

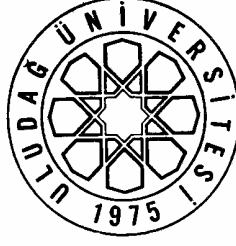
**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI**

**TÜBERKÜLOZ PLÖREZİDE SPESİFİK KORUYUCU
İMMÜN YANITIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ferah BUDAK

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2006



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

TÜBERKÜLOZ PLÖREZİDE SPESİFİK KORUYUCU
İMMÜN YANITIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ferah BUDAK

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Doç. Dr. H.Barbaros Oral

Bursa-2006

Bu tez, Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından T-2002/70 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikobakteriler	4
2.1.1. Hücre Yapısı	8
2.1.2. Antijenik Yapı	10
2.2. Tüberküloz Plörezi	15
2.3. Tüberküloz Patogenezi ve İmmünitesi	17
2.3.1. Akciğer Tüberkülozunda Patogenez	17
2.4. Tüberkülozda Doğal İmmün Yanıt	19
2.4.1. Makrofajlar	19
2.4.2. Nötrofiller	21
2.4.3. NK Hücreleri	21
2.4.4. Toll Benzeri Reseptörler	21
2.5. Tüberkülozda Kazanılmış İmmün Yanıt	22
2.5.1. Hümorale İmmün Yanıt	22
2.5.2. Hücresele İmmün Yanıt	23
2.5.3. Sitokinler	30
2.6. Tüberküloz ve Apoptoz	36
2.7. HIV-Tüberküloz Koenfeksiyonu	38
2.8. Tüberküloz İmmünogenetiği	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1. Lenfosit Alt Gruplarının Değerlendirilmesi	41
3.2. Mononükleer Hücre Kùltürleri	42
3.3. İntrasellülele Sitokin Ölçümleri	43
3.4. Ekstrasellülele Sitokin Ölçümleri	43
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	44
4. BULGULAR	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	76

6. EKLER	88
7. KAYNAKLAR	89
8. TEŞEKKÜR	102
9. ÖZGEÇMİŞ	103

ÖZET

Dünyada önemli bir problem olmaya devam eden tüberküloz (TB)'un kontrolü ve gelecekte eradikasyonu için etkili aşılar, spesifik tanı reaktiflerine; tedavisi için de alternatif immün modülatör yaklaşımların belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, TB aşısı için aday peptidler olarak kabul edilen CFP-10 ve ESAT-6'nın koruyucu immün cevaptaki rolü ile TB'da lokal koruyucu immün cevapta yer alan sitokin ve mononükleer hücrelerin etkinliği araştırıldı. Bu amaçla TB plörezi (hasta grubu) ve malign plörezili (kontrol grubu) hastalardan elde edilen plevral sıvı mononükleer hücreleri PHA, PPD, CFP-10 ve ESAT-6 ile stimüle edilerek intrasellüler ve ekstrasellüler sitokin düzeyleri (IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-4) değerlendirildi. Ayrıca hasta ve kontrol gruplarında plevra sıvısı IFN- γ , IL-12p40, IL-18, IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10, IL-13, sFas, sFasL düzeyleri ile mononükleer hücre oranları araştırıldı.

Plevra sıvısı mononükleer hücrelerinin CFP-10 ve ESAT-6 ile stimülasyonu sonucu, TB plörezi olgularında ekstrasellüler ve intrasellüler IFN- γ düzeylerinde, kontrol grubuna göre belirgin artış olduğu, antienflamatuvar bir sitokin olan IL-10 düzeylerinin de arttığı saptandı. TB plörezili hastalarda plevra sıvısı IFN- γ , IL-12p40, IL-18, IL-8, TNF- α düzeyleri, kontrol gruplarına göre yüksek bulundu.

Elde edilen veriler ışığında TB'daki koruyucu immünitede Th1 tipi spesifik hücresel immünitinin primer yanıt olduğu; ESAT-6 ve CFP-10'un TB plörezili olgularda bu yanıtı endükledikleri; bu peptitlerin TB aşısı preparasyonlarında yer almaları sonucu koruyucu etkinliği daha güçlü aşıların geliştirilebileceği; ESAT-6 ve CFP-10'un yer aldığı testlerden BCG'ye bağlı Tüberkülin pozitifliği ile doğal enfeksiyonun ayırımında ve özellikle TB'un endemik olmadığı bölgelerde tanıya yararlanılabileceği; ayrıca plevra sıvısındaki IFN- γ düzeylerinin TB plörezi ve malign plörezi ayırımında kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Tüberküloz plörezi, *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT-6, CFP-10, sitokin

SUMMARY

Evaluation of specific protective immune response in tuberculosis pleurisy

There are requirements for effective vaccines and specific diagnostic reagents to control and eradicate Tuberculosis (TB) which remains an important health problem. Alternative immunomodulatory approaches also need to be developed for better treatment of the disease.

In our study, the roles of ESAT and CFP-10, which are candidate peptides for new TB vaccine preparations, and effectiveness of cytokines and mononuclear cells were investigated to determine their involvement in local protective immune response. For this aim, pleural fluid mononuclear cells obtained from TB pleurisy (study group) and malign pleurisy or non-TB non-malign pleurisy (control groups) patients were stimulated with PHA, PPD, ESAT-6 and CFP-10 prior to the measurement of intracellular and extracellular cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13). Additionally, the levels of IFN- γ , IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-13, TNF- α , sFas and sFasL, and the proportional profiles of mononuclear cell subsets in pleural fluids were evaluated.

As a result of stimulation of pleural fluid mononuclear cells with ESAT-6 and CFP-10, extracellular and intracellular levels of IFN- γ dramatically increased in TB pleurisy cases when compared to control groups, and the levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 were also determined to be elevated. It was also shown that levels of pleural fluid IFN- γ , IL-8, IL-12p40, IL-18, TNF- α and sFasL were significantly higher in the patients with TB pleurisy in comparison to control groups.

In the light of the data obtained in our study it can be suggested that Th1 type specific cellular immunity is the primary response responsible for protective immunity in TB; that more potent vaccines may be developed by including ESAT-6 and CFP-10 in new vaccine preparations since these peptides induce protective response providing self-control of TB pleurisy; that diagnostic tests using ESAT-6 and CFP-10 could be used to distinguish natural infection from Tuberculin test positivity due to previous BCG vaccination and to diagnose TB in the regions where TB is not endemic; and additionally, that the measurements of pleural fluid IFN- γ levels might be used to differ TB pleurisy and malign pleurisy.

Key Words: Tuberculous pleurisy, *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT-6, CFP-10, cytokine

1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), dünya nüfusunun 1/3'ünün *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ile enfekte olması, her yıl 8 milyon kişide aktif hastalık gelişmesine ve 2 milyondan fazla kişinin ölümüne yol açması nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olmayı sürdürmektedir.

Dünyada yaygın olarak kullanılmakta olan Bacille Calmette Guérin (BCG) aşısının koruyucu etkinliği değişik çalışmalarda % 0-85 arasında bulunmuştur. Çok değişken etkinliği ve immün yetersizliği olan konaklarda hastalığın ortaya çıkma riski nedeniyle canlı aşı BCG'nin kullanımı hala tartışmalıdır.

TB tanısı için kullanılan pürifiye protein derivesi (PPD), hem sekrete edilen hem de somatik mikobakteriyel antijenlerden oluşmuş ham ve iyi tanımlanmamış bir karışımdır. İnsanlarda ve sığırlarda *in vivo* deri testi reaktifi olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. PPD, TB basili kompleksinde (*M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. africanum*) yer alan patojen mikobakteriler, çevresel tüberküloz-dışı mikobakteriler, BCG aşısı suşları gibi birçok mikobakteriyel antijenleri içerir. PPD'ye verilen yanıt, mikobakteri ile etkileşimin olduğunu bize göstererek TB'un tanısında yardımcı olmakla birlikte, MTB enfeksiyonunu, BCG aşılamasından ve çevresel tüberküloz-dışı mikobakterilerden ayırt etme de genellikle yetersizdir.

Bu nedenle, TB'un etkili kontrolü ve gelecekte eradikasyonu için etkili aşılardan, spesifik tanı reaktiflerinin geliştirilmesine; tedavi için alternatif immün modülatör yaklaşımların belirlenmesine acil olarak ihtiyaç vardır. Aynı zamanda, MTB'a karşı oluşan koruyucu immün cevabın hücresel ve moleküler temellerinin anlaşılması yeni aşılardan tasarlanmasında son derece önemli destekler sağlayabilir.

TB plörezi, MTB'e karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu oluşan plevral efüzyon olarak tanımlanabilir. Enfeksiyona karşı güçlü immün cevabı olan TB'lu hastaların çoğunda kemoterapi verilmeksizin plevral efüzyonun ortadan kalktığı görülür. Bu nedenle TB plörezi, plevral aralıkta MTB'e karşı gelişen hücresel immün cevabı değerlendirmek açısından iyi bir model oluşturur. TB plörezi plevral sıvı, immün reaksiyonda rol alan ve çeşitli sitokinler salgılayan hücrelerin plevral aralığa göç etmesi nedeniyle birçok sitokini içerir.

TB plörezi plevral sıvı, immün cevabın anlaşılması, TB'un farklı klinik formlarında gelişen immünitinin belirlenmesine; yeni antijenlere karşı koruyucu immün cevabın ortaya konması da yeni jenerasyon TB aşılardan ve yeni tanı reaktiflerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Çalışmamızda, TB aşısı için aday peptidler olarak kabul edilen ESAT-6 ve CFP-10'un, plevra sıvısı sitokin ve mononükleer hücrelerinin lokal koruyucu immün yanıtındaki rolleri araştırıldı. Bu amaçla bu peptidlerle stimüle edilen plevra sıvısı mononükleer hücrelerinin intrasellüler ve ekstrasellüler sitokin düzeyleri ile plevra sıvısı sitokin düzeyleri ve mononükleer hücre oranları tespit edildi.

2.GENEL BİLGİLER

TB, insanlık tarihinin ilk çağlarından beri bilinen en eski hastalıklarından ve en önemli sağlık problemlerinden biridir. İnsanların ilk yerleşik toplulukları oluşturması ve sığırları evcilleştirmeleriyle birlikte mikobakterilerle karşılaşmaya başladıkları tahmin edilmektedir. MÖ. 5000 yılındaki neolitik çağlara ait vertebra kemik parçalarında ve M.Ö. 2400 yılına ait Mısır mumyalarının omurgalarında TB hastalığını belirleyen bulgular saptanmıştır. TB'a ait en çarpıcı kanıt M.Ö. 700 civarında yaşayan sekiz yaşındaki, İnkâ erkek çocuğu mumyasında rastlanmış olup; mumyanın omurga grafisinde Pott hastalığına ait bulgular saptanmış ve lezyon yaymalarında aside dirençli basiller görülmüştür (1).

Hippocrates (M.Ö. 460-370) tarafından bu hastalık, erime tükenme anlamına gelen “phthisis” (verem) olarak isimlendirilmiştir (2). Hastalığın bulaşıcı olduğuna dair ilk kuşkular, XVI. yüzyılın başlangıcında Fracastero tarafından ileri sürülmüştür (3). Vesalius (M.S.1478), phthisis’li hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların bulunduğunu bildirmiştir. Sylvius (1614-1672) TB’dan ölen hastaların akciğerlerinde küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstererek bunları tüberkül olarak isimlendirmiştir. Hastalığın kavranmasında XIX. yüzyıl çok önemli bilimsel gelişmelere sahne olmuştur; Fransız hekimi Leannec o zamana kadar ayrı birer antite zannedilen TB’a ait çeşitli lezyonların aslında aynı hastalığın değişik anatomopatolojik safhaları olduğunu belirlemiştir (4). Bir başka Fransız hekimi Villemin 1865 yılında TB’lu hastaların kavitelerinden alınan materyali tavşanlara inoküle ederek TB geliştiğini ve hastalığın enfeksiyöz tabiatlı olduğunu göstermiştir (2, 5). Robert Koch (1843-1910), TB basilini 1882 yılında izole etmiş; 1884 yılında kültürünü yapıp, kültür bakterileri ile deney hayvanlarında TB oluşturabileceğini kanıtlamış; 1890 yılında “old tüberkülün”i hazırlayarak, TB’lularda geç tipte aşırı duyarlılığı, bağışıklığı ve kendi adıyla anılan “Koch Fenomeni”ni açıklamıştır. Tüberkülünin terapötik değerinin olmadığı sonradan anlaşılmasına rağmen, deri testi olarak MTB ile enfekte kişilerin saptanmasında önemli gösterge olduğunun ortaya konması; 1905 yılında Koch’a Nobel ödülünü kazandırmıştır (1). Calmette ve Guérin isimli araştırmacılar, 1921 yılında Fransa’da atenüe *M. bovis* suşundan kendi isimleri ile anılan BCG aşısını geliştirmişler ve bu aşı II. Dünya Savaşı’ndan sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılmıştır. Seibert, 1930’lu yıllardan sonra old tüberkülünü saflaştırmış ve elde edilen PPD ile TB enfeksiyonunun varlığı saptanmaya çalışılmıştır.

TB, tedavi edilebilir olmasına rağmen bulaşıcı hastalıklar içinde en çok öldüren; kontrol altına alınabilir olmasına rağmen giderek yaygınlaşan; anti-tüberkülö ilaçlara

direnç kazanması nedeniyle ilaca dirençli hale gelebilen özellikleri nedeniyle dünyadaki en önemli enfeksiyon hastalıklarından biridir. Dünya nüfusunun 1/3'ü (6), yaklaşık 2 milyar insanın TB basili ile enfekte olduğu bildirilmektedir. Dünyadaki yeni TB olgularının sayısı sosyo ekonomik durum ile paralellik göstermekte; en yüksek insidans Afrika, Asya ve Latin Amerika gibi ülkelerde görülmektedir (7). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre hergün 25 bin insan aktif tüberküloza yakalanmakta ve 5 bin insan TB nedeniyle ölmektedir. Tüm dünyada 20 milyondan fazla TB hastası bulunmakta; buna her yıl yaklaşık 9 milyon yeni hasta eklenmekte; TB her yıl 2 milyondan fazla insanın ölümüne neden olmaktadır. Tüm dünyadaki mevcut hastaların %95'i, TB ölümlerinin %98'i, gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmektedir (8).

TB, yirminci yüzyılın 2. yarısından itibaren kontrol altına alınmaya başlanmış, çiçek hastalığı gibi ortadan kalkacağı zannedilmiş ve ciddi olarak ihmal edilmiştir. Ancak 1985 yılından sonra ortaya çıkan epidemilerle, gelişmiş ülkelerdeki TB insidansı gözardı edilemeyecek biçimde artmıştır. TB kontrol programlarının etkinliğinin azalması; hastalık için bütçeden daha az para ayrılması; araştırmaların durdurulması; TB insidansı yüksek ülkelere gelişmiş ülkelere gelen göçlerin yaygınlaşması; TB için önemli risk faktörü olan insan immünyetmezlik virusu (Human immunodeficiency virus; HIV) epidemisinin 1980'lerde ortaya çıkışı; çok ilaca direnç sorunu; hastane ve laboratuvar enfeksiyonlarının artması; özellikle zeminde başka bir patolojisi bulunduğu ciddi ve kısa sürede ölümle sonlanabilen enfeksiyonlara yol açması ve MTB dışındaki atipik mikobakterilerin eskisine oranla daha sık hastalık oluşturmaya başlamaları hastalığın yayılmasına sebep olan başlıca nedenlerdir.

TB'un etkili kontrolü ve gelecekte eradikasyonu son derece önemlidir. Bu nedenle hastalığın patogenezi ve immünolojisinin çok iyi anlaşılmasına, tanısının çabuklaştırılması ve kolaylaştırılmasına, direnç testlerinin hızlandırılmasına, daha etkin yeni aşıların geliştirilmesine, yeni tedavi edici ajanların bulunmasına ve etkili sürveyans çalışmalarına ihtiyaç vardır.

2.1. Mikobakteriler

Mikobakteriler 0,2-0,5 µm eninde, ortalama 1-4 µm uzunluğunda basillerdir. Tek tek, küçük zincirler veya demetler halinde bulunurlar. Kültürden hazırlanan preparatlarda kokoid ve filamantöz formlarda görülebilirler. Hareketsiz sporsuz, kapsülsüz çomaklardır. Endo ve ekzotoksinleri yoktur. Ailenin tek generusu Mycobacterium'dur (Tablo-1).

Tablo-1: Mikobakterilerin sınıflandırması

Alem : Prokaryot (Bakteri)

Bölüm : Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

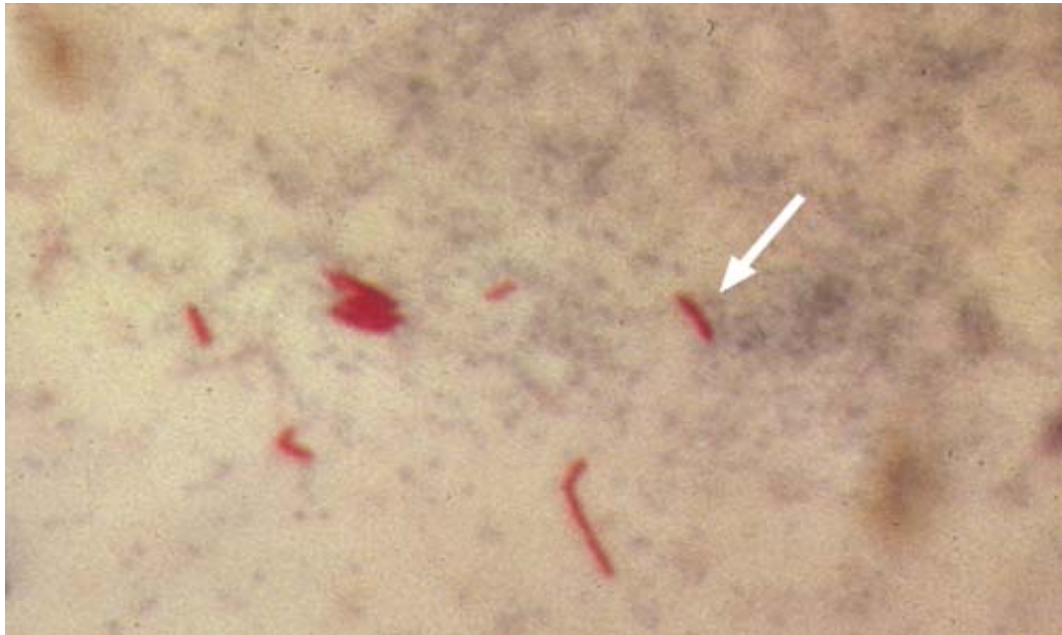
Takım : Actinomycetales

Aile : Mycobacteriaceae

Genus : Mycobacterium

Tür : M. tuberculosis

Hücre duvar yapıları, diğer bakterilerinkinden oldukça farklıdır; duvarın kuru ağırlığının %60 kadarını lipid oluşturur. İçerdiği yüksek lipid miktarı, bakterinin dış etkenlere karşı direncini artırır. Aynı zamanda Gram ve diğer basit yöntemlerle boyanmasını engeller. Boyaların bakteri içine penetre olabilmeleri için boyama işlemi sırasında preparatın ısıtılması gerekir; uzun süreli sıcaklık uygulaması ile anilin boyalarıyla boyanırlar. Boyandıktan sonra alkol ve asitle dekolorize edilemezler. Bu nedenle asido rezistan bakteriler (ARB) veya asido-alkolo rezistan bakteriler (AARB) olarak isimlendirilirler. Ehrlich Ziehl-Neelsen (EZN), bakterinin bu özelliklerine dayanılarak geliştirilen ve pratikte en yaygın olarak kullanılan boyama yöntemidir. Bu yöntem ile boyanan basiller mikroskop altında kırmızı renkte zincirler şeklinde veya kümeler halinde görülürler (Resim 1). Bazen de L,X,V harfi görünümü alırlar. (3).



Resim-1: Ehrlich Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile MTB'in mikroskopik görünümü

Löwenstein-Jensen besiyeri gibi özel besiyerlerinde 4-8 hafta arasında, düzensiz (R tipi) koloniler meydana getirerek ürerler (Resim 2).



Resim-2: Löwenstein-Jensen besiyerindeki R tipi MTB kolonileri

Son yıllarda geliştirilen otomatize sistemler, bakterinin sıvı besiyerindeki üremesini radyometrik olarak saptayarak; bu süreyi 1-2 haftaya kadar kısaltmıştır (9).

Günümüzde 74 civarında mikobakteri türü tanımlanmıştır. Bunların 25 kadarı insan, bir kısmı hayvan patojenidir; diğerlerinin ise saprofit olabileceği düşünülmektedir. Tablo 2’de insanlarda patojen olan belli başlı türler ve özellikleri gösterilmiştir. MTB, hastalık yapma potansiyeli ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi nedeniyle cinsin en önemli üyesidir (10).

Mikobakteriler; karanlıkta veya ışıktaki pigment oluşturmaları, üreme hız ve sıcaklıkları, koloni morfolojileri gibi özellikleri esas alınarak 1950’li yıllarda Runyon tarafından 4 grupta sınıflandırılmıştır. Bu sınıflama taksonomik bir sınıflama olmamasına rağmen pratik olması sebebiyle günümüzde de kullanılmaktadır.

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbiri ile yakın ilişkili türler “kompleks” başlığı altında toplanmaktadır. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microti* “tüberküloz basili kompleksi” olarak isimlendirilmektedir. Bunların dışında kalan mikobakterilere “ tüberküloz dışı mikobakteriler ” veya “ atipik mikobakteriler ” denmektedir (10). Bunlar doğada, toprakta ve suda bolca bulunurlar, insandan insana geçişi son derece nadirdir, çoğu patojen değildir; insanda ender olarak hastalık oluştururlar; immün sistemi zayıflamış konakta ise ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler (11).

Tablo-2: İnsanlarda patojen olan mikobakteri türlerinin sınıflandırılması (10)

Tür	Patojenite
M.tuberculosis Kompleks	
M. tuberculosis	Kesin patojen
M. leprae	Kesin patojen
M. africanum	Kesin patojen
M. bovis	Kesin patojen
M. ulcerans	Kesin patojen
Runyon Grup I (Yavaş üreyen fotokromojenler)	
M. kansasii	Genellikle patojen
M. marinum	Genellikle patojen
M. simiae	Genellikle patojen
M. asiaticum	Genellikle patojen
M. intermedium	Bazen patojen
Runyon Grup II (Yavaş üreyen skotokromojenler)	
M. szulgai	Genellikle patojen
M. succrofulaceum	Bazen patojen
M. xenopi	Bazen patojen
M. lentiflavum	Bazen patojen
M. interjectum	Bilinmiyor
Runyon Grup III (Yavaş üreyen non-kromojenler)	
M. avium	Kesin patojen
M. intracellulare	Kesin patojen
M. genavense	Kesin patojen
M. haemophilum	Genellikle patojen
M. malmoense	Genellikle patojen
M. shimoidei	Bazen patojen
M. celatum	Bazen patojen
M. branderi	Bazen patojen

Runyon Grup IV (Hızlı üreyenler)

M. fortuitum	Bazen patojen
M. chelonae	Bazen patojen
M. abscessus	Bazen patojen
M. mucogenicum	Bazen patojen
M. peregrinum	Bazen patojen

2.1.1. Hücre Yapısı

Mikobakteriler, bir plazma zarı ile sınırlanan sitoplazma ve bunu çevreleyen lipidden zengin kompleks bir hücre duvarına sahip prokaryotik hücrelerdir. Sitoplazmalarında çift sarmallı tek DNA içeren, membrana bağlı olmayan, sıkı sıkıya paketlenmiş tek bir kromozom; ayrıca bazı plazmidler bulunur.

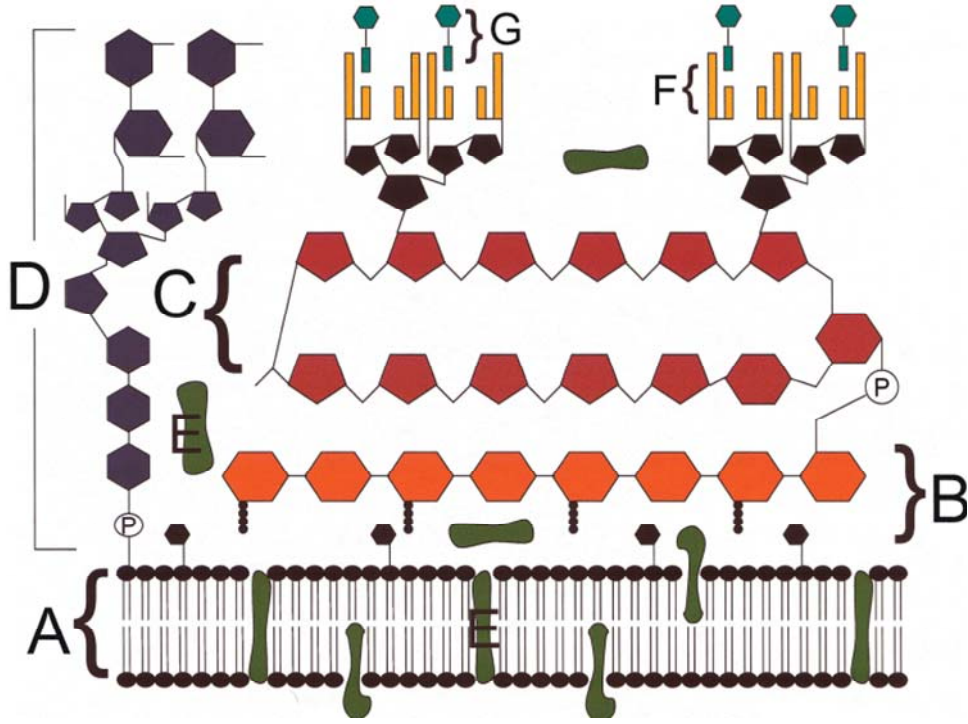
Sitoplazmik Zar

Mikobakteriler ile yapılan elektron mikroskopi çalışmaları, sitoplazmik zarın iki tabakalı bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Sitoplazmik zarın yapısında karbonhidratlar, fosfatidil inositol mannozidler, lipoarabinomannan (LAM) ve kardiyolipin, fosfatidiletanolamin, açillenmiş monofosfoinositoller gibi lipidler bulunur (12).

Hücre Duvarı

Mikobakterilerin hücre duvarı son derece kompleks bir yapıya sahiptir; yüksek oranda lipid içerir (13). Kuru ağırlığının %60 kadarını lipid oluşturur. Duvar yapısının ana iskeletini peptidoglikan (mürein) oluşturur; Bu yapıya arabinogalaktan molekülleri fosfodiester bağları ile bağlanır, ucunda da mikolik asitler yer alır. Mikolik asitler değişik lipid, glikolipid ve bazı proteinler ile sonlanır (Şekil-1), (14) .

Peptidoglikan tabakası kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirlerini içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Bu tabakanın dışında Peptidoglikan tabakasının üzerinde arabinoz ve galaktozdan oluşan dallanmış polisakkarit yapıya sahip arabinogalaktan tabakası bulunur. Arabinogalaktan tabakası peptidoglikana fosfodiester bağları ile bağlanır. Arabinogalaktan moleküllerinin yan zincirindeki arabinaz uçlarında mikolik asitler yer alır.



Şekil-1: Hücre duvar yapısının şematik görünümü; (A) plazma membranı, (B) peptidoglikan, (C) arabinogalaktan, (D) LAM, (E) plazma membranı ve hücre duvarında yer alan proteinler, (F) mikolik asitler, (G) mikolik asitler ile ilişkili glikolipid yüzey molekülleri (14).

Mikolik asitler yüksek molekül ağırlığa sahip α -alkil, β -hidroksil yağ asitleridir; hücre duvar kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludurlar. Ayrıca mikolik asitler, CD1 molekülleri aracılığı ile yardımcı T lenfositlerine (Th) sunulan bilinen ilk antijenlerdir. Böylece konağın mikroorganizmaya karşı immün cevabını etkilerler. Buna karşılık serbest komplemanın bağlanmasını engelleyerek opsonizasyonu ve fagositozu önlerler (15). Mikolik asitler bakteri hücrelerinde kord faktör veya arabinogalaktana bağlı ester halinde bulunurlar. En dış tabaka ise mikoizid adı verilen bir grup heterojen peptidoglikolipid ve fenolik glikolipidlerden oluşmuştur.

Sitoplazmik membrandan başlayıp duvar boyunca yer aldığı kabul edilen önemli bir lipid molekülü de LAM'dır. Hücre membranının fosfolipidine bağlı arabinoz ve mannandan oluşmuş; patojen türlerde baskın bir mikobakteri antijenidir. Konak immün yanıtında önemli olduğu, makrofajda bakterinin yaşamını sürdürmesine yardımcı olduğu kabul edilmektedir (14, 16).

Kapsül

Konak hücre içerisinde mikobakterilerin etrafı elektron transparan bir kapsül ile çevrilidir. Bu madde *in-vitro* şartlarda üretilen basillerin etrafında klasik mikroskopik inceleme ile gösterilemez. Ekstraksiyon çalışmaları ile kapsülün polisakkarit, proteinler ve az miktarda lipidden oluştuğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kapsüle ait elemanların patojenitede rol oynadığı; bazı kapsüller glikanların bakterinin konak hücreye adezyon ve penetrasyonunda görev aldığı; sekrete edilen veya yüzeyde eksprese edilen bazı enzimler ve transporterlerin intrasellüler çoğalmada etkili oldukları gösterilmiştir. Kapsül içerisinde endüklenebilir proteazlar ve lipazların bulunduğu; sekrete edilen ve kapsülde lokalize olan enzimlerin oksijen radikallerini detoksifiye ettiği; kapsülde bulunan toksik lipidlerin ve temas ile aktive olan diğer litik maddelerin makrofaj aktivasyonunu ve lenfosit proliferasyonunu engellediği de saptanmıştır (13, 16).

2.1.2. Antijenik Yapı

Mikobakteriler antijenik yapı özelliği gösteren pek çok protein ve şeker içerirler. Monoklonal antikolar (MoAb)'lar ve probalar kullanılarak MTB'de çok sayıda antijenik yapı (7-8 bin kadar protein) bulunduğu saptanmıştır (17). MTB'in tanımlanmasından dokuz yıl sonra Koch (1891), bakteriyi gliserollü sıvı besiyerinde 8 hafta enkübe ettikten sonra ısı ile inaktive ederek tüberkülini tanımlamış ve bunu tedavide kullanmayı amaçlamıştır. Ancak daha sonra bu maddenin sadece tanı amacıyla kullanılabileceğini anlaşılmıştır. Doğal olarak karışık yapıya sahip olan bu ürün daha sonra Séibert ve Munday (1932) tarafından kültür filtratının amonyum sülfat presipitatu şeklinde pürifiye edilmiş ve PPD olarak isimlendirilmiş, ileri standardizasyonu ile de PPD-S kullanıma girmiştir (12, 16).

Antijenler sitoplazmada, hücre membranında, hücre duvarında ya da hücreyi çevreleyen ortama sekrete edilmiş halde bulunurlar. Sitoplazma antijenleri otoliz veya mekanik hasar sonucu salınana kadar sitoplazmada bulunurlar ya da canlı hücreler tarafından aktif olarak sekrete edilirler.

MTB'in en önemli antijenik yapıları arasında lipoproteinler, ısı şoku proteinleri [heat-shock protein 60 (hsp60) ve hsp70], antijen 85 (Ag85), MPT64, MPB70, LPPX, culture filtrate protein-10 (CFP-10) ve early secretory antigenic target-6 (ESAT-6) gibi sekrete edilen antijenleri ve LAM, HbhA, OmpA gibi hücre duvar yapısında bulunan antijenleri yer alır (18).

M. tuberculosis'in sekrete edilen antijenleri

Isı şoku proteinleri (hsp) mikobakteriyel enfeksiyonlar sırasında oluşan T hücre cevabında önemli rolleri bulunan proteinlerdir. Hücre içinde, bütünlükleri korunacak diğer protein molekülleri ile kolayca birleşirler ve işlevleri bitince de ayrılırlar. Böylece onların, fonksiyon yapacakları yere kadar deforme olmadan taşınmalarına ve membranlardan geçmelerine yardımcı olurlar. Polipeptid katlanmalarının açılmasını, oligomerik protein komplekslerinin bütünleşmesini ve bu bütünleşmenin çözülmesini sağlarlar (19, 20). En etkin hsp'ler arasında, DnaK/hsp70, GroEL/hsp60 ve GroES/hsp10 sayılabilir. DnaK/hsp70, TB ile enfekte hayvanlarda T ve B hücre cevabına yol açan güçlü bir antijendir (21). GroEL/hsp60, MTB ve *M. leprae*'nin sitozolünde, hücre duvarında ve kültür filtratında bulunan iyi tanımlanmış bir T hücre antijenidir (17, 22-24). GroES/hsp10, T hücre cevabını stimüle etme yeteneğindedir.

Antijen 85B (Ag85B) mikobakterilerin kültür filtrat proteinlerinde ve hücre duvar ekstraktlarında büyük miktarlarda tespit edilebilen Ag85 kompleksine ait olan sekrete edilebilen mikobakteriyel bir proteindir. Ag85B, BCG ile aşılınmış kişilerde ve MTB ile karşılaşmış sağlıklı kişilerin çoğunda interferon- γ (IFN- γ) sekresyonunu ve T hücre proliferasyonunu endükler (25).

19kD lipoprotein Gram-pozitif ve Gram negatif bakterilerde bulunan prokaryotik lipoproteinler ailesinin bir üyesidir. Enfeksiyonun erken döneminde, mikrobisidal ve doğal immün fonksiyonların aktive edilmesine öncülük ettiği belirlenmiştir. Makrofaj enfeksiyonundan sonraki aşamalarında ise Toll benzeri reseptör-2 (Toll like receptor-2; TLR-2) aracılığı ile antijenin işlenmesi ve MHC-sınıf II ekspresyonunun inhibe edilmesini sağladığı; MTB antijenlerinin sunulmasını engellediği; T hücreleri tarafından tanınmasını azalttığı ortaya konmuştur (14). 19kD lipoprotein'in nötrofilleri aktive edebildiği ve makrofajlardan Th1 tipi sitokin olan IL-12'nin salınımını endükleyebildiği de gösterilmiştir (2). Ayrıca dendritik hücre matürasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (14). Dendritik hücre matürasyonunu stimüle MTB, makrofaj ya da diğer fagositik hücelere girdiğinde, bu yüzey ile ilişkili protein, TLR-2 ile ilişkiye girerek konakta hücre içi sinyalizasyona sebep olur (26). CD83, MHC-sınıf II molekülleri, CD80, CD86, CD54 ve CD58'in artmış ekspresyonu ve CD32 ekspresyonunun ve endositik aktivitenin azalmasıyla ölçülebilen TLR-2 aracılığı ile dendritik hücre matürasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca yine TLR-2 aracılığı ile MHC-sınıf II antijen işlenmesi ve MHC-sınıf II ile sınırlı CD4+ T hücrelerin antijen tanınmasında azalma ile sonuçlanan, HLA-DR ekspresyonunu azaltarak makrofajlarda IFN- γ reseptör sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir.

MPT64 MTB kompleksi tarafından salgılanan 23 kDa ağırlığında bir proteindir. MTB ile enfekte hayvanlarda kutanöz geç (hücresele) tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarını ve T hücre cevaplarını endükler (27, 28).

MPB70 *M. bovis*'in güçlü serodominant antijenidir. MTB için homoloğu MPT70 olarak isimlendirilir. Enfeksiyon sırasında hücresele immün cevapları, *M. bovis* ile enfekte sığırlarda geç (hücresele) tip aşırı duyarlılık reaksiyonunu stimüle eder. Kültür ortamında virulan *M. bovis* suşları tarafından bol miktarda; Pasteur, Copenhagen, Glaxo firmalarının MTB ve *M. bovis* BCG suşlarında düşük miktarlarda üretilir. Kültürdeki ekspresyon farklılıklarına rağmen hem *M. bovis*'te hem de MTB'de enfeksiyon sırasında MPB70'e karşı güçlü bir immün cevap oluşur (29).

LPPX sekrete edilen 24 kDa'luk lipoproteindir. MTB kompleksine ve *M. leprae*'ya spesifik bir antijendir (30).

1996 yılında Mahairas ve arkadaşları tarafından MTB genomunda "region of deletion-1, 2, 3" RD1, RD2 ve RD3 olarak belirlenen, üç farklı genomik bölge tanımlanmıştır. Takiben RD1 bölgesinde yer alan, hücre kültür ortamında aktif olarak sekrete edilen immünodominant ve koruyucu immünitede yer alan önemli proteinler ortaya konmuştur. Fazla miktarlarda salınan bu proteinlerin, antijen sunan hücrelerce alınıp işlenebilen ve T lenfositlerine kolayca sunulabilir nitelikte olduğu anlaşılmıştır (31). BCG aşısı suşunda ve MTB dışındaki mikobakterilerde bulunmayan bu proteinler, yeni aşısı ve diyagnostik testler için umut vaat etmektedir. RD1 ürünleri içerisinde MTB'e spesifik iki önemli sekretuar protein; ESAT-6 ve CFP-10 yer almaktadır.

ESAT-6 temel olarak patojen mikobakterilerde, MTB kompleksinin üyelerinde (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) ve *M. leprae*'de bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip bir proteindir. ESAT-6'yı kodlayan gen bölgesi patojen mikobakterilerde bulunduğu halde BCG suşlarında gösterilememiştir (32-34). Bu proteinin TB hastalarında, periferik kan mononükleer hücre (PBMC)'lerini bol miktarda IFN- γ salgılaması için tetiklediği belirlenmiştir. TB hastalarının hem BCG ile aşılanmış hem de *M. avium* ile enfekte kişilerden ayırıcı tanısında yararlı olduğu kabul edilen bir moleküldür (34).

ESAT-6 ile ortak bazı özellikleri bulunan diğer antijen 10 kDa ağırlığındaki CFP-10'dur. Her iki antijende RD-1 bölgesinde aynı operon içinde kodlanan küçük moleküller olup; TB hastalarında benzer oranlarda (%60) saptanan çok güçlü T hücre antijenleridir (34).

TB dışındaki mikobakterilerde bulunmamaları nedeniyle ESAT-6 ve CFP-10 hem aşı ve diyagnostik testler için umut vaat etmekte hem de duyarlı kişilerde koruyucu immünitinin mikobakteriye karşı nasıl savaştığını anlamamıza yardımcı olmaktadır. Yapılan çalışmalar ESAT-6 ve CFP-10'un TB'a karşı gelişen spesifik immünitinin hedef molekülleri olduğunu ve TB'daki T ve B hücrelerinin immünodominant epitoplalarının bir çoğunda bu moleküllerin yer aldığını göstermiştir (31, 35).

Doğal immünitinin modülasyonunda da bu moleküllerin birçok aşamada etkili olduğu belirlenmiştir. Proenflamatuvar ve mikrobisidal kapasiteye sahip olan makrofajlar, MTB enfeksiyonunun kontrol altına alınmasında son derece önemli hücrelerdir. Makrofajın bu konudaki başarısızlığı, bu hücrelerin güvenli bir sığınak olarak kullanılmasına yol açar; bakteri kontrolsüz bir şekilde yayılır ve hastalık oluşur. MTB'a karşı savaştan sorumlu en önemli moleküller, proenflamatuvar bir sitokin olan TNF ve endüklenebilen nitrik oksit sintaz (iNOS) ile oluşturulan serbest radikal nitrik oksit (NO)'tir. ESAT-6 ve CFP-10'un makrofajlara etkili bir şekilde bağlanabildikleri, TNF salınımını endükleyebildikleri ve NO sentezini regüle edebildikleri gösterilmiştir (36).

DC'ler, primer immün cevap sırasında naif T lenfositlerinin aktivasyonundan sorumlu, en güçlü antijen sunan hücrelerdir. Kemik iliği lökosit prekürsörlerinden farklılaşan immatür DC'ler, antijen yakalamak üzere programlanmış olup ve düşük düzeylerde MHC ve T hücre kostimulatör molekülleri taşırlar. Çeşitli stimülanlarla temastan sonra MHC ve kostimulatör moleküllerinin artışıyla matürasyona uğrarlar ve etkili T hücre stimulatörleri haline gelirler. Yapılan çalışmalarda, CFP-10 ve ESAT-6'nın kemik iliği prekürsör hücrelerini DC'lere farklılaştırdığı gösterilmiştir. DC'ler CFP-10 ile uyarıldığında, IL-12 ve IFN- γ gibi proenflamatuvar Th1 tipi sitokinlerin ve aynı zamanda anti enflamatuvar Th2 tipi sitokin olan IL-10'un salınımını endüklediği gösterilmiştir. CFP-10 ile matüre edilmiş DC'lerin, CFP-10-spesifik T hücrelerin proliferasyonunu sağladığı ve bu hücreleri daha çok IL-2, IFN- γ ve çok düşük miktarda da IL-10 salınımı için aktive ettiği gösterilmiştir (35).

Mast hücreleri (MC), akciğerde bulunmaları ve proenflamatuvar cevabı uzun süre koruma kapasiteleri nedeniyle mikobakterilere karşı konak savunmasında çok önemli bir role sahiptir. Bu nedenle MC artışı ve enfekte hayvanların akciğerindeki degranülasyon MTB enfeksiyonunun çok erken aşamaları sırasında gözlenmektedir (35). Munoz ve arkadaşları (37) tarafından yapılan bir çalışmada MC'nin, mikobakteri ve sekrete antijenleri ile direkt ilişkiye girdikleri ortaya konmuştur. Bu çalışmada mastosit hücre dizisi ve primer MC histamin, TNF ve IL-6 salınımı için MTB ile stimüle edilmiş; bu

etkinin anti CD48 Ab'larıyla anlamlı olarak bloke edildiği ve glikozil fosfoinositol (GPI) zincirine sahip CD48'in MTB tanınmasından sorumlu ana MC reseptörü olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ilginç olarak hem ESAT-6 hem de CFP-10'un, MC tarafından proenflamatuvar mediyatörlerin salınımına güçlü bir şekilde sebep olduğu, bu sekretuvar proteinlerin MTB aracılı MC aktivasyonunda önemli bir rol oynayabilecekleri ortaya konmuştur.

ESAT-6 ve CFP-10, histamin ve TNF gibi proenflamatuvar mediyatörlerin salınımı için makrofajlar, DC, MC'ni aktive ederek ve MTB sekretuvar Ag (MTSA)-spesifik Th1 hücrelerinin IFN- γ üretmelerini desteklemek için DC matürasyonunu ve farklılaşmasını endükleyerek koruyucu immünitinin oluşumunda da rol alırlar. Diğer taraftan MTB tarafından aktif olarak sekrete edilen bu proteinler, mikobakterilerin immün cevaptan kaçışından ve duyarlı kişilerde hastalığı takip eden komplikasyonların gelişiminden de kısmen sorumlu olabilirler. Bu etkiyi sağlayan mekanizmalara, MTB-spesifik Th1 cevabının optimal endüksiyonu için DC kapasitesinin zayıflatılabilmesi, makrofajların NO üretimi ve B7.1 ekspresyonunu aşağı çekilmesi de eklenebilir (35).

Hücre Yüzey Antijenik Yapıları

Mikobakteriyel hücre duvarı ve plazma zarı, sadece bu bakteride bulunup diğer bakterilerde bulunmayan birçok protein, lipid ve karbonhidrat içeren kompleks bir yapıdır.

LAM, MTB hücre duvarının en önemli komponenti olan, tekrarlayan arabinoz-mannoz disakkarit subünitlerinden oluşan bir glikolipid kompleksidir (38). Fare makrofajlarının bulunduğu kültür ortamına, LAM eklenmesiyle, IFN- γ üretimi baskılanır, IFN- γ 'yı endükleyen gen ekspresyonunun bloke edilmesi ile olay tersine döner. LAM, oksijen radikallerini ortamdan uzaklaştırır ve konağa ait protein kinaz C'yi aktive eder. Bu şekilde, respiratuvar patlama gibi öldürücü olaylardan bakteriyi korur (39).

HbhA, virülan mikobakterilerin yüzeyinde bulunan heparin bağlayan hemaglütinin proteindir. Bakterinin epitelyal hücrelere tutunmasında aracılık eder, MTB ve *M. avium*'da bulunur; kompleman komponentlerinden C3'e bağlanabilir (40).

Porin benzeri protein olan OmpA, MTB H37Rv'de bulunmuştur. Porin ailesi proteinlerin bir özelliği olan lipozomlardaki porları oluşturabilirler. OmpA ekspresyonu, makrofajların gelişimi sırasında ve düşük pH'larda endüklenir (41).

2.2. Tüberküloz Plörezi

TB plörezi, MTB'a karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucunda oluşan plevral effüzyon olarak tanımlanabilir. TB'un akciğer dışı tutulumları arasında TB lenfadenitten sonra en sık rastlanan ikinci klinik formudur (42). TB hastalarında plevral effüzyon sıklığı yaklaşık %30 civarındadır (43-45). Bu oran HIV pozitifliği ile birlikte artmakta; TB'u olan HIV hastalarında plevral reaksiyon, olguların %37'sinde görülmektedir (45). HIV pozitif kişilerde, immünosüpresyonun erken aşamalarında TB plörezi gelişimine eğilim vardır (43, 44). CD4+ T lenfosit sayısı >200 hücre/ml olan HIV pozitif kişilerde plevral effüzyon prevalansı %27 iken; CD4+ T lenfosit sayısı <200 hücre/ml olan kişilerde bu oran %10 bulunmuştur (43, 45).

TB plörezi, batı ülkelerinde ileri yaş (ort. 56), geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde ise genç yaş (ort.30) hastalığıdır. Erkeklerde kadınlara oranla iki misli fazla görülür (46).

TB plörezi 3 farklı yol ile ortaya çıkabilir.

1-Çocuklar ve genç erişkinlerde primer enfeksiyonun birkaç ayı içerisinde gelişebilir.

2- Daha ileri yaşlardaki erişkinlerde, enfeksiyondan sonra herhangi bir zamanda reaktivasyon ile ortaya çıkabilir.

3- Kaviteli akciğer TB'nun plevraya direkt açılmasıyla gelişebilir (45).

İmmünopatogenez

TB plörezinin TB enfeksiyonundan çok gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. TB plörezinin gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna bağlı olduğunu destekleyen en önemli bulgu, plevra sıvısı kültüründe çok az hastada basil üretilebilmesidir. (43).

Plevral aralıkta mikobakteriyel antijenlere cevap veren ilk hücreler nötrofillerdir. PPD ile endüklenecek oluşturulan hayvan TB plörezi modellerinde, nötrofillerin başlangıçta dominant olduğu ve mononükleer hücrelerin plevral boşluğa göç etmelerini ve burada toplanmalarını sağladıkları gösterilmiştir (47). Bu olayda mezotel hücrelerinin de rolü olduğu ileri sürülmektedir. Enflamasyonun üçüncü gününden itibaren plevra sıvısında lenfositler belirgin hale gelir. Bu hücrelerin çoğunu T lenfositleri, T lenfositlerin büyük bir

kısmını da CD4+ T lenfositleri oluşturur. Plevra sıvısında CD4/CD8 oranı, yaklaşık 4,3 civarındadır; kanda ise bu oran 1,6 olarak bulunmuştur (43).

Plevral sıvıda mikobakterileri ve mikobakteri antijenlerini fagosite eden makrofajlar T lenfositlerine bu antijenleri sunar. T lenfositlerinin aktive olmasıyla, makrofaj farklılaşması ve granüloma oluşumu ortaya çıkar.

Mikobakteriyel antijenler tarafından stimüle edilen makrofajlar, granüloma oluşumunda regülatör olarak işlev gören TNF salgılar (48); aynı zamanda IL-1 üretirler (49). TNF ve IL-1, lenfosit aktivasyonundan da sorumludur.

Yapılan araştırmalar TB plörezi olan hastalardan alınan T lenfositlerinin PPD'ye maruz kalmaları sonucu bol miktarda IFN- γ ve IL-2 salgıladıklarını göstermiştir. IFN- γ makrofajların bakteri öldürme kapasitesini artıran en önemli faktörlerden biridir; IL-2 ise T hücrelerinin proliferasyonunu sağlar.

Klinik Bulgular

TB plörezi, genellikle akut olarak başlar. Ateş, yan ağrısı, kuru öksürük, gece terlemesi, kilo kaybı görülebilir. Hastaların 1/3'ünde geçirilmiş akciğer TB'u veya TB'lu ile temas öyküsü vardır. Plevradaki sıvı sinüsü kapatacak kadar az veya tüm hemitoraksı dolduracak kadar fazla olabilir. Hastalık önce ateş, gece terlemesi, kuru öksürük ve yan ağrısı ile başlar; sıvı miktarı artınca nefes darlığı eklenir; akciğerde lezyon varsa balgam ve hemoptizi olur.

Fizik muayenede, efüzyonlu hemitoraks solunuma az katılır. Palpasyon ile vibrasyon torasik azalmıştır ve matite vardır. Oskültasyon ile solunum sesi duyulmaz veya az duyulur. Hastalığın erken döneminde frotman duyulabilir (46).

Tanı

Tanıda torasentez, plevral biyopsi ve balgam örneklerinde gerekli incelemelerden (hücre sayımı, sitolojik inceleme, direkt preparat, kültür vb.) yararlanılır. Torasentez ile alınan plevra sıvısından hücre sayımı, sitolojik inceleme, biyokimya analizi kültür ve yayma preparat yapılmalıdır. İlk sonuçlar eksüda ile uyumlu ise kapalı plevra biyopsisi yapılması yararlı olur. Plevra sıvısı genellikle saman sarısı rengindedir. Nadiren kanlı olabilir (45). Lökosit sayısı 100-5000/mm³ arasındadır (43). Hastalığın ilk günlerinde nötrofil hakimiyeti görülebilir, ancak daha sonra lenfosit ve makrofaj sayısında belirgin artış olur. Protein düzeyleri, 5 g/dl'nin üstündedir ve serum düzeylerinin %50'sinden daha fazladır; glükoz düzeyi normal veya düşük olabilir (45).

Plevra sıvısında total adenozin deaminaz (ADA) düzeyleri TB plörezi de yüksek bulunmuştur. TB plörezi li hastalarda ADA düzeyi genellikle 40 ünite/L'nin üstüne ulaşır (50). ADA'nın ADA1 ve ADA2 olmak üzere iki izoenzimi bulunmuştur. ADA1 tüm hücrelerde bulunur; ADA2 monosit ve makrofaj aktivasyonunu yansıtır (43). TB'li hastalarda daha çok ADA2, ampiyem ve paraenfektif efüzyonlarda ADA1 daha fazla bulunmaktadır.

Tüberkülin deri testi

PPD ile yapılan deri testi eksüda şeklinde plevral sıvısı olan hastaların ayırıcı tanısında yararlı olabilir. Genellikle pozitif bulunur; ancak, TB'li hastaların %30'unda test negatif çıkabilir (43). Negatif bulunan olgularda CD4+ T lenfositlerin plevral sıvıda toplandığı sonucuna varılmıştır (46).

Tedavi

TB plörezi genellikle 2-4 ay içinde sıvının reabsorbsiyonu sonucu spontan olarak düzelebilir. Ancak tedavi edilmeyen olguların çoğunda (%65) daha sonra aktif TB ortaya çıkar (42).

TB plörezi, standart anti-TB rejimleriyle tedavi edilmelidir. Torasenteze sadece semptomların rahatlaması için ihtiyaç vardır, terapötik etkisi yoktur. TB ampiyemde standart kemoterapiye ilave olarak cerrahi drenaj zorunludur (45).

2.3. Tüberküloz Patogenezi ve İmmünitesi

2.3.1. Akciğer Tüberkülozunda Patogenez

MTB oksijen açısından zengin olan akciğerlerde yerleşmeye eğilimli, zorunlu aerobik intrasellüler bir patojendir. Solunum yolundan akciğerlere aerosol partiküllerle ulaşır (14). Her partikül 1-3 basil taşıyabilir; enfeksiyon için 10 kadar partikülün yeterli olduğu sanılmaktadır (51). Akciğerlerdeki ilk yerleşim alanından kan ya da lenf yolu ile vücudun diğer kısımlarına dağılır. En çok yerleştiği alanlar akciğerlerin üst bölgeleri ve bölgesel lenf nodlarıdır. TB hastalarının yaklaşık %15'inde, akciğer dışı (plevra, lenf nodu, kemik, eklem, üriner sistem, deri, meninksler, periton ve karaciğer) tutulum gelişebilir.

TB patogenezi ile ilgili ilk çalışmalar Koch'un basil antijenine karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık (DTH) olduğu anlaşılan Koch Fenomeni'yi tanımlamasıyla başlamış;

Lurie'nin tavşanlarda yaptığı çalışmalar, alveolar makrofajların ilk enfeksiyondan kavite oluşumuna kadar devam eden olayları açıklayan dört evrenin tanımlanmasını sağlamıştır.

Evre 1 Başlangıç evresi (1.hafta): TB basilinin inhalasyonu ile başlar. Alveolar makrofajlar basili fagosite ederler ve çoğunlukla ortadan kaldırırlar. Bu evrede alveolar makrofajların mikrobisidal gücü ve basilin virülans özellikleri enfeksiyonun seyrini belirler. Zayıf alveolar makrofaj ile karşılaşan virülan basil çoğalır ve hastalığı başlatır. Basil zayıf, alveolar makrofajlar güçlü ise basil kolayca ortadan kaldırılır (51).

Evre 2 Ortak yaşam, basillerin çoğalma ve yayılma evresi (2-3. hafta): Güçlü virülan basil alveolar makrofajlar içinde çoğalır, makrofajı parçalar ve sekrete edilen kemotaktik faktörlerin etkisi ile dolaşımdaki inaktif makrofajların lezyon bölgesine gelmesine neden olur. İnaktif makrofajların sitoplazmalarındaki vakuoller, basilin logaritmik çoğalması için ideal bir ortam oluşturur. Konak ve basil ortak bir yaşam sürer. Basil yüklü makrofajlar lenfatiklerle bölgesel lenf nodlarına taşınır, burada da kontrol altına alınamazlarsa lenfohematojen yol ile tüm vücuda yayılarak çoğalmaya devam ederler (51).

Evre 3 Hücresel immün yanıt ve geç tip aşırı duyarlılığın gelişimi (3-9 hafta): Bu evrede basilin logaritmik gelişimi durdurulmaya başlar; hem hücresel immün yanıt hem de geç tip aşırı duyarlılığın gelişimi gözlenir. Geç tip aşırı duyarlılık yanıtı sonucunda oluşan granülomların merkezindeki kazeöz nekroz odakları basilin logaritmik çoğalmasını durdurur. Bu odaklarda basiller canlılıklarını sürdürebilir, fakat uygun olmayan koşullar nedeniyle çoğalamazlar. Kazeöz dokulardaki basillerin bir kısmı ölür, bir kısmı dorman halde kalır. Basilin akciğerlere ilk yerleştiği orta alt akciğer zonlarındaki primer lezyon (Ghon odağı), hiler ve paratrakeal lenfatiklerle birlikte primer kompleksi oluşturur (51).

Evre 3'ün ileri aşamalarında, immün sistemi yeterli kişilerde eğer kazeöz odak erimezse, gelişen süreç hücresel immün yanıt tarafından durdurulur. Tüberkülün etrafı fibröz bir duvarla çevrilerek ortadaki kazeöz odak koyulaşır ve süreç yaşam boyu durdurulur. Kazeöz odaktan basil kaçıışı olur ve basil aktive makrofajlar tarafından tutulup yok edilmezse, geç tip aşırı duyarlılık yanıtı tekrarlanarak makrofajlar tahrip edilir. Sonuç olarak, immün sistemi yeterli kişilerde basillerin yok edilmesiyle süreç durdurularak, sadece PPD pozitifliği ile primer enfeksiyon ortaya çıkar. İmmün sistemi baskılanmış kişilerde ise genişleyen kazeöz nekrozlar akciğerde doku hasarına neden olur ve klinik olarak primer TB gelişir (51).

Evre 4 Erime ve kavite oluşumu: Bu evre genel olarak, primer enfeksiyon veya hastalık sonrası endojen reaktivasyon ya da ekzojen reenfeksiyon sonrası gelişen yetişkin

tip akciğer TB'unda görülür. Primer akciğer TB'unda hücrel immünite yeteri kadar güçlü olsa bile kavite oluşabilir. Kavite oluşumu hem hastalığın yayılmasına hem de hastanın bulaştırıcı özellik kazanmasına neden olmaktadır (51).

2.4. Tüberkülozda Doğal İmmün Yanıt

2.4.1. Makrofajlar

Enfeksiyonun seyrini belirleyen konak-patojen ilişkilerindeki ilk olay, alveolar makrofajlar aracılığıyla MTB'un fagositozudur. Makrofajlar, aşağıda özetlenen değişik mekanizmalarla basilleri ortadan kaldırmaya uğraşırken, basiller de fagositoza karşı aşağıda sıralanan mekanizmalarla karşı koymaya çalışır.

TB'a karşı konak cevabında makrofajların rolü

- Basilin makrofaj yüzeyine bağlanması (kompleman reseptörleri: CR1, CR3, CR4; mannoz reseptörleri; surfaktan protein reseptörleri; CD14; toplayıcı reseptörler)
- Fagozom-lizozom birleşmesi
- Basil üremesinin önlenmesi (ROI ve RNI yapımı, apoptoz)
- Diğer hücrelerin toplanması ve bölgesel enflamasyon yanıtı (52)

Fagositoza karşı mikobakterilerin savunması

- Fagozom-lizozom birleşmesinin önlenmesi
- Fagolizozomdan sitoplazmaya kaçış
- Lizozom içeriğinin alkalizasyonu
- ROI'nin inhibisyonu (katalaz üretimi ve kalın lipid duvar)
- iNOS gen aktivasyonunun baskılanması
- Makrofaj aktive edici moleküllerin yapımının önlenmesi
- Metabolizma veya hücre döngüsünün durdurulması (52)

MTB'un makrofajlara bağlanması

MTB makrofajlara kompleman reseptörleri (CR1, CR2, CR3 ve CR4), mannoz reseptörleri, surfaktan protein A reseptörleri, çöpçü reseptörleri, vitronektin, fibronektin reseptörleri, CD14, CD43 yüzey molekülleri ve TLR aracılığı ile bağlanarak aktivasyona sebep olur veya hücre içine girer. Fagositik hücreler üzerindeki mannoz reseptörleri ve mikobakteriler arasındaki ilişkinin mikobakteriyel yüzey glikoproteini LAM aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Prostaglandin E2 (PGE2) ve bir Th2 tip sitokin olan IL-4,

kompleman ve mannoz reseptör ekspresyonunu ve fonksiyonunu artırırken; IFN- γ makrofajların mikobakterilere bağlanma yeteneğinde azalma ile sonuçlanan bu reseptörlerin ekspresyonunu azaltır (53).

TLR'lerin MTB'in hücre duvarında yer alan lipoproteinler aracılığıyla aktive olduğunda, makrofaj-benzeri hücre dizisi olan THP-1 hücrelerinin IL-12 üretimini stimüle ettikleri gözlenmiştir (54). IL-12'nin TLR aracılı stimülasyonu aynı zamanda, bakterinin hücre içi öldürülmesinde önemli olan NOS ve NO üretiminin artışıyla sonuçlanır.

Ayrıca CD43 (leukosialin/sialophorin) gibi reseptör olmayan yüzey molekülleri immün cevabın başlatılmasında anahtar komponentler olabilir. Diğer hücre yüzey reseptörleri ile mikobakterinin etkileşmesinde rol alan CD43'ün TNF- α üretimini artırdığı gösterilmiştir (15).

Miyelomonositik hücrelerde eksprese edilen ve patern tanıyan reseptör olan CD14, mikobakterilerde bulunan LAM ile ilişkiye girerek kemotaktik cevaba aracılık eder; TNF ve IL-1 β salınımını artırır (55).

Fagozom-lizozom birleşmesi

Fagosite edilmiş mikroorganizmalar, fagolizozom oluşmasından sonra intralizozomal asidik hidrolazların degradasyonuna uğrar. MTB, fagolizozomal füzyonu engelleyerek hayatta kalmayı başarır. Mikobakteriyel sulfatidlerin, fagolizozomal füzyonu inhibe ettikleri (56); ayrıca *in vitro* çalışmalarda, MTB'in bol miktarda amonyak üreterek inhibisyonu başardığı (57) gösterilmiştir.

Reaktif oksijen ara ürünleri (ROI)

Hidrojen peroksit (H₂O₂), makrofajların anti mikobakteriyel etkinliklerine aracılık eden ROI'leri içinde ilk tanımlanmış moleküldür. MTB enfeksiyonunun akciğerlerde makrofaj akümülyasyonunu ve H₂O₂ üretimini endüklediği gösterilmiştir. Benzer sonuçlar TB asit sıvısında da gözlenmiştir (53).

Reaktif nitrojen ara ürünleri (RNI)

IFN- γ ve TNF- α ile endüklenen fagositler, endüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS2) aracılığı ile L-arginin'in substrat olarak kullanarak NO gibi toksik RNI'lerini oluştururlar. RNI yapımı eksik farelerde MTB'e karşı duyarlılığın arttığı gösterilmiştir (58, 59). NOS2, fare TB'unun persistan fazı boyunca akciğerlerde bulunan granülomalarda eksprese edildiği; RNI'lerin üretiminin engellenmesinin persistan enfeksiyonun reaktivasyonu ile sonuçlandığı saptanmıştır (60). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, 1, 25 dihidroksi vitamin D3 {1,25-(OH)₂D₃}'ün NOS2 ekspresyonunu endüklediği ve makrofajlarda MTB'u inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir (61). Aktif

pulmoner TB'lu kişilerin bronko alveolar lavaj (BAL) sıvısından elde edilen makrofajlarda, NOS2'nin yoğun ekspresyonu immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir (62).

2.4.2. Nötrofiller

Nötrofiller, mikobakteriyel enfeksiyonların akut fazında koruyucu rol oynarlar (63, 64). Basilin çoğalma alanına ilk gelen hücreler nötrofillerdir. Ardından NK hücreleri, $\gamma\delta$ hücreleri ve $\alpha\beta$ hücreleri gelir (53). Mikobakteriler ile karşılaşan nötrofiller ilk olarak fagositoz ve mikroorganizmayı öldürebilmek amacıyla reaktif oksijen metabolitlerini (ROM) oluşturarak ayrıca makrofajların akümülyasyonuna kadar bakterinin yayılımını engelleyerek cevap verir (65, 66). Sindirilmiş MTB içeren nötrofillerin, enfeksiyon alanına immün sistemin diğer hücrelerini çekmek için kemokinler ve sitokinler salgıladığı gösterilmiştir (64).

2.4.3. NK Hücreleri

NK hücreleri, mikrobiyal patojenlere karşı doğal immünitelerde önemli rol oynayan ve ön duyarlılaşmaya gerek kalmaksızın enfekte hücreleri öldüren büyük granüllü lenfositlerdir. NK hücreleri, spesifik immün cevabı şekillendiren sitokinler salgılayarak ve enfekte hücreleri yok ederek virus, bakteri ve parazitlere karşı korunmaya aracılık ederler (67-69). Artmış NK hücre sitolitik aktivitesi, primer viral enfeksiyonlardan sonra gözlenir; viral ve diğer mikrobiyal enfeksiyonlara duyarlılık ile kötü NK hücre fonksiyonu arasında güçlü bir korelasyon bulunur (70). NK hücreleri, makrofajların aktivasyonu için kritik olan IFN- γ 'nın erken dönemdeki kaynağını oluşturur (67, 70) ve birçok intrasellüler patojenin eliminasyonu için önemli olan Th1 hücrelerinin klonal genişlemesine yardımcı olur.

MTB ile stimülyasyon yapılan *in vitro* kültürlerde, NK hücrelerinin çoğalması, *in vivo* MTB enfeksiyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (71). Erken enfeksiyon sırasında NK hücreleri, enfeksiyon alanındaki fagositleri aktive etme kapasitesine sahiptir. NK aktivitesindeki azalma ile çoklu ilaca dirençli TB (MDR-TB) gelişimi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (72). IL-2 ile aktive NK hücreleri non spesifik olarak M. avium kompleksi (MAC) ile enfekte makrofajlarda mikobakterisidal aktivite oluşturabilir (73). NK hücreleri IFN- γ üretir ve mikobakteri ile enfekte hedef hücreleri lize edebilir (74).

2.4.4. Toll Benzeri Reseptörler (TLR)

TLR, makrofaj ve DC üzerinde bulunan mikrobiyal tanıma için gerekli olan, doğal immünitinin filogenetik olarak korunmuş mediyatörleridir. TLR ailesinin üyeleri, doğal

immün sistemin diğer patern tanıyan proteinlerine benzer biçimde, ekstrasellüler domenlerinde tekrarlayan lösinden zengin motifler içerirler. TLR'ün sitoplazmik domeni, IL-1 reseptör (IL-1R) sinyal domeni ile homolog olup; sitokinlerin üretiminde sinyalizasyonu sağlayan NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eden bir serin kinaz olan IRAK (IL-1R ile ilgili kinaz)'a bağlanır (75).

MTB, CD14'den bağımsız olarak TLR aracılığı ile hücreleri immünolojik olarak aktive eder (76). MTB lizatları ya da hücre duvarı ile ilişkili solübl lipoproteinlerin, TLR aracılığı ile güçlü bir proenflamatuvar sitokin olan IL-12'nin üretimini endükleyebildikleri bildirilmiştir (6). Yapılan çalışmalarda, tüm TLR'i IRAK'a bağlayan ortak sinyalizasyon komponenti olan miyeloid farklılaşma proteini 88 (MyD88)'in, MTB ile endüklenen makrofaj aktivasyonu için de gerekli olduğu gösterilmiştir (77). TLR2 genindeki mutasyonun, MTB'in endüklediği TNF-α üretimini spesifik olarak inhibe ettiği; TLR2-knockout farelerin ise vahşi tip hayvanlara göre yüksek doz MTB'e karşı daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (78). Ayrıca TLR2, MTB orijinli 19 kDa lipoprotein ile stimüle edildiğinde hem insan hem de fare makrofajlarında mikobakterilerin üremelerinin durduğu gösterilmiştir. MTB ile enfeksiyondan sonra koruyucu hücrel immün cevabın oluşumu ve IL-12p40 ile TNF'nin APC tarafından ilk üretimi için TLR sinyalinin gerekli olduğuna inanılmaktadır (78). Endojen IL-12p40 ve TNF yokluğunda, tip 1 sitokin üretimi, granüloma oluşumu ve mikobakteriyel enfeksiyondan korunmanın ciddi biçimde baskılandığı bildirilmiştir (79). Bu nedenle TLR2 ve TLR4 gibi PRR eksikliği doğal immün cevabın yetersizliği sonucu MTB enfeksiyonunun erken alevlenmesine yol açar (6, 78).

2.5. Tüberkülozda Kazanılmış İmmün Yanıt

2.5.1. Hümorale İmmün Yanıt

İntrasellüler bir patojen olan MTB'e karşı koruyucu etkinlik gösteren herhangi bir serum komponenti saptanmamıştır. B hücreleri ve antikorların, korunmada etkili olmadıkları düşünölmekle birlikte; son yıllarda yapılan çalışmalar TB'a cevapta rolleri olabileceğini desteklemektedir.

İnsanlarda TB'a karşı hümorale immün cevap, özellikle serodiyagnostik testler geliştirebilmek amacıyla araştırılmıştır. Çeşitli seroreaktif antijenler ve epitoplara tanımlanmasına rağmen, MTB'a hümorale cevabın zayıf olması nedeniyle, bu yapılar karşılık gelen antikorların basitçe tespit edilmesine yönelik gelişmeler sınırlı kalmıştır.

Farklı mikobakteriyel antijenlerin yer aldığı ham antijen preparasyonları ile yapılan çalışmalarda hastalığa sebep olan bakteri, çevresel bakteri, aşı ile etkileşimi ortaya koymak amacıyla sağlıklı kişilerin Ab'ları değerlendirilmiştir (80). Daha sonraları 71-kDa DnaK, 65-kDa GroEL, 47 kDa elongasyon faktörü Tu, 44 kDa Pst homologu, 40-kDa L-alanin dehidrojenaz, 38-kDa PhoS, 23kDa süperoksit dismutaz, 23 kDa dış membran proteini, 12kDa tiyoredoksin ve 14kDa GroES gibi antijenler bulunmuş; bu antijenlerin diğer mikobakteriler ve mikobakteriyel olmayan prokaryotlardaki analog proteinlerle anlamlı homolojilere sahip olduğu saptanmıştır (81-86). Sağlıklı ya da enfekte kişilerin hemen hemen tümünde bu antijenlerin epitoplarına karşı antikor oluştuğu gösterilmiş; ham antijen ile gözlenen çapraz reaksiyonlar bu antijenlerle de gözlenmiştir (87, 88).

Çapraz reaksiyon veren antikor problemini aşmak için 38-kDa PhoS, 30/31-kDa antijen 85, 19-kDa lipoprotein, 14-kDa GroES ve LAM gibi pürifiye antijenlerle testler yapılmış; 38-kDa PhoS antijenine karşı antikorların araştırıldığı testler, diğerlerine göre daha duyarlı ve özgül bulunmuş; anti 38-kDa antikorların varlığı ile tedavi görmüş, ilerlemiş ve tekrarlayan TB olguları arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (80). Ayrıca HSP60, 88 kDa sekrete antijen, 2,3-Diacyltrehalose, 2,3,6-Triacyltrehalose, Cord faktör, sulfolipid gibi antijenlerle de çalışılmış (80, 86, 89); ancak günümüze kadar bu antijenlerin hiçbirisiyle TB'un erken tanısında kullanılabilecek bir test geliştirilememiştir.

2.5.2. Hücresel İmmün Yanıt

MTB'a karşı koruyucu yanıtta, hücresel immünite önemlidir. TB basili konakta hücre (genellikle makrofajlar) içinde yaşar. Bu nedenle antikordan daha çok T hücre aracılı mekanizmalar enfeksiyonun kontrolünde rol alır. Virülen MTB ile oluşan enfeksiyonun ilk haftası içinde, akciğere drene olan lenf nodlarında aktive CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin sayısı artar (90). Enfeksiyonu takiben 2-4 hafta içinde hem CD4+ hem de CD8+ T hücreleri akciğerlere göç ederken efektör/hafıza (CD44^{hi}CD45^{lo}CD62^{L-}) fenotipi kazanırlar. Bu hücrelerin en az yarısı bir aktivasyon belirteci olan CD69 pozitifliği gösterir (90-92). Enfeksiyon alanına göç eden aktif T hücreler, APC'ler ile ilişkiye geçerler. Granüloma içerisinde hem CD4+ hem de CD8+ T hücreleri bulunur ve bu hücreler enfeksiyonun yayılım ve reaktivasyonunu engellerler (93).

CD4+ T hücreleri

Bu hücreler, Th hücreleri olarak da isimlendirilirler. İmmün cevabı güçlendirmek için immün sistemin diğer hücrelerine yardımcı olurlar. Th hücreleri, salgıladıkları sitokinlere göre Th1 ve Th2 olmak üzere en az iki subsete ayrılırlar. Th1 hücreleri ise

TB'a karşı konak savunmasında en önemli sitokin olan IFN- γ 'yı; Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5 ve IL-10 sentezlerler (15).

Mikobakteriler makrofajda vakuol içerisine yerleşir. Mikobakteriyel antijenler MHC-sınıf II yoluyla CD4+ T hücrelerine sunulur. Bu olay MTB'e karşı savunmada primer önemi olan CD4+T hücrelerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu hücrelerin akut mikobakteriyel enfeksiyonların kontrolündeki primer önemi, CD4 ya da MHC sınıf II gen eksikliği bulunan fare türleri ve antikor deplesyonunun yapıldığı çeşitli deneysel modellerde gösterilmiştir (94). HIV ile enfekte hastaların TB'a duyarlılıklarındaki dramatik artış bu hücrelerin kritik rolünün altını çizmektedir (36). CD4+ T hücrelerinin TB'daki ana fonksiyonunun sitokinlerin, özellikle makrofaj aktivasyonu ve takiben mikrobisidal mekanizmaların endüksiyonu için son derece önemli olan IFN- γ 'nın sentezlenmesi ileri sürülmekte; IFN- γ üretiminin, enfeksiyonun erken aşamalarında gerekli olduğu düşünülmektedir. Hem CD4-/- hem de MHC sınıf II-/- farelerde MTB ile enfeksiyondan 2 hafta sonra, akciğerde %50 daha az IFN- γ üretildiği; enfeksiyondan 4 hafta sonra ise mutant fare ve vahşi tip farede sitokin üretiminin aynı düzeyde bulunduğu bildirilmiştir (94). Mutant farelerde IFN- γ üretiminin CD8+ T hücreleri tarafından kompanse edilebildiği gösterilmiştir (95). Latent TB oluşturulan farelerde yapılan bir çalışmada CD4+ T hücrelerinin antikorlarla deplete edilmesi, sürekli IFN- γ ve iNOS bulunmasına rağmen persistan MTB enfeksiyonun hızlı bir şekilde reaktivasyonu ile sonuçlanmıştır (94). Bu bulgular, CD4+ T hücrelerinin IFN- γ üretiminden bağımsız olarak TB reaktivasyonunu engellediğini ortaya koymaktadır.

CD4+ T hücreleri, granülomaya infiltre olan hücrelerin %5-10 gibi çok küçük bir popülasyonunu oluşturmalarına rağmen, granüloma oluşumunun erken fazı sırasında çok etkilidirler. CD4+ T hücreleri eksik farelerde bakteriyel yükün kontrol edilemediği ya da yayılmanın engellenemediği aberan lezyonlar olduğu bildirilmiştir (96).

CD4+ T hücrelerinin özellikle akciğerlerdeki lokal immün cevapta sitolitik fonksiyonları vardır. Bu fonksiyonunu canlı intrasellüler mikobakterilerin azaldığı FasL ile endüklenen apoptoz aracılığı ile gerçekleştirirler (97). Bakteriyel öldürme ve granüloma yapısını koruma fonksiyonlarına ek olarak granüloma oluşumunun çözülme aşamasında da fibroblastların aktivasyonunu ve toplanmasını sağlarlar (96).

Ayrıca, CD4+CD27- fenotipi gösteren farklı bir T hücre alt grubunun IFN- γ üretmelerinin yanı sıra perforin ve granzim B sekrete ederek (CD4+ sitotoksik T lenfosit (CTL)'ler) MTB'a karşı savunmada rol aldıkları ortaya konmuştur (98).

Otoimmün hastalıklar, alerjide ve graft reaksiyonunun önlenmesinde son derece önemli olan regülatör T hücreleri (Treg), CD4+ T hücrelerinin bir başka alt grubunu oluştururlar. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin etkinliğini baskılayarak immün reaksiyonların aşırıya kaçmasını engellerler. CD25 ekspresyonunun yanı sıra FoxP3 gen ekspresyonuna da sahip olan CD4+CD25+ doğal Treg hücrelerinin TB hastalarında arttığı ve Th1 tipi immün yanıtın süpresyonunu sağlayabilecekleri gösterilmiştir (99).

CD8+ T hücreleri

CD8+ T hücreleri, MHC sınıf I aracılığı ile sunulan ve APC'nin sitoplazmasından kaynaklanan antijenleri tanırlar. MTB, vakuol içinde yaşadığı için ilk bakışta, CD8+ T hücrelerinin MHC sınıf I molekülleri aracılığı ile bu antijenleri etkili bir şekilde sunması imkansız gibi görünmektedir. Schaible ve arkadaşlarınca (100) yapılan bir çalışma ile bu konuya açıklık getirilmiştir. Bu çalışmada apoptoz ile ölen enfekte makrofajlar ve dendritik hücrelerden mikroçevreye bırakılan basil içeren apoptotik cisimcikler ve veziküller enfekte olmayan makrofajlar ve dendritik hücrelere alınarak geç endozom ve lizozomlara girdikleri; MHC sınıf I ve CD1 molekülleri aracılığıyla mikobakteriyel antijenleri CD8+ T hücrelerine sundukları gösterilmiştir.

Antikor kullanarak T hücre subset delesyonu yapılan ilk çalışmalarda, CD4+T hücrelerine ek olarak CD8+T hücrelerinin de MTB enfeksiyonunun kontrolünde gerekli olduğu; MTB spesifik CD8+T hücrelerinin transfer edilmesi ile enfekte farelerin dalaklarında bakteri sayısının azaldığı saptanmıştır (101).

