

757234

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

LEPRAMATÖZ LEPRALI HASTALARDA NKT
HÜCRELERİNİN FLOW SİTOMETRİK
YÖNTEMLERLE
GÖSTERİLMESİ

DOKTORA TEZİ
Dr. N. Fulya İLHAN

ELAZIĞ-2004

ONAY SAYFASI

Nezih Halil

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Vedat Bulut
İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Vedat Bulut

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. S. Sıccak KILIÇ A. S. İsmail

Prof. Dr. Ayhan AKDUKAT A. S. İsmail

Yrd. Doç. Dr. B. Z. Z. Çelen B. Z. Z. Çelen

Doç. Dr. Cemalettin Aybay Cemal

Doç. Dr. Vedat Bulut V. Bulut

TEŐEKKÖR

Başta İmmünoloji Ana Bilim Dalı Başkanı ve tez danıŐmanım olan Doç.Dr.Vedat BULUT'a, tezim için gerekli hasta teminini sağlayan Lepra Hastanesi BaŐhekimisi Dr.Arif EDİZ'e, hastane doktorlarından Dr.Naciye ERKMEN'e ve tÖm lepra hastanesi laboratuvar personeli, hemŐireleri ve hastane çalıŐanlarına, bana çalışma metodum konusunda ıŐık tutan Dr.Charlie McSharry, Dr.Foo Y Liew ve Dr.Woon Ling CHAN'a, *M.leprae* suŐumu temin eden Dr.Patrick BRENNAN'a, çalıŐmam sırasında yardımlarını esirgemeyen İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalıŐanlarına, yetiŐmemde emeği geçenlere ve gÖsterdikleri sabır için eŐim ve aileme teŐekkÖr ederim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	4
4. GEREÇ VE YÖNTEM	24
5. BULGULAR	28
6. TARTIŞMA	44
7. KAYNAKLAR	51
8. ÖZGEÇMİŞ	54



TABLO LİSTESİ

		<u>SIRA NO</u>
Tablo 1.	Tip-1 ve tip-2 reaksiyonların tipik özellikleri	16
Tablo 2.	Reversal reaksiyon ve relapse arasındaki ayırt edici özellikler	17
Tablo 3.	Leprada bakteriyel indeks.....	21
Tablo 4.	İnaktif lepramatöz lepralı hastaların ve kontrol grubunun yaş ve cinse göre dağılımı	28
Tablo 5.	Hasta ve kontrollerin ASO ve CRP değerleri	29
Tablo 6.	Saptanan hücreler ve hasta yaşı, tanı süresi arasındaki korelasyon	30
Tablo 7.	Hastaların yaş, tanı süresi ve ASO, CRP, RF değerleri arasındaki korelasyon tablosu	32
Tablo 8.	Hasta ve sağlıklı kontrollerde saptanan lenfosit Oranları	42
Tablo 9.	Hasta periferik kan ve primer lenfosit kültüründen elde edilen lenfosit oranları	42

GRAFİK LİSTESİ

	<u>SIRA NO</u>
Grafik 1. Hasta yaşlarının ve tanı sürelerinin dağılımı	29
Grafik 2. V α 24+ /CD 161+ NKT hücrelerle CD3/56+ NKT hücreler arasındaki pozitif korelasyon Grafiği	31
Grafik 3. CRP değerlerinin tanı süresiyle korelasyonu	32
Grafik 4. V α 24+ NKT hücrelerinin periferik kan ve lenfosit kültüründe saptanan karşılaştırmalı oranları	33
Grafik 5. Hasta periferik kanında saptanan V α 24+ NKT hücrelerin CD3+ total T lenfositler içindeki oranları	34
Grafik 6. Lenfosit kültüründe saptanan V α 24+ NKT hücrelerin total T lenfositler içerisindeki oranı	35

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>SIRA NO</u>
Şekil 1. Hastaların lenfosit kültürlerinde izole edilen V α 24+ /CD161+ NKT hücrelerin flow- sitometrik görünümleri	36
Şekil 2-3. Hastaların lenfosit kültürlerinde izole edilen V α 24+ /CD161+ hücrelerin histogramları	36
Şekil 4. Sağlıklı kontrol periferik kanında izole edilen V α 24+/CD161+ NKT hücrelerin flow sitometrik görünümü	37
Şekil 5-6. Sağlıklı kontrol periferik kanında izole edilen CD161 + ve V α 24+ hücrelerin histogramları ..	37
Şekil 7. Hastaların periferik kanlarında izole edilen V α 24+ /CD161+ NKT hücrelerin flow- sitometrik görünümleri	38
Şekil 8-9. Hastaların periferik kanlarında izole edilen V α 24+ /CD161+ hücrelerin histogramları ..	38
Şekil 10. Hasta periferik kanlarında izole edilen CD3/16+56+ hücrelerin flow- sitometrik görünümleri	39
Şekil 11. Lenfosit kültürlerinde izole edilen CD3/16+56+ hücrelerin flow- sitometrik görünümleri	40

Şekil 12. Sağlıklı kontrollerde saptanan CD3/16+56+ hücrelerin flow- sitometrik görünüşleri	41
--	----



KISALTMALAR LİSTESİ

NKT:Natural killer T cells

NK: Natural killer cells

M.leprae: Mycobacterium leprae

EZN: Erlich-Ziehl-Neelsen boyama metodu

ARB: Asido resistant basil

DOPA:3-4 Dihidroksifenilalanin

PGL-I:Fenolik glikolipit-I

ELISA:Enzyme Linked Immunosorbent Assay

IL: İnterlökin

Th1:T helper 1

Th2: T helper 2

IFN- γ :İnterferon gamma

MHC: Major Histocompatibility Complex

CD: Cluster of Differentiation

$\alpha\beta$ TCR: Alfa/Beta T Cell Receptor

V α 24: Variable alfa TCR

NKR-P1A: NK Receptor P1A

CD1d: Non-klasik MHC I molekülü

GMCSF:Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor.

NKT1: Natural killer T cells Tip 1

NKT2: Natural killer T cells Tip 2

TNF- α :Tumor Necrosis Factor α

BCG: Bacille de Calmette-Guerin aşısı

TT: Tüberküloid lepra

BT: Borderlayn tuberküloid lepra

BB: Borderlayn lepra

LL:Lepramatöz lepra

ENL: Eritema Nodosum Leprosum

RF: Romatoid Faktör

CRP:C-Reaktif Protein

ANA:Antinükleer antikor

ROM: Rifampisin-Ofloksasin-Minosiklin

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ASO:Anti streptolizin O

FITC: Fluorescein isothiocyanate

PE: Phycoerythrin

α -GalCer: α -Galaktozil ceramid

RPMI 1649: Roswell Park Memorial Institute' tarafından lisans edilmiş

hücre kültür sıvısı

ÖZET

Leprada hücreyel immün cevap Th1 veya Th2 şeklinde farklılaşabilmekte ve klinik seyir tüberküloid veya lepramatöz lepra olarak şekillenmektedir. Kısacası hücreyel immünitedeki etkilenme derecesine göre hastalığın kliniği ortaya çıkar. Natural Killer T hücreler (NKT), NK reseptörlerini sunan T hücreler olarak tanımlanabilirler. NKT hücreler, çabuk uyarılmaları ve hızlı sitokin sentezleme yetenekleri ile hücreyel immün cevap üzerine etki yapabilmektedirler. Bu çalışma lepramatöz lepralı hastalarda NKT hücrelerin etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla planlandı.

İnaktif lepramatöz lepralı, yaşları 25-80 (ortalama 60.00 ± 14.43), tanı süreleri 4-55 (ortalama 30.66 ± 17.42) yıl olan 11'i kadın 29'u erkek olmak üzere toplam 40 hasta çalışmaya dahil edildi. Aynı şekilde lepralı teması olmamış ve herhangi bir hastalığı olmayan yaş ortalaması (55.00 ± 8.89) olan, 25'i erkek 15'i kadın 40 sağlıklı gönüllü kontrol grubu olarak incelendi.

Bu çalışmada flow-sitometrik yöntemle periferik kan NKT hücre oranları araştırıldı. Ayrıca *M. leprae* ekstraktı etkisindeki primer lenfosit kültürlerinde NKT hücre oranları hesaplanarak basilin uyarısının oranları nasıl etkilediği incelendi.

Lepralılarda periferik kandaki NKT hücre oranı (0.92 ± 0.21) sağlıklılardan (0.54 ± 0.18) daha yüksek olarak saptandı ($p < 0.05$). Lenfosit kültüründe basil uyarısı ile de NKT hücrelerinin yaklaşık periferik kandakilerin iki katına (1.62 ± 0.28) kadar arttığı gözlemlendi ve aralarında anlamlı fark belirlendi ($p < 0.05$).

Çalışma sonuçlarımız, NKT hücrelerin lepramatöz leprada hücre sel bağışıklık cevabının önemli elemanları olarak görev yaptığını düşündürmektedir. Hücre kültürlerinde stimulus altında iken bu hücrelerin oranlarının arttığının gösterilmesi, lepradan korunmak için NKT hücrelerinin uyarılmasını hedefleyen immunomodülatör tedavilerin, geleceğin tedavi yaklaşımı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Lepra, NKT hücreler, flow-sitometri, lenfosit kültürü



ABSTRACT

Cellular response in leprosy make a difference as Th1 and Th2 as a result clinical appearance is composed of lepramatous or tuberculoid leprosy. Natural killer T cells (NKT) are a subgroup of T cells, which express NK receptors and they have an effect on immune response in leprosy because they activate and produce cytokines quickly. In this study, it was aimed to research whether NKT cells have a role on lepramatous leprosy patients.

A total of 40 patients (29 males, 11 females) with inactive lepramatous leprosy who's aged (60.00 ± 14.43) as mean and their diagnosis years mean was (30.66 ± 17.42). Forty healthy individuals (25 males, 15 females) who have no leprosy contact whose ages were (55.00 ± 8.89) as mean evaluated.

In this study, NKT cells ratio were investigated flow-cytometrically in peripheral blood of patients with leprosy and primary lymphocytes culture were stimulated with *M.leprae* extract, then cell ratio under stimulating effect were counted. In conclusion, NKT cell ratio in patients (0.92 ± 0.21) was found higher than controls (0.54 ± 0.18). In addition under the effect of *M.leprae* extract NKT cell ratio (1.62 ± 0.28) were increased almost two times according to peripheral blood cell ratio. This result showed that the stimulating of NKT cells can be therapeutically approach in the future for protecting leprosy with immunomodulatory therapy.

Key words: Leprosy, NKT cells, flow-cytometry, lymphocyte culture

3.GİRİŞ

Lepra *Mycobacterium leprae*'nin etken olduğu kronik bir enfeksiyon hastalığıdır. İnsanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olan bu hastalık 2000 yıldan fazladır bilinmektedir. İlk olarak Hansen 1874'de etkeni tanımlamış ve uzun yıllar etken, Hansen basili adıyla anılmıştır(18). Daha sonra Neisser, Hansen basili olarak bilinen *M.Leprae*'nin Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) metodu ile asidoresistan boyandığını göstermiştir (23). Bu kadar eski geçmişı olmasına rağmen henüz basili in vitro ortamda üretmek mümkün değildir ve hastalık hakkında bilinmeyen çok şey vardır. Bu nedenle, lepra hala birçok araştırmanın konusu olmaya devam etmektedir. Hastalığın tarihçesinde; 1941'de sülfon tedavisinin keşfi ve 1960'da fare ayak tabanında ve yine 1971'de armadillolarda basilin düzenli olarak üretilmesi leprada önemli kilometre taşlarını oluşturur (18).

Leprada bağışıklık sisteminin rolü uzun zamandır birçok araştırmaya konu olmuştur. Basilin mikrobiyolojik özellikleri; hücre duvar yapısı, hücre içi yerleşim göstermesi özelliği, enfeksiyon süresinin uzunluğu immün sistemi farklı yönlerden etkiler. Ayrıca hücresel cevabın etkilenme derecesine kısacası Th polarizasyonuna göre klinik tablo ortaya çıkar (23,34). Diğer yandan NKT hücreler sentezledikleri sitokinlerle hücresel cevabı yönlendirebilirler diye düşünölmektedir (17).

Bu nedenle biz de bu çalışmada hücrel immüitenin, özellikle de bu cevapta anahtar rol oynayan T hücrelerinin yeni tanımlanmış bir alt grubunu oluşturan NKT hücrelerinin leprada rolü olup olmadığını ve lenfositleri basil ekstraktı ile uyararak NKT hücre oranlarında gelişebilecek olası artışı araştırmayı amaçladık.

Basilin mikrobiyolojik özellikleri: *M.Leprae* 0.2-0.3µm eninde ve 2-3 µm boyunda EZN ile koyu kırmızı renkte boyanan silindir şeklinde, düz yada hafif kıvrık, hareketsiz,sporsuz basildir. Doku ve salgılardan yapılan preparatlarda tek tek bulunmakla birlikte çoğu kez çalı demetleri gibi kümeler halinde görülür. Bunlar genellikle mononükleer hücreler içinde bulunurlar, oval şekillidirler ve bu kümelere **globi** denir (3). Globi oluşumunda yağ asitleri, balmumu, nükleik asit ve lipoid karışımından oluşan metabolizma artıkları sorumlu tutulmaktadır. Bu artıklar basilin etrafını çevirerek onları bir araya toplar ve fiziko-şimik ajanlardan korur (23). *M.leprae* asitlere dirençli alkole az dirençlidir. Boyayı tüberküloz basiline göre daha çabuk alır asit ve alkole daha çabuk renksizleşir. Dejenere olmuş basiller ise aside dirençli boyanma özelliğini kaybeder ve basit boyalarla ve Gram yöntemi ile de boyanabilirler. Yeni enfekte olanlarda basiller uç uca dizilmiş, aynı büyüklükte, düz veya hafif kıvrımlı haldedir. Tedavi olanlarda ise basilin içinde kromofil granülasyon olur ve basiller arasında boy farkı vardır. Basil uzun süre -80⁰C kadar düşük ısıda dondurularak canlı kalabilir ve sıcak, nemli iklimde 9 güne kadar kuru sekresyonlarda canlılığını sürdürebilir. Buzda iki hafta veya daha fazla yaşar.

45⁰C'de bir saat süreyle ısıtıldığında öldüğü fakat 100⁰C'nin üzerinde dahi antijenik özelliğini kaybetmediği bilinmektedir (18).

M.leprae dihidroksifenilalanin (DOPA) oksidaz etkisine sahiptir ve bu özellik *Mycobacteriaceae* ailesinin diğer türlerinde bulunmaz ve basilin diğer mikobakterilerden ayrımını sağlar (19). Katalaz ve novopürin sentezlemez. Düşük düzeyde süperoksit dismutaz etkisine sahiptir.

Kültür özellikleri: Lepra basili hücresiz ortamda kültüre edilememiş ve hücre kültüründe de sürekli olarak üretilmemiştir. Basilin çoğalması için optimal ısı 37⁰Cnin altındadır.Bu da neden lepra lezyonlarının vücudun daha soğuk bölgelerinde gelişme eğiliminde oluşunu açıklar (15). Chaussinand adlı araştırmacı tedavi görmemiş hastaların deri altı nodüllerini maymun ve kobaylara inoküle ederek enfeksiyon geliştirmiştir (23). Vücut ısı daha düşük hayvanlarda *M.Leprae*'nin daha iyi ürediğinin anlaşılması üzerine deneyler, fare ve armadillolar üzerinde yoğunlaşmıştır. 1960'da Shepard lepramatöz lepralıların burun salgılarını farelerin ayak tabanına yüzeysel bir şekilde inoküle etmiş ve bakteriyi üretmeyi başarmıştır.Yaklaşık 3-12 ay sonra bakteriler burada bir granüloma oluştururlar. Ayrıca ayak tabanında çok büyük lezyonlar gelişmez. Aynı araştırmacı bakterinin ikiye bölünme süresinin 11-14 gün olduğunu bildirmiştir (15,23). Bu zamandan sonra bakteri sayısında çok az değişim olmaktadır. Ayrıca dokuz bantlı Armadillo'lara (*Dasipus movemcinctus*) inoküle edildiğinde aşılamaadan bir yıl sonra yaygın lepramatöz lepra gelişir. Kirchheimer ve Storrs adlı araştırmacılar 1971'de rektal ısı 31-35⁰C olan bu hayvanlarda basili bol miktarda üretmeyi başarmışlardır (3,23).

Armadillolara intravenöz yoldan tedavi edilmemiş lepramatöz lepralı hastalardan alınan klinik örnekler verilerek 18-24 ayda jeneralize lepra oluşturulabilir.

Hayvandan elde edilen sürüntü örneğinde, karaciğer, dalak, akciğer ve periferik yaymada bol basil görülür. Ayrıca ilk kez Lumpkin adlı araştırmacı tarafından armadillo ile kontaktı takiben gelişen bir insan lepra olgusu bildirilmiştir (28). Leprada bazen lepralı hasta ile temas hikayesi olmayan sporadik vakalar da bildirilmektedir ve armadillolarda da doğal oluşan lepra benzeri enfeksiyon saptanmıştır bu lepranın insan dışı bir kaynağı da olabileceğini düşündürmektedir (5).

Antijenik yapısı: Çok sayıda nonspesifik *M.leprae* antijeni bulunur ancak özellikle monoklonal antikorlar kullanılarak elde edilen bazı spesifik antijenler de vardır. Bunlardan en çok araştırılmış olanı PGL-I (fenolik glikolipit-I) dir (18,23). PGL-I basilin spesifik terminal trisakkarit bölümünde yer alır ve altında proteinler, peptidoglikan, mikolik asit ve arabinogalaktandan oluşan kompleks hücre duvarı yer alır. Bu antijen lepramatöz dokulardaki makrofajlarda yoğundur ve basilin çevresini tamamen sarar. ELISA tekniği ile bu antijen ölçülebilir ve miktarı basiller yüküyle doğru orantılı olarak bulunur ve multibasiller hastalarla kontakt halinde olanlarda yüksek titrelerde bulunabilir (18). Ayrıca diğer mikobakterilerle ortak özelliklere sahip değişik moleküler ağırlıklı protein antijenleri de vardır.

İmmünolojik Özellikleri: *M.leprae* konak hücrelerine yerleşen zorunlu hücre içi parazitidir. Basilin bölünme zamanı oldukça yavaştır, yaklaşık 11-13 gündür. Leprada lezyonlar 2-5 yıllık bir inkubasyon periyodunu takiben konakçının immün cevabına bağlı olarak ortaya çıkar (40). Leprada önemli olan sistem hücresel immün sistemdir. Makrofajlar basili fagosite eder ve daha sonra sitokin salarlar.

Bu salınım genelde nonspesifiktir ve IL-1 uyarısıyla T hücreler aktive olur. T lenfositlerden salınan Th1 sitokinler yani IFN- γ ve IL-2 immün cevabı, Th1 cevabına yöneltirken, Th2 grubu sitokinler yani IL-4 cevabı Th2 ye yönlendirir. Hücrel immünite kişide hangi form lepranın ortaya çıkacağına da belirtecektir ve bazı bireyler lepraya karşı güçlü bir dirence sahiptirler (40). Tüberküloid leprada immün sistem Th1 yönünde polarize olduğundan güçlü hücrel yanıt oluşur ancak lepramatöz leprada yönelim Th2 polarizasyonunadır, hücrel immünite yeterli değildir ve hastalığın seyri daha ağırdır. Aktive makrofajlar basili sindiremeyip MHC molekülleri ile T lenfositlere sunarlar ve oluşan T lenfosit klonu sayesinde basil yok edilmeye çalışılır. Gerçekte T lenfosit ile makrofaj etkileşiminde yaygın olmayan ancak *M.leprae* antijenine spesifik bir defekt vardır (23,40).

Bu çalışma kapsamında araştırılan Natural Killer T hücreler (NKT), NK reseptörlerini sunan T hücreler olarak tanımlanabilirler ayrıca çabuk uyarılmaları ve hızlı sitokin sentezleme yetenekleri ile leprada immün cevap üzerine etki yapabilirler. Bu hücreler glikolipit ve fosfolipit antijenleri tanırlar bu yönden de *M.leprae*'nin hücre duvarında bolca bulunan polianyonik glikolipitler (fosfo ve sülfolipitler) ve peptidoglikolipitler (vax-D) bu hücrelerin aktivasyonunda rol alabilirler. Bu hücrelerin uyarılmalarında non-klasik MHC I molekülleri içerisinde bulunan CD1 proteinlerinin önemi vardır. CD1 proteinleri β_2 mikroglobülinle birlikte olan yüzey molekülleridir insanda dört tanesi tanımlanmıştır.

Bunlar:Grup 1: CD1a, CD1b, Cd1c ve Grup2: Cd1d olarak gruplanırlar. CD1 moleküllerinin ortak fonksiyonu non-peptit antijenleri T hücrelerine sunmaktır. CD1d molekülleri ise hem peptit hem lipit bağlayabilirler.

NKT hücreler ise CD1d reaktif hücreler olarak tanımlanırlar (22). Bu hücrelerin ayrı bir T hücre öncüsünden mi geliştiği yoksa ortak T hücre öncüsünden gelişip CD1d ile pozitif seleksiyondan sonra mı farklılaştığı kesinlik kazanmamıştır (24).

Kanda %0.01-1, karaciğerde ise %5'den az oranda buldukları bilinmektedir (17). Bu hücreler $\alpha\beta$ TCR'a sahip olmakla birlikte genelde invariable olarak tanımlanan V α 24 – J α 18 segmenti ile kısıtlı TCR molekülü taşırlar (30). Ayrıca faredeki karşılığının NK1.1 olduğunu bildiğimiz CD161 molekülünü taşırlar. Bu molekül disülfid bağımlı homodimerler ailesindedir ve hem NK hem de NKT hücrelerde bulunur. Rodentlerde NKR-P1A, B ve C olmak üzere üç tipte bulunur. NKR-P1A ve B aktivatör molekülüdür ve NK hücrelerinin sitokin üretimini ve sitolitik aktivitesini artırır, NKR-P1C ise inhibitör aktivitelidir (2). CD161 molekülü yetişkinlerde dolaşımdaki T hücrelerinin, yaklaşık %25'inde sunulur bunun ancak çok küçük bir bölümü CD1d spesifiktir. Bu nedenle NKT hücrelerini TCR α zinciri ile (V α 24) tanımlamak daha uygun olmaktadır (16). NKT hücrelerinin koreseptörleri: CD4+, CD8 $\alpha\beta$ +, CD8 $\alpha\alpha$ + veya CD4-CD8- (Double negatif:DN) olabilir. Son çalışmalarla ve CD8+ NKT hücrelerinin de virüs enfeksiyonları sırasında önemli görevler yaptıkları gösterilmiştir (2,20). İlginç olarak bu hücreler hem Th1 hem de Th2 sitokinleri: IFN- γ , IL-4, GMCSF, IL-13 salarlar ve immün sistemin güçlü regülatörleri olarak görev yaparlar (17). Sitokin profillerine göre NKT hücreler de NKT1 ve NKT2 olarak gruplanırlar (9).

Genelde CD4⁺ CD8⁻ olan NKT hücrelerinin genelde Th2 ağırlıklı sitokinleri sentezledikleri ve CD4⁻CD8⁻ NKT hücrelerinin Th1 profili taşıdığı gösterilmiştir (26). CD4⁻ T hücreler temel olarak IFN- γ ve TNF- α sentezlerken; CD4⁺ olanlar:IL-4, IL-13, IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF (Granülosit-monosit koloni stimülan faktör) IFN- γ ve TNF- α sentezler ayrıca bazı uyarılmış CD4⁺ler perforin sentezleyebilir (17). Bu görünümle NKT hücrelerin Th1-Th2 gelişimini direkt olarak etkilediği söylenebilir. Bu hücrelerin salgılayabildikleri geniş sitokin profili onların çelişkili immün fonksiyonlar yapmasına neden olur. Örneğin bir yanda tümör rejeksiyonu ve mikroorganizmalara karşı direnci artırırken diğer yandan Th2 sitokinlerle toleransı artırabilir ve anti-tümör cevabını baskılayabilir (17, 26).

M.leprae bir hücre içi bakteridir ve vücuttan eliminasyonunda fagositoz da önemlidir. Bakteriyel virülans ile konak savunması arasındaki denge basile lehine bozulursa (antijen sunulumu veya sitokin salınımı v.b) *M.leprae* fagositozdan kaçır. Canlı mikroorganizma taşıyan makrofajlar epitelooid hücrelere dönüşmez ve sonuçta **Virchow** hücreleri (lepra köpük hücreleri) meydana gelir (23,34). Farklı formlarda hastalık ortaya çıkabilir. Hücrel immün yanıtta yetmezlik derecesine göre farklı formlarda hastalık ortaya çıktığından konağın basile direncini ortaya koymak için lepramin testinden yararlanılır.

Lepromin testi: Lepromin antijeni kullanılarak yapılır. Lepromin antijeni ise tedavi edilmemiş lepramatöz lepralı hastaların basilden zengin nodüllerinin ardı ardına ezilip kaynatılması ve süzülüp sterilize edilmesi ile elde edilir. Antijen ön kolun ön yüzüne 0.1cc intradermal olarak verilir ve test değerlendirilir:

Negatif reaksiyon: Enjeksiyondan sonra birkaç gün ile birkaç hafta içinde kızarıklık oluşur ve kaybolur.

Fernandez reaksiyonu (Erken tip): Test 3-4 gün içerisinde çeşitli şekillerde endürasyon gösterir. Ödem ve konjesyonla birlikte iltihabi olay gelişir ve 3 gün sonra geriler. Test 2-3 gün içerisinde değerlendirilmelidir. Okunması tüberkülin testi gibidir. 5mm'nin altında ise negatif, 5-9 mm ise şüpheli, 10-14 mm pozitif, 15-20 mm kuvvetli pozitif olarak değerlendirilir(23).

Mitsuda reaksiyonu (Geç tip): Daha dirençli 3-4 hafta süren papüler endürasyon vardır, pembe menekşe renkli bir nodül belirir. Test 4.haftadan sonra küçülür ve yok olur. Çok güçlü pozitiflik halinde ortası ülser olarak iyileşmesi gecikebilir. Değerlendirme; negatif, 3mm; şüpheli, 3-5 mm:+ pozitif, 6-10 mm:++, 10mm ve üzeri:+++ pozitif şeklindedir.

Lepromin testi tüberküloid lepralı hastalarda, endemik bölgelerdeki etkilenmemiş bireylerde, kesin tedavi edilmiş lepramatöz lepralılarda pozitif iken tedavi edilmemiş lepralılarda negatiftir. Ancak testin tanısal bir değeri yoktur. Lepra sınıflandırmasında ve prognostik açıdan değer taşır (15). Ayrıca BCG aşısı yapılanlarda, tüberküloz dışı mikobakteri türlerine karşı oluşmuş bağışıklıklarda yalancı pozitiflik olabilmektedir. Lepramatöz lepralı hastalarda *M.leprae* 'ya karşı spesifik anerji olabilir. Çok sık olmamakla beraber lepramatöz lepralıdaki T hücre anerjisi etkili tedavi ile düzelebilir. Anerji hastalığın bir sonucudur sebebi değildir (11). *M.leprae* 'nın çeşitli karbonhidrat ve lipit bileşikleri, özellikle PGL-1 ve lipoarabinomannan basilin lenfosit ve makrofaj fonksiyonlarını bozabilirler.

Lepramatöz lepradaki sellüler defekt genelde *M.leprae* 'ya cevap oluşturan T hücre öncülerinde azalma ve baskılayıcı T hücrelerde artma şeklindedir. Bu hastaların periferik kan lenfositleri klasik lenfosit transformasyon testinde basile yanıt vermez. Yani *M.leprae* reaktif CD4 hücrelerinde bir defekt vardır.

Bunun yanı sıra lepramatöz lepralılarda dikkat çekici olarak baskılayıcı CD8'lerde artma bulunur. Bu hücrelerin oluşturduğu supresyon PGL-1 tarafından stimüle edilmektedir. Sonuç olarak baskılayıcı hücreler *M.leprae* reaktif CD4⁺ T hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe eder. Lepramatöz leprada makrofajlar da basili öldürmede yetersiz kalırlar, bunun nedeninin de PGL-1'in toksik serbest radikalleri temizlemesiyle ilgili olabildiği düşünülmektedir ve yine makrofajlardan IL-1 salınımı yetersizdir (15). Ayrıca lepramatöz leprada IL-2 ve IFN- γ düzeyleri düşük IL-4, IL-5 ve IL-10 düzeyleri yüksek bulunur yani Th2 polarizasyonu dikkat çekicidir. Tüberküloid lepralılarda CD4/CD8 oranı 2:1 iken lepramatöz lepralılarda bu oran 0.5:1 şeklinde ortaya çıkar (23).

Hastalık şekilleri:

Lepra deri, mukoza ve periferik sinirler başta olmak üzere göz, testis, RES gibi birçok organ ve dokuyu tutabilen kronik granülamatöz bir hastalıktır. Hastalığın kuluçka süresi 2-4 yıldır, bazen 5 yıla çıkabilir. Sinsi başlangıçlıdır. Hastalık genelde vücudun soğuk alanlarında yüz, boyun, bacak, el, ayak, kalça, kulak gibi alanlarında lokalizasyon gösterebilir. Sınırları kesin belirlenmeyen hipopigmente ve eritemli bir makül şeklinde başlar. Bu lezyonlara indeterminate lepra denir ve kendiliğinden iyileşebilir ve tedaviye cevabı iyidir.

M.leprae'nin neden olduğu birçok sekel, periferik sinirlerde oluşturduğu hasara bağlıdır. Küçük sinir fibrilleri genelde fonksiyonel olarak bozulmuştur ince his, ağrı, soğuk ve sıcak duyusu, pozisyon ve basınç duyuları kaybolmuştur. Leprada hem büyük sinir kökleri hem de derideki mikroskobik sinirler etkilenebilir en çok etkilenen ulnar sinirdir.

Bu sinir duyu bölgesinde dört ve beşinci parmaklarda pençeleşme, elin dorsal yüzünde metakarpofalangial kasların kaybı ve elde unlar bölgesinde his kaybı şeklinde kendini gösterir. Sinir hasarı schwan hücrelerinde çoğalan bakteriye yada sinir kılıfındaki granüloamatöz hasara bağlıdır. Ayaklarda da duyu kaybı metatars başlarında tekrarlayıcı plantar ülserasyonlara neden olur (15).

Lepra hastalığı klinik, bakteriyolojik, immünolojik ve histopatolojik kriterler göz önüne alınarak yapılan Ridley-Jobling sınıflandırmasına göre başta iki uç ve üç ara forma ayrılır (33):

- 1-Tüberküloid lepra (TT)
- 2-Borderlayn tüberküloid lepra (BT)
- 3-Borderlayn lepra (BB)
- 4-Boderlayn lepramatöz lepra (BL)
- 5- Lepramatöz lepra (LL)

Tüberküloid lepra: Bu formda deri döküntülerine **leprid** adı verilir. Lepridlerde başlangıçta hyperhydrosis sonra anhydrosis görülür. Hipopigmente alanlar, başlangıçta bazen hiperstezik genelde anestezik alanlar şeklinde ortaya çıkar. İlk kaybolan temas hissidir bunu acı ve ısı hissini kaybolması izler.

