Small. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science* 1999; 284 :1520-1523.
4. Ben-Yedidia, T., Marcus, H., Reisner, Y. and Arnon, R., Intranasal administration of peptide vaccine protects human/mouse radiation chimera from influenza infection. *Int. Immunol.* 1999. 11: 1043-1051.
5. Volpina, O. M., Surovoy, A. Y., Zhmak, M. N., Kuprianova, M. A., Koroev, D. O., Chepurkin, A. V., Toloknov, A. S. and Ivanov, V. T., A peptide construct containing B-cell and T-cell epitopes from the foot-and-mouth disease viral VP1 protein induces efficient antiviral protection. *Vaccine* 1999. 17: 577-584.
6. Langeveld, J. P., Casal, J. I., Osterhaus, A. D., Cortes, E., de- Swart, R., Vela, C., Dalsgard, K., Puijk, W. C., Schaaper, W. M. and Melen, R. H., First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J. Virol.* 1994. 68: 4506-4513.
7. Ulrichs, T., Munk, M. E., Mollenkopf, H., Behr-Perst, S., Colangeli, R., Gennaro, M. L. and Kaufmann, S. H., Differential T cell responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur. J. Immunol.* 1998. 28: 3949-3958.
8. Ravn, P., Demissie, A., Eguale, T., Wondwoson, H., Lein, D., Amoudy, H., Mustafa, A. S., Jensen, A. K., Holm, A., Rosenkrands, I., Oftung, F., Olobo, J., von-Reyn, C. F. and Andersen, P., Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from Mycobacterium tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 1999. 179: 637-645.
9. Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 2000 Feb;68(2):791-5.

10. Harboe, M., T. Oettinger, H. G. Wiker, I. Rosenkrands, and P. Andersen. 1996. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 64:16-22.
11. Olsen, A.W., Hansen, P.R., Holm, A., Andersen, P., 2000. Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with a single subdominant epitope from the ESAT-6 antigen. *Eur. J. Immunol.* 30 (6), 1724-1732.
12. Behrens G, Li M, Smith CM, Belz GT, Mintern J, Carbone FR Heath WR. Helper T cells, dendritic cells and CTL immunity. *Immunology and Cell Biology* 2004; 82: 84-90.
13. Harboe M., Malin A.S., Dockrell H.S., Wiker H.G., Ulvund G., Holm A., Jorgensen M.L., Andersen P 1998. B-Cell Epitopes and Quantification of the ESAT-6 Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 66(2): 717-723.
14. Hughes AJ, Hutchinson P, Gooding T, Freezer NJ, Holdsworth SR, Johnson PD. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry. *Clin Exp Immunol.* 2005 Oct;142(1):132-9.
15. Santo AH. Deaths attributed to multiple causes and involving tuberculosis in the state of Rio de Janeiro Brazil between 1999 and 2001. *J Bras Pneumol.* 2006 Nov-Dec;32(6):544-52.
16. Daniel TM. The History of Tuberculosis. *Respiratory Medicine.* 2006;100:1862-1870
17. Karlıkaya C. Tüberküloz Ders Notları. 1998;
<http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>
18. Sotomayor H, Burgos J, Arango M. [Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a Colombian prehispanic mummy] *Biomedica* 2004; 24: 18-26.
19. Palomino JC.,Leão SC., Ritacco V. Tuberculosis 2007.
20. Elmer W. Kineman, Elmer W. Koneman, Gail L. Woods, Gary W. Procop, Paul C. Schreckenberger, Stephen D. Allen, William M. Janda. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* 2005.

21. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3684-9.
22. Rachman H, Strong M, Schaible U, Schuchhardt J, Hagens K, Mollenkopf H, Eisenberg D, Kaufmann SH. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression profiling within the context of protein networks. *Microbes Infect*. 2006 Mar;8(3):747-57.
23. Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7033-41.
24. Thurnher, M., R. Ramoner, G. Gastl, C. Radmayr, G. Bock, M. Herold, H. Klocker, and G. Bartsch. 1997. *Bacillus Calmette-Guerin* mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int. J. Cancer* 70:128–134.
25. Kang BK, Schlesinger LS. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2769-77.
26. Hall-Stoodley L, Watts G, Crowther JE, Balagopal A, Torrelles JB, Robison-Cox J, Bargatze RF, Harmsen AG, Crouch EC, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* binding to human surfactant proteins A and D, fibronectin, and small airway epithelial cells under shear conditions. *Infect Immun*. 2006 Jun;74(6):3587-96.
27. Menozzi, F. D., J. H. Rouse, M. Alavi, M. Laude-Sharp, J. Muller, R. Bischoff, M. J. Brennan, and C. Locht. 1996. Identification of a heparinbinding hemagglutinin present in mycobacteria. *J. Exp. Med*. 184:993–1001.
28. Cywes, C., H. C. Hoppe, M. Daffe, and M. R. Ehlers. 1997. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect. Immun*. 65:4258–4266.
29. Haworth R, Platt N, Keshav S, Hughes D, Darley E, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated

- macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med.* 1997 Nov 3;186(9):1431-9.
30. Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV, Boom WH. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2003 Aug;71(8):4487-97.
 31. Bermudez, L. E., and J. Goodman. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect. Immun.* 64:1400–1406.
 32. Ferguson, J. S., D. R. Voelker, F. X. McCormack, and L. S. Schlesinger. 1999. Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J. Immunol.* 163:312–321.
 33. Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol.* 1998 Sep 15;161(6):3169-75.
 34. Garred, P., C. Richter, A. B. Andersen, H. O. Madsen, I. Mtoni, A. Svejgaard, and J. Shao. 1997. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. *Scand. J. Immunol.* 46:204–208.
 35. DesJardin LE, Kaufman TM, Potts B, Kutzbach B, Yi H, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages exhibit enhanced cellular adhesion with increased expression of LFA-1 and ICAM-1 and reduced expression and/or function of complement receptors, FcγRII and the mannose receptor. *Microbiology.* 2002 Oct;148(Pt 10):3161-71.
 36. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. *J Clin Invest.* 1990 Apr;85(4):1304-14.
 37. Pasula, R., J. R. Wright, D. L. Kachel, and W. J. Martin. 1999. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Investig.* 103: 483–490.

38. Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7477-85.
39. Doz E, Rose S, Nigou J, Gilleron M, Puzo G, Erard F, Ryffel B, Quesniaux VF. Acylation determines the TLR-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor- and SIGNR1-independent negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6; [Epub ahead of print]
40. Gruenberg J, Stenmark H: The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:317-323.
41. Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V: Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:4033-4038.
42. Roberts EA, Chua J, Kyei GB, Deretic V. Higher order Rab programming in phagolysosome biogenesis. *J Cell Biol*. 2006 Sep 25;174(7):923-9.
43. Thompson CR, Iyer SS, Melrose N, VanOosten R, Johnson K, Pitson SM, Obeid LM, Kusner DJ: Sphingosine kinase 1 (SK1) is recruited to nascent phagosomes in human macrophages: inhibition of SK1 translocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2005, 174:3551-3561.
44. Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, Klebl B, Thompson C, Bacher G, Pieters J: Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 2004, 304:1800-1804.
45. Geisel RE, Sakamoto K, Russell DG, Rhoades ER: In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin is due principally to trehalose mycolates. *J Immunol* 2005, 174:5007-5015.
46. Vergne I, Chua J, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic*. 2003 Sep;4(9):600-6.
47. Vergne I, Fratti RA, Hill PJ, Chua J, Belisle J, Deretic V: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog

- phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol Biol Cell* 2004, 15:751-760.
48. Makinoshima H, Glickman MS: Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature* 2005, 436:406-409.
 49. VanderVen BC, Harder JD, Crick DC, Belisle JT: Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science* 2005, 309:941-943.
 50. Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR Jr: SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2003, 48:453-464.
 51. Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR: Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2004, 51:359-370.
 52. Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, Gordon SV, Hewinson RG, Burke B, Norman J et al.: Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J* 2005, 24:2491-2498.
 53. Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, Cox JS: Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:13001-13006.
 54. Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sasseti CM, Sherman DR, Bloom BR, Rubin EJ: Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:10676-10681.
 55. Gao LY, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN, Brown EJ: A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol* 2004, 53:1677-1693.
 56. Houben EN, Nguyen L, Pieters J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Feb;9(1):76-85.

57. Goren MB, Hart PD, Young MR, Armstrong JA. Prevention of phagosome lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73 : 2510-4.
58. Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 1994; 124 : 677-88.
59. Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 1991; 59 : 1905-10.
60. Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibile JC, et al. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 : 2453-7.
61. Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* 1991; 59 : 1755-61.
62. Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A. How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*. 2006 Nov;8(11):1687-96.
63. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, Orlova MO, Apt AS. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun*. 2005 Mar;73(3):1744-53.
64. Sayama K, Diehn M, Matsuda K, Lunderius C, Tsai M, Tam SY, Botstein D, Brown PO, Galli SJ. Transcriptional response of human mast cells stimulated via the Fc(epsilon)RI and identification of mast cells as a source of IL-11. *BMC Immunol*. 2002 Jun 12;3:5.
65. Munoz S, Hernandez-Pando R, Abraham SN, Enciso JA. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol*. 2003 Jun 1;170(11):5590-6.
66. Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1999 Feb;11(1):53-9.