Beta 2 mikroglobülin ($\beta 2m$) zincirinin bulunmadığı ($\beta 2m^{-/-}$), dolayısıyla MHC sınıf I moleküllerinin fonksiyon dışı kaldığı ve CD8+ T hücrelerine antijenin sunulmadığı farelerde; özellikle akciğerlerde enfeksiyonun kontrol edilemediği bildirilmiştir (102). İntravenöz MTB ile enfekte edilen değişik fare gruplarında hayatta kalma süresi ve bakteri yükleri dikkate alınarak yapılan karşılaştırılmalı çalışmalarda; en duyarlı grubun $\beta 2m^{-/-}$ fareler olduğu; bunu transport-asosiyasyon-protein-1 (TAP1 $^{-/-}$), CD8 $\alpha^{-/-}$, perforin $^{-/-}$ ve CD1d $^{-/-}$ olanların takip ettiği gösterilmiştir. Tüm bu gözlemler klasik olarak sınırlanmış (TAP-1 bağımlı) CD8+ T hücrelerinin, perforin bağımlı sitotoksinite ile sınırlı olmaksızın MTB'a karşı *in vivo* korunmaya katkıda bulunduğunu göstermiştir (103).

MTB enfeksiyonu sonucu gelişen granülomalarda CD8+ T hücre sayısı, CD4+ T hücre sayısına yakın olup; yapılan çalışmalar CD8 $^{-/-}$ farelerde normal granüloma oluştuğunu; enfeksiyonun kontrol edildiğini; ancak bakteri yükünün daha fazla olduğunu göstermiştir. Granüloma oluşumunda CD4+T hücre sayısı erken dönemde artarken, CD8+

T hücreleri, enfeksiyonun daha sonraki döneminde korunmada rolleri olduğundan daha geç dönemde artar (96).

CD8⁺ T hücreleri MTB enfeksiyonunu sitokin salınımı, granül bağımlı sitotoksosite, Fas-FasL aracılı sitotoksosite ve direkt mikrobisidal aktivite olmak üzere başlıca 4 farklı mekanizma ile kontrol eder.

Bu hücreler, IFN- γ ve TNF- α gibi tip 1 sitokinlerin kaynağı olarak fonksiyon göstermelerinin yanı sıra dokulardaki enfekte makrofajları öldürerek koruyucu etkiye katılabilirler. Her iki sitokin, sinerjistik olarak MTB barındıran makrofajları aktive edebilirler. Makrofajların aktivasyonu, nitrik oksit (NO) gibi reaktif nitrojen ara ürünlerinin (RNI) üretimine yol açan endüklenebilir nitrik oksit sintaz (iNOS) üretiminin artışı ile sonuçlanır. Reaktif oksijen ara ürün (ROI)'leri ile birlikte RNI'leri, canlı mikobakterilerin azalmasını sağlarlar (104).

CD8⁺ T hücreleri, perforin aracılı mekanizmalarla enfekte makrofajları öldürebilirler. Perforin, CD8⁺ T hücrelerin granüllerinde bulunan bir protein olup; enfekte makrofajların membranlarında porlar oluştururlar ve bu hücrelerin apoptozu ya da lizisi ile sonuçlanan granzim A, granzim B (serin proteaz), granülozin gibi toksik proteinlerin girişine izin verir (104).

Makrofaj apoptozu, aynı zamanda enfekte makrofajların üzerindeki Fas ile aktive CD8⁺ T hücrelerin üzerindeki FasL'ın bağlanmasıyla endüklenebilir.

CD8⁺ T hücreleri, direkt olarak mikrobisidal aktivite de gösterirler. Bu hücrelerin granülleri, hücre içindeki bakteriler üzerinde direkt mikrobisidal etki gösteren granülozin içerirler. Saponin benzeri bir protein olan granülozin, lipid membranlar ile ilişkiye girer ve lipid degrade eden enzimleri aktive eder. Granülozin, perforin varlığında, intrasellüler MTB'un canlılığı dramatik biçimde azalır (104).

Non klasik olarak sınırlanmış CD8 T hücreleri

CD8⁺ T hücreleri, klasik MHC sınıf I (MHC sınıf 1a) molekülleri ile sunulmayan fakat bu moleküllere çok yakın bir grup olan sınıf 1b molekülleri aracılığı ile sunulan diğer MTB antijenlerini de tanır. MHC sınıf 1b molekülleri, nonpolimorfik olup ve CD1 moleküllerini kapsar. CD 1 molekülleri, MTB'i lipid ve glikolipid antijenlerini CD8⁺T hücrelerine sunar (93). CD1 molekülleri, DC üzerinde bol miktarda eksprese edilirken (53), makrofajlar da yok denecek kadar azdır. CD1 yüzey ekspresyonu, MTB ile enfekte hücrelerde azalır (105). Bu nedenle enfekte makrofajlardan DC'e glikolipidlerin transferi, CD1 aracılı sunum için son derece önemlidir (106).

Yapılan çalışmalarda, periferel kanda, MTB'e reaktif CD8+ T hücrelerinin önemli bir kısmının, MHC sınıf Ib sınırlı olduğu belirlenmiş; MHC sınıf Ib sınırlı CD8+ T hücreleri, MTB ile enfekte kişilerin periferel kanlarından izole edilebilmiştir (101).

$\gamma\delta$ T hücreleri

$\gamma\delta$ T hücre reseptörü (TCR) eksprese eden T hücreleri, fare ve diğer hayvanların periferel kan ve lenfoid organların %5 oranında bulunurlar (97). Bu hücreler, lenfoid dokularda DC morfolojisi oluşturabilen büyük granüler lenfositler olup; bazıları CD8+ fenotipindedir. Genel olarak $\gamma\delta$ T hücrelerinin MHC ile sınırlı olmadığı kabul edilir. Çoğunlukla sitotoksik T hücreleri gibi fonksiyon gösterirler (53). $\gamma\delta$ T hücreleri, işlenmemiş protein antijenleri ve küçük organik fosfat molekülleri gibi birçok antijeni tanıyabilir. Farelerde yapılan çalışmalar, bu hücrelerin enfeksiyonun erken aşamalarında önemli rol oynadıkları ortaya konmuştur (107, 108). Periferel kan $\gamma\delta$ T hücrelerinin baskın olan subseti, V γ 9/V δ 2 eksprese eden hücrelerdir, bunlar inaktive MTB ile MHC-sınırlı olmaksızın güçlü bir şekilde reaksiyona girerler. V γ 9/V δ 2 T hücreleri TNF- α ve IFN- γ 'nın yanı sıra (makrofaj enflamatuvar protein-1 α) MIP-1 α ve MIP-1 β gibi CC kemokinler ile lenfotaktin gibi C kemokinlerin sentezlenmelerine yardımcı olur ve patojen ile enfekte makrofajlara karşı sitotoksik aktivite gösterirler (109).

Çoğu erişkin yaş grubunda insanlarda yapılan çalışmalarda, TB sırasında periferel kan $\gamma\delta$ T hücrelerinin relatif oranlarında ve absölu sayılarında değişiklik olmadığı gösterilmiştir (110). Hastalığın genel olarak primer enfeksiyonla ilişkili olduğu, çocuklarda ise enfeksiyondan ve kemoterapiden hemen sonra yapılan değerlendirmelerde bu hücre grubu ile ilgili önemli bilgiler edinilmiştir. Sağlıklı veya TB'un değişik klinik formlar seyrettiği PPD pozitif çocuklarda yapılan bir çalışmada; *in vitro* farklı fosfoantijenler ile stimüle edilen V γ 9/V δ 2 T hücrelerin sağlıklı PPD negatif kişilerininkine göre çok güçlü bir biçimde proliferere olduğu gösterilmiştir (111). Yeni doğanlarda BCG aşısından sonra, en belirgin T hücre alt tipinin V γ 9/V δ 2 T hücreleri olduğu; 18-45 yaş arasındaki erişkin kişilerde de aşılardan sonra aynı hücre grubunun hakim olduğu bildirilmiştir (107).

Yapılan çalışmalar BCG aşısından sonra V γ 9/V δ 2 T hücre proliferasyonunun arttığını; kemoprofilaksi ya da kemoterapiden sonra muhtemelen bakteriyel yükün azalmasına bağlı olarak proliferasyonun azaldığını; fosfolipid antijenlerin enjekte edildiği Rhesus maymunlarında başlangıçta fosfolipidlere karşı *in vitro* V γ 9/V δ 2 T hücre proliferasyonunun arttığını, enfeksiyondan 2 ay sonra ise proliferasyonun azaldığını göstermiştir. Proliferasyon azalması, MTB ile enfekte kişilerde de saptanmıştır (111).

Sağlıklı kişilerin beyin omurilik sıvılarında hakim hücre grubunun V δ 1 T hücreleri olmasına karşılık, TB menenjit (TBM)'li çocuklarda V γ 9/V δ 2 T hücre cevabının arttığı gösterilmiştir. Pulmoner TB'lu hastaların bronko alveolar lavaj (BAL) ve periferik kan örneklerinde ise V γ 9/V δ 2 T hücrelerinin selektif olarak azaldığı saptanmıştır; TBM ile pulmoner TB arasındaki bu farkın bakterinin yerleşim yerindeki değişiklikten (beyne karşılık akciğer) kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca immün cevaptaki fark, primer hastalığa karşılık reaktivasyon oluşumuna (çocuklardaki TBM, primer enfeksiyona bağlı iken; erişkinlerdeki pulmoner TB reaktivasyona bağlı olabilir) veya hastalık süresine (Klinik belirtiler TBM'li hastalarda pulmoner TB'a oranla daha erken ortaya çıkar) bağlı olabilir. Pulmoner TB'lu hastalardaki V γ 9/V δ 2 T hücrelerinin selektif kaybı, uzun süreli mikobakteriyel antijenler ile stimülasyona bağlı olarak apoptozun gerçekleşmesi nedeniyle de olabilir (111).

Mikobakteriyel antijenlerle $\gamma\delta$ -TCR'nün uyarılması, kronik olarak aktive $\gamma\delta$ T hücreleri üzerinde FasL'in ekspresyon artışını endükler. FasL'in mikobakteriyel lezyonlara göç eden lökositler üzerindeki Fas antijeni ile ilişkiye girmesi, $\gamma\delta$ T hücrelerinin ölümünü endükleyen aktivasyon ile sonuçlanır. $\gamma\delta$ T hücreleri, enfeksiyonun erken aşamasına katılmak üzere lezyon bölgesine göç ederler; hastalık kronik hale geldiğinde Fas-FasL aracılı apoptoz, MTB'a karşı reaktif olan $\gamma\delta$ T hücrelerinin önemli bir kısmını ortadan kaldırır. $\gamma\delta$ T hücrelerinin azalması, enflamatuvar T hücrelerinin akümülyasyonunun inhibasyonu aracılığı ile enflamasyonun sınırlanmasına, doku hasarının inhibe edilmesine yardımcı olabilir; aynı zamanda, enfeksiyonun kronik formunun gelişimine de katkıda bulunabilir (112).

Aktive $\gamma\delta$ T hücreleri, çeşitli hedefler için sitotoksik olup ve MTB ile enfekte makrofajları etkili bir şekilde öldürebilir (113). Sitotoksik aktivitesi, MHC sınıf I ya da sınıf II ile sınırlanmış değildir; Fas-FasL ilişkisi, TNF- α salınımı ve granülleri içindeki sitotoksik moleküllerin salınımı ile gerçekleşir (111).

Tüberkülozda Th1/Th2 dengesi

T hücrelerinin antijenle stimüle edildikten sonra salgıladıkları sitokin paternlerine göre 2 alt grubu tanımlanmıştır. Th1 hücreleri IL-2, IFN- γ sentezleyerek hücre içi enfeksiyonlarda koruyucu rol oynarlar. Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5, ve IL-10 sentezleyerek akut ve kronik enflamasyon ile geç tipte hücresel aşırı duyarlılığı inhibe ederler. İki tip cevap arasındaki denge, enfeksiyona karşı konak direncinin sonucunu yansıtır. Th0 hücreleri ise ara sitokin sekresyon paterni gösterirler. Prekürsör hücrelerden

Th1 farklılaşması IL-12, Th2 farklılaşması ise IL-4 gibi sitokinlerin kontrolü altında gerçekleşir.

MTB enfeksiyonuna ailesel duyarlılığı olan hastalarla yapılan bir çalışmada Th1 cevabının koruma için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. IFN- γ reseptörleri, IL-12 üretimi ya da IL-12 reseptörlerini etkileyen mutasyonlar MTB'e duyarlılığı artırır. IFN- γ 'nın üretilmediği ya da cevabının olmadığı olgularda hastalık şiddetli ve çoğunlukla öldürücüdür (114). Bu da MTB'e karşı koruyucu immünitede güçlü Th1 cevabına ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, TB hastalarından elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) PPD ile stimüle edildiğinde tüberkülin pozitif sağlıklı kişilere göre daha az IFN- γ ve IL-2 salgıladıkları gösterilmiştir. Benzer çalışmalarda da IFN- γ düzeyinde azalma, IL-4 sekresyonunda ya da IL-4 sekrete eden hücrelerin sayısında artış gözlenmiştir (53).

Hastalığın gerçekleştiği alanda hücrel immün yanıtta bakıldığında; MTB ile stimüle edilen plevral sıvı hücrelerinde, stimülasyondan sonra IL-12 düzeylerinin çok yüksek olduğu bulunmuştur. IL-12'nin farklılaşmamış CD4+ T hücrelerinde Th1 tipi cevabı endüklediği bilinmektedir. Bu nedenle hastalığın gerçekleştiği alanda da Th1 tipi cevap söz konusudur (115). Ayrıca aktif pulmoner TB'lu hastalardan elde edilen BAL hücrelerinde de IFN- γ mRNA düzeylerinin artmış olduğu saptanmıştır (53).

Bazı Afrika ve Avrupa ülkelerinin katıldığı, 2002 yılında yapılan ortak bir çalışmada, Th1 aktivitesini belirlemek için plazma solübl lenfosit aktivasyon gen-3 [soluble lymphocyte activating gene-3 (sLAG-3)]; Th2 aktivitesini belirlemek için ise plazmada bulunan IgE, solübl CD30 ve MDC/CCL-22 (makrofajlar tarafından üretilen bir kemokin) değerleri ölçülmüş; TB tanısı alan hastalarda düşük miktarda sLAG-3 (Th1), bu hastalarla ev içi teması olan sağlıklı kontrollerde ise toplum içindeki kontrollerden daha yüksek sLAG-3 düzeyleri saptanmıştır. Tüm Th2 markerleri, hasta gruplarında toplum kaynaklı kontrollere göre daha yüksek bulunmuş; hastalarla ev içi teması olan kontrol gruplarında ise toplum kaynaklı kontrollerden daha düşük saptanmıştır. Bu bilgiler zayıf Th1 ya da güçlü Th2 aktivitesine sahip olan kişilerde enfeksiyon gelişme riskinin daha yüksek olduğunu, koruma için Th1 cevabının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çalışmada enfekte hastalarda tedavinin 2-3. ayında ve tedavinin sonlandığı 6-8. ayda testler tekrarlanmış; sLAG-3 düzeyleri (Th1), tedavinin 2-3. ayında başlangıç değerine göre hemen hemen 4 kat, tedavi bitiminde ise 8 kat daha yüksek; toplum içi kontrollere göre de daha yüksek bulunmuştur. TB'daki klinik iyileşmenin, daha yüksek Th1 aktivitesi ve daha düşük Th2 aktivitesine doğru dönüşüm ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (114).

2.5.3.Sitokinler

Proenflamatuvar sitokinler

Fagositik hücreler tarafından MTB'in tanınması, hücre aktivasyonuna ve çok sayıda sitokinin üretilmesine sebep olur. Enflamatuvar cevapta ve mikobakteriyel enfeksiyonların seyrinde önemli rol oynayan bu sitokinler aşağıda özetlenmiştir.

TNF- α

MTB makrofaj, DC ve T hücrelerini TNF- α sekrete etmesi için endükler. TNF- α , TB'da oluşan immün ve patolojik cevaplarda pek çok açıdan etkilidir. TNF- α ya da TNF reseptör (TNFR)'ü eksik olan farelerde MTB enfeksiyonunun, kontrol grubuna göre daha fazla bakteriyel yüke ve farelerin daha hızlı ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir. TNF- α , MTB'ye karşı immün cevapta son derece önemli olan IFN- γ ve NOS2 ekspresyonunu da endüklemektedir (53).

TNF- α granüloma oluşumunda anahtar rol oynar, böylece bakteri bir duvar ile sınırlandırılır ve enfeksiyonun yayılması engellenir (6). TNF eksik olan farelerde MTB enfeksiyonunun bol miktarda nötrofil içeren kötü organize olmuş lezyonlar ile sonuçlandığı gösterilmiştir (96).

TNF- α , MTB enfeksiyonunda hücrelerin göçünü ve doku içine yerleşimini; kemokinler ve kemokin reseptörleri gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu etkiler (96). Bu sayede enfekte doku içinde fonksiyonel granüloma oluşumunda belirgin olarak rol oynar (53).

TNF- α konak dokusunun hasarında etkili olan en önemli faktördür. Sistemik cevap ile karşılaştırıldığında enfeksiyonun yer aldığı sınırlı alanda (örneğin plevral sıvı) TNF- α düzeylerinin arttığı görülmüştür. TNF- α 'nın sistemik yayılımı, ateş, kilo kaybı gibi istenmeyen enflamatuvar etkilere sebep olur. Tedavi sırasında erken klinik kötüleşme, plazmadaki TNF- α 'nın selektif artışı ile çabuk iyileşme ise plazmadaki TNF- α 'nın hızlı azalmasıyla ilişkili bulunmuştur. TNF- α 'nın sistemik üretiminin aşağı çekildiği ve TNF- α 'nın zarar verici etkilerinin sınırlandığı durumlarda, TNF- α aktivitesini bloke eden solübl TNF- α reseptörleri artmaktadır. TNF- α ya da TNF- α reseptör p55 eksik farelerin mikobakterilere karşı duyarlılıkları artmıştır. Benzer olarak Crohn hastalığı ve romatoid artrit'de monoklonal anti-TNF- α antikör kullanımının TB reaktivasyon oranını artırdığı gösterilmiştir (6).

IFN- γ

IFN- γ , MTB enfeksiyonunun kontrolünde son derece önemli Th1 tipi bir sitokin olup; CD4, CD8 ve NK hücreleri tarafından üretilir. Antijen sunumunu artırır; etkenin

öldürülmesine CD4+ T lenfosit ve CTL'nin katılımını sağlar. Antijen spesifik T hücre immünesinde özellikle etkindir. *In vitro* mikobakteriyel antijen spesifik IFN- γ üretimi, MTB enfeksiyonunu gösteren bir marker olarak kullanılabilir. Tek başına IFN- γ üretimi, MTB enfeksiyonundan korunmada başarısız olmasına rağmen bu patojene karşı oluşan koruyucu cevapta gereklidir (6).

Makrofajları aktive etmede oldukça etkili olan IFN- γ , TNF- α ile birlikte sinerjik etki gösterir. Anti-mikobakteriyel makrofaj fonksiyonlarının aktivasyonunda IFN- γ ve TNF- α 'nın kostimülatör aktivitesi ilk olarak 1990'lı yıllarda gösterilmiştir. Flesch ve Kaufmann yaptıkları bir seri deneylerle, IFN- γ 'nın TNF- α 'dan daha fazla anti-mikobakteriyel makrofaj fonksiyonlarını stimüle ettiğini göstermişler; TNF- α üretiminin endojen olarak bloke edilmesiyle, IFN- γ ile endüklenen makrofaj aktivasyonunun azaldığını; hem IFN- γ hem de TNF- α 'nın kombinasyonu ile optimum makrofaj aktivasyonunun sağlandığını ortaya koymuşlardır (96).

IFN- γ geni eksik farelerin, virülan MTB'a karşı çok duyarlı oldukları gösterilmiştir. Bu fareler BCG ile enfekte edildiklerinde, bakteriyel yükün çok arttığı ve granülomaların daha büyük ve düzensiz olduğu görülmüştür (96). IFN- γ ya da IFN- γ reseptör genlerinde eksiklik veya bozukluk olan insanlarda da ciddi mikobakteriyel enfeksiyonlara eğiliminin arttığı bildirilmiştir (116). Aktif TB'lu hastalarda yapılan çalışmalarda, IFN- γ düzeylerinin baskılandığı da saptanmıştır (53).

IFN- γ , spesifik T hücre immünesi tamamen gelişmeden önce ilk olarak NK hücreleri tarafından ya IL-12 ya da IL-18'e cevap olarak ya da direkt olarak mikobakteriyel oligonükleotidlerle etkileşim sonucu üretilebilmektedir. MTB ile enfekte farelerde akciğer makrofajlarının IFN- γ sentezledikleri bulunmuştur. Ayrıca $\gamma\delta$ T hücrelerinin ve CD1 sınırlı T hücrelerinin de enfeksiyonun erken döneminde IFN- γ üretebildikleri gösterilmiştir (6).

IL-12

IL-12, disülfid bağları ile bağlanan iki subünitten (p35 ve p40) oluşmuş 70 kDa'luk heterodimerik bir proteindir. NK, $\alpha\beta$ (CD4+ ve CD8+) ve $\gamma\delta$ T hücre reseptörü taşıyan T hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırır. IFN- γ üretimini artırarak Th1 tipi T hücre cevabının gelişimine katkıda bulunur. IL-4 ve IL-10'un etkin olduğu Th2 tipi cevabı aşağıya çeker (115)

IL-12, MTB'in fagositozundan sonra makrofaj, DC gibi fagositik hücreler tarafından üretilir. TB'da akciğer infiltratlarında, plöreziye, granülomalarda ve lenfadenitlerde tespit edilmiştir (6). IL-12 eksik farelerde mikobakteri enfeksiyonlarına

duyarlılığın artmış olması bu sitokinin koruyucu rolünü göstermektedir. IL-12p40 eksik farelerin enfeksiyona duyarlılıklarının ve bakteriyel yüklerinin arttığı; ayrıca muhtemelen azalmış IFN- γ 'ya bağlı olarak hayatta kalma sürelerinin azaldığı görülmüştür (117). IL-12p40 ya da IL-12R gen mutasyonları olan insanların, T hücrelerinden IFN- γ üretiminin azaldığı, dissemine BCG ve *M. avium* enfeksiyonlarına daha duyarlı oldukları rapor edilmiştir (118).

Çoklu ilaç direncine sahip TB hastalarıyla yapılan bir çalışmada, bu hastalardan elde edilen PBMC'ler stimüle edildiğinde sağlıklı kontrollere göre daha az IL-2 ve IFN- γ sekresyonu görülmüş, bu hücrelerin IL-12 ile stimüle edilmesiyle, IFN- γ sekresyonunun arttığı, anti-IL-12 antikoru ile stimülasyonun önlendiği ve IFN- γ yapımının azaldığı görülmüştür (119).

IL-18

IL-1 ailesinin bir üyesidir. Başlangıçta IL-12 ile sinerjisi olan IFN- γ uyarıcı faktör olarak bilinen bu sitokinin daha sonraları diğer proenflamatuvar sitokinleri, kemokinleri ve transkripsiyon faktörlerinin üretimini stimüle ettiği anlaşılmıştır (120). IL-18'in mikobakteriyel enfeksiyonlar sırasında koruyucu rolü vardır. IL-18 eksik olan fareler, BCG ve MTB enfeksiyonlarına çok duyarlıdır. *M. leprae* ile enfekte farelerde de direnç, IL-18 ekspresyonu ile orantılı bulunmuştur (6).

IL-18'in en önemli etkisi, IFN- γ endüksiyonunu sağlamasıdır. Vankayalapati ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, TB hastalarının ve sağlıklı kontrollere PBMC'leri MTB ile stimüle edilmiş, hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha az IL-18 ve IFN- γ saptanmış; MTB ile endüklenen IFN- γ üretimi, anti IL-18 ile inhibe edilmiş, rekombinant IL-18 ile artırılmıştır; MTB'e cevap olarak alveolar makrofajların salgıladığı IL-18 ve plevral sıvıya sekrete edilen IL-18 ve IFN- γ konsantrasyonları TB'lu hastalarda, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgular IL-18'in TB immüitesi ile IFN- γ üretiminde son derece önemli olduğunu ve mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı Tip1 sitokin cevabını sağladığını ortaya koymuştur (121).

IL-15

IL-15, biyolojik aktiviteleri açısından IL-2'ye benzer. NK ve NKT hücrelerinin gelişimini stimüle ettiği; periferik kan T hücrelerinin, tümöre infiltre olan lenfositlerin (TILs) ve B hücrelerinin aktivasyonu ile makrofaj ve DC'in matürasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca efektör sitolitik hücre gelişimini endüklediği; NK hücrelerini farklılaşmaya uğratarak bu hücrelerin daha etkin sitotoksik-sitolitik aktivite kazanmış olan

lenfokinle aktive öldürücü hücreler (LAK) formuna geçmesine yardımcı olduğu tespit edilmiştir (122).

IL-15'in T lenfositleri, NK hücreleri ve nötrofiller için kemoatraktan özellik gösterdiği; T lenfositlerinde CC, CXC, ve C-tipi kemokinlerin potent endüktörü olduğu anlaşılmıştır (123).

Umemura ve arkadaşları (124) BCG ile enfekte edilen IL-15 transgenik farelerde enfeksiyona direnç geliştiğini; serum IFN- γ düzeylerinin transgenik olmayan fareler ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunduğunu; NK hücrelerinin dikkat çekici biçimde arttığını; IFN- γ üreten CD8+T hücrelerinin aracılık ettiği antijen-spesifik T sitotoksik 1 (Tc1) cevabının arttığını göstermişlerdir. Böylece *in vivo* IL-15'in aşırı ekspresyonunun NK ve Tc1 cevabının artışına yol açarak BCG enfeksiyonuna karşı korunmayı güçlendirdiğini; bununla ilişkili olarak BCG aşısının biyolojik etkinliğini artırabilmek amacıyla IL-15'in BCG aşısı ile birlikte adjuvan olarak verilebileceğini ileri sürmüşlerdir (125).

Anti-enflamatuvar sitokinler

MTB'in başlattığı proenflamatuvar cevap, anti enflamatuvar mekanizmalarla antagonize edilir. Solübl sitokin reseptörleri (solübl TNF- α R I ve II), hücresele reseptörlere sitokinlerin bağlanmalarını engellerler ve böylece hücre içi sinyalizasyonu bloke ederler. Örneğin IL-1 β 'nın etkisi, spesifik antagonisti IL-1 Ra ile yok edilir. Ayrıca üç anti enflamatuvar sitokin, IL-4 IL-10 ve TGF- β , TB'a karşı etkin olan proenflamatuvar sitokinlerin etkilerini veya üretimini inhibe edebilir.

IL-10

Sitokin sentez inhibitör faktörü olarak isimlendirilen IL-10, CD4+ T hücreleri, monositler, CD8+ T hücreleri, keratinositler vb birçok hücre tarafından üretilir. Anti enflamatuvar sitokin olarak IL-10, kostimülatör moleküllerin aşağı çekilmesi suretiyle makrofaj fonksiyonlarının engellenmesine ve sitokin sentezinin inhibisyonuna neden olur (126).

TB'da IL-10, LAM'ın bağlanıp bakterinin fagosite edilmesinden sonra makrofajlar tarafından üretilir. MTB ile reaktif T hücreleri de IL-10 sentezleyebilirler. TB'lu hastalarda IL-10 mRNA'nın ekspresyonu, enflamasyon alanında (alveolar lavaj sıvısı, plevra sıvısı) dolaşan mononükleer hücrelerde gösterilmiştir. IL-10, proenflamatuvar sitokin cevabını IFN- γ , TNF- α ve IL-12'nin üretimini aşağı çekerek antagonize eder (6). CD4+ T hücre cevabını ya direkt olarak ya da mikobakteri ile enfekte hücrelerin APC fonksiyonunu bozarak inhibe edebilir (53). T hücreleri aşırı IL-10 eksprese eden

transgenik fareler BCG ile enfekte edildiklerinde, yeterli IFN- γ üretimi yapan kapsayan T hücre cevabına rağmen; bakteriyel yükün daha fazla, enfeksiyonu temizleme kapasitesinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar IL-10'un, IFN- γ aracılı makrofaj aktivasyonunu engelleyebileceğini göstermektedir (127). IL-10 eksik olan farelerde ise bakteriyel yükün daha düşük olduğu görülmüş; erken dönemdeki bu direncin, enflamatuvar mediyatör üretiminin artışı ve bununla ilişkili artmış makrofaj aktivasyonu ile olabileceği ileri sürülmüştür (128). Anergjik TB hastalarında, IL-10 üretiminin tedaviden önce ve başarılı tedaviden sonra çok yüksek bulunması, MTB'in endüklediği IL-10 sentezinin etkili immün cevabı süprese ettiğini desteklemektedir (129).

TGF- β

TGF- β , TB hastalarının granülomatoz lezyonlarında saptanabilen bir sitokindir. MTB ya da LAM ile stimülasyondan sonra monosit ve DC tarafından üretilir (53). IL-10 gibi TGF- β 'da enfeksiyon sırasında bol miktarda sentezlenir ve enflamasyon alanında eksprese edilir (130). TGF- β , hücrel immüniteyi süprese eder; T hücrelerinde IFN- γ üretimini ve T lenfositlerinin proliferasyonunu baskılar. Makrofajlarda antijen sunumunu, proenflamatuvar sitokin üretimini, hücrel aktivasyonu antagonize eder; ROI ve RNI'lerinin üretimini engeller; NK ve CTL fonksiyonlarını inhibe eder. IFN- γ 'nın yanı sıra TNF- α ve IL-1 salınımını aşağı çeker (6). TB sırasında kollajen matriks, makrofaj kollejenazın depolanması ve üretimine yardımcı olduğu gibi doku hasarında ve fibrozis oluşumunda da yer alabilir (131). Antienflamatuvar cevapta, TGF- β ve IL-10 sinerji göstermektedir. TGF- β , IL-10 üretimini selektif olarak endükler ve her iki sitokin, fagosite edilmiş mikroorganizmaların öldürülmesi ve monosit/makrofaj aktivasyonunu da kapsayan, IFN- γ 'nın aracılık ettiği pek çok olayı antagonize eder; ayrıca IL-2 ve IFN- γ üretimini ve farklılaşmasını inhibe eder. TGF- β ve IL-10'un uzun süre devam eden sekresyonları, nonself antijenlere spesifik uzun süren anerji durumunun endüksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (132). TB hastalarının plazmalarında (126) ve MTB ile stimüle edilmiş PBMC'lerinde TGF- β ve IL-10 düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiştir (133). MTB, direkt olarak APC'lerin IL-10 ve TGF- β üretimini endükleyebilir. MTB gelişimini sınırlayan enfekte monosit/makrofajların bu yeteneği, IL-10 ve TGF- β miktarları ile ters orantı oluşturmaktadır (132).

TB'da TGF- β düzeylerindeki artış, hastalığın şiddeti ile ilişkili bulunmuştur. İlerlemiş pulmoner TB hastalarının PBMC'leri, sonike edilmiş MTB antijenleri ile stimüle edildiğinde; TGF- β düzeylerinin, sağlıklı kontrollere ve orta düzeyde ilerlemiş hastalığı bulunanlara göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (134).

IL-4

IL-4, MTB'in latent hale geçişinde önemli rol oynayan iNOS'ı aşağı çekerek ve TLR-2 ile sinyalizasyonu kapatarak makrofajların aktivasyonunu engeller. Sağlık çalışanları ile yapılan bir çalışmada, MTB'e cevap olarak IL-4 üreten CD8+T hücrelerinin bulunduğu kişilerde 2-4 yıl içerisinde aktif hastalığın geliştiği görülmüş; IL-4'ün hastalığın erken evresindeki direnci yıkabileceği öne sürülmüştür. Aynı çalışmada periferik kan hücrelerinde, kantitatif RT-PCR ya da phorbol myristate acetate (PMA) ve kalsiyum iyonofor ile stimülasyondan sonra akım sitometri ile tespit edilen artmış IL-4 ekspresyonu, kaviter hastalıkla uyumlu bulunmuş; BAL örneklerinde akciğerleri infiltre eden lenfositlerin sitokin profiline bakıldığında; IL-4 sekrete eden hücre oranı, kaviter hastalığı olanlarda %14, kaviter hastalığı olmayanlarda %2-3 saptanmıştır. IL-4, farelerde Th1 cevabının baskın olduğu lezyonlar içinde de gösterilmiştir. Her iki durum, IL-4'ün immün patolojiye de katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (135).

MTB ile enfekte farelerde yapılan çalışmalarda ilerlemiş hastalık ve reaktivasyon ile IL-4'ün artmış düzeyleri arasında bir ilişki bulunmuştur. Benzer biçimde IL-4'ün aşırı üretimi, deneysel enfeksiyonlarda doku hasarını artırırken; sentezinin inhibisyonunu, hücrel immüniteyi güçlendirmemiştir. IL4-/- farelerde, mikobakterilere karşı duyarlılığın artmadığı; bir başka çalışmada ise hava yolu enfeksiyonundan sonra bakteri üremesinde ve granüloma büyüklüğünde artış gözlenmiştir. Bu bulgular TB'da IL-4'ün rolünün hala oldukça tartışılan konular arasında olduğunu göstermekte; IL-4'ün insan da TB nedeni olduğu ya da sadece hastalık aktivitesini yansıttığı konusunda kesin bir görüş birliği bulunmamaktadır (6).

Kemokinler

Kemokinler, enfeksiyon alanına enflamatuvar hücrelerin toplanmasından sorumlu kemotaktik sitokinlerdir. Bu güne kadar 40'dan fazla kemokin ve 16'dan fazla kemokin reseptörü tanımlanmıştır (6). Kemokinler hedef hücrelerdeki G-proteini ile eşleşmiş spesifik reseptörleri aracılığı ile bu proteinleri tetikleyerek sinyalizasyon kaskadını aktive ederler ve kemotaksisi başlatırlar. Kemokinler lökositler, makrofajlar, DC, endotel hücreleri gibi çeşitli hücrelerde eksprese edilirler (136). TB'daki kemokinlerin etkinliği üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda en çok dikkati çeken kemokin, IL-8 olmuştur.

IL-8

IL-8'in nötrofiller, T hücreleri ve monositlerin, enflamasyon alanına göçünü düzenlemede son derece etkin rolü vardır. TB hastalarının BAL sıvılarında, plevra

sıvılarında, plazmalarında ve MTB ile enfekte dokularında IL-8 ekspresyonunun artmış olduğu bulunmuştur (137). İlginç olarak, antitüberküloz tedaviyi takiben aylar içinde BAL sıvısında ve serumda düzeylerinin arttığı saptanmıştır (6). Anti-IL-8 antikorları ile yapılan *in vivo* çalışmalarda, mikobakteriyel granüloma oluşumunun engellendiği gösterilmiştir. Hücresel düzeyde, monosit / makrofajlar tarafından bakterinin MTB'un fagositozu, IL-8 sentezi için en önemli stimulustur. Bunun dışında, solunum epitel hücreleri gibi hücre tipleri de TB'da diğer IL-8 kaynaklarını oluştururlar (137).

MCP-1

TB'da en önemli ikinci kemokin olan, monosit kemoatraktan protein1 (MCP-1), monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenir ve bu hücreler üzerinde etkili olur. MTB, öncelikli olarak monositler tarafından MCP-1'in üretimini endükler. MCP-1'i eksik olan fare modellerinde, granüloma oluşumunun inhibe edildiği gösterilmiştir (138). MCP-1'e cevap vermede başarısız olan C-C kemokin reseptör 2 eksik olan farelerde de granüloma oluşumunun ve Th1 tipi sitokin üretiminin süprese edildiği ayrıca MTB ile enfeksiyondan sonra erken ölümün gerçekleştiği gözlenmiştir. MCP-1 konsantrasyonları, TB'lu hastaların BAL örnekleri ile serumlarında da artmış bulunmuştur (6).

RANTES

TB'da yer alan diğer bir kemokin, lenfosit, makrofaj, fibroblast, trombosit, düz kas, endotel ve epitel hücreleri tarafından üretilebilen ve CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5 gibi birçok kemokin reseptörüne bağlanabilen RANTES'dir. Yapılan insan çalışmalarında RANTES, BAL örneklerinde saptanmıştır (6). Fare modellerinde ise *M.bovis*'in endüklediği pulmoner granülomaların gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (139).

IL-8, MCP-1 ve RANTES'den başka kemokinlerin de TB'da hücre trafiğinde yer aldığı rapor edilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* fare çalışmalarında tespit edilen, MTB'in endüklediği diğer kemokinler; makrofaj enflamatuvar protein1- α (MIP-1 α), MIP-2, MCP-3, MCP-5, ve IP10'dur (53).

2.6. Tüberküloz ve Apoptoz

MTB ve antijenlerinin endüklediği apoptoz ile ilgili çalışmalarda makrofaj apoptozunun son derece önemli olduğu ortaya konmuştur. Apoptoz enfekte makrofajlarda meydana geldiğinde, canlı bakteri sayısı azaldığı için TB'a karşı korunmada makrofaj apoptozunun son derece kritik bir rolü vardır. Buna karşılık aktif MTB enfeksiyonu

sırasında MTB reaktif T hücrelerinde apoptoz gerçekleştiğinde, bu hücrelerin silinmesi ile uzun süre devam eden düşük T hücre cevabı ortaya çıkabilir (140).

Makrofaj apoptozu TB'a karşı başarılı bir immün cevap için gerekli olan granüloma içinde meydana gelmektedir. Granülomalar, merkezde makrofajlar ve onları çevreleyen lenfositlerden oluşan histolojik görünümlere sahiptir. Mikobakteri ile enfekte makrofajlar, IL-12, IL-18 ve IL-23 salarak Th1 tipi lenfosit aktivitesinin gelişimine yardımcı olurlar. Bu lenfositler de IFN- γ ve TNF- α sentezleyerek makrofajları aktive ederler. Bakterinin eradikasyonu ya da hastalığın ortaya çıkıp çıkmaması, makrofajın mikobakterisidal aktivitesi ile mikobakterinin virülans faktörleri arasındaki dengeye bağlıdır. Granüloma, ölmekte olan makrofajlar ile onların yerini alan yeni aktifleşen monositlerden meydana gelen dinamik bir oluşumdur. Lenfositler de makrofajlara benzer biçimde sürekli değişim gösterirler. Apoptotik makrofaj ve lenfositlerin her ikisi de granüloma içinde görülebilir. TB'da granülomaların merkezinde kazeifikasyon nekrozu bulunur. Bu bölgeyi sınırlayan alanda çok fazla sayıda apoptotik makrofajlar görülebilir (141).

Apoptoz, sitokrom c'nin mitokondriyal salınımını ve kaspaz 9'un aktivasyonunu kapsayan hücre içi sinyallerle ya da hücre yüzeyinde eksprese edilen ölüm reseptörlerinin stimülasyonu ve kaspaz 8'in aktivasyonunu sağlayan hücre dışı sinyallerle tetiklenen bir yol ile gerçekleşir. Granüloma içindeki makrofajlar, pro-apoptotik molekül Bax'ı eksprese ederler; anti-apoptotik molekül Bcl-2'yi eksprese etmezler. Bax, granüloma içinde meydana gelen hipoksi gibi stres faktörleri tarafından düzenlenen hücre içi sinyallerle tetiklenen apoptoz yolunu aktive eder. Ayrıca makrofajların çevresinde bulunan lenfositler üzerinde TNF- α ve Fas L ekspresyonunun artması, p55 TNFR ve Fas ölüm reseptörlerini uyarır (141).

TB'da makrofaj apoptozu ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Placido ve arkadaşları TB hastalarının BAL örneklerinde apoptotik alveolar makrofaj sayısının arttığını HIV ve TB ko-enfeksiyonu olan olgularda bu artışın daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (142). Bu bulgular Klinger ve arkadaşları (143) tarafından da doğrulanmış; ayrıca TB ile ilişkili apoptozun, apoptoz inhibitörü bcl-2'nin aşağı çekilmesi ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Keane ve arkadaşları (144) ise DNA fragmentasyonunun saptandığı TUNEL tekniği ile TB'lu hastaların akciğer dokularında bulunan granülomaların periferlerindeki hücrelerin %50'den fazlasında apoptoz oluştuğunu bildirmişlerdir.

Apoptoza giden makrofajlarda, hücre içi mikobakteriler öldürülür ancak nekroza giden makrofajlarda ölüm gerçekleşmez. Bu nedenle mikobakteriler, canlı bakteri sayısını azaltan makrofaj apoptozundan korunmak için farklı stratejiler geliştirirler. TNF- α 'nın nötralizasyonunu sağlayan solübl TNFR2 sekresyonunu; Mcl-1 gibi anti-apoptotik moleküllerin düzeylerini artırır. Bad gibi proapoptotik moleküllerin inaktivasyonunu sağlarlar.

Ayrıca mikobakteriyel bir antijen olan ManLAM ve onun reseptörü DC-SIGN ile DC'in aşağı çekilmesine; böylece spesifik immün cevap inhibe edilerek T lenfosit aktivasyonunda azalma ve bunun sonucunda da makrofaj apoptozunda azalma meydana getirebilirler (141).

Yapılan çalışmalar, TB'da T hücre apoptozunun da arttığını ortaya koymuştur. TB'lu hastaların PBMC'leri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, düşük T hücre cevabının, spontan ya da MTB'in endüklediği apoptoz ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir; bu apoptoz, MTB'in stimüle ettiği IFN- γ ve IL-2 üretiminin azalması ile de ilişkili bulunmuştur. MTB enfeksiyonlarında Th1 hücrelerinin CD95 aracılı deplesyonu, etkene karşı koruyucu immünitenin zayıflaması ve hastalığa duyarlılığın artışı ile sonuçlanmaktadır (53).

2.7. HIV-TB koenfeksiyonu

HIV/AIDS pandemisi, tüm dünyada morbidite ve mortalite artışı ile birlikte TB'un sıklığında artışın ortaya çıkmasına sebep olmuştur. TB, AIDS olgularında başlıca ölüm nedenlerinden (%30) biridir. AIDS hastalarında görülen bağışıklığın baskılanması, MTB'de ortaya çıkan direnç sorunu, antiretroviral-antitüberküloz ilaç etkileşimi, ilaç toksisitesi, artan ilaç sayısı nedeniyle tedaviye uyumun güçleşmesi ve mortalite HIV-TB koenfeksiyonu olan olgularda başlıca sorunlardır.

HIV ile enfekte kişilerde, latent enfeksiyonun reaktivasyonunda olduğu gibi önceden kazanılmış enfeksiyonların hızlı gelişim riski artmıştır. HIV pozitif TB olgularında HIV negatif TB hastalarına göre, ekstrapulmoner veya dissemine hastalığın daha yüksek oranda ortaya çıktığı; tüberkülin deri testinin daha sık yanlış negatif değerlendirildiği; akciğer grafilerinde atipik görüntüler saptandığı; kaviteli akciğer lezyonlarının daha seyrek görüldüğü; ilaca bağlı yan etkilerin daha yüksek oranda ortaya çıktığı; AIDS ile ilişkili belirtilerin varlığı ve ölüm oranının daha yüksek olduğu bilinmektedir.

HIV enfeksiyonu, TB immünesinde önemli rol oynayan CD4+ T hücrelerinin azalmasına; ayrıca CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde fonksiyonel bozukluklara neden olur. Benzer şekilde, TB da HIV enfeksiyonunun asemptomatik evreden AIDS'e ve ölüme doğru ilerleyişini hızlandırır. TB enfeksiyonuna cevap olarak granüloma içinde aktive olan makrofajlar tarafından salgılanan TNF- α , T hücrelerinde HIV replikasyonunun en önemli aktivatörüdür (53).

HIV, gp 120 antijeni ile CD4+ moleküllerine bağlanarak T hücrelerini enfekte eder. Böylece antijenin MHC sınıf-II yolu ile CD4+ T hücrelerine sunulması ve MTB'in solübl antijenlerine konak cevabı olumsuz etkilenir. HIV enfeksiyonları, Th1 cevabını aşağıya çeker. TB ve HIV'e koenfekte olan kişilerin PBMC'lerinde IFN- γ , IL-2 ve IL-4 süprese edilir fakat IL-10 düzeyleri, HIV ile enfekte hastalarda farklılık göstermez Süprese Th1 cevabı, bilindiği gibi hücre içi enfeksiyon duyarlılığına yol açmaktadır (145).

2.8. Tüberküloz İmmünojenetiği

TB'a duyarlılık multifaktöriyeldir. İnsan lökosit antijenleri (HLA); HLA dışındaki genler ve gen ürünleri, TB'a duyarlılık ile ilişkilendirilen genetik markerlerdir.

İnsan lökosit antijen (HLA) kompleksi

TB ile ilişkili ilk genetik çalışmalar, HLA üzerinde yapılan çalışmalardır. HLA-DR2 (subtipi DRB1*1501) ve DQ1 (DQB1*0503) antijenleri pulmoner TB ile ilişkili bulunmuştur (146).

Nramp-1 geni

Doğal direnç ile ilişkili makrofaj proteini (Nramp) sitozol gibi intrasellüler kompartmanlardan, NO'in oluştuğu yer olan fagolizozom gibi daha asidik çevrelere nitritin taşınmasında rol oynayan oldukça önemli bir moleküldür. Moleküler ağırlığı 60 kDa olan hidrofobik bir proteindir. İyon kanalları ve transportta rol alan diğer komponentlerle benzer yapısal özelliklere sahiptir (147). Nramp'taki defektler, mikobakterilere karşı duyarlılığı artırmaktadır. Mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı duyarlı olan çocuklarda Nramp-1 gen mutasyonlarının fazla olduğu gösterilmiştir (148). Pulmoner ve spinal TB'lu hastalar da yapılan bir çalışmada Nramp-1 geni ile pulmoner ve spinal TB'a duyarlılık arasında da ilişki bulunmuştur. Batı Afrika'da yapılan bir çalışmada, Nramp polimorfizmleri ile latent enfeksiyonlu hastalarda aktif TB gelişme riski arasında da kesin bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (53).

Vitamin D reseptör (VDR)

Epidemiyolojik çalışmalarda, vitamin D yetmezliği ile TB duyarlılığı arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Vitamin D'nin aktif formu 1,25 dihidroksivitamin D3 [1,25 (OH)2D3] immünmodülatör bir hormondur. Monositler içinde MTB üremesinin inhibisyonunda, lenfosit proliferasyonunun süpresyonunda, immünglobülin üretimi ve sitokin sentezinde rol oynar.

Vitamin D, vitamin D reseptör (VDR) aracılığı ile etkinlik gösterir. Bu reseptör, monositler, T ve B lenfositler üzerinde bulunur. VDR gen varyantları ile TB arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda, 1,25 (OH)2D3'ün artışı ile ilişkili olan VDR genotip "TT" kodon 352'nin sağlıklı kontrollerde anlamlı olarak artışı gözlenmiş ve vitamin D'nin TB'a karşı korumada rol oynadığı hipotezi güçlü bir şekilde desteklenmiştir (146).

Mannoz bağlayan lektin (MBL)

MBL, yapısal ve fonksiyonel olarak opsonin aktivitesine sahip olan C1q'ya benzemektedir. Sağlıklı kontrollerde, TB hastalarının serumlarından daha düşük miktarlarda MBL bulunmuştur. Güney Afrika popülasyonunda yapılan bir çalışmada, homozigot MBL-G54D alleli, erişkin kişilerde, pulmoner TB'a karşı (pulmoner TB'da %28, TB'lu hastalarda %13), pediatrik popülasyonda ise TB menenjitte karşı güçlü koruyucu etkinlik sağladığı gösterilmiştir. Gambia'da yapılan bir çalışmada ise MBL-G57D varyantı ile TB direnci arasında ilişki bulunmuştur (146).

Sitokin genlerindeki polimorfizm ile TB duyarlılığı arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla TNF- α , TNF- β , IL-1 β ve IL-1Ra, IFN γ R1, IFN γ R2, IL12p40 ve IL-12R β 1 gibi çeşitli sitokinlerle çok sayıda araştırma yapılmıştır. Sitokin gen polimorfizmi ve TB duyarlılığı ve gelişimi arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla hastalığın farklı klinik formlarda seyrettiği 81 TB olgusu ile sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunda sekans spesifik primerlerin kullanıldığı PCR ile (PCR-SSP) araştırdığımız çalışmamızda; IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β ve TNF- α 'da gen polimorfizmlerini araştırdığımız çalışmamızda; sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında hasta grubunda daha az IL-10 üreten genotiplerin azaldığı (%64'e karşılık %37, p:0,003). IL-10-1082 G allel frekansının, TB hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yaygın olduğu gösterilmiştir (%37,7'ye karşılık %23, p:0,014). Bu sonuçlar IL-10 genindeki polimorfizmlerin TB'a duyarlılığı etkileyebileceğini ve hastalığın gelişme riskini artırabileceğini düşündürmektedir (149).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı ile Bursa Türkan Akyol Göğüs Hastalıkları Hastanesi'ne başvuran; tümünde plevral effüzyon saptanmış; daha önce tedavi uygulanmamış TB plörezili 35 hasta (hasta grubu) ve kanser, pnömoni, konjestif kalp yetmezliği tanısı konulan 53 kişiden (kontrol grubu) oluşan toplam 88 olgu alındı. Tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verildi ve onayı alınan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Olguların tümüne torasentez uygulanarak alınan plevra sıvısı örneklerinde; dansite, glikoz, total protein, albümin, laktik dehidrogenaz ve kolesterol ölçümleri yapıldı; hücre sayısı belirlendi. Hücre tipi için Giemsa; nonspesifik etkenler için Gram; direkt ve teksif ile aside dirençli bakteri (ARB) araştırmak için Erlich-Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyalı preparatlar hazırlandı. Ayrıca MTB ve diğer etkenlerin kültürü için uygun besiyerlerine ekimler yapıldı. Biyokimyasal tetkikler sonrası eksüda özelliğinde olduğu anlaşılan plevra sıvısı örneklerinde, sitolojik inceleme yapıldı ve bu olgulardan histopatolojik inceleme için pariyetal plevradan iğne biyopsisi ile örnekler alındı.

TB plörezili hastaların tanısında plevra biyopsi ve plevra sıvısı örneklerinde ARB saptanması ve/veya kültürde MTB üremesi; malign efüzyonların tanısında plevra sıvısının sitolojik inceleme ve/veya pariyetal plevra biyopsi materyalinin histopatolojik analiz sonuçları; transüdatif plevral efüzyonların tanısında ise Light kriterleri dikkate alındı.

Plevra sıvısı örnekleri, bekletilmeden İmmünoloji laboratuvarı'nda işleme alındı; 1650 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi; süpernatant ayrılarak ekstrasellüler sitokin, sFas ve sFasL ölçümleri yapılmaya kadar -80°C'de saklandı.

Sedimentte kalan hücreler, %10 FCS içeren zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyeri (cRPMI-1640) [Ek:1] ile süspansiyon haline getirildi; hücre süspansiyonunun bir kısmı akım sitometri ile lenfosit alt grupları değerlendirildi; kalanı ise T hücre kültürleri için işleme alındı.

3.1. Lenfosit Alt Gruplarının Değerlendirilmesi

Çalışmada her örnek için 11 adet akım sitometri tüpü (70x15 mm) kullanıldı. Tüplere plevra sıvısı süspansiyonlarından 100 µl (10⁵ hücre) aktarıldı. İnsan mononükleer hücre yüzey markerlerine karşı farelerden elde edilmiş fluorescein isothiocyanate (FITC)

veya phycoerythrin (PE) ile işaretli monoklonal antikörlerden (IgG1-FITC/IgG1-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD4-FITC/CD25-PE, CD4-FITC/CD69-PE, CD8-FITC/CD25-PE, CD8-FITC/CD69-PE, TCR $\gamma\delta$ -FITC/CD25-PE, TCR $\gamma\delta$ -FITC/CD69-PE, CD3-FITC/CD16+56+PE, CD95-FITC/CD19-PE) 10'ar μ l ilave edildi. Tüpler oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildikten sonra eritrositleri lize eden, lökositleri ve membranlarını stabilize eden reaktifleri [ImmunoPrep™, Beckman/Coulter, Amerika Birleşik Devletleri(ABD)] içeren, Multi-Q Prep sisteminden (Beckman/Coulter, ABD) geçirildi. Lenfosit alt grupları akım sitometrede (Epics XL.MCL, Beckman/Coulter, ABD) değerlendirildi (Şekil-2).

3.2. Mononükleer Hücre Kültürleri

Plevra hücre süspansiyonlarından ficoll (Biochrom, Berlin, Almanya) ile dansite gradient santrifüj yöntemi kullanılarak mononükleer hücreler elde edildi. Hücreler 3 kez yıkandı ve cRPMI-1640 ile sulandırılarak hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı 5×10^5 hücre/500 μ l olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonlarından; 48 kuyulu mikroyuvalara, her örnek için 5 kuyu kullanılmak üzere 500'er μ l dağıtıldı.

Hücreleri stimüle etmek için kuyulara sırasıyla PHA (2 μ g/ml, SIGMA, L-9017), PPD (5 μ g/ml, Statens serum Institut, Tuberculin department, Copenhagen, Denmark), ESAT-6 (5 μ g/ml, Dr. Adam Whcian (Veterinary Laboratory agency, Lusse, England) ve CFP-10 (5 μ g/ml, Dr. Adam Whcian (Veterinary Laboratory agency, Lusse, England) eklendi ve hücreler %5 CO₂'li etüvde 37°C'de enkübe edildi.

Herhangi bir stimüle edici ajan ilave edilmeyen 5. kuyudaki hücreler ise kontrol amacıyla kullanıldı. Ekstrasellüler sitokinlerin değerlendirilmesi için kültür süpernatantları, PHA ile stimüle edilen hücrelerde 2. günün sonunda; PPD, ESAT-6 ve CFP-10 ile stimüle edilen hücrelerde ise 5. günün sonunda toplandı ve değerlendirme yapılmaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Kalan hücreler taze cRPMI-1640 ile toplam hacmi ~ 500 μ l olacak şekilde yeniden süspanse edildi. İntrasellüler sitokinlerin değerlendirilmesi için PMA (2,5 μ g/ml) ve ionomisin (20 μ g/ml) ilave edilerek hücreler tekrar stimüle edildi; %5 CO₂'li etüvde 37°C'de enkübe edilen hücrelere 4. saatin sonunda Brefeldin A (20 μ g/ml) eklendi. Hücreler 6. saatin sonunda toplanarak, hücre içi sitokin ölçümü için hazırlandı.

3.3. İntrasellüler Sitokin Ölçümleri

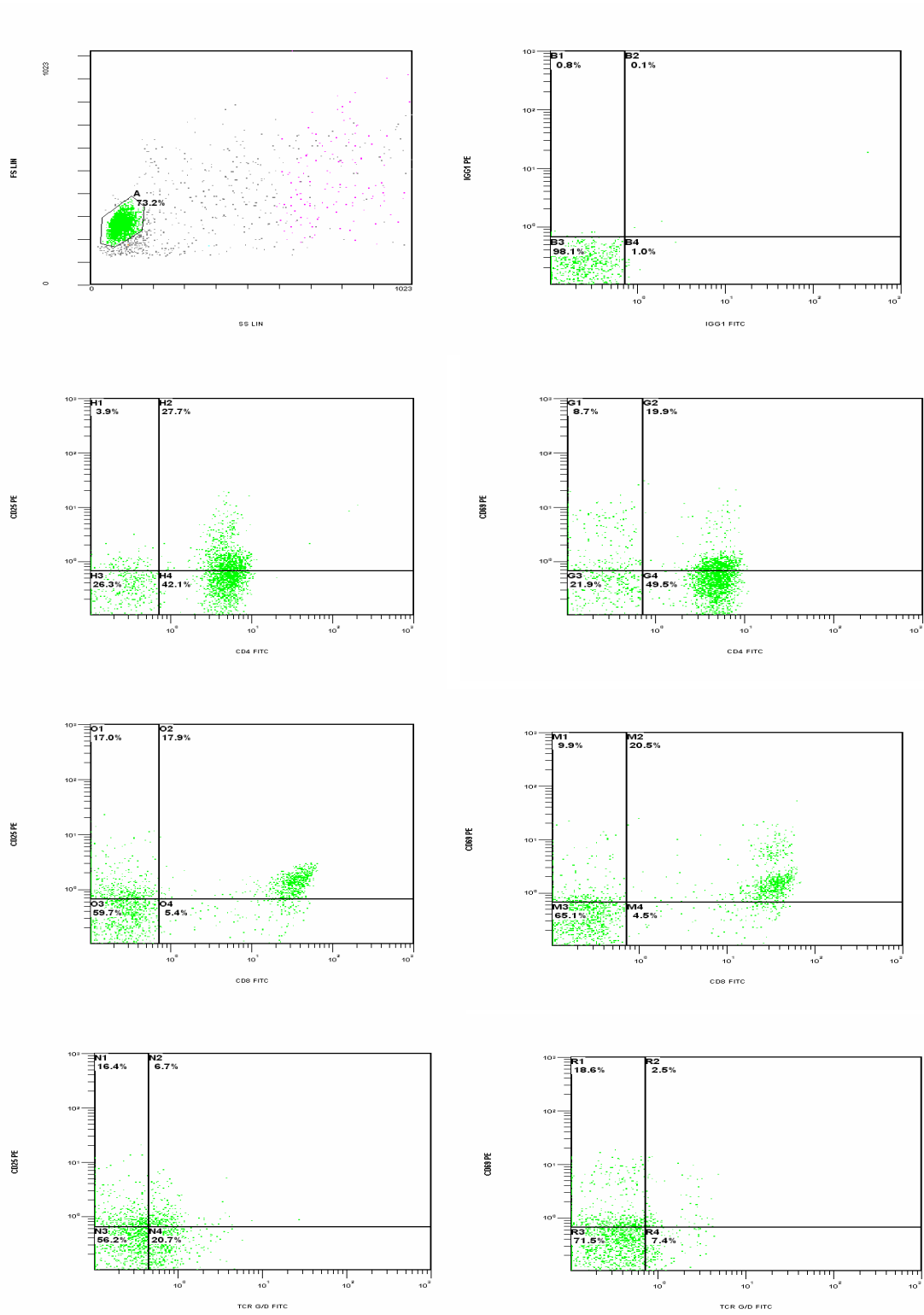
CD3+ T hücrelerinin hücre içinde sentezlediği IFN- γ , IL-4, IL-10 ve IL-13'ün değerlendirilmesi amacıyla PHA, PPD, ESAT-6, CFP-10 ile stimüle edilmiş ve stimüle edilmemiş (us; kontrol) hücreler için 5'er akım sitometri tüpü kullanıldı. Tüplere hücre süspansiyonlarından 100'er μ l (10^5) aktarıldı. Membran yüzeyindeki boyamaları saptamak için izotip kontrol tüpüne 10 μ l FITC ile konjuge monoklonal antikör (anti-IgG1 FITC); diğer tüplere ise 10'ar μ l FITC ile konjuge monoklonal CD3 antikoru (anti-CD3 FITC) ilave edildi. Oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika enkübe edilen tüplere 100 μ l %5,5 formaldehit içeren fiksasyon reaktifinden (Reaktif 1, Intra Prep™ Immunotech/Coulter, Fransa) eklendi ve tekrar 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta enkübasyondan sonra 4ml PBS ilave edilerek 5 dakika 300xg'de santrifüje edildi. Süpernatant atıldıktan sonra üzerine 100 μ l PBS ile tamponlanmış saponin bazlı permeabilizasyon reaktifi [Reaktif 2, Intra Prep™ (Immunotech/Coulter), Fransa] eklenen tüpler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İntrasellüler sitokinleri saptamak için ilk tüpe (izotip kontrolü) 10 μ l PE ile konjuge monoklonal sitokin antikörleri (anti-IFN- γ PE, anti-IL-4 PE, anti-IL-10 PE ve anti-IL-13 PE) 10'ar μ l ilave edildi. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta enkübe edildikten sonra üzerlerine ~ 3 ml PBS ilave edilerek 5 dakika 300xg'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan hücreler, %5 formaldehit içeren PBS ile tekrar süspansiyon edildi ve akım sitometri ile değerlendirildi (Şekil-3).

3.4. Ekstrasellüler Sitokin Ölçümleri

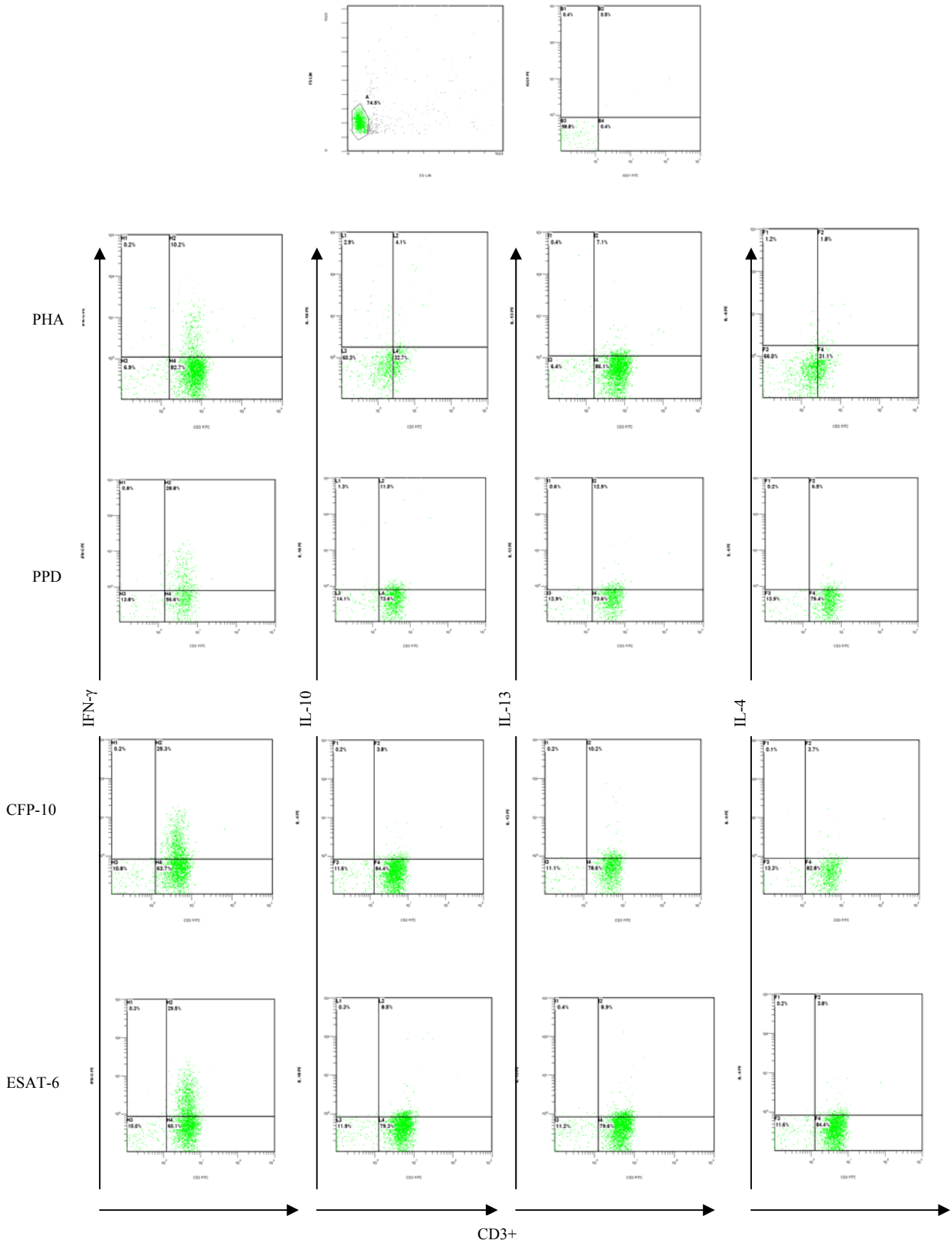
Plevra sıvısı ve hücre kültür süpernatantlarındaki sitokinler (IFN- γ , IL-12, IL-18, IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10, IL-13,) ile sFas (CD95), sFasL düzeyleri, ticari kantitatif sandwich enzyme immunosorbent assay (ELISA) kitleri (BML systems, DIACLONE, Fransa) kullanılarak; üretici firma tarafından önerilen protokole göre ölçüldü. Bu kitlerle saptanabilir en düşük düzeyler IFN- γ için 1,5 pg/ml, IL-12 için 20 pg/ml, IL-18 için 45 pg/ml, IL-8 için 25 pg/ml, TNF- α için 10 pg/ml, IL-4 için 1,32 pg/ml, IL-10 için 0,99 pg/ml, IL-13 için 0,73 pg/ml, sFas (CD95) için 47 pg/ml, sFasL için 12 pg/ml olarak belirtilmekte idi. Standart eğrilerin çizilmesi ve kantitatif değerlerin saptanmasında MS Eksel programı kullanıldı.

3.5. İstatiksel Değerlendirme

Elde edilen veriler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda istatiksel olarak değerlendirildi. Ortalama ve standart hatayı kapsayan tanımlayıcı istatistikler yapıldı. Mononükleer hücre kültürlerinden yapılan intrasellüler ve ekstrasellüler sitokin değerlendirmeleri ile plevral sıvı ekstrasellüler sitokin ölçümlerinde, grup değişkenleri arasında non parametrik bir test olan Mann-Witney-U testi kullanıldı. Plevral sıvı mononükleer hücre alt gruplarının değerlendirilmesinde, CD3 ve TCR $\alpha\beta$ için bağımsız örnek T testi; diğer alt gruplar için ise Mann-Witney-U testinden yararlandı.



Şekil-2:Plevra sıvısı mononükleer hücre alt gruplarının akım sitometri ile yapılan değerlendirmelerinden örnekler



Şekil-3:PHA, PPD, CFP-10, ESAT-6 ile stimüle edilmiş plevra sıvısı CD3+ T hücrelerinde akım sitometri ile saptanan intrasellüler IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-4 sonuçlarından örnekler

4. BULGULAR

Çalışmanın ilk basamağı olan plevra sıvısı mononükleer hücre kültürleri için hasta ve kontrol gruplarına ait 10'ar olgu alındı. TB plörezili (hasta grubu) olguların 2'si kadın 8'i erkek olup yaş ortalaması $51,4 \pm 22$; kontrol grubunda bulunan olguların ise 3'ü kadın 7'si erkek olup yaş ortalaması $60 \pm 8,4$ idi. Hücre kültürleri yapılan kontrol grubu olgularının 4'ü adenokarsinom (AK), 2'si küçük hücreli bronş kanseri (KHBCa), 4'ü ise yassı epitel hücreli karsinom (YEHK) tanısı almıştı (Tablo-3).

Tablo-3: Mononükleer hücre kültürleri yapılan olguların demografik özellikleri

HASTA GRUBU					KONTROL GRUBU				
Sıra No	İsim	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Sıra No	İsim	Yaş	Cinsiyet	Tanı
1	M.A.	50	E	plörezi	1	Ü.E.	57	E	KHBCa
2	O.T.D.	78	E	"	2	T.A.	45	E	AK
3	S.A.	55	E	"	3	F.B.	59	K	YEHK
4	Z.K.	31	E	"	4	N.Y.	64	E	"
5	Y.C.	49	E	"	5	A.Ç.	55	E	"
6	G.T.	25	K	"	6	V.S.	72	K	"
7	A.P.Y.	80	E	"	7	S.K.	56	E	AK
8	E.A.	55	E	"	8	M.C.	55	E	KHBCa
9	B.Y.	17	K	"	9	B.Y.	66	K	AK
10	A.Y.	74	E	"	10	N.K.	72	E	"

Ekstrasellüler sitokin değerlendirmeleri

Ekstrasellüler IFN- γ , IL-10, IL-13 ve IL-4 düzeyleri, plevra sıvısı mononükleer hücrelerinin PHA, PPD, CFP-10, ESAT-6 ile stimüle edilmiş ve US kültür süpernatantlarında ölçüldü.

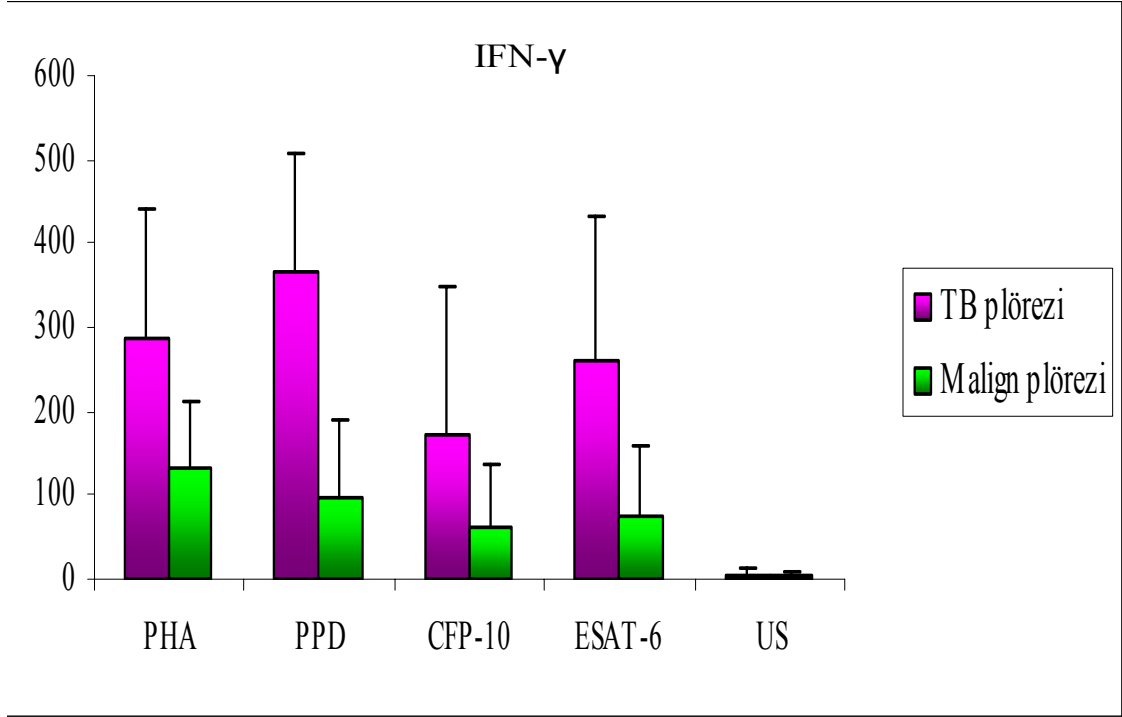
TB plörezi hastalarda IFN- γ düzeyleri, PHA ile stimüle edilen kültürlerde $285 \pm 154,8$ pg/ml; PPD ile stimüle edilenlerde $364,4 \pm 141,3$ pg/ml; CFP-10 ile stimülasyon sonucu $173,8 \pm 173,5$ pg/ml; ESAT-6 ile stimülasyon sonucu $262,5 \pm 167,9$ pg/ml ve US kültürlerde $6,3 \pm 7,4$ pg/ml bulundu. Stimülasyon amacıyla kullanılan tüm peptidlerin, US hücreler ile karşılaştırıldığında ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinde belirgin artışa neden olduğu saptandı (Tablo-4, Şekil-4,5).

Kontrol grubunu oluşturan malign plörezi olgularında da IFN- γ düzeyleri, PHA ile stimüle edilenlerde $134 \pm 78,8$ pg/ml; PPD ile stimüle edilen kültürlerde $98,3 \pm 91,3$ pg/ml; CFP-10 ile stimülasyon sonucu $63,4 \pm 74,4$ pg/ml; ESAT-6 ile stimülasyon sonucu $75,6 \pm 83,6$ pg/ml ve US kültürlerde $4,9 \pm 5,9$ pg/ml bulundu. Hasta grubundaki gibi belirgin olmamakla birlikte; kontrol grubunda da US hücrelere göre PPD, CFP-10, ESAT-6 ve PHA ile stimüle edilenlerin ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinde artış olduğu görüldü (Tablo-4, Şekil-4,5).

Tablo-4:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri (pg/ml)

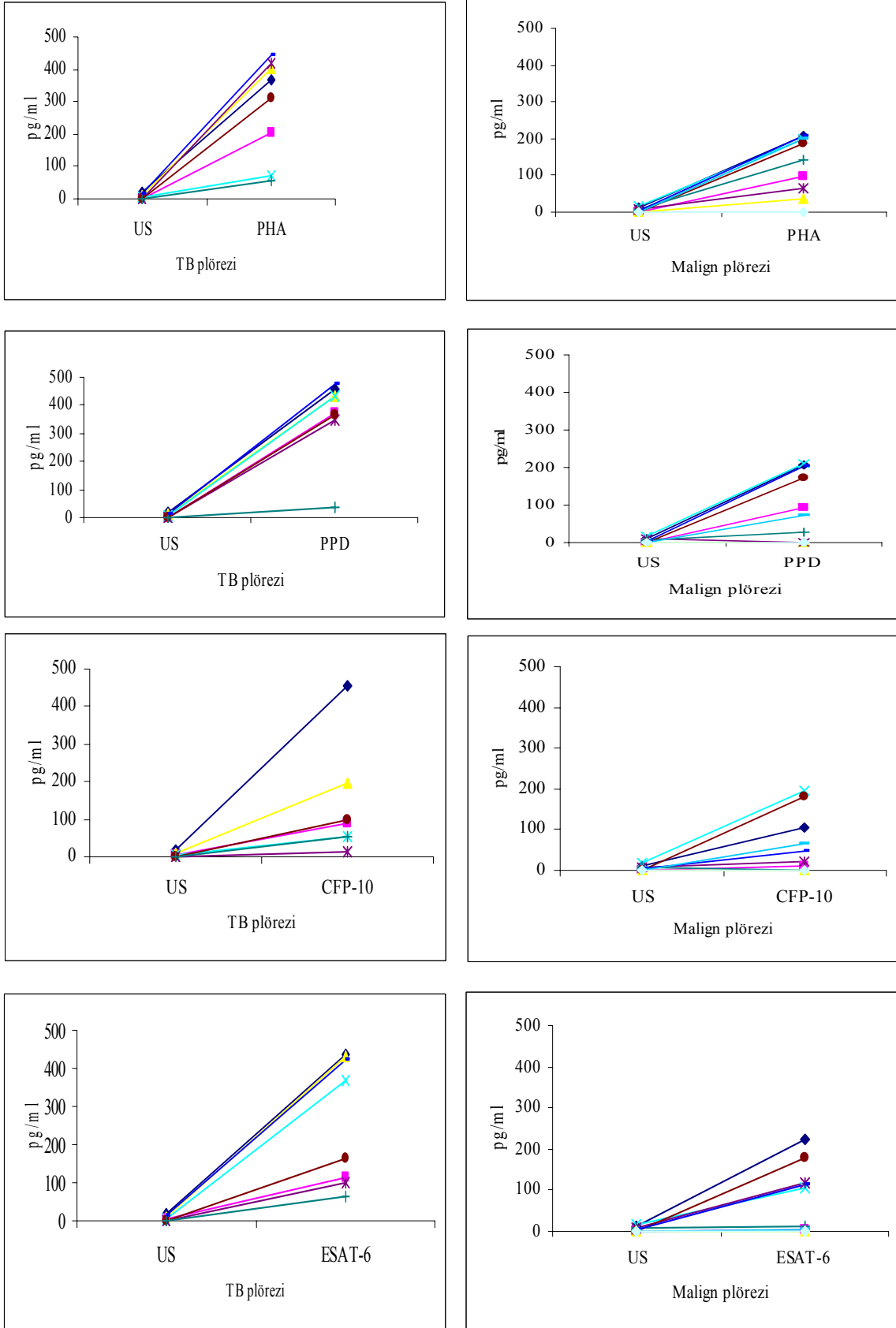
	TB plörezi	Malign plörezi
PHA	$285 \pm 154,8^*$	$134 \pm 78,8$
PPD	$364,4 \pm 141,3^{**}$	$98,3 \pm 91,3$
CFP-10	$173,8 \pm 173,5$	$63,4 \pm 74,4$
ESAT-6	$262,5 \pm 167,9^*$	$75,6 \pm 83,6$
US	$6,3 \pm 7,4$	$4,9 \pm 5,9$

*p<0.05 ** p<0.001

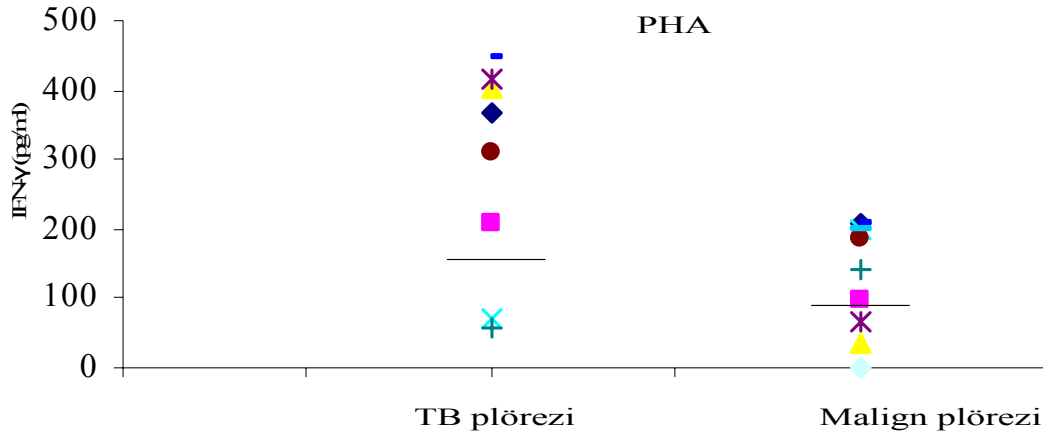


Şekil-4:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri (pg/ml)

Şekil-5:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinin karşılaştırılması

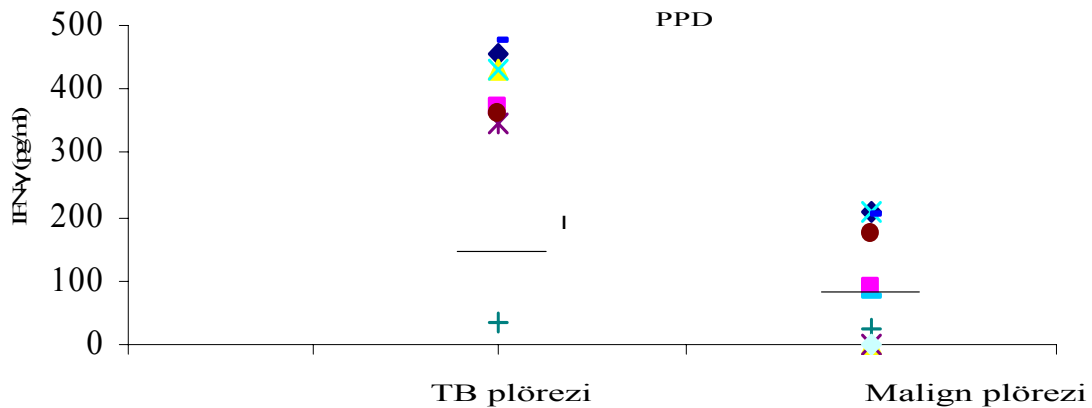


PHA ile stimüle edilen hücrelerin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında; TB plörezi hastalarında IFN- γ düzeylerinin, malign plörezi (kontrol) grubuna göre yaklaşık iki kat arttığı (Tablo-4, Şekil-6); bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu gösterildi ($p<0,05$).



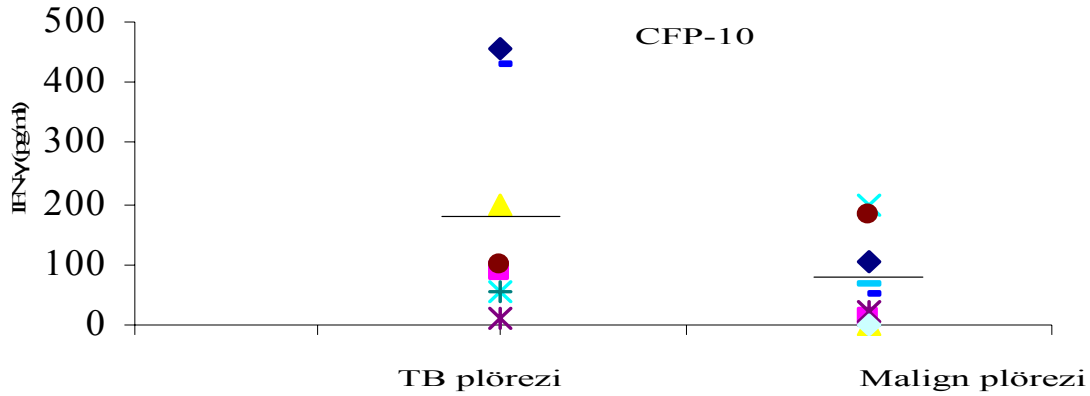
Şekil-6:TB plörezi ve malign plörezi olgularında PHA ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,05$)

PPD ile stimüle edilen plevra hücrelerinin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunda IFN- γ düzeylerinin, kontrol grubuna göre yaklaşık 3,7 kat arttığı (Tablo-4, Şekil-7); bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,001$).



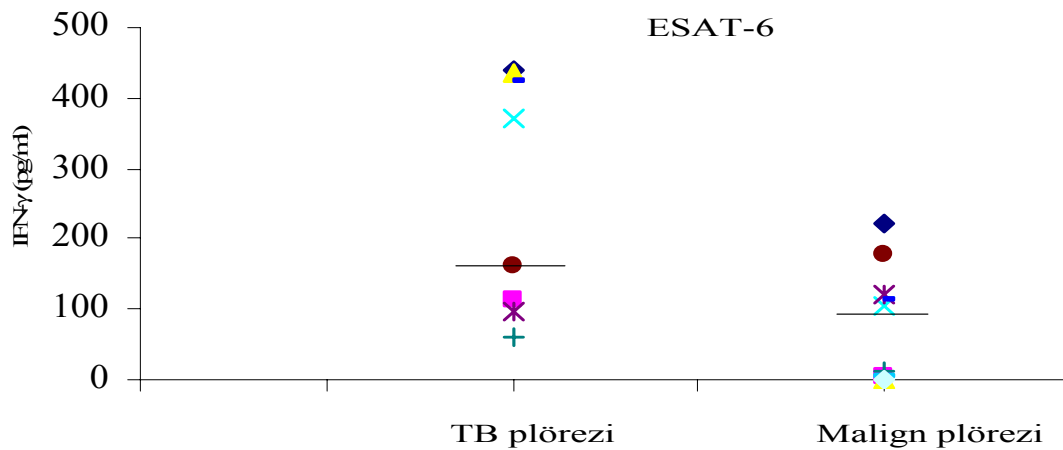
Şekil-7:TB plörezi ve malign plörezi olgularında PPD ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,001$)

CFP-10 ile stimüle edilen mononükleer hücrelerin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında; TB plörezi hastalarında IFN- γ düzeylerinin, malign plörezi olgularına göre yaklaşık 2,7 kat artmış olmasına rağmen (Tablo-4, Şekil-8); bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterildi.



Şekil-8:TB plörezi ve malign plörezi olgularında CFP-10 ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinin karşılaştırılması

ESAT-6 ile stimüle edilen plevra hücrelerinin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunda IFN- γ düzeylerinin, kontrol grubuna göre yaklaşık 3,5 kat arttığı (Tablo-4, Şekil-9); bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$).



Şekil-9:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ESAT-6 ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,05$)

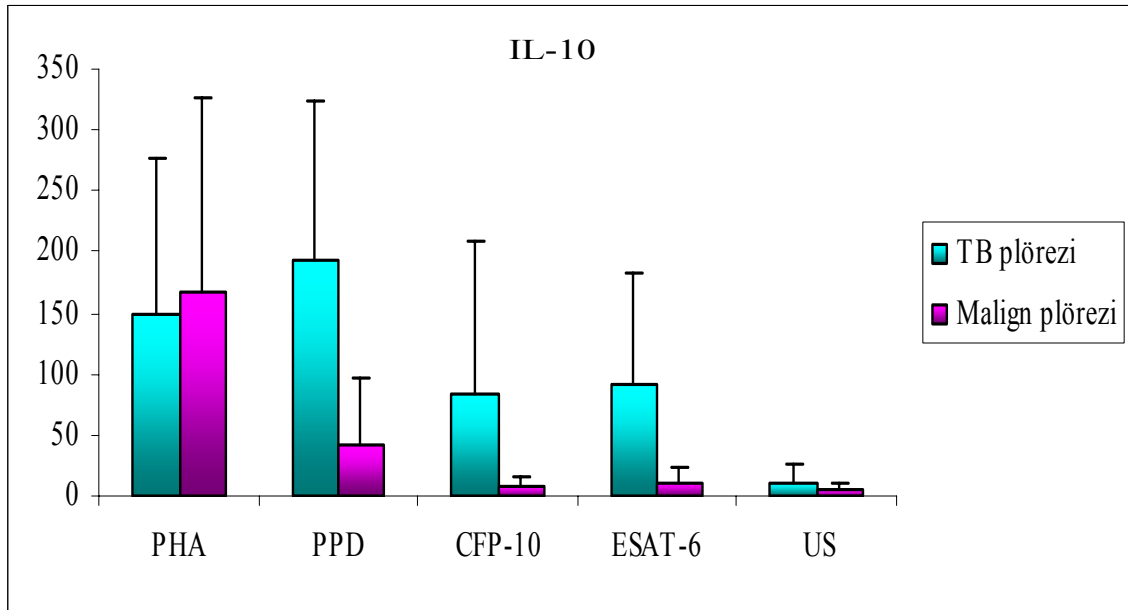
TB plörezi hastalarında plevra hücrelerinin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeyleri, PHA ile stimüle edilenlerde $150 \pm 127,7$ pg/ml; PPD ile stimülasyon sonucu $192,7 \pm 130,4$ pg/ml; CFP-10 ile stimüle edilenlerde $83,8 \pm 124,4$ pg/ml; ESAT-6 ile stimülasyon sonucu $90,3 \pm 92,7$ pg/ml; US kültürlerde ise $11,7 \pm 15,1$ pg/ml bulundu (Tablo-5, Şekil-10).

Kontrol grubunu oluşturan malign plörezi olgularında IL-10 düzeyleri, PHA ile stimüle edilenlerde $168 \pm 158,9$ pg/ml; PPD ile stimüle edilen kültürlerde $42,7 \pm 54$ pg/ml; CFP-10 ile stimülasyon sonucu $7,5 \pm 8,7$ pg/ml; ESAT-6 ile stimülasyonda $10 \pm 13,5$ pg/ml ve US kültürlerde $4,1 \pm 5,2$ pg/ml bulundu (Tablo-5, Şekil-10).

Tablo-5:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IL-10 düzeyleri (pg/ml)

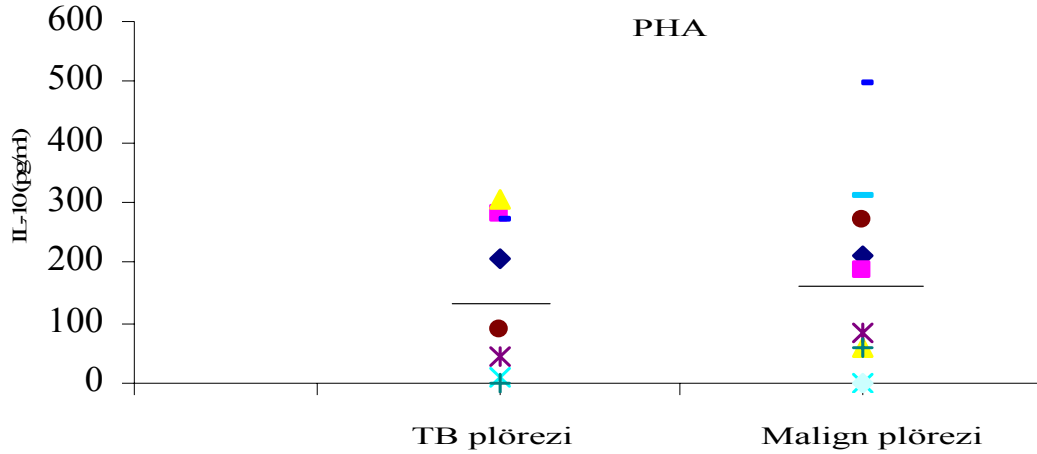
	TB plörezi	Malign plörezi
PHA	$150 \pm 127,7$	$168 \pm 158,9$
PPD	$192,7 \pm 130,4^*$	$42,7 \pm 54$
CFP-10	$83,8 \pm 124,4$	$7,5 \pm 8,7$
ESAT-6	$90,3 \pm 92,7^*$	$10 \pm 13,5$
US	$11,7 \pm 15,1$	$4,1 \pm 5,2$

* $p < 0,05$



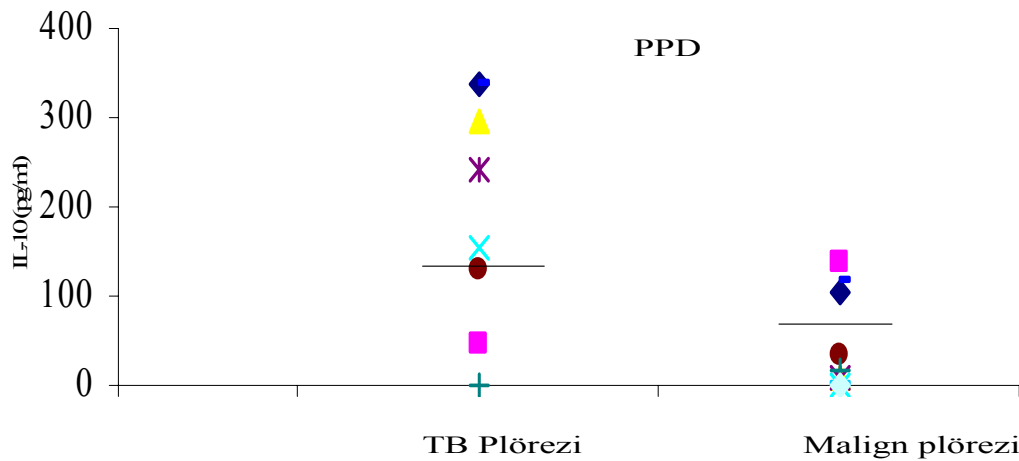
Şekil-10: TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IL-10 düzeyleri (pg/ml)

PHA ile stimüle edilen hücrelerin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığında; TB plörezi hastalarının IL-10 düzeyleri, malign plörezi (kontrol) grubuna göre azalmış bulundu. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo5, Şekil-11).



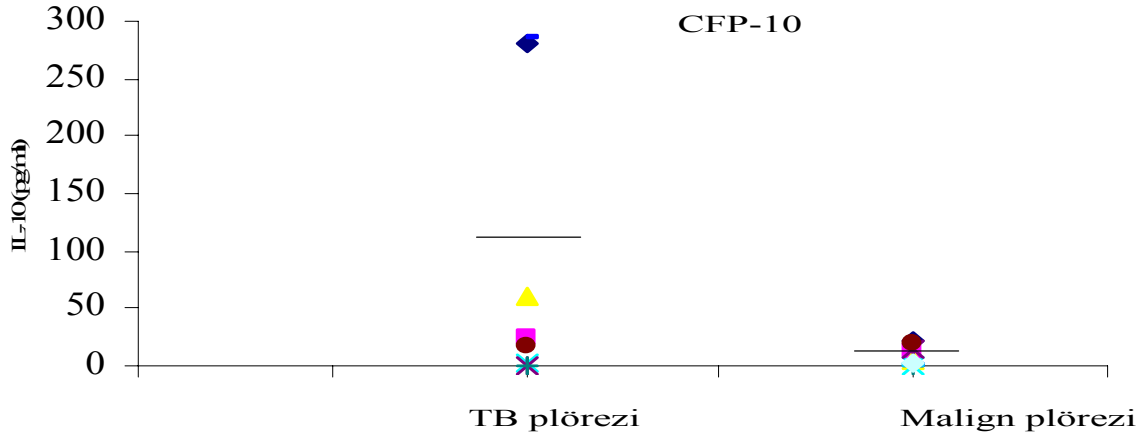
Şekil-11: TB plörezi ve malign plörezi olgularında PHA ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması

PPD ile stimüle edilen plevra hücrelerinin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunda IL-10 düzeylerinin kontrol grubuna göre yaklaşık 4,5 kat arttığı (Tablo-5, Şekil-12); bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu saptandı ($p<0,05$).



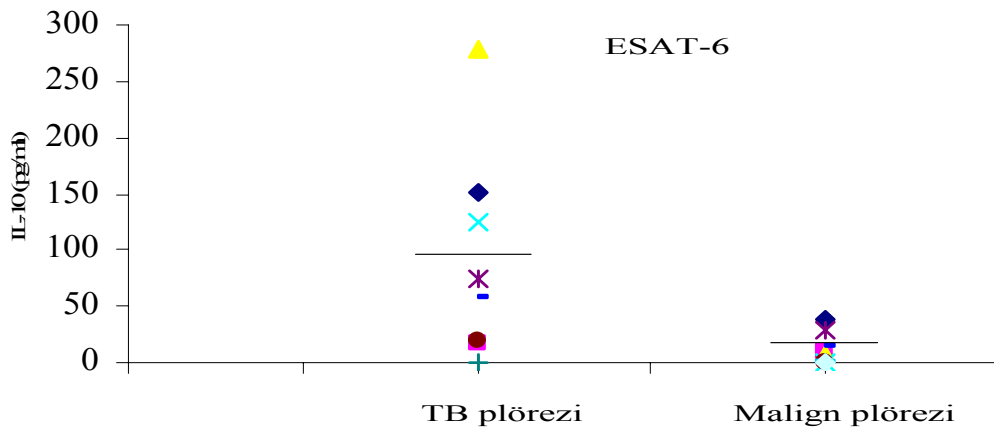
Şekil-12: TB plörezi ve malign plörezi olgularında PPD ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,05$).

CFP-10 ile stimüle edilen mononükleer hücrelerin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığında; TB plörezi hastalarında IL-10 düzeylerinin, malign plörezi olgularına göre belirgin biçimde artmış olmasına rağmen (Tablo-5, Şekil-13); bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterildi.



Şekil-13: TB plörezi ve malign plörezi olgularında CFP-10 ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması

ESAT-6 ile stimüle edilen plevra hücrelerinin kültür süpernatantlarında saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığında; hasta grubunda IL-10 düzeylerinin, kontrol grubuna göre yaklaşık 9 kat arttığı (Tablo-5, Şekil-14); bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$).

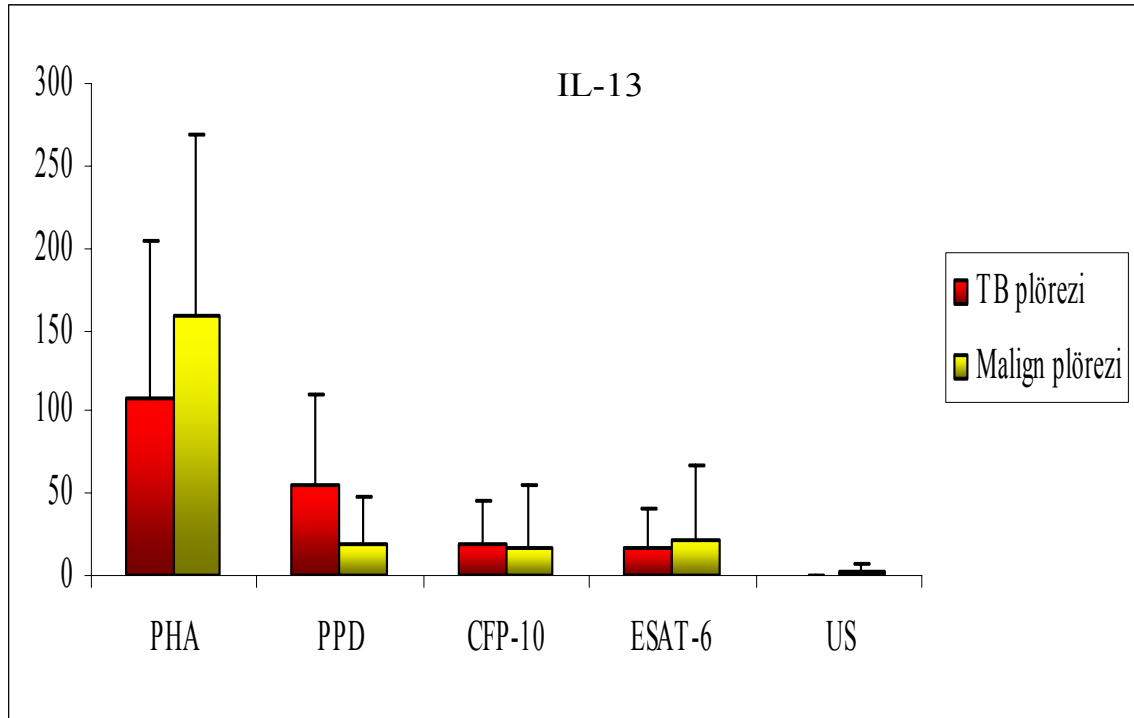


Şekil-14: TB plörezi ve malign plörezi olgularında ESAT-6 ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,05$).

TB plörezi ve malign plörezi olgularında hücre kültür süpernatanlarındaki ekstrasellüler IL-13 düzeyleri karşılaştırıldığında; TB plörezi grubunun PPD ve CFP-10 ile stimüle edilen hücre kültür süpernatanlarındaki ekstrasellüler IL-13 düzeyleri, malign plörezi grubuna göre artmışken; PHA ve ESAT-6 ile stimüle edilenlerde, malign plörezi grubuna göre azalmış değerler bulundu (Tablo-6, Şekil-15). Gruplar arasındaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo-6:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IL-13 düzeyleri (pg/ml)

	TB plörezi	Malign plörezi
PHA	109 ± 94,1	159 ± 111
PPD	55,8 ± 54,2	19,1 ± 27,8
CFP-10	18,7 ± 27,4	16,6 ± 38,7
ESAT-6	16 ± 24	21,9 ± 46
US	0	2,6 ± 3,8

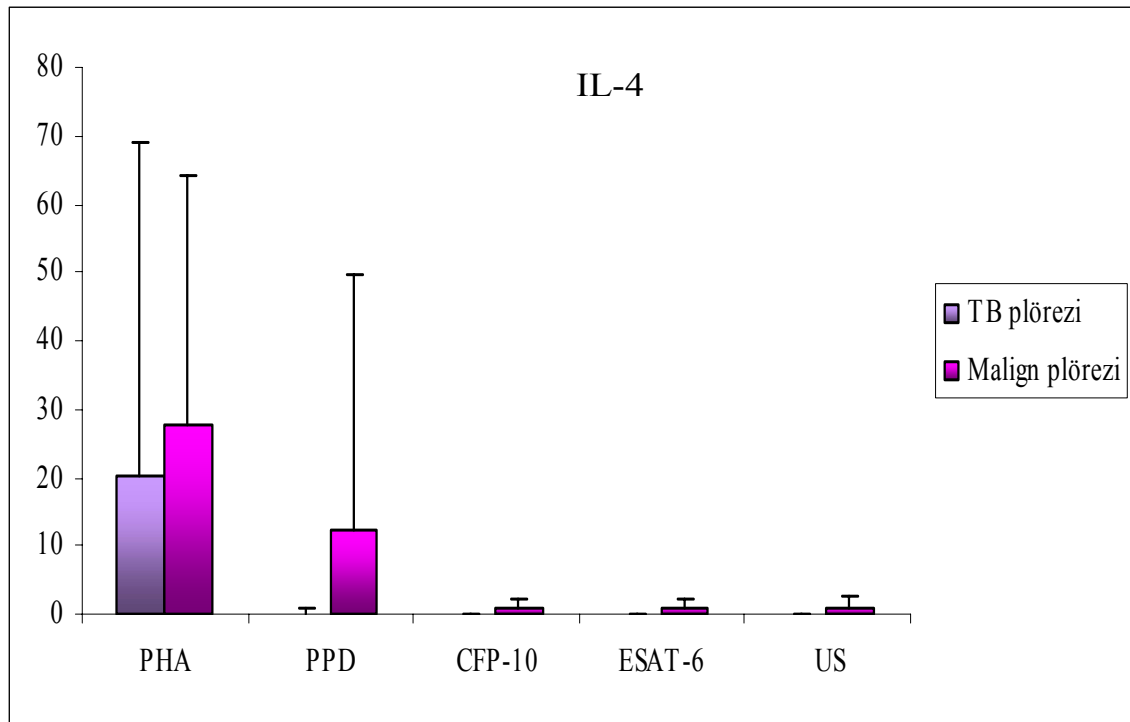


Şekil-15:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IL-13 düzeyleri (pg/ml)

TB plörezi ve malign plörezi olgularında PHA, PPD, CFP-10 ve ESAT-6 ile stimülasyon sonucu saptanan ekstrasellüler IL-4 düzeyleri oldukça düşük bulundu. Özellikle CFP-10 ve ESAT-6 ile elde edilen sonuçların çoğu ölçülebilir düzeylerin altında idi. TB plörezi grubunda PHA ve PPD ile stimülasyon sonucu saptanan IL-4 düzeyi, malign plörezi grubuna göre azalmış olmakla beraber; bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo-7, Şekil-16).

Tablo-7:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IL-4 değerleri (pg/ml)

	TB plörezi	Malign plörezi
PHA	20,1± 48,8	27,8 ± 36,3
PPD	0,2 ± 0,5	12,5 ± 37
CFP-10	0	0,8 ± 1,2
ESAT-6 (pg/ml)	0	0,8 ± 1,3
US (pg/ml)	0	0,8 ± 1,8



Şekil-16:TB plörezi ve malign plörezi olgularında ekstrasellüler IL-4 düzeyleri (pg/ml)

İntrasellüler sitokin değerlendirmeleri

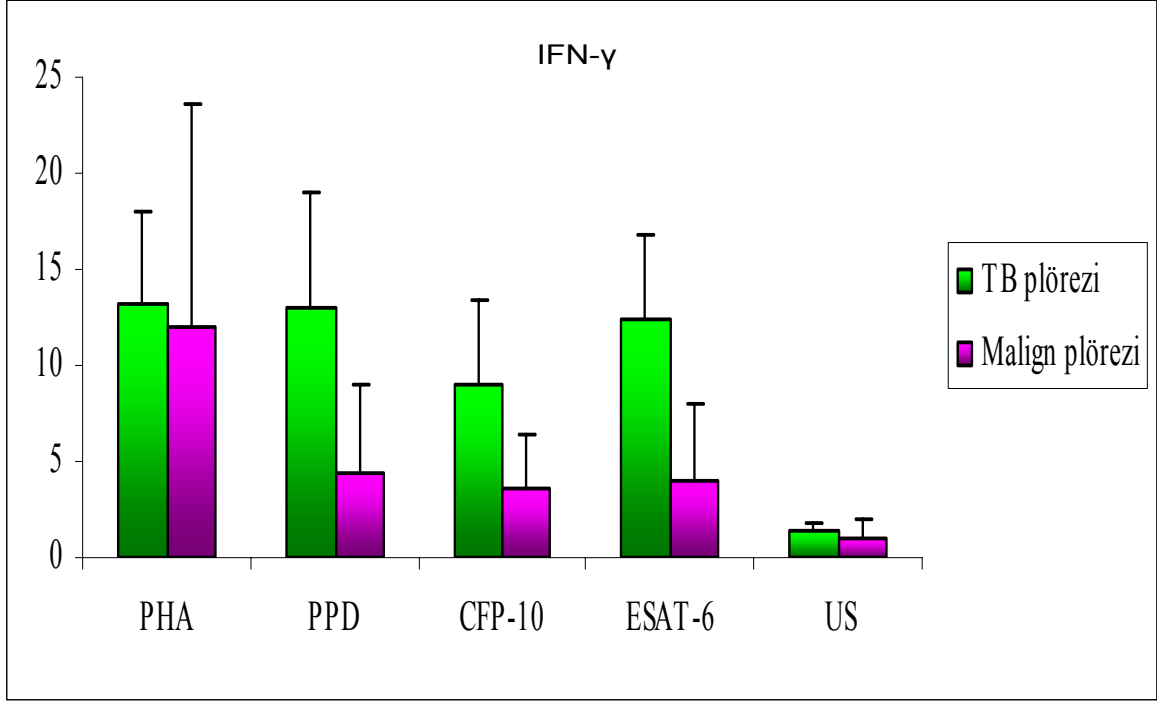
Plevra sıvısı mononükleer hücrelerinin PHA, PPD, CFP-10, ESAT-6 ile stimüle edilmiş ve US kültürlerinden elde edilen CD3+ T hücrelerinde; intrasellüler IFN- γ , IL-10, IL-13 ve IL-4 değerlendirmeleri akım sitometri ile yapıldı.

PPD, CFP-10 ve ESAT-6 ile stimüle edilen CD3+ T hücrelerinde saptanan intrasellüler IFN- γ düzeyleri, TB plörezi olgularında malign plörezi grubuna göre artmış bulundu. Bu artış PPD ile stimülasyon sonucu yaklaşık 3 kat ($p<0,002$); CFP-10 ile yaklaşık 2,5 kat ($p<0,005$); ESAT-6 ile 3 kat ($p<0,0001$) olup; istatistiksel olarak da anlamlı idi. PHA ile stimülasyon sonucu ise gruplar arasında belirgin bir fark saptanmadı (Tablo-8, Şekil-17).

Tablo-8:TB plörezi ve malign plörezi olgularına ait CD3+ T hücrelerinde akım sitometri ile saptanan intrasellüler IFN- γ sonuçları (%)

	TB plörezi	Malign plörezi
PHA	13,2 \pm 4,8	12 \pm 11,6
PPD	13 \pm 6*	4,5 \pm 4,5
CFP-10	9 \pm 4,5**	3,6 \pm 2,9
ESAT-6	12,5 \pm 4,3***	4 \pm 4,1
US	1,4 \pm 0,4	1,1 \pm 0,9

* $p<0,002$ ** $p<0,005$ *** $p<0,0001$

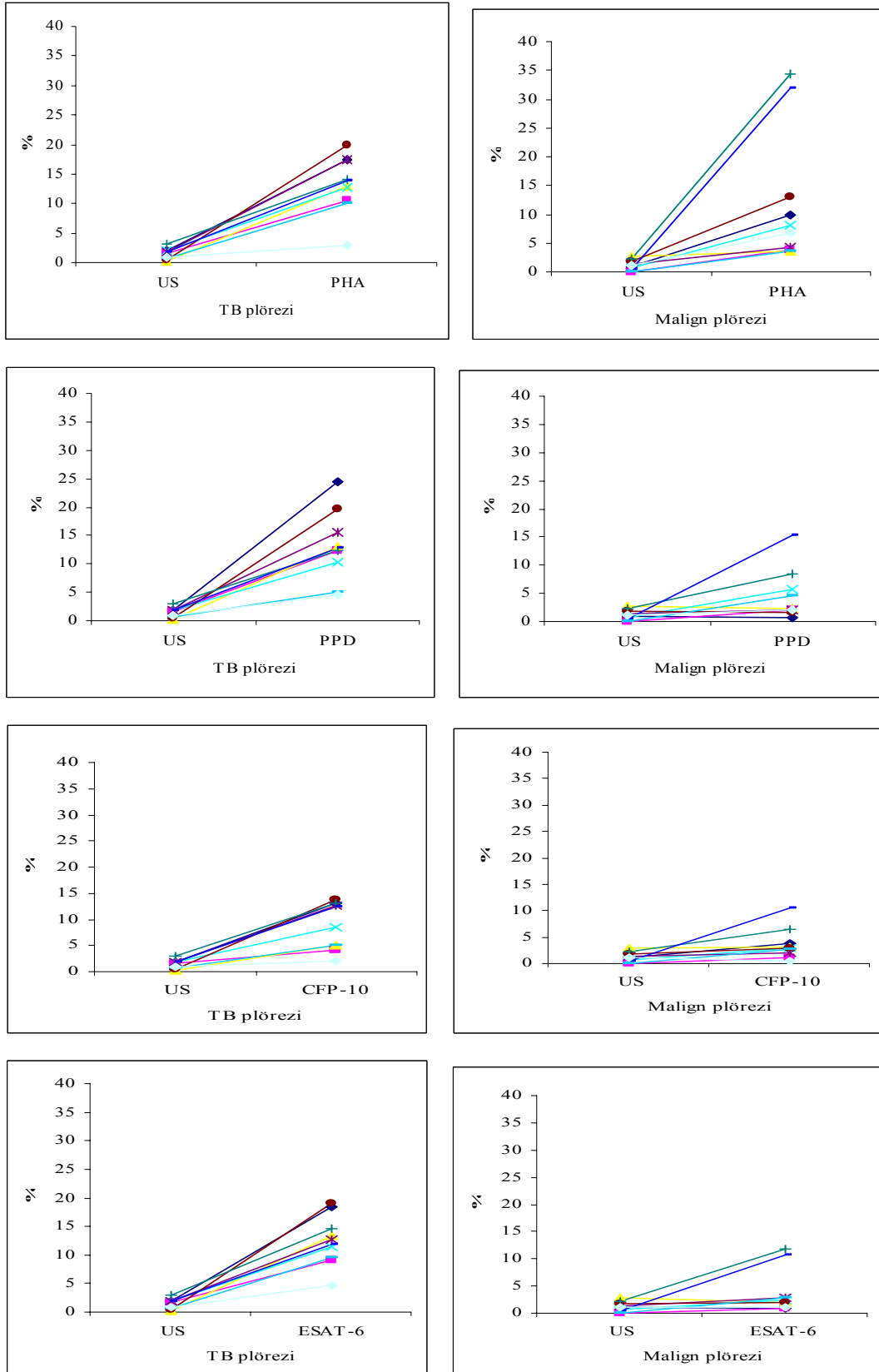


Şekil-17:TB plörezi ve malign plörezi olgularına ait CD3+ T hücrelerinde intrasellüler IFN- γ sonuçları (%)

TB plörezili hasta grubunda stimülasyon amacıyla kullanılan tüm peptidlerin, US hücrelere göre intrasellüler IFN- γ düzeylerinde artışa neden olduğu saptandı (Tablo-8, Şekil-18).

Malign plörezili (kontrol grubu) olgularda da US hücreler ile karşılaştırıldığında; tüm peptidlerin, intrasellüler IFN- γ düzeylerinde artışa neden olduğu; ancak bu artışın PHA dışındaki peptidler için hasta grubuna göre düşük kaldığı belirlendi (Tablo-8, Şekil-18).

Şekil-18: TB plörezi ve malign plörezi olgularına ait CD3+ T hücrelerinde akım sitometri ile saptanan intrasellüler IFN- γ sonuçlarının karşılaştırılması

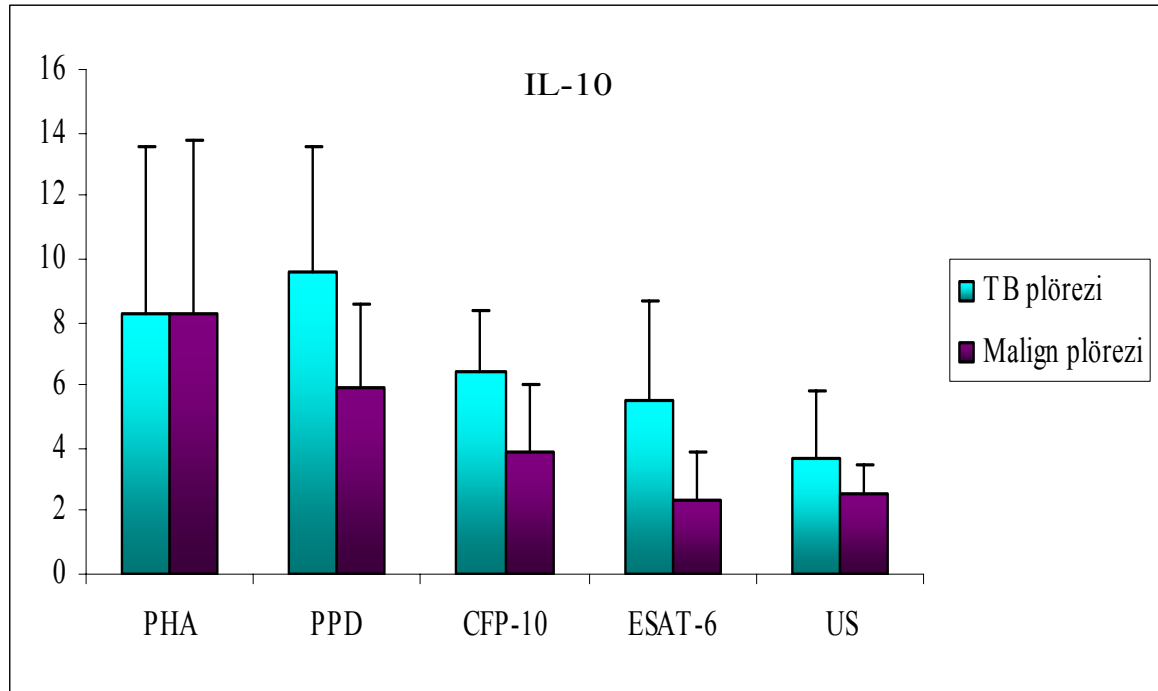


PPD, CFP-10 ve ESAT-6 ile stimüle edilen CD3+ T hücrelerinde saptanan intrasellüler IL-10 düzeyleri, TB plörezi olgularında malign plörezi grubuna göre artmış bulundu. Bu artış PPD ve CFP-10 ile stimülsyon sonucu yaklaşık 1,5 kat (sırasıyla (p<0,05) ve (p<0,01)); ESAT-6'da ile yaklaşık 2,5 kat (p<0,05) olup; istatistiksel olarak da anlamlı idi. PHA ile stimülasyon sonucu ise gruplar arasında fark saptanmadı (Tablo-9, Şekil-19).

