



**BÖBREK NAKLİ OLAN HASTALARDA ORGAN REDDİNDE AT1R /
SİTOKİN GEN POLİMORFİZM İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Emel YANTIR

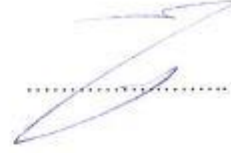
**DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2018

Emel YANTIR tarafından hazırlanan "Böbrek nakli olan hastalarda organ reddinde ATIR / sitokin gen polimorfizm ilişkisinin araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

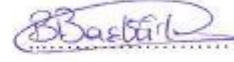
Danışman: Prof. Dr. Vedat BULUT
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan: Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK
İmmünoloji Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Prof. Dr. Dicle GÜÇ
Temel Onkoloji ABD/Tümör Biyoloji ve İmmünolojisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Prof. Dr. Cemalettin AYBAY
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 04/01/2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Emel YANTIR

04.01.2018

BÖBREK NAKLİ OLAN HASTALARDA ORGAN REDDİNDE AT1R / SİTOKİN GEN POLİMORFİZM İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Emel YANTIR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2018

ÖZET

Böbrek nakli son dönem böbrek yetmezliğinin tedavisinde altın standart olarak önemini korumaktadır. Transplantasyon immünolojisi araştırmaları ile geliştirilen tanı ve tedavide yeni yaklaşımlar, günümüzde başarı oranlarını artırmıştır. Fakat halen tam uyumlu vericide bile rejeksiyon gözlenmesi başka faktörleri araştırmayı gerektirmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalarda non-HLA antikorlardan AT1R-Ab varlığının rejeksiyon ile ilişkisi gündeme gelmiştir. Çalışmamızda AT1R-Ab varlığının rejeksiyona etkisini, sitokin polimorfizmi ile AT1R-Ab varlığının etkileşimini ve bunların rejeksiyona olan katkısını araştırdık. Bu amaçlı 50 sağlam kontrol, pediatrik ve erişkin olmak üzere toplam 100 böbrek nakli yapılmış olan hasta çalışmaya dâhil edilerek PCR-SSP ile TGF- β , TNF- α , İL-6, İL-10, İFN- γ sitokinlerinin gen polimorfizmleri ve ELISA ile AT1R-Ab düzeyleri çalışıldı. Veriler SPSS programı ile değerlendirildi. Çalışmanın sonucunda nakil sonrası rejeksiyon gözlenen hastalarda AT1R-Ab düzeylerinin kontrol grubuna ve nakil sonrası istikrarlı seyreden hasta grubuna göre istatistiksel anlamlı bir ilişkisi olmadığı, çalışılan sitokin gen polimorfizmlerinin rejeksiyon ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi olmadığı görüldü. Fakat TGF- β 1 C/C G/C düşük salınım gen polimorfizmi ve İL-6 G/C yüksek salınım gen polimorfizmi varlığı ile AT1R-Ab düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi. Çalışmamızın sonuçları AT1R-Ab testlerinin nakil öncesi rejeksiyonu saptamada uygun biyomarker olmadığını düşündürmektedir. Saptanan AT1R-Ab düzeyi ile sitokin gen polimorfizm ilişkisi ise RAS da etki mekanizmalarının açıklanmasına katkıda bulunabilir. Rejeksiyona katkısı bulunan diğer faktörlerin gösterilmesi için daha fazla sayıda ve daha büyük gruplarla çalışma yapılması gerekmektedir.

Bilim Kodu : 1067

Anahtar Kelimeler : Böbrek nakli, organ reddi, AT1R-Ab, sitokin gen polimorfizmi

Sayfa Adedi : 158

Danışman : Prof. Dr. Vedat BULUT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN AT1R AND CYTOKINE
GENE POLYMORPHISM IN RENAL TRANSPLANTATION

(Ph. D. Thesis)

Emel YANTIR

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2018

ABSTRACT

Renal transplantation remains a gold standard in the treatment of end-stage renal failure. New approaches in diagnosis and treatment developed by transplantation immunology surveys have increased the success rates today. However, rejections even with a fully compatible donor suggest investigation of other factors. Recent studies have shown that the presence of AT1R-Ab from non-HLA antibodies is associated with rejection. In our study, we investigated the effect of AT1R-Ab on rejection, the interaction of cytokine polymorphism with the presence of AT1R-Ab and their contribution to rejection. A total of 100 kidney transplants including pediatric and adult patients, with 50 healthy controls were included in the study following with investigation of the presence of gene polymorphisms of TGF- β , TNF- α , IL-6, IL-10 and IFN with the levels of AT1R-Ab. The data were evaluated using the SPSS program. As a result of the study, it was observed that there was no statistically significant difference in AT1R-Ab levels between the control group and the healthy patient group after transplantation and the cytokine gene polymorphisms studied were not statistically significant between groups. However, statistical significance was observed between the presence of TGF- β 1 C/C G/C low-emission gene polymorphism and the presence of IL-6 G/C high-emission gene polymorphism with AT1R-Ab level. The results of our study suggest that the AT1R-Ab test is not a suitable biomarker in detecting rejection risk before transplantation. The relationship between the level of AT1R-Ab with cytokine gene polymorphism can help to explain the mechanism of action of RAS. Further studies with larger groups are needed to demonstrate other factors that may contribute to the rejection.

Science Code : 1067

Key Words : Renal transplantation, graft rejection, AT1R-Ab, cytokine gene polymorphism

Page Number : 158

Advisor : Prof. Vedat BULUT (MD & PhD)

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başladığım andan itibaren hem bilimsel hem de kişisel gelişimimde desteklerini hep yanımda hissettiğim, eğitimde bilimsellik kadar iyi insan olmanın da gerekliliğini ve değerini öğrendiğim danışmanlarım Prof. Dr. Vedat BULUT ve Başkent Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK'e;

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimleri ile katkı sağlayan, tez izleme komitesinde yer alan Prof. Dr. Cemalettin AYBAY ve İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL başta olmak üzere tüm Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Doktora eğitimine başlamak konusunda beni yüreklendiren Dr. Serpil TAŞDELEN ve Prof. Dr. A. Emin KÜREKÇİ'ye; çalışmamı sonlandırmamda desteği ile büyük katkı sağlayan Doç. Dr. Fatih BÜYÜKCAM'a;

Çalışmalarım süresince her konuda desteklerini esirgemeyen Başkent Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı başta olmak üzere Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi yönetimine, Başkent Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Aytül NOYAN, Doç. Dr. Rüya ÖZELSANCAK ve Doç. Dr. Kenan ÇALIŞKAN'a; laboratuvar çalışmalarında özveri ile beni destekleyen Bio. Bircan KANTAROĞLU ve Bio. Miray KAVUZLU başta olmak üzere tüm Başkent Üniversitesi Adana Araştırma ve Uygulama Hastanesi İmmünoloji ve Doku Tipleme Laboratuvarı çalışanlarına;

Destekleri için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Dicle GÜÇ'e;

Çalışmalarım sırasında en büyük destekçilerim olan arkadaşlarıma, aileme ve özellikle de uzun çalışma saatleri nedeniyle çoğu zaman yanında olamadığım kızım Irmak' a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA14/329) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Emel YANTIR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR	5
2.1. Böbrek Nakli	5
2.1.1. Genel bilgiler	5
2.1.2. Böbrek naklinin tarihçesi	6
2.1.3. Böbrek naklinde alıcı-verici seçimi	7
2.1.4. Böbrek naklinde immünsüpresif tedavi	17
2.2. Böbrek Naklinde Rejeksiyon İmmünolojisi	26
2.2.1. Doğal bağışıklık sistemi ve iskemi-reperfüzyon hasarı	27
2.2.2. Kazanılmış bağışıklık sistemi	31
2.2.3. Böbrek naklinde rejeksiyonun klinik tabloları	36
2.3. Renin-Anjiotensin-Aldosteron Sistemi (RAS)	40
2.3.1. RAS tarihçesi	40
2.3.2. RAS elemanları	42
2.3.3. RAS fonksiyonları	47
2.3.4. RAS ve immünmodülasyon	49
2.3.5. Anti AT1R, önemi ve transplantasyondaki yeri	51
2.4. Sitokin Polimorfizmi	56
2.4.1. Nakil ve sitokinler	56

2.4.2.	Nakil ve sitokin polimorfizmi.....	58
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	64
3.1.	Çalışma Hazırlığı.....	64
3.1.1.	Materyal.....	64
3.1.2.	Kitler.....	64
3.1.3.	Cihazlar.....	64
3.1.4.	Kimyasallar.....	66
3.1.5.	Sarf malzemeleri.....	68
3.2.	Çalışma Grubu.....	68
3.2.1.	Çalışma etik kurul onayı ve onamlar	69
3.2.2.	Çalışma grubunun özellikleri.....	69
3.3.	Çalışma Metodu	72
3.3.1.	Kan örneği toplanması	72
3.3.2.	Kan örneklerinin saklanması ve çalışma öncesi hazırlanması	72
3.3.3.	Genomik DNA izolasyonu	72
3.3.4.	Sitokin gen polimorfizmi çalışması	73
3.3.5.	ELISA ile AT1R antikor çalışması.....	78
3.3.6.	Veri analizi	81
4.	BULGULAR.....	82
4.1.	Çalışma grubu demografik özellikleri ve rejeksiyon ilişkisi	82
4.2.	AT1R-Ab düzeyi ile hastalık seyri ilişkisi	86
4.3.	Sitokin polimorfizm ve rejeksiyon ilişkisi	89
4.4.	Sitokin polimorfizmi ve AT1R-Ab ilişkisi.....	95
5.	TARTIŞMA	98
5.1.	Böbrek naklinde AT1R-Ab ve rejeksiyon ilişkisi	98
5.2.	Böbrek naklinde rejeksiyon ile sitokin gen polimorfizm ilişkisi.....	105

Sayfa

5.2.1.	TNF- α sitokin gen polimorfizmi.....	106
5.2.2.	İL-10 sitokin gen polimorfizmi	107
5.2.3.	İL-6 sitokin gen polimorfizmi	108
5.2.4.	TGF- β 1 sitokin gen polimorfizmi.....	110
5.2.5.	İFN- γ sitokin gen polimorfizmi	111
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	114
	KAYNAKLAR.....	118
	EKLER	135
	Ek-2. Sağlıklı gönüllü onam formu	135
	Ek-3. Hasta gönüllü onam formu	139
	Ek-4. Sitokin gen polimorfizm değerlendirme formu	145
	Ek-5. Sitokin gen polimorfizm değerlendirmesi için hazırlanmış örnek form.....	146
	Ek-6. Elektroforez jel görüntülerinde sitokin gen polimorfizm varlığı.....	147

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1 ASHI skorlaması.....	11
Çizelge 2.2 Anti HLA antikor tarama test sonuçlarının yorumlanması.....	16
Çizelge 2.3 Çapraz karşılaştırma test sonuçlarının yorumlanması	16
Çizelge 2.4 İmmünolojik risk durumuna göre immünosüpresif tedavi önerileri.....	20
Çizelge 2.5 Antikor aracılı böbrek transplant patolojisi	36
Çizelge 2.6 Güncel RAS	41
Çizelge 3.1 Kullanılan kitler	64
Çizelge 3.2 Kullanılan cihazlar	64
Çizelge 4.1 Çalışma grubunun prognoz ve rejeksiyon dağılımı	82
Çizelge 4.2 Prognoz ve rejeksiyon tipine göre yaş dağılımı.....	83
Çizelge 4.3 Cinsiyete göre prognoz ve rejeksiyon tipi dağılımı.....	83
Çizelge 4.4 Yaşa göre prognoz ve rejeksiyon tipi dağılımı	84
Çizelge 4.5 Pediatrik ve erişkin hastalarda rejeksiyonun yaş ve cinsiyet ile ilişkisi	84
Çizelge 4.6 Rejeksiyon saptanan hastalarda donör özellikleri ile rejeksiyon ilişkisi	85
Çizelge 4.7 Rejeksiyonda cinsiyete göre ilişki	85
Çizelge 4.8 AT1R-Ab düzeylerinin çalışma grubuna göre dağılımı	86
Çizelge 4.9 Nakil öncesi, sonrası ve rejeksiyon sonrasında AT1R-Ab pozitiflik oranları ..	86
Çizelge 4.10 Rejeksiyon durumuna göre nakil öncesi, sonrası ve rejeksiyon. sırasındaki AT1R-Ab pozitiflik oranları.....	87
Çizelge 4.11 Cinsiyete göre nakil öncesi, sonrası ve rejeksiyon sonrası AT1R-Ab pozitifliği dağılımı.....	88
Çizelge 4.12 Cinsiyete göre sitokin polimorfizm pozitifliği dağılımı ve karşılaştırması	89
Çizelge 4.13 Yaş grubuna göre sitokin polimorfizmi dağılımı.....	90
Çizelge 4.14 Prognoza göre sitokin polimorfizm dağılımı ve karşılaştırması.....	91
Çizelge 4.15 Salınım özelliğine göre sitokin polimorfizm prognoz ilişkisi	92

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.16 Sitokin polimorfizmi salınım düzeyi/yaş grupları dağılımı.....	93
Çizelge 4.17 Sitokin polimorfizmi salınım düzeyi/cinsiyet dağılımı	94
Çizelge 4.18 Sitokin polimorfizmine göre AT1R-Ab pozitifliği dağılımı	95
Çizelge 5.1 AT1R-Ab düzeyi ile istatistiksel olarak anlamlı sitokin gen polimorfizmlerinin ilişkisi.....	112

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1 HLA haritası	10
Şekil 2.2 ABO uyumsuz nakilde alıcı desensitizasyon elemanları.....	18
Şekil 2.3 Canlı donör nakli için desensitizasyon protokolü.....	19
Şekil 2.4 Anti-A/B antikor uzaklaştırılması için aferez teknikleri	21
Şekil.2.5 Organ transplantasyonunda kullanılan tedavi ajanlarının biyolojisi	26
Şekil 2.6 Doku stresine renal epitel hücresinin kompleman cevabı için fizyolojik model..	29
Şekil 2.7 Kompleman tarafından modifiye edilen antikor bağımlı yanıt için önerilen bir mekanizma modeli	30
Şekil 2.8 Doğal bağışıklık reseptörleri ile gelişen hasar.....	30
Şekil 2.9 Greft hasarı ve iskemi reperfüzyon gelişimine karşı böbrekte gözlenen immün aktivasyon.....	31
Şekil 2.10 Rejeksiyonda kompleman aktivasyonu	35
Şekil 2.11 AT1R yapısı ve AT1R-Ab ile etkileşiminin şematik diyagramı	52
Şekil.2.12 Böbrek naklinde vasküler rejeksiyon gelişiminde AT1R/AT1R-Ab ilişkili mekanizmalar.....	53
Şekil 2.13 Rejeksiyonda AT1R'nin olası hücre içi etki mekanizması.....	54
Şekil 2.14 AT1R-Ab aracılı AT1R aktivasyonunun moleküler mekanizması	55
Şekil 2.15 Anti-AT1R/Anti-ETAR ın sistemik sklerozisli hastalardaki etkileri-1	55
Şekil.2.16 Anti-AT1R/Anti-ETAR ın sistemik sklerozisli hastalardaki etkileri-2	56
Şekil 3.1 Elektroforez jel görüntülerinin değerlendirilmesi	76
Şekil 3.2 ELISA ile AT1R-Ab testinin temeli	80
Şekil 3.3 Anti-AT1R-Ab için örnek konsantrasyon eğrisi.....	81

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1 DNA izolasyonu için kullanılan örnek tüpler	73
Resim 3.2 Hazırlanmış olan primer set tray örneği	74
Resim 3.3 PCR cihazına yerleştirme	75
Resim 3.4 Elektroforez cihazına yerleştirilmiş jel	76
Resim 3.5 Çalışılmış elektroforez jel görüntü örnekleri	77
Resim 3.6 ELISA plak yerleşimi ve planı (Plak 1)	79
Resim 3.7 ELISA plak örneği 1	79
Resim 3.8 ELISA plak örneği 2	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklamalar

μL	Mikrolitre
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
M	Mol
mm³	Milimetreküp
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng/μl	Nanogram/mikrolitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
rpm	Devir/dakika
sn	Saniye
U/μL	Ünite/mikrolitre
U/ml	Ünite/mililitre

KısaltmalarAçıklamalar

ABO	Kan grubu A, B, O
ACE	Anjiotensin dönüştürücü enzim
ACR	Akut hücrel rejeksiyon
ADH	Anti diüretik hormon
AECA	Anti endotelial hücre antikorları
AGT	Anjiotensinojen
ALG	Anti-lenfosit globulin

KısaltmalarAçıklamalar

AMR	Akut antikor aracılı rejeksiyon
Ang	Anjiotensin
anti-ETAR	Endotelin-1 tip A reseptör antikor
anti-HLA	HLA ya karşı oluşmuş antikorlar
APC	Antijen sunucu hücreler
ARBs	Ang II reseptör tip 1 blokörleri
ASHI	American Society for Histocompatibility & Immunogenetics
AT1R	Anjiotensin II tip 1 reseptör
AT1R-Ab	Anjiotensin II tip I reseptör aktivatörü antikorları: AT1R-AA
AT2R	Anjiotensin tip 2 reseptör
AT4R	Anjiotensin tip 4 reseptör
ATG	Antitimosit globulin
ATP	Adenozin trifosfat
Aza	Azathioprine
BAFF	B hücre aktive edici faktör
BCMA	B hücre maturasyon antijeni
BCR	B hücre reseptörü
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Kompleman bağımlı sitotoksiste
CNI	Kalsinörin inhibitörü
CR2	Kompleman reseptörü tip 2
CREG	Cross reactive group
CRRY	Cr1-related gene/protein y
CSIF	Sitokin sentez inhibitör faktör
CTGF	Connective tissue growth factor=Bağ doku büyüme faktörü
CTLA-4	Sitotoksik T lenfosit antijen-4: cd152
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Damage associated molecular pattern molecules
DC	Dendritik hücre
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSA	Donör spesifik antikorlar
DTT	Dithiothreitol

KısaltmalarAçıklamalar

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EFI	European federation for immunogenetics
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERL	Everolimus
ETAR-Ab	Endothelin-1 type A receptor antikor
Fc	Fragment crystallizable region (fc region)
FC	Akım sitometre= flow cytometry
FGF	Fibroblast growth factor
FSGS	Focal segmental glomerulo sclerosis
gACE1	Germinal ACE1
GBM	Glomerular basement membrane
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimule eden faktör
GPCR	G protein reseptör ailesi: G protein–coupled receptors
GVHD	Graft versus host hastalığı
HLA	Hüman lökosit antijen
HRP	Horseradish peroxidase
ICAM1	İnterselüler adezyon molekülü 1
ICOS	Inducible T-cell costimulator
İFN-γ	İnterferon gama
Ig	İmmunglobulin
IP3	İnositol triphosphate
IRI	İskemi reperfüzyon hasarı (ischemia/reperfusion injury)
IVIG	İntravenöz immünglobulinler
İL	İnterleukin=İnterlökin
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal transducers and activators of transcription
KIRs	Killer cell immünglobulin-like receptors
LCM	Lenfosit cross match
MAC	Membran atak kompleksi
MAPK	Mitojenle aktive olmuş protein kinaz
MasR	Ang (1-7) mas reseptör
mHag	Minör histocompatibility antigens
MHC	Major histocompatibility kompleks

KısaltmalarAçıklamalar

MIC-A	MHC sınıf-I zinciri ilişkin gen A antijen
MIC-B	MHC sınıf-I zinciri ilişkin gen B antijen
MMF	Mikofenolat mofetil
Mrg:	Mas-related g-protein coupled reseptor
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NDSA	Donöre spesifik olmayan antikorlar
NEP	Neprylisin
NF-κB	Nuclear factor kappa b
NK	Doğal öldürücü=natural killer
NO	Nitrik oksit
non-HLA	Hüman lökosit antijen dışı
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PD- 1	Programmed cell death-1
PKC	Protein kinase c
PRA	Panel reaktif antikor
PRR	Patent recognition receptor
(P)RR	Renin/(pro)renin reseptör
PTC	Peritubular capillary
RAPA	Restriction fragment length polymorphism
RAS	Renin anjiotensin sistemi.
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
ROS	Reaktif oksijen radikalleri
RSCA	Reference strand conformation analysis
SAB	Luminex-based single antigen bead
sACE1	Somatik ACE1
SBT	Sequence based typing
SNP	Single nucleotid polymorphism
SRL	Sirolimus
SSCP	Sequence specific conformational polymorphism
SSO/ SSOP	Sequence specific oligonucleotide priming typing
SSP	Sequence specific priming

KısaltmalarAçıklamalar

SSS	Santral sinir sistemi
TBE	Tris borate EDTA
Tc	Sitotoksik T hücre
TCR	T hücre reseptörü
TF	Doku faktörü (tissue factor)
TGF-β1	Transforming growth factor- β 1
Th	Yardımcı T hücre
TLR	Toll like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor- α
TODS	T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Organ ve Doku Bilgi Sistemi
Tx	Transplantasyon
UV	Ultraviyole
XM	Cross match

1.GİRİŞ

Günümüzde *böbrek* nakli son dönem böbrek yetmezliği hastalarında kabul edilmiş ve seçkin bir tedavi yöntemidir [1]. İlk böbrek nakli 1954 yılında tek yumurta ikizleri arasında Murray, Harrison ve Merrill tarafından yapılmıştır. İlk nakilden başlayarak organ nakli üzerine olan çalışmalar hızla artmış ve immünolojik mekanizmalar ışığında yeni tanı ve tedavi yöntemleri eklenerek günümüz transplantasyon pratiğinin oluşması sağlanmıştır.

Fakat her organ nakli başarı ile sonuçlanmamaktadır. Organ naklinde başarısızlığın en önemli nedeni ise alıcının immün sistemi tarafından nakledilen organın reddedilmesidir. Rejeksiyon olarak adlandırılan bu süreç karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir [2]. Rejeksiyon sisteminde, hem doğal ve kazanılmış immün sistem yanıtları, hem de hücrel ve salgısal (hümorale) mekanizmalar yer almaktadır. Alıcı verici arasında doku uyumu ne kadar fazla olursa nakil sonrası erken dönemde akut rejeksiyon ve geç dönemde kronik rejeksiyon gelişme ihtimali o kadar düşük olmakta, hasta nakledilen böbrek ile daha uzun ve konforlu bir yaşam sürdürmektedir [3].

Böbrek naklinde non-HLA antikorlar

Rejeksiyon sürecindeki mekanizmalar incelendiğinde donör spesifik HLA (Hüman Lökosit Antijen) antikorlarının (DSA) nakledilen böbrekte kompleman ilişkili ve antikor bağımlı hücrel sitotoksikite ile hasara neden olduğu bilinmesine karşın non-HLA antikorların böbrek naklinde erken ve geç dönemdeki etkilerinin önemi belirsizliğini halen korumaktadır [4-5]. Birçok non-HLA antikor çalışılmış olmasına rağmen üzerinde en çok çalışma yapılan ve böbrek nakli ile ilişkisi en fazla gösterilen Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAS)'nin bir komponenti olan AT1R (Anjiyotensin II tip I reseptör) antikorlarıdır. Özellikle son yıllarda RAS'ın immünregülasyon ve transplantasyon immünolojisindeki önemi üzerine çalışmalar hız kazanmıştır [6]. Böbrek nakli sonrası organ hasarında meydana gelen endotel değişikliklerinde RAS'ın da olaya karıştığı, antikor ilişkili mekanizmaları ile vasküler endotel aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir [7-8].

Böbrek naklinde sitokin gen polimorfizmi

Tüm inflamatuvar olaylarda ve immün yanıtlarda olduğu gibi, böbrek endotel hasarında da sitokinler esansiyel mediyatörlerdir. Salgılanan sitokinler hedef hücredeki reseptörüne bağlandığında, o hücredeki hücresel fonksiyonları aktive ederler. Bu nedenle sitokinler rejeksiyon sürecinde de önemlidir. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler rejeksiyonda karmaşık mekanizmanın elçileri olarak rol oynamaktadır [9-10].

Sitokinlerin salınım düzeyini ise sahip olduğu gen polimorfizmleri etkiler. Sitokin gen polimorfizm etkisinin böbrek naklinde rejeksiyon ile ilişkisi üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sitokin gen polimorfizminin araştırılması, rejeksiyon ve greft fonksiyonları üzerine yeni bilgiler eklerken, aynı zamanda istenmeyen sonuçlardan korunmak için de yol göstermektedir. Böbrek nakli öncesinde yapılan doku uyum testlerine ek olarak sitokin gen polimorfizminin de incelenmesinin, rejeksiyon sıklığının azaltılması yönünde yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Gen polimorfizm etkisinin önemini bildiren çalışmalar çok olmasına rağmen halen tartışmalı olduğunu bildiren yayınlar da vardır [11].

Bizim çalışmamızda nakil olan hastalarda TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), İL-6 (Interleukin-6), İL-10 (Interleukin-10), İFN- γ (Interferon-gama) sitokinlerinin düşük, orta ve yüksek salınımı ile uyumlu gen polimorfizmlerinin ve Anjiotensin II tip 1 reseptör antikoru (AT1R-Ab) seviyesinin belirlenmesi, aralarındaki ilişki ve oluşan rejeksiyona etkilerinin gösterilmesi planlandı. Hasta ve kontrol serumlarından genomik DNA örnekleri izole edildi. İzole edilen genomik DNA örnekleri TGF- β 1, TNF- α , İL-6, İL-10, İFN- γ için düşük, orta ve yüksek sitokin salınımıyla uyumlu polimorfizm bölgelerinin belirlenmesini sağlayacak sitokin gen polimorfizm kiti kullanarak, PCR-SSP (polimeraz zincir reaksiyonu-sekans spesifik priming) yöntemi ile çoğaltılarak belirlenen sitokinler için polimorfik bölgeler saptandı. AT1R-Ab düzeyi ölçümü ELISA yöntemiyle çalışılıp konsantrasyonları belirlendi.

Hedeflerimiz arasında; AT1R-Ab varlığının/seviyesinin rejeksiyonla ilişkisinin gösterilmesi, TGF- β 1, TNF- α , İL-6, İL-10, İFN- γ sitokin gen polimorfizmlerinin rejeksiyonla ilişkisinin gösterilmesi, sitokinlerin gen polimorfizmlerinin AT1R-Ab düzeyleri ile ilişkilerinin araştırılması ve rejeksiyona olan etkisinin değerlendirilmesi

bulunmaktadır. AT1R-Ab düzeylerini etkileyen sitokin polimorfizmlerinin değerlendirilmesinin rejeksiyon mekanizmasına ışık tutması açısından anlamlı olabileceği düşünülebilir.

Bugüne kadar çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen gen polimorfizm çalışmaları her toplum için ayrı değerlendirilmesi gereken çalışmalardır. Transplantasyon üzerine yapılan sitokin gen polimorfizmi çalışmaları Türkiye’de henüz oldukça sınırlı sayıdadır. Polimorfizm çalışmalarının geniş kitleler üzerinde yapılması gerektiğinin bilincinde olmamıza rağmen yüksek maliyet nedeniyle çalışma grubumuzun kısıtlı tutulmuş olması sınırlılıklarımız arasındadır.

Son yıllarda organ nakli hazırlıkları yapılırken non-HLA antikor taramasının rutin bir basamak olarak uygulamaya konulması yapılan çalışmaların sonuçlarına dayanılarak gündeme gelmektedir. Nakil öncesi uygun verici seçiminin yanı sıra nakil sonrası organ reddine giden durumlarda nedenin erken dönemde bilinmesi, tedavinin hızlı ve doğru yapılması, organın yaşamını ve işlevselliğinin devamı için çok önemlidir. İlerleyen dönemlerde AT1R-Ab varlığı bilinen hastalar için plazmaferez ve AT1R blokajı tedavi seçeneklerinin kullanılabilirliği üzerine çalışmalar halen devam etmektedir.

2.KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

2.1.Böbrek Nakli

Böbrek nakli fonksiyonel görevini yapamayan böbreğin, sağlıklı olduğu belirlenen ve verici olma koşullarına uygun olduğu tespit edilen, gönüllü vericiden alınan hastalıksız olan böbrekle değiştirilmesidir.

2.1.1.Genel bilgiler

Böbrekler boşaltım sisteminin bir parçası olup kanı filtre eden bir sistem olarak çalışmaktadır. Böbrekler retroperitoneal bölgede bulunan her biri yaklaşık 120-150 g ağırlığında olan organlardır. Makroskopik olarak en dışta fibröz bir kapsül, kapsülün altında korteks ve en içte medulla bulunur. Nefronlar ise böbreklerin işlevsel birimleridir. Her iki böbrekte yaklaşık 2 000 000 nefron vardır ve her nefron tek başına idrar yapma yeteneğine sahiptir. Bir nefron temel olarak filtrasyon görevi olan glomerül ve kıvrımlı tübül olmak üzere iki kısımdan oluşur. Nefronlar, kortikal nefronlar ve jukstaglomeruler nefronlar olarak iki gruba ayrılır. Kortikal nefronlar böbrek korteksinde, jukstaglomeruler nefronlar ise medulla sınırındadır. Jukstaglomeruler nefronlar idrarın konsantre edilmesinde görevlidir. Sıvı elektrolit ve asit-baz dengesinin düzenlenmesi, metabolik atık ürünlerin atılımı, ilaç-toksin ve metabolitlerin detoksifikasyonu ve atılımı, ekstraselüler sıvı hacmi ve kan basıncı regülasyonu, hormon üretim ve metabolizması, peptid hormonların yıkımı, küçük molekül ağırlıklı peptidlerin yıkımı ve glukoneogenez gibi metabolik etkiler görevleri arasındadır [12].

Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda tedavi seçenekleri hemodiyaliz, peritoneal diyaliz ya da böbrek naklidir. Diyaliz, hasta için normal hayatını diyaliz makinesine bağlı olarak geçirilecek bir yaşam biçimi iken böbrek nakli ile hastanın konforlu bir yaşam sürmesi sağlanabilmektedir. Ayrıca diyaliz sadece kan filtrasyon görevini gördüğü için böbreğin diğer fonksiyonları tamamlanamamaktadır. Yapılan ekonomik irdelemelerde de böbrek naklinin ekonomik olarak toplamda diyalize oranla daha düşük maliyetli olduğu bildirilmiştir [13]. Amerika'dan bildirilen bir çalışmada günümüzde bir diyaliz hastasının yıllık masrafı 70-75 000 dolar olarak belirlenmiştir. Nakil ile karşılaştırıldığında ilk yıl için diyalize göre nakil masrafları biraz daha fazla (yaklaşık yıllık 100 000 dolar) çıkmaktadır.

Fakat istikrarlı bir nakil hastasında takip eden yıllar için yıllık masraf 15 000 dolar olmaktadır. Dolayısıyla böbrek naklinin birikmiş masrafının diyalizin birikmiş masrafından çok daha az olduğu dikkati çekmektedir [14].

Bu nedenlerle böbrek nakli günümüzde son dönem böbrek yetmezliği hastalarında kabul edilmiş ve seçkin bir tedavi yöntemidir [1]. Diyalizle hayatını sürdüren ve nakil bekleyen hastaların oranı her yıl milyon kişide 30-50'dir. Dünyada yılda yaklaşık 30 000 böbrek nakli yapılmaktadır ve toplam 2010 yılına kadar yapılan böbrek nakil sayısının 900 000'den fazla olduğu düşünülmektedir [13-14]. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre TODBS (T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Organ ve Doku Bilgi Sistemi) kayıtlı 2 871 tanesi 2017 yılında olmak üzere 2008 yılından bu yana 22 320 böbrek nakli yapılmıştır. Halen böbrek nakil için bekleme sırasında olan kişi sayısı 2017 yılında eklenen 3 515 kişi ile beraber 21 697 olarak bildirilmiştir [15].

2.1.2.Böbrek naklinin tarihçesi

İlk deneysel böbrek nakli 1902 yılında Viyana'da Emerich Ulmann tarafından köpekler üzerinde yapılmıştır. İlk insan allograft böbrek nakli ise 1936 yılında Rus cerrah Varonay tarafından yapılmış fakat hasta 48 saat sonra kaybedilmiştir [16].

Tümör immünolojisi üzerine çalışan bilim adamlarının tümör üzerindeki çalışmalarını sürdürebilmek amacıyla, tümörü fareden fareye nakletmesi sırasında, akraba farelerde tümörün devamlılığının devam ettiği, fakat akraba olmayan bazı farelerde yapılan nakillerin başarılı olmadığını göstermeleri üzerine, MHC (Major Histocompatibility Complex) çalışmaları hız kazanmış ve organ nakliyle uğraşan bilim adamlarının da ilgi alanı olmuştur. 1944 yılında araştırmacılar tavşanlar üzerinde yaptıkları deneylerde organ naklinde görülen reaksiyonların immünolojik bir temele dayalı olduğunu göstermeyi başarmışlardır [17]. Benacerraf, Dausset ve Snell, immün yanıtta MHC'nin rolü, MHC antijenlerinin keşfi ve immonogenetikteki başarılarından dolayı 1980 yılında Nobel tıp ödülünü kazanmıştır [18]].

Organ nakli immünolojisinin önemli köşe taşlarından biri de 1953 yılında HLA'nın tanımlanması olmuştur [19].

İlk uzun dönem başarılı allogreft böbrek nakli ise 1954 yılında Boston’da tek yumurta ikizleri arasında Murray, Harrison ve Merrill tarafından yapılmıştır. Hasta nakil sonrası 8 yıl yaşamını sürdürmüştür. Dr. Murray bu başarısından dolayı 1990 yılında Nobel tıp ödülüne layık görülmüştür.

Sonraki dönemde 1957 yılında Hitchings ve Elion tarafından azathioprine geliştirilmesi, 1983’de siklosporin kullanılması, 1990 yılında tacrolimus, 1995 yılında mycophenolate mofetil, 1997’de daclizumab geliştirilmesi nakilde başarıyı artıran tedavi ilklerindendir [20].

Türkiye’de ilk böbrek nakli ise Hacettepe Üniversitesi’nde 3 Kasım 1975 tarihinde Dr. Mehmet Haberal tarafından bir annenin 12 yaşındaki oğluna bağışladığı böbreğin nakli ile gerçekleştirilmiştir [21]. Aynı ekip tarafından 10 Ekim 1978’de Avrupa Transplantasyon Birliği’nden (Eurotransplant) sağlanan ölü böbrek ile Türkiye’de ilk defa kadavradan böbrek nakli gerçekleştirilmiştir [22].

İlk nakilden başlayarak organ nakli üzerine olan çalışmalar hızla artmış ve başarılı bir nakil için immünolojik mekanizmalar ışığında yeni tanı ve tedavi yöntemleri eklenerek günümüz organ nakli pratiğinin oluşması sağlanmıştır. Başarılı bir nakil için uygun cerrahi teknik, uygun alıcı-verici seçimi ve uygun immünsüpresif tedavi birlikteliği önemlidir.

2.1.3.Böbrek naklinde alıcı-verici seçimi

Nakilde alıcı verici arasında doku uyumu ne kadar fazla olursa nakil sonrası erken dönemde akut rejeksiyonlar ve geç dönemde kronik rejeksiyon gelişme ihtimali o kadar düşük olmakta ve hasta nakledilen böbrek ile daha uzun ve konforlu bir yaşam sürdürmektedir [3]. Birden fazla verici adayı olduğu durumlarda diğer ölçütler eşit düzeydeyse uyumun en fazla olanının seçilmesi başarıyı artıracaktır [23].

Nakil öncesi immünolojik değerlendirme kapsamında HLA doku grubu tayini, ABO uyumu, PRA (Panel Reaktif Antikor) çalışılması ve LCM (Lenfosit crossmatch) çalışmaları günümüzde rutin uygulamada olan çalışmalardır [23]. Fakat tüm bu çalışmalar sonrasında tam uyumlu ikizlerde bile rejeksiyon gözlenmesi HLA dışında farklı

mekanizmaların da olabileceğini desteklemektedir [24-26]. 2005 yılında “Collaborative Transplant Study” olarak isimlendirilen ve 245 merkezin katıldığı bir çalışmada 4048 HLA tam uyumlu donör ile çalışılmış ve rejeksiyonda non-HLA immünitinin öneminden bahsedilmiştir [26].

Hastaların nakil öncesi risk grupları açısından değerlendirilmesi ve başarılı bir immünsüpresif tedavi belirlenmesi yaşanacak rejeksiyonu önlemek açısından önemlidir. 2016 da yayınlanan bir çalışmada risk gruplarının belirlenmesinde verici ve alıcı yaşı, etnik grubu, önceki nakiller ve transfüzyonlar, canlı ya da kadavradan nakil, önceki gebelik, % PRA, HLA DSA varlığı, AT1R-Ab varlığı, T hücre ELISPOT değerlendirmesi, çözünür CD30 değerlendirmesi, HLA uyumu, CMV değerlendirmesi, EBV değerlendirmesi, soğuk iskemi zamanı, gecikmiş greft fonksiyonu ele alınması gereken parametreler olarak bildirilmiştir [27].

HLA doku grubu tayini

Hücrelerin antijenleri tanıyabilmesi ve immün yanıtlar oluşturabilmesi için antijenlerin özelleşmiş hücresel yapılar aracılığıyla hücrelere sunulması gerekmektedir. “Major Doku Uyumluluğu Kompleksi” (Major Histocompatibilite Complex= MHC) olarak adlandırılan özelleşmiş hücresel yapı antijen sunumunda rol alır. İnsanda bulunan MHC’ler HLA olarak isimlendirilmektedir¹. İmmün sistemde antijen sunumu ve yanıt oluşumunda organizmanın kendinden olanı (self) ve olmayanı (nonself) ayırt edebilmesi önemlidir. Bu tanıma olayı MHC antijenleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu mekanizma kendinden olmayan hastalık etkenlerine karşı yararlı bir mekanizma iken, organ naklinde birtakım güçlükleri de beraberinde getirmektedir [28].

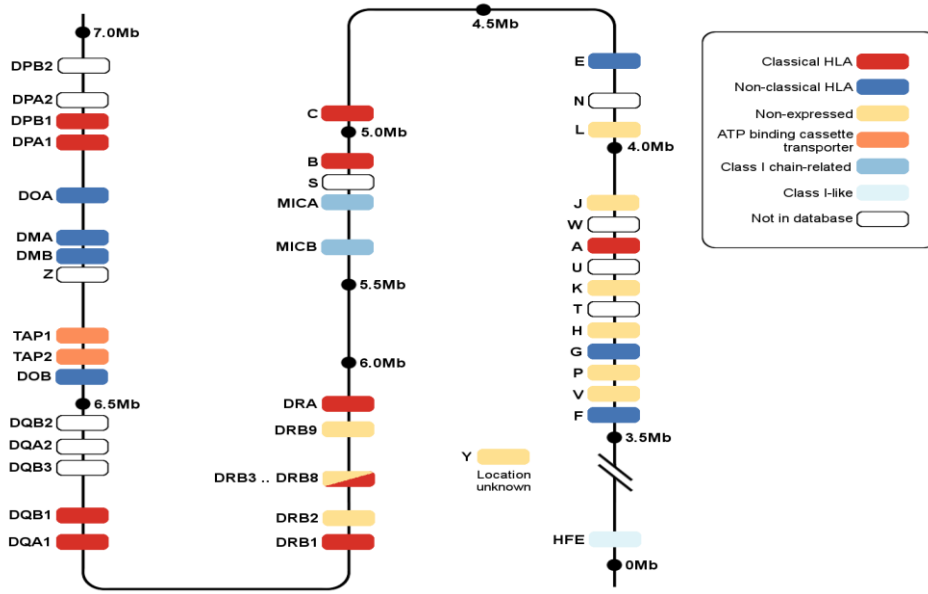
Her bireyde farklı HLA tipleri olabileceği için, farklı HLA nedeniyle bireye göre verilecek immün yanıt da farklılık gösterebilmektedir. HLA uygun olmayan bireyden yapılan organ nakli sonrasında nakledilen doku alıcı tarafından reddedilecektir (rejeksiyon) ya da vericinin nakledilen dokusu alıcıyı reddedecektir (greft versus host hastalığı=GVHD). Başarılı bir organ nakli yapılabilmesi için önceden bireyler arasında HLA uyumu olup olmadığının araştırılması çok önemlidir. HLA tiplerinde benzersiz bir genetik çeşitlilik

¹ MHC insanda ilk defa lökositlerde gösterildiği için Hüman Lökosit Antijen olarak adlandırılmıştır.

vardır. Genleri Mendel kanunlarına göre düzenlenir, yani paternal ve maternal alellerin değişik kombinasyonları ile yeni bireyin HLA gen profili oluşmaktadır [29]. Aralık 2017 itibarıyla son bildirilen alel sayısı 12 631 adet sınıf I, 4 700 adet sınıf II olmak üzere toplam 17 331'dir. Diğer non-HLA alel sayısı 178, gizli alel sayısı 8 olarak bildirilmiştir. Bu nedenle bireyin HLA profilini tanımlamak amacıyla HLA tiplendirme yapılması gerekmektedir [30].

Organ nakillerinde başarı oranı HLA uyum oranına göre artmaktadır. Tercih edilen tam uyumlu vericidir. Uyumsuzluk alıcının T hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonu ile birlikte B hücre alloantikor üretiminin aktivasyonuna yol açar. Bu da hücre ve humoral greft rejeksiyonuna neden olur [31].

Yapılan çalışmalar: böbrek ve pankreas naklinde HLA DR uyumunun HLA A, B, C uyumundan daha önemli olduğunu; kalp naklinde HLA DR uyumunun önemli olduğunu; kornea naklinde HLA A, B uyumunun önemli olduğunu, HLA DR uyumunun öneminin net olmadığını; karaciğer naklinde uyumun öneminin tartışmalı olduğunu bildirmektedir [29]. Ama hematopoietik kök hücre naklinde halen tam uyumlu verici hedeflenmektedir. Tüm bunların ışığı altında başarılı bir nakil için HLA tiplendirilmesi gerekmektedir [28]. Organ nakli öncesi alıcı ve vericilerde HLA A, B ve DR lokus alelleri tiplendirilmelidir. Hastanın hayatta olan tüm 1. derece akrabalarından tiplendirme yapılarak haplotip ve genotip analizleri tamamlanmalıdır. HLA C, DQ ve/veya DP için yapılan tiplendirme bazı durumlarda yardımcı ama zorunlu değildir. Tiplendirme EFI (European Federation for Immunogenetics), ASHI (American Society for Histocompatibility & Immunogenetics) kurumlarınca tanımlanmış olan standartlara uygun çalışan laboratuvarlarda yapılmalıdır [18]. Yeni tanımlanan aleller www.bmdw.org adresi kullanılarak serolojik denklikleri düzenli olarak takip edilmelidir [29]. Güncel HLA haritası şekil 2.1'de gösterilmiştir [32].



Şekil 2.1 HLA haritası [32]

HLA Tiplendirme Yöntemleri

Serolojik Yöntemler

Mikrolenfositotoksosite Testi, “National Institute of Health” yöntemi ya da “Complement Dependent Cytotoxicity (CDC)” olarak tanınan bu yöntem, Gorer ve Amos tarafından tanımlanmış daha sonra Terasaki ve Mc Clelland tarafından 1964 yılında modifiye edilmiştir [29, 31]. Bu nedenle Terasaki yöntemi de denilmektedir. Son yıllarda moleküler yöntemler bu yöntemin yerini almış olsa da halen uygun verici taramalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Antijen antikor reaksiyon temelli olan bu yöntem kompleman bağımlı sitotoksositeye dayanır. Uygun HLA molekülü eksprese eden hücreler kuyucuklardaki antikorlar ile bağlanır. Antijen antikor bağlanmasının olduğu kuyucuklarda hücre ölümü gerçekleşir, diğer kuyularda ise hücreler canlı olarak kalır. İnkübasyon sonrası boyama sistemi ile mikroskopta ölü/canlı hücreler değerlendirilir [33-34]. ASHI skorlaması ile ölü hücre yüzdesi skorlanır (Çizelge 2.1) [34]. Skorlamada 6 puan ve üstü test pozitifliği olarak tanımlanır.

Çizelge 2.1: ASHI skorlaması [34]

% ölü hücre	Yorum	Skor
0-10	Negatif	1
11-20	Şüpheli negatif	2
21-50	Zayıf pozitif	4
51-80	Pozitif	6
81-100	Güçlü pozitif	8

Aynı yöntem kullanılarak HLA antikor taranması (gebelik, kan ürün transfüzyonu, önceki nakle bağlı gelişen antikorlar) ve çapraz karşılaştırma çalışmaları yapılabilir [18, 28-29, 34].

DNA Temelli Yöntemler

Moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmeler sonucu HLA tiplendirmesinde DNA temelli yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Moleküler yöntemlerin birçok avantajı vardır. Özgün ve esnek olmaları, yeni aleller tanımlandıkça yeni reaktiflerin geliştirilebilmesi, istenen duyarlılıkta çalışma yapabilecek seçeneklerin olması, çalışmalarda canlı hücre gerektirmemesi, kan dışı dokulardan çalışılabilmesi, bireyin hastalık ya da tedavi durumundan etkilenmemesi, otomasyona daha uygun olması, eş zamanlı daha çok örneğin çalışılabilmesi, HLA genlerindeki tüm çeşitliliğin gösterilebilmesi ve serolojik olarak tanımlanamayan alellerin tanınabilmesi bunların arasındadır [29, 31, 33-35].

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Sequence Specific Priming Typing (PCR-SSP), Sequence Specific Oligonucleotide Priming Typing (SSO/ SSOP), Luminex, SSOP temelli “Microplate based” metot, “Line-probe-based assay”, Sequence Based Typing (SBT), Sequence Specific Conformational Polymorphism (SSCP) veya Heteroduplex Analysis ve Reference Strand Conformation Analysis DNA temelli moleküler tanı yöntemleridir [29, 31, 33-35].

“Minör Histocompatibility Antigens” (mHag), “Nonconventional MHC Antigens” ve “Killer Cell Immunglobulin-Like Receptors” (KIR) tiplendirme nakil ile ilişkili olan diğer faktörlerdir [34].

Tiplendirme hassasiyetini artırmak amacıyla bazı durumlarda metotların kombinasyonu gerekebilir [34]. Doku nakli tipine göre değişik çözünürlükte metotlar seçilebilir. Solid organ nakillerinde düşük çözünürlüklü serolojik metotlar sıklıkla kullanılır, fakat kök hücre ve kemik iliği naklinde GVHD'den kaçınmak ve ret olasılığını azaltmak için yüksek çözünürlüklü tiplendirme kullanılmaktadır.

ABO uyumu

ABO sistemi, 20. yüzyılın başında Avusturyalı bilim adamı Karl Landsteiner tarafından bulunmuştur. Bu oligosakkaritler kırmızı küreler, endotel hücreleri, böbrekte parankim hücreleri, tübülus ve glomerül gibi çeşitli hücrelerde eksprese olurlar [36].

İlk kez 1955 yılında Hume ve arkadaşları böbrek naklinde ABO uyumunun önemli olduğuna dikkat çekmişlerdir [16]. Böbrek naklinde ABO kan grubu antijenleri uyumu çok önemlidir. En iyi sonuç ABO uygun vericilerle alınabilmektedir. Fakat uygun verici bulunamadığında güçlü immünosüpresyon ve desensitizasyon tedavisi ile ABO uyumsuz vericiden de böbrek nakli yapılabilmektedir [37].

ABO antijenler güçlü transplant antijenleri olarak davrandığından ABO uyumsuzluğu erken hiperaktif akut rejeksiyona yol açar. Greftte verici B hücrelerinin bulunmasından dolayı nakil sonrası hemolitik hastalık riski yüksek olsa da O kan grubuna sahip potansiyel vericilerin böbrekleri teorik olarak A, B veya AB alıcılarında kullanılabilir [13]. Canlı verici naklinde, ABO uyumluluğu ABO kimliği ile aynı biçimde kabul edilebilir.

Anti-HLA Antikor (Panel Reaktif Antikor=PRA) Taraması

Anti-HLA antikorlar doğal yolla oluşan ABO antikorlarının aksine; kan transfüzyonları, gebelik, rejekte olmuş greftler yoluyla yabancı HLA'ya maruz kalınmasıyla oluşur. Anti-HLA antikorlar sınıf I, sınıf II veya her iki sınıf HLA antijenine karşı oluşabilen antikorlardır. Spesifik ya da nonspesifik olabilir. Birkaç HLA tarafından paylaşılan ortak epitoplara veya çapraz reaksiyon veren antijenlere (cross reactive group, CREG) karşı gelişebilir. Ig (immunglobulin) G tipi antikorlar nakil için kontrendikasyon oluştururken Ig M tipi antikorların klinik önemi tartışmalıdır [13].

Anti-HLA antikorlar donör spesifik antikorlar (DSA) ve donöre spesifik olmayan (NDSA) antikorlardan oluşur. DSA'lar alıcılarda verici HLA antijenlerine karşı gelişen antikorlardır. Takip amaçlı nakil öncesi ve sonrası DSA tespiti gereklidir [38]. Kan transfüzyonları en sık oluşma nedeni iken, gebelik ve önceki nakiller sonrasında da görülmektedir. 1969 yılında, Patel ve Terasaki donör lenfosit hücrelerinde eksprese olan antijenlere karşı, alıcıda antikorların bulunmasının, akut greft rejeksiyonu için majör risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir [39].

Anti-HLA antikor ya da PRA tarama testi alıcının daha önce HLA antijenleri ile karşılaşmış bu antijenlere karşı antikor oluşturup oluşturmadığını ve bu antikorların ne kadar yaygın olduğunu gösteren testtir. Değişik yollarla yapılmasına rağmen son dönemde oldukça duyarlı testler geliştirilerek çok düşük düzeydeki antikorlar saptanabilmektedir [40]. PRA skoru yüzde olarak ifade edilir ve anti-HLA antikorları ile reaksiyona giren popülasyonun yüzdesini temsil eder. %0-99 arası bir değeri vardır. PRA oranı yüksek olan alıcının genel donör havuzuna karşı duyarlılığı yüksektir ve uygun donör bulma şansı düşüktür [41].

Bu antikorlar %80-85 üzerinde ise alıcı için ciddi immünolojik riskten söz edilebilir. Ancak PRA testi pozitif saptanan bir alıcıda mevcut antikorun donör spesifik olup olmadığı ise bu testin en can alıcı kısmını oluşturmaktadır. Mevcut antikorun donör spesifik olup olmadığının cevabı ek olarak nakil öncesinde yapılması gerekli olan lenfosit cross match (LCM) testi ile belirlenir. Bu testin pozitif sonuçlanması yapılacak böbrek naklinin yüksek riskli olduğunu ve hiperakut rejeksiyon ile karşılaşılabilceğini göstermektedir. Bu nedenle LCM testi her nakil öncesinde yapılması gerekli olan en önemli testtir [42].

Başarılı bir nakil için negatif LCM ve negatif PRA gereklidir. PRA pozitifliği olan, hatta özel (spesifik PRA) yöntemlerle antikorların hangi antijenlere yönelik olduğu saptanan ve bu antijenlerin bir veya birkaçının verici adayında olduğu belirlenen durumda LCM testinin pozitif olarak çıkması beklenirken bazen antijenin düşük titrede olması, kompleman aktive etmemesi gibi nedenlerle LCM testi negatif saptanabilir [43]. Bu durumda organ nakli sonrasında hızlandırılmış rejeksiyon denilen ve ilk birkaç günden sonra, fonksiyonel greftte ortaya çıkan antikor aracılı rejeksiyon ile karşılaşılabilceği

akılda tutulmalıdır. Bu nedenle bu antikorların varlığında nakil öncesi daha duyarlı LCM testleri¹ yapılması yararlı olabilir [44].

Genellikle serolojik yöntemlerle saptanmakla beraber son yıllarda akım sitometri ile daha duyarlı ve özgül bir şekilde belirlenebildiği tespit edilmiştir. Anti-HLA antikor taramasında ELISA ve Luminex de kullanılabilir.

Serolojik olarak Terasaki yöntemi; komplemana bağımlı antijen-antikor etkileşimine dayalı, lenfosit lizisi ile sonuçlanan sitotoksik bir yöntemdir. Hazırlanan hasta serumlarının üzerine HLA antijenleri bilinen kişilerin lenfositleri ve kompleman eklenir. Antijen-antikor kompleksi oluştuğunda komplemanın yardımıyla hücre lizisi gerçekleşir. HLA antikorlarıyla reaksiyona girerek ölen panel hücrelerinin oranı belirlenir. Paneller üzerinde işlem yapılmaktadır ve bu nedenle Panel Reaktif Antikor terimi kullanılmıştır [13].

Akım sitometrisi (Flow sitometre; FC);

Kantitatif, tek hücre seviyesinde hızlı ve çok parametrelili analiz elde edilmesi, hücre alt gruplarının sayısal ve yapısal farklılaşmasında kullanılabilirliği olması, hücrelerin fonksiyonel, biyokimyasal, morfolojik veya sitogenetik karakterizasyonuna ek olarak hücre alt gruplarının “sorting” ine olanak sağlaması temel kullanım nedenleridir [13].

Akım sitometri cihazının çalışma prensibi her bir hücre veya partikülün lazer demetinin içinden geçerken, saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan floresan ışığı bir araya getirip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, sinyallere dönüştürülmesi ve bu sinyallerin dijitalleştirilerek histogramlar olarak ekrana aktarılmasıdır. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immünotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir. 1 saniyede 500 hücre sayılır ve ortalama 10 000 hücreyi 20 saniyede analiz edilebilir.

¹ Flow sitometrik yöntem gibi

Akım sitometri yöntemi, farklı Ig sınıfları ve alt gruplarını belirlemek ve özgül olmayan geri plan boyamasını azaltmak için B hücrelerinin pronaz ile muamelesi gibi modifikasyonlar içermektedir [45].

ELISA

Sorgulanan hedef hasta serumundaki antikorlar olduğunda; plaklar yüksek oranda saflaştırılmış HLA sınıf I ve II glikoproteinler ile kaplanmıştır. Antijen ile kaplı kuyucuklara hasta serumu ve enzim işaretli anti-Ig G antikor eklenir. Serumda antijene karşı antikor varsa bağlanma gerçekleşir. İkincil antikor ve enzim substrat reaksiyonu ile oluşan kolorimetrik reaksiyonun gösterdiği absorbans değeri sorgulanan antikoru varlığı ve miktarını gösterir [13, 46]. ELISA serolojik yöntemle göre daha hızlı, özgül ve güvenilir bir yöntemdir. Ig G tipi antikorların varlığını göstermesi ve duyarlılığı nedeniyle tercih edilmektedir [13].

ELISA teknolojisi CDC'den, Luminex boncuk teknolojileri ise CDC ve akım sitometreden daha hassastır [47-48]. Bu hassasiyet sayesinde boncuk teknolojileri, HLA'ya özgül düşük düzeydeki antikorları belirleyebilirler. Luminex SAB yöntemi de mevcut yaygın ve seyrek HLA alellerinin, 11 HLA bölgesi (A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPBA1 ve DPB1) için yapılan geniş kapsamlı analizlerde, karmaşık serum örneklerinde, HLA antikorlarının eşsiz bir şekilde tanımlanmasını sağlamıştır [45].

Luminex

Kısaca solid faz olarak antijenle kaplı boncukları kullanan bir floroanalizör sistemdir. Luminex corp. tarafından geliştirilmiştir. Antikor özgüllüğünü daha basit bir yolla saptar. Polisitiren küreler HLA antijenleri ile kaplıdır. Boncuklar internal olarak farklı derecelerde florofor ile boyanmıştır. Tek bir reaksiyonla en fazla 100 analitin test edilmesini sağlar. Akım sitometri ile kıyaslanabilir duyarlılıkta ve özgüllükte sonuçlar verir. Yöntem olarak daha verimlidir.

Çapraz Karşılaştırma (Lenfosit Cross Match, XM, LCM) çalışmaları

LCM testi ile alıcı hastanın serumunda verici hücrelerine karşı bulunan anti-HLA antikor varlığı sorgulanır. Böbrek transplant T hücrelerinin hiperakut rejeksiyonunu engellemek için her böbrek naklinden önce LCM testi yapılmalıdır. Pozitif LCM verici hücrelerine karşı, alıcıda HLA-allo-antikorlarının varlığını gösterir (çizelge 2.2) [13].

Çizelge 2.2 Anti HLA antikor tarama test sonuçlarının yorumlanması [13]

YÖNTEMLER VE SONUÇLAR				YORUM
CDC	CDC DTT	ELISA	FC	
Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Antikor yok
Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Antikor titresi düşük? Yanlış pozitiflik?
Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Antikor var (kompleman bağlamayan)
Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Ig M tipi antikor
Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Ig G tipi antikor

Çapraz karşılaştırma testleri ile anti-HLA antikor tarama yöntemleri aynıdır, fakat karşılaştırma testinde panel ya da havuz kullanılmaz, sadece donör antijenleri veya lenfositleri kullanılır [13]. CDC-LCM, FC-LCM, ELISA kullanılan yöntemlerdir. Test sonuçlarının doğru değerlendirilmesi amacıyla en az iki farklı yöntemin kullanılması önerilmektedir. Çapraz karşılaştırma test sonuçlarının yorumlanması çizelge 2.3’de verilmiştir [13].

Çizelge 2.3 Çapraz karşılaştırma test sonuçlarının yorumlanması [13]

YÖNTEMLER VE SONUÇLAR						YORUM
CDC	CDC DTT	ELISA Sınıf I	ELISA Sınıf II	FC T	FC B	
Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Tx yapılabilir
Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Tx yapılamaz
Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Tx yapılamaz
Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Tx yapılabilir. CDC hatalı?
Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	DSA araştır. Tx yapılabilir

Solid faz antikor saptama testlerinde, ELISA veya polistiren boncuklara (multiplexed multianalyte beads array) bağlanarak akım sitometre veya Luminex olarak bilinen floroanalizörlerde tayinler yapılır [20].

Mikrolenfositotoksosite yöntemi ile çapraz karşılaştırma (CDC-LCM)

Bu yöntemde hasta serumu ile verici lökositleri karşılaştırılır. Verici hücreleri ile hasta serumundaki antikorlar bağlanır ve kompleman eklenerek sitotoksosite varlığı değerlendirilir. HLA analizinde de kullanılan bu test ile *sanal nakil* yapılmış gibi düşünülebilir ve pozitif reaksiyon gözlenmesi rejeksiyon gelişebileceğini düşündürür.

CDC-LCM testi, antikor aracılıklı hiperakut rejeksiyonun öngörülebilmesine imkân verir. DSA tayini için CDC-LCM testi altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat düşük düzeydeki HLA antijenlerine karşı DSA'ların saptanabilmesi için yeterli derecede duyarlı değildir [20].

Eklenen DTT ile Ig M tipi antikorların pentamerik yapıları parçalanarak sadece Ig G tipi antikora özgü sitotoksosite gözlenmesi sağlanmaktadır [13].

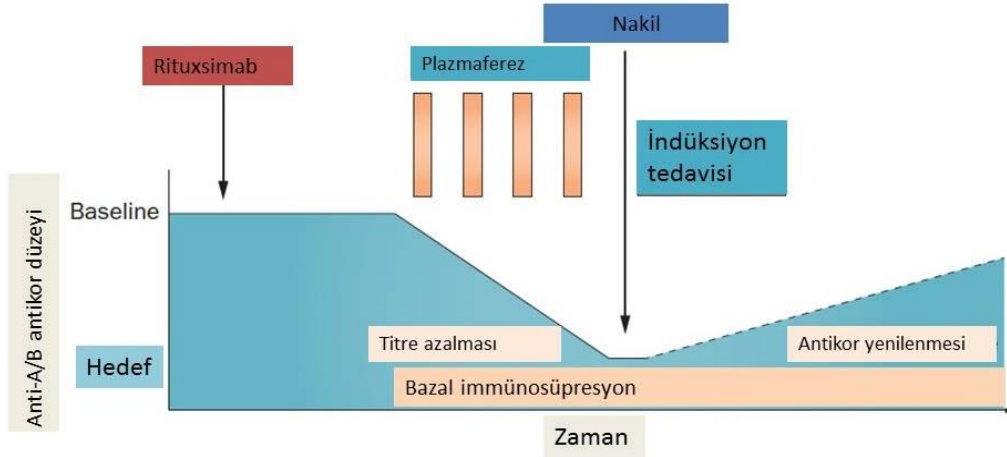
Akım sitometri yöntemi (Flow cytometry crossmatch, FC-LCM) donör lökositlerinin floresan T hücre ve B hücre belirteçleri ile (CD3, CD20) işaretlendikten sonra alıcıda bu hücrelere yönelen antikor varlığı, ikinci bir insan antikoruna karşı reaksiyon veren floresan işaretli antikor ile işaretlenerek belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Negatif kontrol serumuna göre değerlendirilir. Özgüllüğü yüksektir.

B hücre FC-LCM yüksek arka plan antikor bağlanması hedef lenfositlerinin pronase ile inkübe edilmesiyle azaltılabilir [45].

2.1.4.Böbrek naklinde immünsüpresif tedavi

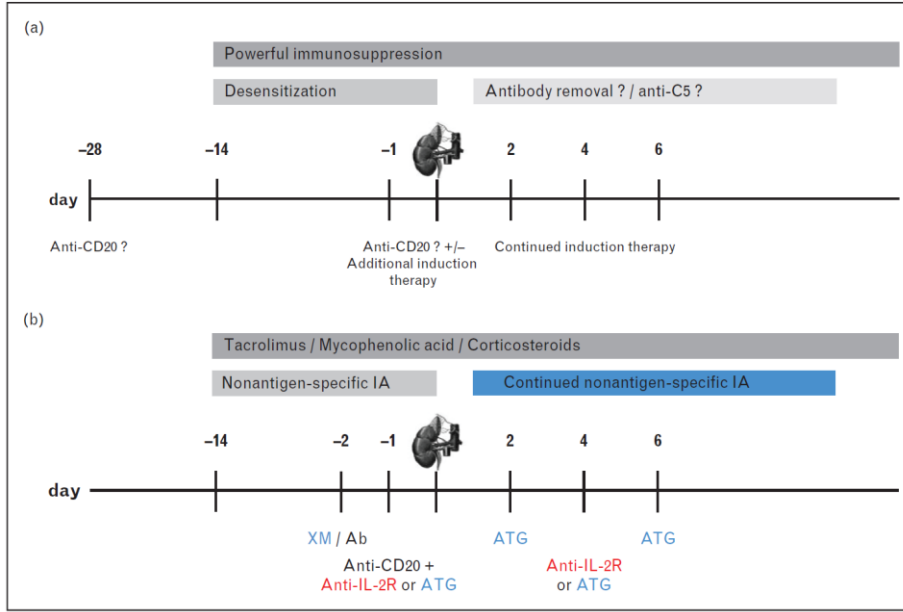
Böbrek naklinde verici ve alıcı arasında doku uyumu ne kadar fazla olursa erken dönemde akut rejeksiyon ve geç dönemde immünolojik nedenli kronik greft hasarı gelişiminin o kadar düşük oranda gerçekleştiği günümüzde klasik bilgi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle birden fazla canlı verici aday var ise mümkün olan en iyi doku uyumu olan verici seçimi hedeflenmelidir. Bu koşulun sağlanamadığı doku uyumu tam olmayan canlı verici veya kadavradan böbrek nakli de immünosüpresif tedavi ile başarılı bir şekilde

yapılmaktadır. ABO uyumsuz bir nakil için alıcı desensitizasyon elemanları Şekil 2.2’de sunulmaktadır [36].



Şekil 2.2 ABO uyumsuz nakilde alıcı desensitizasyon elemanları [36]

İmmünosüpresyonda esas amaç alıcıda ilaçların minimal yan etkisiyle grefte karşı özgül bir farmakolojik tolerans oluşturma ve ret oluşumunu engellemektir. Gerçek bir tolerans uzun dönemde, çoğu alıcıda oluşmadığından ilaçların kesilmesi genelde akut rejeksiyon ile sonuçlanmaktadır. 1980’lere kadar özgül olmayan immün sistem baskılayıcı tedaviler uygulanmakta iken günümüzde verilen tedavilerin özgüllüğü giderek artmaktadır. Kombine ilaç kullanımı hem yan etki oluşumunu azaltmakta hem de sinerjistik etki göstererek immünosüpresyonu artırmaktadır [13]. Fiziksel olarak plazmaferez, radyasyon, duktus torasikus drenajı, splenektomi, timektomi, kan transfüzyonları kullanılmıştır. Farmakolojik olarak steroidler, kalsinörin blokörleri, mTOR inhibitörleri, (RAPA- Everolimus), de novo nükleotid sentez inhibitörleri (Aza-MMF-Siklofosamid), pirimidin sentez inhibitörleri (Brequinar sodyum-Leflunemide), dolaşımdaki lenfosit trafiğini değiştiren greften uzak tutan FTY720, protein yapısındaki biyoilaçlar (ATG- ALG- monoklonal anti İL2 antikorları- OKT3- IVIG), peptidler (kostimülatör blokörleri- intraselüler adezyon molekül blokörleri) klinikte kullanılabilmektedir [13].



Şekil 2.3: Canlı donör nakli için desensitizasyon protokolü [37]

Başarılı immünsüpresif tedavinin ortak hedefleri T hücre aktivasyonunu önlemek, sitokinlerin yapımı, aktivasyonu ve ekskresyonuna engel olmak, endotel hücre aktivasyonunu ve antijen ekspresyonunu önlemektir [13]. İndüksiyon, idame ve ret tedavisi olarak farklı amaçlarla bu ilaçlar kullanılmaktadır. Eğer alıcı PRA negatif ise lenfosit deplesyonu yapmayan ilaçlar, eğer PRA pozitif ise lenfosit deplesyonu yapan ilaçlar ile indüksiyon uygulanmaktadır [42]. Şekil 2.3’de örneği gösterilen desensitizasyon protokollerinin geliştirilmesi ile nakil başarısının artırılması hedeflenmektedir [37].

Hastanın nakil öncesi rejeksiyon riski durumu belirlenerek immünsüpresif tedavi politikasının belirlenmesi hastanın tedavisinde başarıyı artıracaktır. Başarılı bir immün süpresyon oluşturulması için çizelge 2.4’de belirtildiği gibi kombinasyon tedavileri tercih edilebilir [27].

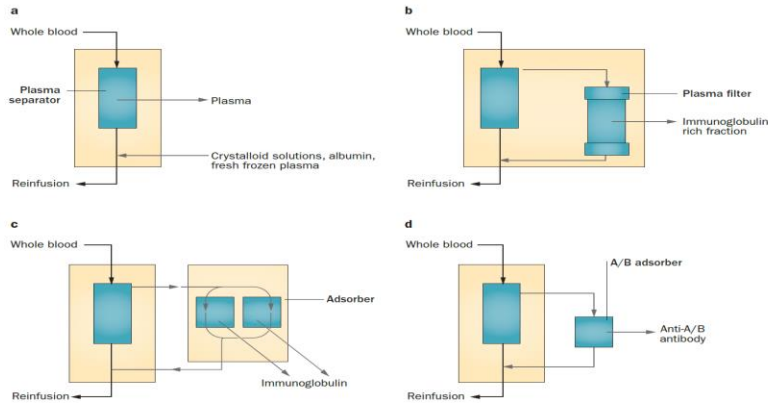
Çizelge 2.4: İmmünolojik risk durumuna göre immünosüpresif tedavi önerileri [27]

	İmmünolojik risk durumu	Yorum
İndüksiyon	Düşük/ orta risk	İL-2R antagonist
	Yüksek risk ^a	T-hücre deplezyon tedavisi
Kalsinörin inhibitör (CNI) tedavisi	Düşük/orta risk	CNI kesilmesi genellikle tavsiye edilmez (belatacept ile mümkün olabilir) Transplanttan itibaren düşük doz CNI + mTOR inhibitörü uygulanması uygundur
	Yüksek risk ^a	Standart CNI protokolü genellikle tavsiye edilir
Steroid kesilmesi	Düşük/orta risk	Erken steroid kesilmesi (<7 gün) CNI olarak takrolimus ile olasıdır ve indüksiyon tavsiye edilir. T-hücre deplezyon tedavisi, İL-2RA ile indüksiyona tercih edilebilir.
Desensitizasyon ^b	ABO uyumsuz canlı donör transplantasyonu	Rituximab ± IVIG ± plazmaferez ya da immunoabsorpsiyon
	DSA ile sensitize hastalar	IVIG ± rituximab ± plazmaferez ya da immunoabsorpsiyon ± T hücre deplezyonu ile indüksiyon

^a Örneğin: retransplantlar, önceki gebelik, kan transfüzyonu, HLA-antikor pozitifliği^b Genellikle canlı verici transplantasyonunda

Plazmaferez

Nakil öncesi HLA ve ABO antikorlarının uzaklaştırılması için kullanılan yöntemler standart plazmaferez, çift filtrasyon plazmaferez ve antijene özgül ve antijene özgül olmayan immünoabsorpsiyondur (şekil 2.4) [36]. HLA uyumsuzluğu durumunda nakil öncesi düşük doz IVIG replasmanı ile birlikte plazmaferez kombinasyonu önerilmektedir [36-37].



Şekil 2.4: Anti-A/B antikor uzaklaştırılması için aferez teknikleri

- a) plazmaferez, b) çift filtrasyon plazmaferez,
c) yarı seçatif immünoadsorbsiyon, d) ABO özgül immünoadsorbsiyon [36]

Plazmaferez tedavisinde plazmaferez cihazı ile antikorlar, immüno kompleksler gibi büyük molekül ağırlıklı maddeleri plazmadan temizlenir. Plazma separatorü ya da santrifüj kullanılarak hastanın plazması temizlenir ve hasta taze donmuş plazma, kristalloid solüsyonu ya da albümin ile desteklenir. Şekli elemanlar hastaya geri verilir. Çift filtrasyon plazmaferezde hücrelerden ayrıldıktan sonra plazmadaki immünglobulinden zengin plazma bölümü için ikinci kez filtrasyon uygulanır. İmmünoadsorbsiyon işlemini ise replasman sıvısına gereksinim olmadan ve pıhtılaşma faktörleri ve kompleman eksilmeden, plazmadan yalnız immünglobulinleri uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. ABO seçatif immünoadsorbsiyon, A ya da B kan grubu antijenleri için antijene özgül adsorber kullanılarak bu antijenlerin uzaklaştırılması işlemidir (şekil 2.4) [36]. Plazmaferez tedavisi böbrek nakli hastalarında ABO uyumsuzluğu durumunda, yüksek sensitize hastalarda transplant öncesi dönemde, akut hümorale rejeksiyonlarda diğer tedavilere ek olarak uygulanabilir [49].

Splenektomi

Farmakolojik anti-B hücre tedavilerinin öncesinde splenektomi HLA ve ABO uyumsuz böbrek nakli öncesinde B lenfosit sayısının azaltılmasına yönelik tedavinin bir parçası olarak kullanılmaktayken son zamanlarda cerrahi risk ve sepsis riski nedeniyle yerini anti-CD20 antikor Rituximab'a bırakmıştır [50]. Fakat bazı merkezlerde halen tercih edilmektedir. Refrakter antikor aracılı rejeksiyon sonrası iyi sonuçlar bildirilmiştir [37, 50].

Rituximab

Rituximab kimerik anti-CD20 monoklonal antikordur. *Farmakolojik splenektomi* olarak da adlandırılmaktadır. Selektif olarak B hücrelerini direkt olarak sitotoksik hücre ölümüyle, antikor aracılı sitotoksikiteyle ve indirekt olarak da apoptoz yoluyla ortadan kaldırır. Klinikte lenfoma tedavisinde kullanılmakta olan bu ajan LCM pozitif veya ABO uyumsuz böbrek nakillerinde desensitizasyon protokollerinde ve akut hümoral rejeksiyonda kullanılmaktadır [13].

Kalsinörin inhibitörleri (Siklosporin A, Takrolimus)

1980'lerin başında siklosporin A'nın kullanıma girmesiyle kalsinörin inhibitörleri (CNI) standart tedavide sık olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ana etki olarak Th (yardımcı T hücre) üzerine etki eder, İL-2 yapım ve sekresyonunu engeller. Terapötik indeksi dar bir ilaç olduğundan dozu kan düzeyi ile hastaya göre planlanır [13]. Siklosporin kullanımı ile akut rejeksiyonda ciddi düşüş gözlenmesi ve greft ömründe belirgin uzama neticesinde immünosüpresyonda devrim yaratmıştır. 1994'de FK 506-Takrolimus kullanıma girmiştir. Siklosporin A'ya kıyasla daha az yan etki gelişmesi ve daha etkili olması nedeni ile takrolimus son yıllarda immünsupresif protokolün merkezine oturmuştur [42]. Özellikle MMF, takrolimus ve steroid kombinasyonu birçok merkez tarafından standart immünsupresif protokol olarak uygulanmakta ve akut rejeksiyonların ciddi oranda azaldığı görülmektedir [51].

De novo nükleotid sentez inhibitörleri (Mikofenolat Mofetil "MMF" ve Azatiopürin)

Azatiopürin DNA ve RNA sentezini önleyen pürin sentez inhibitörü bir antiproliferatif ajandır. 1960'lardan beri steroidlerle kombine olarak kullanılmaktadır. Kemik iliği baskılaması en önemli yan etkisidir. Azatiopürinin yerini günümüzde hemen hemen tamamen MMF almıştır ve bunun enterik salınım formu da güncel immünosüpresyonda kullanılmaya başlanmıştır [52-53]. Fakat halen düşük dozda azatiopürin, steroid ve siklosporin A ya da takrolimus ile kombine olarak sinerjistik etki yaratmak amacıyla

kullanılmaktadır [13].

MMF, uyarılmış T ve B lenfositlerin pürin nükleotid sentezini inhibe ettiği için selektif spesifik etkili bir immünoşüpresiftir. Primer antikor cevabını durdururken sekonder antikor cevabına etkilemez. Endotel selektin yapımını baskılayarak mononükleer hücrelerin endotele yapışmasını ve kandan grefte geçişini önler. Sitokin yapımını inhibe ve modifiye eder. Damar duvarındaki media tabakasında düz kas hücre proliferasyonunu engeller [13]. Kemik iliği toksisitesi azatiopürine göre daha azdır. MMF'nin azatiopürin ile karşılaştırmalı çalışmalarda daha düşük akut rejeksiyona neden olduğu belirtilmektedir [42].

Steroid

İmmünoşüpresyon tedavisinde temel ilaçlardan birisi kortikosteroiddir. Antijenin fark edilmesini, işlenmesini ve prezantasyonunu inhibe ederler. Özellikle akut rejeksiyon ve indüksiyon tedavisinde immün sistem üzerine olan baskılayıcı etkileri önemlidir [13]. Steroidler immün aktivasyonun hemen tüm aşamalarını baskılamada etkindir. Aynı zamanda primer glomerüler patolojinin tekrarlamasının önlenmesinde de etkin olan ilaçlardandır. Kılavuzlara bakıldığında steroidsiz bir rejim uygulanacaksa indüksiyon uygulanan hastalarda ve tercihen ilk 1 haftada steroid tedavisinin kesilmesi önerilmektedir. Bununla gerek infeksiyöz gerekse steroid ile ortaya çıkan yan etkilerden kaçınılması amaçlanmaktadır [44].

Steroidlerin özellikle İL-1, İL-4, İL 6 etkinliğini inhibe etmesi, İL-2 salınımı durdurması, lökosit migrasyonunu inhibe etmesi önemli immünolojik mekanizmalardandır. Geçmişte steroidlerin kombinasyon tedavisindeki yeri önemliyken, selektif etkili immünoşüpresiflerin geliştirilmesi ile yan etkileri nedeniyle yeri tartışılmaya başlanmıştır [13]. Fakat klinikte indüksiyon ve akut rejeksiyon tedavisinde intravenöz bolus şeklinde 3 gün 500 mg metilprednizolon uygulaması halen kullanılmaktadır. Steroidli rejimlerde ilk aylardan sonra steroidin kesilmesi sonrasında ise akut rejeksiyon artışının dikkat çekici olabildiği bildirmiştir [54-55].

mTOR (mechanistic target of rapamycin) inhibitörleri

Sirolimus (SRL, Rapamisin RAPA) ve Everolimus (ERL) sitokin reseptör (İL-2, İL2R) ilişkisini bloke ederek lenfositlerin lenfokine cevabını ve T hücre proliferasyonunu engeller. Sirolimus T hücre proliferasyonunun G0-G1 fazlarını bloke ederek fonksiyon gösterir [13]. Günümüzde mTOR inhibitörleri özel seçilmiş hasta gruplarında tercih nedeni olabilecek ilaçlardır. Kaposi sarkomu gelişen böbrek nakli alıcıları, posttransplant diyabetes mellitus, posttransplant lenfoproliferatif hastalık veya solid organ malignitesi gelişen hastalar bu özel grup hastaları oluşturmaktadır [42]. Brequinar sodyum, Mizoribine, Leflunomide, 15-deoksipergualin, FTY720 klinikte ve çalışmalarda kullanılan diğer mTOR inhibitörleridir [13].

İntravenöz İmmünglobulinler (IVIG)

IVIG immünomodülatör etkiye sahiptir. Transplantasyonda 1990'larda kullanılmaya başlamıştır. LCM pozitif ve ABO uyumsuz nakillerde desensitizasyon amaçlı kullanılmaktadır. Kompleman aktivasyon ve efektör fonksiyonlarının inhibisyonu, sitokin kaskadının, T ve B lenfosit fonksiyonlarının inhibisyonu, dendritik hücre fonksiyonunun modülasyonu gibi birçok mekanizma ile etki gösterdiği düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda HLA uyumsuz böbrek nakillerinde desensitizasyonda IVIG'in tek başına etkili olduğu belirtilmektedir [37, 56].

Monoklonal Lenfosit azaltan antikorlar (OKT3, Alemtazumab)

Alemtazumab (Campath 1H)

İnsansılaştırılmış monoklonal CD-52 antijenine karşı oluşturulmuş sıçan Ig-G2b antikorudur. 1998'den beri nakilde kullanılmaktadır. Güçlü sitolitik aktivite gösterir. Sitotoksik hücre ölümü ve antikor bağımlı sitotoksite ve apoptoz indüklemesiyle etkiler [13, 56].

OKT3

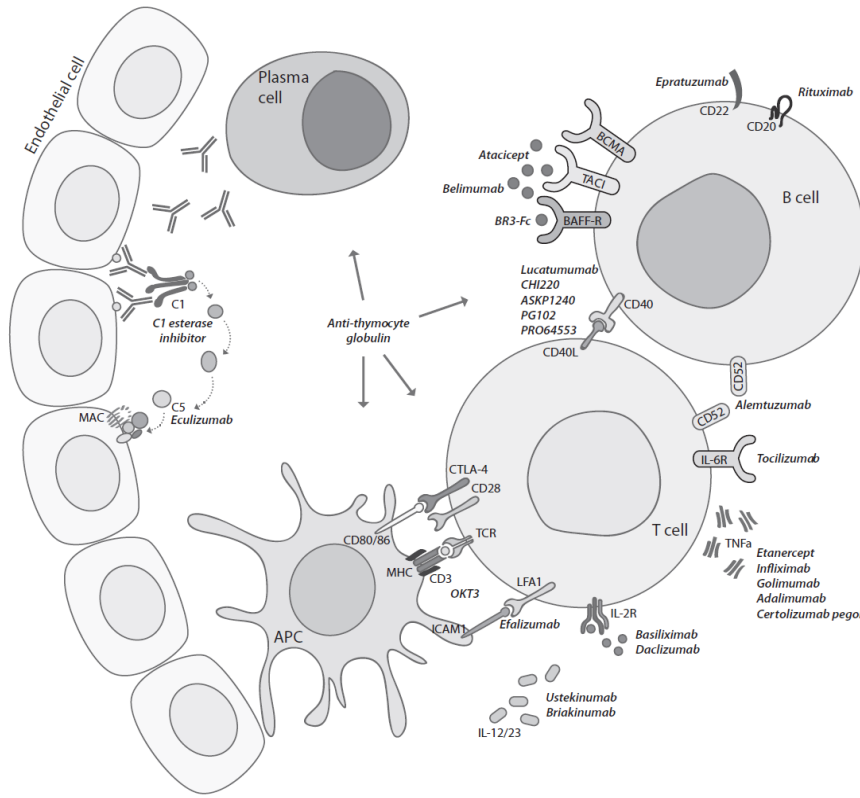
OKT3 (muromonab-CD3) ilk anti-CD3 monoklonal antikorudur. 1970'lerin sonunda Kung ve arkadaşları tarafından üretilmiştir [56]. Sadece aktive T hücrelerin üzerinde bulunan CD3 reseptörüne etkileyerek selektif etki gösterir. Akut rejeksiyon tedavisinde kullanılabilmektedir [13].

Poliklonal lenfosit azaltan antikorlar (Timoglobulin, ATGAM)

İnsan lenfositlerine karşı sensitize edilmiş tavşan veya at serumlarından izole edilen Ig G fraksiyonlarıdır. Periferik lenfositlere bağlanarak, fonksiyonlarını bozarak ya da yok ederek etki gösterirler. Kompleman yardımıyla lenfosit yıkımına ya da antikora bağlı sitotoksositeye yol açarlar [13].

Diğer immünsüpresif ajanlar

Efalizumab, LEA29Y (Belatacept), FK778, CP-690, AEB071, Atacicept, Etanercept, İnfliximab, Golimumab, Adalimumab, Certalizumab, Ustekinumab, Briakinumab, Epratuzumab, Belimumab, Lucatomumab, Eculizumab (kompleman C5 inhibitörü), Bortezomib (proteozom inhibitörü), Daklizumab, Basiliximab immün sistemin değişik basamaklarında etkili, yeni geliştirilen immünosüpresif ajanlardandır (şekil 2.5) [37, 56-57].



Şekil.2.5: Organ transplantasyonunda kullanılan tedavi ajanlarının biyolojisi [57]

2.2.Böbrek Naklinde Rejeksiyon İmmünolojisi

Organ naklinde başarısızlığın en önemli nedeni nakledilen organın alıcının immün sistemi tarafından reddedilmesidir. Rejeksiyon olarak adlandırılan bu süreç karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir [2].

Karmaşık bir dizi olayın beraber gerçekleştiği rejeksiyon sisteminde, doğal ve kazanılmış immün sistem yanıtları ile hücresel ve salgısal (hümorale) mekanizmalar birlikte yer almaktadır.

Normal koşullarda esas görevi antijen sunucu hücrelerde (APC) ve enfekte hücrelerde patojenin epitopunun T hücrelerine sunulması olan MHC molekülleri doku ve organ naklinde benzer mekanizmaları aktive ederek verici-alıcı uyumsuzluğunda nakledilen dokudaki antijenlerin tanınmasına ve yok edilmesi için T lenfositlere sunulmasına aracılık ederler.

Daha sonra ayrıntılandırılacak olan immünolojik rejeksiyon mekanizmalarını kısaca şöyle özetleyebiliriz:

- 1.Nakil sonrası uyumsuzluk durumunda, nakledilen doku alıcı bağışıklık sistemindeki MHC'ler tarafından hemen tanınmaya başlar. Sonrasında bu dokuda Tc (sitotoksik T hücre) lenfositlerin etkisiyle hızlı bir parankimal ve endotelial yıkım başlarken Th lenfositlerin etkisiyle damar geçirgenliği artışı ve mononükleer hücre göçü gözlenir. Başta makrofajlar olmak üzere tüm hücreler dokuda hızlı bir iskemi ve yıkımı başlatarak dokunun nekrozuna neden olurlar.
- 2.Antikora bağlı rejeksiyonlarda, nakledilen dokudaki MHC'lere karşı üretilen alloantijenler, kompleman sisteminin de katkısıyla rejeksiyona neden olurlar.
- 3.Doğal bağışıklık sürecinde APC'ler içinde yer alan dentritik hücrelerin (DC) nakledilen dokuda aktive olup alıcı lenf nodlarında kazanılmış bağışıklık sistemini aktive etmesi de rejeksiyonda önemlidir.
- 4.T hücreleri verici MHC moleküllerini direkt olarak APC'leri aktive ederek veya indirekt olarak alıcı APC üzerindeki kendi MHC'leri ile etkileşerek aktive edebilir. Bununla birlikte indirekt aktivasyon daha geç işleyen bir süreçtir. Dolayısıyla akut rejeksiyonda direkt tanıma etkinen uzun süreli rejeksiyonda indirekt tanıma daha önemlidir [58].

2.2.1.Doğal bağışıklık sistemi ve iskemi-reperfüzyon hasarı

İskemi reperfüzyon hasarı (Ischemia/reperfusion injury; IRI) organda kan akışı kısıtlandıktan sonra kan akımının düzenlenmesini ve yeniden oksijenlenmeyi takiben gelişir. İnfarkt, sepsis ve organ nakli sonrası gelişebilir ve reaktif oksijen radikalleri (ROS), sitokinler, kemokinler ve lökosit aktivasyonu yoluyla bir inflamasyon kaskadını başlatarak doku hasarı oluşturur [59-60].

Kadavradan yapılan nakillerin başarısının az olmasının nedeni, beyin ölümü sonrası sempatik aktivitenin hızla artması ve sona ermesi nedeniyle verici organ damarlarında ani daralma ve genişleme ile iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturmaktadır [61]. Nakillerde gerek IRI, gerek cerrahi girişim etkisi, doğal bağışıklık sistemini uyaran bazı faktörlerin (HSP70, HMGB1, ROS, ATP, hiyaluronik asit, heparan sülfat ve fibrinojen) üretilmesine yol açar. DAMP (Damage Associated Molecular Pattern molecules) olarak adlandırılan ve

inflamasyonun erken döneminde aktivasyona yol açan bu faktörler; hücrelerin ölümüyle, strese maruz kalmasıyla ya da hücre dışı matriksin parçalanmasıyla ortaya çıkarlar. İmmün yanıtın başlaması için PRR (Pattern recognition receptor)'ler tarafından DAMP'ların tanınması gerekmektedir [60]. DAMP'ların inaktif NALP3 (DAMP'ların başlıca ligandı)'e bağlanması ile inflamazom kompleksi meydana gelir. İnflamazom kompleksi, TLR (Toll Like Receptor) uyarımı ile hücrede üretilen inaktif İL-1b ve İL-18 öncüllerinin aktif İL-1b ve İL-18'e dönmesini sağlar. Üretilen bu sitokinler kazanılmış bağışıklık yanıtının uyarılmasında önemli rol oynar, steril bir inflamasyon meydana getirir [62].

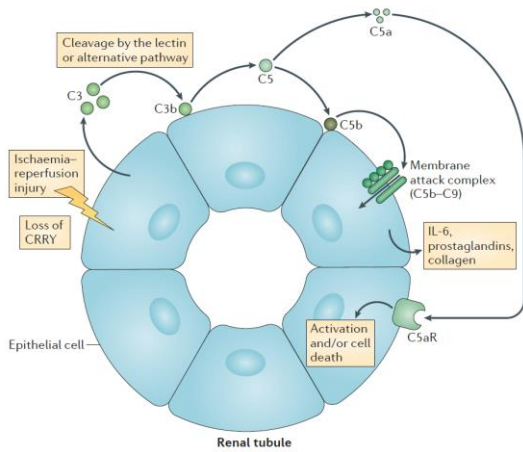
Rejeksiyonda doğal immün yanıt T lenfositler ve antijen sunucu hücrelerin iletişimde majör öneme sahiptir. T lenfositlerin doğal immünite aktive olmadan rejeksiyona yol açması olanaksızdır [60].

Nakil sürecinde doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonu sonucu lokal olarak üretilen çeşitli moleküller (sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, kompleman proteinleri) organda inflamatuvar değişikliklere yol açar; endotel hasarı ve damar geçirgenliğinde artış olur, lökositler toplanır. Proinflamatuvar sitokinler ve İL-6 ve TNF- α IRI'de renal hasar oluşumunda majör rolü oynar. Janus kinaz/sinyal yolu aktivasyonu ve JAK/STAT yolağının aktivasyonu hasarın ilerlemesini sağlar [59]. Makrofajlar ve nötrofiller bir taraftan nekrotik hücreleri ortadan kaldırmaya çalışırken, diğer taraftan salgıladıkları enzimler ve ROS ile greft hasarına katkıda bulunurlar [62]. İskemi sırasında oksijen kesintisi ile mitokondrial oksidatif fosforilasyon baskılanır, bu olay yetersiz ATP sentezine ve enerji bağımlı hücresel süreçlerin engellenmesi ile hücre ölümüne neden olur. Mitokondriler hücre içi ROS'un ana kaynağıdır. ATP eksikliğinde hücre içindeki kalsiyum hücre dışına taşınamaz ve hücre içi biriken kalsiyum apoptozu başlatır. Ayrıca artan nitrik oksit de hücre hasarına katkıda bulunur. Renin anjiyotensin sistemi aktivasyonu da iskemiye yardımcı olur [59].

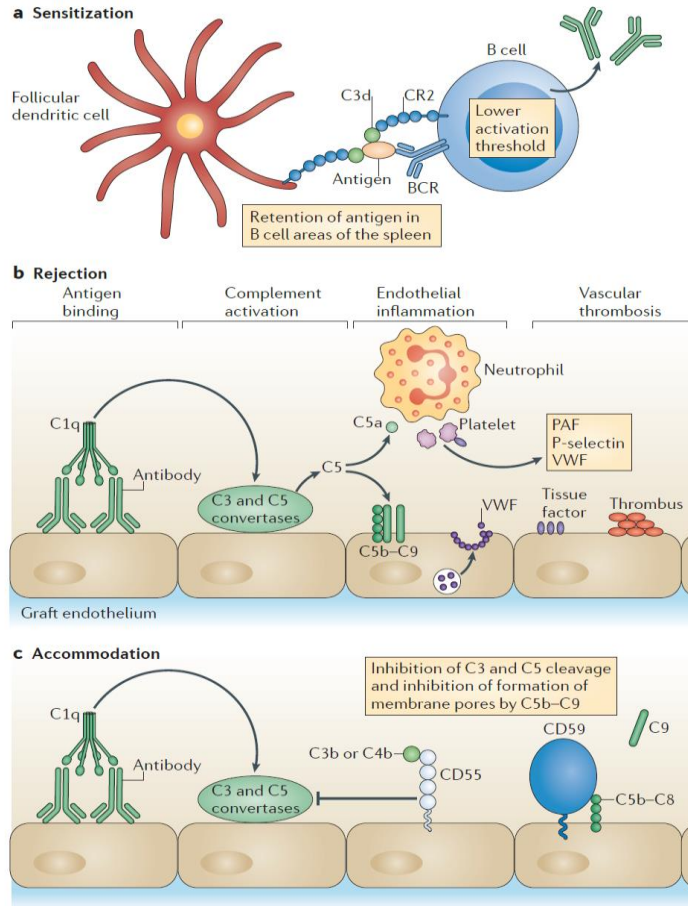
Doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücreler de yabancı hücreleri algılayan reseptörleriyle (KIR, NKG2A/CD94) uyarılarak greft hasarını artırır [63]. Doğal bağışıklık sisteminin üyesi olan NK hücreleri, kazanılmış immün yanıtı uyarmada farklı yolları kullanarak akut rejeksiyonda rol oynamaktadır. NK hücrelerinin, antijen sunucu hücrelerden özellikle DC'lerin olgunlaşmasında, T hücre eliminasyonunda, salgıladıkları İFN- γ ile CD4+ T hücrelerinden Th1 yanıtın gelişiminde ve direkt NK:CD4+ T hücre reaksiyonu ile CD4+ T

hücre aktivasyonunu arttırmadaki rolleri sonucu potansiyel greft yıkıcı akut T hücre reaktivitesinde rol alırlar [64]. Aktive NK hücrelerinin akut rejeksiyon sürecinde, İFN- γ ve TNF- α gibi proinflamatuar sitokinleri salgılayarak etkili oldukları ileri sürülmektedir [59].

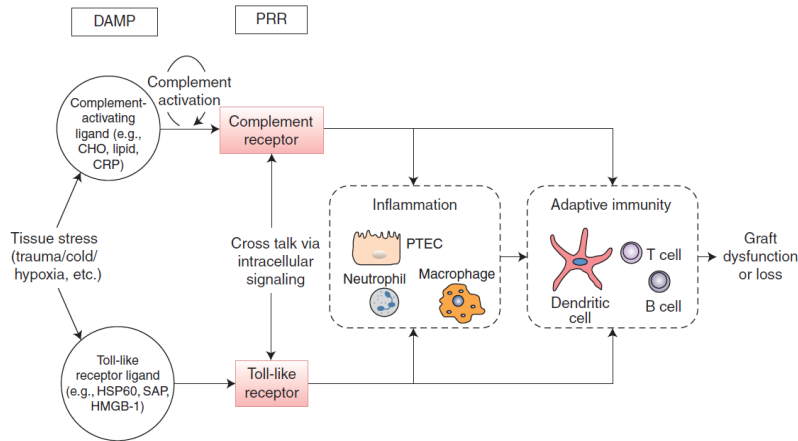
Lokal olarak üretilen kompleman proteinlerinin aktivasyonu da birkaç farklı yol ile (şekil 2.6-2.9) organ nakli sonrası greft hasarına neden olan mekanizmalardandır [59, 65]. Bu proteinlerin aktivasyonu ile açığa çıkan parçalanma ürünleri, hedef hücreleri opsonize ederek fagositik hücreler tarafından temizlenmelerini sağlar. Bu arada anafilatoksin olarak adlandırılan ürünler (C3a, C4a, C5a) damarlarda genişlemeye neden olur, lökositleri inflamasyon alanına çeker. Aktivasyonun son basamağında ortaya çıkan membran atak kompleksi (MAC; C5b-9) ise hedef hücrelerin lizisine yol açar [59, 62]. Ayrıca şekil 2.6-2.9'de şematize edildiği şekilde İL-6, TNF, prostaglandinler, ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), doku faktörü (tissue factor; TF) ve kolajen gibi proinflamatuar ve profibrotik faktörlerin salınımına ve/veya ekspresyonuna yol açarak akut inflamasyona katkıda bulunur [65-67].



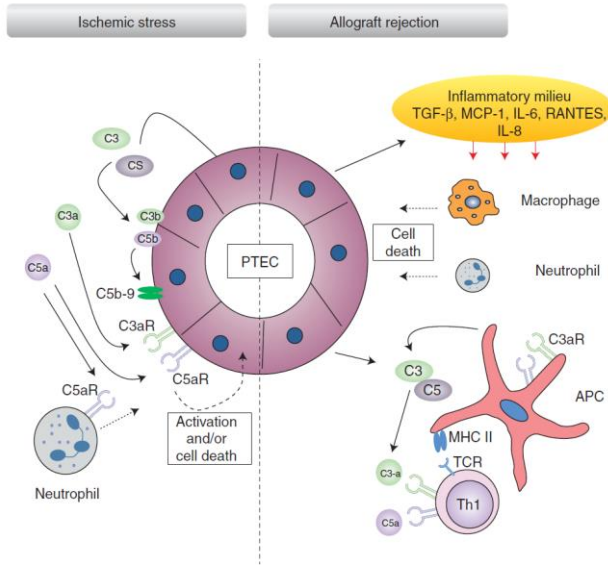
Şekil 2.6 Doku stresine renal epitel hücresinin kompleman cevabı için fizyolojik model [65]



Şekil 2.7: Kompleman tarafından modifiye edilen antikor bağımlı yanıt için önerilen bir mekanizma modeli [65]



Şekil 2.8: Doğal bağışıklık reseptörleri ile gelişen hasar [66]



Şekil 2.9: Graft hasarı ve iskemi reperfüzyon gelişimine karşı böbrekte gözlenen immün aktivasyon [66]

2.2.2.Kazanılmış bağışıklık sistemi

Rejeksiyon için tek başına doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonu yeterli değildir. Antijen sunma yeteneği artan DC'ler kazanılmış bağışıklık sisteminin uyarılmasında köprü görevi görür. Vericinin uyumsuz olan doku antijenlerine karşı hücrel ve humoral bağışıklık yanıtı ortaya çıkar [62]. Rejeksiyonda majör öneme sahip olan T lenfositler ve APC'ler doğal immünite aktivasyonu ile olaya katılır [52].

Hücrel immün yanıt

Erken posttransplant dönem akut rejeksiyonda en etkin mekanizmadır. Tübüler epitel hücreleri veya vasküler endotel hücreleri hedef alan T lenfositler ile gerçekleşir. Akut hücrel rejeksiyonun temel mekanizması greft hücrelerinin Tc lenfosit aracılı ölümüdür. Endotel hasarında hem CD4+ hem de CD8+ T hücreler rol alır. Nakledilen organa karşı immün yanıtın başlıca hedefi MHC molekülleridir. Vericiye ait uyumsuz doku antijenlerinin alıcı T hücreleri tarafından tanınması bölgesel lenf nodlarında gerçekleşir ve başlıca 2 şekilde olur [62]:

- a) *Direkt* tanıma yolunda alıcı T hücreleri işlenmemiş verici MHC moleküllerini vericinin antijen sunucu hücresi üzerinde tanır. Yani verici DC yüzeylerindeki

uyumsuz majör doku antijenlerini doğrudan doğruya alıcı T hücrelerine sunar,

- b) *İndirekt* yolda ise işlenen ve alıcının kendi antijen sunucu hücresi üzerinde öz MHC ile peptid olarak sunulan verici antijeni tanınır. Yani alıcı DC öncelikle greftte bulunan uyumsuz majör ve minör doku antijenlerini yakalar, hücre içerisinde işledikten sonra yine alıcı T hücrelerine sunar.

T hücre aktivasyonu ile devam eden immün süreçler rejeksiyonla sonuçlanmaya neden olur [62, 68]. Organ nakli sonrası direkt ve indirekt tanıma ile başlayan rejeksiyon süreci, T hücrelerinin aktivasyonu, çoğalması ve farklılaşması ile devam eder. Nakil sonrası dönemde direkt tanıma ile gerçekleşen rejeksiyon süreci indirekt tanıma göre daha erken gerçekleşir. CD4+ T hücreleri HLA sınıf-II molekülleri eşliğinde sunulan antijenleri tanır, CD8+ T hücreleri ise HLA sınıf-I molekülleri eşliğinde sunulan antijenleri tanır.

T hücre aktivasyonu, T hücre reseptörü (TCR) ve CD3 moleküllerinin T hücre yüzeyinde oluşturdukları komplekse doku antijenlerinin bağlanması ile başlar (1. sinyal). Ancak bu bağlanma aktivasyon için yeterli değildir ve 2. sinyale ihtiyaç vardır. 2. sinyal için etkileşime giren hücrelerin yüzeylerinde başka moleküllerin¹ eksprese edilmesi ve birbirine bağlanması gerekir. T hücre aktivasyonunda 2. sinyal oluşturan moleküllere eş-uyaran moleküller denir.

Ligandları CD28 olan bu moleküllerin² CD28'e bağlanması, T hücrelerinde İL-2 sentezini uyarır. Üretilen İL-2, yüksek afiniteli reseptörü olan İL-2Ra (CD25)'ya bağlanarak otokrin ve parakrin etkiyle T hücrelerinin çoğalmasını sağlar. Bu 3. sinyal olarak tanımlanır [62, 69].

CD28 ve B7 molekülleri arasındaki etkileşimin diğer bir sonucu, T hücrelerinde CD40L üretilmesidir. Bu molekülün CD40'a bağlanması, dendritik hücre yüzeyindeki B7 moleküllerinin sentezini artırarak T hücre aktivasyonuna ilave bir katkı sağlar. T hücre aktivasyonunda pozitif yönde etki yapan diğer moleküler etkileşimler ICOS/ICOS-L ve OX40/OX40L arasında gerçekleşir. Eş-uyaran moleküller, aktive hücrelerin yüzeylerinde ifade edilen adezyon molekülleri ile birlikte immünolojik sinaps olarak adlandırılan

¹ Bu moleküller dendritik hücrelerde: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), CD40, ICOS-L (Inducibleco-stimulatory molecule ligand) ve OX40-L (CD252); T hücrelerinde: CD28, CD40L (CD154), ICOS ve OX40 (CD134) molekülleridir.

² B7.1 (CD80), dendritik hücre yüzeyinde uyarım sonrası ifade edilen bir moleküldür. B7.2 (CD86) ise hücre yüzeyinde yapısal olarak ifade edilen ve uyarım sonrası hızla artan bir moleküldür.

kompleks bir yapı meydana getirir [62].

Yabancı antijenlere karşı duyarlı hale gelen ve farklılaşan T hücreleri organ hasarına yol açarlar. Th hücre alt grupları salgıladığı sitokinlerle rejeksiyon sürecini yönlendirir. Th1 hücreleri İL-2 ve İFN- γ sekresyonu ile rejeksiyon sürecine katılan tüm hücreleri (monositler, makrofajlar, eozinofiller, NK hücreleri) aktive eder. Bu hücrelerden salgılanan NO, ROS, prostaglandin- E, lökotrienler, tromboksan ise greft dokusunda hasar meydana getirir. İL-4 üreten Th2 hücreleri grefte eozinofilleri çekerken, İL-17 üreten Th17 hücreleri nötrofilleri çekerek rejeksiyonda rol oynar. Tc hücreleri ise duyarlı oldukları yabancı antijenlerle karşılaştığında sitotoksik granül içeriklerini (perforin, granzim) salgılayarak hedef hücrelerin ölümüne yol açar [62, 70].

Kazanılmış bağışıklığın kendini sınırlama özelliği rejeksiyonun sonlandırılmasında önemlidir. Aktive olmuş T hücrelerinin yüzeyinde inhibitör bir molekül olan CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen- 4; CD152) artışı olur [71]. CD28 ile aynı aileden olan bu molekül de CD80 ve CD86'ya bağlanarak etkisini gösterir. Ancak bunun için CTLA-4 ve CD28 molekülleri arasında bir yarışma oluşur. CTLA-4'ün CD80 ve CD86'ya olan afinitesi CD28'e göre yaklaşık 20 kat daha fazla olduğundan, bu yarış CTLA-4 lehine sonuçlanır ve T hücre aktivasyonu baskılanır.

CD28 ile aynı aileden diğer bir inhibitör molekül olan PD-1 (programmed cell death-1)'nin ligandlarına¹ bağlanması da T hücrelerini baskılayan başka sinyallerin ortaya çıkmasına yol açar. İnhibitör moleküllerin artışı ile rejeksiyon süreci kontrol altına alınır ve iyileşme süreci başlar [62].

Alloantikorlar böbrekte atak için özellikle peritübüller ve glomerüler kapilleri tercih ederken, buna karşı T hücreler karakteristik olarak tübülleri ve arterial endotelyumu infiltre ederler [72].

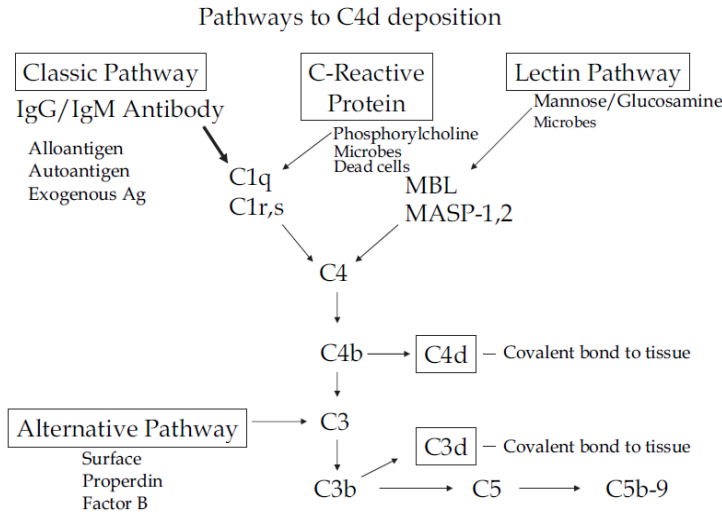
Hümmoral immün yanıt ya da antikor aracılı rejeksiyon

¹ PD-1'nin ligandları: PD-L1 [B7-H1], PD-L2 [B7-DC]

Rejeksiyonda bir diğerk mekanizma antikor aracılığı ile oluşur. Hümmoral immün yanıt antikor aracılı rejeksiyon genellikle duyarlanmış hastalarda görölür ve önceki kan transfüzyonlarına, çoklu gebeliklere ve önceki nakillere bağıdır. Alloantikorlar, alloantijenlere bağlanarak akut rejeksiyona yol açar. Özellikle greftin vasküler endotel hücrelerinde yıkımı ile sonuçlanan intravasküler tromboz ve endotelyal hasar görölür [68].

Tipik olarak HLA sınıf I ve II antijenlerine karşı oluşan antikorlar tarafından oluşur. Fakat sadece doku antijenlerine karşı gelişmiş antikorlarla meydana gelmez. ABO kan grubu uyumsuzluğu ile yapılan nakillerde alıcıda bulunan antikorlar (anti-A, anti-B) damar endoteline bağlanarak hızla kompleman sistemi aktivasyonuna ve endotel hasarına yol açar. Endotel hasarı sonucu açığa çıkan TF ekstrinsik yoldan koagölasyon sistemi uyarır ve greft damarlarında tromboz meydana gelir. Yabancı doku antijenlerine yüzeylerindeki BCR (B cell receptor) vasıtasıyla bağlanan B hücreleri, CD4+ T hücrelerinden aldıkları yardım ile çoğalarak alloantikor (anti-HLA antikor) üreten plazma hücrelerine farklılaşır [62, 73]. Bir kısım B hücresi de hafıza hücrelerine döner. Alloantikorların hedefi grefte ait damar endotelidir. Antijen- antikor kompleksi oluştıktan sonra greft hasarı ya kompleman sistemi klasik yol aktivasyonu (şekil 2.10) ile ya da Fc reseptör taşıyan hücrelerin (makrofajlar, nötrofiller, NK hücreleri) aracılık ettiğı antikora bağılı hücresel sitotoksiste ile gelişir. Alınan biyopsilerde kompleman sistemi aktivasyonunu gösteren C4d'nin tespit edilmesi, akut ve kronik rejeksiyonda antikor aracılı mekanizmanın önemli bir göstergesidir [68].

Bu bulgu günümüzde hümmoral rejeksiyonun güvenilir bir belirteci olarak kullanılmaktadır ve Banff sınıflandırmasının temelidir [2, 73]. Damarların tromboz nedeniyle tıkanması ise greft iskemisi veya infarktı ile neticelenir. Nakil sonrası saatler içerisinde gelişen bu süreç, hiperakut rejeksiyon olarak adlandırılır. Genel olarak antikor aracılı rejeksiyon T hücre aracılı rejeksiyondan daha kötü prognoza sahiptir ve farklı tedavi yaklaşımları gerektirir [72, 74].



Şekil 2.10: Rejeksiyonda kompleman aktivasyonu [70]

Kazanılmış bağışıklığın temel özelliklerden biri de uzun ömürlü hafıza T ve B hücrelerinin meydana gelmesidir. Bu hücreler önceden karşılaştıkları ve duyarlılık kazandıkları antijenlere yeniden maruz kaldıklarında daha hızlı ve daha güçlü bir yanıt ortaya çıkarır. Dolayısı ile hafıza hücrelerinin rol oynadığı rejeksiyon daha kısa süre içerisinde gerçekleşir ve daha fazla hasar meydana getirir. Organ nakillerinde ilk duyarlılığın kazanılması genellikle daha önce yapılan kan transfüzyonlarına, çoklu gebeliklere ve önceki nakillere bağlıdır [68].

Antikor aracılı rejeksiyon reaksiyonlarında, reaksiyonları başlatan olayın HLA veya non-HLA antijenlere karşı antikor oluşumu olduğu düşünülmektedir. Anti-HLA antikorların (DSA) nakledilen böbrekte kompleman ilişkili ve antikor bağımlı hücrel sitotoksosite ile hasara neden olduğu bilinmesine karşın non-HLA antikorların böbrek naklinde erken ve geç dönemdeki etkilerinin önemi belirsizliğini korumaktadır [6, 75]. Birçok non-HLA antikor çalışılmıştır fakat hangi HLA dışı antikorların nasıl reaksiyona yol açtığı konusu tam aydınlatılmamıştır. Hücrel hedef olarak anti endotelial hücre antikorları (AECA), antijenik hedef olarak majör histokompatibilite kompleksi sınıf-I zinciri ilişkin Gen A ve B antijenleri (MIC-A ve MIC-B), dokuya özgü oto antijenlerden vimentin, kardiyak miyozin, kardiyolipin, kollajen V, k-alfa-1 tubulin, glomerüler bazal membran proteini agrin, Perlekanın LG3 fragmanı, glutathione S-transferase T1, AT1R en çok çalışılan non-HLA hedeflerdendir [73-74, 76-79].

2.2.3.Böbrek naklinde rejeksiyonun klinik tabloları

Böbrek naklinde rejeksiyonlar ortaya çıkış süresine bağlı olarak hiperakut, akut, kronik rejeksiyon olmak üzere 3 ana başlıkta toplanır. Bu üç farklı tabloda çizelge 2.5’de belirtildiği gibi farklı klinik ve farklı patolojik bulgular gözlenir [72]. Greft yıkımına yol açan immünolojik olayların ana mekanizmaları, hücre aracılı sitotoksiste, gecikmiş tip hipersensitivite ve antikor bağımlı hücresel sitotoksistedir.

Çizelge 2.5 Antikor aracılı böbrek transplant patolojisi [70]

Tam	Klinik görünüm	Histoloji	C4d	Seroloji	Sonuç
Hiperakut rejeksiyon	Ani greft yetmezliği (dakikalar saatler) reperfüzyon sonrası	PTC ve glomerüllerde nötrofiller; hemoraji, nekroz, tromboz	Pozitif PTC; erken dönemde negatiflik görülebilir	Çoğunda anti-donör HLA ya da ABO pozitif	Neredeyse her zaman geri dönüşsüz
Akut hümorale rejeksiyon	Greft fonksiyonunun hızlı kaybı (günler), transplant sonrası herhangi bir zaman	Değişken. PTC ve glomerüllerde nötrofil ve makrofajlar; fibrinoid arteriyel nekroz, akut tübüler hasar ± hücre aracılıklı rejeksiyon	Pozitif PTC; değişken glomerüller	Çoğunda anti-donör HLA (sınıf I ve/veya II) ya da ABO pozitif (yaklaşık 90%)	Sıklıkla uygun tedavi ile geri dönüşü olabilir
Kronik hümorale rejeksiyon	Greft fonksiyonunun yavaş, ilerleyen kaybı (aylardan yıllara), sıklıkla hipertansiyon ve proteinüri ile beraber	GBM duplikasyonu, PTC ve glomerüllerde mononükleer hücreler, intimal fibrozis, tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis, PTC basement membran multilaminasyonu (EM ile)	Pozitif PTC (sıklıkla yama tarzı), glomerüller değişken olarak pozitif, bazen sadece glomerüllerde pozitif	Çoğunda anti-donör HLA pozitif, özellikle sınıf II MHC Ag	Optimal tedavi henüz tam olarak tanımlanmamıştır
Konaklama (Accommodation)	Normal greft fonksiyonu	Normal, ya da minör değişiklikler	Pozitif PTC, değişken glomerüller	Sıklıkla ABO uyumsuzluğu ile ilişkili, nadiren HLA Ab	Optimal tedavi henüz tam olarak tanımlanmamıştır

EM, electron microscopy; GBM, glomerular basement membrane; PTC, peritubular capillary.

Hiperakut Rejeksiyon

Alıcıda önceden duyarlılaşma sonucunda ortaya çıkan antikorlara bağlı olarak nakli takip eden dakikalar ya da saatler içerisinde ortaya çıkan bir immün reaksiyondur. Bu rejeksiyon tipinde daha ameliyat sırasında damar anastomozu yapılır yapılmaz nakledilen organın görünüşünde değişim ve bozulma dikkati çekebileceği bildirilmektedir [58]. Daha önceden doğal olarak var olan ya da geçirilmiş gebelik, kan transfüzyonu veya doku-organ nakli

nedeni ile sonradan edinilmiş alloantikorlara bağı gelişen reaksiyonlardır [80]. Alıcının dolaşımında bulunan bu antikorların anastomoz yapılan damar endotel antijenlerine bağlanarak dakikalar ya da saatler içinde greft vaskülaritesinde trombotik oklüzyona yol açması ile karakterizedir [68]. Hiperakut rejeksiyonda en önemli nedenin MHC gen uyumsuzluğu olduğu bilinmektedir. En önemli hedef antijenler kan grubu antijenleri ve HLA sınıf I antijenlerdir. Bunların dışında, minör doku uygunluk antijenleri ile polimorfizm özelliğine sahip diğer antijenler de rejeksiyon reaksiyonları için hedef durumundadır. HLA sınıf II antijenler endotel ekspresyonu zayıf olduğundan, hiperakut rejeksiyonun hedef antijenleri arasında sayılmamaktadır¹ [81]. Bu antijenlere karşı gelişmiş antikorlar endoteldeki hedef antijenlere bağlanınca komplemanı klasik yoldan aktive ederek bir yandan MAC oluşturarak endotel hücrelerinde hasar oluşturur. Bir yandan da bu aktivasyon sonucunda açığa çıkan anafatoksin etkili C3a, C5a gibi mediyatörler ile inflamatuvar yanıtı uyarak immün sistem hücrelerinin bölgeye toplanmasına, vazodilatasyona ve ödeme yol açarlar [68, 82]. İnflamasyon bölgesindeki sitokinler, endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar. Buna bağı olarak hem trombositlerin adezyon ve agregasyonu², hem de nötrofil ve monositlerin kemotaksisi gerçekleşir [68].

Artan doku hasarı koagülasyonu da uyarak trombotik oklüzyona yol açar. Sonuçta inflamatuvar yanıt ile endoteldeki hasar şiddetlenerek dolaşımın bozulmasına ve tromboz ve vasküler oklüzyon ile organ ya da dokunun geri dönüşsüz iskemik nekrozuna yol açar [68]. Histopatolojik olarak bu dokularda kapillerlerde yaygın tromboz, interstisyel hemoraji ve ödem varlığı mevcuttur. İmmünohistokimyasal olarak immünkompleksler saptanabilir [82]. Hiperakut rejeksiyonlar özellikle böbrek ve kalp gibi vaskülaritesi yüksek organlarda ortaya çıkar. Günümüzde nakil öncesi LCM, PRA tayini, doku uyumuna dikkat edilmesi, gerektiğinde antikorların plazmaferez ve benzeri yöntemlerle uzaklaştırılması ile hiperakut rejeksiyon olguları oldukça nadir görülmektedir.

Akut Rejeksiyon

Akut rejeksiyon alloreaktif T hücre ve antikorlar aracılığıyla kan damarları ve greft

¹ Kan grubu antijenleri ve HLA sınıf-I antijenleri endotelde yoğun olarak eksprese edilen antijenlerdir.

² Kompleman aktivasyonu endotel hücre hasarına öncülük eder ve subendotelial bazal membran proteinlerinin açığa çıkması sonucu trombosit aktivasyonu gerçekleşir. Endotelial hücreler von Willebrand faktör sekresyonunu uyarak trombosit adezyon ve agregasyonuna neden olur.

parankiminde hasarlanma ile giden bir süreçtir. Modern immünsupresyondan önce sık görülen bu rejeksiyon transplantasyonu takip eden birkaç gün ile birkaç hafta arasındaki dönemde ortaya çıkmaktayken günümüz klinik pratiğinde ise daha geç zamanda (hatta ilk yıl içinde) ortaya çıkmaktadır [68]. Hem antikor aracılı hümmoral hem de T hücre yoluyla hümmresel immün mekanizmalarla ortaya çıkabilmektedir. DSA yanıtının ortaya çıkması halinde hümmoral yanıt daha belirgin olur. Hiperakut rejeksiyonda olduğu gibi hümmoral akut rejeksiyonda da komplemana bağlı sitotoksisite ve antikora bağlı hümmresel sitotoksisite ile doku ve organ hasarı ortaya çıkar [81, 83]. Hümmoral immün yanıt mekanizmaları ile oluşan rejeksiyonlar ortamda antikor bulunması nedeniyle hızlı gelişirken, hümmresel immün yanıt mekanizmalarıyla ortaya çıkan reaksiyonlar ise göreceli olarak daha uzun sürede gelişirler.

Akut Hümmresel Rejeksiyon

Akut T hücre aracılı rejeksiyon alıcı T hücre veya verici alloantijenlerine karşı gelişen reaktivite nedeni ile günler içinde gelişen greft fonksiyon bozukluğudur. En sık nakil sonrası ilk haftalar içinde gelişir. Akut rejeksiyon epizodlarının sıklığı ilk 6 aydan sonra düşmeye başlar. Ancak herhangi bir zamanda yine gelişebilir.

Akut hümmresel rejeksiyonda ana mekanizma Th lenfositler (Th1 ve Th17) tarafından üretilen sitokinler ile oluşan inflamasyon ve Tc lenfositler tarafından endotel ve greft parankim hümmrelerinin öldürölmesidir. Histolojik çalışmalarda lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu ile karakterizedir. İnfiltratlar tübölitis denilen tüböl nekroza sahip tübölle ve endotelialitis denilen kapiller ve küçük arter duvarlarında nekrozu içerebilir [68, 80]. Tc hümmreler aktive olunca hem TNF gibi yıkıcı sitokin salınımı ile hem de perforin/granzim aracılı sitotoksisite ile greft hasarına yol açar [80].

Akut Antikor Aracılı Rejeksiyon (Antibody Mediated Rejection=AMR)

Alloantikorlar vasköl endotelde alloantijenlere (özellikle HLA molekülüne) bağlanarak, endotel hasar ve intravasköl tromboz yoluyla greft yıkımı yaparak akut rejeksiyona neden olur. Alloantikorların nötrofil ve NK hümmrelerindeki Fc reseptörlere bağlanması endotel hasarına yol açarak kompleman aktivasyonunu tetikler ve trombüs formasyonu ve nötrofil aktivasyonu ile hümmre yıkımını başlatır. Ek olarak endotelyal yüzeye alloantikor

bağlanması direkt olarak proinflamatuvar ve prokoagulan moleküllerin yüzey ekspresyonunu artırarak hücre içi sinyal yolağıyla da endotel fonksiyonlarını etkiler [68].

Alloantikörler nakil olan böbrekte tercihen peritübüler ve glomerüler kapillere etki gösterir. Antikör aracılı rejeksiyonda sık olarak endotel hasarından kaynaklı olarak akut glomerülitis, peritübüller kapillaritis ve kronik vasküler hasar olarak transplant glomerülopati gelişir [84].

Renal allogreft kapillerlerinde C4d kompleman fragmanının immünohistokimyasal olarak tanımlanması hümoral rejeksiyon ve klasik kompleman yolu aktivasyonunun bir belirteci olarak klinikte kullanılmaktadır [68, 85]. Akut hümoral rejeksiyonun olduğu gibi hiperakut rejeksiyonun tanısı için de C4d birikimi belirteç olarak önemli kabul edilir. Son çalışmalar HLA I ve II donör antikörleri ile C4d birikimi arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir [86-88].

Klinikte hastaların çoğu asemptomatiktir. İdrar renginde değişme, miktarında azalma, yeni başlayan proteinüri, hipertansiyon, nadiren yüksek ateş, greft bölgesinde ağrı, hassasiyet, renal doppler ultrasonografide özgül olmayan bulgular görülebilir. Tanıda altın standart greft biyopsisidir ve izlemde serum kreatinin düzeyi, diürez, DSA antikörler kullanılır. AMR'de karakteristik histolojik bulgular: glomerülit/kapillerit, peritübüler kapiller içinde nötrofiller, fibrin trombüsü, interstisyel hemoraji, ağır veya nekrotizan vaskülitir. Peritübüller kapiller içinde diffüz, lineer C4d saptanır [89]. Ancak histolojik olarak lenfosit infiltrasyonu gözlenmez [80].

Donör HLA sınıf I ya da II antijenlere karşı oluşan antikörlerin C4d birikimi olan akut greft disfonksiyonunda %88-95 hastada bulunurken %10'luk bir kısımda C4d negatif akut rejeksiyon gözlenebileceği de bildirilmiştir [72].

Kronik Rejeksiyon

Transplantasyondan aylar veya yıllar sonra ortaya çıkan bir tablodur. Kronik rejeksiyon farklı organlarda farklı patolojik değişiklikler gösterir. Böbrekte vasküler oklüzyon ve interstisiyel fibrozis görülmektedir. Kronik rejeksiyonda olay genellikle intimal düz kas hücrelerinin proliferasyonun sonucu arteriyel oklüzyona bağlı iskemik hasardan kaynaklanır. Bu arteriyel değişiklikler greft vaskülopatisi ya da hızlandırılmış greft

arteriosklerozu olarak isimlendirilir. Greft vaskülopatisi böbrekte 6 aydan sonra 1 yıla kadar sürede gelişebilir. Alloreaktif T hücrelerin aktivasyonu sonrası sitokin sekresyonu ve bu sitokinlerin uyarısı ile vasküler düz kas hücrelerinin profilarasyonu ana mekanizmadır. Bu arterioskleroz sonrası greft vaskülaritesinin bozulması nedeniyle parankime giden kan akışında bozulma sonucu dokunun fonksiyon görmeyen bir fibröz doku halini alması ile sonuçlanır [68, 90].

Kronik rejeksiyonda alloantikorların rolü tartışmalıdır. Antikora bağlı reaksiyonlardan en belirgin olanı HLA sınıf I moleküllerine bağlanan antikorların endotel hücrelerinde FGF (fibroblast growth factor) ekspresyonunu artırarak endotelde proliferatif oklüzyona neden olmasıdır [81]. Kronik AMR ile ilişkili ana histolojik lezyon transplant glomerülopati ve arteriopatidir [72, 83]. Transplant glomerülopati immünkompleks depozitlerinin yokluğunda glomerüler bazal membranın duplikasyon ya da multiplikasyonu ile tanımlanır ve DSA bağımlı endotel hasarından kaynaklanır. Tekrarlayan endotel hasarı epizotları glomerüler bazal membranda çoklu katmanlı bir görünüm oluşturur [72].

2.3.Renin-Anjiotensin-Aldosteron Sistemi (RAS)

RAS sıvı dengesinin sağlanmasında çok önemli bir rol olmaktadır. Fakat son yıllarda başka birtakım etkileri de gündeme gelmiştir.

2.3.1.RAS tarihçesi

Renin-Anjiotensin-Aldosteron Sistemi (RAS) ilk defa 1898’de Karolinska Enstitüsü’nde araştırmacılar Robert Tigerstedt ve Per Bergman tarafından tavşanlarda renin olarak isimlendirdikleri vasopressör bir protein tanımlamaları ile gündeme gelmiştir [91]. Anjiotensin, 1940 yılında eş zamanlı birbirinden bağımsız çalışmalarda Braun-Menéndez [92] tarafından “hypertensin”, Page [93] tarafından “angiotenin” olarak ilk kez tanımlanmıştır. Bu iki vazoaktif peptidin aynı peptid olduğu anlaşılmaya üzerine 1958 yılından itibaren hibrit bir isim olan “angiotensin” olarak yeniden isimlendirilmiştir. Anjiotensinojen de ilk defa 1940 yılında yine Page tarafından ilk renin aktivatörü olarak tanımlanmıştır [94]. 1987 yılında Dünya Sağlık Örgütü (The World Health Organization) ve Amerikan Kalp Derneği anjiotensin için Ang I kısaltmasını kullanarak tüm anjiotensin

derive peptidlerin isimlendirilmesinde bir standardizasyona gidilmesine karar vermiş ve sonraki isimlendirmelerde temel alınmıştır [95].

ACE (Anjiotensin Dönüştürü Enzim) inhibitörleri kullanıma girmeden önce ilk olarak anjiotensin II reseptör blokeri “Saralasin”ın kan basıncını düşürdüğü gösterilmiş [96], daha sonra 1970’lerde bir ACE inhibitörü olan kaptopril ve 1980’lerde Ang II reseptör tip 1 blokörleri (ARBs) gündeme gelmiştir [94, 97]. Hız kazanan RAS çalışmaları yeni peptidler ve yeni anjiotensin reseptör tiplerinin tanımlanmasını getirmiştir. RAS ilk tanımlandığında sadece bir substrat (anjiotensinojen), iki proteaz (renin ve ACE1), iki peptid (Ang I ve Ang II) ve bir reseptörden (AT1R) oluşmaktaydı. Oysa günümüzde bilinmektedir ki RAS çizelge 2.6’da gösterildiği gibi çeşitli enzim yolakları ve yirminin üzerinde peptidaz, yirmiye yakın anjiotensin peptidi ve en az altı reseptörden oluşan geniş bir sistemdir [98].

Çizelge 2.6: Güncel RAS [98]

	Klasik RAS	Günümüzde RAS
Hormon süreci	Endokrin	Otokrin Parakrin İntrakrin
Biyoaktif peptid	Ang II	Ang II Ang III Ang IV Ang 1-7 Ang 3-4 Ang A Alamandine
Reseptör	AT1R AT2R	AT1aR AT1bR AT2R MasR Mrg AT4R (P)RR ACE

Ang: Anjiotensin; ACE: Anjiotensin dönüştürücü enzim; AT1R: Anjiotensin tip 1 reseptör; AT2R: Anjiotensin tip 2 reseptör; AT4R: Anjiotensin tip 4 reseptör; MasR: Ang (1-7) Mas reseptör; Mrg: Mas-related G-protein coupled reseptör; (P)RR: Renin/(Pro)renin reseptör; RAS: Renin Anjiotensin Sistemi.

Son yıllarda yapılan çalışmalar “Lokal RAS” ı gündeme getirmiştir [99]. Kan basıncı ve sıvı elektrolit dengesini sağlayan bir sistem olan dolaşımdaki RAS; organ özgül bulunan ise lokal RAS olarak tanımlanmıştır. Lokal RAS’ın pankreas, üreme organları, beyin, yağ dokusu, kalp, böbrek, göz gibi birçok organda bulunduğu, hücrenin büyüme, protein sentezi, proliferasyon gibi hücresel fonksiyonlarında görevli bir sistem olduğu kabul edilmektedir [100-102].

2.3.2.RAS elemanları

RAS çeşitli enzim yolakları, yirminin üzerinde peptidaz, yirmiye yakın anjiotensin peptidi ve en az altı reseptörden oluşan geniş bir sistemdir [98].

Enzimleri

Renin

Bir aspartil proteaz olan renin anjiotensinojenden anjiotensin I oluşumunu sağlayan özgül bir enzimdir. Böbreğin jukstaglomeruler aparatında 406 aminoasit olan inaktif prorenin olarak sentezlenir. Prokonvertaz ya da Katepsin B tarafından parçalanarak 340 aminoasitlik reninin aktif formu oluşur [98].

ACE1

ACE1, aktif bölgesinde çinko içeren, metalopeptidaz M2 ailesine ait bir metalopeptidazdır. Bir monomerik glikoprotein olan ACE1 iki farklı izoforma sahiptir: 150-180 kDa olan somatik ACE1 (sACE1) ve 90-110 kDa olan germinal ACE1 (gACE1).

sACE1 çeşitli endotel ve epitel hücrelerinde bulunurken gACE1 testis germinal hücrelerinde bulunur [103]. Bir eksopeptidaz olan ACE1 hipotansif peptid bradikininin ve Ang I'in serbest C terminal ucundan dipeptidleri parçalar.

ACE1 aynı zamanda Ang III ve Ang (1-7) oluşumunda bulunur ve hatta Ang (1-7)'yi inaktif Ang (1-5)'e degrade edebilir. ACE1 kallikrein kinin sisteminde bradikininin inaktif komponentlerine ayrılmasında da rol oynar. ACE1 kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde ve kan basıncı regülasyonunda önemli görevi nedeniyle farmakoterapinin majör hedefi olmuştur [98, 103].

ACE2

ACE2, bilinen ilk insan ACE1 homologudur. 2000 yılında klonlanmıştır. İlk olarak ACE2

nin Ang I'i Ang (1-9)'a dönüştürdüğü gösterilmiştir. Daha sonra, ACE2'nin, Ang II'nin Ang (1-7)'ye hidrolizini Ang I'in Ang (1-9)'a hidrolizinden çok daha fazla verimlilikle (yaklaşık 400 kat) hidrolize ettiği bulunmuştur. ACE2, 805 aminoasit uzunluğunda (120 kDa), böbrek, kalp, akciğer, karaciğer ve beyinde bulunan bir tip 1 transmembran glikoproteindir. ACE2, Ang (1-7) ve MasR güncel çalışmaların odağı olmuştur [103-104].

ACE2'nin, RAS'ın iki ana yolağı olan ACE1-Ang II-AT1R ve ACE2-Ang (1-7)-MasR arasında bir anahtar rolü olduğu düşünülmektedir. İki enzimatik yolak arasındaki uzayan dengesizlik renal, pulmoner, kardiyovasküler ve santral sinir sistemi patofizyolojisinde rol oynamaktadır [98].

Peptidleri

Anjiotensinojen (AGT)

255 aminoasit uzunluğunda, temel olarak karaciğerde sentezlenen fakat bunun yanında kalp, damarlar, böbrek ve yağ dokuda da bulunduğu bildirilen bir α -glikoproteindir [99, 105]. Sentezi inflamasyon, insülin ve östrojenlerle stimüle olur [103].