Lezyonlar tek olabileceği gibi birden fazla da olabilir. Lezyon çapı yaklaşık 10 cm, sınırları belirgin, kenarları infiltrate, ortası normal görünümündedir. lezyonda basil yoktur ve lepromin testi pozitifdir. Saçlarda kuruma ve dökülme, tırnaklarda kalınlaşma ve kıvrılma, deride ise hiperkeratöz ve pullanma dikkat çekicidir.

Tip-1 lepra reaksiyonu: Tedavi altındaki tüberküloid lepra hastaları ve borderline lepra hastalarında tedavi öncesi azalan reaksiyon tarzında veya tedavinin yeni başladığı dönemlerde reversal reaksiyon olarak görülür.

Bu reaksiyon aşırı duyarlılık reaksiyonlarından tip-IV reaksiyon benzeridir. Önceki deri lezyonlarında inflamasyonla birlikte nörit, yeni, küçük, satellit makülopapüler deri lezyonları veya eski lezyonlarda ülserleşmeye eğilim, erithema multiforme, el ve ayaklarda ödem, düşük düzeyde ateşle karakterize bir tablodur. Görünümleri erizipele benzer, lokalizedir ve hiçbir zaman bilateral değildir. Lezyonlar ağrılı ve hassastır. Eğer nörit ilk 24 saatte tedavi edilemezse deformite ve kas disfonksiyonu ile sonuçlanabilir. Bu genelde hücresel immünitinin güçlendiğini gösteren bir tablodur. Reaksiyon histolojik olarak tüberküloid tipe dönüş gösterir. Lezyonlarda CD4⁺ hücrelerde artma ve IFN- γ ve IL-2 düzeyinde artış ve $\gamma\delta$ reseptörü taşıyan T hücrelerde artış saptanır (32). Tedavi almayan hastalarda lezyonlarda kötüye gidiş ve immünitede zayıflama olabilir. Borderline tüberküloid vakalarda immün cevabı iyi olan reversal reaksiyon, hastalığın veya tedavinin erken safhalarında çok ciddi sinir hasarları ile sonuçlanabilir.

Tip-2 reaksiyon: Erithema Nodosum Leprosum (ENL) tedavinin daha geç safhalarında ikinci 6 ayında ortaya çıkar. Bu reaksiyon immünolojik görünümde lepramatöz tipe daha yakındır. Aşırı duyarlılık reaksiyonlarından tip-III reaksiyondur. Reaksiyonel lezyonlar, plaklar ve nodüller, bilateral ve simetrikdir. Lezyonlar yüzde, baldırlarda ve ön kolda görülebilirler. Kısaca derinin sıcak bölgeleri hariç her yerinde görülebilirler. Nadir olarak ayağın palmar ve plantar yüzünde lezyonlar görülebilir. Bazıları rüptüre olabilir ve nekrotik hale gelebilir.

Tip-2 lezyonlar ciddi göz problemleri özellikle iritisle birlikte olabilir, testislerde şişme ve aşırı hassasiyet vardır. Özellikle tibia üzerinde, el ve ayak kemiklerinde şişme, kas ağrıları tipiktir. Bu şikayetler varsa reaksiyon şiddetlidir.

Tip-2 reaksiyon aralıklı olabileceği gibi sürekli de olabilir. Aralıklı ise iki haftalık erithema nodosum leprosum atağını yaklaşık 1-2 aylık sessiz dönem izler. Bu vakalarda sinir bölgesinde hafif ağrı ve hassasiyet olur ancak fonksiyon kaybı yoktur. Sürekli tip de ise atak birkaç ay devam edebilir.

Borderline (dimorfik) lepramatöz vakalarda cilt lezyonları difüz niteliktedir ve tanımlanması zordur(38). Yine bu vakalarda tip-1 ve tip-2 reaksiyonlar aynı anda görülebilir ve cerrahi, fiziksel veya mental stres, gebelik gibi olaylar tabloyu alevlendirebilir. Bu tip reaksiyonlar multibasiller hastalarda daha fazladır.

Lepramatöz lepra:Hastalığın anerji gelişme safhasıdır. Hastalarda simetrik deri nodülleri, plaklar, dermisde kalınlaşma tipiktir. Bu oluşumlar makül, papül, nodül şeklinde olabilirler. Lezyonlar geniştir, sınırları belirsizdir önce hipopigmente sonra kırmızı renkli olurlar. Deri lezyonlarına **leprom** denir. Lepromlar bolca basil bulundurur ve basil düşük ısıyı sevdiğinden genelde vücudun kulaklar gibi soğuk bölgelerinde sık görülürler. Erken lezyonlar genişleyerek göz kapakları, burun, alın, kulak kepçelerinde leprom denen plaklar oluştururlar (38). Yüzdeki lepromlar aslan yüzü görünümüne neden olurlar. Burun mukozasına infiltre olabilirler ve kronik nazal konjesyon ve epistaksise yol açabilir ayrıca nekroz, septum ülseri ve perforasyon görülebilir (15). Nekroz kıkırdakları tutunca burunda çökme, semer burun gibi şekil bozukluğu ortaya çıkar. Damak perforasyonu, glottis kontraksiyonu gelişebilir, el ve ayaklarda deformite ve doku kaybı olabilir. Periferik nöropati gelişir önce otonom sonra sensitif ve motor sinir tutulumu oluşur (23). Bu tutulum simetrik ve jeneralizedir. El ve ayakların distalinde anestezi vardır. En çok tutulan sinirler N.ulnaris ve N.peroneustur.

Hücrel immünite bozuk iken humoral immünite sağlamdır Th2 polarizasyonu vardır. Bu tip hastalarda RF (romatoid faktör), CRP (C-reaktif protein), krioglobülin ve antitroglobülin antikor, ANA gibi otoantikorlar oluşur. Ayrıca basilin parçalanma ürünlerine karşı oluşan antikorlar, Tip III aşırı duyarlılık reaksiyonundaki mekanizmalarla yukarıda ayrıntılı olarak söz edilen artrit, iridosiklit, erithema nodozum, glomerülonefrit gibi klinik tablolara neden olur (Tip II lepra reaksiyonu). Bu iki reaksiyon arasındaki farklar tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo.1 Tip-1 ve tip-2 reaksiyonların tipik özellikleri

	Tip-1 Reaksiyon (Reversal)	Tip-2 Reaksiyon (ENL)
Lepra tipi	BB, BT, BL ve Tüberküloid	Lepramatöz, BL
Başlangıç	BT, BB’de tedavinin ilk 6 ayı	Tedavinin geç safhaları
Sebebi	Hücrel immünitede değişiklik veya ani artma	Doku, kan, lenf damarlarındaki Ag-Ab kompleksi birikimine bağlı immün kompleks sendromu
Klinik	Var olan lepra lezyonlarında akut inflamasyon (Erizipel) Bazen nekroz ve ülserasyon	Ani ortaya çıkan pembe renkli, hassas yeni nodül ve plaklar. Vesiküler, pistüler, büllöz ve gangrenöz olabilir.
Sistemik bulgular	Nadirdir	Ateş ve halsizlik
Tipik özellikler	Bir veya birden fazla sinirde ağrı ve hassasiyetle birlikte şişme, el, ayak veya yüzde ödem. Pençe el, düşük ayak veya yüz felci gelişebilir	El, ayak, yüzde ödem. Paraliziler olabilir tip-1 kadar hızlı değildir. İrit, iridosiklit, epistaksis, kas, eklem, sinir ve kemik ağrısı, lenfadenit, orşit, proteinüri

Tablo.2 Reversal reaksiyon ve relapse arasındaki ayırt edici özellikler

Özellikler	Reversal reaksiyon	Relapse
Başlangıç	Ani (Birkaç saat içinde)	Yavaş, tedrici (haftalar aylar içerisinde)
Başlangıç zamanı	Tedavi sırasında veya tedavi bitiminde ilk 6 ay	Tedavi kesildikten birkaç ay sonra
Eski lezyonlar	Erithematöz, parlak ve şiş	Etkilenmez
Yeni lezyonlar	Nadir	Sık
Ülserasyon	Bazen	Sık
Sinir tutulumu	Yaygın: Sinirler hızla ağrılı ve hassas hale gelir ve fonksiyonu bozulur	Sinirler tutulabilir fonksiyon bozulması yavaştır.
Genel durum	Ateş ve halsizlik nadir	Etkilenmemiştir
Steroide cevap	Çok iyi	Değişmez
İlaç uygunluğu	İyi	Kötü

Epidemiyoloji: Hastalığın tek bulaşma kaynağı insandır. *M.leprae* özellikle lepromlarda fazla olmak üzere tüm lezyonlarda bulunur. İlerlemiş olgularda dalak, karaciğer, testis, iç organlar ve nadiren kanda bulunabilir. Daha ileri dönemlerde periferik sinirlerde bulunabilir (3). Basil yara salgılarından ve özellikle de burun salgısından dışarı atılır, dış ortamda 2-9 gün canlılığını korur, ayrıca anne sütü ile geçebildiği de bildirilmiştir. Anne sütü ile her emzirmede bebeğin 2 milyon bakteri aldığı saptanmıştır (23). Yüzyıllar önce büyük salgınlar yapan basil, bugün güçlükle bulaşan ve yavaş çoğalan bir hastalık halini almıştır. Hastalığın bulaşmasında genellikle yakın temas, aile içi yaşam gibi yakın ilişki gerektiği bilinmektedir (31). Genelde düşük ekonomik düzeyli ve kalabalık topluluklarda daha sık görülmektedir. Enfeksiyona duyarlılık 3-5 yaşlar arasında yüksektir.

Hasta salgıları ile temas halinde bulunan ve aynı evi paylaşan çocuklar enfekte olabilir ve yıllar sonra hastalık ortaya çıkar (31). Lepramatöz lepralıların burun sekresyonlarında 10 bin-10 milyon arasında bakteri bulunurken bu sayı dokularda 1 milyon/gr olarak saptanmıştır. Ülkemizde sporadik vakalar şeklinde hastalık görülmektedir.

1983 yılından günümüze kadar ülkemizde toplam 554 yeni hasta kayda alınmıştır. Halen 2001 yılı sonu verilerine göre ülkemizde 2596 hasta bulunmakta ve izleme ve kontrol altında tutulmaktadır. Bu verilere göre hastaların yaş ortalaması 59.41'dir. Hastaların % 62.85'ini oluşturan 1631 hasta lepranın sakatlık sınıflamasına göre 2. derece (%60) ve daha üzerinde olmak üzere sakattır. Yine aynı verilere göre 2001 yılı sonunda lepra tedavisi süren hasta sayısı 35'dir. Kalan hastaların % 92'sine kombine tedavi uygulanmıştır (37).

Ancak gerçekten hastalığı taşıyan ve tedavi altında olan hasta sayısı çok azdır. Yine 2002 yılı sonunda tedavisi süren 30-40 kadar hasta vardır. Son yıllarda ülkemizde her yıl ortalama 10-15 yeni hasta saptanmaktadır. Bunlar genellikle eski hastaların çevrelerindeki uzun kuluçka süreli hastalardır. Çünkü ülkemizde basil taşıyan ve bunu yayan hasta çok azalmıştır. Bu nedenle her yıl saptanan hasta sayısı giderek azalmaktadır (37).

Tanı: Leprada ayırıcı tanı yapmak önem taşır çünkü hastalığın klinik bulguları bazı nörolojik ve dermatolojik hastalıklarla karışabilir. *M.leprae*'nin kültürü mümkün olmadığından basilin lezyonlarda direkt boyalı preparatlarla gösterilmesi tanı koydurucudur.

Basil *M.tuberculosis*'e göre boyayı daha çabuk alır ve kolay bırakır (34). Basilin bölünme süresi uzundur hayvanlarda deneysel enfeksiyonun gerçekleştirilmesi için aylar geçmesi gerekir.

Bütün bu zorluklar göze alınarak leprada kesin tanı Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanan preparatlarda basilin gösterilmesi ile olur. Bunun için de en çok burun salgısı kullanılır. Burun mukozası silgeyle sertçe sürülerek kazılır ve EZN yöntemi ile boyanır. Bu preparatlarda basiller kümeler halinde serbest veya hücre içinde görünürler. Bu görüntü çalı demeti veya sigara dizisi şeklinde tanımlanır (4). Burun salgısı az ise birkaç gün potasyum iyodürlü şurup verilerek salgı arttırılıp tekrar inceleme yapılabilir. Burun salgısı dışında bakteri lenf bezleri, sinir biyopsi örneklerinde de aranabilir. Ancak buradaki basil miktarı deri ve mukozalardaki kadar çok değildir (23). Yüz, el ve ayak parmaklarının dış yüzleri, dirsek, diz gibi vücudun soğuk bölgelerindeki lezyonlarda basil daha fazladır. Deri lezyonu birden fazla ise materyal almak için en yaşlı ve belirgin olan lezyon tercih edilmelidir. Bakteriyolojik tanıda en değerli materyal deri ve deri altı dokusunu içeren biyopsi örnekleridir. Bu biyopsilerin sağlam deriye yakın alınması gerekir. Örnek steril fizyolojik tuzlu su ile yıkanır lam üzerinde kıyılır ve bastırılarak pulpası çıkarılır ve bundan lamlara yayılarak EZN yöntemi ile boyanıp incelenir.

Kazıma şeklinde materyal alınacaksa tüberküloid leprada sağlam deriyle lezyonun birleştiği bölgeden almak uygundur. Lepramatöz leprada yüz ve kulaklar tercih edilmelidir. Ayrıca şişmiş lenf nodülleri ve lepromlardan enjektörle sıvı alınarak incelenir.

Burun kazıntısı veya doku salgısındaki bakterilerin *M.leprae* olduğunu anlamak için bu materyalin üzerine bir damla DOPA (3-4 dihidroksifenilalanin) damlatılır ve lezyondakiler *M.leprae* ise siyahlaşma izlenir.

Olay bakterinin fenolaz (DOPA oksidaz) enzimi ile ilgilidir (3). Bu özellik diğer mikobakteri türlerinde yoktur (18,23). DOPA oksidaz aktivitesi armadillo veya insanda yapay ortamda üretilen basilin *M.leprae* olduğunu doğrulamak için verilen yedi kriterden birisi olarak tanımlanır. Diğer altı kriter: bakterinin ilaç duyarlılık paterni, ortak antijenik yapısı, deney hayvanlarında benzer büyüme özellikleri, lepromin testindeki benzer sonuçlar, diğer mikobakterilere benzerlik ve hücre duvar yapısının ortak kimyasal birleşimi olarak sıralanır. *M.leprae* tipik olarak fare ayak tabanında üreme özelliği de gösterir (18). Bir diğer test; histamin testidir. Lezyon üzerine ve sağlam deriye iğne ile birer çizgi çizilir ve bu çizgilere 1/1000'lik histamin eriyiğinden damlatılır. Sağlam deride şişlik kızarıklık oluşurken leprada anerji ve sempatik sinir harabiyeti nedeniyle hiç değişiklik izlenmez (3).

Lepranın sınıflandırılması, ayırıcı tanısı ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde basil sayısı, boyanma özellikleri ve duruş şekilleri ipucu verir:

1-Lezyonlarda en çok basil bulunduran form lepramatöz lepradır, BL'de de basil miktarı çoktur buna karşın tüberküloid tipte basile rastlanmaz.

2-Tedavi altındaki hastalarda lezyonlarda az sayıda basil izlenir.

3-Basiller genelde makrofajlar içerisinde globi oluşturmuş halde bulunurlar.

M.leprae diğer mikobakterilerden daha ince yapılıdır.

Basillerin diğ er mikobakteri türlerinden ayrılmasında Bermann yöntemi ile hazırlanmış sudan siyahı kullanılabilir. *M.leprae* sudan siyahı ile boyanmaz ama *M.tuberculosis* siyah ve *M.lepramemurium* gri renkli boyanır (4).

Tablo3. Leprada bakteriyel indeks

ARB sayısı / Mikroskop alanı	Bakteriyel index
> 1000/alan	6+
100-1000/alan	5+
10-100/alan	4+
1-10/alan	3+
1-10/10 alan	2+
1-10/100 alan	1+
0/100 alan	0

M.leprae'nin diğ er mikobakterilerle ortak ve türe spesifik çeşitli antijenleri vardır. Bunlardan en çok bilinen türe özgü fenolik glikolipit-I (PGL-I) dir.Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar hücre sel immün yanıtı güçlü olan hastalarda düşüktür.Yani LL da en yüksek,TT de ise en düşük antikor titreleri saptanır.PGL-I antikorları RIA ve ELISA yöntemi ile saptanabilir.

LL'da ELISA duyarlılığı %100'dür. Lepralı hastalarda PGL-I antikorlarının titreleri basiller yükle doğru orantılıdır. Endemik bölgelerde multibasiller hastalarla temas halindeki bireylerde düşük titrelerde pozitiflik saptanabilir(18).

Kısacası lepromin testinin yaygın olarak kullanılmasına karşın, bu da lepralı hastaların takibinde güvenilir bir serolojik test olarak değerlendirilebilir. *M.leprae* spesifik monoklonal antikolar ile daha spesifik testlerin geliştirilmesi konusunda çalışmalar vardır.

Tedavi: Birkaç tane spesifik sülfon kullanılır, bunlardan en çok kullanılan dapsondur. Rifampin *M.leprae*'nın büyümesini ve uzun süreli kullanımda lepranın klinik görünümünü baskılar. Leprada sülfon direnci gelişebileceğinden başlangıç tedavisinin sülfon + rifampin şeklinde kombinasyon tedavisi olarak düzenlenmesi gerekmektedir (19).

1982 yılında Dünya Sağlık Örgütü bu ilaçların birlikte uygulandığı en çok iki yıl sürede tamamlanan çok ilaçlı tedavi (Multi Drug Treatment=MDT) rejimlerini dünyaya duyurmuştur. Halen pek çok ülkede bu standart tedavi rejimleri neredeyse hastaların tümüne yakın bölümünde uygulanarak tamamlanmıştır. Saptanan yeni olguların da büyük bölümü aynı tedavi altındadır. Dünya sağlık örgütü lepra tedavisinin basil sayısına göre yapılmasını önermektedir. Basil sayısı az olan TT, BT ve indetermine olgularda 1 yıl boyunca günde 100 mg dapson ve 6 ay boyunca ayda bir defa 600 mg. rifampisin kombinasyonu önerilir. Tedavi bitiminde hastalar 2 yıl süreyle izlenir eğer şüpheli lezyon gelişirse tedaviye alınır.

Basil sayısı çok olan (BB, BL, LL) olgularında ayda bir defa 600 mg. rifampisin ve ayda bir defa 300 mg klofazimin kombinasyonu, günde 100 mg dapson ve 50 mg klofazimin tedavisi 2 yıl süreyle verilir (6, 34). Bu tedaviye gerekirse etionamid veya protionamid eklenir.

Kombine tedavi en az 2 yıl sürdürülür. Basil pozitifliği söz konusu ise basil kaybolana kadar tedaviye devam edilir.

Ansamisinler ise rifampisinden elde edilen yeni bir grup moleküldür. Lepra tedavisinde yüksek bakterisit etkisiyle tedavi protokollarında çok önemli yer tutan bir gruptur. Bu grupta; rifapenetine, rifabutin sayılabilir. Bunlar rifampisinden daha etkindir ve umut verici bir tedavidir.

M.leprae kinolon, klaritromisin, streptomisin, kanamisin, amikasin ve ampisilin-sulbaktam gibi antibiyotiklere duyarlıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalarla ofloxacin, sparfloxacın, clarithromycin ve minocycline gibi ilaçlar lepra tedavisi için kullanılmaya başlamış ve bunlardan oluşan yeni rejimler, tedavi süresini kısaltmak amacıyla hastalarda uygulanmaya başlanmıştır (6).

İmmünoterapi: Genel immünstimülan olarak bilinen IL-2 ve 8 gün süreyle IFN- γ verilebilir. BCG+ ölü armadillolardan elde edilen *M.leprae*'dan üretilen Convit aşısı tek doz uygulanabilir. Kemo-immunoterapi olarak (üçlü antibiyotik kombinasyonu ROM(rifampisin-ofloksasin-minosiklin) ve Convit aşısı birlikte uygulanır. Ayrıca levamisol, çinko sülfat ve rekombinant gama interferonun birlikte uygulandığı tedavi prosedürü de vardır (6).

4.GEREÇ VE YÖNTEM

Elazığ Deri-Zührevi ve Lepra Hastalıkları Hastanesinde yatmakta olan tümü inaktif lepramatöz lepralı, yaşları 25-80 (ortalama 60.00 ± 14.43), tanı süreleri 4-55 (ortalama 30.66 ± 17.42) yıl olan 11'i kadın 29'u erkek olmak üzere toplam 40 hasta çalışmaya dahil edildi. Aynı şekilde lepralı teması olmamış ve herhangi bir hastalığı olmayan yaş ortalaması (55.00 ± 8.89) olan, 40 (25 erkek, 15 kadın) sağlıklı gönüllü kontrol grubu olarak incelendi. Çalışmaya katılan hastalardan ve sağlıklı kontrollerden, iki adet 2 şer ml steril etilendiamintetraasetikasit (EDTA) içeren tüpe (Vacuette EDTA K3 Greiner Bio-One) ve 5ml jelli tüpe (Vacutainer SST II Becton Dickinson UK) toplam 7ml. kan alındı. Jelli tüplere alınan kanların serumları ayrılarak her hastada ASO, CRP ve RF ölçümleri turbidimetrik yöntemle (Space Schiapparelli Biosystems Inc USA) cihazı ile yapıldı.

EDTA'lı kanlarda en geç iki saat içerisinde flow sitometrik inceleme yapıldı. Test prosedürüne uygun olarak her tüpe 5 µl monoklonal antikor ve 100 µl kan eklendi. Bu inceleme için hücreler IgG1/IgG2 (PN IM1203 Immunotech) ile negatif kontrol için, CD45/14 (PN IM 1201) ile de mononükleer hücre sayısını ortaya koymak için boyandı. Üçüncü ve dördüncü tüpdeki hücreler total lenfositleri belirlemek için CD3 FITC (floressein isotiosiyanat) (PN IM1281 Immunotech) ve T lenfosit alt grupları için CD4PE (phycoerythrin) (PN IM0449 Immunotech) ve CD8PE (PN IM0452 Immunotech) ile boyandı. Beşinci tüp CD3/16-56 (PN IM2076) ve altıncı tüp CD3 FITC (PN IM1281 Immunotech) ve CD161 PE (PN IM3450 Immunotech) ile boyandı. Yedinci tüp olarak Vα24 FITC (1589 Immunotech) ve CD161PE (PN IM3450 Immunotech) boyaması yapıldı.

Tüpler 1-2 dakika orta şiddette vortekslendi. Bu aşamadan sonra floresans kaybı olmaması için tüpler ışıktan korundu ve 20 dakika karanlıkta bekletildi. Tüplerin işleme hazır olması için gerekli yıkama ve karıştırma işlemleri TQ prep cihazı ile otomatik olarak yapıldı. Cihazın gerekli voltaj ayarları yapılarak tüpler Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter U.S.A) cihazı kullanılarak flow sitometrik olarak incelendi ve Expo-32 analiz programı kullanılarak aynı cihazla analiz edildi.

Lenfosit kültürü yapmak için bu kanlardan mononükleer hücreler izole edildi. İzolasyon için 15 ml' lik konik tabanlı steril test tüpleri (Cellstar PP test tubes Greiner Labortechnik) kullanıldı. Hücre ayırıcı solüsyon olarak 1.077 dansiteli Biocoll Separating Solution ve dansite-gradient seperasyon tekniği kullanıldı. Steril tüplere laminar flow içinde 2 ml ayırıcı solüsyon ve yine yaklaşık 2-2.5ml kan eklendi. Çökmesi beklendikten sonra 1800 devirde Hettich Universal 32 santrifüj cihazı kullanılarak 30 dakika 24⁰C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında dansiteleri biocoll'den yüksek olan eritrosit ve granülositler tüpün dibine çökerken, dansitesi biocoll'den düşük olan lenfositler solüsyonun üzerinde bir tabaka oluşturdular. Mononükleer hücreler steril pastör pipeti ile dikkatle toplandı.

Hücreleri yıkamak ve kültüre etmek için komplet medium hazırlandı. Bunun için L-glutaminli RPMI 1640 (Biological Industries Israel) solüsyonuna, %10 oranında %3'lük inaktive fetal calf serumu (Sigma-Aldrich Germany) eklendi.

Hücreler komplet medium ile yıkandı bunun için; 400 devirde 5 dakika santrifüj edildi ve pelletin üzerindeki sıvı kısım atılarak yıkama işlemi tekrarlandı ve pellet karıştırıldı.

Hücre sayımı için 20 µl ½ sulandırılmış Tripan blue kullanıldı. Hücreler Thoma lamında sayıldı ve her hücre süspansiyonunda 10^7 hücre olacak şekilde ayarlandı. Hücre süspansiyonu 24 kuyucuklu steril doku kültür platelerine (TPP Tissue Culture Test Plate) aktarıldı. Stimülasyon için *M.leprae* ekstraktı kullanıldı. *M.leprae* liyofilize suşu Colorado State Üniversitesinden Dr.Patrick Brennan'dan temin edildi.

Bakteri suşu PBS (phosphate-buffered saline) içinde karıştırıldı, 2-3 dakika vortekslendi ve 2000X g de 10 dakika santrifüjlendi. Süspansiyonun 1 ml sinde 10^9 basil bulunuyordu ve RPMI eklenerek 10 ml ye tamamlandı (1ml de 10^8 basil).

Hücreler (Ultra Turrax T 25 IKA Labortechnik) markalı homojenizatörde 5 er dakika aralıklarla 20 dakika süreyle homojenize edildi. Süpernatant 10 µg/ml DNAase ve RNAase ile 1 saat $+4^{\circ}\text{C}$ de bekletildi. Daha sonra 32000X g de 40 dakika santrifüje edildi. Bu aşamada hücre duvarının sitoplazmik membrandan ayrılması sağlandı. Bakterinin parçalandığını göstermek için süspansiyon Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) metodu ile boyandı.

EZN Boyama metodu:

1- Preparatı boyamak için Ziehl-Neelsen fenollü fuksini(Carbol-fuchsine) kullanıldı. Havada kurutulmuş alevde tesbit edilmiş preparat boyama küvetine alttan ısıtılacak şekilde yerleştirildi. Preparatı kaplayacak kadar fenollü fuksin eriyiğinden döküldü ve ucuna pamuk sarılmış tel alkolde ıslatılarak yakıldı ve preparat alttan ısıtıldı. 2 dakika süreyle boyanın kaynamasına izin verilmeden ısıtma sürdürüldü. Bu süre sonunda preparat suyla yıkandı.

2- Renksizleştirme işlemi için asit-alkol eriyiği (%95 etil alkol+ HCl) kullanıldı. Preparatın üzerine bu eriyik dökülerek renksizleştirildi. Akan eriyik boyasız kalıncaya kadar renksizleştirme sürdürüldü. Preparat tekrar suyla yıkandı.

3- Zıt boyama için Löfflerin metilen mavisi eriyiği kullanıldı. Boya preparata dökülüp 15 sn. bekletildi ve suyla yıkandı. Preparat havada kurutulularak immersiyonla incelendi. İnceleme sonrası sağlam basil kalmadığı görüldü.

Elde edilen *M.leprae* ekstraktı her kuyucuğa %10 konsantrasyonunda eklenerek lenfosit uyarımı sağlandı. Bu lenfositler hücre kültürü için karbondioksitli etüvde (Heraeus Germany) 37⁰C'de, %5CO₂ konsantrasyonunda 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda tekrar flow sitometrik olarak incelendi. Bu inceleme için hücreler yukarıda anlatılan yöntemle aynı monoklonal antikolar kullanılarak boyandı. Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coultere U.S.A) cihazı kullanılarak flow sitometrik olarak incelendi ve Expo-32 analiz programı kullanılarak aynı cihazla analiz edildi.

Hastaların periferik kanlarından elde edilen hücre oranları sağlıklı kontrollerin oranları ile karşılaştırıldı. Ayrıca lepra basili ekstraktı ile uyarılan lenfosit kültürlerinden elde edilen hücre oranları aynı hastaların periferik kan oranları ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçların analizi SPSS 11.0 programı kullanılarak yapıldı. Korelasyon analizleri "Pearson Korelasyon Analizi" ile yapıldı. Hastaların örnekleri arasındaki farklılığı ortaya koymak için "Wilcoxon T testi" ve hastalarla sağlıklı kontroller arasındaki farkı değerlendirmek için "Mann-Whitney U testi" kullanıldı.

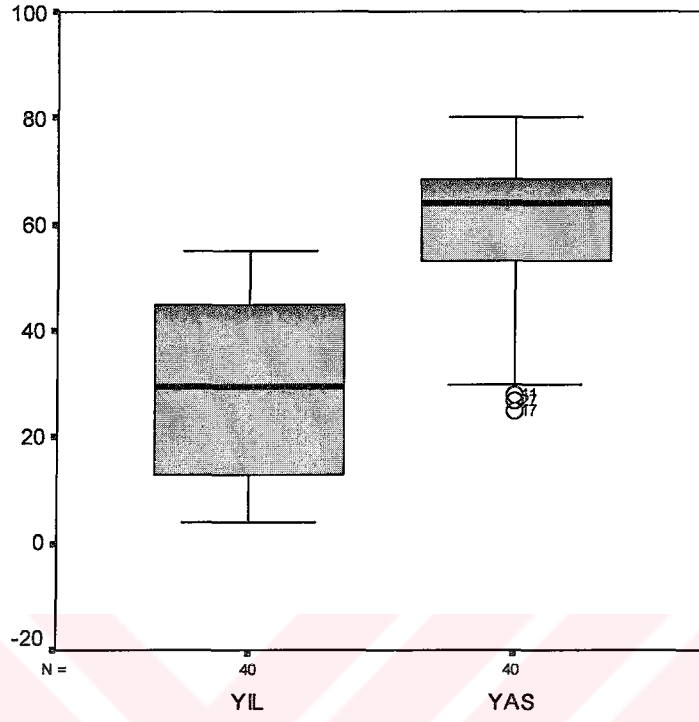
BULGULAR

Çalışma kapsamında 29'u erkek 11'i kadın olmak üzere 40 inaktif lepramatöz lepralı hasta değerlendirildi. Hastaların yaş ortalamaları 60 ± 14.43 , tanı süreleri ise 30.66 ± 17.42 olarak belirlendi. Hastaların yaşları ile gerek total lenfosit oranları gerekse lenfosit alt grupları ve NKT hücreleri yönünden herhangi bir farklılık izlenmedi. Kontrol grubunun yaş ortalaması 55.00 ± 8.89 olarak saptandı. Hasta ve kontrol grubunu yaş ortalamaları arasında önemli bir fark izlenmedi. Hastalardan alınan periferik kanların flow sitometri ile incelenmesi sonucu Hastaların tanı sürelerinin 4- 55 yıl arasında değiştiği ve tanı süreleri uzun olan hastaların çoğunlukta olduğu izlendi. Yeni tanı almış veya basil pozitif olan hiçbir hastaya rastlanmadı. Tanı süreleri ile saptanan hücre oranları arasında herhangi bir farklılık izlenmedi.

Tablo 4. İnaktif lepramatöz lepralı hastaların ve kontrol grubunun yaş ve cinsine göre dağılımı

	Çalışma grubu	Kontrol grubu
Erkek	29	25
Kadın	11	15
Yaş	60 ± 14.43	55.00 ± 8.89
Tanı süresi	30.66 ± 17.42	–

Grafik 1. Hasta yaşlarının ve tanı sürelerinin dağılımı



Tüm hasta ve kontrollere rutin inflamasyon kontrol testi olarak ASO ve CRP ölçümleri yapıldı ve özellikle ASO değerlerin hastalarda belirgin olarak yüksek saptandı. Ayrıca romatoid faktör pozitifliği araştırıldı ve sadece üç hastada RF pozitif bulunurken kontrol grubunda hiçbir hastada pozitiflik saptanmadı.

Tablo 5. Hasta ve kontrollerin ASO ve CRP değerleri

	ASO (U/ml)(0-200)	CRP (mg/l)(0-6)
Çalışma grubu	224.76±28.02	11.48±2.42
Kontrol grubu	61.04±8.09	4.66±0.43
P değeri	P<0.001	P<0.001

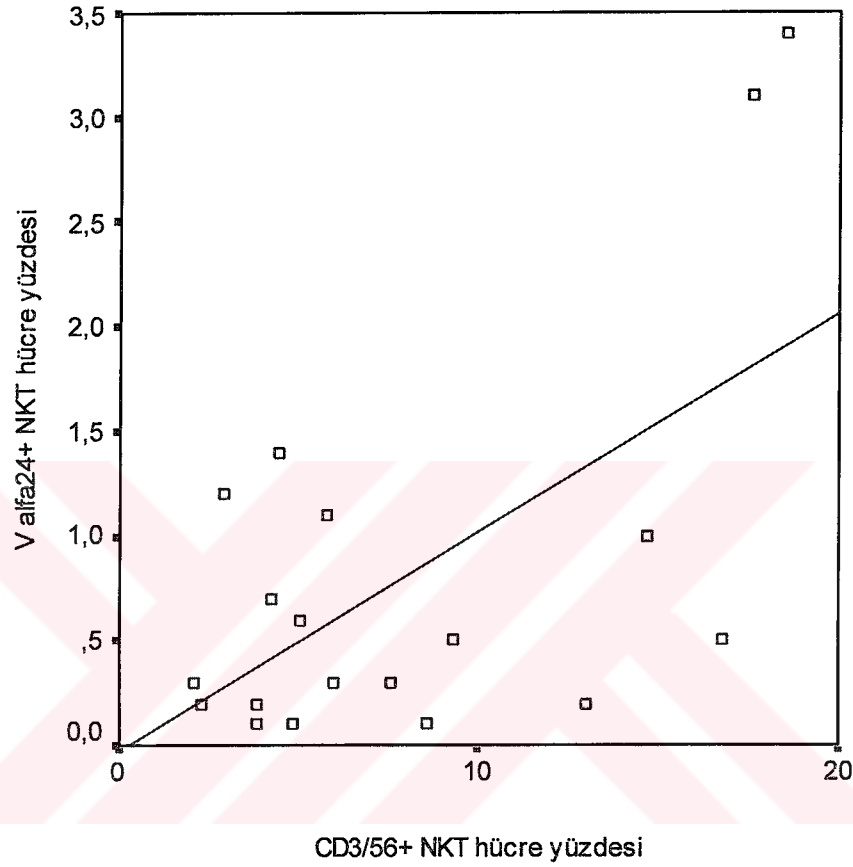
Hastaların periferik kanlarında incelenen lenfosit alt gruplarının birbirleriyle ve hasta yaşı ve tanı konulma süresi arasında korelasyon analizi Pearson korelasyon testi kullanılarak yapıldı. NKT hücreler incelendiğinde CD3/56+ NKT hücrelerle bunların alt grubunu oluşturan V α 24+ NKT hücreler arasında güçlü pozitif korelasyon saptandı. Diğer T lenfosit alt grupları arasında herhangi bir korelasyona rastlanmadı.

Tablo 6. Saptanan hücreler ve hasta yaşı, tanı süresi arasındaki korelasyon tablosu

	V α 24+	CD3+	CD356+	CD4+	CD8+	CD56+	Tanı süresi	Yaş
V α 24+	1		** ,597	-,035	,054	,359	-,138	,010
	,	,061	,007	,851	,788	,189	,453	,956
CD3+	,335	1	,151	-,293	,156	,440	-,080	,069
	,061	,	,537	,093	,437	,100	,629	,674
CD3/56+	** ,597	,151	1	-,002	-,308	,039	-,266	,047
	,007	,537	,	,993	,199	,891	,270	,849
CD4+	-,035	-,293	-,002	1	-,214	-,078	,067	-,081
	,851	,093	,993	,	,283	,781	,705	,647
CD8+	,054	,156	-,308	-,214	1	,122	,062	-,231
	,788	,437	,199	,283	,	,665	,760	,247
CD56+	,359	,440	,039	-,078	,122	1	-,491	-,101
	,189	,100	,891	,781	,665	,	,063	,719
Tanı süresi	-,138	-,080	-,266	,067	,062	-,491	1	,171
	,453	,629	,270	,705	,760	,063	,	,297
Yaş	,010	,069	,047	-	-,231	-,101	,171	1
	,956	,674	,849	,081	,647	,247	,719	,297
								,

** 0.01 önemlilik düzeyinde korelasyon vardır.

Grafik 2. V α 24+ /CD 161+ NKT hücrelerle CD3/56+ NKT hücreler arasındaki pozitif korelasyon grafiği



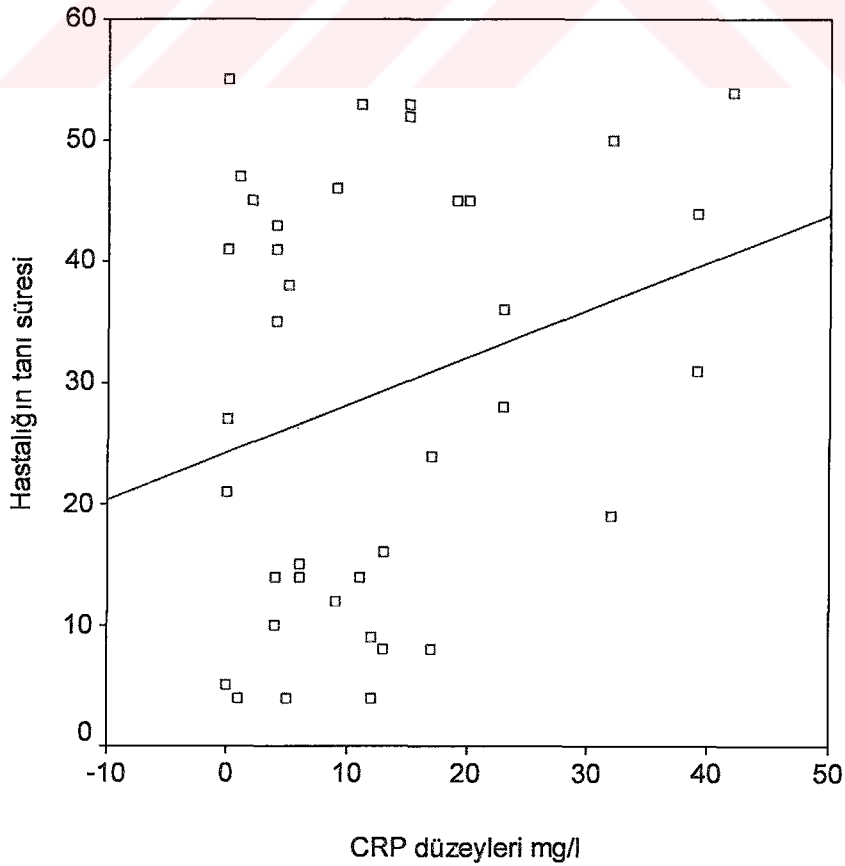
Yapılan korelasyon analizinde sadece tanı süresi ve RF ile CRP değerleri arasında "Pearson" korelasyon analizine göre pozitif korelasyon izlenmiş diğer veriler arasında korelasyona rastlanmamıştır.

Tablo7. Hastaların yaş, tanı süresi ve ASO, CRP, RF değerleri arasındaki korelasyon tablosu

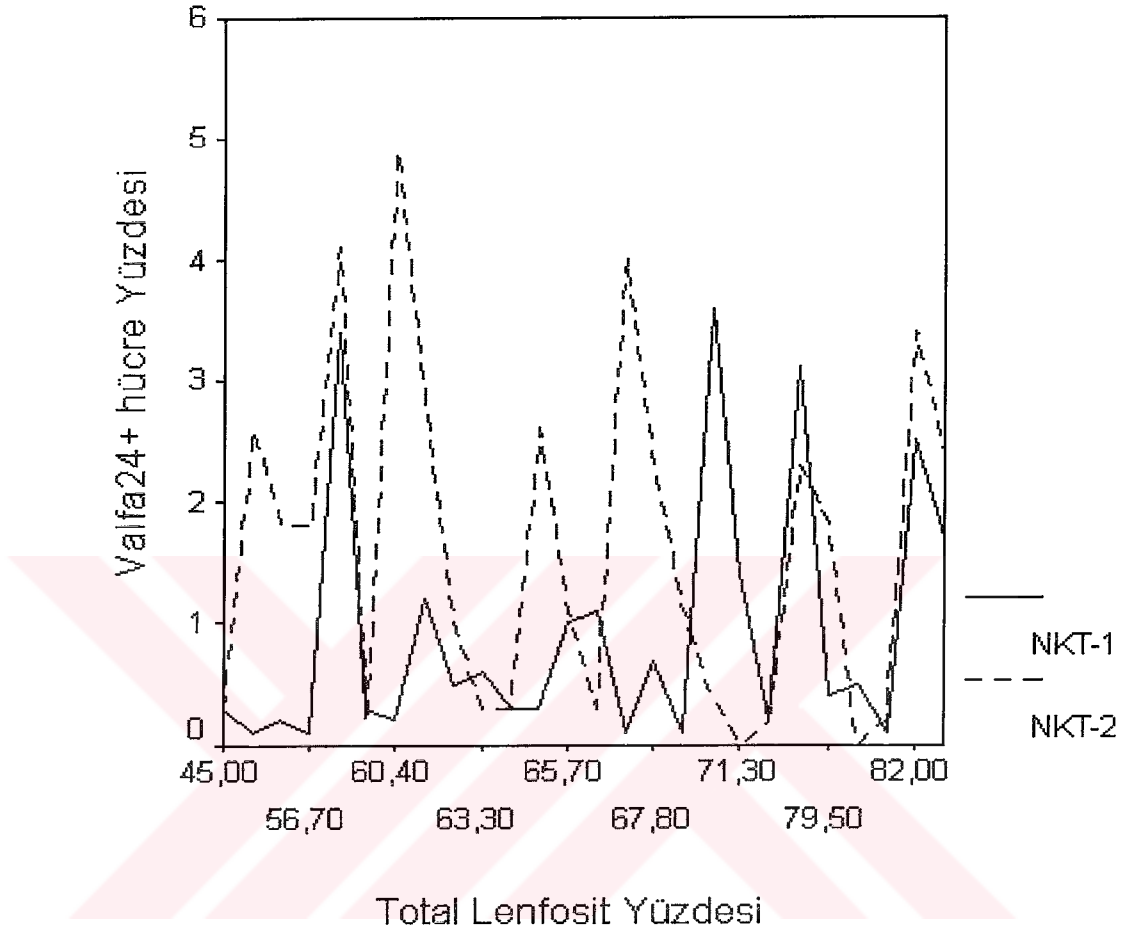
	Yaş	Tanı süresi	ASOU/ml	CRPmg/L	RFU/ml
Yaş	1	,125	-,335	-,029	,062
	,	,441	,101	,860	,770
Tanı süresi	,125	1	-,069	*,259	,210
	,441	,	,742	,107	,313
ASO	-,335	-,069	1	,239	,136
	,101	,742	,	,249	,518
CRP	-,029	*,259	,239	1	*,472
	,860	,107	,249	,	,017
RF	,062	,210	,136	*,472	1
	,770	,313	,518	,017	,

* 0.05 önemlilik düzeyinde korelasyon vardır.

Grafik 3. CRP değerlerinin tanı süresiyle korelasyonu



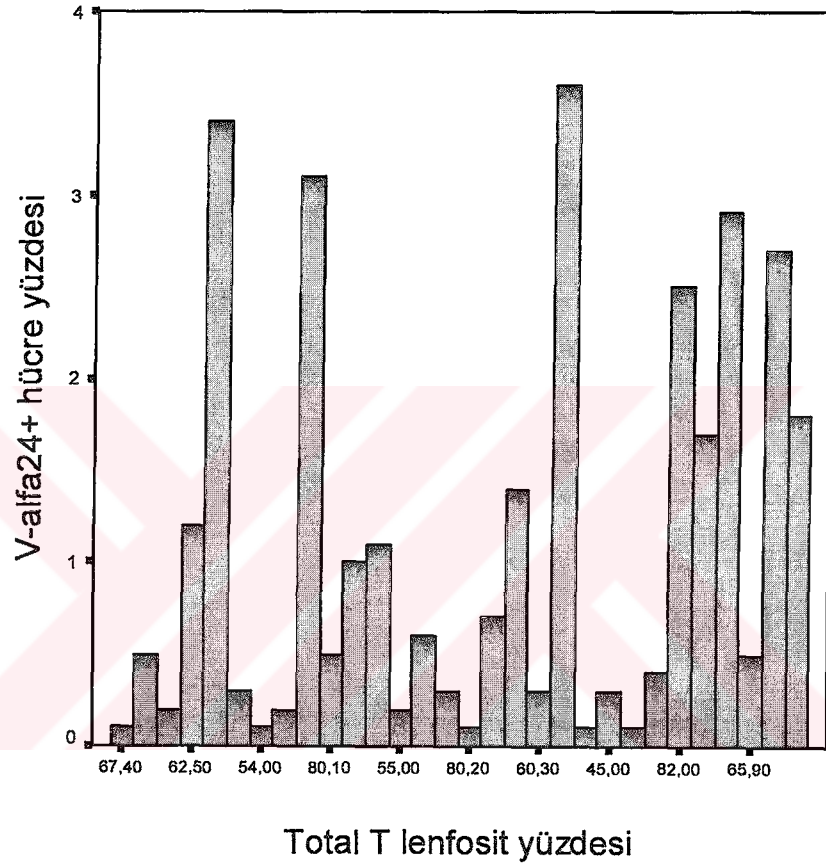
Grifik 4: $V\alpha 24+$ NKT hücrelerinin periferik kan ve lenfosit kültüründe saptanan karşılaştırmalı oranları



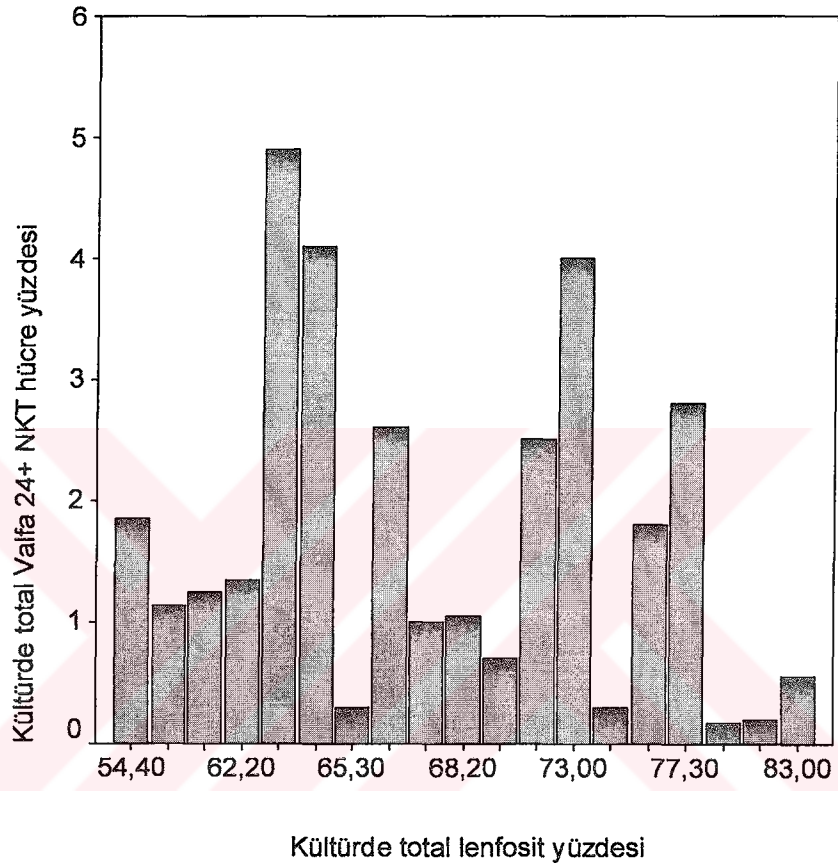
NKT-1: Hasta periferik kanında saptanan $V\alpha 24+$ NKT hücreler

NKT-2: Hastadan yapılan lenfosit kültüründe saptanan $V\alpha 24+$ NKT hücreler

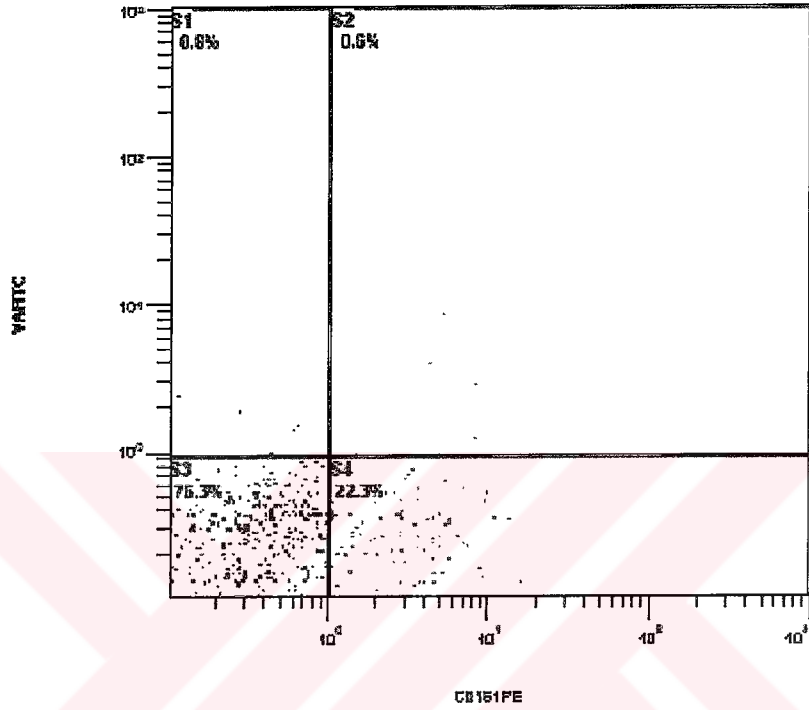
Grafik 5. Hasta periferik kanında saptanan V α 24+ NKT hücrelerin CD3+ total T lenfositler içindeki oranları



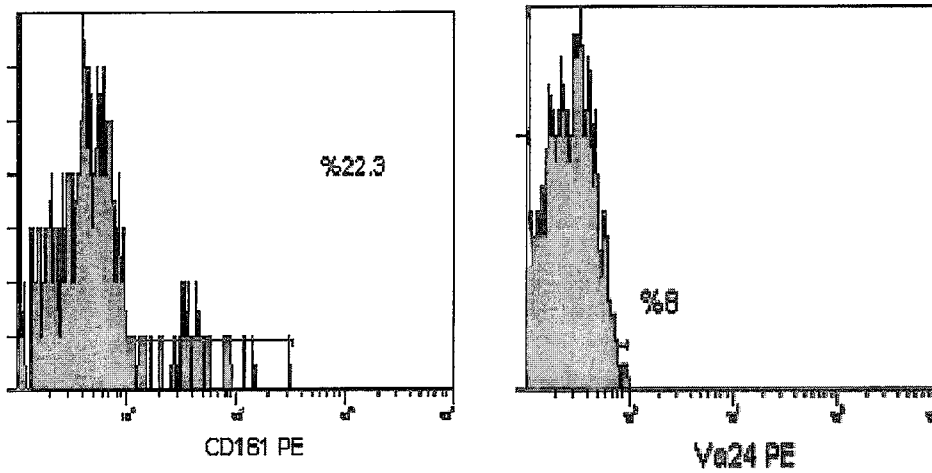
Grafik 6. Lenfosit kültüründe saptanan V α 24+ NKT hücrelerin total T lenfositler içerisindeki oranı



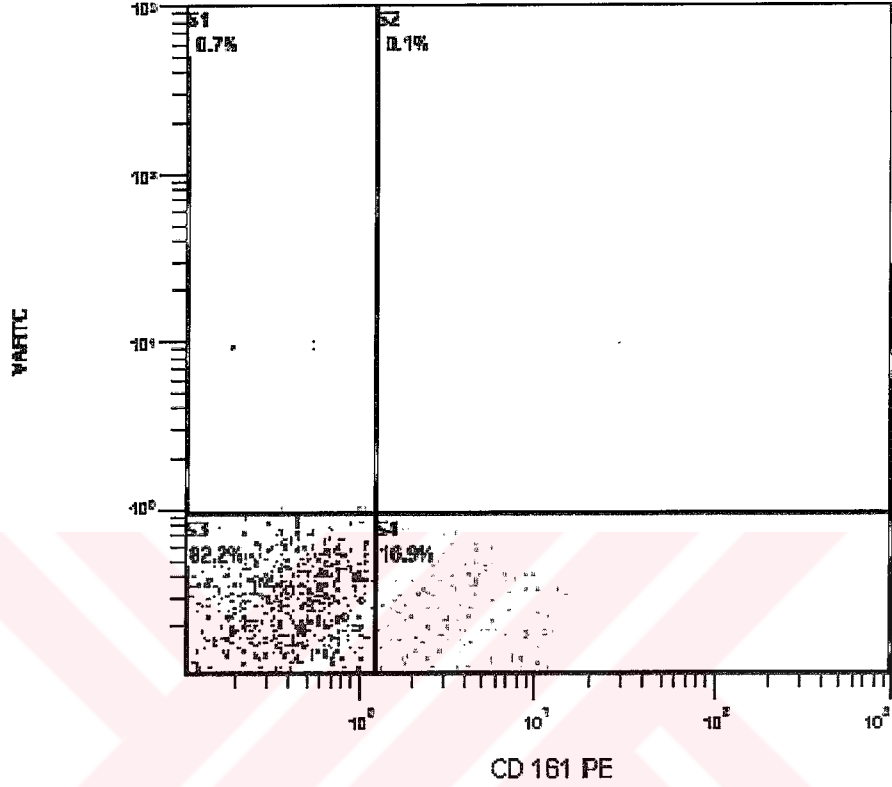
Şekil 1. Hastaların lenfosit kültürlerinde izole edilen Va24+ /CD161+ NKT hücrelerin flow-sitometrik görünüşleri



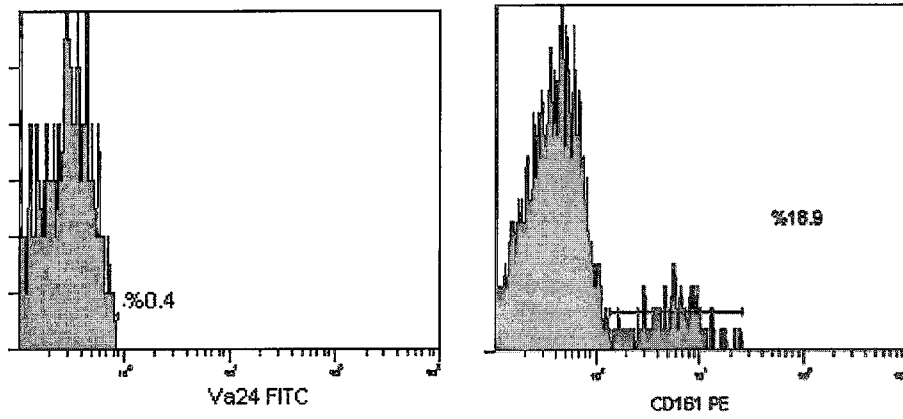
Şekil 2-3. Hastaların lenfosit kültürlerinde izole edilen Va24+ /CD161+ hücrelerin histogramları



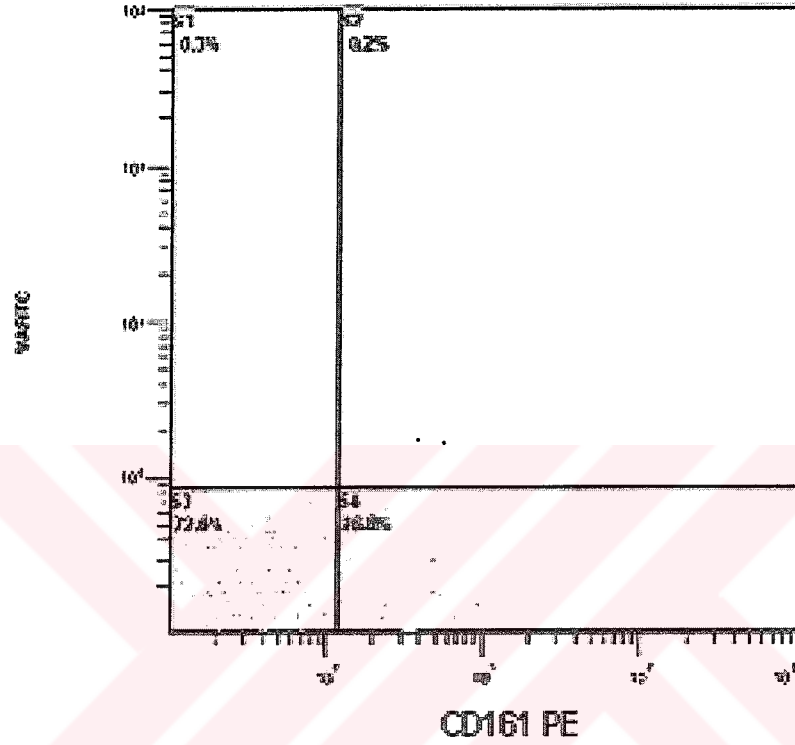
Şekil 4. Sağlıklı kontrol periferik kanında izole edilen $V\alpha 24^+$ / $CD161^+$ NKT hücrelerin flow sitometrik görünümü



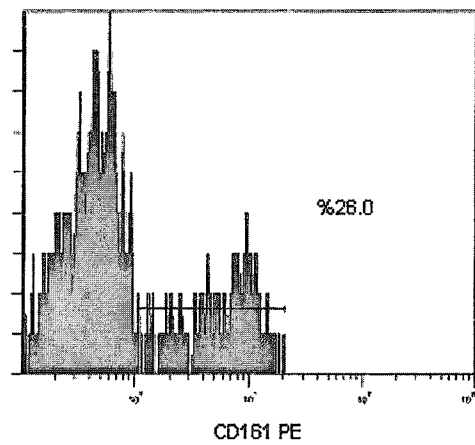
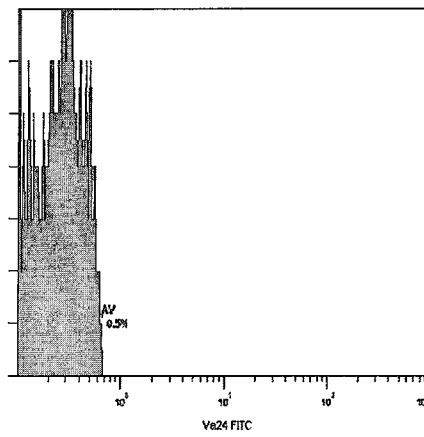
Şekil 5-6. Sağlıklı kontrol periferik kanında izole edilen $CD161^+$ ve $V\alpha 24^+$ hücrelerin histogramları



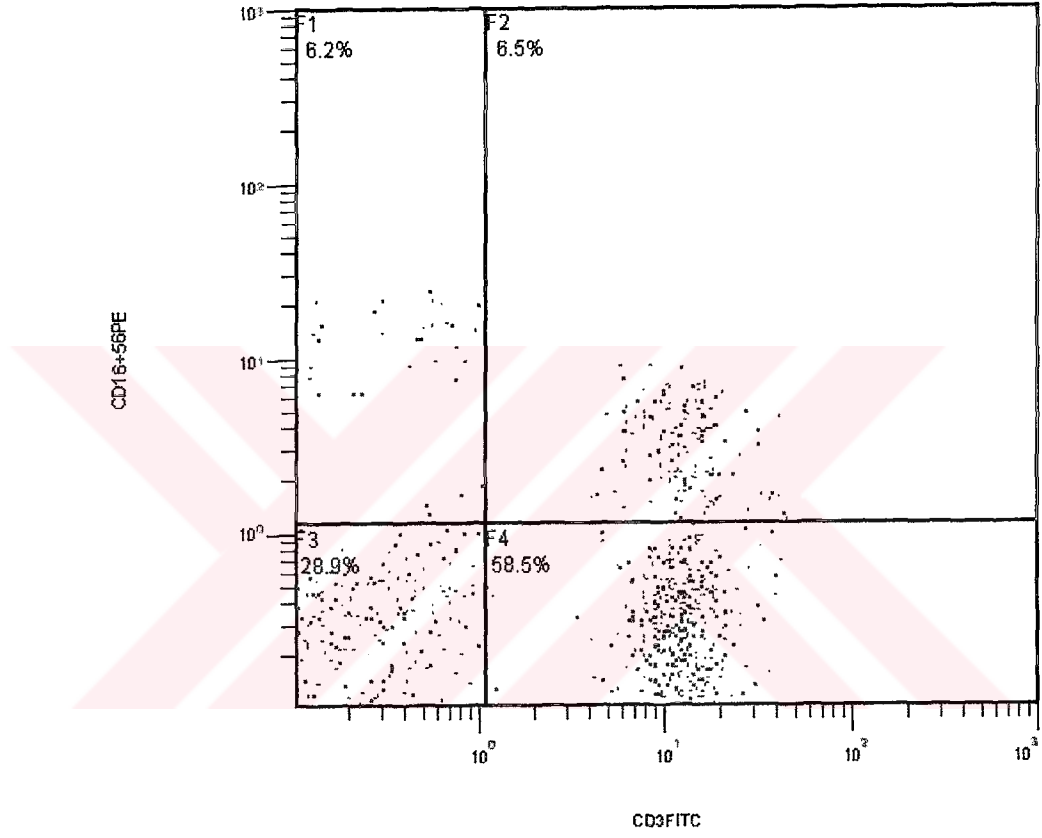
Şekil 7. Hastaların periferik kanlarında izole edilen $V\alpha 24+$ /CD161+ NKT hücrelerin flow-sitometrik görünüşleri



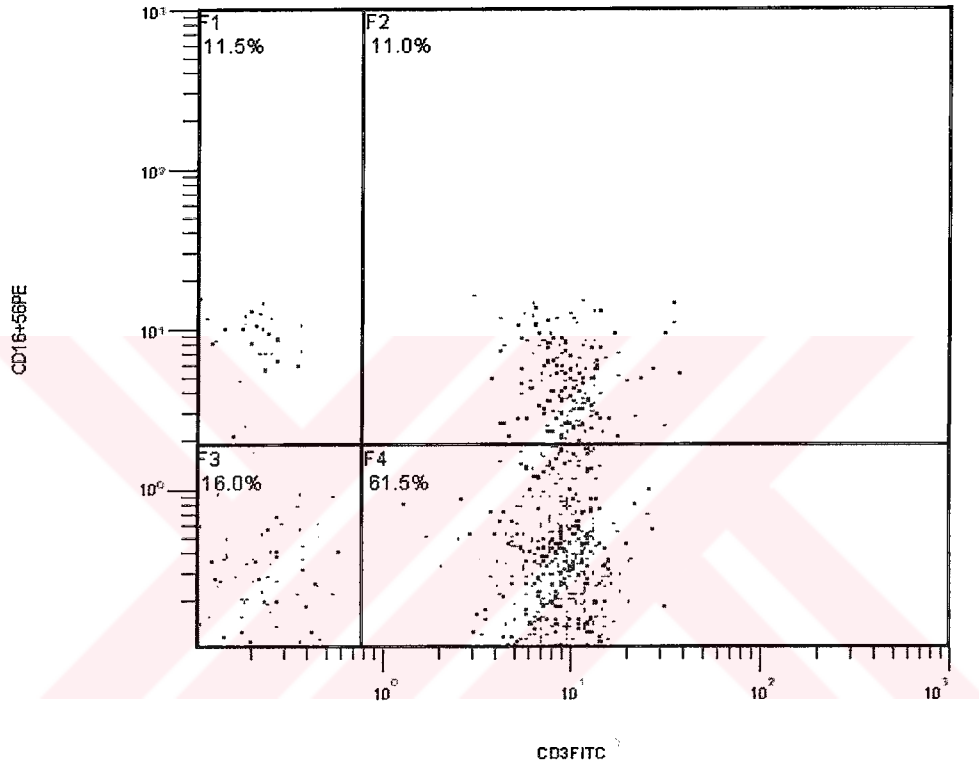
Şekil 8-9. Hastaların periferik kanlarında izole edilen $V\alpha 24+$ /CD161+ hücrelerin histogramları



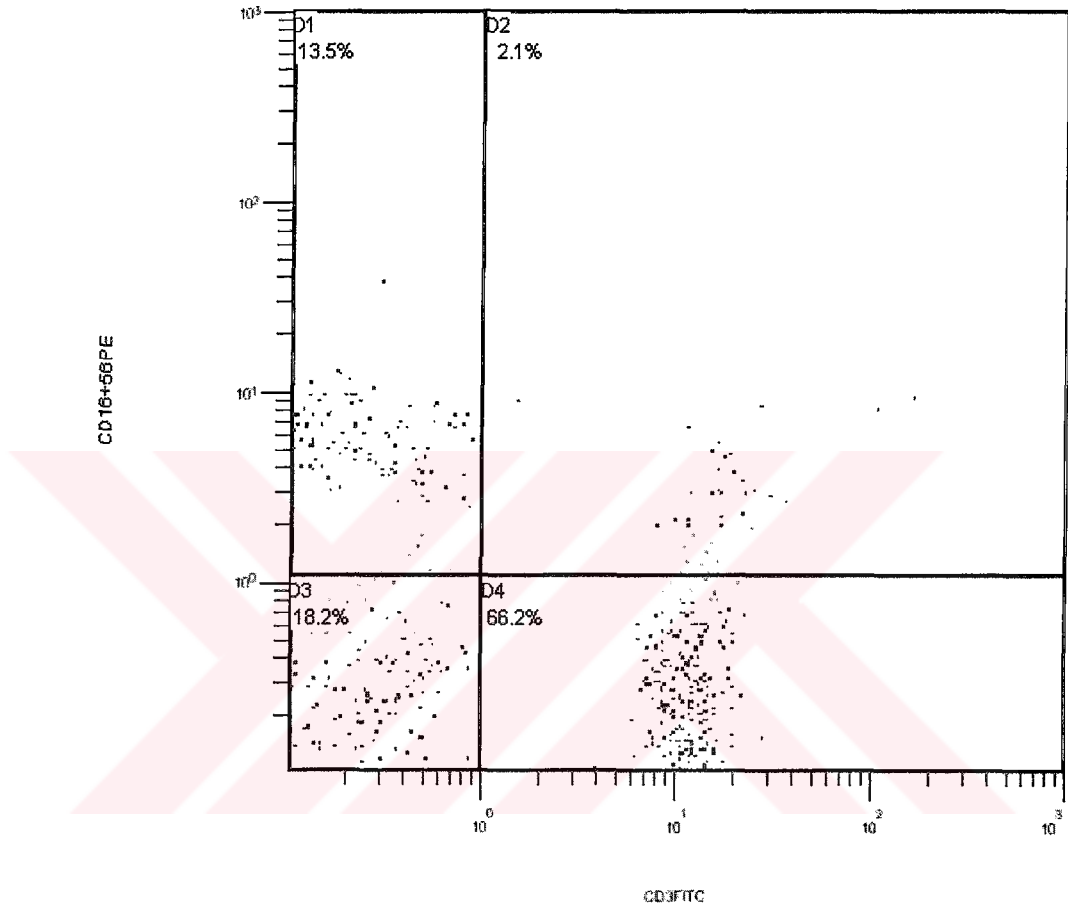
Şekil 10. Hasta periferik kanlarında izole edilen CD3/16+56+ hücrelerin flow-sitometrik görünüşleri



Şekil 11. Lenfosit kültürlerinde izole edilen CD3/16+56+ hücrelerin flow-sitometrik görünümüleri



Şekil 12. Sağlıklı kontrollerde saptanan CD3/16+56+ hücrelerin flow-sitometrik görünümüleri



Tablo.8: Hasta ve sağlıklı kontrollerde saptanan lenfosit oranları

	Hasta	Sağlıklı	P değerleri
Total lenfosit CD3+	67,10 ± 1,67	64.76 ± 1,16	p>0,05
CD4+ T hücre%	44,60 ± 1,98	39.21 ± 0,80	p<0,001
CD8+ T hücre%	26.75 ±1,00	24.05 ± 1.37	p>0,05
CD4/CD8 oranı	1,45 ± 0,06	1,84 ± 0,09	p<0,001
CD56+16+ NK	13.95 ± 1.28	17.48 ± 1.43	p>0,05
CD3+56+ NKT	8,60 ± 1,13	2.17 ± 0.37	p<0.001
Vα24+CD161+	0,92 ± 0,21	0.54 ± 0.18	p<0,05
CD3+CD161+	22.75±1.00	18,80 ± 2,17	p<0,05

Tablo 9: Hasta periferik kan ve primer lenfosit kültürü lenfosit oranları

	Periferik kan Ortalama± SE	Lenfosit kültürü Ortalama± SE	P değerleri
Total CD3+	67,10 ± 1,67	69,93 ± 1,86	p>0.05
CD4+	44,60 ± 1,98	47,77 ± 2,24	p>0.05
CD8+	26,75 ±1,00	35,52 ± 3,17	p<0.05
CD56+16+	13.95 ± 1.28	16,24 ± 1,73	p<0.05
CD3+56+	8,60 ± 1,13	14,8 ± 1,55	p<0.05
Vα24+CD161+	0,92 ± 0,21	1,62 ± 0,28	p<0.05

ASO sonuçları 40 hastanın 14'ünde normal sınırlarda saptanırken kalan 26 hastada üst sınır olan 200U/ml'nin 1.5-3 katına kadar varan değerlerde yükseklik izlendi. Romatoid faktör(RF) ise sadece üç hastada pozitif bulundu ve bu hastaların eklem ağrı ve şişme yakınmalarının olduğu saptandı. CRP değerleri ise 11 hastada normal sınırlarda saptandı, ancak 29 hastada yükselme izlendi. Gerek hasta ve sağlıklıların, gerekse hastaların periferik kanları ile lenfosit kültürleri karşılaştırıldığında total lenfosit ve NK hücre oranları bakımından fark olmadığı görüldü. CD8+ sitotoksik T lenfosit yüzdelere bakıldığında hasta ve sağlıklılar arasında fark saptanmazken, *M.leprae* ekstraktı etkisinde bırakılan lenfositlerde periferik kandakilere kıyasla belirgin bir CD8+ lenfosit artışı izlendi. Bu sonuç invitro koşullarda basil uyarısı altında sitotoksik T lenfositlerin arttığını ve basili öldürmeye çalıştığını düşündürmektedir. CD4+ hücre yüzdesinin, hastalarda sağlıklılardan daha yüksek olduğu görüldü ama hastaların kan ve kültür sonuçları arasında böyle bir fark görülmedi. Benzer bir farklılık da NKT hücreler açısından izlendi: Hem $V\alpha 24+CD161+$ iNKT hücreler (invariant T hücreler) hem de $CD3+CD56+$ hücre oranlarının, hastalarda kontrol grubuna göre ve lenfosit kültürlerinde hasta periferik kan hücrelerine göre belirgin olarak yüksek saptandı ve istatistiksel anlamlılık gösterildi ($p<0.05$).

TARTIŞMA

M.leprae'ya karşı hücresel immünite önemlidir ve T hücre defekti olduğunda yada immün cevap Th2 yönünde polarize olduğunda hastalığın klinik görünümünün değiştiği daha ağır bir form olan lepramatöz lepranın geliştiği bilinmektedir. CD4+ ve CD8+ T hücrelerin bu hastalıktaki rolleri kesin olmasına karşın, bir T hücre alt grubu olan NK hücresi differansiyon antijeni CD161 sunan; CD1d sınırlı T hücreler, invariant T hücreler, V α 24J α Q TCR taşıyan, α GalCer bağlayan hücreler de denilen, NKT hücrelerin henüz birçok hastalıkta olduğu gibi lepradaki rolleri tam aydınlanmamıştır. Buna karşın bazı otoimmün hastalıklarda, tümör immünitesinde koruyucu rol oynadıkları gösterilmiştir (6,18).

NKT hücrelerinin yüzey yapıları içinde bulunan CD161 molekülü ilk kez NKR-P1A molekülü olarak, rodentlerdeki NKR-P1 glikoproteinlerinin insandaki homologu olarak tanımlanmış ve periferik kanda T hücrelerinin yaklaşık %25'inin bu molekülü taşıdığı belirlenmiştir (25). Rodentlerde üç NKR-P1 molekülü vardır: NKR-P1 A, B ve C. İnsanda ise bilinen tek NKR-P1 molekülü NKR-P1A yani CD161 molekülüdür (12). Aslında aktive olan T hücreler de bu molekülü sunarlar (39). CD161'in V α 24+ T hücrelerin TCR aracılı proliferasyonu ve sitokin sekresyonunda spesifik kostimülatör molekül olarak etki ettiği gösterilmiştir. Çünkü tek başına TCR uyarımı olmaksızın CD161 uyarısı ile V α 24+ T hücreler aktive olmaz. CD161 monoklonal antikolar spesifik olarak V α 24+ T hücre gelişimini engelleyebilir ve CD1d+ hedef hücrelere cevap olarak sitokin sentezlenmesini baskılayabilir.

Ancak, granüller aracılığıyla ve eksositik mekanizma ile gerçekleşen hedef hücre lizisi CD161'e bağımlı değildir ve dolayısıyla CD161 kostimülasyonu direkt olarak IFN- γ salınmasını sağlayamaz (12).

NKT hücreler değişen oranlarda CD161 sunarlar. Ayrıca invariant TCR taşıyan CD161+ hücreler de vardır. NKT hücreler içinde CD161+ hücrelerin oranı CD56+ olanlardan önemli ölçüde yüksektir ve CD161+CD56+ olanlar efektör tip hücrelerdir (27). Bizim çalışmamızda da belirtilen oranlara uygun olarak CD3+CD161+ T hücrelerin oranı 22.75 ± 1.00 bulunurken, CD3+ CD56+ hücrelerin oranı 8.60 ± 1.13 olarak saptandı. Sonuç olarak CD161+ hücrelerin yüzdesi CD56+ olanlara göre anlamlı ölçüde yüksekti. Bu nedenle tek başına CD161 bakılarak NKT hücreleri ortaya konulamaz, bu molekülün invariant TCR ile birlikte yorumlanması gerekmektedir. Buna karşın invariant olarak tanımlanan V α 24 taşıyan CD161+ hücre yüzdesi %1'den küçük bulundu (0.92 ± 0.21).

CD 161 bir kostimülatör moleküldür ve NKT hücrelerin uyarılmasında önemli role sahiptir. Bu nedenle *M.leprae* ekstraktı ile uyarılan lepralı hastalardan elde edilen lenfositlerde NKT hücre oranlarının yaklaşık iki kat (1.7) artış gösterdiği saptandı. Benzer şekilde CD3+CD56+ hücrelerde ve CD8+ lenfositlerde artış izlenirken CD4+ ve NK hücre yüzdesinde fark gözlenmedi.

V α 14 taşıyan fare NKT hücrelerin hem NK1.1 hem de TCR taşıdıkları için NK markerları sunan $\alpha\beta$ T hücrelerin bir grubu olduğuna inanılır. Aslında aktive olan T hücreler bazen NK markerları sunabilirler. Fakat son veriler V α 14 NKT hücrelerinin klasik $\alpha\beta$ T hücreleri olmadığını ve B hücrelerden, T hücrelerden ve NK hücrelerden farklı bağımsız bir hücre serisi olduğunu düşündürmektedir(39).

TCR (T cell receptor) repertuarları ve bazı yüzey molekülleri tanımlanmış olmasına karşın NKT hücrelerin fonksiyonları, immün cevabın regülasyonunda oynadıkları rol ve karmaşık sitokin profillerinin cevabı yönlendirmedeki etkisi hakkında farklı yorumlar yapılmaktadır. Total lenfosit yüzdesi içinde kapladıkları hacmin küçüklüğüne rağmen fonksiyonlarının önemi şaşırtıcıdır. NKT hücrelere her ne kadar doğal bağışıklığın güçlü aktörleri gözü ile bakılsa da, özellikle CD4+ NKT hücrelerin immünglobülin üretiminde yardımcı olabildikleri sanılmaktadır. Bu hücrelerle B lenfositler arasında aktivasyon ve immünglobülin üretimi ile sonuçlanan CD1d bağımsız bir etkileşim gösterilmiştir. Yani, NKT hücrelerinin B lenfosit fizyolojisinde de düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir (13).

NKT hücrelerinin *M.leprae*'a dirençte rol oynayıp oynamadığı kesinlik kazanmamıştır ancak rolü olduğunu düşündüren çeşitli çalışmalar vardır. CD1 molekülleri klasik HLA'ların aksine çok sınırlı ve hücre tipine spesifik bir ekspresyona sahiptir. CD1 proteinleri timositlerde güçlü olarak sunulur. Timus dışında ise temel olarak antijen sunucu hücrelerde sunulurlar (7). CD1 moleküllerinin fonksiyonlarının anlaşılması ilk olarak mikobakteriyel lipitlerin CD1b ile T hücrelere sunulduğunun gösterilmesi olmuştur (16). Bu mikobakteriyel antijenler; mikobakteri hücre duvar yapısında bulunan mikolik asit, glikoz içerikli mikolik asit (glikoz monomikolat-GMM) ve lipoarabinomannandır. Lepralı hastaların lezyonlarından da mikobakteriyel antijenlere spesifik CD1-sınırlı T hücreler izole edilmiş ve lepra lezyonlarında dendritik hücrelerce grup-1 CD1 moleküllerinin sunulumu etkin bir hücresel immün cevap gelişmesi ile direk olarak ilişkili bulunmuştur.

Çalışmamızda proteolizle proteinlerini uzaklaştırdığımız ve homojenize ettiğimiz *M.leprae* ekstraktı ile uyarılan lepralı hastalardan elde edilen primer lenfosit kültürlerinde artan NKT hücre yüzdeleri bu verileri destekler görünmektedir.

Bir başka çalışmada mikobakterilerin hücre duvarındaki glikolipit fraksiyonun NKT hücrelerinin birikiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Aynı araştırmada granümatöz cevabın en erken safhasında NKT hücrelerinin bulunduğu ve bu hücre birikiminin, konağın nonpeptid mikobakteriyel komponentlere erken cevabında rol oynayabileceği gösterilmiştir (1) $V\alpha 14$ defektli farelerde yapılan deneyde bu farelerin BCG infeksiyonunu elimine edebildiği ama daha fazla granüloma formasyonu ve kazeasyon nekrozu gelişimi gösterdikleri bildirilmiştir. Bu çalışma $V\alpha 14$ NKT hücrelerin antiinflamatuvar hücreler gibi çalıştığını ve aşırı lenfosit birikimi ve doku hasarını sınırlandırabildiğini göstermiştir. Bu hücrelerin koruyucu cevap ve immünopatoloji arasındaki dengenin sağlanmasında düzenleyici görev üstlendikleri bildirilmiştir (10). Sugawara ve arkadaşlarının(36) yaptıkları çalışmada tüberkülozla infekte edilmiş NKT knockout fareler kullanılmış sonuçta gerek granülom formasyonu açısından gerekse sitokin üretimi açısından normal farelerle arasında çok büyük bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Gansert ve ark. (14) *M.tuberculosis* ile yaptıkları çalışmalarında deniz süngerinden elde edilen bir glikolipit olan α -galaktozil seramid'in CD1d aracılığıyla IFN- γ üreten NKT hücreleri aktive ettiğini bulmuşlar ve NKT hücrelerin bu infeksiyonda üç önemli özellik taşıdığından söz etmişlerdir.

NKT hücreler ürettikleri IFN- γ ile Th1 cevabını indükler, NKT hücreler mikobakterinin sığındığı bir liman olan fagositik hücreleri parçalayabilirler ve bu hücreler NKT hücreler antimikrobiyal bir peptit olan granülisini salgılayarak antimikrobiyal özellik gösterirler (14).

Yapılan bir çalışmada α -GalCer'in V α 14 NKT hücreleri seçici olarak aktive ettiği ve sonuçta bu hücrelerin tümör metastazlarının önlenmesinde görev aldığı ortaya konulmuştur. NKT hücre aktivasyonunda IL-12 primer rolü oynamakta ve dolayısıyla IL-12 aracılı tümör rejeksiyonu görülmektedir. NKT hücrelerin tümör hücrelerini öldürmesi V α 14 TCR ve CD1d bağımsızdır NK gibi direkt mekanizma ile olmaktadır (21).

Çeşitli çalışmalara rağmen CD1d ile sunulan glikolipit antijenlere karşı bu hücrelerin verdiği reaksiyonun moleküler temeli hakkında çok az bilgi vardır ve CD1d molekülüne bağlı antijenlerin karbonhidrat hareketliliği TCR etkileşiminde major rolü oynar denilmiştir (35). Ayrıca inflamasyon belirteçleri olarak kullanılan ASO ve CRP değerlerinin normalin üzerinde saptanması; inaktif durumda olsalar dahi lepralı hastalarda kronik bir inflamasyonun olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir.

Bizim çalışma kapsamına aldığımız tüm hastaları inaktif lepramatöz lepralılar oluşturduğundan ve tanı süreleri çok uzun olduğundan yukarıda söz edilen özelliklerin bu hastalarda saptanması çok zordur. Ancak yinede bakteri ile karşı karşıya kaldığında in vitro koşullarda bu hastaların NKT hücre oranlarının arttığı gözlemlendi.

Periferik kanda NKT hücre yüzdesi tüm lenfositler içerisinde 0.92 ± 0.21 iken, *M.leprae* ekstraktı uygulanan lenfosit kültürlerinde bu oranın 1.02 ± 0.28 'e yükseldiği gözlemlendi ($p < 0.05$). Elde edilen sonuç direkt bakteri ile veya onun ekstraktı ile karşılaştırıldığında NKT hücrelerinde diğer hücreler gibi aktive olabileceğini ve sayıca artabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca bu sonuç tekrarlayan enfeksiyonlarda da NKT hücrelerin artabileceğini düşündürülebilir. Uyarıldıklarında hızla IFN- γ üretme kapasitesinde olan bu hücreler leprada Th1 polarizasyonunu güçlendirici etki yapabilirler ve hastalığa karşı verilen hücresel immün cevabı artırabilirler. Bu varsayım, lepranın ağır klinik formu olan lepramatöz lepranın gelişmesini önlemede ve en azından hastalığın başında yakalanabilen hastalarda NKT aktivasyonunu sağlayabilecek tedavi alternatifleri (α -galaktozil seramid vb.) oluşturulmasında göz önüne alınabilir.

NKT hücreler T hücre cevabının olduğu lepra formunda bolca bulunurken lepramatöz lepralı granülomlarında saptanmamıştır. Tüberküloid leprada NKT hücrelerin birikiminin gösterilmesi, bu hücrelerin mikobakteriler ve diğer hücre içi bakteriler tarafından üretilen bazı maddelere yönelik doğal immün cevapta önemli bir role sahip olduğu hipotezini güçlendirmektedir (29). *M.tuberculosis* ile yapılan bir çalışmada NKT hücrelerinin tüberküloz enfeksiyonu sırasında aktive olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin ise mikobakteri hücre duvar lipidlerinin granülom oluşumunu indüklemesi ve NKT hücreleri inflamasyon alanına çekmesi olabilir denmiştir. Bakteri duvar lipidleri CD1 aracılığıyla NKT hücreleri aktive edecek kadar yeterli olmayabilir veya infekte makrofajlarda CD1d sunulumu azalır.

Sonuç olarak NKT hücelere antijen sunulumunun azalmasını etkileyebilir. Aynı çalışmada α -galaktozil seramid(α -GalCer) verilmesini takiben NKT aktivasyonunda dramatik bir artma görüldüğü bildirilmiştir (8).

Bu sonuç hem α -GalCer'in terapötik bir potansiyeli olduğunu hem de NKT hücrelerin modülasyonunun ileride lepra gibi karmaşık hastalıklarda dahi yeni tedavi modelleri gelişmesinde hedef hücreler olabileceğini işaret eder.

Bizim çalışma sonuçlarımıza göre inaktif lepramatöz lepralı hastalarda $V\alpha 24$ invariant zincirini ve CD161 molekülünü taşıyan NKT hücrelerin oranı 0.92 ± 0.21 arasında bulundu. Bu oranlar normal kan konsantrasyonu verilerine uymaktadır. Bu hastalardan yapılan kısa süreli (24 saat) lenfosit kültürleri basil ekstraktı ile uyarıldığında NKT hücre oranlarının arttığı izlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmadaki veriler enfeksiyon ajanı ile etkileşme sürecinde mikroorganizmanın kendisi veya antijenik uyarı yapabilen molekülleri ile karşılaştığında NKT hücrelerin de hücre sel bağışıklık cevabının önemli elemanları olarak görev yaptığını düşündürmektedir. Hücre kültürlerinde stimulus altında iken bu hücrelerin oranlarının arttığının gösterilmesi lepradan korunmak için NKT hücrelerinin uyarılmasını hedefleyen immunmodülatör tedavilerin geleceğin tedavi yaklaşımı olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Apostolou I, Takahama Y, Belmont C, Kawano T, Huerre M, Marchal G, Taniguchi M, Nakauchi H, Fournie J, Kourilsky P, Gachelin G. (1999). Murine natural killer cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls Proc. Natl. Acad. Sci.; 96:5141-5146.
- 2- Assarson E, Kambayashi T, Sandberg JK, Hong S, Taniguchi M, Kaer LV, Ljunggren HG, Chambers BJ. (2000). CD8⁺ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo Journal of Immunology; 165:3673-3679.
- 3- Bilgehan H. (1995). Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları Barış Yayınları İzmir.
- 4- Bilgehan H. (1992). Klinik Mikrobiyolojik Tanı 1. Baskı Barış Yayınları İstanbul.
- 5- Blake LA, West BC, Lary CH, et al (1987). Environmental nonhuman sources of leprosy. Review of Infectious Diseases; 9:562-577.
- 6- Anonim. Bozkır M. (2002). Lepre tedavisi. Ankara Merkez Cüzzam Savaş Derneği Erişim: (www.un.org.tr/who/bulten/turk/bullepratedavi.htm) Erişim tarihi: 05.07.2004.
- 7- Carbone E, Terrazzano G, Melian A, Zanzi D, Moretta L, Porcelli S, Karre K, Zappacosta S. (2000). Inhibition of human NK cell-mediated killing by CD1 molekules The Journal of Immunology; 164: 6130-6137.
- 8- Chackerian A, Alt J, Perera V, Behar SM. (2002). Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis Infection and Immunity 70(11):6302-6309.
- 9- Chan WL, Pejnovic N, Liew TV, Lee CA, Groves R, Hamilton H. (2003). NKT subsets in infection and inflammation Immunology Letters, 85; 2:159-163.
- 10- Dieli F, Taniguchi M, Kronenberg M, Sidobre S, Ivanyi J, Fattorini L, Iona E, Orefici G, De Leo G, Russo D, Caccamo N, Sireci G, Di Sano C, Salerno A. (2003). An anti-inflammatory role for V alpha 14 NKT cells in Mycobacterium bovis basillus Calmette-Guerin-infected mice The Journal of Immunology 15; 171(4):1961-1968.
- 11- Esquenazi DA, Sampaio EP, Moreire AL, Gallo ME, Almeida SM, Samo E. (1990). Effect of treatment on immune responsiveness in lepromatous leprosy patients. Leprosy Rev.; 61:251-257.
- 12- Exley M, Porcelli S, Furman M, Garcia J, Balk S. (1998). CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V α 24JaQ T cell receptor α chains. Journal Experimental Medicine; 7:867-876.
- 13- Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S (2003). Innate immune responses support adaptive immunity: NKT cells induce B cell activation Vaccine, 21:48-54.

- 14- Gansert JL, Kiebler V, Engele M, Wittke F, Röllinghoff M, Krensky AM, Porcelli SA, Modlin RL, Stenger S (2003). Human NKT cells Express granzysin and exhibit antimycobacterial activity *Journal of Immunology* 15;170(6):3154-3161.
- 15- Gelber R H.(1989). *Leprosy (Hansen's Disease) Infectious Diseases* 4th edition. Hoeprich P.D and Jordan M.C (Editörler) Philadelphia. Sayfa:2243-2250.
- 16- Gumperz JE, Brenner MB. (2001). CD1 specific T cells in microbial immunity *Current Opinion In Immunology*, 13:471-478.
- 17- Hammond K JL, Kronenberg M.(2003) Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity *Current Opinion in Immunology*;15:683-689.
- 18- Jacobson RR.(1991). *Leprosy Bacterial Infections of Humans Epidemiology and Control* Evans Alfred S., Bracham Philip S (Editörler) New York. Sayfa:349-366.
- 19- Jawetz E., Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN (Editörler) (1989). *Mycobacteria. Medical Microbiology* 18th Edition. Appleton&Lange. Liban Sayfa: 259-266.
- 20- Kambayashi T, Assarson E, Michaelson J, Berglund P, Diehl AD, Chambers BJ, Ljunggren HG. (2000). Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in Influenza A virus–infected mice. *Journal of Immunology*;165: 4964-4969.
- 21- Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Taura I, Kaneko Y, Sato H, Kondo E, Harada M, Koseki H, Nakayama T, Tanaka Y, Taniguchi M (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells. *Proc. Natl.Acad. Sci.USA.* 95: 5690-5693.
- 22- Kılıçturgay K(2003) "İmmünoloji 2003" Nobel Tıp Kitabevi İstanbul.
- 23- Kıyan M. (1999). *Mycobacteriaceae Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ustaçelebi Ş.(Editör) Güneş Kitabevi Ankara* Sayfa: 420-454.
- 24- Kronenberg M, Gapin L.(2002) The unconventional lifestyle of NKT cells: Nature *Reiwews Immunology.* 2: 557-568.
- 25- Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. (1994). A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *Journal Immunol.* 15;153(6):2417-28.
- 26- Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A (2002). Distinct functional lineage of human V(alpha) 24 Natural Killer T cells. *J. Exp Med.* 195:637-641.
- 27- Loza MJ, Metelitsa LS, Perussia B.(2002). NKT and T cells:coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production *European Journal Immunology* 32: 3453-3462.
- 28- Lumpkin LR, Cox GF, Wolf JE (1983). Leprosy in five armadillo handlers. *Journal of American Academical Dermatology* 9:899-903.

- 29- Mempel M, Flageul B, Suarez F, Ronet C, Dubertret L, Kourilsky P, Gachelin G, Musette P (2000). Comparison of the T cell patterns in leprosy and cutaneous sarcoid granulomas. *American Journal of Pathology*. 157: 509-523.
- 30- Metelitsa LS (2004). Flow cytometry for natural killer T cells: multi-parameter methods for multifunctional cells. *Clinical Immunology*. 110: 267-276.
- 31- Mims CA, Playfair J HL, Roitt I M, Wakelin D, Williams R1 (1993). Mycobacterial disease of the skin. *Medical Microbiology St. Luis Mosby Co. London* 28.9 -28.12.
- 32- Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB. (1989). Lymphocytes bearing antigen specific gamma/delta T-cell receptors in human infectious disease lesion. *Nature*. 339: 544-548.
- 33- Ridley DS, Jopling WH. (1964) Classification of leprosy according to immunity: A five group system. *International Journal Leprosy*. 34: 255-258.
- 34- Rota S. (2004). *Mycobacterium Leprae*. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Bakteriyoloji Cengiz TA (Editör). Güneş Kitabevi Ankara. Sayfa: 429-431.
- 35- Sidobre S, Naidenko OV, Sim BC, Gascoigne NRJ, Garcia KC, Kronenberg M. (2002). The V α 14 NKT cell TCR exhibits high-affinity binding to a glycolipid/CD1d complex. *The Journal of Immunology*. 169:1340-1348.
- 36- Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Li CY, Nakayama T, Taniguchi M. (2002) Mycobacterial infection in natural killer T cell knockout mice. *Tuberculosis*. 82 (2-3): 97-104.
- 37- Anonim. Sütlaş M.(2002) Türkiye’de cüzzamla savaşın son dönemi. İstanbul Üniversitesi Lepra Araştırma ve Uygulama Merkezi. Erişim adresi: (www.un.org.tr/who/bulten/turk/bulleprasondonem.htm) Erişim tarihi 05.07.2004
- 38- Ed. Tekeli E (2003). *İnfeksiyon Hastalıkları El Kitabı*. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. Sayfa:184-186.
- 39- Taniguchi M, Nakayama T. (2000). Recognition and function of V α 14 NKT cells *Seminars in Immunology* 12:543-550.
- 40- Wood GL (2001) *Mycobacteria. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Henry JB (Editör) W.B. Saunders Company Philadelphia USA. 1148-1157.

ÖZGEÇMİŞ

1965 yılında Ankara'da doğdum. İlköğrenimimi Ankara Bahçelievler İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi'nde tamamladım. 1989 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Mezuniyet sonrasında Ankara Numune Hastanesi Hızır Acil Servisi'nde, Ankara 100. Yıl Sağlık Ocağı'nda ve Dikmen Aile Hekimliği Merkezi'nde pratisyen hekim olarak çalıştım. Aynı zamanda Mikrobiyoloji alanında doktora çalışmalarımı yaptım. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek okuluna öğretim görevlisi olarak atandım. 1998'de Mikrobiyoloji doktoramı aldım. 2000 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Yüksek Okuluna Yardımcı Doçent olarak atandım. 2001 yılında İmmünoloji doktora programına başladım. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'na Yardımcı Doçent olarak atandım; halen aynı bölümde çalışmaktayım. Evli ve iki çocuk annesiyim.