Tablo-9:TB plörezi ve malign plörezi olgularına ait CD3+ T hücrelerinde akım sitometri ile saptanan intrasellüler IL-10 sonuçları (%)

	TB PLÖREZİ	MALİGN PLÖREZİ
PHA	8,3 ± 5,3	8,3 ± 5,5
PPD	9,6 ± 4*	5,9 ± 2,7
CFP-10	6,4 ± 2**	3,9 ± 2,1
ESAT-6	5,5 ± 3,2*	2,3 ± 1,6
US	3,7 ± 2,1	2,5 ± 1

*p<0,05 ** p<0,01

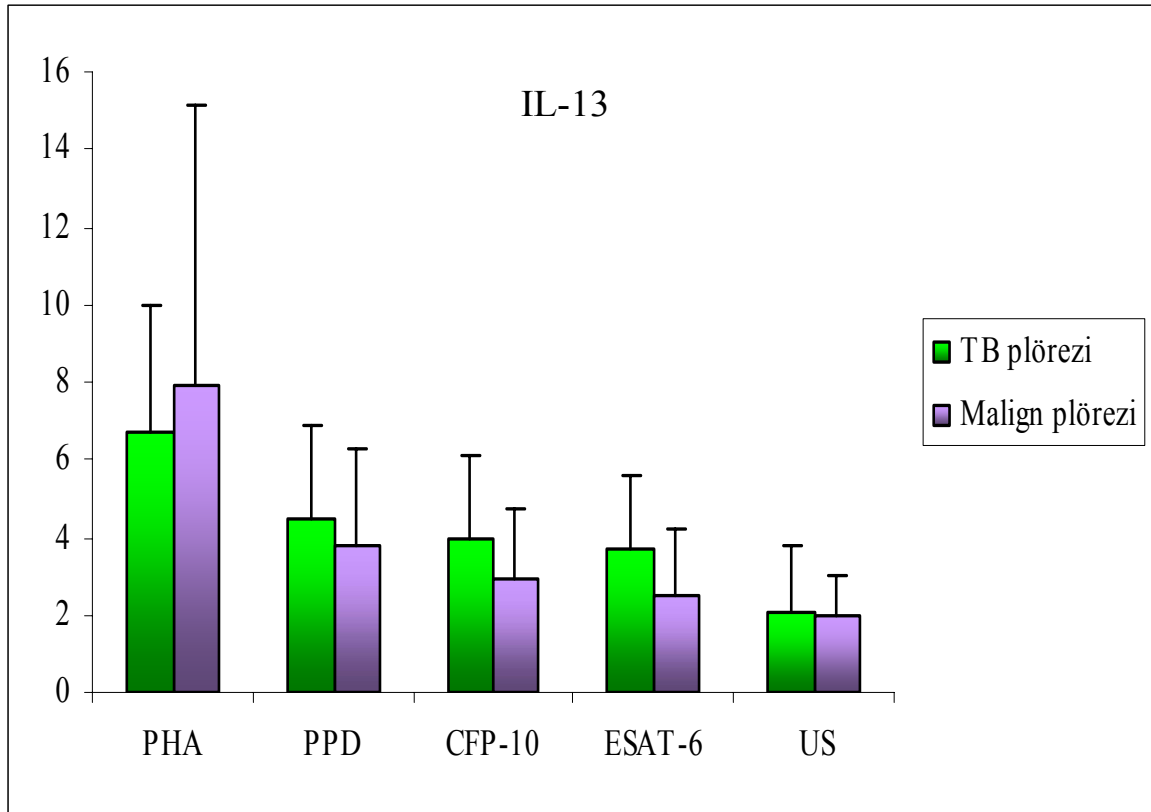


Şekil-19:TB plörezi ve malign plörezi olgularına ait CD3+ T hücrelerinde intrasellüler IL-10 sonuçları (%)

PPD, CFP-10 ve ESAT-6 ile stimüle edilen CD3+ T hücrelerinde saptanan intrasellüler IL-13 düzeyleri, TB plörezi (hasta) grubunda kontrol grubuna göre artış; PHA ile stimülasyon sonucu minimal azalma gösterdi. Ancak gruplar arasındaki farklar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo-10, Şekil-20).

Tablo-10:TB plörezi ve malign plörezi olgularına ait CD3+ T hücrelerinde akım sitometri ile saptanan intrasellüler IL-13 sonuçları (%)

	TB PLÖREZİ	MALİGN PLÖREZİ
PHA	6,7 ± 3,3	7,9 ± 7,2
PPD	4,5 ± 2,4	3,8 ± 2,5
CFP-10	4 ± 2,1	2,9 ± 1,8
ESAT-6	3,7 ± 1,9	2,5 ± 1,7
US	2,1 ± 1,7	2 ± 1



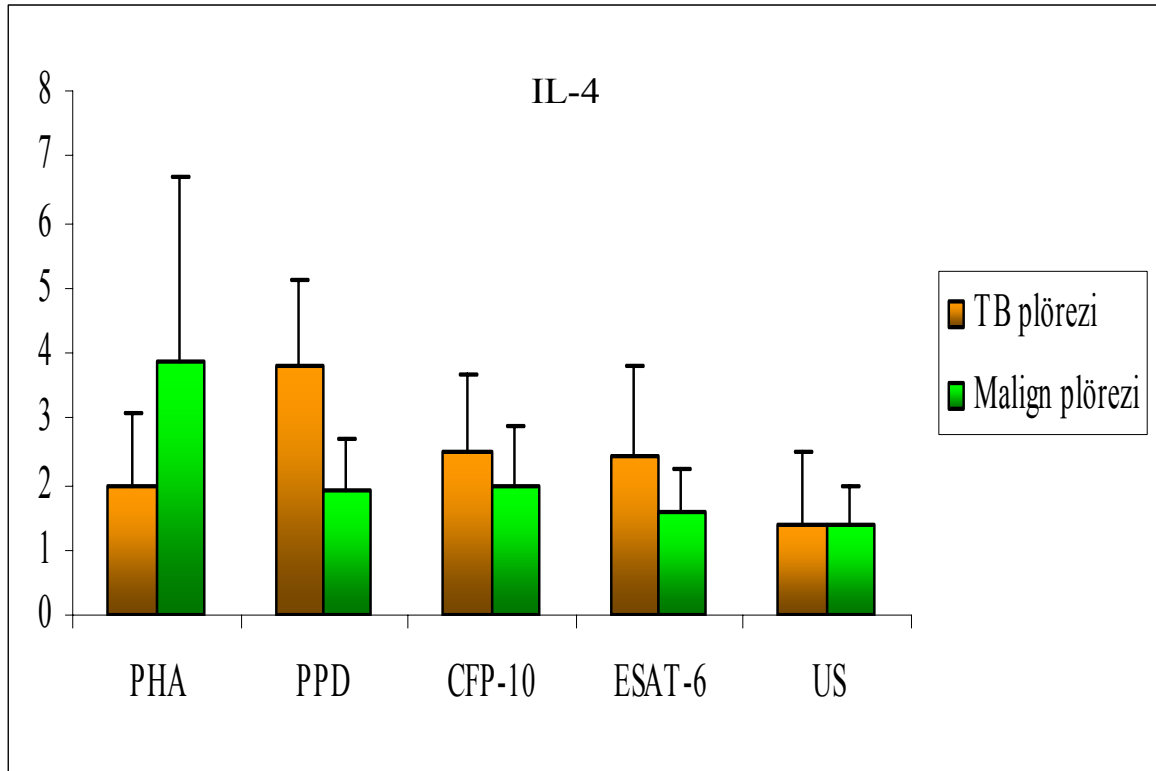
Şekil-20:TB plörezi ve malign plörezi olgularına ait CD3+ T hücrelerinde intrasellüler IL-13 sonuçları (%)

PPD, CFP-10 ve ESAT-6 ile stimüle edilen hücrelerde saptanan intrasellüler IL-4 düzeyleri; hasta grubun da kontrol grubuna göre artış; PHA ile stimülasyon sonucu ise azalma gösterdi (Tablo-11, Şekil-21). Sadece PPD ile stimüle edilen hücrelerde, gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0,0001$).

Tablo-11: TB plörezi ve malign plörezi grubuna ait CD3+ T hücrelerinde akım sitometri ile saptanan intrasellüler IL-4 sonuçları (%)

	TB PLÖREZİ	MALİGN PLÖREZİ
PHA	2 ± 1,1	3,9 ± 2,8
PPD	3,8 ± 1,3*	1,9 ± 0,8
CFP-10	2,5 ± 1,2	2 ± 0,9
ESAT-6	2,4 ± 1,4	1,6 ± 0,6
US	1,4 ± 1,1	1,4 ± 0,6

* $p<0,0001$



Şekil-21: TB plörezi ve malign plörezi olgularına ait CD3+ T hücrelerinde intrasellüler IL-4 sonuçları (%)

Plevra sıvılarında ekstrasellüler sitokin ölçümleri

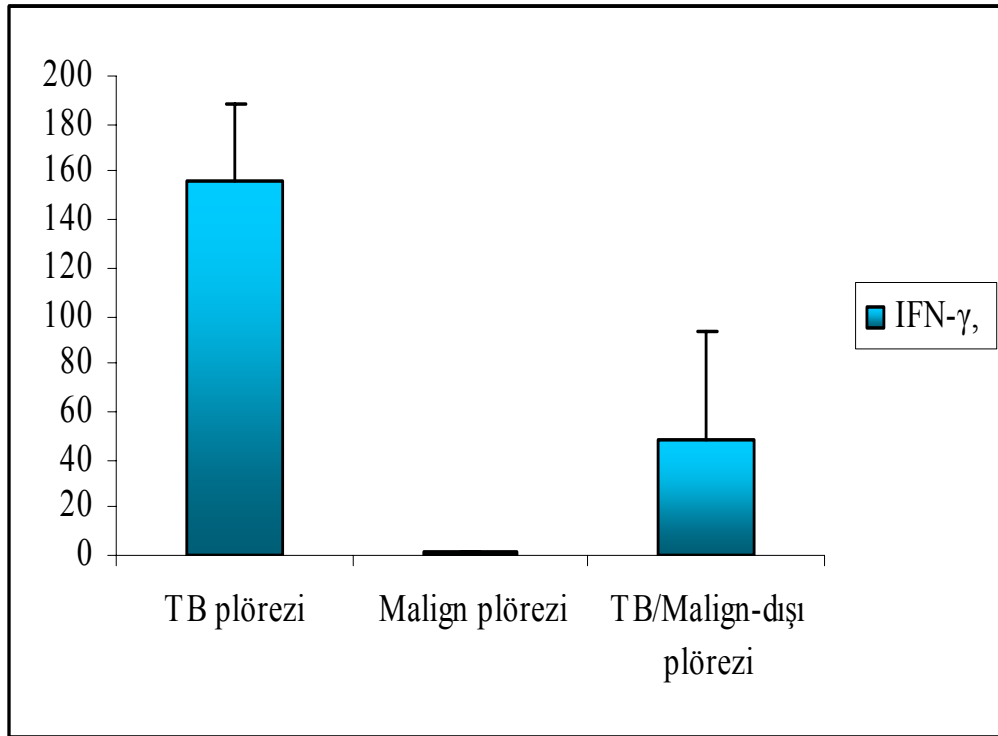
Çalışmanın üçüncü basamağı olan plevra sıvılarında ekstrasellüler sitokin ölçümleri için hasta ve kontrol gruplarına ait toplam 88 olgu değerlendirmeye alındı. TB plörezili olguların (hasta grubu) 9'u kadın 26'sı erkek (toplam 35) olup yaş ortalaması $42,7 \pm 19,7$; malign plörezili kontrol grubunun 14'ü kadın 25'i erkek (toplam 39) olup yaş ortalaması $61,4 \pm 13,5$; TB/malign-dışı plörezili kontrol grubunun ise 5'i kadın 9'u erkek (toplam 14) olup yaş ortalaması $66 \pm 20,5$ idi. Malign plörezili kontrol hastalarının 19'u adenokarsinom, 5'i malign mezotelyoma, 4'ü küçük hücreli bronş karsinomu, 10'u yassı epitelyum hücreli karsinom, 1'i sigmoid karsinom; TB/malign-dışı plörezi olgularından oluşan kontrol grubunun ise 6'sı pnömoni, 8'i konjestif kalp yetmezliği tanısı almıştı.

Plevra sıvılarında ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri, hasta grubunda $156,1 \pm 32,4$ pg/ml; malign plörezili kontrol grubunda $1,2 \pm 0,1$ pg/ml; TB/malign-dışı plörezili kontrol grubunda ise $47,5 \pm 46,2$ pg/ml bulundu (Tablo-12, Şekil-22). Hasta grubu ile her iki kontrol grubu arasında plevra sıvısı ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinde saptanan fark, istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,0001$).

Tablo-12:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri (pg/ml)

	TB plörezi n=35	Malign plörezi N=39	TB/malign-dışı plörezi n=13
IFN- γ	$156,1 \pm 32,4$	$1,2 \pm 0,1^*$	$47,5 \pm 46,2^*$

* $p < 0,0001$



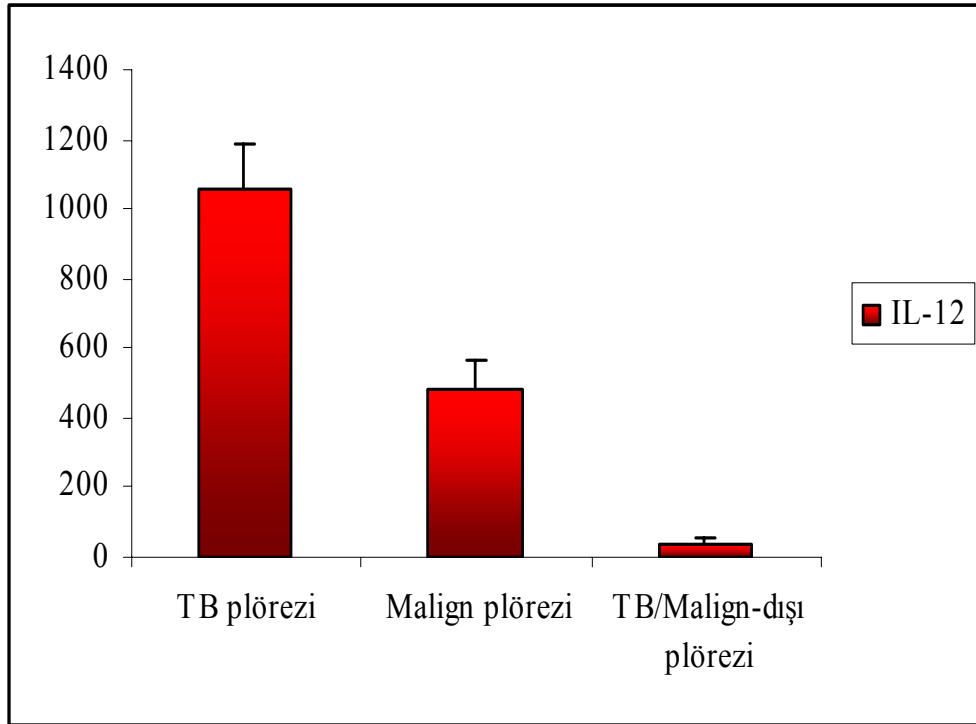
Şekil-22:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IFN- γ düzeyleri (pg/ml)

Plevra sıvısı ekstrasellüler IL-12 düzeyleri; hasta grubunda $1053,6 \pm 137,6$ pg/ml; malign plörezili grupta $482,7 \pm 81,5$ pg/ml; TB/malign-dışı plörezili kontrol grubunda ise $35,4 \pm 16,2$ pg/ml bulundu (Tablo-13, Şekil-23). TB plörezili grup ile malign plörezili kontrol grubu arasında yaklaşık 2 kat; TB/malign-dışı plörezi grubu arasında ise yaklaşık 30 kat artış saptandı. Hasta grubu ile her iki kontrol grubu arasındaki bu fark, istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,0001$).

Tablo-13:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-12 düzeyleri (pg/ml)

	TB plörezi n=28	Malign plörezi n=29	TB/malign-dışı plörezi n=13
IL-12	$1053,6 \pm 137,6$	$482,7 \pm 81,5^*$	$35,4 \pm 16,2^*$

* $p < 0,0001$



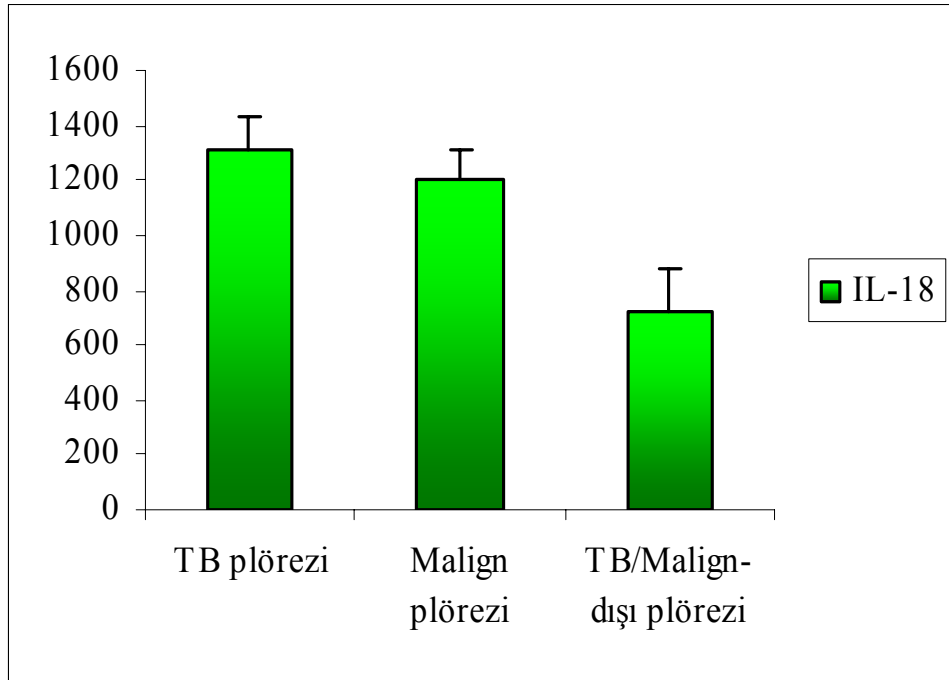
Şekil-23:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-12 düzeyleri (pg/ml)

Plevra sıvısı ekstrasellüler IL-18 düzeyleri, TB plörezi grubunda $1312 \pm 124,2$ pg/ml; malign plörezi grubunda $1200,3 \pm 112,1$ pg/ml; TB/malign-dışı plörezi grubunda ise $726,1 \pm 146,2$ pg/ml bulundu (Tablo-14, Şekil-24). TB plörezili hasta grubu ile malign plörezili kontrol grubu arasında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-18 düzeylerinde saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak hasta grubu ile TB/malign-dışı plörezi grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,002$).

Tablo-14:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-18 düzeyleri (pg/ml)

	TB plörezi n=35	Malign plörezi n=39	TB/malign-dışı plörezi n=14
IL-18	$1312 \pm 124,2$	$1200,3 \pm 112,1$	$726,1 \pm 146,2^*$

* $p < 0,002$



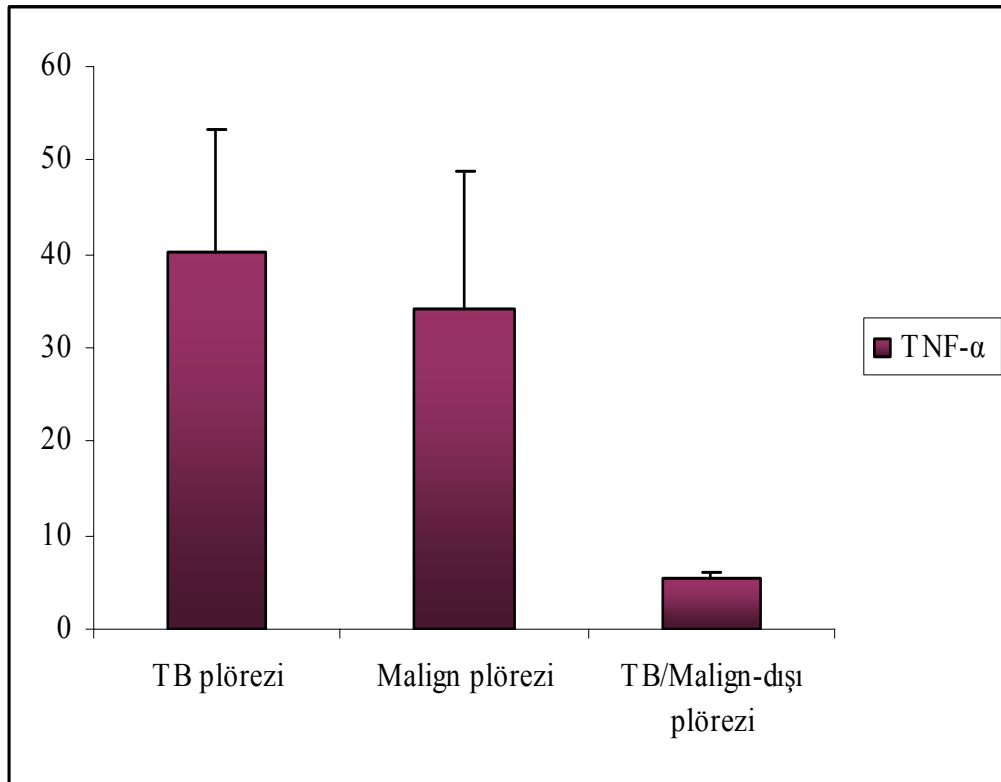
Şekil-24:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-18 düzeyleri (pg/ml)

Plevra sıvısı ekstrasellüler TNF- α düzeyleri, TB plörezi olgularında $40,1 \pm 13,3$ pg/ml; malign plörezi grubunda $34,3 \pm 14,4$ pg/ml; TB/malign-dışı plözili olgularda ise $5,3 \pm 0,8$ pg/ml bulundu (Tablo-15, Şekil-25). Hasta grubu ile her iki kontrol grubu arasında plevra sıvısı ekstrasellüler TNF- α düzeylerinde saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla, $p < 0,005$, $p < 0,0001$).

Tablo-15:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler TNF- α düzeyleri (pg/ml)

	TB plörezi n=28	Malign plörezi N=29	TB/malign-dışı plörezi n=11
TNF- α	$40,1 \pm 13,3$	$34,3 \pm 14,4^*$	$5,3 \pm 0,8^{**}$

* $p < 0,005$ ** $p < 0,0001$



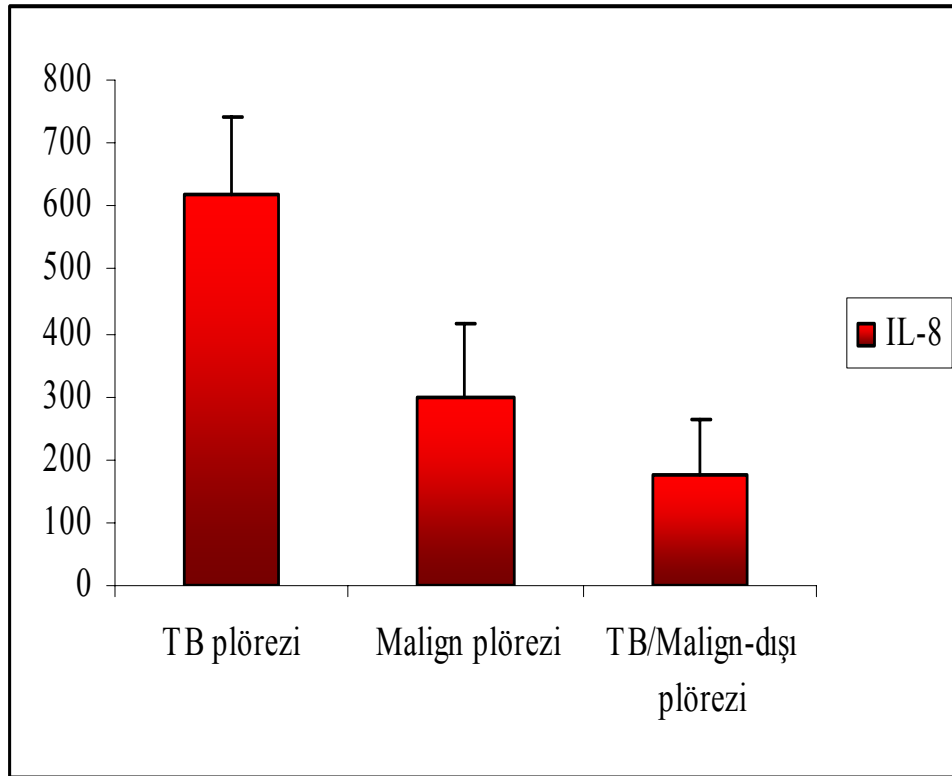
Şekil-25:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler TNF- α düzeyleri (pg/ml)

Plevra sıvısı ekstrasellüler IL-8 düzeyleri, TB plörezi olgularında $621,7 \pm 121,3$ pg/ml iken; malign plörezi grubunda $295 \pm 121,3$ pg/ml; TB/malign-dışı plörezi grubunda ise $173,4 \pm 90,3$ bulundu (Tablo-16, Şekil-26). TB plörezi grubu ile malign plörezi ve TB/malign-dışı plörezi grupları arasında saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla $p < 0,005$ ve $p < 0,002$).

Tablo-16:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-8 düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

	TB plörezi n=35	Malign plörezi n=39	TB/malign-dışı plörezi n=14
IL-8	$621,7 \pm 121,3$	$295 \pm 121,3^*$	$173,4 \pm 90,3^{**}$

* $p < 0,005$ ** $p < 0,002$



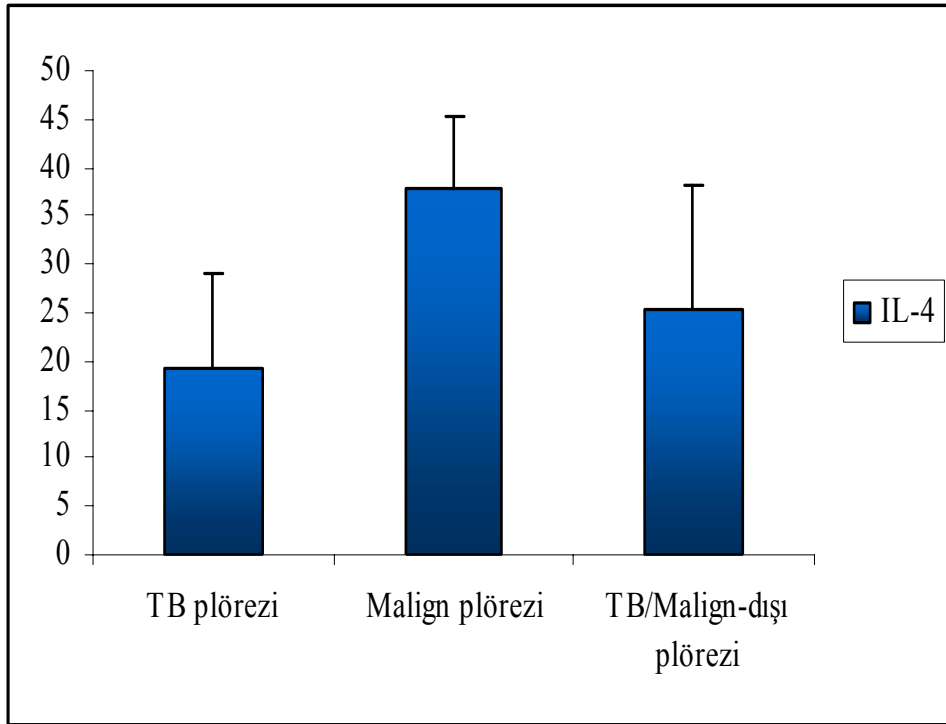
Şekil-26:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-8 düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

Plevra sıvısı ekstrasellüler IL-4 düzeyleri, TB plörezi grubu için $19,3 \pm 9,8$ pg/ml; malign plörezi grubu için $38 \pm 7,2$ pg/ml; TB/ malign-dışı plörezi grubu için ise $25,4 \pm 12,8$ pg/ml olarak bulundu (Tablo-17, Şekil-27). TB plörezi olgularının plevral sıvı ekstrasellüler IL-4 düzeylerinin, malign plörezi kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat azalmış olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). Diğer kontrol grubu arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo-17:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-4 düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

	TB plörezi n=35	Malign plörezi n=37	TB/malign-dışı plörezi n=14
IL-4	$19,3 \pm 9,8$	$38 \pm 7,2^*$	$25,4 \pm 12,8$

* $p < 0,0001$



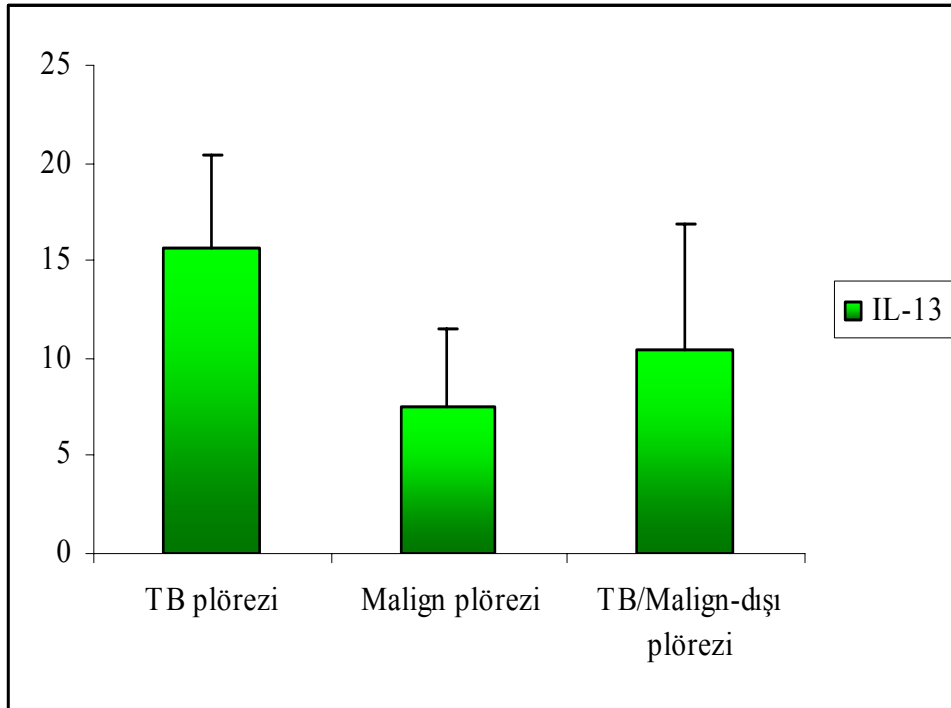
Şekil-27:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-4 düzeylerinin dağılımı

Plevra sıvısı ekstrasellüler IL-13 düzeyleri TB plörezi olguları için $15,74 \pm 4,7$ pg/ml; malign plörezi grubu için $7,5 \pm 4$ pg/ml; TB/malign-dışı plörezi olguları için ise $10,4 \pm 6,5$ pg/ml bulundu (Tablo-18, Şekil-28). Hasta grubu ile malign plörezi grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,0001$).

Tablo-18:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-13 düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

	TB plörezi n=35	Malign plörezi N=37	TB/malign-dışı plörezi n=14
IL-13	$15,74 \pm 4,7$	$7,5 \pm 4^*$	$10,4 \pm 6,5$

* $p < 0,0001$

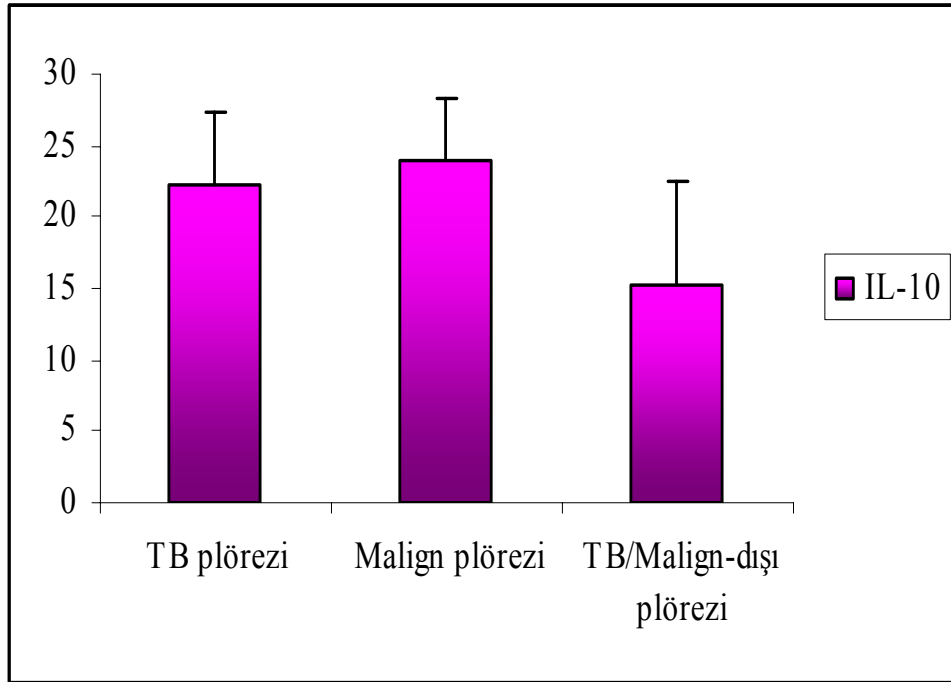


Şekil-28:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-13 düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

TB plörezi grubundaki plevra sıvısı ekstrasellüler IL-10 düzeyleri malign plörezi grubundan daha düşük, TB/malign-dışı plörezi grubundan daha yüksek bulundu. Bu değerler TB plörezi grubu için $22,2 \pm 5,1$ pg/ml; malign plörezi grubu için $23,9 \pm 4,3$ pg/ml; TB/malign-dışı plörezi grubu için ise $15,3 \pm 7,1$ pg/ml idi (Tablo-19, Şekil-29). Gruplar arasındaki farkın, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Tablo-19:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-10 düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

	TB plörezi n=35	Malign plörezi n=39	TB/malign-dışı plörezi n=14
IL-10	$22,2 \pm 5,1$	$23,9 \pm 4,3$	$15,3 \pm 7,1$



Şekil-29:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler IL-10 düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

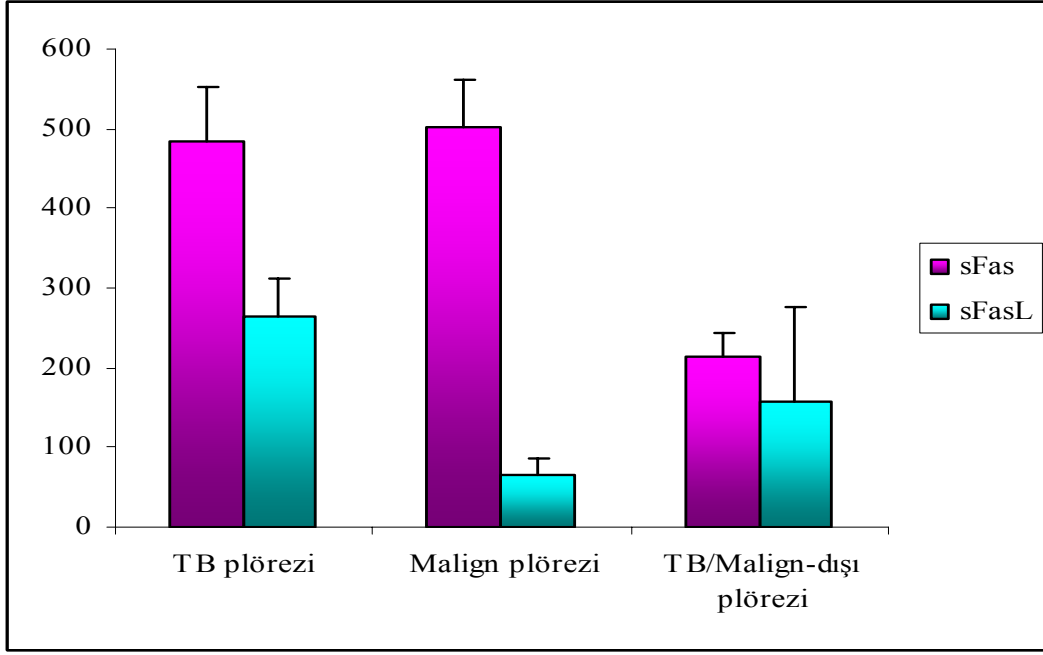
TB plörezi, malign plörezi, TB/malign-dışı plörezi grupları arasında plevra sıvısı ekstrasellüler sFas (CD95) düzeyleri karşılaştırıldığında; TB plörezi grubunda sFas düzeyleri malign plörezi grubundan biraz daha düşük, TB/malign-dışı plörezi grubundan ise daha yüksek olduğu saptandı. Bu değerler TB plörezi grubunda $485,1 \pm 68$ pg/ml; malign plörezi grubunda $502,8 \pm 60$ pg/ml; TB/malign- dışı plörezi grubunda ise $213,9 \pm 29,2$ pg/ml bulundu (Tablo-20, Şekil-30). TB plörezi grubu ile malign plörezi grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. TB plözili olguların sFas değerlerinde TB/malign-dışı plörezi olgularına göre 2 kat artış olduğu saptandı ($p < 0,0001$).

TB plörezi grubunda plevra sıvısı ekstrasellüler sFasL düzeyleri, her iki kontrol grubundan daha yüksek bulundu. Bu değerler TB plörezi grubunda $265,6 \pm 47,3$ pg/ml; malign plörezi grubunda $64,5 \pm 22,2$ pg/ml; TB/malign-dışı plörezi grubunda ise $156,1 \pm 121,2$ pg/ml saptandı (Tablo-20, Şekil-30). TB plörezi grubunun ekstrasellüler sFasL düzeylerinin, malign plörezi grubuna göre yaklaşık 4 kat arttığı ($p < 0,0001$); TB/malign-dışı plörezi grubuna göre de artmış olduğu bulundu ($p < 0,001$).

Tablo-20: TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler sFas (CD95) ve sFasL düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

	TB plörezi n=28	Malign plörezi n=29	TB/malign-dışı plörezi n=13
sFas	$485,1 \pm 68$	$502,8 \pm 60$	$213,9 \pm 29,2^*$
sFasL	$265,6 \pm 47,3$	$64,5 \pm 22,2^*$	$156,1 \pm 121,2^{**}$

* $p < 0,0001$ ** $p < 0,001$



Şekil-30:TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı ekstrasellüler sFas ve sFasL düzeylerinin dağılımı (pg/ml)

Mononükleer hücre alt grupları

Çalışmanın dördüncü basamağı olan plevra sıvılarında mononükleer hücre alt gruplarını değerlendirmek için hasta ve kontrol gruplarına ait toplam 56 olgu değerlendirmeye alındı. TB plörezili olguların (hasta grubu) 4'ü kadın 18'i erkek (toplam 22) olup yaş ortalaması $44 \pm 18,7$; malign plörezili kontrol grubunun 7'si kadın 18'i erkek (toplam 25) olup yaş ortalaması $62 \pm 14,6$; TB/malign-dışı plörezili kontrol grubunun ise 3'ü kadın 6'sı erkek (toplam 9) olup yaş ortalaması $63,5 \pm 25$ idi.

Malign plörezili kontrol hastalarının 12'si adenokarsinom, 3'ü malign mezotelyoma, 3'ü küçük hücreli bronş karsinomu, 7'si yassı epitel hücreli karsinom; TB/malign-dışı plörezi olgularından oluşan kontrol grubunun ise 4'ü pnömoni, 5'i konjestif kalp yetmezliği tanısı almıştı.

TB plörezi ile kontrol gruplarında, plevra sıvısı mononükleer hücre alt gruplarının dağılımı karşılaştırıldığında; hasta grubunda $\gamma\delta$ + T hücrelerinin malign plörezi kontrol grubuna göre artmış olduğu saptandı ($p<0,05$). CD3+, CD4+, CD8+, CD25+, CD69+, CD19+, CD4+CD25+, CD4+CD69+, CD8+CD25+, CD8+CD69+, $\gamma\delta$ +CD25+, $\gamma\delta$ +CD69+, CD3+CD16+CD56+, CD3-CD16+CD56+, CD3+CD28+, CD3+CD152+ ve CD95+ hücreler ile CD4/CD8 oranlarında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo-21).