67. Ernst, J. D. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 66:1277–1281.
68. Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.* 2001 Mar;3(3):249-55.
69. Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* 2000 Jun 2;288(5471):1647-50.
70. Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, Kerjaschki D, Maurer D. Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):797-808.
71. Gumperz JE, Brenner MB. CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol.* 2001 Aug;13(4):471-8.
72. Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J, Golenbock DT, Vogel SN, Fenton MJ. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol.* 2001 Mar 15;166(6):4074-82.
73. Stenger S, Niazi KR, Modlin RL. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3582-8.
74. Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B, Weis SE, Samten B, Safi H, Shams H, Barnes PF. NK cells regulate CD8⁺ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol.* 2004 Jan 1;172(1):130-7.
75. Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Safi H, Lakey DL, Mandelboim O, Samten B, Porgador A, Barnes PF. The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3451-7.
76. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 2000; 1: 141-50.
77. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 710-20.

78. Rivas-Santiago B, Sada E, Tsutsumi V, Aguilar-Leon D, Contreras JL, Hernandez-Pando R. beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis* 2006; 194: 697-701.
79. Rollins BJ., Chemokines. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):909-28.
80. Moller AS, Ovstebo R, Haug KB, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P. , Chemokine production and pattern recognition receptor (PRR) expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Cytokine*. 2005 Dec 21;32(6):304-15. Epub 2006 Jan 10.
81. van Vliet SJ, Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007 Aug;19(4):435-40.
82. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.
83. Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol*. 4, 499–511.
84. Bowie, A., and O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol*. 67, 508–514.
85. Choe, J., Kelker, M.S., and Wilson, I.A. (2005). Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309, 581–585.
86. Pitha PM. Unexpected similarities in cellular responses to bacterial and viral invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 20;101(3):695-6.
87. Kaisho T., Akira S., Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:979-87.
88. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999; 163 : 3920-7.
89. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2004 Oct;120(4):213-32.

90. Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, Bjune G. Progress in serodiagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. Scand J Immunol. 2007 Aug-Sep;66(2-3):176-91.
91. Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. J Invest Dermatol. 2005 Oct;125(4):629-37.
92. Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. J Immunol. 1998 Jun 1;160(11):5448-54.
93. Barcelos W, Martins-Filho OA, Guimaraes TM, Oliveira MH, Spindola-de-Miranda S, Carvalho BN, Toledo Vde P. Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. Microbiol Immunol. 2006;50(8):597-605.
94. Liu G, Ren H, Sun XJ, Shi JS. Distribution of natural killer cells and T-lymphocyte subsets in peripheral blood, gallbladder cancer and surrounding tissue. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2007 Feb;6(1):81-6.
95. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis by interleukin-10 and transforming growth factor beta. Infect Immun. 1999 Dec;67(12):6461-72.
96. De La Barrera SS, Finiasz M, Frias A, Aleman M, Barrionuevo P, Fink S, Franco MC, Abbate E, del C Sasiain M. Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis. Clin Exp Immunol. 2003 Jun;132(3):450-61.
97. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94 : 5243-8.
98. Vidal S, Gros P, Skamene E. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/Ity/Lsh locus. J Leukoc Biol. 1995 Oct;58(4):382-90.

99. Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 1986; 68 : 708-11.
100. Ogata K, Linzer BA, Zuberi RI, Ganz T, Lehrer RI, Catanzaro A. Activity of Defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun* 1992; 60 : 4720-5.
101. Bermudez LE, Kolonoski P, Young LS. Natural killer cell activity and macrophage-dependent inhibition of growth or killing of *Mycobacterium avium* complex in a mouse model. *J Leukoc Biol.* 1990 Feb;47(2):135-41.
102. Esin S, Batoni G, Pardini M, Favilli F, Bottai D, Maisetta G, Florio W, Vanacore R, Wigzell H, Campa M. Functional characterization of human natural killer cells responding to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. *Immunology.* 2004 May;112(1):143-52.
103. Miles JS, Wolf CR. Principles of DNA cloning. *BMJ.* 1989 Oct 21;299(6706):1019-22.
104. Galley HF, Webster NR. A rough guide to molecular biology. *Br J Anaesth.* 1999 Oct;83(4):675-81.
105. Mucke M, Kruger DH, Reuter M. Diversity of type II restriction endonucleases that require two DNA recognition sites. *Nucleic Acids Res.* 2003 Nov 1;31(21):6079-84.
106. <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/109.pdf>
107. Joshi HK, Etzkorn C, Chatwell L, Bitinaite J, Horton NC. Alteration of sequence specificity of the type II restriction endonuclease HincII through an indirect readout mechanism. *J Biol Chem.* 2006 Aug 18;281(33):23852-69.
108. Daugelat S, Kowall J, Mattow J, Bumann D, Winter R, Hurwitz R, Kaufmann SH. The RD1 proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: expression in *Mycobacterium smegmatis* and biochemical characterization. *Microbes Infect.* 2003 ;5(12):1082-95.
109. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 1996 Sep;60(3):512-38.

110. Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 May;67(3):289-98.
111. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2005 Jan 26;115(2):113-28.
112. Bardwell JC, Lee JO, Jander G, Martin N, Belin D, Beckwith J. A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Feb 1;90(3):1038-42.
113. Talmadge, K. and W. Gilbert . Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. 1982 *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1830 - 1833.
114. Mogensen JE, Otzen DE. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol*. 2005 Jul;57(2):326-46.
115. http://takween.com/techniques/05_Electrophoresis.html
116. Wang BL, Xu Y, Wu CQ, Xu YM, Wang HH. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif*. 2005 Feb;39(2):184-8.
117. Franken KL, Hiemstra HS, van Meijgaarden KE, Subronto Y, den Hartigh J, Ottenhoff TH, Drijfhout JW. Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif*. 2000 Feb;18(1):95-9.
118. Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2004 Dec;4(12):761-76.
119. Nahid P, Pai M, Hopewell PC. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(1):103-10.
120. Aiken AM, Hill PC, Fox A, McAdam KP, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Donkor SA, Adegbola RA, Brookes RH. Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases. *BMC Infect Dis*. 2006 Mar 30;6:66.
121. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, Wallis RS, Edmonds K, Okwera A, Mugerwa R, Peters P, Ellner JJ. Depressed T-cell interferon-

gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis.* 1999 Dec;180(6):2069-73.

- 122.** Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, Hill AV, Lalvani A. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):5217-25.



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 08.03.2005/70

Etik Kurul Üyeleri

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR
Doç. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Doç. Dr. Uğur MÜNGAN
Doç. Dr. Hüseyin İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Doç. Dr. Özgül SAĞOL
Doç. Dr. Görsev YENER
Doç. Dr. Mehmet Ali KOÇDOR
Doç. Dr. Kamer UYSAL
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yard. Doç. Dr. Ayşe KARCI

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR

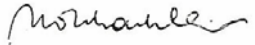
Etik Kurul Sekreteri
Yonca YILDIRIM

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 08 Mart 2005 tarih ve 18/05/05 no.lu toplantısında, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Nuran ESEN'in sorumlu olduğu 09 protokol no.lu "Mycobacterium Tuberculosis'e ait ESAT-6 Proteinin Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılmasının Ardından Çeşitli HASTA Gruplarından Alınacak Kan Örneklerinde IFN- γ ve IL-10 Yanıtlarının Saptanması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR
Klinik ve Laboratuvar Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Gelecekte tüberküloz tanısında ve aşı çalışmalarında kullanılmak üzere planlanmış olan çalışmamıza, sağlık sorununuz olmaması nedeniyle sağlıklı kontrol grubunda yer almanızı öneriyoruz. Bu çalışmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz.

Çalışmaya katılan kişilerden sadece bir kez 10mL kan örneği alınacaktır. Çalışmamıza; hasta ve kontrol gruplarından oluşacak toplam 150 kişinin katılması planlanmıştır.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları hastaya veya güvencesi altında bulunduğu resmi ya da özel kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu çalışmada yer alan hastaların kayıtları ve bilgileri kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlar sadece kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı Soyadı:Hüseyin Çoban

**Tel: 0 232 412 4501
0 505 525 1514**

Tarih:

İmza:

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Tüberküloz tanısı almanız nedeniyle, gelecekte tüberküloz tanısında ve aşı çalışmalarında kullanılmak üzere planlanmış olan çalışmamıza katılmanızı öneriyoruz. Bu çalışmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz.

Çalışmaya katılan kişilerden sadece bir kez 10mL kan örneği alınacaktır. Çalışmamıza; hasta ve kontrol gruplarından oluşacak toplam 150 kişinin katılması planlanmıştır. Bu çalışmaya katılmanızın hastalığınızın tanı ve tedavisine etkisi olmayacaktır.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları hastaya veya güvencesi altında bulunduğu resmi ya da özel kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu çalışmada yer alan hastaların kayıtları ve bilgileri kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlar sadece kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı Soyadı:Hüseyin Çoban

**Tel: 0 232 412 4501
0 505 525 1514**

Tarih:

İmza: