

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ELAZIĞ YÖRESİNDE PULMONER ve EKSTRAPULMONER  
TÜBERKÜLOZ HASTALARINDA CCL1 ve P2X<sub>7</sub> GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Fethi Ahmet ÖZDEMİR**

**Doktora Tezi  
Anabilim Dalı: Biyoloji  
Danışman: Doç. Dr. Vahit KONAR**

**ELAZIĞ-2011**

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ELAZIĞ YÖRESİNDE PULMONER ve EKSTRAPULMONER**  
**TÜBERKÜLOZ HASTALARINDA CCL1 ve P2X<sub>7</sub> GEN**  
**POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**  
**Fethi Ahmet ÖZDEMİR**  
**(06210202)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 15.08.2011**

**Tezin Savunulduğu Tarih: 12.09.2011**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Vahit KONAR**  
**Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Fikret KARATAŞ**  
**Prof. Dr. Halit ELYAS**  
**Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU**  
**Yrd. Doç. Dr. Aziz AKSOY**

**ELAZIĞ-2011**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime olan katkıları ve bu tezin hazırlanmasında benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, çalışmalarımı yönlendiren çok kıymetli danışman hocalarım Doç. Dr. Vahit KONAR ve Doç. Dr. Hüseyin YÜCE' ye, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Halit ELYAS' a

Laboratuvar ve tez çalışmalarına sabırla ve büyük bir erdemle yardımcı olan, her zaman varlıklarını yanımda hissettiğim Dr. Deniz EROL' a, Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN' a, Uzman Funda BULUT' a,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan aileme, her zaman her konuda beni destekleyip, maddi ve manevi olarak yanımda olan eşime,

Hayatıma anlam ve değer katan, fedakâr canım anneme çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmamızı destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne ( FÜBAP Proje No: FF. 10. 01) teşekkür etmeyi bir borç biliyorum.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>II</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>III</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>X</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Tüberküloz Epidemiyolojisi.....	1
1.2. Tüberküloz Etkeni .....	3
1.3. Tüberkülozda Tanı Yöntemleri .....	4
1.3.1. Tüberkülin Testi .....	5
1.3.2. Akciğer Grafisi .....	5
1.3.3. Bakteriyolojik Tanı .....	6
1.3.4. Serolojik Tanı .....	6
1.4. TB ve İmmün Sistem .....	8
1.5. TB' de Bulaşma ve Semptomlar.....	10
1.6. İnsan Genetiği ve TB' ye Yatkınlık.....	10
1.7. Polimorfizm.....	11
1.7.1 Polimorfizm Nedir? .....	11
1.7.2. Tıbbi Genetikte Polimorfizmlerin Kullanımı.....	12
1.7.3. Polimorfizmlerin Önemi .....	12
1.8. Kemokinler (CCL).....	15
1.9. Pürinerjik Resptörler (P2X <sub>7</sub> ) .....	16
1.10. Moleküler Teknikler .....	18
1.10.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	18
1.10.2. RFLP .....	19
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>21</b>
2.1. Hastaların Seçimi.....	21
2.2. Örneklerin Alınması, Saklanması ve Analizlere Hazırlanması.....	21

2.3.	Demirbaş Malzemeler.....	22
2.4.	Sarf Malzemeleri .....	22
2.5.	Kandan DNA İzolasyonu .....	23
2.6.	PCR-RFLP Yöntemi .....	25
2.6.1.	Oligonükleotidler (Primerler).....	25
2.6.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	26
2.6.3.	CCL1 rs159294 T/A PCR Programı.....	26
2.6.4.	P2X <sub>7</sub> A1513C PCR Programı.....	27
2.6.5.	BfaI (FspBI) Restriksiyon Enzim Muamelesi .....	27
2.6.6.	HaeII Restriksiyon Enzim Muamelesi .....	27
2.6.7.	PCR ve RFLP Ürünlerinin Elektroforezi .....	28
2.6.8.	Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması .....	28
2.6.8.1.	Etidyum Bromür Hazırlanması: .....	28
2.6.8.2.	TBE Tamponu (5X).....	28
2.6.8.3.	%3'lük Agaroz Jel Hazırlanması .....	29
2.6.9.	PCR ve RFLP Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi .....	29
2.7.	İstatistiksel Analizler .....	29
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>ÖNERİLER.....</b>	<b>42</b>
	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>43</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>51</b>

## ÖZET

Tüberküloz, dünya genelinde ölüme neden olan; latent, pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz olarak farklı klinik formlarla tanımlanan bir hastalıktır. İnsanların %90'ı *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olup, *Mycobacterium tuberculosis* latent durumdadır. Latent enfeksiyonlar da hastalık semptomları görülmemekte ve bağışıklık sistemi ile basile cevap verilmektedir.

Tüberküloza yakalanmada konağın genetik yapısının etkili olduğunu birçok kanıt göstermektedir. Aday genler ile ilgili çalışmalar, genlerdeki polimorfizmlerin tüberkülozun gelişmesinde etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada tüberküloz ile ilgili olduğu bilinen CCL1 genindeki rs159294 T/A ve P2X<sub>7</sub> genindeki A1513C polimorfizmlerinin tüberküloz etyopatogenezindeki rolünün aydınlatılması hedeflenmiştir.

Çalışmamız da Elazığ ili yöresinde Fırat Üniversitesi tıp fakültesi göğüs hastalıkları polikliniğine başvuran, tüberküloz teşhisi konmuş 160 hasta ve 160 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubuna ait kişilerden periferik kan örnekleri alınarak EDTA içeren tüplere, 2 cc olacak şekilde konuldu. Bu kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. CCL1 rs159294 T/A ve P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmi PCR- RFLP analizi yapılarak belirlendi.

CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi için 160 tüberkülozlu hastanın 98'inde (%61.25) TT genotipi, 58'inde (%36.25) TA genotipi, 4'ünde de (%2.5) AA genotipi, 71 pulmoner tüberkülozlu hastanın 50'sinde (%70.42) TT genotipi, 20'sinde (%28.16) TA genotipi, 1'inde de (%1.40) AA genotipi, 89 ekstrapulmoner tüberkülozlu hastanın 48'inde (%53.93) TT genotipi, 38'inde (%42.69) TA genotipi, 3'ünde de (%3.37) AA genotipi tespit edildi. Kontrol grubunda ise 160 sağlıklı bireyin 100'ünde (%62.50) TT genotipi, 58'inde (%36.25) TA genotipi, 2'sinde de (%1.25) AA genotipi belirlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmi için 160 tüberkülozlu hastanın 91'inde (%56.87) AA genotipi, 52'sinde (%32.5) AC genotipi, 17'sinde de (%10.62) CC genotipi, 71 pulmoner tüberkülozlu hastanın 44'ünde (%61.97) AA genotipi, 18'inde (%25.35) AC genotipi, 9'unda da (%12.67) CC genotipi, 89 ekstrapulmoner tüberkülozlu hastanın 47'sinde (%52.80) AA genotipi, 34'ünde (%38.20) AC genotipi, 8'inde de (%8.98) CC genotipi, kontrol grubunda ise 160 sağlıklı bireyin 76'sında (%47.50) AA genotipi, 63'ünde (%39.37) AC genotipi, 21'inde de (%13.12) CC genotipi belirlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Sonuç olarak CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi ile P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmi, Elazığ ili y6resi populasyonun da t6berk6loz hastalığına yatkınlık oluşturmamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** T6berk6loz, CCL1, P2X<sub>7</sub>, Polimorfizm

**ABSTRACT**  
**THE INVESTIGATION OF CCL1 AND P2X<sub>7</sub> GENES POLYMORPHISM**  
**PULMONER AND EXTRAPULMONER TUBERCULOSIS PATIENTS IN**  
**ELAZIĞ REGION**

Tuberculosis, a leading cause of death worldwide, is characterized by different clinical forms including latent, localized pulmonary infection and extrapulmonary tuberculosis. %90 of people infected with *Mycobacterium tuberculosis* have latent infection with no symptoms and an immune response that contains the bacilli.

Several evidence suggest that host genetics influences susceptibility to tuberculosis. Candidate gene association studies have implicated common polymorphisms in genes that may influence the development of tuberculosis. In this study, we aimed to elucidate the role of CCL1 gene in rs159294 polymorphism and P2X<sub>7</sub> gene in A1513C polymorphism the etiopathogenesis of tuberculosis.

In our study 2 cc peripheral blood samples from 160 tuberculosis disease and 160 healthy controls who consulted to department of bosoms disease where Firat university medicine school in Elazığ region. Bosoms disease department were collected into EDTA anticoagulated tubes and DNA was extracted. rs159294 T/A polymorphism in CCL1 gene and A1513C polymorphism in P2X<sub>7</sub> gene was analyzed with PCR- RFLP method.

The rates of TT, TA and AA genotypes CCL1 rs159294 T/A polymorphism in 160 tuberculosis disease were calculated as 98 in 160 (%61.25) TT genotypes, 58 in 160 (%36.25) TA genotypes, 4 in 160 (%2.5) AA genotypes, The rates of TT, TA and AA genotypes 71 pulmonary tuberculosis disease were calculated as 50 in 71 (%70.42) TT genotypes, 20 in 71 (%28.16) TA genotypes, 1 in 71 (%1.40) AA genotypes, The rates of TT, TA and AA genotypes 89 extrapulmonary tuberculosis disease were calculated as 48 in 89 (%53.93) TT genotypes, 38 in 89 (%42.69) TA genotypes, 3 in 89 (%3.37) AA genotypes, The rates of TT, TA and AA genotypes 160 control groups were calculated as 100 in 160 (%62.50) TT genotypes, 58 in 160 (%36.25) TA genotypes, 2 in 160 (%1.25) AA genotypes. There were no statistically significant differences between the patient and control groups with regard to genotypes and allele frequencies.

The rates of AA, AC and CC genotypes P2X<sub>7</sub> A1513C polymorphism in 160 tuberculosis disease were calculated as 91 in 160 (%56.87) AA genotypes, 52 in 160 (%32.50) AC genotypes, 17 in 160 (%10.62) CC genotypes, The rates of AA, AC and CC genotypes 71 pulmonary tuberculosis disease were calculated as 44 in 71 (%61.97) AA

genotypes, 18 in 71 (%25.35) AC genotypes, 9 in 71 (%12.67) CC genotypes, The rates of AA, AC and CC genotypes, 89 extrapulmonary tuberculosis disease were calculated as 47 in 89 (%52.80) AA genotypes, 34 in 89 (%38.20) AC genotypes, 8 in 89 (%8.98) CC genotypes, The rates of AA, AC and CC genotypes 160 control groups were calculated as 76 in 160 (%47.50) AA genotypes, 63 in 160 (%39.37) AC genotypes, 21 in 160 (%13.12) CC genotypes. There were no statistically significant differences between the patient and control groups with regard to genotypes and allele frequencies.

In conclusion, according to our data the rs159294 polymorphism of CCL1 gene and A1513C polymorphism of P2X<sub>7</sub> gene don't constitute any susceptibility for tuberculosis disease in Elazığ region population.

**Key words:** Tuberculosis, CCL1, P2X<sub>7</sub>, Polymorphism

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Şekil 1.</b> CCL1 için kesim öncesi ilk PCR ürün örnekleri .....	30
<b>Şekil 2.</b> P2X <sub>7</sub> için kesim öncesi ilk PCR ürün örnekleri .....	31
<b>Şekil 3.</b> CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi için PCR' a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	31
<b>Şekil 4.</b> CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için TT genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.....	32
<b>Şekil 5.</b> CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için AA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.....	32
<b>Şekil 6.</b> CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için TA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.....	33
<b>Şekil 7.</b> P2X <sub>7</sub> A1513C polimorfizmi için PCR' a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	33

## TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 1.</b> TB Hastalarının Dağılımı .....	21
<b>Tablo 2.</b> CCL1 ve P2X <sub>7</sub> ' ye Ait Primer Dizileri.....	26
<b>Tablo 3.</b> Çalışılan Polimorfizmler, Restriksiyon Enzimleri ve Bant Boyutları.....	28
<b>Tablo 4.</b> CCL1 rs159294 Polimorfizmine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Genotip Frekansları.....	34
<b>Tablo 5.</b> CCL1 rs 159294 Polimorfizmine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Allel Frekansları.....	35
<b>Tablo 6.</b> P2X <sub>7</sub> A1513C Polimorfizmine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Genotip Frekansları.....	35
<b>Tablo 7.</b> P2X <sub>7</sub> A1513C Polimorfizmine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Allel Frekansları.....	36

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ARB</b>	: Aside dirençli basil
<b>BAL</b>	: Bronkoalveolar lavaj
<b>BCG</b>	: Bacillus Calmette Guerin
<b>CCL1</b>	: CC ligand 1
<b>DGTS</b>	: Doğrudan gözetimli tedavi stratejisi
<b>DHEA</b>	: Dehidroepiandrosteron
<b>dNTP</b>	: Deoksi nükleotid trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetra asetik asit
<b>FOB</b>	: Fiberoptik bronkoskopi
<b>HGP</b>	: Human Genome Project
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	: İnterferon gama
<b>MGC</b>	: Multinükleer giant cell
<b>MHC</b>	: Major histocompatibility
<b>MS</b>	: Multiple sklerozis
<b>MTB</b>	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NK</b>	: Natural killer
<b>P2X<sub>7</sub></b>	: Pürinerjik reseptör
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PPD</b>	: Purified protein derivative
<b>RFLP</b>	: Restriction fragment length polymorphism
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SLC11A1</b>	: Solute carrier family 11 member 1
<b>SNP</b>	: Tek nükleotid polimorfizmi
<b>TB</b>	: Tüberküloz
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming growth faktör beta
<b>Th1</b>	: T hepler 1
<b>Th2</b>	: T hepler 2
<b>TLR</b>	: Toll like reseptör
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekrozis faktör alfa

**TPD** : Tuberculin Purified Derivative  
**UTR** : Untranslated regions  
**VNTR** : Variable number tandem repeat

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Tüberküloz Epidemiyolojisi

Tüberküloz (TB), bütün dünyada halk sağlığını tehdit eden tehlikeli bir hastalıktır. Tedavisi mümkün olmakla birlikte hastaların uzun süre ilaç kullanmaları gerekmektedir. Buna bağlı olarak kullanılan ilaçlarda ciddi yan etki sorunlarıyla karşılaşmaktadır. Tüberküloz, tedavisindeki ilerlemelere rağmen hala tüm dünyada önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olan, multisistemik tutulum gösteren kazeifiye granülomlarla karakterize bir enfeksiyon hastalığıdır (Pfyffer ve diğ., 2003).

İnsanlık tarihi kadar eski bir hastalık olan tüberküloz hakkındaki bilgiler Milattan Önce (M.Ö.) 3000 yıl öncesine kadar uzanmaktadır (Daniel, 1997). Tüberküloz tanımı ilk kez M.Ö. 4. yüzyılda Hipokrat tarafından yapılmıştır (İmecik, 1998). İlk tedavi önerilerini Milattan Sonra (M.S.) 2. yüzyılda Galen ortaya koymuştur. Vesalius (M.S. 1478) tüberküloz hastalarının otopsilerinde kaviter lezyonları bildirmiştir. Sylvius ise tüberkülozdan ölen hastaların akciğerlerinde tüberkül olarak adlandırdığı küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstermiştir (Kıyan ve diğ., 1999).

İlk kez 1882 yılında tüberküloza neden olan etkeni bulduğunu açıklayan Robert Koch, kısa bir süre sonra 1891 yılında, benzer şekilde immünolojide de çığır açan Koch fenomenini tanımlamıştır. Koch, hastaların akciğerlerindeki lezyonlarda basili göstermiş, bunu kültürde üretmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında tüberküloz oluşturmuştur (Barış, 2003).

1907-1921 yılları arasında çalışan Calmette ve Guerin günümüzde de profilakside en önemli silah olan Bacillus Calmette Guerin (BCG) aşısını bulmuşlardır. Seibert ve Glenn (1939) ise Tuberculin Purified Derivative (TPD) 'i bulmuşlardır (Yazıcıoğlu, 1981).

Tüberkülozda yaşam tarzı, beslenme, çevresel faktörler gibi birçok etken etkili ise de anahtar faktör bireyler arası genetik farklılıklar yani genetik polimorfizmlerdir. İlaç metabolizmasındaki enzimler, taşıyıcılar, reseptörler ve diğer ilaç hedeflerini kodlayan genlerdeki polimorfizmler, tedavi amaçlı kullanılan birçok ilacın etkinliği ve toksisitesindeki bireysel farklılıklar ile ilişkili bulunmuştur (Evans ve diğ.,1999; Mcleod ve diğ., 2001). Bunlardan dolayı bireyler arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesi önem kazanmıştır.

Günümüzde tüberküloz dünyada ve ülkemizde çok önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bugün dünya nüfusunun üçte biri, yaklaşık 1.7 milyar kişi *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ile enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin tüberküloz nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir (CLSI, 2007). Dünya sağlık örgütü verilerine göre 2007 yılında dünya genelinde 8.8 milyon yeni tüberküloz olgusu olduğu ve bunların 7.4 milyonunun Asya ve Afrika'nın Güney sahra ülkelerinden olduğu, 1.6 milyon kişinin tüberküloz nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. Bu kötü oluşuma AIDS epidemisi yaşanan Afrika ve Güneydoğu Asya'nın katkısı da büyüktür. Dünyada tüberküloz artışında değişik faktörler sorumludur. Bunlardan en önemlileri sağlık politikalarında tüberküloza yeterli önemin verilmemesi, HIV epidemisi, sosyoekonomik koşullarda kötüleşme ve demografik değişikliklerdir (WHO report, 2009).

Dünyada tüberküloz hastalarının %80'ini kapsayan, en çok hastanın olduğu ülkeler yüksek hasta yükü olan ülkeler olarak ele alınmaktadır. Bugün 22 ülke dünyadaki tüberküloz hastalarının %80'ini barındırmaktadır. Bunlardan en çok hastanın bulunduğu beş ülke Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika'dır (WHO, 2001). Tüberküloz hasta sayılarındaki artışlar ve Tüberküloz kontrol çabalarının yeterince başarı sağlayamaması nedeniyle Dünya Sağlık örgütü 1993 yılında tüberküloz için acil durum ilan etmiştir. Böylece 1990'lı yıllarda başlayan doğrudan gözetimli tedavi stratejisi uygulamaları dünyada hızlı bir şekilde yayılmıştır (WHO, 2002).

Tüberküloza bağlı ölümler dünyadaki tüm ölümlerin %7'sini, az gelişmiş ülkelerde ise %26'sını oluşturmaktadır. Tüberküloz tek başına tüm diğer enfeksiyon hastalıklarından daha fazla ölüme sebep olmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde diğer ürkütücü bir gerçek tüberküloz hastalarının ancak %46'sının saptanabildiği ve bunlarında yarısından azının tedavi imkanına kavuşabildiğidir (Sarmiento ve diğ.,2003, Özkara ve diğ., 2003).

Türkiye'de geçen yüzyılın başında tüberküloz ciddi bir epidemi nedeni olmuş ve bu dönemlerde tüberküloz ölümleri bütün ölüm nedenleri içinde ilk sırada yer almıştır. Ülkemizde tüberküloz ile etkin mücadele 1950'li yıllarda başlatılmış ve 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Bunun sonucu olarak 1945 yılında tüberküloz ölümleri yüzbinde 262 iken, 1950'li yıllarda yüzbinde 204'e düşmüştür (Özkara ve diğ., 2003, Uzun ve diğ., 2002). Günümüzde ülkemizdeki tüberkülozun durumu değerlendirildiğinde, hastalık insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulanmış ülkeler ile kötü programlar uygulanmış ülkeler arasında konumumuz olduğu görülmektedir (Özkara ve diğ., 2003). Verem Savaş Daire Başkanlığının 2007 raporuna göre (Verem

Savaş Dairesi Başkanlığı, 2007), 1965'te yüzbinde 172 olan tüberküloz insidansı 2005 yılında yüzbinde 26 olarak bildirilmiştir. 2005 yılı toplam hasta sayısı Türkiye genelinde 20.535, yeni vaka sayısı 18.753 olarak bulunmuştur. Bu rakamların Türkiye'de tüm hastaları içermediği bilinmektedir. Aynı rapora göre, ülkemizde tüberkülozun bakteriyolojik tanısı konusunda da ciddi eksiklikler olduğu görülmektedir. 2005 yılında akciğer tüberkülozlu hastaların yaklaşık yarısının (%55.6) yayma pozitif olduğu ve %38.1'inin kültür pozitif olduğu bildirilmiştir (Verem Savaş Dairesi Başkanlığı, 2007).

Dünyada 1999 yılı kohortunda doğrudan gözetimli tedavi stratejisi (DGTS) uygulanan yerlerde hastaların %96'sının DGTS uygulamayan yerlerde %41'inin tedavi sonuçları değerlendirilebilmiştir. Türkiye, DGTS uygulamayan bir ülke olarak listelenmekte, Türkiye tedavi sonucu vermeyen, yani değerlendirilemeyen ülke olarak kayıtlara geçmekteydi (WHO, 2002). Ancak 2000 yılında ilk uygulamaları başlayan doğrudan gözetimli tedavi stratejisi 2003 yılı itibariyle pilot olarak uygulanmış, 2006 yılında tüm ülke geneline yaygınlaştırılmış bulunmaktadır. 2005-2006 yılında doğrudan gözetimli tedavi stratejisine hazırlık olarak yapılan eğitimler ve formların yenilenmesi, bireysel veri tabanına geçiş ve yapılan değerlendirmeler sonucunda Türkiye Dünya Sağlık Örgütüne veri gönderen ülkeler arasında yer almıştır.

## 1.2. Tüberküloz Etkeni

*Mycobacterium* cinsi *Mycobacteriaceae* ailesindeki tek cinstir. Bu cinsin temel özellikleri yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları, hücre duvarlarında bol miktarda lipid içermeleridir. *Mycobacterium* türlerinin DNA'sındaki G+C oranı %61-71 olup (*M. leprae* hariç %55), diğer mikolik asit içeren bakteri cinsleri ile benzerlik göstermektedir. DNA-DNA homolojileri %95'ten fazla olan ve bakteriyolojik özellikleri benzerlik gösteren *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* türleri MTB kompleks başlığı altında gruplandırılır ve tanımlanır (Haas ve diğ., 2000).

*M. canetti*'nin çocuklarda lenfadenit ve HIV olumlu hastalarda generalize tüberküloza neden olabildiği bildirilmiştir. *M. bovis* BCG aşı amaçlı kullanılmaktadır (Pfyffer ve diğ., 2003). Tüberküloz basili terimi, kompleksin diğer üyelerinin insanlarda çok daha nadir patojen olmaları nedeniyle *M. tuberculosis* ile nerdeyse eş anlamlı olarak kullanılmaktadır (Pfyffer ve diğ., 2003; Kıyan ve diğ., 1999). *M. tuberculosis* kompleks

dışında kalan tüm mikobakteriler tüberküloz dışı mikobakteriler veya atipik mikobakterileri, olarak adlandırılır.

*M. tuberculosis* kompleks ve *M. leprae* dışındaki mikobakterilerin tümü doğada, toprakta, suda bolca bulunurlar ve çoğu patojen değildir. Ayrıca hasta kişilerden diğer insanlara yayılımlarına nadiren rastlanır (Pfyffer ve diğ., 2003). Hastalık etkeni olmaksızın vücutta kolonize olabildikleri için ayırımlarının yapılabilmesi zordur. *Mycobacterium* cinsinin standart karakterine uyan 120'den fazla tüberküloz dışı mikobakteri türü vardır (CLSI, 2007).

Tüberküloz dışı mikobakteri türleri hem immün sistemi baskılar hem de normal olan konaklarda tüberküloz dışı hastalıklar meydana getirebilir. Sıklık sırasıyla pulmoner enfeksiyonlar, lenfadenitler, dissemine enfeksiyonlar, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, tendon kemik enfeksiyonları, kateter enfeksiyonlarına neden olabilirler.

### **1.3. Tüberkülozda Tanı Yöntemleri**

Klinik radyolojik veya histolojik bulgularla bir hastada tüberkülozdan kuşkulunılabilir, ancak hastalığın kesin tanısı sadece klinik örneklerde tüberküloz basilinin varlığının kanıtlanması ile mümkündür (American Thoracic Society, 1995). Tüberküloz tanı yöntemlerinin amacı, klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermek ve hastalık etkeni olan türü izole etmektir. Tanının tam ve doğru olarak yapılabilmesi uygun örneğin, uygun yöntemle alınmasına uygun şekilde işlenmesine bağlıdır. Tanı ve tedavilerde güvenilir sonuç veren yöntemlere gereksinim duyulmaktadır (Pfyffer ve diğ., 2003). Tüberküloz laboratuvarına gönderilen pulmoner örnekler arasında balgam, indüklenmiş balgam, açlık mide suyu (gastrik lavaj sıvısı), bronkoalveolar lavaj (BAL), bronşiyal fırçalama, transtrakeal aspirat, larenks sürüntüsü gibi örnekler sayılabilir. Ekstrapulmoner örnekler ise idrar, doku biyopsi örnekleri, beyin omurilik sıvısı, periton sıvısı, plevra sıvısı ve perikardiyal sıvı gibi örneklerdir (CLSI, 2007).

Klinik, fizik muayene, laboratuvar bulguları ve radyoloji sadece TB' den kuşkulunmayı sağlar. TB' nin yaygın olduğu toplumlarda 15 günden fazla devam eden öksürüklerde ve şüpheli akciğer infiltrasyonunda TB' ye yönelik tanı yöntemleri kullanılmalıdır (Dannenberg ve diğ., 1998).

### **1.3.1. Tüberkülin Testi**

Tüberkülin testi, TB infeksiyonu sonucu oluşan geç ve hücresel tipteki bağıışıklığı, aşırı duyarlılığı belirlemek için kullanılan deri testidir (Özemsî, 1991). Standart tüberkülin testi, ön kolun ön yüzüne cilt içine (Mantoux yöntemi) 0.1 ml 5TU tüberkülin ünitesi (Purified Protein Derivative = Saflaştırılmış Protein Türevi) (PPD), yapılarak 48-72 saat sonra endurasyon çapının ölçülmesi esasına dayanır. Tüberkülin testinde antijen olarak kullanılan, TB basillerinin proteinleridir (American thorasic society, 2000). Tüberkülin testi, organizmanın TB basili ile karşılaşp karşılaşmadığını, dolayısıyla basilin protein bileşenlerine karşı alerjinin oluşup oluşmadığını gösteren bir testtir. TB infeksiyonundan 6-8 hafta sonra deride ortaya çıkan geç aşırı duyarlılık reaksiyonunun saptanması esasına dayanır (Alataş, 1997).

### **1.3.2. Akciğer Grafisi**

Akciğer grafisinde özellikle üst zonlardaki radyolojik değişiklikler aktif TB' ye ait bulgular olabileceği gibi, önceden geçirilmiş TB enfeksiyonuna ait sekeller de olabilir. TB' ye ait kavite veya fibrotik lezyon görülebilir. TB tanısında akciğer filmi önemli olsa da özellikle balgam yayma negatif hastalarda tek başına aktivite tayini için yeterli değildir (Gümüş, 2005). Mikobakterilerin hücre duvarlarının lipid içeriğinin yüksek olması, güçlü asit ve alkillere olan direncinin diğer bakterilerden fazla olmasını sağlar. TB' nin direkt gösterilmesinde materyal lam üzerinde Ziehl- Nielsen, Kinyoun tekniği veya Rodamin, Auramin gibi asit-fast metodlarla boyanır. Aside dirençli basilin (ARB) mikroskopik olarak görülmesi mikobakterilerin saptanması için yapılan en hızlı işlemdir. Ancak ARB (+) bulunması organizmanın tanımlanması ve canlılığı konusunda bilgi vermez çünkü non TB bakteriler ve nokardia gibi mikroorganizmalar da pozitif sonuç verebilir. TB' nin mikroskopik olarak tespit edilebilmesi için sabah erken saatlerde birbirini takip eden üç gün balgam örneği alınması gerekir. Balgam veremeyen hastalardan mide suyundaki pulmoner sekresyonları yakalamak için nazogastrik sonda ile sabah açlık mide suyu örnekleri alınabilir. Balgam ve mide suyu örnekleri ile tanıya ulaşılamayan hastalara Fiberoptik Bronkoskopi (FOB) uygulanıp bronş lavajı, bronkoalveoler lavaj, broş biyopsisi ve transbronşial biyopsi örnekleri alınabilir (Murray, 1994; Glassroth, 1993; Schlossberg, 1995). Sonuçlar negatif veya pozitif olarak yorumlanır. Basil varlığı sayısal olarak

belirtilir. Bu hem tanı sırasında hastalığın ağırlığını göstermede hem de tedaviye yanıtı takip etmede önemlidir. Yaymanın tümünde 3-9 mikroorganizma varsa (+), yaymanın tümünde 10 ve daha fazla mikroorganizma varsa (++) , büyük büyütmede her immersiyon sahasında 1 veya daha fazla ise (+++) olarak ifade edilir. Bu yöntemle ARB' nin gösterilebilmesi için örneğin mililitresinde en az  $10^4$  basil bulunması gerekir (Glassroth, 1993).

### **1.3.3. Bakteriyolojik Tanı**

TB' nin kesin tanısı bakteriyolojiktir ve tanısı için MTB basilinin kültürde üretilmesi gerekmektedir. Materyalin mililitresinde en az 100 basil bulunduğunda pozitif sonuç verir ancak TB basili çok yavaş ürediği için sonuç alabilmek için haftalarca (6-8 hafta) beklemek gerekir. Tüm materyaller, yayma pozitif olsun veya olmasın antibiyotik duyarlılık ve mycobacterium tür tayini için kültüre ekilir. Kültür için en sık kullanılan katı besi yerleri yumurta içeren Löwenstein- Jensen veya agar içeren Middlebrook H7 10-11' dir. %60-80 sensitivitesi vardır (Fraser ve diğ., 1999).

Ayrıca basil varlığını daha hızlı tespit edebilmek için dekontamine, konsantre örnek karbon ile işaretlenmiş, palmitik asit eklenmiş sıvı kültür ortamına ekilir. MTB bu maddeyi metabolize eder ve ortama CO<sub>2</sub> verir; CO<sub>2</sub> BACTEC aleti tarafından saptanır ve büyüme göstergesi olarak algılanır. Böylece mikobakteriler yayma pozitif olgularda 7-8 günde, negatif olgularda 16-20 günde olmak üzere daha kısa sürede BACTEC ile saptanabilmektedir. %70-95 sensitivitesi vardır (Fraser ve diğ., 1999, Murray ve diğ., 1994).

### **1.3.4. Serolojik Tanı**

Seroloji MTB' ye ait antijenlerin substrat olarak kullanılması yoluyla tanıya yardımcı olan bir metoddur. %70 spesifisite, %90 sensitivitesi vardır (Fraser ve diğ., 1999). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)–DNA hibridizasyon, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) gibi moleküler biyolojik teknikler hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir (Fraser ve diğ., 1999). PCR ile mikobakteri belirlenmesi, mikobakteriyel DNA' nın çoğaltılarak ölçülebilir düzeye getirilmesi prensibine dayanır. PCR ile çok az miktardaki DNA rutin agaroz jel elektroforezinde görülebilecek düzeyde artırılır. Yapılan

bazı çalışmalarda PCR' in spesifitesinin düşük olduğu yalnızca PCR sonuçlarına göre TB tanısı konulup tedaviye başlamanın uygun olmadığı bildirilmektedir (Fraser ve diğ., 1999; Ferrer, 1997).

Transtorasik ince iğne aspirasyonu ile elde edilen örnekler, sitolojik TB tanısı açısından balgam ve bronşiyal lavaj sıvısından daha değerlidir (Fraser ve diğ., 1999). Yardımcı tanı yöntemleri olarak hematolojik ve biyokimyasal incelemeler de kullanılabilir. Eritrosit sedimentasyon hızında artış, anemi, lökositoz, trombositoz, en sık rastlanan hematolojik değişikliklerdir (Haas, 1995).

Akciğer dışı tüberkülozun tanısı için idrar örneği (sabah alınan orta akım idrarı), plevral, perikardiyal, serebrospinal peritoneal sıvı örnekleri yayma, kültür, biyokimya, ve sitolojik inceleme için gönderilir. Tüberküloz şüphesi olan hastanın biyopsi örnekleri hem patolojik hem bakteriyolojik olarak incelenmelidir ve nekrotizan granümatöz iltihap araştırılmalıdır.

Tüberküloz *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı oluşan immün cevap ve patolojik değişikliklerden oluşan hastalık olarak kabul edilir. *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı bir çok T-lenfosit alt grubunu içeren immün cevap oluşmaktadır, fakat T hücrelerince interferon gama (INF- $\gamma$ ) üretimi hastalığın kontrolünde temel faktör olarak görülmektedir. T Helper 1 (Th1) tip sitokinler hafif ve orta derecedeki pulmoner TB'de baskın iken, T hepler 2 (Th2) tip sitokinler şiddetli hastalıkta baskındır. İmmün cevabın yetersiz kaldığı durumda hastalığı kontrol altına almak mümkün olmayacak ve hastalık kronik forma dönecektir, bu durumda geniş bir dizi reglatuar mekanizmalar devreye girmektedir. Sitokinler, glukokortikoidler ve dehidroepiandrosteronun (DHEA) üretimine yol açan, immün cevapla hipotalamopituiter-adrenal aksın aktive olduğu sürede salgılanır. TB hastalarında plazma kortizol ve interlökin-6 seviyeleri artmış, DHEA ve testosteron seviyeleri azalmıştır, bunlarla birlikte growth hormon seviyesi belirgin olarak artmasına rağmen, insülin-like growth faktör-1 seviyesinde beklenen artış yoktur. Östradiol, prolaktin ve tiroid hormon konsantrasyonları da belirgin olarak artmıştır. Kortizol mikobakteriyel antijen çoğalmasını ve INF- $\gamma$  üretimini inhibe ederken, DHEA ilerlemiş TB' li hastalarda lenfoid hücreler tarafından üretilen transforming growth faktör beta (TGF- $\beta$ ) yı süprese eder. Bu tip immün endokrin etkileşimler doku hasarının kontrolünü ve koruyucu immün yanıtın gelişmesini etkileyebilir ve kısmen hastalığın agrevasyonunu izah eder (Bottasso ve diğ., 2007; Srinivasan ve diğ., 2005).

MTB' nin damlacık yoluyla alınması sonrası izlediği yol ve oluşan bağışıklık yanıtının aşamaları şöyledir:

1. MTB' nin alveole ulaşması aşamasında bakteri miktarı, temas süresi, bakterini virulansı ve kişinin immünitesi önemlidir.
2. MTB' nin alveoler makrofajlar, bölgeye gelen dentritik hücreler ve monositler tarafından algılanması, bağlanma ve fagositozu gerçekleşir. Bu aşamada CR3, CR1, CR4, CD14, mannoz reseptörü, surfaktan protin-A, bağlanma bölgesinde kolesterol birikimi önemlidir. MTB varlığının algılanması ve yangı yanıtının başlatılmasında makrofajlarda Toll-like receptor 2 (TLR2) ve TLR4, dentritik hücrelerde ise TLR9 daha önemli rol oynar.
3. Öldürme; oksidatif ürünler, nitrik oksit, asidifikasyon, lizozomal füzyon, degranulasyon ve granülozin ile olur.
4. Fagozitozun gerçekleşmesi makrofaj, özellikle dentritik hücreler tarafından aktivasyon uyarılarının verilmesi, ek uyarı molekülleri gösteriminin artması CD80, CD86, interlökin-12 (IL-12), IL-18, IL-23, IL-27 ile T hücrelerinin uyarılması ve Th1 tipi yanıtın aktivasyonu ile olur.
5. Antijen sunumu aşamasında major histocompatibility complex (MHC) klas I, II ve Cd1 a-e molekülleri ile MTB antijenlerinin CD8+, CD4+ve gamma/delta tipi reseptörü olan hücrelere sunulması.
6. Kazanılmış immün yanıtın başlaması; Th1 hücrelerden tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-2 ve INF- $\gamma$  salınması, natural killer (NK), CD8 hücrelerinin etkinleşmesi ile olur.
7. Makrofaj aktivasyonu ve enfeksiyonun sınırlanması, fagozom olgunlaşmasının hızlanması, oksidatif ürünler, nitrik oksit, solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) gösteriminin artışı, otofajinin tetiklenmesi, MHC antijenlerinin artışı ile olur (Yeğin,2007).

#### **1.4. Tüberküloz ve İmmün Sistem**

Konağın tüberküloz enfeksiyonunu kontrol etme yeteneği, etkin bir hücrel immün cevap oluşturmaya bağlıdır. Hücrel immünite ise, spesifik antijenle karşılaşan T lenfositlerinin duyarlanması ve makrofaj fonksiyonlarını düzenlemek üzere medyatörler salgılaması ile olur. Yani hücrel immünitenin spesifitesi, primer olarak makrofaja değil,

T lenfositlerine bağlıdır (Dannenberg, 1989). MTB immünesinde dominant olduğu düşünölen CD4+, T hücreleri, kompleksi tanır ve aktive olurlar. Aktive olan CD4+ T hücreleri ise lenfokinler salgılayarak, daha fazla makrofajın aktive olmasını sağlarlar. INF- $\gamma$  ise duyarlı T lenfositlerinden ve NK hücrelerinden salgılanan makrofaj aktivasyonunda önemli rolü olan bir sitokindir ve TB immünolojisinde çok önemli bir yere sahiptir (Deniz ve diğ., 2001). Bu sitokinler kan akımından lezyona monosit/makrofajları çekerler ve onları aktive ederler. INF- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  en önemli makrofaj aktive edici sitokinlerdir. Ayrıca makrofajlar reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri, lizozomal enzimler ve diğere faktörleri üreten fagositler oldukları için tüberküldeki basilleri yok edebilirler. INF- $\gamma$  monosit/makrofajlardaki IL-2 reseptörlerini uyardıktan sonra IL-2 bu hücrelerin basilleri öldürücü etkisini daha da artırır (Dannenberg, 1995). MTB antijenleri ile duyarlı hale getirilmiş kişilerde T hücreleri, mikobakteriyel antijenlerle karşılaştıklarında INF- $\gamma$  üretmektedir. Bu nedenle, yüksek INF- $\gamma$  üretim düzeyi TB enfeksiyonu için bir gösterge olarak kabul edilir. IL-12, INF- $\gamma$  aksındaki tek gen hatalarının (IL-12p40, IL-12RB1, IFNGR1, IFNGR2, STAT1) mikobakteri enfeksiyonlarına yatkınlıkla ilişkisi açıkça ortaya konulmuştur. Ancak bu grup, hastaların az bir kısmını oluşturmaktadır. Bu durum gen polimorfizmlerini araştırmaya yöneltmiştir. Bu bağlamda, SLC11A1, Vitamin D reseptörü, IL-12 reseptörü, IL-1, IL-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TLR2, ve TLR aktivasyon yolağında önemli olan TIRAP/Mal, insanda Ipr1 (lipoprotein alleli 1) homoloğı olan tek nükleotid polimorfizmi (SNP) 110 polimorfizmlerinin TB hastalığına yatkınlıkla ilişkisi bildirilmiştir. Ancak bu konuda geniş serilerde ve diğereki toplumlarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır (Yeğın,2007; MacMicking ve diğ., 2003).

Organizmaya giren MTB' nin algılanmasında Toll benzeri reseptörler (TLR2, TLR4 ve TLR9) önemli rol oynar. Bu reseptörlerin uyarılması hücrelerden bir dizi aktivasyonlar yanında özellikle IL-12 ve TNF- $\alpha$  salınmasına yol açar. Son yıllarda IL-12p40 ve IL-12 reseptör hatası olan hastaların tanımlanması da bu sitokinin MTB' ye karşı dirençte ne denli önemli olduğunu göstermiştir. IL-12' nin etkisine benzer etki gösteren ya da aktivitesini güçlendiren sitokinler konusundaki bilgilerimiz ise henüz yetersizdir. IL-23, IL-7, IL-18 ve IFN- $\alpha$ ' nın, INF- $\gamma$  yapımı ve MTB' ye karşı dirençle ilgili aktivasyondaki rolleri yeni anlaşılmalıya başlanmıştır. Bu sitokinlerle ilgili klinik veriler henüz yetersizdir (Yeğın, 2007; Hawn ve diğ., 2006).

### **1.5. Tüberkülozda Bulaşma ve Semptomlar**

Tüberküloz, hava yoluyla insandan insana bulaşır. Hasta bireyin konuşma, öksürük ve hapşırması ile 1-3 basille yüklü 1-5 mikron çapındaki damlacıklar ortam havasına dağılır ve bunların solunması ile basiller terminal hava yollarına kadar ulaşır (Barış, 1995). Kaviteli akciğer lezyonu olanlar ve larinks tutulumu olanlarda bulaştırıcılık daha yüksektir. Hastalığın oluşabilmesi için hasta ile uzun süreli temas gerekmektedir. Kapalı ve kalabalık ortamlarda bulaştırıcılık daha fazladır. Balgam yayması pozitif bireylerin, balgam yayması negatif bireylere oranla daha bulaştırıcı olduğu bilinmektedir (Fraser ve diğ.,1999). Hastalıktan korunmakta BCG aşısı kısmen etkili olabilmektedir. TB primer yada reaktivasyon TB şeklinde olabilir. Bir çok primer enfeksiyon vakasında lezyonlar iyi gidiş gösterir ancak basiller dokularda çoğalma göstermeden aylarca ve yıllarca canlılıklarını sürdürebilirler. Moleküler çalışmalar TB basilinin onyıllar boyunca sessiz olarak kalabileceğini ve akciğer makrofajlarında ve diğer özelleşmemiş fagositik hücrelerde MTB DNA' sı bulunabileceğini göstermiştir. TB vakalarının büyük kısmı eski lezyonların reaktivasyonu ile oluşmaktadır. Reaktivasyona predispozan faktörler; malnutrisyon, steroid tedavisi veya diyabet, lösemi, HIV gibi hastalıkların varlığıdır (Bottasso ve diğ., 2007). Hastalığın ilerlemesi ile özellikle üst loblarda bilateral yoğun enflamasyon ve doku yıkımı ile kazeifikasyon ve kavitasyon görülebilir. Sık görülen semptomlar öksürük, balgam, ateş, gece terlemesi, iştahsızlık ve kilo kaybıdır (Schluger, 2005). Ancak bu semptomlardan hiçbiri TB' ye özgü değildir. Klinik tablo çok değişken olabilir. Genel durum son derece iyi, hafif öksürük, başka nedenlere bağlanan halsizlik ve iştahsızlık gibi siliik semptomlardan hemoptizi ve solunum yetmezliğine kadar gidebilen ağır bir gidişte gösterebilir (Schluger, 1994).

### **1.6. İnsan Genetiği ve Tüberküloza Yatkınlık**

Gen polimorfizmleri genomik DNA' nın bir popülasyonun, normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz çifti değişiklikleridir. Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın olarak görülüp, etnik ve coğrafi farklılıklar göstermektedir. Birçok durumda, hücre metabolizması için önemli olan yollarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumlarda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde

etkilenir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonunun bozulması, çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski arttırmaktadır (Deligezer ve diğ., 2004).

Geleneksel görüş, mikobakterilerin eşit virülansa sahip olduğu şeklinde olsa da, topluma dayalı yapılan genotipleme çalışmaları, az sayıdaki suşun toplumdaki vakaların çoğundan sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar, farklı *M. tuberculosis* suşlarının konak ile değişik ilişkiler kurduğunu ve bulaş potansiyellerinin birbirinden farklı olduğunu göstermektedir (Barnes, 2003; Narayanan, 2004).

Son elli yılda yapılan çalışmalar konağın genetik faktörlerinin TB' ye yakınlıkta etkili olduğunu göstermektedir (Casanova, 2002; Cooke, 2001). Tüberküloza karşı bağışıklık IFN- $\gamma$  ve IL-12' yi içerir, bundan dolayı IFN- $\gamma$  ve IL-12 sitokin reseptörlerindeki defektlerin de TB' ye yakınlığı arttırdığı bilinmektedir (Ottenhoff, 2005). IFN- $\gamma$  genleri tahrip edilmiş farelerde TB hastalığına yakınlığın oluştuğu bilinmektedir (Crevel ve diğ., 2002).

## **1.7. Polimorfizm**

### **1.7.1 Polimorfizm Nedir?**

Polimorfizm, bir toplumda sadece tekrarlayan mutasyonlarla sürdürülemeyecek oranlarda var olan, nadir sıklıktaki, devamlılık göstermeyen iki veya daha fazla genetik özelliğin bir arada olması olarak tanımlanabilmektedir. Gen polimorfizmi, aynı genin DNA dizisindeki değişikliklerdir. Eğer toplumun %2 veya daha fazlası nadir bir alleli taşıyorsa, bu durum polimorfiktir (Akın, 2003). Polimorfik durumun oluşması için gereken allel frekansı farklı yayınlarda %1 olarak ta gösterilmektedir (Brookes, 1999). Bu orandan daha az sıklıkla rastlanan alleller ise “mutasyon” olarak adlandırılır. Polimorfizmler tıpkı mutasyonlar gibi, bazı DNA bölgelerinde eksilme bir veya daha fazla bazın diziyeye katılması (insersiyon), diziden baz eksilmesi (delesyon) veya bir bazın diğeri ile yer değiştirmesi (substitüsyon) sonucu meydana gelebilir (Hajeer, 2000).

Polimorfizmler 2 ana grupta incelenmektedir:

1. Tek nükleotid polimorfizmi: SNP (Single Nucleotide Polymorphism)
2. Kısa DNA dizilerinin tekrarı (VNTR; Variable number tandem repeat).

SNP' ler tek bir nükleotidin değişmesi ile meydana gelen ve insan genomunda en çok görülen polimorfizmlerdir. SNP' ler genomda yaklaşık her 1000 bazda bir tane olacak sıklıkla bulunur (Nussbaum ve diğ., 2005). İnsan DNA dizisindeki değişikliklerin %90 kadarı tek baz değişimleridir (Collins ve diğ., 1998) ve bu değişimleri içeren allellerin frekansı toplumda %1'i geçtiğinde tek baz polimorfizmi adını almaktadır. SNP' ler ekzonlarda olabileceği gibi intronlarda ve 5' ve 3' ifade edilmeyen bölgelerde de (UTR; 5' and 3' Untranslated Regions) olmaktadır. Bu bölgelerdeki SNP' ler RNA splicing ve stabilitesini etkilemektedir. SNP veritabanlarında 4 milyonun üzerinde SNP bildirilmiştir. Bu SNP' ler kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, mental bozukluklar ve otoimmün hastalıklar gibi bazı yaygın majör rahatsızlıklarda risk tayini için genetik belirteçler olarak kullanılabilir (Brookes, 1999).

### **1.7.2. Tıbbi Genetikte Polimorfizmlerin Kullanımı**

Polimorfizmler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliğindeki elementlerdir. Polimorfizmler genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır. Genetik belirleyiciler Tıbbi Genetikte kullanım için pratiklik sunar. Bağlantı analiz yolu ile kromozomların belirli bölgelerindeki genlerinin haritalanması, genetik hastalıkta doğum öncesi tanı, genetik hastalıklarda heterozigot taşıyıcıların belirlenmesi, koroner kalp hastalığı, kanser ve diyabet gibi yaygın yetişkin hastalıklara yatkın kişilerin yüksek ve düşük risklerin değerlendirilmesi adli tıpta ve babalık testinde kullanım ve organ transplantasyonu için doku tiplenmesi tıbbi genetik kapsamı içindedir (Nussbaum ve diğ., 2005). Ayrıca bu polimorfik durumlar tedavi edici ilaç seçimi ve ilaca cevapta kişiler arasındaki farklılıkları açıklamak ve kişiye özgü tedavi seçenekleri geliştirmek için de kullanılmaktadır. Bu polimorfizmlerin mutasyona olan nispi stabiliteeleri onların bağlantı eşitsizliği durumlarında kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Forsberg ve diğ., 2000).

### **1.7.3. Polimorfizmlerin Önemi**

Bir polimorfizmin etkisi o polimorfizmin yerleşimine bağlıdır. Genin kodlanan bölgesinde, yani eksonunda meydana gelen farklılıklar protein dizisini etkileyebileceğinden proteinin yapısı ve fonksiyonu değişebilir. Ayrıca proteini kodlayan

bölgelerin dışında, genin sonundaki düzenleyici bölgede veya intronik dizilerde de nükleotid değişiklikleri gözlenebilir. Genin promoter bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için uygun DNA motifleri vardır. Bu bölgede meydana gelen polimorfizmler transkripsiyon faktörlerinin bağlanmalarını veya bağlanma etkinliklerini değiştirebilir. Böylece genin transkripsiyon aktivitesi artabilir veya azalabilir. mRNA kopyasının kalıcılığı ve dayanıklılığını ise 3'UTR bölgesi etkiler. Bu bölgedeki polimorfizmler, mRNA kalıcılığını düzenleyen proteinlerin mRNA'ya bağlanmasını etkileyebilir ve sentez edilen protein miktarının değişmesine neden olabilir (Hajeer, 2000).

Tüm insan genlerini içeren insan genomundaki baz dizisi değişiklikleri mutasyon olarak tanımlanır. Mutasyonlar bir gen bölgesinin dışında oluşabildikleri gibi, gen bölgesinin içinde de meydana gelebilirler ve aminoasit sırasını veya kodlanan protein yapısını değiştirebilirler. Bir mutasyon genin tek bir noktasını değiştiriyorsa, nokta mutasyonu veya tek gen mutasyonu olarak isimlendirilir. Marfan sendromu, kistik fibrozis, nörofibromatozis gibi genetik hastalıklar nokta mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Bu hastalıkları taşıyan kişilerin hayatta kalma şansları düşük olduğundan nokta mutasyonların toplumda görülme sıklığı %1'den daha azdır.

DNA baz dizisindeki değişiklikler her zaman ciddi bir sendroma neden olmazlar ve bir popülasyondaki genetik varyasyonları oluştururlar. Eğer belirli bir genetik varyasyon bir toplumda %1'den daha sık görülüyorsa polimorfizm'den söz edilir. Polimorfizmler deri ve göz rengi özelliklerinin, eritrosit antijen özelliklerinin, farmakolojik yanıt özelliklerinin ve aynı zamanda hastalığa yatkın olma özelliğinin belirlenmesinde rol oynarlar (Sadee, 1999).

Son yıllarda DNA polimorfizm verileri popülasyon içi ve popülasyon dışı karşılaştırmalarda, birey tanımlanmasında genetik marker (işaretleyici) olarak kullanılmaktadır, çünkü bu polimorfizmler döden döle klasik mendel kalıtımı ile aktarılabilmektedir (Devrim ve diğ., 2003). Özellikle de bir popülasyon içerisinde polimorfik lokustaki DNA dizisinin iki kromozomda farklı olma olasılığı yani heterozigotluk ne kadar yüksek ise o lokus genetik çalışmalar için o kadar değerlidir (Ülküer ve diğ., 2004). Aynı lokustaki nükleotid dizileri iki ya da daha çok genotipte belirli bir sıklıkta bulunan DNA polimorfizmleri, DNA molekülünün yapısında yer alan ve bireyler arasında farklılık gösteren nükleotid değişimleridir. Bu değişimlere ekson ve intron bölgelerinde rastlanmaktadır, ancak DNA dizisindeki bu farklılara intron bölgelerde ekson bölgelere göre daha sıklıkla rastlanmaktadır. Ana-baba tayini, doğada yaşayan

türlerin tanısı, bu türler arasındaki polimorfizm hesaplamaları, kimlik tayini ve şüphelilerin saptanması, evrim ve haritalama çalışmaları gibi geniş bir alanda kullanıma sahiptirler (Devrim ve diğ., 2003). SNP' ler genom dizisi içerisinde A,T,C ya da G bazlarından birisinin değişmesiyle meydana gelen DNA dizi farklılıklarıdır. Örneğin AAGGCTAA dizisinin ATGGCTAA dizisi şeklinde dönüşmesi ile bir SNP oluşur. Belirli bir SNP popülasyonunun en az %1'inde görülmektedir. İnsanlar arasında genetik farklılıkların %90'ını oluşturan SNP' ler genomdaki yaklaşık her bin bazda bir meydana gelirler (Stoneking, 2001; Zhou ve diğ., 2001). İnsan haploid genomunun yaklaşık 3 milyar bazdan oluştuğu düşünülecek olursa, total SNP sayısının 3 milyon civarında olduğu hesaplanabilir. Her üç SNP' den ikisi C ve T bazlarının değişmesiyle meydana gelir. SNP' lerin dağılımı %63 CT, %17 TC, %8 CG, %4 AT ve %8 insersiyon/delesyon şeklinde olduğu belirtilmiştir (Miller ve diğ., 2001). DNA dizisindeki farklılıkların bakteri, virüs, toksinler, kimyasallar ve ilaç gibi çevresel etkenler ve hastalıklara verilen yanıt üzerinde büyük etkisi vardır. Bu yüzden SNP' ler biyomedikal araştırmalarda ve farmakolojik ürünlerin geliştirilmesinde büyük önem taşırlar. SNP' lerin canlıların oluşumu sırasında stabil kalmaları, yani jenerasyonlar arası geçişte fazla değişmemeleri popülasyon çalışmalarının kolay izlenmesini sağlamaktadır. İnsan genomunun SNP haritasının çıkarılması konusunda dünyada çok sayıda grup çalışmaktadır. Bu gruplar içinde en önemli olanlar U.S. Human Genome Project (HGP) ve SNP konsorsiyumudur (TSC Project).

SNP Konsorsiyumu, Şubat 1999'da insan genomunda eşit dağılım gösteren ~300.000 SNP' nin tanımlanması ve "fikri mülkiyet sınırlaması olmaksızın bilginin halka aktarımını" sağlamak amacı ile kurulmuş bir organizasyondur. Hedefi iki yıl içerisinde 300.000 SNP' nin tanımlanması olan SNP konsorsiyumu' nun 2001 yılı sonunda yayımlanan raporunda 1.4 milyon SNP açıklanmıştır (Sachidanandam, 2001).

SNP haritalarının kanser, diyabet, vasküler hastalıklar gibi poligenik kalıtım gösteren hastalıkların çözümlenmesinde çok faydalı olacağı düşünülmektedir. SNP' ler genellikle hastalıklara neden olmazlar, fakat belirli hastalıkların gelişmesine yatkınlık kazandırabilirler. Örneğin; Alzheimer hastalığı ile ilgili bulunmuş genlerden birisi olan Apolipoprotein E (ApoE) geni SNP' lerin hastalık gelişimine nasıl etki ettiğine dair iyi bir örnektir. Apolipoprotein E, lipid metabolizmasında gerekli bir plazma proteindir, genetik olarak polimorfik bir gen dir (Mahley, 1988). ApoE geni 112. ve 158. kodonlarında 2 adet SNP içerir ve sonuç olarak bu gen için 3 muhtemel genotip oluşabilir, E2, E3 ve E4 (Utermann ve diğ., 1980; Weisgraber ve diğ., 1981). Her allel birbirinden bir DNA bazı ve

her protein ürünü ise birbirinden bir aminoasit farklılığı ile ayrılır. 112. ve 158. kodonlarda, E2 alleli TGC/TGC (Cys/Cys), E3 alleli TGC/CGC (Cys/Arg), E4 alleli ise CGC/CGC (Arg/Arg) içerir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda E3 alleli bütün popülasyonlarda yaygın olarak bulunmuştur. E4 alleli total serum kolesterol düzeyinin yükselmesine neden olur ve koroner kalp hastalıklarına yatkınlık oluşturur (Wilson ve diğ., 1996). Ayrıca E4 alleli taşıyan kişilerin, Alzheimer hastalığının gelişmesine daha yatkın olduğu da belirtilmiştir (Corder ve diğ., 1993). E2 allelinin Alzheimer hastalığına karşı koruyucu olduğu ve uzun yaşam sağladığı gösterilmiştir (Schachter ve diğ., 1994).

Hatırlanması gereken bir başka husus, SNP' lerin her zaman hastalıkların gelişmesinde tek başlarına kesin belirleyici olmamalarıdır. E4 alleleline sahip bireyde Alzheimer hastalığı oluşmayabilir yada E3 alleleline sahip bir birey Alzheimer hastası olabilir. Alzheimer toplumda sık görülen diyabet, kanser ve kalp hastalıklarında olduğu gibi birçok genin bir arada etken olduğu bir hastalıktır. Bu hastalıkların poligenik kalıtımla oluşması, tanımlanmaları için genetik testlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır.

### **1.8. Kemokinler (CCL)**

Aday genlerdeki varyasyonlar ve farklılıklar tüberküloz yatkınlığında önemli bir özelliktir (Yıldırım ve diğ., 2007). Kemokinler, küçük sitokinlerin bir ailesidir. Bu genler lökositlerin değişik tiplerinin direkt olarak göçmesinde önemli rol oynarlar. Bu genler CXC ve CC olarak adlandırılan iki büyük alt ailede sınıflandırılır ayrıca C ve CX<sub>3</sub>C diye adlandırılan ikide küçük alt ailesi vardır. Bu ailenin insanda 40'tan fazla üyesi tanımlanmıştır. CXC ve CC genleri sırası ile insanda 4q12-21 ve 17q11.2 kromozomlarında kümelenmiştir. Benzer bir şekilde farede de 5. ve 11. kromozomlara yerleşmiştir (Nomiya ve diğ., 2001).

CC ligand 1 (CCL1) ve CCL8 genleri karşılıklı olarak T<sub>H</sub>2 hücreleri, T<sub>H</sub>17 hücrelerini, T yardımcı hücreleri baskılamaktadır. CCL1 geni monosit üretmekte ve bu sinyal, diğer CCL genlerini teşvik etmektedir (Sironi ve diğ., 2006).

CCL genleri immün dengede önemli bir rol oynamaktadırlar. Bunlar lökositlerin aktivasyonunda, hareketinde, olgunlaşmalarında görev alırlar (Ono ve diğ., 2003).

Birkaç kemokin, lenfositlerin güçlendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla ilgili kanıtlar gittikçe artmaktadır. Ayrıca kemokinler alerji, astım gibi solunum

yolları hastalıklarında, kan oluşumunda, damar oluşumunda yaraların onarılmasında, embriyogenez ve organ gelişiminde, kardiyovasküler hastalıklarda, tümör metastazında, HIV enfeksiyonunda, kemokinler ve onların reseptörlerinin önemli rolleri vardır (Le ve diğ., 2004).

Tüberküloz granülomasının karakteristik özelliği çok çekirdekli dev hücrelerdir (Multinükleer giant cell, MGC); fakat bunların fonksiyonları hala iyi anlaşılamamıştır. CXCL8 salgısı *M. tuberculosis*'in MGC ve monositleri arttırmaktadır. MTB monosit ve CCL2 salgısını arttırmaktadır. CCL3 salgısı ile bütün hücre tipleri MTB' ye cevap vermektedir. Gen ekspresyon artışı ile monositlerin kemokin salgısı birleşmektedir. Özetle MGC granüloma hücre güçlenmesine katkıda bulunacaktır, fakat bu patojene maruz kalmaya bağlı olmayabilir (Zhu ve diğ., 2006).

Zenciler tüberküloza daha duyarlıdır. Bazı bireyler daha güçlü olup makrofaj popülasyonuna sahip olduklarından tüberküloza dirençlidirler buda insanlar arasındaki genetik polimorfizm olduğunun kanıtı olabilir (Özbal, 2006).

### **1.9. Pürinerjik Reseptörler (P2X<sub>7</sub>)**

P2X<sub>7</sub> reseptörleri, yedi homomerik (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>) reseptör alt tipi içeren, ATP' ye hassas, iyonotropik, P2X reseptör ailesine mensuptur (North, 2002). Bu reseptörlerin P2X<sub>2</sub> ve P2X<sub>3</sub> gibi heteromerik reseptör kombinasyonları olanları da vardır (North, 2002). Ancak P2X<sub>7</sub> reseptörleri P2X ailesi içerisinde homerik form olarak fonksiyon gösteren tek reseptör çeşididir. P2X<sub>7</sub> reseptörleri yüksek ATP konsantrasyonunda (4100 mM) fonksiyon gösterip (Jacobson ve diğ., 2002), uzun süre agoniste maruz kalmaları durumunda hücre membranında büyük stolitik form oluşumuna sebep olmaktadır (Surprenant ve diğ., 1996). P2X<sub>7</sub> reseptörleri öncelikle ratlarda (Surprenant ve diğ., 1996), sonra insan beyninde (Collo ve diğ., 1997), son olarak da insan makrofajlarında klonlanmıştır (Rassendren ve diğ., 1997).

P2X<sub>7</sub> reseptörleri, mast hücreleri, lenfositler, eritrositler, fibroblastlar, periferik makrofajlar ve epidermal langerhans hücrelerini içeren hematopoetik kök hücrelerde de ekspresyone edilebilirler (Collo ve diğ., 1997).

Pürinler ile onların nükleozit ve nükleotid formları, gerek enerji metabolizmasında, gerekse genetik materyalin oluşturulmasında olmazsa olmaz moleküllerdendir. Bu iki

temel görevin yanı sıra, hücre içi ve hücreler arasındaki iletişime de önemli katkılar sağlarlar. Bu iletişim, hücre yüzeyine yerleşmiş reseptörler (Pürinoseptör) ailesi

- a. Adenin reseptör grubu
- b. Yapısal (Metabotropik) nükleotid (P2Y) reseptörler
- c. İyonotropik nükleotid (P2X) reseptörler
- d. Dinükleotid reseptörler
- e. Adenozin reseptörler olmak üzere beş alt gruba ayrılmıştır (King ve diğ., 2003).

Pürinejik reseptörler, önemli ölçüde makrofajlarda ekspresse edilir ve ATP uyarımı ile MTB' nin ölümüne neden olurlar. P2X<sub>7</sub>' nin uyarımı, ikili katyon kanallarının açılmasına, kalsiyum geçişine, kaspazın uyarılmasına, sonuç olarak da apoptosise neden olur. MTB' nin ölümü fagozomal füzyonu yöneten fosfolipaz D' yi aktive eder (Berrington, 2007).

P2X<sub>7</sub> reseptörlerinin en az 250 polimorfik formu tanımlanmış (Ferrari ve diğ., 2006), bu çeşitler arasında reseptörün fonksiyonunu hem kazanmasına (Cabrini ve diğ., 2005), hem de kaybetmesine (Wiley ve diğ., 2003) sebep olan SNP' ler rapor edilmiştir. Bu SNP' lerin bazıları ekstrapulmoner TB' yi tahmin etmede bir biomarker olarak işe yaramaktadır (Fernando ve diğ., 2007).

P2X<sub>7</sub> reseptörünün polimorfik formlarının çeşitliliği, P2X<sub>7</sub> reseptörleri ile alakalı diğer reseptörlerin C terminal bölgesinin uzunluğunun artması ile alakalıdır. Bu bölge reseptör aracılı sitosolik por oluşturma aktivitesi için gerekli olup (Surprenant ve diğ., 1996), SH2 domainleri ve a-aktin gibi lipopolisakaritler için birbirini etkilediği varsayılan bölgeleri de içermektedir (Denlinger ve diğ., 2001).

Pürinerjik reseptörler, makrofajlarda önemli ölçüde ekspresse edilen immün sistem ve kandaki hücrelerde bulunan katyonik kanallardır (Gu ve diğ., 2001).

P2X<sub>7</sub> reseptörü ekstrasellüler ATP ile aktive olmaktadır. ATP apoptosise yol açan kaspaz kaskadının uyarılmasına ve kalsiyum girişine yol açarak, katyon seçici kanalların açılmasına neden olur. Bir kalsiyum bağımlı fosfolipaz D yolu da aktive edilir, Aktive edilen bu yolda fagolizozomal füzyona ve MTB' nin ölümüne neden olur (Gu ve diğ., 2001).

P2X<sub>7</sub> reseptörleri, makrofajları güçlü bir şekilde ekspre eder. P2X<sub>7</sub>' nin aktivasyonu Ca<sup>2+</sup> seçici kanallarının hemen açılmasına ve kalsiyum iyonlarının hücrenin içine girmesini sağlar. Bunun sonucunda da kaspaz kaskadı indüklenerek apoptosise oluşur, ayrıca fosfolipaz-D aktive olur. Fosfolipaz-D fagozom-lizozom füzyonunu arttırarak MTB' nin

ölümüne neden olur. P2X<sub>7</sub> geninde birçok polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlardan en yaygını A1513C polimorfizmidir. Bu polimorfizm bir amino asidin değişimine neden olur. P2X<sub>7</sub> reseptörünün C terminalindeki 496. amino asid olan glutamik asidin alanin amino asidine dönüşümüne neden olur. Bu amino asid değişikliği P2X<sub>7</sub> geninin fonksiyonunu kaybetmesine sebep olur (Fernando ve diğ., 2007).

Birçok çalışma popülasyonların tüberküloza olan yatkınlıklarında genetik faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. P2X<sub>7</sub> geni birkaç Batı Afrika, Güney Doğu Asya, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa popülasyonlarında bir risk faktörüdür (Xiao ve diğ., 2009).

## **1.10. Moleküler Teknikler**

### **1.10.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

PCR spesifik bir DNA parçasının primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde in vitro bir amplifikasyon yöntemidir. PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan 5 ana madde vardır. DNA örneği (genomik DNA), çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen sentetik primer, deoksi-nükleotit-tri fosfatlar (dNTP), yüksek ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi uygun pH ve iyon koşullarını (Mg<sup>+2</sup>) sağlayan tampon karışımı (MgCl<sub>2</sub>) kullanılır (Applied Biosystems, 2001; AmpFISTR1 User Manuel).

PCR yöntemi kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle birçok farklı alanda kullanılabilmektedir.

Bu alanlar şöyle özetlenebilir;

- Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı,
- Prenatal (doğum öncesi) tanıda,
- Klinik örneklerde patojen (hastalık yapabilecek) organizmaların saptanması,
- Adli tıp da,
- Onkogenезisin (kanseri yapan hücrelerin oluşum evresi) araştırılmasında,

- “Probe” oluşturulmasında, klonlamada, gen tanımlaması araştırmalarında,
- DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
- Bilinmeyen dizilerin tayininde,
- Geçmiş DNA’nın incelenmesi ve evrimin aydınlatılmasında,
- RFLP analizinde,
- İn vitro fertilization’ da implantasyon öncesi genetik testlerin yapılmasında,

Bir PCR döngüsünde denatürasyon, primerin bağlanması(anealing), ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Art arda tekrarlanan denatürasyon primerlerin bağlanması, primerlerin uzaması, evreleriyle DNA parçaları üssel olarak amplifiye olur. Reaksiyon başlatılmadan önce istenen sayıda döngünün tekrarlanması sağlanabilir. PCR’ın kullanıma geçmesiyle laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmıştır.

### **1.10.2. RFLP**

Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu, restriksiyon endonükleazlar kullanılarak DNA’nın kesimine dayanan bir tekniktir.

Restriksiyon endonükleazlar 1968 yılında keşfedilmiş bakteri enzimleridir. Restriksiyon endonükleazlar DNA üzerindeki bazı özel dizileri tanır ve DNA’yı bu dizilerden keserler. Farklı bakteri şuşlarından farklı sayıda bazdan oluşan ve farklı tanıma dizisine sahip, farklı enzimler elde edilebilir. DNA üzerindeki restriksiyon tanıma dizilerinde oluşan herhangi bir nükleotid değişimi ( SNP, insersiyon/delesyon, translokasyon, ve benzeri mutasyon çeşitleri) restriksiyon enziminin o bölgeyi tanıyamaması, ardından da kesimin gerçekleşmemesine yol açar. Bu bilgiye dayanarak; aynı restriksiyon enzimi kullanılarak farklı kaynaklardan elde edilen DNA molekülleri sindirildiğinde, farklı uzunlukta DNA parçaları oluşabilir. RFLP sindirim ürünlerini jel elektroforezinde yürüttüğümüzde ise, bir sindirim görüntüsü oluşur. Jel görüntüsünde oluşan farklılıklar bize, tanıma bölgelerindeki nükleotid polimorfizmlerinin varlığını belirtir. Bu yöntem bize dolaylı olarak nükleotid değişimi varlığını gösterir.

RFLP metodu kullanılarak, PCR ile çoğaltılmış belirli bir gen bölgesi, tanımlanmış özel mutasyonlara karşı uyumlu, eşsiz bir restriksiyon enzimi ile taranabilir. Analiz edilen gen bölgesi jel görüntüsündeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplendirilebilir, lokusa ait genotip ve allel sıklıkları saptanabilir.

Bu çalışmamızda pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz hastalıklarında; CCL1 rs159294 T/A ve P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmlerinin Elazığ ili yöresi populasyonun da tüberküloz için bir risk faktörü olup olmayacağını araştırmayı, araştırma sonucunda elde edilecek genotip ve allel frekanslarının pulmoner ve ekstrapulmoner TB hastaları ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması amaçlanmıştır. Böylece gruplar arasında allel ve genotip frekanslarındaki farklılıklar incelenecek, bu gen polimorfizmlerinin incelenen hastalık üzerinde etkili olup olmadığı araştırılacaktır. Çalışmamız Elazığ yöresi populasyonunda TB hastalığında CCL1 rs159294 T/A ve P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmlerinin, allel ve genotip frekanslarının saptanması ve TB hastalığına karşı yatkınlığın belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızın gelecekte TB hastalığı ile ilgili yapılacak çalışmalar için bir temel oluşturacağını ve yol gösterici olacağını ümit etmekteyiz.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca 13.09.2010 tarih ve 148 sayılı yazısı ile onaylanan çalışmada, eylül 2010 ile mayıs 2011 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları polikliniğinde pulmoner ve ekstrapulmoner TB tanısıyla takip ve tedavileri yapılan hastalardan; kendilerinin, birinci derece yakınlarının, hastane otoriteleri ve hekimlerinin rızası ile kan örnekleri alındı. Kontrol grubunu ise, pulmoner ve ekstrapulmoner TB hastalıkları başta olmak üzere herhangi bir organik ve kronik hastalığı olmayan, gönüllü sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubunun benzer coğrafi bölgelerden olmasına dikkat edildi. Çalışmamız 160 sağlıklı kontrol grubundan, 160 pulmoner ve ekstrapulmoner TB hastasından oluşmaktadır. TB hastalarının dağılımı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

**Tablo1.** TB Hastalarının Dağılımı

TB'li hasta	Sayı
Toplam TB'li hasta	160
Toplam Pulmoner TB'li hasta	71
Toplam Ekstrapulmoner TB'li hasta	89
Lenfadenit	73
Plevra	8
Kemik	5
Deri	3

### 2.2. Örneklerin Alınması, Saklanması ve Analizlere Hazırlanması

Kanlar hastaların antekübital veninden daha önceden hazırlanmış 0.3 ml' lik, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren tüplere 2 cc olacak şekilde alındı. Kanlar, kan alınma işlemleri bittikten sonra DNA saflaştırması yapılmaya kadar -20 °C'de bekletildi.

Kanlar birkaç defa alt-üst edilerek homojen hale getirilip 24'erli gruplar oluşturularak çalışıldı.

### **2.3. Demirbaş Malzemeler**

- 1- PCR cihazı (Biometra USA)
- 2- Mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157.MP, Germany ve Eppendorf microcentrifuge type 5415C, Germany)
- 3- Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan)
- 4- Elektroforez aparatı 1200V-500mA E815 (Belgium)
- 5- Electrophoresis box (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium),
- 6- UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France)
- 7- Hız ayarlı vorteks (Labinco L46, The Netherlands)
- 8- Etüv (Weiss Gallenkamp, UK)
- 9- Otoklav (Nüve, Germany)
- 10- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- 11- Laminar air flow
- 12- Su banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Germany)
- 13- Otomatik Pipetler (Eppendorf Research, Germany)
- 14- Derin Dondurucu (Liebherr, Germany)
- 15- Buzdolabı (Arçelik)

### **2.4. Sarf Malzemeleri**

- 1- Kandan DNA izolasyon kiti (PROMEGA, MADİSON, WI).
- 2- BfaI (FspBI) Restriksiyon enzimi (FERMENTAS)
- 3- HaeII Restriksiyon enzimi (PROMEGA)
- 4- Eppendorf Tüpler (0.2, 0.5, 1.5, 2'lik)
- 5- Primerler (REF GEN BİYOTEKNOLOJİ)
- 6- Amonyum asetat
- 7- Amonyum klorür
- 8- Sodyum dodesil sülfat (SDS)

- 9- Potasyum hidrojen karbonat
- 10- Etanol (%70'lik)
- 11- İzopropil alkol
- 12- EDTA
- 13- Borik asit
- 14- Agaroz
- 15- Ethidium bromide
- 16- Deoksiniükleotid trifosfat (dNTP) mix (INTRON)
- 17- Taq DNA polimeraz (INTRON),
- 18- 6X Yükleme Tamponu (SIGMA)
- 19- 100 bp DNA ve 50 bp DNA step marker'leri (FERMENTAS).
- 20- TRIS baz
- 21- MgCl<sub>2</sub> (FERMENTAS)
- 22- Distile Su
- 23- Tüplük
- 24- Cam malzemeler

## 2.5. Kandan DNA İzolasyonu

DNA saflaştırılması Promega firmasından alınan ticari “Wizard Genomic DNA Purification Kit”i ile gerçekleştirildi (Kat. No.: A1125, Madison, WI, USA). Bu kit 300 µL kandan DNA izolasyonu için dizayn edilmiştir. Çalışma esnasında kitin genel kurallarına uymak koşuluyla bazı modifikasyonlar yapıldı. Gerçekleştirilen deney aşamaları aşağıda sıralandığı gibidir:

- 1.5 mL'lik tüplere 900 µL “cell lysis” (hücre parçalama) solüsyonu konuldu.
- Alt-üst edilmiş kandan 300 µL alınarak hücre parçalama solüsyonunun üzerine ilave edildi, 5-6 defa alt-üst edildi, 10 dakika oda ısısında bekletildi.
- 15.000 x g de 20 saniye oda ısısında santrifüjlendi.
- Alttaki beyaz kısma zarar vermeden mümkün olduğu ölçüde fazla süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı. Altta hücrelerin üzerinde yaklaşık olarak 10-20 µL sıvı bırakıldı.
- Hücre parçalama solüsyonundan 300 µL alınarak çok hafifçe vortekslenmiş hücre çöküntüsünün üzerine eklendi ve 5-6 kez alt-üst edildi. 2-4. basamaklar tekrar

edildi. Beyaz hücrelerin arasında hala bazı kırmızı hücreler görülüyorsa bu durumda tekrar hücre parçalama solusyonu eklenerek yukarıdaki deneyler tekrarlandı.

- Beyaz hücreler şiddetle vortekslenerek iyice karışması sağlandı (10-15 saniye).
- Vortekslenmiş hücrelerin üzerine 350 µL “Nuclei lysis” (çekirdek parçalama) solusyonu eklendi. Beyaz hücrelerin parçalanması için solusyon 5-6 kez pastör pipeti ile pipetlendi ve bırakıldı. Solusyon visköz bir yapı kazandı. Karıştırıldıktan sonra hala hücre kümeleri görünüyorsa 37°C’de inkübe edildi.
- Oda ısısına getirilmiş Nükleer lizatın üzerine 120 µL “protein precipitation” (protein çöktürme) solusyonu eklendi. 10-20 saniye şiddetle vortekslendikten sonra küçük, değişik kahverengi tonlarında protein kümeleri görüldü. Numuneler tam oda ısısına gelmeden protein çöktürme solusyonu eklendiğinde yeterli bir protein çöküntüsü elde edilemeyeceğinden hareketle iyi bir çöktürme için bu ayrıntıya dikkat edildi.
- Oda sıcaklığında 15.000 x g’de 3 dakika santifüjlendi. Eppendorf tüpün dibinde koyu kahverengi bir protein çöküntüsü görüldü.
- Süpernatant 300 µL izopropanol içeren 1.5 ml’lik santifüj tüpüne transfer edildi.
- Sürekli alt-üst edilerek ve ters çevrilerek karıştırıldı. Beyaz iplik görünümündeki DNA, görülebilen bir kitle oluncaya kadar bu çevirme işlemine devam edildi. Bazı numunelerde görülebilen kümeler oluşurken diğer bazılarında çok küçük miktarda iplikçik görüldü.
- 1 dakika oda sıcaklığında 15.000 x g’de santrifüjlendi. DNA, örnekteki lökosit miktarının az veya fazla olmasına göre miktarı değişebilen beyaz bir çöküntü olarak görüldü.
- Süpernatant dökülerek dipte kalan DNA’nın üzerine 300 µL oda sıcaklığındaki %70’lik etanol eklendi. Alt-üst yapılarak DNA pelleti ve tüpün kenarları yıkandı. Yukarıdaki santrifüleme işlemi tekrarlandı.
- Etanol dikkatlice uzaklaştırıldı. Bu aşamada DNA çok gevşektir. Yanlışlıkla pipetlenebileceğinden dikkatli olmak gerekir. Tüpler temiz kurutma kağıtlarının üzerine ağızları alta gelecek şekilde yerleştirildi, böylece fazla etanol alınmış oldu. Sonra 5-10 dakika normal havada kurumaya bırakıldı.

- Kurumuş tüpe 100 µL DNA rehidratasyon solusyonu eklendi. DNA'yı rehidre etmek için 65°C'de 1 saat inkübe edildi. Tüp ara ara çalkalandı.
- DNA 0.5 mL'lik eppendorf tüplere aktarılarak 2-8°C'de saklandı.

Bu işlemler bittikten sonra eppendorf tüplerde bulunan DNA'nın tahmini miktarını hesaplamak için şu işlem gerçekleştirildi: UV/visible spektrometre 260 ve 280 nm'de çift dalga boyu aralığında okuma yapacak şekilde ayarlandı. DNA örneğinden 4 µL alınarak mikro küvette bulunan 746 µL saf suyun üzerine konuldu ve alt-üst yapıldı. Okuma gerçekleştirildi. Daha sonra  $\text{ng}/\mu\text{l DNA} = A_{260} \times \text{dilasyon faktörü} \times 50$  formülünden hareketle örneklerdeki DNA'nın yaklaşık miktarı hesaplandı.

## **2.6. PCR-RFLP Yöntemi**

### **2.6.1. Oligonükleotidler (Primerler)**

CCL1 genindeki rs159294 polimorfizminin değerlendirilmesi için [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) web adresi kullanılarak genlerin tam dizilerine ulaşıldı ve primer dizayn edildi. Primerler [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) programı kullanılarak dizayn edildi. Polimorfizmlerin değerlendirilmesinde RFLP yöntemi kullanılırken özellikle seçilen enzimin star aktiviteye sahip olmaması tercih edildi.

CCL1 rs159294 polimorfizminin doğrulanması için DNA dizileme yapıldı. Bu amaçla ilgili polimorfizm için wild, heterozigot ve polimorfik olduğu RFLP yöntemi ile tespit edilen örnekler PCR ile çoğaltıldı. Laboratuvarlarımızda DNA dizileme cihazı bulunmadığından örnekler "Ref Gen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji" laboratuvarına gönderildi.

PCR deneylerinde kullanılacak olan oligonükleotidler, insan DNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerin nükleotidlerin sekansı ve orijini aşağıda belirtilmiştir.

**Tablo 2.** CCL1 ve P2X<sub>7</sub>' ye Ait Primer Dizileri

---

CCL1 Sense primer: 5'- CCC AAA ATA TCT GTG GCT GA -3'
CCL1 Antisense primer: 5'- ATC CCA GCA GAA GCT TTG AA-3'
P2X <sub>7</sub> Sense primer: 5'- AGA CCT GCG ATG GAC TTC ACA G-3'
P2X <sub>7</sub> Antisense primer: 5'- AGC GCC AGC AAG GG CTC -3'

---

### 2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmada hasta ve kontrollerden elde edilen DNA örnekleri PCR ile çoğaltıldı. PCR koşulları Zhang ve arkadaşlarınca tariflenen protokole göre belirlendi (Zhang ve diğ., 2008). PCR optimizasyonundan sonra protokol laboratuvar şartlarımıza göre yeniden oluşturuldu.

PCR İçeriği:

10X PZR Buffer	3µl
MgCl (25mM)	3µl
dNTP (2.5mM)	3µl
Primer R (20pmol)	1µl
Primer F (20pmol)	1µl
DNA	5µl
Taq DNA Polimeraz	0.2µl

Toplam volüm 30 µl ye distile su ile tamamlandı.

### 2.6.3. CCL1 rs159294 T/A PCR Programı

95 °C	5dk.	Denatürasyon periyodu	
95 °C	30sn		36 siklus
58.4 °C	30sn		
72 °C	40sn		
72 °C	7dk.	Ekstensiyon periyodu	

#### 2.6.4. P2X<sub>7</sub> A1513C PCR Programı

95 °C	5dk.	Denatürasyon periyodu	
95 °C	30sn		36 siklus
66.3 °C	30sn		
72 °C	40sn		
72 °C	7dk.	Ekstensiyon periyodu	

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra %3'lük agaroz jelde PCR ürünleri koşturuldu. CCL1 rs159294 için 239 bp, P2X<sub>7</sub> A1513C için ise 317 bp ürün elde edildi. Elde edilen CCL1 ürünleri BfaI (FspBI), (Fermentas) restriksiyon enzimi ile; P2X<sub>7</sub> ürünleri HaeII (Promega) restriksiyon enzimi ile kesildi.

#### 2.6.5. BfaI (FspBI) Restriksiyon Enzim Muamelesi

10X Reaksiyon Buffer 2.5µl

PCR ürünü 10 µl

Su 3 µl

Enzim [BfaI (FspBI)] 0.8 µl

37°C' de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra ürünler %3'lük agaroz jelde koşturularak hastaların ve kontrollerin polimorfizm sonuçları verildi (Zhang ve diğ., 2008).

#### 2.6.6. HaeII Restriksiyon Enzim Muamelesi

RE 10X Reaksiyon Buffer 2 µl

PCR ürünü 10 µl

Su 10 µl

Enzim (HaeII) 0.5 µl

BSA 0,2 µl

37°C'de 1-4 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra ürünler %3'lük agaroz jelde koşturularak hastaların ve kontrollerin polimorfizm sonuçları verildi (Zhang ve diğ., 2008).

**Tablo 3.** Çalışılan Polimorfizmler, Restriksiyon Enzimleri ve Bant Boyutları

Çalışılan Polimorfizmi	Gen	Kullanılan Restriksiyon Enzimi	PCR Ürünü	Normal Genotip	Heterozigot Ürünleri	Homozigot Polimorfik Genotip
CCL1		BfaI (FspBI)	239 bp	130bp +	239 bp +	239bp
				109bp	130 bp +	
					109 bp	
P2X <sub>7</sub>		HaeII	317 bp	317 bp	317 bp +	199 bp +
					199 bp +	120 bp
					120 bp	

### 2.6.7. PCR ve RFLP Ürünlerinin Elektrofrezisi

PCR ve enzim kesim ürünlerinin amplifikasyonlarının ya da kesimlerinin doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilebilmesi için agaroz jelde yürütüldü.

### 2.6.8. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

#### 2.6.8.1. Etidyum Bromür Hazırlanması:

0.2 gr etidyum bromür tartılarak distile su ile 20 ml ye tamamlanır.

#### 2.6.8.2. TBE Tamponu (5X)

54 gr Tris

27.5 gr Borik Asit

20 mL 0.5 M EDTA tartılarak (pH 8) 1 L distile ve deiyonize suda çözüldü.

### **2.6.8.3. %3'lük Agaroz Jel Hazırlanması**

3 gr agaroz tartılır, TBE ile 100 ml'ye tamamlanır. Mikrodalga fırında kaynatılarak eritilir, soğutulur, jel kalıbına dökmeden içine 7 µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakılır.

### **2.6.9. PCR ve RFLP Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi**

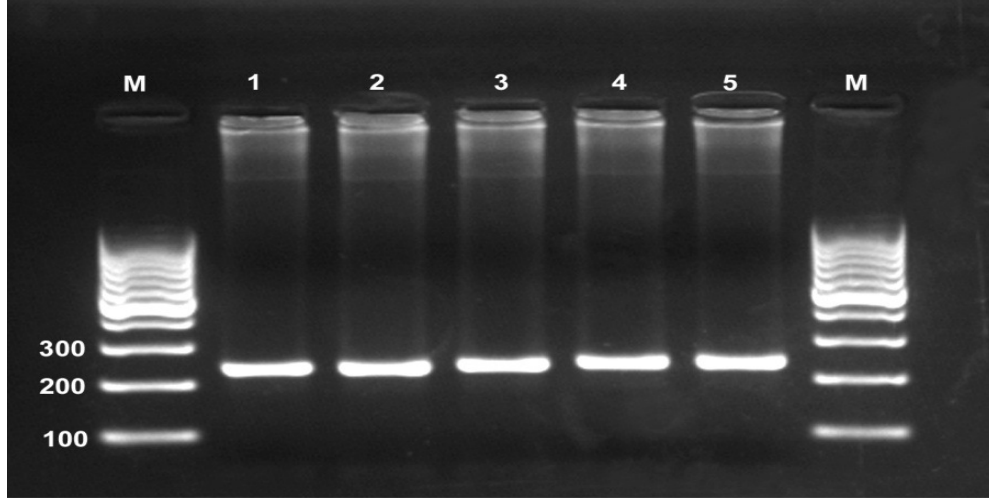
PCR ve RFLP ürünlerinin yüklenecek miktarlarının %10'u kadar içerisine 6X yükleme tamponu eklenir ve kuyucuklara mikropipetle yükleme yapılır. DNA'lar jele yüklenirken, beklenen bantların boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla aynı jelin ilk ve son kuyucuğuna Fermentas firmasından alınan 100 bp'lik 7 µl DNA boyut marker'ı de yüklendi. Jel, oda sıcaklığında 60 V ve 25 mA sabit akımda yürütüldü. 1 saatlik yürütmeden sonra jeller UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı.

### **2.7. İstatistiksel Analizler**

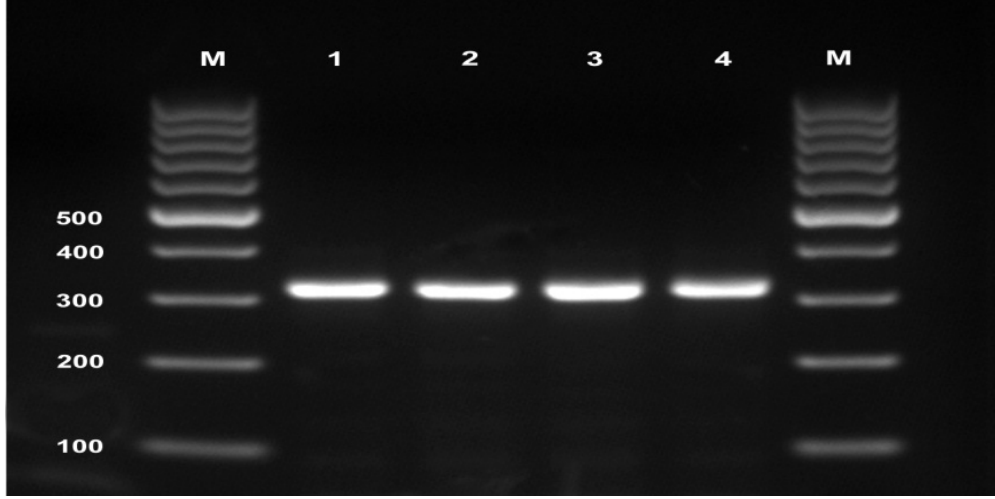
Bütün istatistiksel testler "SPSS® for Windows computing program, Version 16" (SPSS Inc. Chicago IL USA) ile gerçekleştirildi. Genetik dağılımın Hardy-Weinberg dengesine uyumu Ki Kare ( $X^2$ ) testi ile analiz edildi. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik dağılımların farklılıkları  $X^2$  testi ile değerlendirildi. Kontrol ve hastalar arasındaki allelik dağılım farklılıkları Fisher's exact test ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

### 3. BULGULAR

Bu çalışmada 160 tüberkülozlu hasta ve 160 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubundan, kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapıldı. Hastaların cinsiyet dağılımı 61(%38.1) kadın, 99(%61.9) erkek, yaş ortalamaları ise  $37.43 \pm 14.58$ ; kontrol grubunun cinsiyet dağılımı 82(%51.2) kadın, 78 (%48.8) erkek, yaş ortalamaları ise  $39.27 \pm 13.84$  olarak belirlendi. İzolasyon sonrası CCL1 ve P2X<sub>7</sub> primerleri kullanılarak PCR kuruldu. DNA'sı elde edilen hasta ve kontrol gruplarının PCR'ları kurularak çoğaltma yapıldı. Sonra ürünler %3 lük agaroz jelde koşturularak değerlendirildi. Hasta ve kontrol örneklerinde CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi için 239 bp; P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmi için 317 bp de ilk PCR ürünleri oluşturuldu ( Şekil 1 ve Şekil 2).

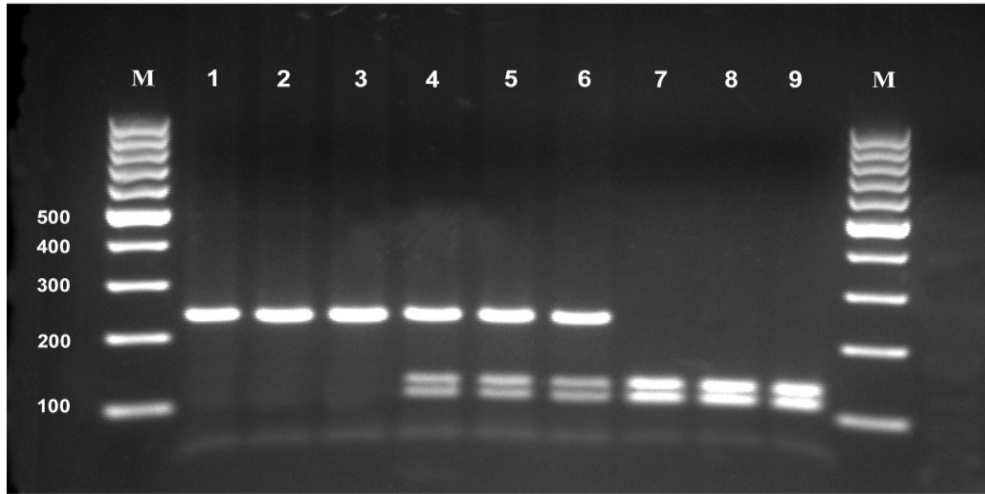


**Şekil 1.** CCL1 için kesim öncesi ilk PCR ürün örnekleri, M: 100 bp' lik DNA boyutmarkını

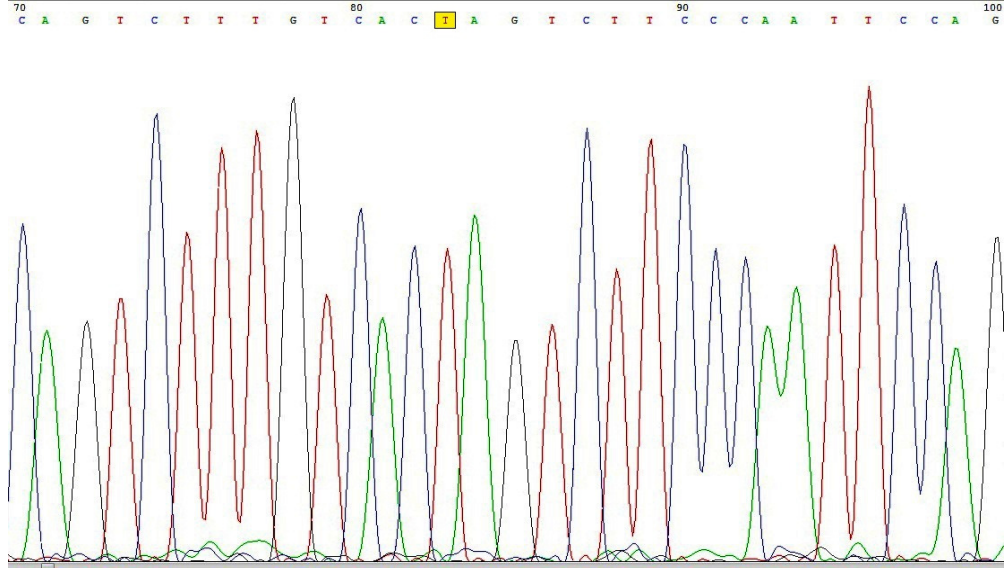


**Şekil 2.** P2X<sub>7</sub> için kesim öncesi ilk PCR ürün örnekleri, M: 100 bp' lik DNA boyut markırı

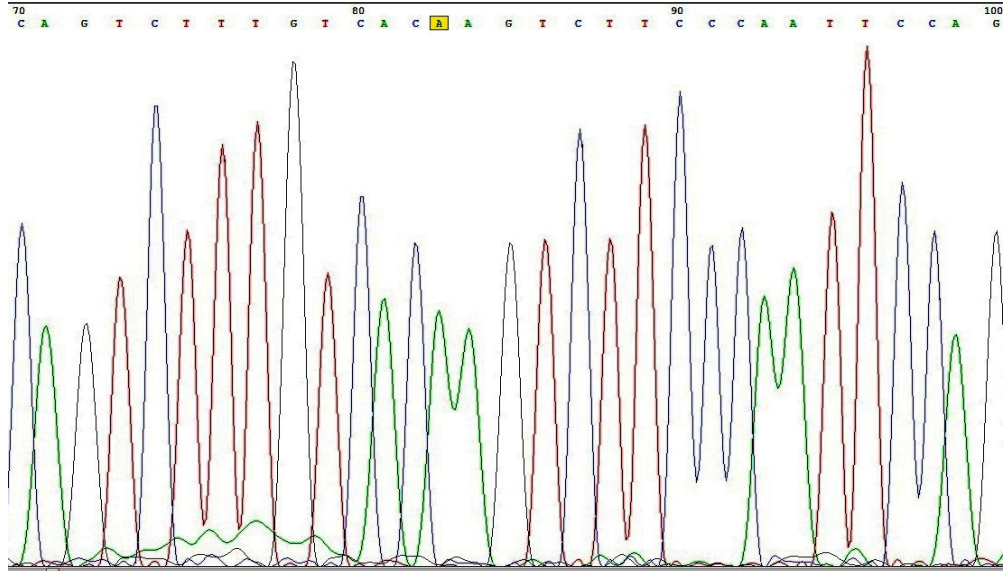
PCR ile amplifiye edilen gen ürünleri CCL1 için BfaI (FspBI) restriksiyon endonükleaz enzimi ile P2X<sub>7</sub> için HaeII restriksiyon endonükleaz enzimi ile muamele edildi. İlgili polimorfizmin belirlenmesi için %3'lük agaroz jelde koşturularak CCL1 için yabancı tip (TT), heterozigot (TA), homozigot polimorfik (AA), (Şekil 3) olguları tespit edildi.



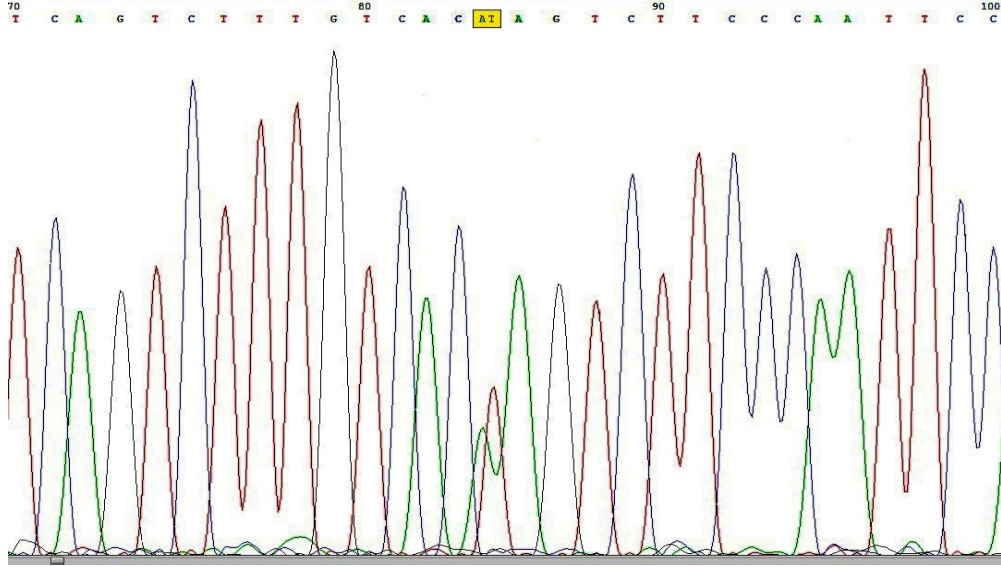
**Şekil 3.** CCL1 rs159294 T/A polimorfizmi için PCR' a yönelik agaroz jel elektroferez görüntüsü. Sütun1, 2, 3: 239 bp (AA homozigot polimorfik örnekler), Sütun 4, 5, 6: 239 bp + 130bp + 109 bp (TA heterozigot örnekler), Sütun 7, 8, 9: 130bp +109 bp (TT yabancı tip örnekler) M: 100 bp' lik DNA boyut markırı



**Şekil 4.** CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için TT genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.

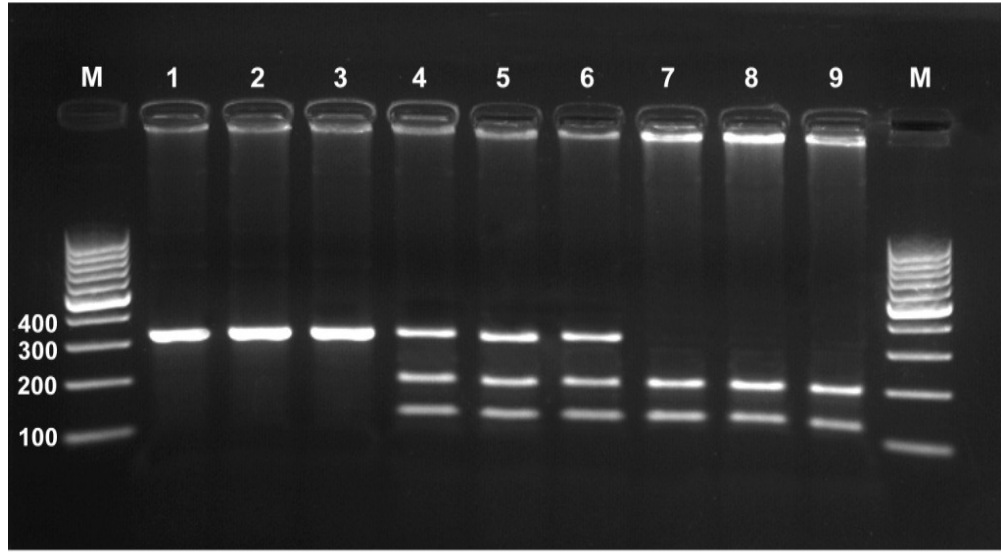


**Şekil 5.** CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için AA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.



**Şekil 6.** CCL1 genindeki rs159294 polimorfizmi için TA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü.

P2X<sub>7</sub> için de yabancı tip (AA), heterozigot (AC), homozigot polimorfik (CC) olguları belirlendi (Şekil7).



**Şekil 7.** P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmi için PCR' a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1, 2, 3: 317 bp (AA: yabancı tip örnekler) Sütun 4, 5, 6: 317 bp + 199 bp + 120 bp ( AC: Heterozigot polimorfik örnekler) Sütun 7, 8, 9: 199 bp + 120 bp ( CC: Homozigot polimorfik örnekler) M: 100 bp' lik DNA boyut markırı.

Hasta ve kontrol grubu ile yaptığımız çalışma sonucunda CCL1 için 160 tüberkülozlu hastanın 98'inde (%61.25) TT genotipi, 58'inde (%36.25) TA genotipi, 4'ünde de (%2.5) AA genotipi, 71 pulmoner tüberkülozlu hastanın 50'sinde (%70.42) TT genotipi, 20'sinde (%28.16) TA genotipi, 1'inde de (%1.40) AA genotipi, 89 ekstrapulmoner tüberkülozlu hastanın 48'inde (%53.93) TT genotipi, 38'inde (%42.69) TA genotipi, 3'ünde de (%3.37) AA genotipi tespit edildi. Kontrol grubunda ise 160 sağlıklı bireyin 100'ünde (%62.50) TT genotipi, 58'inde (%36.25) TA genotipi, 2'sinde de (%1.25) AA genotipi belirlenmiştir (Tablo 4). CCL1 rs159294 polimorfizminde genotip frekansları  $X^2$  testi kullanılarak, hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır ( $P > 0.05$ ). Kontrol grubunun genotip dağılımı Hardy Weinberg dengesi içinde olmayıp ( $P < 0.05$ ), hastaların genotip dağılımlarının Hardy Weinberg dengesi içinde olduğu belirlenmiştir ( $P > 0.05$ ).

**Tablo 4.** CCL1 rs159294 Polimorfizmine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Genotip Frekansları

Gruplar	TT	TA	AA	P	H-Wes
Kontrol (n=160)	100(%62.50)	58(%36.25)	2(%1.25)		0.042
Toplam TB'li Hasta (n=160)	98(%61.25)	58(%36.25)	4(%2.5)	0.709	0.175
Pulmoner TB (n=71)	50(%70.42)	20(%28.16)	1(%1.40)	0.488	0.52
Ekstrapulmoner TB (n=89)	48(%53.93)	38(%42.69)	3(%3.37)	0.272	0.164

CCL1 için, toplam, pulmoner ve ekstrapulmoner TB'li hastalarda T allel frekansları sırasıyla; 0.19, 0.15, 0.25 olarak saptanmış; kontrol grubunda ise T allel frekansı 0.21 olarak belirlenmiştir. A allel frekansları ise toplam, pulmoner ve ekstrapulmoner TB'li hastalarda sırasıyla; 0.81, 0.85, 0.75, kontrol grubunda ise 0.79 olarak tespit edilmiştir (Tablo 5). Allel frekansları  $X^2$  testi kullanılarak, hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ( $P > 0.05$ ).

**Tablo 5.** CCL1 rs 159294 Polimorfizmine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Allel Frekansları

Gruplar	T allel frekansı	A allel frekansı	P
Kontrol	0.21	0.79	
Toplam TB'li	0.19	0.81	0.693
Pulmoner TB	0.15	0.85	0.195
Ekstrapulmoner TB	0.25	0.75	0.291

Hasta ve kontrol grubu ile yaptığımız çalışma sonucunda P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmi için 160 tüberkülozlu hastanın 91'inde (%56.87) AA genotipi, 52'sinde (%32.5) AC genotipi, 17'sinde de (%10.62) CC genotipi, 71 pulmoner tüberkülozlu hastanın 44'ünde (%61.97) AA genotipi, 18'inde (%25.35) AC genotipi, 9'unda da (%12.67) CC genotipi, 89 ekstrapulmoner tüberkülozlu hastanın 47'sinde (%52.80) AA genotipi, 34'ünde (%38.20) AC genotipi, 8'inde de (%8.98) CC genotipi tespit edildi. Kontrol grubunda ise 160 sağlıklı bireyin 76'sında (%47.50) AA genotipi, 63'ünde (%39.37) AC genotipi, 21'inde de (%13.12) CC genotipi belirlenmiştir (Tablo 6). P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizminde genotip frekansları X<sup>2</sup> testi kullanılarak, hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (P > 0.05). Pulmoner TB'li hastaların genotip dağılımı Hardy Weinberg dengesi içinde olmayıp (P < 0.05), toplam tüberküloz ve ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalar ile kontrol grubunun genotip dağılımlarının Hardy Weinberg dengesi içinde olduğu belirlenmiştir (P > 0.05).

**Tablo 6.** P2X<sub>7</sub> A1513C Polimorfizmine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Genotip Frekansları

Gruplar	AA	AC	CC	P	H-Wes
Kontrol (n=160)	76(%47.50)	63(%39.37)	21(%13.12)		0.176
Toplam TB'li Hasta (n=160)	91(%56.87)	52(%32.5)	17(%10.62)	0.244	0.028
Pulmoner TB (n=71)	44(%61.97)	18(%25.35)	9(%12.67)	0.093	0.0053
Ekstrapulmoner TB (n=89)	47(%52.80)	34(%38.20)	8(%8.98)	0.553	0.607

P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmi için, toplam, pulmoner ve ekstrapulmoner TB'li hastalarda A allel frekansları sırasıyla; 0.27, 0.75, 0.28 olarak saptanmış; kontrol grubunda

ise A allel frekansı 0.67 olarak belirlenmiştir. C allel frekansları ise toplam, pulmoner ve ekstrapulmoner TB' li hastalarda sırasıyla; 0.73, 0.25, 0.72, kontrol grubunda ise 0.33 olarak tespit edilmiştir (Tablo 7). Allel frekansları  $X^2$  testi kullanılarak, hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ( $P > 0.05$ ).

**Tablo 7.** P2X<sub>7</sub> A1513C Polimorfizmine Ait Hasta ve Kontrol Gruplarının Allel Frekansları

Gruplar	A allel frekansı	C allel frekansı	P
Kontrol	0.67	0.33	
Toplam TB'li	0.27	0.73	0.10
Pulmoner TB	0.75	0.25	0.10
Ekstrapulmoner TB	0.28	0.72	0.275

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

TB ölüme neden olan enfeksiyon hastalıkları arasında dünya da ikinci sırada yer almaktadır. Yıllık olarak 8-9 milyon yeni TB vakasının olduğu, ayrıca dünya nüfusunun üçte birinin MTB ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. MTB ile enfekte olan insanların ancak %5-10'nun da klinik rahatsızlık görülmektedir (Frieden ve diğ., 2003).

MTB'nin vücuda girişi ile makrofajlar immün cevabın oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır. Makrofajlar MTB'nin konağa girdiği andan itibaren onları fagosite edip, basili bir kapsülle çevrelemektedir. Kemokinler makrofajların hareketinde görev alan bağışıklık sistemi elemanlarıdır. Kemokinler glikoprotein yapıda olup TB enfeksiyonunun da rol oynamaktadır. İnsan makrofajları, MTB ile karşılaşmaları durumunda birçok kemokin üretmektedir (Widdison ve diğ., 2007).

Kemokinler, inflamasyon yerleri ve merkezi sinir sistemindeki hücrelerin hareketinde, hayati öneme sahiplerdir. Kemokin genleri kromozomun 17q11.2- q12 üzerindedir. Bugeja ve arkadaşları multiple sklerozis (MS) hastalığı ile kemokin genleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Avusturyalı MS hastalarında 12 aday SNP' yi genotiplendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda CCL2 ve CCL11 genlerindeki 4 SNP'nin hastalıkla ilişkili olduğunu görmüşlerdir (Bugeja ve diğ., 2006). Bizim yaptığımız çalışmada ise CCL1 genindeki rs159294 T/A SNP'sinin TB hastalığına yakalanmada istatistiksel olarak bir risk oluşturmadığını belirledik.

Thuong ve arkadaşlarının latent, pulmoner ve menenjit TB' li 273 hasta ve 188 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunu kullanarak yaptıkları bir çalışmada; CCL1 geni içerisindeki rs10491110, rs3091324, rs2072069, rs159319, rs3138031, rs159290, rs159291 ve rs159294 SNP'lerinin TB ile ilgili olup olmadığını araştırmışlar (Thuong ve diğ., 2008) ve bizim çalıştığımız polimorfizm olan rs159294 T/A polimorfizminin istatistiksel olarak TB ye yatkınlık oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmaları sonucunda T allel frekansını toplam TB'li hastalarda 0.82, pulmoner TB'li hastalarda 0.79, A allel frekansını toplam TB'li hastalarda 0.19, pulmoner TB'li hastalarda 0.21 olarak belirlemişlerdir. Çalışmamız sonucunda T allel frekansını toplam TB'li hastalarda 0.19, pulmoner TB'li hastalarda 0.15, A allel frekansını toplam TB'li hastalarda 0.81, pulmoner TB'li hastalarda 0.85 olarak tespit ettik. Thuong ve arkadaşlarının allel frekansları, bizim allel frekanslarımız ile karşılaştırıldığında, T allel frekanslarının bizim belirlediğimiz T allel frekanslarına göre

oldukça yüksek, A allel frekanslarının bizim belirlediğimiz A allel frekanslarına göre de oldukça düşük olduğunu görmekteyiz. A alleli polimorfik allel olup çalıştığımız popülasyonda yaygın olarak görülmektedir. Thuong ve arkadaşlarının çalıştıkları popülasyonda polimorfik A allel sıklığının oldukça düşük olduğunu görmekteyiz. Allel sıklığındaki bu farklılık istatistik sonuçlarını etkilemektedir.

Biz çalışmamızda CCL1 genindeki rs159294 T/A polimorfizminin TB' ye yakalanma da istatistiksel olarak bir risk oluşturmadığını belirledik. Bunun nedeninin CCL1 genindeki rs159294 T/A polimorfizm sıklığının, popülasyonlarda farklılık gösteriyor olması olabilir. Nitekim yapılan çalışma ile kendi çalışmamızdaki allel frekanslarını karşılaştırdığımızda atasal allel olan T'nin hem toplam TB'li hastalarımızda hem de pulmoner TB'li hastalarımızda, yapılan çalışmaya göre daha düşük oranlarda olduğunu görmekteyiz. Farklı toplumlarda, farklı etnik kökene sahip popülasyonlardaki polimorfizmlerin, aynı hastalık için bir risk faktörü oluşturmadığı da bilinmektedir. Aynı polimorfizmin, farklı etnik kökene sahip popülasyonlarda aynı hastalığa karşı bir risk faktörü oluşturmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Thuong ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 273 hasta, 188 sağlıklı birey kullanmışlar ve CCL1 genindeki rs159294 T/A polimorfizminin TB' ye yakalanmada istatistiksel olarak bir risk oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamız 160 TB'li hasta ve 160 kontrol grubu ile yapılmış olup hasta ve sağlıklı bireylerin sayısı birbirine eşittir. Çalışmamızı hasta bireylerin sayısını arttırarak ya da, kontrol grubundaki birey sayısını azaltarak, yapmamız durumunda daha farklı bir sonuçla karşılaşılabilir. Hasta sayısının arttırılması çalışmanın sonucunu değiştirebilir.

Kronik akciğer hastalıklarının şiddetlenmesi önemli bir ölüm nedenidir. Hastadaki SNP' ler bu kronik rahatsızlığın şiddetlenmesine katkıda bulunabilir. Takabatake ve arkadaşları Japonya' da 276 erkek kronik akciğer rahatsızlığı bulunan hastalarda CCL11, CCL1 ve CCL5 geni üzerindeki 4 SNP'nin kronik akciğer hastalıkları üzerine etkisini araştırmışlar ve çalışma sonucunda CCL1 gen polimorfizminin hastalığın şiddetlenmesi ile ilgili olduğunu bulmuşlardır (Takabatake ve diğ., 2006).

Yukarı da bahsettiğimiz çalışmalarda, CCL1 gen polimorfizmlerinin çalışılan farklı hastalıklar ile ilişkili olduğu görülmektedir. Çalışmamız da, CCL1 genin de farklı bir polimorfizmin, TB hastalığı ile ilişkili olup olmadığını araştırdık. CCL1 rs159294 T/A polimorfizminin, istatistiksel olarak TB hastalığı ile anlamlı bir ilişkisinin olmadığını tespit ettik. Literatür bulguları ile çalışmamızın sonucunun farklı olmasının nedeni, aynı

polimorfizmin çalışılmamış olması, çalışılan polimorfizmin farklı bir hastalık üzerinde etkili olup olmadığının araştırılmış olması olabilir. Ayrıca aynı polimorfizim, aynı hastalık üzerinde, etnik kökenleri farklı olan populasyonlarda bazen hastalık ile istatistiksel olarak ilişkili iken, bazen de ilişkili olmayabilir. Bu durumu çalışılan hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin sayılarındaki farklılık ya da polimorfik allelin görülme sıklığı ile açıklanabilir. Çalışmamızda CCL1 geni için, kontrol grubunun genotip dağılımının istatistiksel olarak Hardy-Weinberg dengesi içinde olmaması istatistik sonuçlarını etkilemiş olabilir. Thuong ve arkadaşları mikroarray hibridizasyon, real time PCR tekniklerini kullanarak çalışmışlardır. Biz ise RFLP tekniğini kullandık, kullanılan tekniğin farklı olması çalışma sonucunu etkileyebilir.

P2X<sub>7</sub> reseptörleri, insan makrofajlarını indükleyerek MTB'nin ölümünü aktive etmektedir. P2X<sub>7</sub> genindeki A1513C polimorfizmi makrofajların indüklenmesini azaltarak, MTB ölümünü azaltmaktadır. Fernando ve arkadaşlarının kuzeydoğu Asya kökenli TB hastaları ile yaptıkları bir çalışmada, P2X<sub>7</sub> genindeki A1513C polimorfizminin ekstrapulmoner TB ile ilişkili olduğunu, bu polimorfizmin MTB'nin makrofajlar tarafından öldürülme kapasitesini azalttığını belirtmişlerdir (Fernando ve diğ., 2007).

Mokrousov ve arkadaşlarının 190 TB'li hasta ve 128 kontrol grubunu kullanarak, Rusya'nın St Petersburg bölgesinde, Slav popülasyonu ile yaptıkları çalışmada, P2X<sub>7</sub> genindeki 762 C/T ve A1513C SNP'lerini çalışmışlar; Çalışmaları sonucunda A1513C polimorfizmi için, TB'li hastaların 120'sinde (%63.8) AA genotipini, 59'unda (%31.4) AC genotipini, 9'unda (%4.8) da CC genotipini, kontrol grubunu oluşturan bireylerin 96'sında (%76.2) AA genotipini, 27'sinde(%21.4) AC genotipini, 3'ünde (%2.4) de CC genotipini tespit etmişlerdir. A1513C polimorfizminin Slav popülasyonu için TB hastalığına yakalanma da istatistiksel olarak bir risk faktörü olabileceğini ancak 762 C/T polimorfizminin, Slav popülasyonu için TB hastalığında istatistiksel olarak bir risk oluşturmadığını belirtmişlerdir (Mokrousov ve diğ., 2008).

Ben Selma ve arkadaşları Tunus' ta yaptıkları bir çalışmada, P2X<sub>7</sub> genindeki A1513C ve 762 C/T polimorfizmlerinin TB'ye yakalanmada istatistiksel olarak bir risk faktörü olup olmadığını araştırmışlar, 168 pulmoner TB, 55 ekstrapulmoner TB ve 150 tane sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada A1513C polimorfizmi için TB'li hastaların, 149'unda (%67) AA genotipini, 57'sinde (%25) AC genotipini, 17'sinde (%8) de CC genotipini, kontrol grubunu oluşturan bireylerin 104'ünde (%69) AA genotipini, 40'ında (%27) AC genotipini, 6'sında (%4) da CC genotipini tespit etmişlerdir.

P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizminin Tunus popülasyonunda ekstrapulmoner TB'nin oluşmasına katkısı olabileceğini belirtirken, 762 C/T polimorfizminin TB hastalığı ile bir ilişkisinin olmadığını vurgulamışlardır ( Ben-Selma ve diğ., 2011).

NRAMP1/SLC11A1 ve P2X<sub>7</sub> genleri bazı Afrika ve Asya popülasyonları için TB hastalığına yakalanma riskini arttırmaktadır. Moreno ve arkadaşları Meksika'lı TB hastaları ile yaptıkları bir çalışmada, 94 TB hastası ve 110 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu kullanarak çalışmış, NRAMP1/SLC11A1 gen polimorfizminin Meksika popülasyonu için TB hastalığına yakalanma da bir risk faktörü oluşturmadığını, aynı şekilde; P2X<sub>7</sub> 762 C/T polimorfizminin de TB'ye yakalanma da bir risk faktörü oluşturmadığını tespit etmişlerdir (Moreno ve diğ., 2007). Ancak P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizminin Meksika popülasyonu için TB'ye yakalanma ile önemli derecede ilgili olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmaları sonucunda A1513C polimorfizmi için TB hastalarının 53'ünde AA genotipini, 33'ünde AC genotipini, 8'inde de CC genotipini, kontrol grubunu oluşturan bireylerin 70'inde AA genotipini, 38'inde AC genotipini, 2'sinde de CC genotipini belirlemişlerdir.

Xiao ve arkadaşlarının Çin Han popülasyonu ile yaptıkları bir çalışmada 96 TB' li hasta( 41 pulmoner TB, 55 ekstrapulmoner TB) ve 384 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu kullanıp, P2X<sub>7</sub> A1513C ve 762 C/T polimorfizmi ile TB hastalığı arasındaki ilişkiyi araştırmışlar; araştırmaları sonucunda A1513C polimorfizmi için 96 TB'li hastanın 51'inde (%53.1) AA genotipini, 37'sinde (%38.5) AC genotipini, 8'inde (%8.3) CC genotipini, 41 pulmoner TB'li hastanın 21'inde (%51.2) AA genotipini, 18'inde (%43.9) AC genotipini, 2'sinde (%4.9) CC genotipini, 55 ekstrapulmoner TB'li hastanın 30'unda (%54.5) AA genotipini, 19'unda (%34.5) AC genotipini, 6'sında (%10.9) CC genotipini, 384 kişiden oluşan kontrol grubunun 221'inde (%57.6) AA genotipini, 119'unda (%31.0) AC genotipini, 44'ünde (%11.5) de CC genotipini tespit etmişlerdir. Her iki polimorfizmin de Han popülasyonu için TB'ye yakalanmada istatistiksel olarak bir risk faktörü oluşturmadığını belirtmişlerdir (Xiao ve diğ., 2008). Bu bulgu çalışmamız ile örtüşmekte olup, aynı polimorfizmin, aynı hastalık üzerinde, farklı popülasyonlarda bazen bir risk faktörü olup bazen de olmadığını göstermektedir.

Mokrousov ve arkadaşları 190 TB'li hasta ve 128 kişiden oluşan kontrol grubu ile Ben-Selma ve arkadaşları 223 TB'li (168 pulmoner TB, 55 ekstrapulmoner TB) hasta ve 150 kişiden oluşan kontrol grubu ile çalışmış ve P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizminin TB'ye yakalanmada kendi çalıştıkları popülasyon için yatkınlık oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Oysaki Xiao ve arkadaşları 96 TB'li (41 pulmoner TB, 55 ekstrapulmoner TB) hasta ve 384 kişiden oluşan kontrol grubunu kullanarak çalışmışlar ve P2X7 A1513C polimorfizminin Çin Han populasyonu için TB'ye yakalanmada bir risk faktörü oluşturmadığını belirtmişlerdir. Bulunan sonuçların birbirinde farklı olmasının nedenini çalışılan hasta ve kontrol grubunu oluşturan birey sayılarının farklı olmasına, genotip yüzdelерinin farklı oranlarda bulunmasına bağlayabiliriz. Nitekim Mokrousov ve arkadaşları ile Ben –Selma ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda kullanılan hasta sayısı kontrol grubunu oluşturan bireylere göre daha azdır. Fakat Xiao ve arkadaşları çalışmalarında hasta sayısını az, kontrol grubunu oluşturan bireyleri daha fazla tutarak çalışmışlar ve P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizminin Han populasyonu için TB'ye yakınlık oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda 160 TB'li ( 71 pulmoner TB, 89 ekstrapulmoner TB) hasta ve 160 kişiden oluşan kontrol grubu kullanarak çalıştık, P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizminin Elazığ yöresinde TB'ye yakınlık oluşturup oluşturmadığını araştırdık ve bu polimorfizmin TB'ye yakalanmada Elazığ yöresi için istatistiksel olarak bir risk faktörü oluşturmadığını tespit ettik. Yukarıda ki bilgiler ışığında kullanılan hasta sayısının ve genotip frekanslarının çalışma sonuçlarını etkilediğini düşünmekteyiz. TB'nin pulmoner veya ekstrapulmoner olması, ekstrapulmoner TB hastalarının dağılımının farklılık arzemesi de çalışma sonuçlarını etkilemiş olabilir. Ayrıca farklı toplumlarda, farklı etnik kökene sahip populasyonlarda aynı polimorfizmin, aynı hastalık için bir risk faktörü oluşturmadığı da bilinmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda, aynı polimorfizmler, farklı toplumlarda, TB hastalarında, daha fazla TB hastası ve kontrol grubu ile çalışılarak, pulmoner ve ekstrapulmoner TB hasta sayısı ve ekstrapulmoner TB hastalarının dağılımları birbirine çok yakın tutularak, verilerimizin daha fazla araştırmayla destekleneceği inancındayız.

## 5. ÖNERİLER

Son zamanlarda insan genomundaki doğal genetik varyasyonlar, bunların klinik ve fonksiyonel önemleriyle ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu ilerlemeler bize bazı multifaktöriyel hastalıkların oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan genetik faktörlerin anlaşılmasında yol gösterici olacaktır. İnsan genomunda polimorfizmlerin çoğu fonksiyonel olarak nötraldir. Yani, genin oluşturduğu protein yapısını ya da fonksiyonunu etkilemezler. Bununla birlikte bazı polimorfizmler gen yapısındaki kodlayıcı alanları ya da düzenleyici bazı dizileri etkileyerek gen transkripsiyonu, mRNA stabilitesi, RNA uç birleştirme, protein yapısı ve fonksiyonunu etkileyebilmektedirler. Böyle değişiklikler hastalık yatkınlığını ve ciddiyetini artırma ya da azaltma, tedaviye cevap ve ilacın yan etkilerine karşı hassasiyet gibi farklı klinik etkiler ortaya çıkarabilirler (Balasubramanian ve diğ., 2004).

Polimorfizmlerin değerlendirilmesinde kullanılan restriksiyon enzim uzunluk polimorfizm yöntemi, gerçek zamanlı PCR gibi yöntemlerin gelişmesine rağmen halen spesifik, hızlı ve diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha ekonomik bir şekilde polimorfizm ve mutasyonların tespitini sağlamaktadır. Çalışmamızda seçilen polimorfizmlerin değerlendirilmesinde RFLP yöntemi kullanılmış ve tüm değerlendirilen polimorfizmler başarı ile genotiplendirilmiştir.

Hekimler TB tanısı koydukları hastalarında, hasta genotipini göz önünde bulundurabilirler. Çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda; araştırmacılar, CCL1 genindeki rs10491110, rs3091324, rs2072069, rs159319, rs3138031, rs159290, rs159291 polimorfizmleri, P2X<sub>7</sub> genindeki T762C polimorfizmini veya farklı polimorfizmlerin TB'ye yatkınlık oluşturup oluşturmadığını araştırabilir, CCL1 rs159294 T/A ve P2X<sub>7</sub> A1513C polimorfizmlerini Elazığ yöresi dışındaki farklı populasyonlarda, daha fazla sayıda hasta ve kontrol grubu kullanarak çalışabilir, TLR2, TLR8, PTPN22 gibi TB ile ilişkili olduğu bilinen genlerde, farklı polimorfizmler, Elazığ yöresinde veya farklı bölgelerde TB'ye yakalanmada yatkınlık oluşturup oluşturmadığını araştırılabilir.