Tablo-21: TB plörezi ve kontrol gruplarında plevra sıvısı mononükleer hücre alt gruplarının dağılımı (%)

	TB plörezi	Malign plörezi	TB/malign-dışı plörezi
CD3+ T hücre	88,2 ± 0,8	89,1 ± 1	82,3 ± 5,1
CD4+ T hücre	64,5 ± 2	66,9 ± 1,6	57,4 ± 5,9
CD8+ T hücre	23 ± 1,2	21,3 ± 1,6	23 ± 14,2
$\gamma\delta$ + T hücre	6,5 ± 0,7	4,3 ± 0,6*	6,2 ± 1,2
CD25+ T hücre	22,2 ± 3	19,4 ± 1,6	17,7 ± 2
CD69 + T hücre	21,1 ± 2,3	25,3 ± 4,8	23,4 ± 3,8
CD19 + T hücre	8 ± 0,8	8,3 ± 1,3	5,9 ± 1,3
CD4+CD25 + T hücre	9,5 ± 1,5	11,1 ± 1,3	6,2 ± 0,6
CD4+CD69 + T hücre	9,5 ± 1,7	13,8 ± 3	7,2 ± 1,8
CD8+CD25 + T hücre	0,9 ± 0,2	2,2 ± 1,2	1,2 ± 0,6
CD8+CD69 + T hücre	2,4 ± 0,4	4 ± 1,3	2,6 ± 0,9
$\gamma\delta$ +CD25 + T hücre	1,4 ± 0,2	0,9 ± 1,2	1,2 ± 0,3
$\gamma\delta$ +CD69 + T hücre	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,5	1,1 ± 0,3
CD3+CD16+CD56+	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,6
CD3-CD16+CD56+	6,08 ± 1,8	4,3 ± 0,6	10,7 ± 3,9
CD95+ T hücre	66,6 ± 3,4	64,1 ± 3,9	65 ± 4,9
CD4/CD8	3 ± 0,3	3,8 ± 0,4	3,6 ± 0,9
CD3+CD28+T hücre	21,5 ± 5,4	14,6 ± 3,4	20 ± 11,6
CD3+CD152+T hücre	2,2 ± 0,5	2,4 ± 0,4	0,9 ± 0,3

* $p<0,05$

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

TB, halen dünya nüfusunun 1/3'ünün MTB ile enfekte olması, her yıl 8 milyon kişide aktif hastalık gelişmesi ve 2 milyondan fazla kişinin ölümüne yol açması nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olmayı sürdürmektedir. Çoklu ilaca dirençli suşların giderek artması ve HIV ile koenfeksiyon gibi faktörlerin yanı sıra uzun süreli, kombine, kompleks, pahalı tedavi rejimini gerektirmesi ve yeterli hasta uyumunun sağlanamaması hastalığın kontrolünü güçleştirmektedir. TB'un kontrolü için etkin aşuların ve spesifik tanı reaktiflerinin kullanıma girmesi gerekmektedir. Dünyada rutin kullanımdaki tek aşı olan BCG'nin koruyuculuğu farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda % 0-80 arasında bulunmuştur. Çok değişken etkinliği ve immün yetmezlikli konaklarda hastalığın ortaya çıkma riski nedeniyle canlı aşı olan BCG'nin kullanımı hala tartışmalıdır (25, 31, 93).

TB tanısı için kullanılan PPD, hem sekrete edilen hem de somatik mikobakteriyel antijenleri içeren bir karışımdır. İnsanlarda ve sığırlarda *in vivo* deri testi reaktifi olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. PPD, MTB kompleksinde (*M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. africanum*) yer alan patojen mikobakterilerin yanı sıra çevresel tüberküloz-dışı bakteriler ile BCG aşı suşlarına ait antijenleri içerir (34, 150). Konağın PPD'ye karşı geliştirdiği hücrel immün yanıt, konağın mikobakteri ile karşılaşım etkileşime girdiğini göstererek TB'un tanısında yardımcı olmakla birlikte; Tüberkülin deri testi pozitifliği BCG aşılması ve çevresel tüberküloz-dışı mikobakterilerle karşılaşım sonucu da meydana gelebilmektedir (31, 34). Bu nedenle *MTB* ve *M. bovis* enfeksiyonu için PPD'den daha spesifik yeni tanı reaktiflerine gereksinim vardır.

MTB'a karşı oluşım koruyucu immün cevabın hücrel ve moleküler temellerinin anlaşılması; TB'un kontrolünde etkili olabilecek yeni aşuların, spesifik tanı reaktiflerinin hazırlanmasında ve tedavi için alternatif immün modülatör yaklaşımların belirlenmesinde önemli yararlar sağlayabilir.

TB plörezi, TB'un farklı klinik formları arasında en ayrıcalıklı olanıdır. Enfeksiyona karşı güçlü bir immün yanıt geliştirmiş olan TB plörezili olguların çoğunda antimikobakteriyel tedavi uygulanmasa da plevral efüzyonun ortadan kalktığı görülebilmektedir. Bu nedenle plevral aralıkta yerleşim MTB'e karşı gelişim immün cevap ile ortaya çıktığı için TB plörezi, lokal koruyucu immün mekanizmaları değerlendirmek açısından son derece uygun bir modeldir (140).

Son zamanlarda düşük molekül ağırlığındaki ESAT-6 ve CFP-10'un MTB ve virülen BCG suşları tarafından sekrete edilmesine karşım çevresel mikobakteriler ve BCG

aşı suşları tarafından sentezlenmediği gösterilmiştir (25, 32, 34, 35, 150, 151). Bu proteinler, TB'lu kişilerde güçlü T hücre cevabı ortaya çıkarmakta, erken ve aktif TB ya da subklinik TB tanısı için *ex vivo* testlerde kullanılmaktadır (25, 34, 150).

Enfeksiyonların lokal bir alanda sınırlandırılarak patojenin etkisiz hale getirilmesini sağlayan koruyucu immün mekanizmaların anlaşılması; farklı hasta gruplarında, özellikle TB enfeksiyonlarında etkin spesifik immün yanıtın ortaya konmasına ve elde edilen bilgiler ışığında daha etkili yeni TB aşlarının ve yeni tanı reaktiflerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Bu amaçla çalışmamızda, TB aşısı için aday peptidler olarak kabul edilen ESAT-6 ve CFP-10'un lokal koruyucu immün cevaptaki rolü araştırılmıştır. Plevra sıvısından elde edilmiş mononükleer hücreler PHA, PPD, CFP-10 ve ESAT-6 ile stimüle edildikten sonra kültür süpernatanlarındaki ekstrasellüler sitokin düzeyleri (IFN- γ , IL-10, IL-13 ve IL-4) ve uyarılmış hücrelerdeki intrasellüler sitokin düzeyleri (IFN- γ , IL-10, IL-13 ve IL-4) değerlendirilmiştir.

Enfeksiyon bölgesinde MTB'e karşı immün savunmada IFN- γ 'nın önemli rol aldığı (152); ESAT-6 ve CFP-10'un IFN- γ salınımına ve dolayısıyla çok güçlü bir T hücre yanıtına yol açtığı daha önce yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (25, 126, 150). Çalışmamızda TB plörezi hastaların plevra sıvılarından elde edilen mononükleer hücrelerin PPD, ESAT-6 ve CFP10 ile uyarılması sonucu kültür süpernatanlarındaki ekstrasellüler IFN- γ düzeylerinin kontrol grubu olan malign plörezi grubuna göre anlamlı olarak arttığı (Tablo-4); TB plörezi olgularda bu peptidlerle uyarılmanın sonucu olarak intrasellüler IFN- γ üreten T hücre oranlarının da ekstrasellüler IFN- γ düzeylerine paralel olarak arttığı (Tablo-8) gösterilmiştir.

IL-10, TB hastalarında spesifik hücrel immün yanıtın baskılanması ile ilişkilidir. Bu sitokinin TB hastalarında CD4+ ve CD8+ CTL'lerin litik aktivitesini ve MTB ile enfekte makrofajlar üzerinde bulunan kostimülör molekül ekspresyonunu azalttığı (153); makrofajlar tarafından üretilen TNF- α (154) ve T lenfositlerinin sentezlediği IFN- γ (155) gibi sitokinlerin sentezini inhibe edebildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ekstrasellüler IL-10 düzeyleri ESAT-6 veya PPD ile uyarılma sonucu TB plörezi grubunda malign plörezi grubuna göre belirgin olarak daha yüksek bulundu. Hücreler CFP-10 ile stimüle edildiğinde saptanan artış, istatistiksel olarak anlamlı değildi; PHA ile stimülasyonda ise TB plörezi grubunda malign plörezi grubuna göre daha az artış görüldü (Tablo-5). Intrasellüler IL-10 üreten T hücrelerin oranları ise PPD, ESAT-6 ve CFP10 ile uyarılmayı takiben TB plörezi grubunda anlamlı olarak artmış bulundu (Tablo-9).

Makrofajların aktivasyonunu engelleyebilen ve IL-2 reseptör ekspresyonunu azaltarak T hücre proliferasyonunu bloke edebilen bir sitokin olan IL-4'ün plevral aralıktaki kısmi yokluğunun konak immün cevabını artırabileceği öne sürülmektedir (156). Çalışmamızda, TB plörezi ve malign plörezi gruplarına ait plevra mononükleer hücre kültür süpernatanlarındaki ekstrasellüler IL-4 düzeyleri genel olarak son derece düşük bulundu. Özellikle ESAT-6 ve CFP-10 ile uyarılan hücrelerin kültür süpernatanlarındaki ekstrasellüler IL-4 düzeylerinin çoğu ölçülebilir değerlerin altında saptandı. ESAT-6, CFP-10 ve PPD ile uyarılma sonucuna göre TB plörezi'li hastalarda (Tablo-7), intrasellüler IL-4 üreten hücrelerin oranları kontrol grubuna göre daha düşük bulundu (Tablo-11).

IL-4 gibi Th2 tipi bir sitokin olan IL-13'ün ekstrasellüler düzeylerine bakıldığında, ESAT-6 ve PHA ile stimüle edilen TB plörezili olgulara ait hücrelerin malign plörezi grubundakilere göre daha az IL-13 ürettiği; PPD ile uyarılma sonucu belirgin, CFP-10 ile ise minimal artışların olduğu gözlemlendi (Tablo-6). İntrasellüler IL-13 üreten T lenfosit oranları karşılaştırıldığında; ESAT-6, CFP-10 ve PPD ile uyarılma sonucu TB plörezi grubu ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Tablo-10).

Bu veriler Barnes ve arkadaşlarının (156) sonuçları ile uyumlu bulundu. Araştırmacılar MTB'a karşı immün yanıt gelişen hastalarda, hastalığın bulunduğu alanda Th1 tipi sitokinler ile IL-10'un etkin olduğunu göstermişler; TB plörezili hastaların plevral sıvı ve periferik kan mononükleer hücrelerini MTB ile *ex vivo* stimüle ettikten sonra ekstrasellüler sitokin düzeylerini değerlendirmişler; plevral sıvı mononükleer hücreleri tarafından üretilen IFN- γ düzeylerini, periferik kan mononükleer hücrelerinin ürettiği IFN- γ düzeylerine göre daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca plevral sıvıdaki IFN- γ mRNA düzeyinin ve IFN- γ mRNA eksprese eden hücre oranının periferik kan örneklerine göre daha yüksek olduğunu; plevra sıvısı IFN- γ düzeylerinin serum düzeylerine oranla 15 kat artmış olduğunu; IL-10'un plevral aralıkta selektif olarak daha yoğun bulunduğunu ve IL-4 düzeylerinin bizim sonuçlarımıza benzer olarak tespit edilebilir sınırların altında bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Jalapathy ve arkadaşları (152), TB plörezili ve TB-dışı plörezili hastaların plevra sıvılarından elde edilen mononükleer hücreleri PHA, PPD, kültür filtrat protein antijenleri ve ısı ile öldürülmüş MTB ile uyardıktan sonra ekstrasellüler sitokin düzeylerini araştırmışlar; bizim sonuçlarımıza benzer olarak TB plörezi grubunda IFN- γ düzeylerinin, TB-dışı plörezili gruba göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmış olduğunu; ancak farklı olarak IL-4 düzeylerinin de kontrol grubuna göre arttığını göstermişlerdir.

Prabha ve arkadaşları (44), TB plörezili ve kontrol grubu olarak TB-dışı plörezili hastalardan elde edilen plevral sıvı mononükleer hücre ve periferik kan mononükleer hücrelerini PPD, kültür filtratı (CF) ve ısı ile öldürülmüş MTB ile stimüle ettikten sonra hücre kültür süpernatantlarında ekstrasellüler IFN- γ ve TNF- α düzeylerini araştırmışlar; TB plörezili olgularda PPD ve ısı ile öldürülmüş MTB ile uyarılma sonunda bizim verilerimizle uyumlu olarak IFN- γ düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında ESAT-6 ve CFP-10'un, proenflamatuvar Th1 tipi bir sitokin olan IFN- γ düzeylerini artırarak, enfeksiyonun bulunduğu alanda koruyucu immün cevabı endükleme potansiyelinde oldukları; hastalığa duyarlılık ve reaktivasyon ile ilişkili olmasının yanı sıra aşırı immün yanıtın baskılanması ve lokal doku hasarının engellenmesinde rol oynadığı düşünülen IL-10 sekresyonunu da endükledikleri sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda IFN- γ 'nın antagonisti olarak davranan antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-4'ün ESAT-6 ve CFP-10 ile stimülasyonda ölçülemeyecek düzeylerde saptanması; IL-4 ile benzer özelliklere sahip Th2 tip sitokin olan IL-13'ün de genel olarak azalmış bulunması; PPD, ESAT-6 ve CFP-10'un TB plörezide koruyucu Th1 tipi immün yanıtın geliştirilmesi ve sürdürülmesini indirekt olarak uyardığını düşündürmektedir. Bu veriler ESAT-6 ve CFP-10'un yeni TB aşı preparasyonlarında bulunmasının yararını desteklemektedir. ESAT-6 peptidini içeren rekombinan BCG aşısı ile aşılanan farelerde MTB'e karşı direncin arttığı, insanlarda da konu ile ilgili klinik çalışmalara başlanacağı bildirilmiştir (157). Buna karşın özellikle CFP-10'un makrofaj içerisinde eksprese edildiğinde NO yapımını ve yüzey kostimülator molekülü olan B7.1'in ekspresyonunu azalttığı gösterilmesi (IFN- γ 'ya yanıt olarak bile), ekstrasellüler CFP-10'un ise bunun tam aksine bu moleküllerin yapımını artırdığının ortaya konmuş olması; bu peptitlerin immünomodulator etkilerinin oldukça karmaşık olduğunu ve daha ayrıntılı araştırılması gerektiğini düşündürmektedir (35). ESAT-6 veya CFP-10 ile IFN- γ yapımının belirgin olarak uyarılması, IFN- γ yapımını temel alarak spesifik hücresel immün yanıtı ölçen immünolojik tanı testlerinde bu peptitlerin kullanılabileceğini desteklemektedir. Nitekim bugüne kadar yapılan çalışmalarda, MTB ile enfekte kişilerin T hücrelerinin ESAT-6'ya karşı güçlü bir IFN- γ yanıtı verdikleri; BCG aşısı yapılmış sağlıklı kişilerin ise bu uyarıya yanıtsız kaldıkları gösterilmiştir (158-160). Bu çalışmalar ESAT-6'nın kullanıldığı testlerin özellikle TB'un düşük endemi gösterdiği ülkelerde tanı amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak ESAT-6'ya spesifik T hücre yanıtının pulmoner TB geçirip iyileşmiş veya latent enfeksiyonu olan

kişilerde de saptanabilmesi (161, 162) bu testin TB'un endemik olduğu bölgelerde aktif hastalığın tanısı için kullanılmasını sınırlayabilir.

TB plörezide immün sistem hücrelerinin plevral boşluğa göç ederek birikmesi nedeniyle plevra sıvısı birçok sitokini içermektedir. Sitokinler TB patogenezinde önemli rol oynarlar (bakınız genel bilgiler). IL-12 ve IFN- γ , Th1 tipi immün cevabın endüksiyonunda son derece önemli iken IL-4 ve IL-13 Th2 tipi cevabın oluşmasında kritik rol oynarlar. Çalışmamızda TB'a karşı gelişen lokal immün cevapta sitokinlerin rolünü sorgulamak amacıyla TB plörezili hastaların plevra sıvısındaki IFN- γ , IL-12p40, IL-18, TNF- α , IL-8, IL-4, IL-13 ve IL-10 düzeyleri araştırıldı.

IFN- γ , Th1 tipi hücrel immün cevap ile ilişkili bir sitokindir. Spesifik antijenler ya da nonspesifik antijenler ile stimülasyona cevap olarak T lenfositleri tarafından sentezlenir. İmmün sistemin diğer hücrelerinin cevabını modifiye eder; makrofajları aktive ederek bu hücrelerin mikobakterisidal kapasitelerinin artışına neden olur (163). Yapılan çalışmalarda TB plörezili hastaların plevral efüzyonlarında, TB-dışı diğer nedenlerle meydana gelen plevral efüzyonlardakine göre IFN- γ düzeyinin arttığı ve bu artmış IFN- γ düzeylerinin TB tanısını destekleyici bir marker olabileceği ortaya konmuştur (42, 164). Shimokata ve arkadaşları (164) TB plörezi hastalarının plevral efüzyonlarında malign plörezi hastalarına göre IFN- γ düzeylerinin artmış olduğunu saptamışlar; Villegas ve arkadaşları (42) da çalışmalarında benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmamızda da TB plörezi grubunda plevra IFN- γ düzeyleri, kontrol gruplarından olan malign plörezi ve TB/malign-dışı plörezi grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Tablo-12).

p40 ve p35 zincirlerinden oluşan heterodimerik bir sitokin olan IL-12, naif T hücrelerinin Th1 tipine dönüşümünü ve antijen ile aktive edilmiş olan Th1 hücrelerinin IFN- γ sentezlemelerini sağlar. Granüloma oluşumunda da rol oynayan IL-12, NK hücrelerinin stimülasyon faktörü, sitotoksik T lenfositlerin olgunlaşma faktörü olarak bilinir (79, 117). Zhang ve arkadaşlarının (115) yaptıkları bir çalışmada, TB plörezi hastalarının plevral sıvılarında hem serbest p40 hem de heterodimer IL-12 düzeylerinin kontrollere göre arttığı gösterilmiştir. TB plörezili hastaların plevra sıvılarındaki IL-12p40 ve heterodimer IL-12 düzeyleri, TB plörezili hastaların serumlarındakinden ve malign plörezili hastaların plevra sıvılarındakinden istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada MTB ile stimüle edilen plevral sıvı hücrelerinin süpernatantlarında biyoaktif IL-12 tespit edilmiş, anti IL-12 antikoru ile plevral sıvı hücrelerinin proliferatif cevaplarının süprese edildiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da TB plörezi grubunun plevra sıvılarındaki IL-12p40 düzeyi, malign plörezi ve TB/malign-dışı plörezi gruplarının değerlerinden

anlamli olarak daha yuiksek bulunmuştur (Tablo-13). Elde edilen bu bilgilerin ışığında IL-12'nin, IFN- γ 'nın üretimini artırarak Th1 hücrelerinin gelişimlerini kolaylaştırdığı; antijen spesifik T hücreleri ve NK hücrelerinin sitotoksitelerini artırarak MTB'a karşı gelişen koruyucu immün cevapta rol aldığı söylenebilir.

IL-18, naif T hücrelerinin Th1 tipine dönüşmesine yardımcı olan bir sitokindir. T ve NK hücrelerinin IFN- γ sentezlenmesine neden olur. Hayvan modellerinde ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda IL-18'in, IFN- γ üretimine yol açarak mikobakterilere karşı korunmaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Vankayalapati ve arkadaşları (121) TB plörezi tanısı almış hastaların plevra sıvılarındaki IL-18 düzeylerinin, TB-dışı plörezi olan hastalardan daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada artmış IL-18 düzeyleri ile uyumlu olarak IFN- γ düzeylerinin de artmış olduğu saptanmış; MTB'in endüklediği IFN- γ üretiminin rekombinan IL-18 ile artırıldığı, anti IL-18 antikoru ile inhibe edildiği de gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da, TB plörezi grubunda plevra sıvısı IL-18 düzeyleri her iki kontrol grubundan daha yüksek bulundu. TB plörezi ile malign plörezi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, TB plörezi ile TB/malign dışı plörezi grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo-14). Bu verilerin ışığında TB plörezi efüzyonlarında, canlı bakteri ya da bakteri kalıntıları ile makrofajların uyarılması sonucu sentezlenen IL-12 ve IL-18'in bir yandan naif Th lenfositler tarafından IFN- γ üretimini tetiklemesi, diğer taraftan bu makrofajların antijenleri işlenerek spesifik Th hücrelere sunumunun artması ile Th1'e farklılaşmanın ortaya çıktığı söylenebilir.

Proenflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , mikobakterilere karşı cevap olarak makrofaj, monosit ve DC tarafından sentezlenir. Enfeksiyonun kontrol altına alınmasında önemli olan makrofaj aktivasyonu, granüloma oluşumu, T hücre stimülasyonu ve kemokin endüksiyonu gibi birçok reaksiyonda rol alır. TNF- α TB plözili hastaların plevra sıvılarında, malign plözili hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı biçimde daha yüksek bulunmuş; artmış plevral sıvı TNF- α düzeylerinin, TB plözili hastalardaki plevral kalınlaşma ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (165). Diğer yandan, romatoid artritli hastalara uygulanan anti-TNF- α tedavisinin komplikasyonu olarak gelişen TB reaktivasyonu, TNF- α 'nın MTB'in granülom içerisinde kontrol altında tutulmasında önemli olduğunu kanıtlamaktadır (166). Bizim çalışmamızda, TB plörezi grubunda plevra TNF- α düzeyleri her iki kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo-15). Plevral sıvıda TNF- α düzeylerinde gözlenen bu selektif artış, Ogawa ve arkadaşları (167) ve Hua ve arkadaşlarının (165) sonuçları ile uyumludur. Plevral sıvıda yüksek

konsantrasyonlarda bulunan TNF- α 'nın, bakteriyel eliminasyonu ve granüloma oluşumu ile idamesini kolaylaştıran bir faktör olduğunu düşündürmektedir.

IL-8, enflamatuvar hücreleri enfeksiyon alanına toplayarak MTB'e karşı etkin konak savunmasının sağlanmasında rol oynayan önemli bir kemokindir. Çalışmamızda, TB plörezi grubunda plevra IL-8 düzeyleri, malign plörezi ile TB/malign-dışı plörezi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmış bulundu (Tablo-16). Sonuçlarımız, Yamada ve arkadaşları (168)'nin bulguları ile benzerlik göstermektedir. IL-8'in artması, koruyucu hücrel immün cevap için gerekli olan hücrelerin bakterinin bulunduğu alanda toplanmasını; böylece makrofaj içindeki basillerin akciğerin sağlam bölgelerine yayılmasını engelleyen granülom oluşumu için gerekli hücrelerin enfeksiyon alanında hazır bulunmasını sağladığını düşündürmektedir.

IL-4, Th2 hücreleri tarafından sentezlenen; Th1 hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* gelişimine engel olan anti-enflamatuvar etkili bir sitokindir. Çalışmamızda TB plörezi hastaların plevra sıvılarında IL-4 düzeyleri malign plörezi grubundakilere göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. Değerler TB/malign-dışı plörezi grubundakilere göre de daha düşük olmakla birlikte, farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterildi (Tablo-17). IL-4 konsantrasyonundaki bu azalma, TB plörezi de etkin olan koruyucu Th1 yanıtının Th2 yanıtının baskılanmasının bir sonucu olabilir.

IL-13 çeşitli immünomodülatör özellikleri ile IL-4'e benzerlik gösteren bir diğer sitokindir. Seah ve arkadaşları (169) hastalığın derecesi ile Th2 gen aktivasyonunun ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, pulmoner TB'lu hastalarda IL-13 ve IL-4 mRNA ekspresyonunu, tüberkülin pozitif kontrol grubundan yüksek bulmuşlardır. IL-13 ve IL-4 mRNA ekspresyonu ile radyolojik bulguların şiddeti ve Th2 cevabının biyolojik göstergesi olan serum IgE düzeyleri arasında da anlamlı ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda TB plörezi grubunda plevra IL-13 düzeyleri, kontrol gruplarından malign plörezi grubunun değerlerine göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Sonuçlar, TB/malign-dışı plörezi grubundakilere göre de daha yüksek olmasına rağmen farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Tablo-18).

IL-10, *in vitro* ve *in vivo* anti-enflamatuvar özelliklere sahip bir sitokin olup; proenflamatuvar sitokin sekresyonunu inhibe, inhibitör özellikte olan sTNFR'ünü stimüle eder. Bu inhibitör özelliklerine zıt olarak MTB'e karşı makrofaj aktivasyonunu sağlamak için DC'i aktive eder. IL-10 sadece Th2 lenfositlerden ve Treg hücrelerden değil, monositler, CD8⁺ T (Tc2) hücreleri ve keratinositler tarafından da salgımlanabilir. Yapılan çalışmalarda, TB plörezi hastaların plevral sıvılarında IL-10 konsantrasyonunun arttığı

ortaya konmuş ve IL-10'un lokal immün yanıtı sınırladığı bildirilmiştir (126, 128). Çalışmamızda ise TB plörezi olgularının plevra IL-10 düzeyleri malign plörezi grubundan daha düşük, TB/malign-dışı plörezi grubundan ise daha yüksek bulunmasına rağmen bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo-19). Malign plörezi grubunda IL-10 düzeylerinin daha yüksek saptanması, konağın geliştirdiği anti-tümöral immün yanıtın IL-10 tarafından baskılanarak tümörün gelişimi ve ilerlemesi lehine bir durum yaratıldığını düşündürebilir. TB plörezide TB/malign-dışı plöreziye göre artmış IL-10 yanıtı ise uzun süreli aşırı immün yanıt sonucu ortaya çıkabilecek lokal doku hasarının sınırlandırılması için konağın geliştirdiği bir mekanizma ile ilgili olabilir.

Fas ligand (FasL), apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynayan tip II membran proteindir. FasL'in solübl formu (sFasL), serum, plevral efüzyonlar, beyin omurilik sıvısı, oküler sıvı gibi vücut sıvılarında bulunur. Çalışmamızda TB plörezi olgularının plevra sıvısı sFasL düzeyleri, malign plörezi ve TB/malign-dışı plörezi grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Tablo-20). Wu ve arkadaşları (170) da benzer olarak TB plörezi olgularında plevra sıvısı sFasL düzeylerini, transüda ve malign plörezi gruplarından yüksek bulmuşlardır. Wang ve arkadaşlarının (171) farklı klinik tanıları olan plevral efüzyonlarda sFasL düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında da bakteriyel ampiyem ve TB plörezi olgularında, plevral sıvı sFasL düzeylerinin malign, transüda ve komplike olmayan parapnömonik efüzyonlardaki değerlerden anlamlı biçimde yüksek olduğu gösterilmiştir. TB'a bağlı plevral efüzyonlarda sFasL konsantrasyonlarının diğer plörezi gruplarından anlamlı bir şekilde yüksek bulunması; sFasL'dan tanı konulmamış plevral efüzyonların ayırt edilmesinde diyagnostik bir marker olarak yararlanılabileceğini düşündürmektedir.

sFasL'in patogenezdaki yeri tartışmalıdır. MTB'in Fas/FasL yolu ile reaktif $\gamma\delta$ T hücrelerinin apoptozunu endüklediği gösterilmiştir (170). MTB ile enfekte makrofajlarda FasL'in ekspresyonu artar; MTB'e özgül sitotoksik T hücrelerinin apoptozu endüklenerek bu hücrelerin sitotoksik etkisi engellenir (172). Diğer taraftan MTB'e karşı konak savunması da Fas sisteminden yararlanabilmektedir. Rekombinant sFasL'in MTB ile enfekte makrofajlarda apoptozu endüklediği ve böylece bakteri yükünü azalttığı gösterilmiştir (173). sFasL'in apoptozu artırdığına ilişkin ortak inanca karşılık, membrana bağlı Fas'ın apoptotik aktivitesini aşağıya çektiği düşünülmekte; buna göre sFasL apoptozu inhibe eden bir faktör olarak kabul edilmektedir. TB plörezide sFasL konsantrasyonlarının artması mikobakteri enfeksiyonunun bulunduğu alanda efektör hücrelerin yaşam sürelerini uzatmada ve etkili immün yanıtın sürekliliğini sağlamada rol oynayabilir.

sFas da apoptozu bloke ederek tümörün bulunduğu alanlarda efektör hücrelerin tümör hücrelerini öldürmesini önleyebilir. Mitani ve arkadaşları (174) tarafından yapılan çalışmalarda, malign plevral efüzyonlardaki sFas düzeylerinin, transüda ve TB'a bağlı plevral efüzyonlardan anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda da malign plörezili hastaların plevra sıvılarındaki sFas düzeyleri, TB plörezi ve TB/malign-dışı plörezi gruplarından daha yüksek bulundu (Tablo-20). Bu sonuçlar sFas'ın, malign plevral efüzyonlarda, tümör hücrelerinin geliştirdiği lokal immün süpresyonda rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

TB plörezi de en önemli hücre grubunun lenfositler olduğu, T hücre bağımlı hücre sel immünitinin bu hastalığın lokal patojenik mekanizmalarında önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (175, 176). MTB enfeksiyonuna karşı spesifik hücre sel immünite, makrofajların lokal aktivasyonunu ve granüloma oluşumu için monositlerin toplanmasını sağlayan sitokinleri sekrete eden koruyucu CD4⁺ T hücre popülasyonunun ortaya çıkışı ile tanımlanmaktadır (117). TB'da T lenfositlerin özellikle T helper-endüktör (CD4⁺ T lenfositler) grubunun lezyon bölgesine göç ederek buralarda immün yanıtı regüle ettiği; buna karşın periferdeki T lenfosit oranlarının genellikle düştüğü çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (176-178).

Perforin ve granzim B gibi litik moleküller salarak enfekte hücreleri öldürmelerinin yanı sıra IFN- γ üreterek makrofajların daha fazla aktive olmasını sağlayan CD8⁺ T hücrelerinin (90), lezyon bölgesinde sayı ve oranlarında anlamlı farklılıkların olmadığı bildirilmektedir (179).

Oral ve arkadaşları (178) CD3⁺ hücre oranlarını, TB plörezili olguların plevra sıvısında aynı olguların periferik kan örneklerinden ve TB-dışı plörezili olguların periferik kan ve plevra sıvısı örneklerinden daha yüksek bulmuşlar; CD4⁺ T hücre oranları için de benzer sonuçlar elde etmelerine karşılık CD8⁺ T hücre oranlarında değişiklik gözlememişlerdir. TB plörezili olguların plevra sıvılarında CD4/CD8 T lenfosit oranlarının anlamlı olarak artış gösterdiğini bildirmişlerdir (178). Guzman ve arkadaşlarının (180) yaptığı bir çalışmada ise TB plörezi ile malign plörezi ve konjestif kalp yetmezliği hastalarından alınan plevra sıvılarında immünperoksidaz yöntemiyle lenfosit alt grupları araştırılmış, T hücre (CD3⁺) oranlarının ve CD4/CD8 T lenfosit oranlarının gruplar arasında farklılık göstermediği ortaya konmuştur. Çalışmada aktivasyon markeri olarak CD25 (IL-2 reseptör) taşıyan T lenfosit oranları, TB plörezi ve malign plörezili olguların plevra sıvısı hücrelerinde, konjestif kalp yetmezliği olgularından daha yüksek bulunmuştur. HLA-DR⁺ T hücre oranının da TB plörezili olguların plevral

mononükleer hücrelerinde konjestif kalp yetmezliği olgularına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda da TB plörezi olguları ile kontrol olguları arasında plevra sıvısı T hücre oranları, CD4+ T lenfosit oranları, CD8+ T lenfosit oranları, CD4/CD8 oranları, aktivasyon belirteçleri (CD25 ve CD69) açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar saptanmamıştır (Tablo-21).

TB plörezi olgularında, lezyon bölgesinde lenfositlerin artışı, özellikle T yardımcı/endüktör lenfositlerin artışı gösteren çalışmalar (175-178) ile bizim sonuçlarımız uyumlu değildi. Çalışmamızda elde edilen veriler, TB plörezi ile TB-dışı plöreziilerin ayırıcı tanısında plevral sıvı lenfosit alt gruplarının yardımcı olamayacağını düşündürmektedir.

Çalışmamızda TB plörezi olguların plevra sıvısı B (CD19+) lenfosit oranlarında malign plörezi ve TB/malign-dışı plörezi olayları ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmaması (Tablo-21), TB'a karşı koruyucu immünitede humoral immün yanıtın rolü olmadığını kanıtlamaktadır (175, 177, 181, 182).

TB'a karşı koruyucu immün yanıtta rol aldığı düşünülen lenfosit gruplarından biri de $\gamma\delta$ T lenfositleridir. MTB ile aktive edilmiş $\gamma\delta$ T hücre dizileri IFN- γ , GM-CSF, IL-13, TNF- α ve çok az miktarlarda IL-4 ve IL-5 salgırlar. Salgılanan bu sitokinlerin her birinin anti-mikobakteriyel savunmada çok önemli etkinlikleri vardır. IFN- γ ve GM-CSF makrofaj aktivasyonunda, IL-13 dev hücre oluşumunda, TNF- α mikobakterilerin öldürülmesinde etkilidir (110). Barnes ve arkadaşları (110) TB'da $\gamma\delta$ T lenfositlerinin rolünü araştırmışlar; normal sağlıklı kişiler, TB plörezi olgular ve pulmoner TB'lu hastaların periferik kan lenfositlerinin %3,2-%5'ini bu hücrelerin oluşturduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada hasta gruplarına ait periferik kan mononükleer hücreleri ısı ile öldürülmüş MTB ile *in vitro* stimüle edildiklerinde, özellikle TB plörezi hasta grubunda $\gamma\delta$ T lenfosit oranının %30 \pm 7'ye kadar yükseldiği; pulmoner TB'lu ve milyer TB'lu hastalarda ise çok anlamlı bir $\gamma\delta$ T lenfosit proliferasyonu saptanamadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar tüberküloid lepra'da da lepromatöz form ile karşılaştırıldığında, $\gamma\delta$ T lenfosit proliferasyonunun olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda TB plörezi grubunda $\gamma\delta$ + T hücre oranı, her iki kontrol grubuna (özellikle malign plörezi grubuna) göre artmış bulunmuştur (Tablo-21). Aktivasyon markerleri CD25 ve CD69'u taşıyan $\gamma\delta$ + T hücre oranlarında ise gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. TB plörezi grubunda elde ettiğimiz bu veriler, antijen spesifik $\gamma\delta$ T lenfositlerin mikobakteriyel enfeksiyona immün dirençte rol aldığı iddialarını desteklemektedir.

NKT hücreleri (CD3+CD16+CD56+), NK ve T hücrelerinin özelliklerini taşıyan bir T hücre alt grubudur. Non-klasik CD1d molekülü ile sunulan glikolipid ve α -galaktozilseramid gibi antijenleri tanırlar. Daha çok CD4+CD8⁻ ya da çift negatif (CD4⁻CD8⁻) olan NKT hücreleri güçlü sitotoksik hücrelerdir. Proenflamatuvar sitokinler sentezleyerek, enfekte makrofajları lize ederek, granülozin ve perforin gibi antimikrobiyal peptidleri eksprese ederek anti mikrobiyal savunmada rol aldıkları ileri sürülmektedir (183). Çalışmamızda bu hücrelerin oranlarında gruplar arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi (Tablo-21).

Çalışmamızda plevral sıvı NK hücre oranlarında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo-21). Okuba ve arkadaşlarının (184) karsinomatoz ve TB plörezili hastalarda yaptıkları bir çalışmada, bizim sonuçlarımızı destekleyen bulgular elde edilmiş ve iki grup arasında NK hücre oranlarında anlamlı fark bulunmamış fakat TB plörezili grupta plevra sıvısı NK hücre aktivitesinin, karsinomatoz orjinli plevral sıvıdakinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Santiago ve arkadaşları (175) TB'un farklı klinik durumlarında ve vücut sıvılarında yaptıkları çalışmada plevra sıvısı NK hücre oranlarında, gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Ota ve arkadaşları (185) TB orijinli plevral efüzyonlarda NK hücre aktivitesini değerlendirmişler; plevra sıvısı mononükleer hücreleri ve PBMC'leri PPD ile stimüle edildikten sonra bir aktivasyon markeri olan IL-2R taşıyan NK hücrelerini araştırmışlar ve plevral efüzyonda NK aktivitesinin daha güçlü olduğunu göstermişlerdir. Tüm bu bilgiler, TB plörezide NK hücrelerinin rolünü değerlendirirken; sayı ve oranlarının karşılaştırılmasından çok NK aktivitesini saptamanın daha doğru bir yaklaşım olacağını düşündürmektedir.

MTB enfeksiyonlarında Fas/Apo-1 (CD95) aracılığıyla Th1 hücrelerinin apoptozunun meydana gelebileceği ve bu olayın MTB'ye karşı koruyucu immünitinin zayıflaması ve hastalığa duyarlılığın artması ile sonuçlanacağı ileri sürülmektedir (53). Çalışmamızda plevral sıvı CD95+ lenfosit oranları değerlendirildiğinde TB plörezili hastalarla kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo-21). TB plörezide CD95+ lenfosit oranlarının diğer gruplara göre artmış bulunmaması TB plörezide koruyucu hücrel immünitede etkin rol oynayan Th1 hücrelerinin ortamda varlığını ve dolayısıyla etkisini sürdürdürebildiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada elde edilen verilerin ışığı altında, TB'daki koruyucu immünitede Th1 tipi spesifik hücrel immünitinin primer yanıt olduğu; ESAT-6 ve CFP-10'un TB plörezili olgularda bu yanıtı endükledikleri ve sonuçta bu peptidlerin TB aşı preparasyonlarında yer almalarının koruyucu etkinliği daha güçlü aşuların geliştirilmesini

sağlayabileceği; ESAT-6 ve CFP-10'un tanı testlerinde yer almasının BCG'ye bağlı Tüberkulin testi pozitifliği ile doğal enfeksiyonun ayırımında ve özellikle TB'un endemik olmadığı bölgelerde tanıda kullanılabileceği ortaya konmuştur. Bununla birlikte, ESAT-6 ve CFP-10'un kompleks immünomodülatör etkilerini açıklığa kavuşturacak yeni, özellikle *in vivo*, çalışmalara gereksinim vardır.