## KAYNAKLAR

- Akın, H., 2003, Tıbbi genetik terimleri sözlüğü, Sendrom III 1(1), 17s.
- Alataş, F., 1997, Tüberkilin deri testi, Anadolu solunum derneği, Eskişehir, 57-70s.
- American Thoracic Society, 1995, Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis, Am J Respir Care Med, 149, 264-267.
- American Thoracic Society, 2000, Diagnostic standarts and clasification of tuberculosis in adults and children, Am J Respir Crit Care Med, 161, 1376-1395.
- Amp FISTR1 profiler plus TM user Manual, 2003, PE Corporation, USA, 13p.
- Applied Biosystems, 2001, AmpFISTR identifiler PCR Amplification Kit User's Manual, Faster City, CA, P/N 4322288.
- Balasubramanian, S.P., Cox, A., Brown, N.J., Reed, M.W., 2004, Candidate gene polymorphisms in solid cancers, Eur J Surg Oncol, 30(6), 593-601.
- Barış, Y.İ., 1995, Solunum hastalıkları temel yaklaşım 2.Baskı, Türkiye akciğer hastalıkları vakfı yayınları, İstanbul, 147-234.
- Barış, Y.Z., 2003, Çağlar Boyu Tüberküloz, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Samsun, 1-7s.
- Barnes, P.F., Cave, M.D., 2003, Molecular epidemiology of tuberculosis, N. Engl. J Med, 349, 56-1149.
- Ben-Selma, W., Ben-Kahla, I., Boukadida, J., Harizi, H., 2011, Contribution of the P2X<sub>7</sub> 1513 A/C loss of function polymorphism to extrapulmonary tuberculosis susceptibility in Tunisian populations, FEMS Immunol Med Microbiol, 1-8.
- Berrington, W.R., Hawn, T.R., 2007, Mycobacterium tuberculosis, macrophages and the innate immune response does common variation matter, Immunol Rev, 219, 86-167.
- Bottasso, O., Bay, M.L., Basedovsky, H., 2007, The immuno endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis, Scand J Immunol, 66, 166-175.
- Brookes, A.J., 1999, The essence of SNPs, Gene, 234(2), 86-177.
- Bugeja, M.J., Booth, D., Bennetts, B., Heard, R., Rubio, J., Stewart, G., 2006, An investigation of polymorphisms in the 17q11.2-12 CC chemokine gene cluster for association with multiple sclerosis in Australians, BMC Medical Genetics, 7, 64, 1-12.

- Cabrini, G., Falzoni, S., Forchap, S.L., Pellegatti, P., Balboni, A., Agostini, P., Cuneo, A., Castoldi, G., Baricordi, O.R., Di Virgilio, F., 2005, A His-155 to Tyr polymorphism confers gain of function to the human P2X<sub>7</sub> receptor of human leukemic lymphocytes, *J Immunol*, 175, 9-82.
- Casanova, J., Abel, L.L., 2002, Genetic dissection of immunity to mycobacteria the human model, *Annu Rev Immunol*, 20, 581-620.
- Clinical and Laboratory standards Institute (CLSI), 2007, Laboratory detection and Identification of Mycobacteria, Proposed Guideline, CSLI document, USA, 48p.
- Collins, F.S., Brooks, L.D., Chakravarti, A., 1998, A DNA polymorphism discovery research for research on human genetic variation, *Genome Res*, 8(12), 1229-1260.
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Koscovilbois M., North, R.A., Buell, G., 1997, Tissue distribution of the P2X<sub>7</sub> receptor, *Neuropharmacology*, 36, 1277-1360.
- Cooke, G.S., Hill, A.V., 2001, Genetics of susceptibility to human infectious disease, *Nat Rev Genet*, 2, 77-967.
- Corder, E.H., Jaunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., 1993, Gene dose of apolipoprotein E type 4 alele and the risk of alzheimer's disease in late onset families, *Science*, 261, 921-924.
- Crevel, R., Ottenhoff, T.H., Meer, J.W., 2002, Innate immunity to mycobacterium tuberculosis, *Clin Microbiol Rev*, 15, 294-309.
- Daniel, T. M., 1997, The story of tuberculosis, Universty of Rochester Pres, 7-8.
- Dannenber A.M.J., 1995, Patogenez ve immünoloji, Bilimsel ve teknik yayınları çevirivakfı, İstanbul, 13-29s.
- Dannenber, A.M., Tomashefski, F.J., 1998, Patogenezisof pulmonary tuberculosis, Fishman's pulmonary diseases and disorders, McGraw-Hill, New York, 2447-2471p.
- Dannenber, A.M.J., 1989, Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis, *Rev Infect Dis*, 11, 369-378.
- Deligezer, U., Akışık, E.E., Dalay, N., 2004, The application of the lightcycller fluoresecence PCR in polymorphism analysis, Investigation of the Mthfr C677T polymorphism in childhood and adult patients with myeloid leukemia, *Türk Onkoloji Dergisi*, 19, 4.
- Deniz, Ö., Yüksekol, İ., Çiftçi, F., Demirci, N., 2001, Tüberküloz plörezisinin ayırıcı tanısında interferon gamanın tanısal değeri, *GATA Tıp dergisi*, 43, 122-126.

- Denlinger, L.C., Fiset, P.L., Sommer, J.A., Watters, J.J., Prabhu, U., Dubyak, G.R., Proctor, R.A., Bertics, P.J., 2001, Cutting edge the nucleotide receptor P2X<sub>7</sub> contains multiple protein and lipid interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide, *J Immunol*, 167, 1871-1877.
- Devrim, A.K., Kaya, N., 2003, Genetik polimorfizm ve mikrosatellitler, *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, 10, 215-220.
- Evans, W.E., Relling, M.V., 1999, Translating functional genomics into rational therapeutics, *Science*, 286, 487-91.
- Fernando, S.L., Saunders, B.M., Sluyter, R., Skarratt, K.K., Goldberg, H., Marks, G.B., Wiley, J.S., Britton, W.J., 2007, A polymorphism in the P2X<sub>7</sub> gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med.*, 175, 360-366.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., Di Virgilio, F., 2006, The P2X<sub>7</sub> receptor a key player in IL-1 processing and release, *J Immunol*, 176, 3877-3960.
- Ferrer, J., 1997, Pleural tuberculosis, *Eur Respir J*, 10, 942-947.
- Forsberg, L., De Faire, U., Marklund, S.L., Andersson, P.M., Stegmayr, B., Morgenstern, R., 2000, Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase, *Blood Cells Mol Dis*, 26(5), 423-426.
- Fraser, R.S., Müller, N.L., Colman, N., Pare, P.D., 1999, Diagnosis of the diseases of the chest, Fourth edition, Saunders company, Philadelphia, 798-848p.
- Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J., 2003, Dye tuberculosis, *Lancet*, 362, 887-986.
- Glassroth, J., 1993, Diagnosis of tuberculosis, lung biology in health and disease, Elsevier Science Health Science, Baltimore, 43, 149-165.
- Global tuberculosis control surveillance, planning, financing WHO report, 2007, World Health Organization, WHO/HTM/TB, 376.
- Gu, B.J., Zhang, W., Worthington, R.A., Sluyter, R., Dao-Ung, P., Petrou, S., Barden, J.A., Wiley, J.S., 2001, A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X<sub>7</sub> receptor, *J Biol Chem*, 276, 11135-11177.
- Gümüş, S., 2005, Akciğer grafisine göre tüberküloz kuşkusu olan yayma negatif hastalarda bronş lavajı ve transbronşial biyopsinin tanısal değeri, uzmanlık tezi, GATA Tıp fakültesi, 46s.

- Haas, D.W., Des Prez, R.M., 2000, Principles and practice of infectious diseases 5th edition, 2596-2608.
- Haas, W.D., Des Prez, R.M., 1995, Mycobacterial diseases, 4th edition, Churchill Livingstone, New York, 2213-2243p.
- Hajeer, A.H., 2000, TNF- $\alpha$  gene polymorphism, Clinical and Biological Implications, 50(3), 28-216.
- Hawn, T.R., Dunstan, S.J., Thwaites, G.E., Simmons, C.P., Thuong, N.T., Lan, N.T., 2006, A polymorphism in toll interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis, J Infect Dis, 94, 1127-1134.
- İmecik, O., 1998, Tüberküloz Tedavi İlkeleri, Toraks Derneği İkinci Yıllık Kongresi, Tüberküloz Kursu Notları, 1-5.
- Jacobson, K.A., Jarvis, M.F., Williams, M., 2002, Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets, J Med Chem, 45, 4057-4150.
- Kıyan, M., Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T., Ustaçelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., 1999, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara Güneş Kitabevi, Ankara, 419-454s.
- King, B.A., Nicholson, T., 2003, Nucleotide and nucleoside receptors, Tocris Reviews, 23.
- Le, Y., Hou, Y., Iribarren, P., Wong, J.M., 2004, Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease, Molecular Immunology, 1(2), 95-104.
- MacMicking, J.D., Taylor, G.A., McKinney, J.D., 2003, Immune control of tuberculosis by IFN-gamma inducible, Science, 302, 654-659.
- Mahley, R.W., 1988, Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology, Science, 240, 622-630.
- McLeod, H.L., Evans, W. E., 2001, Unlocking the human genome for better drug therapy, Annu. Rev. Pharmacol Toxicol, 41, 101-122.
- Miller, R.D.P., Taillan, M., Kwok, P.Y., 2001, Regions of low single nucleotide polymorphism incidence in human and orangutan Xq, Genomics, 71, 78-88.
- Mokrousov, I., Sapozhnikova, N., Narvskaya, O., 2008, Mycobacterium tuberculosis co-existence with humans: making an imprint on the macrophage P2X<sub>7</sub> receptor gene, Journal of Medical Microbiology, 57, 581-584.

- Moreno, P.N., Perez, D.P., Castro, B.H., Cervantes, L.P., Meraz, V.F., Baranda, L., Gomez, A.G., Alonzo, V.A., Granados, J., Amaro, R.G., 2007, P2X<sub>7</sub> and NRAMP1/SLC11A1 gene polymorphisms in Mexican metizo patients with pulmonary tuberculosis, *Clinical and Experimental Immunology*, 148, 469-477.
- Murray, J.F., Nadel, J.N., 1994, *Textbook of respiratory medicine*, W.B Saunders company, New York, 245-276p.
- Narayanan, S., 2004, Molecular epidemiology of tuberculosis, *Indian J Med Res*, 120, 47-233.
- Nomiyama, H., Mera, A., Ohneda, O., Miura, R., Suda, T., Yashie, O., 2001, Organization of the chemokine genes in the human and mouse major clusters of CC and CXC Chemokines diversification between the two species, *Genes and Immunity*, 2, 110-113.
- North, R.A., 2002, Molecular physiology of P2X receptors, *Physiol Rev*, 82, 67-1013.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Boerkoel C.F., 2005, *Thompson and Thompson Tıbbi genetik*, Güneş kitapevi, Ankara, 313-330s.
- Ono, S.J., Nakamura, T., Miyazaki, D., 2003, Chemokines roles in leukocyte development, trafficking, effector function, *Biogen Inc*, 45, 168-177.
- Ottenhoff, T.H., Verreck, F.A., Hoeve, M.A., Vosse, E., 2005, Control of human host immunity to mycobacteria tuberculosis, 85, 53-64.
- Özbal, Y., 2006, *Tüberküloz İmmünolojisi*, Erciyes Tıp Dergisi, 28(1), 25-34.
- Özemi, M., 1991, *Plevra tüberkülozu, Tüberküloz kliniği ve kontrolü 1. Baskı*, Adana, 151-154s.
- Özkara, Ş., Aktaş, Z., Özkan, S., Ecevit, H., 2003, *Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı*, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, 33-35s.
- Pfyffer, G.E., Brown, B.A., Swenson, J.M., Wallace, R.J., 2003, General characteristics, isolation and staining procedures, *Manuel of Clinical Mikrobiology*, 8, 532-59.
- Rassendren, F., Buell, G., Virginio, C., Collo, G., North, R.A., Surprenant, A., 1997, The permeabilizing ATP receptor P2X<sub>7</sub> cloning and expression of a human cDNA, *J Biol Chem*, 272, 5482-5488.
- Sachidanandam, R., 2001, A Map of human genome sequence variation containing, *Nature*, 409, 928-933.
- Sadee, W., 1999, *Pharmacogenomics*, 319, 1286.

- Sarmiento, O.L., Weigle, K.A., Alexander, J., Weber, D.J., Miller, W.C., 2003, Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis, *S. Clin Microbiol*, 41, 3233-3273.
- Schachter, F., Faure, L., Guenot, F., Rouger, H., Froguel, P., Lesueur, L., 1994, Genetics associations with human longevity at the APOE and ACE Loci, *Nat Genet*, 6, 29-32.
- Schlossberg, D., Tetikkurt, C., 1995, *Tüberküloz*, Bilimsel ve teknik yayınları çeviri vakfı, İstanbul, 38-46s.
- Schulger, N.W., 2005, The pathogenesis of tuberculosis, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32, 251-256.
- Schulger, N.W., Rom, W.N., 1994, Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med*, 149, 264-267.
- Sironi, M., Martinez, F.O., Ambrosio, D.D., 2006, Different regulation of chemokine production by Fc $\gamma$  receptor engagement in human monocytes, *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 342-349.
- Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Esquifino, A.I., Perumal, S.R., Miller, S.C., 2005, Melatonin immune function and aging, *Immun Ageing*, 29, 17-29.
- Stoneking, M., 2001, Single nucleotide polymorphisms from the evolutionary past, *Nature*, 15, 821-822.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., Buell, G., 1996, The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor, *Science*, 272, 735-743.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı, 2007, *Türkiye’de Verem Savaşı 2007 Raporu*, Ankara.
- Takabatake, N., Shibata, Y., Abe, S., Wada, T., Machiya, J., Igarashi, A., Tokairin, Y., Ji, G., Sato, H., Sata, M., Takeishi, Y., Emi, M., Muramatsu, M., Kubota, I., 2006, A single nucleotide polymorphism in the CCL1 gene predicts acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med*, 174, 875-885.
- Thuong, N.T.T., Dunstan, S., Chau, T.T.H., Thorsson, V., Simmons, C.P., Quyen, N.T.H., Thwaites, G.E., Lan, N.T.N., Hibberd, M., Teo, Y.Y., Seielstad, M., Aderem, A., Farrar, J.J., Hawn, T.R., 2008, Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles, *PLOS Pathogens*, 4(12), 1-13.

- Utermann, G., Langenbeck, U., Beisiegel, U., Weber, W., 1980, Genetics of the apolipoprotein E system in man, *Hum Genet*, 32, 339-347.
- Uzun, Ö., Ünal, S., 2002, Güncel Bilgiler Işığında Enfeksiyon Hastalıkları, *Bilimsel Tıp Yayınevi*, 2, 821-854.
- Ülküer, Ü., Kurtuluş- Ülküer, M., Elma, C., Kesici, T., Menevşe, S., 2004, Short tandem repeat (STR) polymorphism in Turkish population, *Journal of Genetics*, 83, 11-12.
- Weisgraber, K.H., Rall, S.C.J., Mahley, R.W., 1981, Human E apolipoprotein heterogeneity. cysteine- arginine interchanges in the aminoacid sequence of the ApoE isoforms, *J Biol Chem*, 256, 9077-9083.
- WHO, Global DOTS plan, Progress in TB control in high burden countries, 2001, World Health Organization, WHO/CDC/TB, 11.
- Widdison, S., Watson, M., Piercy, J., Howard, C., Coffey, T.J., 2007, Granulocyte chemotactic properties of *M. tuberculosis* versus *M. bovis* infected bovine alveolar macrophages, *Molecular Immunology*, 45, 740-749.
- Wiley, J.S., Dao-Ung, L.P., Li, C., Shemon, A.N., Gu, B.J., Smart, M.L., Fuller, S.J., Barden, J.A., Petrou, S., Sluyter, R., 2003, An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X<sub>7</sub> receptor, *J Biol Chem*, 278, 17108-17121.
- Wilson, P.W., Schaefer, E.J., Larson, M.G., Ordovas, J.M., 1996, apolipoprotein E aleles and risk of coronary disease, a meta analysis arterioscler thromb, *Vasc Biol*, 16, 1250-1255.
- World Health Organization, 2002, stop TB, Communicable diseases, an expanded DOTS framework for effective tuberculosis control, 297.
- Xiao, J., Sun, L., Jiao, W., Li, Z., Zhao, S., Li, H., Jin, J., Jiao, A., Mokroussou, I., 2009, Lack of association between polymorphism in the P2X<sub>7</sub> gene and tuberculosis in a chinese han population, *Immunol Med Microbiol*, 55, 107-111.
- Yazıcıoğlu, S., 1981, Tüberküloz Teşhis ve Tedavisi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1-112.
- Yeğın, O., 2007, Tüberküloz immünitesi, *Çocuk Enf Derg*, özel sayı 1, 15-22.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., 2007, Moleküler Biyoloji, Nobel Yayıncılık, Ankara, 48s.

- Zhang, Z.H., Chen, F., Zhang, X.L., Jin, Y., Bai, J., Fu, S.B., 2008, PTPN22 allelepymorphisms in 15 chinese populations, *Int J Immunogenet*, 35(6), 433-440.
- Zhou, G., Kamahori, M., Okan, K., Chuan, G., Harada, K., Kambara, H., 2001, Quantitative detection of single nucleotide polymorphisms for a pooled sample by a bioluminometri, Assay coupled with modified primer extension reactions, *Nucleic Acids Res*, 29, 123-129.
- Zhu, X.W., Friedland, S.J., 2006, Multinucleate giant cells and the control of chemokine secretion in response to *Mycobacterium tuberculosis*, *Clinical Immunology*, 120, 10-20.

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladıktan sonra 1997 yılında İnönü üniversitesi eğitim fakültesi biyoloji öğretmenliği bölümünü kazandım. 2001 yılında buradan fakülte ve bölüm birincisi olarak mezun oldum. 2004-2007 yılları arasında Yüzüncü Yıl üniversitesinde yüksek lisansımı yaptım. 2007 yılında Fırat üniversitesi biyoloji bölümünde doktora başladım. Elazığ Kaya Karakaya Anadolu lisesinde biyoloji öğretmenliği yapmakta olup evliyim.