6. EKLER

EK 1

Zenginleştirilmiş RPMI-1640

Zenginleştirilmiş RPMI-1640, 500 ml RPMI 1640 medium (Biochrom Ag, Almanya, Katalog no: F 1215) içine aşağıda sıralanmış reaktiflerin ilavesi ile hazırlandı.

- 50 ml FCS (Biological Industries,Israel, Katalog no:04-001-1A)
- 10 ml Penicillin/Streptomycin/Kanamycin karışımı (5 ml Penicillin/Streptomycin, (10000), Gibco Katalog no: 15140-122+ 5 ml Kanamycin (100x) Gibco, Katalog no: 15160-047)
- 10 ml MEM Vitamin/L- Glutamine karışımı (5 ml Vitamin (100x), Gibco Katalog no:11120-037+ 5 ml L- Glutamine 200mM, Gibco, Katalog no: 25030-024)
- 10 ml Na-Pyruvate/Non essential AS (MEM non essential amino acids (100x) Gibco, Katalog no: 11140-035+5 ml Na pyruvate MEM 100mM, Gibco, Katalog no: 11360-039)
- 500 µl beta-Mercaptoethanol 50 mM Gibco, Katalog no: 31350-010

7. KAYNAKLAR

1. HERZOG H. History of tuberculosis. *Respiration*, 65: 5-15, 1998.
2. SMITH I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*, 16: 463-96, 2003.
3. BILGEHAN H. Klinik Mikrobiyoloji, 8. baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, sayfa 344, 1993.
4. DANIEL TM BJ, DOWNES KA. History of tuberculosis. Editor: BLOOM BR. *Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control*, American Society for Microbiology press, Washington, page 17, 1994.
5. KOCABAŞ A. Akciğer Tüberkülozu. Editörler: Wilke T, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, sayfa 396-442, 1996.
6. VAN CREVEL R, OTTENHOFF TH, VAN DER MEER JW. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, 15: 294-309, 2002.
7. RAVIGLIONE MC, SNIDER DE, JR., KOCHI A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *Jama*, 273: 220-6, 1995.
8. PEKŞEN Y. Tüberküloz sürveyans çalışmalarına pratik yaklaşım ve önemi. 21. yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve 2. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu kitabı, Otak Form-Ofset Basım Sanayi Ticaret A.Ş., Samsun, sayfa 251, 2003.
9. ERDOĞAN B. Erişkin tipi tüberkülozda tanı. Editör: Özyardımcı N. *Akciğer ve Akciğer Dışı Organ Tüberkülozları*, Uludağ Üniversitesi Basımevi Müdürlüğü, BURSA, sayfa 61-63, 2004.
10. GEDİKOĞLU S. Tüberküloz bakteriyolojisi ve Mikrobiyolojik tanı yöntemleri. Editör: Özyardımcı N. *Akciğer ve Akciğer Dışı Organ Tüberkülozları*, cilt 3, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, sayfa 4-5, 1999.
11. ERSOY C. Atipik mikobakteri enfeksiyonları. Editör: Özyardımcı N. *Akciğer ve Akciğer Dışı Organ Tüberkülozları*, Uludağ Üniversitesi Basımevi müdürlüğü, Bursa, sayfa 21-29, 2004.
12. GEDİKOĞLU S. Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı. *İnfeks Derg*, (suppl 11):13-18, 1998.
13. DAFTE M, ETIENNE G. The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis*, 79: 153-69, 1999.
14. KARAKOUSIS PC, BISHAI WR, DORMAN SE. Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. *Cell Microbiol*, 6: 105-16, 2004.
15. SCHLUGER NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res*, 2: 157-63, 2001.
16. STOKES RW, NORRIS-JONES R, BROOKS DE, BEVERIDGE TJ, DOXSEE D, THORSON LM. The glycan-rich outer layer of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun*, 72: 5676-86, 2004.
17. SUNG N, TAKAYAMA K, COLLINS MT. Possible association of GroES and antigen 85 proteins with heat resistance of Mycobacterium paratuberculosis. *Appl Environ Microbiol*, 70: 1688-97, 2004.
18. AL-ATTIYAH R, MUSTAFA AS, ABAL AT, EL-SHAMY AS, DALEMANS W, SKEIKY YA. In vitro cellular immune responses to complex and newly defined recombinant antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, 138: 139-44, 2004.

19. QAMRA R, MANDE SC, COATES AR, HENDERSON B. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 85(5-6):385-94, 2005.
20. KILIÇTURGAY K. *İmmünoloji 2003*, 3.baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, Bursa, sayfa 68, 2003.
21. PRENETA R, PAPA VINASASUNDARAM KG, COZZONE AJ, DUCLOS B. Autophosphorylation of the 16 kDa and 70 kDa antigens (Hsp 16.3 and Hsp 70) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 150: 2135-41, 2004.
22. ROSENKRANDS I, WELDINGH K, RAVN P, BRANDT L, HOJRUP P, RASMUSSEN PB, COATES AR, SINGH M, MASCAGNI P, ANDERSEN P. Differential T-cell recognition of native and recombinant *Mycobacterium tuberculosis* GroES. *Infect Immun*, 67: 5552-8, 1999.
23. CHUA-INTRA B, WILKINSON RJ, IVANYI J. Selective T-cell recognition of the N-terminal peptide of GroES in tuberculosis. *Infect Immun*, 70: 1645-7, 2002.
24. LAUNOIS P, N'DIAYE MN, CARTEL JL, MANE I, DROWART A, VAN VOOREN JP, SARTHOU JL, HUYGEN K. Fibronectin-binding antigen 85 and the 10-kilodalton GroES-related heat shock protein are the predominant TH-1 response inducers in leprosy contacts. *Infect Immun*, 63: 88-93, 1995.
25. CARDOSO FL, ANTAS PR, MILAGRES AS, GELUK A, FRANKEN KL, OLIVEIRA EB, TEIXEIRA HC, NOGUEIRA SA, SARNO EN, KLATSER P, OTTENHOFF TH, SAMPAIO EP. T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. *Infect Immun*, 70: 6707-14, 2002.
26. NOSS EH, PAI RK, SELLATI TJ, RADOLF JD, BELISLE J, GOLENBOCK DT, BOOM WH, HARDING CV. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 167: 910-8, 2001.
27. ROCHE PW, WINTER N, TRICCAS JA, FENG CG, BRITTON WJ. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 in recombinant *Myco. smegmatis*: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, 103: 226-32, 1996.
28. ROCHE PW, FENG CG, BRITTON WJ. Human T-cell epitopes on the *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein MPT64. *Scand J Immunol*, 43: 662-70, 1996.
29. CARR MD, BLOEMINK MJ, DENTTEN E, WHELAN AO, GORDON SV, KELLY G, FRENKIEL TA, HEWINSON RG, WILLIAMSON RA. Solution structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex protein MPB70: from tuberculosis pathogenesis to inherited human corneal disease. *J Biol Chem*, 278: 43736-43, 2003.
30. AL-ATTIYAH R, MUSTAFA AS. Computer-assisted prediction of HLA-DR binding and experimental analysis for human promiscuous Th1-cell peptides in the 24 kDa secreted lipoprotein (LppX) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol*, 59: 16-24, 2004.
31. MUSTAFA AS. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Mol Immunol*, 39: 113-9, 2002.
32. HARBOE M, OETTINGER T, WIKER HG, ROSENKRANDS I, ANDERSEN P. 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, 1996.

33. MAHAIRAS GG, SABO PJ, HICKEY MJ, SINGH DC, STOVER CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*, 178: 1274-82, 1996.
34. VAN PINXTEREN LA, RAVN P, AGGER EM, POLLOCK J, ANDERSEN P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 155-60, 2000.
35. TRAJKOVIC V, NATARAJAN K, SHARMA P. Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins. *Microbes Infect*, 6: 513-9, 2004.
36. TRAJKOVIC V, SINGH G, SINGH B, SINGH S, SHARMA P. Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-specific 10-kilodalton antigen on macrophage release of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Infect Immun*, 70: 6558-66, 2002.
37. MUNOZ S, HERNANDEZ-PANDO R, ABRAHAM SN, ENCISO JA. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol*, 170: 5590-6, 2003.
38. HUNTER SW, GAYLORD H, BRENNAN PJ. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J Biol Chem*, 261: 12345-51, 1986.
39. 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*, 59: 1755-61, 1991.
40. MUELLER-ORTIZ SL, WANGER AR, NORRIS SJ. Mycobacterial protein HbhA binds human complement component C3. *Infect Immun*, 69: 7501-11, 2001.
41. SENARATNE RH, MOBASHERI H, PAPA VINASASUNDARAM KG, JENNER P, LEA EJ, DRAPER P. Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol*, 180: 3541-7, 1998.
42. VILLEGAS MV, LABRADA LA, SARAVIA NG. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase, and interferon-gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest*, 118: 1355-64, 2000.
43. FERRER J. Pleural tuberculosis. *Eur Respir J*, 10: 942-7, 1997.
44. PRABHA C JK, MATSA RP, DAS SD. Role of TNF-alpha in host immune response in tuberculous pleuritis. *Current Science*, 85: 639-642, 2003.
45. KHATAMI K. Pleural tuberculosis. *SEMJ*, 3, 2002.
46. GÖZÜ R. Tüberküloz plörezi. Editör: Yardımcı N. Akciğer ve Akciğer Dışı Organ Tüberkülozları, Uludağ Üniversitesi Basımevi Müdürlüğü, Bursa, sayfa 85-88, 2004.
47. ANTONY VB, SAHN SA, ANTONY AC, REPINE JE. Bacillus Calmette-Guerin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and in vitro. *J Clin Invest*, 76: 1514-21, 1985.
48. BARNES PF, FONG SJ, BRENNAN PJ, TWOMEY PE, MAZUMDER A, MODLIN RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN-gamma in tuberculous pleuritis. *J Immunol*, 145: 149-54, 1990.
49. KURASAWA T, SHIMOKATA K. Cooperation between accessory cells and T lymphocytes in patients with tuberculous pleurisy. *Chest*, 100: 1046-52, 1991.
50. PEREZ-RODRIGUEZ E, PEREZ WALTON IJ, SANCHEZ HERNANDEZ JJ, PALLARES E, RUBI J, JIMENEZ CASTRO D, DIAZ NUEVO G. ADA1/ADAp ratio in pleural tuberculosis: an excellent diagnostic parameter in pleural fluid. *Respir Med*, 93: 816-21, 1999.
51. DANNENBERG AM, JR. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today*, 12: 228-33, 1991.

52. ÖZTÜRK R. Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri. 21. yüzyılda Tüberküloz sempozyumu, 2.Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri kursu kitabı, Otak Form-Ofset Basım San. Tic. A.Ş., Samsun, sayfa 58-73, 2003.
53. RAJA A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*, 120: 213-32, 2004.
54. BRIGHTBILL HD, LIBRATY DH, KRUTZIK SR, YANG RB, BELISLE JT, BLEHARSKI JR, MAITLAND M, NORGARD MV, PLEVY SE, SMALE ST, BRENNAN PJ, BLOOM BR, GODOWSKI PJ, MODLIN RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285: 732-6, 1999.
55. EHLERS S, REILING N, GANGLOFF S, WOLTMANN A, GOYERT S. *Mycobacterium avium* infection in CD14-deficient mice fails to substantiate a significant role for CD14 in antimycobacterial protection or granulomatous inflammation. *Immunology*, 103: 113-21, 2001.
56. GOREN MB, D'ARCY HART P, YOUNG MR, ARMSTRONG JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 2510-4, 1976.
57. GORDON AH, HART PD, YOUNG MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature*, 286: 79-80, 1980.
58. 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 U S A*, 94: 5243-8, 1997.
59. SCANGA CA, MOHAN VP, TANAKA K, ALLAND D, FLYNN JL, CHAN J. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect Immun*, 69: 7711-7, 2001.
60. FLYNN JL, SCANGA CA, TANAKA KE, CHAN J. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J Immunol*, 160: 1796-803, 1998.
61. ROCKETT KA, BROOKES R, UDALOVA I, VIDAL V, HILL AV, KWIATKOWSKI D. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun*, 66: 5314-21, 1998.
62. NICHOLSON S, BONECINI-ALMEIDA MDA G, LAPA E SILVA JR, NATHAN C, XIE QW, MUMFORD R, WEIDNER JR, CALAYCAY J, GENG J, BOECHAT N, LINHARES C, ROM W, HO JL. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med*, 183: 2293-302, 1996.
63. APPELBERG R, CASTRO AG, GOMES S, PEDROSA J, SILVA MT. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. *Infect Immun*, 63: 3381-7, 1995.
64. RIEDEL DD, KAUFMANN SH. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun*, 65: 4620-3, 1997.
65. PERSKVIST N, LONG M, STENDAHL O, ZHENG L. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol*, 168: 6358-65, 2002.
66. PERSKVIST N, ZHENG L, STENDAHL O. Activation of human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra involves phospholipase C gamma 2, Shc adapter protein, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*, 164: 959-65, 2000.

67. ORANGE JS, WANG B, TERHORST C, BIRON CA. Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med*, 182: 1045-56, 1995.
68. DOOLAN DL, HOFFMAN SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol*, 163: 884-92, 1999.
69. GARCIA-PENARRUBIA P, KOSTER FT, KELLEY RO, MCDOWELL TD, BANKHURST AD. Antibacterial activity of human natural killer cells. *J Exp Med*, 169: 99-113, 1989.
70. 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*, 172: 130-7, 2004.
71. ESIN S, BATONI G, KALLENIUS G, GAINES H, CAMPA M, SVENSON SB, ANDERSSON R, WIGZELL H. Proliferation of distinct human T cell subsets in response to live, killed or soluble extracts of *Mycobacterium tuberculosis* and *Myc. avium*. *Clin Exp Immunol*, 104: 419-25, 1996.
72. RATCLIFFE LT, LUKEY PT, MACKENZIE CR, RESS SR. Reduced NK activity correlates with active disease in HIV- patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, 97: 373-9, 1994.
73. BERMUDEZ LE, YOUNG LS. Natural killer cell-dependent mycobacteriostatic and mycobactericidal activity in human macrophages. *J Immunol*, 146: 265-70, 1991.
74. MOLLOY A, MEYN PA, SMITH KD, KAPLAN G. Recognition and destruction of *Bacillus Calmette-Guerin*-infected human monocytes. *J Exp Med*, 177: 1691-8, 1993.
75. VISINTIN A, MAZZONI A, SPITZER JH, WYLLIE DH, DOWER SK, SEGAL DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, 166: 249-55, 2001.
76. MEANS TK, WANG S, LIEN E, YOSHIMURA A, GOLENBOCK DT, FENTON MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 163: 3920-7, 1999.
77. UNDERHILL DM, OZINSKY A, SMITH KD, ADEREM A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 14459-63, 1999.
78. REILING N, HOLSCHER C, FEHRENBACH A, KROGER S, KIRSCHNING CJ, GOYERT S, EHLERS S. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 169: 3480-4, 2002.
79. HOLSCHER C, ATKINSON RA, ARENDSE B, BROWN N, MYBURGH E, ALBER G, BROMBACHER F. A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. *J Immunol*, 167: 6957-66, 2001.
80. LAAL S, SAMANICH KM, SONNENBERG MG, ZOLLA-PAZNER S, PHADTARE JM, BELISLE JT. Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high-molecular-mass antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4: 49-56, 1997.
81. BRAIBANT M, DE WIT L, PEIRS P, KALAI M, OOMS J, DROWART A, HUYGEN K, CONTENT J. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen 88, a protein related to the *Escherichia coli* PstA periplasmic phosphate permease subunit. *Infect Immun*, 62: 849-54, 1994.

82. CARLIN NI, LOFDAHL S, MAGNUSSON M. Monoclonal antibodies specific for elongation factor Tu and complete nucleotide sequence of the *tuf* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 60: 3136-42, 1992.
83. GARSIA RJ, HELLQVIST L, BOOTH RJ, RADFORD AJ, BRITTON WJ, ASTBURY L, TRENT RJ, BASTEN A. Homology of the 70-kilodalton antigens from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* with the *Mycobacterium tuberculosis* 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infect Immun*, 57: 204-12, 1989.
84. HIRSCHFIELD GR, MCNEIL M, BRENNAN PJ. Peptidoglycan-associated polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 172: 1005-13, 1990.
85. SHINNICK TM, PLIKAYTIS BB, HYCHE AD, VAN LANDINGHAM RM, WALKER LL. The *Mycobacterium tuberculosis* BCG-a protein has homology with the *Escherichia coli* GroES protein. *Nucleic Acids Res*, 17: 1254, 1989.
86. ARAUJO Z, WAARD JH, FERNANDEZ DE LARREA C, LOPEZ D, FANDINO C, MALDONADO A, HERNANDEZ E, OCANA Y, ORTEGA R, SINGH M, OTTENHOFF TH, AREND SM, CONVIT J. Study of the antibody response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Warao Amerindian children in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99: 517-24, 2004.
87. DAVENPORT MP, MCKENZIE KR, BASTEN A, BRITTON WJ. The variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70-kilodalton heat shock protein is the target for humoral immune responses. *Infect Immun*, 60: 1170-7, 1992.
88. MEEKER HC, WILLIAMS DL, ANDERSON DC, GILLIS TP, SCHULLER-LEVIS G, LEVIS WR. Analysis of human antibody epitopes on the 65-kilodalton protein of *Mycobacterium leprae* by using synthetic peptides. *Infect Immun*, 57: 3689-94, 1989.
89. JULIAN E, MATAS L, PEREZ A, ALCAIDE J, LANEELLE MA, LUQUIN M. Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J Clin Microbiol*, 40: 3782-8, 2002.
90. SERBINA NV, LIU CC, SCANGA CA, FLYNN JL. CD8⁺ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *J Immunol*, 165: 353-63, 2000.
91. SERBINA NV, FLYNN JL. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun*, 67: 3980-8, 1999.
92. FENG CG, BEAN AGD, HOOÏ H, BRISCOE H, BRITTON WJ. Increase in gamma interferon-secreting CD8⁺, as well as CD4⁺, T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 67:3242-7, 1999.
93. FLYNN JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)*, 84: 93-101, 2004.
94. SCANGA CA, MOHAN VP, YU K, JOSEPH H, TANAKA K, CHAN J, FLYNN JL. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med*, 192: 347-58, 2000.
95. CARUSO AM, SERBINA N, KLEIN E, TRIEBOLD K, BLOOM BR, FLYNN JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol*, 162: 5407-16, 1999.
96. CO DO, HOGAN LH, KIM SI, SANDOR M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol*, 113: 130-6, 2004.

97. COLLINS HL, KAUFMANN SH. The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology*, 103: 1-9, 2001.
98. LYADOVA IV, OBERDORF S, KAPINA MA, APT AS, SWAIN SL, SAYLES PC. CD4 T cells producing IFN-gamma in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype. *Clin Exp Immunol*, 138: 21-9, 2004.
99. GUYOT-REVOL V, INNES JA, HACKFORTH S, HINKS T, LALVANI A. Regulatory T Cells are Expanded in Blood and Disease Sites in Tuberculosis Patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005.
100. SCHAIBLE UE, WINAU F, SIELING PA, FISCHER K, COLLINS HL, HAGENS K, MODLIN RL, BRINKMANN V, KAUFMANN SH. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med*, 9: 1039-46, 2003.
101. URDAHL KB, LIGGITT D, BEVAN MJ. CD8+ T cells accumulate in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected Kb-/-Db-/- mice, but provide minimal protection. *J Immunol*, 170: 1987-94, 2003.
102. FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, TRIEBOLD KJ, KOLLER B, BLOOM BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 12013-7, 1992.
103. SOUSA AO, MAZZACCARO RJ, RUSSELL RG, LEE FK, TURNER OC, HONG S, VAN KAER L, BLOOM BR. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4204-8, 2000.
104. LAZAREVIC V, FLYNN J. CD8+ T cells in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 1116-21, 2002.
105. STENGER S, NIAZI KR, MODLIN RL. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, 161: 3582-8, 1998.
106. SCHAIBLE UE, HAGENS K, FISCHER K, COLLINS HL, KAUFMANN SH. Intersection of group I CD1 molecules and mycobacteria in different intracellular compartments of dendritic cells. *J Immunol*, 164: 4843-52, 2000.
107. LEE J, CHOI K, OLIN MR, CHO SN, MOLITOR TW. Gammadelta T cells in immunity induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Infect Immun*, 72: 1504-11, 2004.
108. DIELI F, IVANYI J, MARSH P, WILLIAMS A, NAYLOR I, SIRECI G, CACCAMO N, DI SANO C, SALERNO A. Characterization of lung gamma delta T cells following intranasal infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*, 170: 463-9, 2003.
109. SZEREDAY L, BALIKO Z, SZEKERES-BARTHO J. Gamma/delta T cell subsets in patients with active Mycobacterium tuberculosis infection and tuberculin anergy. *Clin Exp Immunol*, 131: 287-91, 2003.
110. BARNES PF, GRISSO CL, ABRAMS JS, BAND H, REA TH, MODLIN RL. Gamma delta T lymphocytes in human tuberculosis. *J Infect Dis*, 165: 506-12, 1992.
111. DIELI F, TROYE-BLOMBERG M, FAROUK SE, SIRECIL G, SALERNO A. Biology of gammadelta T cells in tuberculosis and malaria. *Curr Mol Med*, 1: 437-46, 2001.
112. STENGER S, MODLIN RL. T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Curr Opin Microbiol*, 2: 89-93, 1999.

113. BOOM WH, CHERVENAK KA, MINCEK MA, ELLNER JJ. Role of the mononuclear phagocyte as an antigen-presenting cell for human gamma delta T cells activated by live *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 60: 3480-8, 1992.
114. KIDD P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*, 8: 223-46, 2003.
115. ZHANG M, GATELY MK, WANG E, GONG J, WOLF SF, LU S, MODLIN RL, BARNES PF. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest*, 93: 1733-9, 1994.
116. JOUANGUY E, ALTARE F, LAMHAMEDI S, REVY P, EMILE JF, NEWPORT M, LEVIN M, BLANCHE S, SEBOUN E, FISCHER A, CASANOVA JL. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med*, 335: 1956-61, 1996.
117. COOPER AM, MAGRAM J, FERRANTE J, ORME IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*, 186: 39-45, 1997.
118. ALTARE F, DURANDY A, LAMMAS D, EMILE JF, LAMHAMEDI S, LE DEIST F, DRYSDALE P, JOUANGUY E, DOFFINGER R, BERNAUDIN F, JEPSSON O, GOLLOB JA, MEINL E, SEGAL AW, FISCHER A, KUMARARATNE D, CASANOVA JL. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*, 280: 1432-5, 1998.
119. MCDYER JF, HACKLEY MN, WALSH TE, COOK JL, SEDER RA. Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4+ T cell counts have impaired Th1 responses. *J Immunol*, 158: 492-500, 1997.
120. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest*, 101: 711-21, 1998.
121. VANKAYALAPATI R, WIZEL B, WEIS SE, SAMTEN B, GIRARD WM, BARNES PF. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis*, 182: 234-9, 2000.
122. OHTEKI T. Critical role for IL-15 in innate immunity. *Curr Mol Med*, 2: 371-80, 2002.
123. PERERA LP, GOLDMAN CK, WALDMANN TA. IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes. *J Immunol*, 162: 2606-12, 1999.
124. UMEMURA M, NISHIMURA H, HIROSE K, MATSUGUCHI T, YOSHIKAI Y. Overexpression of IL-15 in vivo enhances protection against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection via augmentation of NK and T cytotoxic 1 responses. *J Immunol*, 167: 946-56, 2001.
125. UMEMURA M, NISHIMURA H, SAITO K, YAJIMA T, MATSUZAKI G, MIZUNO S, SUGAWARA I, YOSHIKAI Y. Interleukin-15 as an immune adjuvant to increase the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Infect Immun*, 71: 6045-8, 2003.
126. OLOBO JO, GELETU M, DEMISSIE A, EGUALE T, HIWOT K, ADERAYE G, BRITTON S. Circulating TNF- α , TGF- β , and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J Immunol*, 53: 85-91, 2001.
127. MURRAY PJ, WANG L, ONUFRYK C, TEPPER RI, YOUNG RA. T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J Immunol*, 158: 315-21, 1997.

128. MURRAY PJ, YOUNG RA. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, 67: 3087-95, 1999.
129. BOUSSIOTIS VA, TSAI EY, YUNIS EJ, THIM S, DELGADO JC, DASCHER CC, BEREZOVSKEYA A, ROUSSET D, REYNES JM, GOLDFELD AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest*, 105: 1317-25, 2000.
130. CONDOS R, ROM WN, LIU YM, SCHLUGER NW. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 729-35, 1998.
131. ROBERTS AB, SPORN MB, ASSOIAN RK, SMITH JM, ROCHE NS, WAKEFIELD LM, HEINE UI, LIOTTA LA, FALANGA V, KEHRL JH, ET AL. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 4167-71, 1986.
132. BONECINI-ALMEIDA MG, HO JL, BOECHAT N, HUARD RC, CHITALE S, DOO H, GENG J, REGO L, LAZZARINI LC, KRITSKI AL, JOHNSON WD, JR., MCCAFFREY TA, SILVA JR. Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis. *Infect Immun*, 72: 2628-34, 2004.
133. OTHIENO C, HIRSCH CS, HAMILTON BD, WILKINSON K, ELLNER JJ, TOOSI Z. Interaction of Mycobacterium tuberculosis-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10. *Infect Immun*, 67: 5730-5, 1999.
134. ALLEN SS, CASSONE L, LASCO TM, MCMURRAY DN. Effect of neutralizing transforming growth factor beta1 on the immune response against Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs. *Infect Immun*, 72: 1358-63, 2004.
135. ROOK GA, DHEDA K, ZUMLA A. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine*, 23: 2115-20, 2005.
136. REIDEL DD, KAUFMANN SHE. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with Mycobacterium tuberculosis and lipoarabinomannan. *Infection and Immunity*, 65(11):4620-4623, 1997.
137. AMEIXA C, FRIEDLAND JS. Interleukin-8 secretion from Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes is regulated by protein tyrosine kinases but not by ERK1/2 or p38 mitogen-activated protein kinases. *Infect Immun*, 70: 4743-6, 2002.
138. LU B, RUTLEDGE BJ, GU L, FIORILLO J, LUKACS NW, KUNKEL SL, NORTH R, GERARD C, ROLLINS BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med*, 187: 601-8, 1998.
139. CHENSUE SW, WARMINGTON KS, ALLENSPACH EJ, LU B, GERARD C, KUNKEL SL, LUKACS NW. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J Immunol*, 163: 165-73, 1999.
140. DAS SD, SUBRAMANIAN D, PRABHA C. Cell proliferation and apoptosis: dual-signal hypothesis tested in tuberculous pleuritis using mycobacterial antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 41: 85-92, 2004.
141. FAIRBAIRN IP. Macrophage apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. *Biochem Soc Trans*, 32: 496-8, 2004.

142. KORNFIELD H, MANCINO G, COLIZZI V. The role of macrophage cell death in tuberculosis. *Cell Death Differ*, 6: 71-8, 1999.
143. KLINGLER K, TCHOU-WONG KM, BRANDLI O, ASTON C, KIM R, CHI C, ROM WN. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect Immun*, 65: 5272-8, 1997.
144. KEANE J, BALCEWICZ-SABLINSKA MK, REMOLD HG, CHUPP GL, MEEK BB, FENTON MJ, KORNFIELD H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun*, 65: 298-304, 1997.
145. ZHANG M, GONG J, IYER DV, JONES BE, MODLIN RL, BARNES PF. T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest*, 94: 2435-42, 1994.
146. MALIK S, SCHURR E. Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chem Lab Med*, 40: 863-8, 2002.
147. MANJULA S SV. Microbial pathogenesis: An insight in to *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 20: 61-68, 2002.
148. NEWPORT M, LEVIN M, BLACKWELL J, SHAW MA, WILLIAMSON R, HUXLEY C. Evidence for exclusion of a mutation in NRAMP as the cause of familial disseminated atypical mycobacterial infection in a Maltese kindred. *J Med Genet*, 32: 904-6, 1995.
149. ORAL HB, BUDAK F, KUNT-UZASLAN E, BAŞTÜRK B, AKALIN H, BEKAR A, GÜLER H, AYMAK F, GÖRAL G. Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients affected by tuberculosis. *International Journal of Immunogenetics* (submitted paper).
150. SCARPELLINI P, TASCA S, GALLI L, BERETTA A, LAZZARIN A, FORTIS C. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol*, 42: 3469-74, 2004.
151. RENSHAW PS, PANAGIOTIDOU P, WHELAN A, GORDON SV, HEWINSON RG, WILLIAMSON RA, CARR MD. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem*, 277: 21598-603, 2002.
152. JALAPATHY KV, PRABHA C, DAS SD. Correlates of protective immune response in tuberculous pleuritis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40: 139-45, 2004.
153. DE LA BARRERA S, ALEMAN M, MUSELLA R, SCHIERLOH P, PASQUINELLI V, GARCIA V, ABBATE E, SASIAIN MDEL C. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on *Mycobacterium tuberculosis*-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol*, 138: 128-38, 2004.
154. DE WAAL MALEFYT R, ABRAMS J, BENNETT B, FIGDOR CG, DE VRIES JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174: 1209-20, 1991.
155. FIORENTINO DF, BOND MW, MOSMANN TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170: 2081-95, 1989.
156. BARNES PF, LU S, ABRAMS JS, WANG E, YAMAMURA M, MODLIN RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun*, 61: 3482-9, 1993.

157. PYM AS, BRODIN P, MAJLESSI L, BROSCHE R, DEMANGEL C, WILLIAMS A, GRIFFITHS KE, MARCHAL G, LECLERC C, COLE ST. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med*, 9: 533-9, 2003.
158. ULRICH T, MUNK ME, MOLLENKOPF H, BEHR-PERST S, COLANGELI R, GENNARO ML, KAUFMANN SH. Differential T cell responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur J Immunol*, 28: 3949-58, 1998.
159. LEIN AD, VON REYN CF, RAVN P, HORSBURGH CR, JR., ALEXANDER LN, ANDERSEN P. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to Mycobacterium avium complex and those with pulmonary disease due to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6: 606-9, 1999.
160. RAVN P, DEMISSIE A, EGUALE T, WONDWOSSON H, LEIN D, AMOUDY HA, MUSTAFA AS, JENSEN AK, HOLM A, ROSENKRANDS I, OFTUNG F, OLOBO J, VON REYN F, ANDERSEN P. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*, 179: 637-45, 1999.
161. WU-HSIEH BA, CHEN CK, CHANG JH, LAI SY, WU CH, CHENG WC, ANDERSEN P, DOHERTY TM. Long-lived immune response to early secretory antigenic target 6 in individuals who had recovered from tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 33: 1336-40, 2001.
162. EWER K, DEEKS J, ALVAREZ L, BRYANT G, WALLER S, ANDERSEN P, MONK P, LALVANI A. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet*, 361: 1168-73, 2003.
163. HIRAKI A, AOE K, EDA R, MAEDA T, MURAKAMI T, SUGI K, TAKEYAMA H. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest*, 125: 987-9, 2004.
164. SHIMOKATA K, SAKA H, MURATE T, HASEGAWA Y, HASEGAWA T. Cytokine content in pleural effusion. Comparison between tuberculous and carcinomatous pleurisy. *Chest*, 99: 1103-7, 1991.
165. HUA CC, CHANG LC, CHEN YC, CHANG SC. Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions. *Chest*, 116: 1292-6, 1999.
166. GOMEZ-REINO JJ, CARMONA L, VALVERDE VR, MOLA EM, MONTERO MD. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum*, 48: 2122-7, 2003.
167. OGAWA K, KOGA H, YANG B, FUKUDA M, OHNO H, YAMAMOTO Y, YANAGIHARA K, MIYAMOTO J, TOMONO K, HIRAKATA Y, TASHIRO T, KOHNO S. [Differential diagnosis of tuberculous pleurisy by the measurement of cytokine concentration in pleural effusion]. *Kekkaku*, 71: 663-9, 1996.
168. YAMADA Y, NAKAMURA A, HOSODA M, KATO T, ASANO T, TONEGAWA K, ITOH M. Cytokines in pleural liquid for diagnosis of tuberculous pleurisy. *Respir Med*, 95: 577-81, 2001.
169. SEAH GT, SCOTT GM, ROOK GA. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis*, 181: 385-9, 2000.
170. WU SH, CHU JJ, CHIANG CD. Increased soluble Fas ligand concentration in tuberculous pleural effusion. *J Formos Med Assoc*, 100: 32-4, 2001.

171. WANG PS, CHEN YM, HSIEH YL, YU CF, TSAI CM, PERNG RP. Pleural effusion and serum soluble fas-ligand levels are elevated in different clinical conditions. *Lung*, 180: 25-32, 2002.
172. MUSTAFA T, PHYU S, NILSEN R, BJUNE G, JONSSON R. Increased expression of Fas ligand on Mycobacterium tuberculosis infected macrophages: a potential novel mechanism of immune evasion by Mycobacterium tuberculosis? *Inflammation*, 23: 507-21, 1999.
173. 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*, 160: 5448-54, 1998.
174. MITANI K, NISHIOKA Y, YAMABE K, OGAWA H, MIKI T, YANAGAWA H, SONE S. Soluble Fas in malignant pleural effusion and its expression in lung cancer cells. *Cancer Sci*, 94: 302-7, 2003.
175. MONTES SANTIAGO J, GAMBON DEZA F, PACHECO CARRACEDO M, CERDA MOTA T. [Cellular immune response in tuberculosis: analysis of T-lymphocytes and their subsets, B-lymphocytes and natural cytotoxic cells in different tuberculosis states and body fluids]. *Rev Clin Esp*, 196: 223-7, 1996.
176. KOCHMAN S, BERNARD J, LAVAUD F, CAZABAT A, DUBOIS DE MONTREYNAUD JM. T-lymphocyte subsets in pleural fluids: discrimination according to traditional and monoclonal antibody-defined markers. *Eur J Respir Dis*, 65: 586-91, 1984.
177. LUCIVERO G, PIERUCCI G, BONOMO L. Lymphocyte subsets in peripheral blood and pleural fluid. *Eur Respir J*, 1: 337-40, 1988.
178. ORAL HB, UZASLAN-KUNT E, ATAK T, AKALIN H, KARADAĞ M, GÖRAL G, TÖRE O. Tüberküloz plöreziide mononükleer hücre alt grupları ve proenflamatuvar sitokin düzeyleri. *Bursa Devlet Hast Bül*, 15: 161-168, 1999.
179. SHIRATSUCHI H, TSUYUGUCHI I. Analysis of T cell subsets by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after in vitro stimulation with purified protein derivative of tuberculin. *Clin Exp Immunol*, 57: 271-8, 1984.
180. GUZMAN J, BROSS KJ, WURTEMBERGER G, FREUDENBERG N, COSTABEL U. Tuberculous pleural effusions: lymphocyte phenotypes in comparison with other lymphocyte-rich effusions. *Diagn Cytopathol*, 5: 139-44, 1989.
181. AKKAYA A, ÖZYARDIMCI N, GÖZÜ O, EGE E, AKDIŞ C, KARADAĞ M. Tüberküloz plöreziili olgularda, lenfosit grup ve alt gruplarının araştırılması. *Uludağ Üniv Tıp Fak Derg*, 2: 155-161, 1994.
182. GÖRAL G, AKDIŞ C, AKKAYA A. Kaviteli akciğer tüberkülozu, milyer tüberküloz ve tüberküloz tedavisi tamamlanmış olgularda periferik kan lenfosit alt gruplarının monoklonal antikorlar ile incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 29: 681-685, 1990.
183. GANSERT JL, KIESSLER V, ENGELE M, WITTKE F, ROLLINGHOFF M, KRENSKY AM, PORCELLI SA, MODLIN RL, STENGER S. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol*, 170: 3154-61, 2003.
184. OKUBO Y, NAKATA M, KUROIWA Y, WADA S, KUSAMA S. NK cells in carcinomatous and tuberculous pleurisy. Phenotypic and functional analyses of NK cells in peripheral blood and pleural effusions. *Chest*, 92: 500-4, 1987.

185. OTA T, OKUBO Y, SEKIGUCHI M. Analysis of immunologic mechanisms of high natural killer cell activity in tuberculous pleural effusions. *Am Rev Respir Dis*, 142: 29-33, 1990.

8. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde emeği geçen hocalarım Prof. Dr. Kaya Kılıçturgay'a, Prof. Dr. Feridun Gökırmak'a, Prof. Dr. Cezmi Akdiş'e, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Okan Töre'ye, eğitimime katkıları yanında, tezimin her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Barbaros Oral'a, her konuda yardım ve desteğini gördüğüm Prof. Dr. Güher Göral'a her zaman yakın ilgilerini hissettiğim Prof. Dr. Suna Gedikoğlu'na, Prof. Dr. Safiye Helvacı'ya, Prof.Dr. Reşit Mıstık'a, Prof. Dr. Beyza Öner'e, Prof.Dr. Halis Akalın'a, Doç.Dr. Cüneyt Özakin'a ve çalışma arkadaşlarım Dr. Selçuk Sözer'e, Tekn. Figen Aymak'a, Tekn. Deniz Gülkaya'ya, Tekn. Tuba Akküloğlu'na, Tekn. Özlem Karaçar'a teşekkür ediyorum.

Tezimde yer alan olguların sağlanmasında yardım ve desteklerini gördüğüm Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Esra Kunt Uzaslan'a, Bursa Türkan Akyol Göğüs Hastalıkları Hastanesinde görevli Uzm.Dr.Burhaneddin Alkan'a, Tekn. Çiğdem Cıva'ya teşekkür ediyorum.

Ayrıca her zaman bana destek olan, sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama, kızkardeşim ve ağabeyime içtenlikle teşekkür ediyorum.

9. ÖZGEÇMİŞ

İzmir’de 1962 yılında doğdum. İlkokul öğrenimimi Cemil Akyüz İlkokulu’nda, ortaokul öğrenimimi Havva Özişbakan Lisesi ve lise öğrenimimi de Ortaklar Öğretmen Lisesi’nde tamamladım. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndan 1984 yılında mezun oldum. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimimi 1996 yılında tamamladım. Halen Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Laboratuvarı’nda Biyolog olarak görev yapmaktayım.