Anjiotensin I (Ang I)

Ang (1-10) olarak da bilinen zayıf etkili bir prohormondur. Renin tarafından anjiotensinojenden bir decapeptid olarak üretilir. Ang I, ACE1 tarafından karboksiterminal ucundan 2 aminoasit rezidüsünün koparılması ile bir oktapeptid olan Ang II ye dönüştürülür [105-106].

Anjiotensin II (Ang II)

Ang (1-8) olarak da bilinir. İlk kez 1940 yılında kan basıncını yükselten potent bir vazokonstriktör olarak izole edilmiştir [92]. Elektrolit dengesi, vasküler tonus, su alımı, aldosteron sentezi, sempatetik aktivite, böbrekten sodyum tutulumu, hipofizden vazopressin salınımı görevleri olan bir endokrin sistem olarak kabul edilmiştir. Major görevi sıvı ve sodyum dengesi olan Ang II'nin, hücre büyümesi ve kardiyovasküler

remodeling görevi de vardır [99]. Antihipertansif tedavi olarak ACE inhibitörleri ACE1 tarafından Ang I'in Ang II'ye dönüşümünü bloke ederek etki gösterir [98, 103].

Anjiotensin III (AngIII)

Ang (2-8) olarak da bilinir. ACE1 ve aminopeptidaz A tarafından Ang (2-10)'dan ya da Ang II'den üretilir [99]. Bu heptapeptid 1970'lerde bulunmuştur ve etkilerini AT1R ve AT2R üzerinden gösterir. Ang III AT2R'e AT1R'den daha fazla afinite gösterir. Ang III vazokonstriksiyonu ve aldosteron salınımını indükler. Ang II'nin vazokonstriktör aktivitesinin %40'ına sahiptir. Ang III'ün AT1R üzerindeki etkisi en az Ang II kadar önemlidir [99].

Anjiotensin IV (AngIV)

Ang (3-8) olarak da bilinir. Ang IV bazı N-aminopeptidazlar tarafından Ang II'den ya da N, M, B aminopeptidazlar tarafından Ang III'den oluşur. Bu heksapeptid böbrek, akciğer, beyin ya da kalpte bulunan AT4R yoluyla etki gösterir [107]. Ayrıca, Ang IV AT1R aracılığıyla endotel hücreleri, kardiyak fibroblast ve vasküler kas hücreleri üzerinde etkileyerek renal vazodilatasyon, hipertrofi ve büyüme regülasyonunu da indükleyebilirler [98].

Anjiotensin (1-9) [Ang (1-9)]

Ang (1-9) ACE2 tarafından Ang I karboksil ucundan aminoasitlerin ayrılmasıyla oluşur ve NEP ya da ACE1 tarafından metabolize edilerek Ang (1-7) oluşturur. Ang (1-9) Ang I'den oluşurken karboksipeptidaz A ya da katepsin A kataliz etkisiyle ACE2 aktivitesinden etkilenir. Ang (1-9)'un biyolojik fonksiyonu; artmış NO oluşumunu, araşidonik asit salınımını, bradikinin aktivitesinin güçlenmesini ve olası trombosit fonksiyonlarının inhibisyonunu içerir [98].

Anjiotensin (1-7)

Ang (1-7)'nin RAS'da inaktif bir heptapeptid olduğuna inanılmakta iken 1988 yılında Ang II'ye karşıt etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Ang (1-7) Ang II'den ACE2 ya da diğer peptidazlar (prolylendopeptidase ve prolyl-carboxipeptidase) tarafından oluşturulur. Direkt Ang I'den prolylendopeptidase tarafından, Ang (1-12) prohormondan sentez edilebilir. ACE inhibitörleri Ang (1-7) seviyelerini hem Ang I konsantrasyonunu artırarak hem de Ang (1-7) yıkılmasını önleyerek artırır [98, 108]. Ang (1-7)'nin akciğer, karaciğer, böbrek gibi organların inflamasyonu ya da fibrozisi gibi patolojik durumlarla ilişkili olabileceği, ek olarak metabolizmada glikoz uptakeini ve lipolizi artırarak, insülin rezistansının ve dislipideminin azaltılması gibi pozitif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Serebroprotektif etkileri, reproduktif sistem üzerine etkileri yanı sıra anjiogenezi ve hücre proliferasyonunu inhibe etmesi nedeniyle anti-kanser tedavide potansiyel hedef olarak görülmesi, son yıllarda üzerinde yoğun çalışmalar yapılmasına neden olmuştur [109].

Ang A (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)

Ang A (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) olarak bilinen diğer bir anjiotensin derive peptid, sağlıklı insanların plazmalarında ve renal yetmezlikli son dönem hastalarda yüksek düzeyde bulunmuştur. Mononükleer lökositlerin varlığında, Ang II'nin Asp'nın dekarboksilasyonu, Ang II'den daha fazla AT2R afinitesi olan ve etkisini böbrekleri zorlayarak gösteren Ang A üretimine neden olur. Ang II'den türemiş diğer peptidler gibi Ang A da normotansif ve hipertansif ratlarda ve de genetik olarak modifiye farelerde renal vazokonstrüktör yanıtı uyatarak böbreklerde zorlanmayla etkisini gösterir. Ayrıca Ang A, insanlarda, farelerde ve sıçanlarda RAS'ın yeni bir peptidi olan heptapeptid alamandine üreterek ACE2 tarafından hidrolize edilebilir [94].

Alamandine (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro)

Alamandine ilk olarak 2013 de Lautner RQ ve arkadaşları tarafından bir RAS hormonu olarak tanımlanmıştır. Ang A, insanlarda, farelerde ve ratlarda RAS'ın yeni bir peptidi olan heptapeptid alamandine üreterek ACE2 tarafından hidrolize edilebilir. Alamandine'nin, ratlarda uzun dönem antihipertansif etkiye ve antifibrotik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Mas ile ilişkili G Protein bağlı reseptör-D (MrgD), alamandine için bir bağlanma bölgesi olarak tanımlanmıştır [110].

RAS Reseptörleri

(Pro)renin reseptör [(P)RR]

(P)RR 350 aminoasit rezidüsüne sahip uzun tek bir transmembran domain içeren bir protein reseptördür. Kısa sitoplazmik uca renin ve prorenin bağlanır. (P)RR ilk olarak 2002 yılında Nguyen ve arkadaşları tarafından bildirilmiş ve renin ve proreninin enzimatik yoldan Ang II'yi artırması dışında başka etkilerinin de olduğu anlaşılmıştır. (P)RR X kromozomunda yer almaktadır ve yaygın olarak böbrek, kalp, beyin, karaciğer ve plasentada bulunur [111]. (P)RR böbrekte mezengial hücrelerde, renal arterlerin düz kas hücrelerinde ve toplayıcı kanallarda yer almaktadır. Hücre kültüründe (pro)renin reseptörlerinin uyarılmasının, reninin enzimatik aktivitesinden bağımsız bir şekilde, mitojenle aktive olmuş protein kinaz (MAPK) yolağının aktivasyonuna, plazminojen aktivatör 1 ve TGF- β üretiminin artmasına yol açtığı gösterilmiştir [98, 112]. (P)RR' nin yeni ilaç geliştirilmesinde yeni hedef olduğu düşünülmektedir.

RAS' ın G-protein-coupled reseptörleri

Ang II'nin AT1R, AT2R, AT4R ve MasR olmak üzere dört tip reseptörü vardır. Ama temel olarak AT1R ve AT2R üzerinden etkisini gösterir [104]. Ang II'nin çoğu etkileri Ang II reseptörü tip 1 (AT1R) ile düzenlenir. AT2R ise AT1R'nin etkilerini dengeler. AT2R nin, apoptozis, osmoregülasyon, serebral kan akımının otoregülasyonu, anjiogenez ve vazokonstriksiyonu inhibe edici birçok özelliği bilinse de halen aydınlatılamamış yönleri de mevcuttur [113].

AT4R beyin, akciğer, kalp, böbrek, karaciğerde bulunur ve proliferatif etkilere yol açar. AT1R kan damarları, böbrek, sürrenal, kalp ve karaciğerde yaygın olarak bulunurken, AT2R fetal, embriyojenik ve neonatal dokularda yoğun olarak bulunur. Erişkinde ise az miktarda sürrenal, beyin, over ve uterusda bulunur. AT1R Ang II'nin vazokonstrüksiyon, aldosteron salgılanması, kalp kontraktilesi (inotropik yanıt), katekolaminlerin salgılanması ve böbrek üzerine etkileri (renal kan akımı, tübüler Na retansiyonu) gibi temel

etkilerini düzenler. AT1R'nin izoformları AT1aR ve AT1bR olarak adlandırılmaktadır. AT2R ise büyüme ve gelişme sırasında antiproliferatif etki, proapoptotik etki, antihipertansif, vazodilatör etkilidir. NO salınımına yol açtığı da gösterilmiştir. AT1R ve AT2R Ang II'nin karşıt etkilerine aracılık eder. AT2R'nin prenatal gelişimde önemi olduğu, nöranal dokunun büyümesi, farklılaşması ve yenilenmesinde önemli olduğu da bilinmektedir [98, 114].

MasR: Ang (1-7)'nin ana reseptörüdür Ang (1-7)'nin fizyolojik önemi özellikle Santos ve arkadaşlarının Ang (1-7) için reseptör olarak G protein coupled reseptör olarak MasR tanımlamalarından sonra dikkat çekmiştir [115]. Oysa MasR ilk olarak 1986 yılında Young ve arkadaşları tarafından bir protoonkogen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra SSS'de, gözde, böbrekte, kalpte, damarlarda ve testiste bildirilmiştir. MasR yedi-transmembran G protein reseptör ailesinin (GPCR) bir üyesidir. Ve bu reseptör AT1R'ye antagonistik etkiler gösterir. Ang (1-7) ile antiproliferatif ve vazodilatör etkisi vardır. RAS' da ACE2-Ang (1-7)- MasR yolu ACE1-Ang II-AT1R'nin etkilerini dengeleyen bir yolak olarak çalışır [98].

2.3.3.RAS fonksiyonları

RAS ilk tanımlandığı günden bu yana kan basıncının düzenlenmesinde, sıvı ve elektrolit dengesinin sağlanmasında önemli fonksiyonları olduğu bilinen bir sistemdir. Son yıllarda inflamasyon, immünregülasyon ve organ nakli immünolojisindeki önemi üzerine çalışmalar yapılmaktadır [6, 116].

Renin, esas olarak kan basıncında düşmeye, makula densa ultrafiltratında sodyum düzeyinin düşmesine veya sempatik sinir sistemi aktivasyonuna yanıt olarak jukstaglomeruler hücrelerden salgınır [94]. Böbrek kan akımı düştüğünde afferent arteriolde jukstaglomeruler aparat komşuluğundaki hücrelerde baro reseptörler basınç düşüşünü algılayarak renin salgısına yol açar. Reninin aynı zamanda beyin, kalp, testis, hipofiz ve adrenal bezler, arteriyel düz kas ve göz gibi organlarda da sentezlenebildiği bildirilmiştir [103]. Renin, pre-prorenin olarak oluşmakta ve Golgi cisimciği içinde proreninden hem proteolitik hem de nonproteolitik yoldan inaktif renin oluşarak hücre dışına salgılanmaktadır [108]. Temel olarak karaciğerde sentezlenen fakat bunun yanında kalp,

damarlar, böbrek ve yağ dokuda da bulunduğu bildirilen anjiotensinojenin Ang I'e dönüşümünü renin sağlar [98, 117].

Ang I daha güçlü etki gösteren Ang II'ye akciğer endotelinde bulunan ACE etkisi ile dönüştürülür. Ang II farklı dokularda pek çok fonksiyona sahiptir, bununla birlikte bu peptid temel fonksiyonunu böbrekte gösterir [94].

Kan basıncını artırıcı etkisini sistemik arteriollerde ve böbrek afferent arteriollerde vazokonstriksiyon yaparak, proksimal tübülde Na^+/K^+ ATPaz pompası aktivasyonunu artırarak ve ADH salınımını uyarak sağlar. Ang II'nin AT1R aracılığıyla yarattığı ana etkileri vazokonstriksiyon, anti-diürez, anti-natriürez, ADH ve aldosteron salınımıdır [118].

Ang II'nin diğer metabolik etkileri, AT1R üzerinden proinflamator modülasyon, insülin salınımını artırmak, B hücre apoptozisi, karaciğer glikoz output ve glukoneogenezini azaltmak, plazma trigliseridlerini artırmaktır [99].

Güncel çalışmalar RAS'ın başlangıçta basit bir endokrin sistem olduğu kanısını çürüterek parakrin, otokrin ve intrakrin fonksiyonları da olan bir sistem olduğunu gündeme getirmiştir [118].

RAS aktivasyonu ve Ang II seviyelerinde artış iskemi reperfüzyon hasarı için önemli bir risk faktörüdür. Ang II renal vazokonstriksiyon yoluyla, damar sempatik sinir hassasiyetini artırarak, oksidatif strese yol açarak ve apoptozisi indükleyerek renal hasar oluşturur. RAS birbirine antagonist iki farklı yolak (ACE/AngII/AT1R ve ACE2/Ang (1-7) /MasR) ile inflamasyonu düzenler. Bu iki aksın dengesizliğinde renal hasar ortaya çıkar. MasR agonisti AVE0991'nin uygulanmasının böbrekte iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı bildirilmiştir. ACE2, Ang II seviyelerini düzenler, renal dokuda Ang II'yi Ang (1-7)'ye dönüştürerek etkiler ve Ang II'nin bir birçok zararlı etkisini antagonize eder. Renal iskemi perfüzyon hasarında ACE/Ang (1-7) /MasR aksının aktivasyonunun yeni terapötik stratejiler gelişimde önemli olduğu düşünülmektedir. Yeni çalışmalar ACE inhibitörlerinin ve ARB'lerinin böbrekte iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir. Örneğin; Aliskren bir renin inhibitörüdür ve direkt olarak plazma renin aktivitesini ve Ang II seviyesini azaltarak, antiapoptotik aktiviteyi güçlendirerek böbrekte

iskemi reperfüzyon hasarından koruyucu etki göstermektedir [59].

2.3.4.RAS ve immünmodülasyon

Böbrekte patolojik durumlar üzerine yapılan çalışmalarda glomerüler hasarın RAS'ın hem non-immün primer renal hasar ile hem de bazı antijen özgül immün yanıtlar aracılığı ile geliştiği bulunmuştur [119]. Ang II vasküler permeabiliteyi artırarak, inflamatuvar hücreleri toplayarak (kemotaksis ve adezyon moleküllerin regülasyonu) ve immünkompetan hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayarak inflamatuvar süreçte önemli rol oynar. NF- κ B, endothelin 1, Rho (small G protein), ve redoks yolağı bu fonksiyonların gerçekleşmesine aracılık eden yolaklardandır [6, 120].

RAS'ın immün modülatör rolü makrofajlarda renin ve Ang II'nin varlığının bildirilmesi ile gündeme gelmiştir [121]. Daha sonra nötrofil ve mast hücrelerinde de Ang II enzimatik yolu bildirilmiştir [122]. İnflamatuvar hücreler RAS'ın tüm komponentlerine sahiptir ve Ang II üretebilecek özelliktedir. Makrofajların fagositik aktivitesini direkt upregüle edebilir [120]

Birçok böbrek patolojisinde, makrofajların kemotaksisi ve aktivasyonunda RAS önemli rol oynamaktadır. Ayrıca Ang II DC aktivitesinde de düzenleyici rol oynar. Bazı RAS genlerinin immatür ve matür DC'lerde eksprese olduğu gösterilmiştir [123]. İnflamasyonda T ve NK hücrelerinde de RAS ile ilişki bildirilmiştir [124].

RAS, glomerüloskleroz, mezengial hücrelerin proliferasyonu gibi bazı patolojik durumlarda böbrekte lokal aktif halde bulunmuştur. Çoğu Ang reseptörü lokal olarak üretilen Ang II tarafından dolaşımdakine göre daha fazla aktive edilir. Çeşitli lokal RAS fonksiyonları TGF- β 1 ve platelet growth faktör gibi immünolojik fonksiyona sahip farklı moleküller üzerinden düzenlenir [6].

Ang II, immün hücrelerde AT1R üzerinden etki gösterir. Kalsinörin bağımlı yoldan splenik lenfositlerin proliferasyonunu tetiklemesi, immünosüpresif tedavi ve antiinflamasyon amaçlı RAS blokajı kullanılmasına yol açmıştır. T lenfositler ACE içerirken B lenfositlerde aktivitesi saptanmadığı da bildirilmiştir [6].

T hücrelerinde RAS etkisi özellikle TNF- α gibi bazı sitokinler aracılığıyla olur. AT1R primer olarak intraselüler olarak eksprese olur ve endojen üretilen Ang II T hücre aktivasyonuna, TNF- α üretimine neden olur. T hücrelerinde ACE inhibisyonu TNF- α üretimini azaltarak etkiler [6, 125]. ARB'lerin interferon üretimini ve lenfosit proliferasyonunu baskılayarak Th1 ve Th2 immün yanıtlarının baskılanmasına öncülük ettiği gösterilmiştir [126-127]. Böbrek transplant alıcılarının periferik kan lenfositlerinde 12 ay AT1R antagonisti ile tedavi sonrası İFN- γ seviyelerinde de azalma gözlenmiştir. Tc hücrelerinin Ang II ye maruz bırakılması durumunda İFN- γ sekresyonunun arttığı invitro olarak gösterilmiştir [127].

Ang II glomerüler endotelial hücrelerde aktivitesini AT1R ve AT2R üzerinden NF- κ B ile gösterir. Ang II NF- κ B kontrolü altında kemokinlerden MCP-1 ve RANTES, sitokinlerden İL-6, adezyon molekülü VCAM-1 ve ICAM-1 ve anjiotensinojeni içeren proinflamatuvar genleri artırır. AT1R için İL-6, MCP-1 ve anjiotensinojen aracılığı; AT2R için RANTES aracılığı önemlidir [120].

Fibrojenizde ise RAS'ın parakrin rolü vardır. Kolajen turnoverı ve fibröz doku kontraksiyonuna otokrin ya da parakrin olarak etkiler. Lokal etkili RAS nonimmün gelişen böbrek hasarında interstisiyel infiltrasyonu güçlendirerek önemli rol oynamaktadır. RAS kaynaklı fibrojenizisin büyük oranda TGF- β 1 yoluyla olduğu gösterilmiştir. Bu aktivite kısmen AT1R aracılığıyla gerçekleşir. TGF- β 1/Ang II aracılıklı matriks sentezi ve organ hipertrofisi için çok önemli adaylardan biridir. TGF- β 1 fibroblastlar, VSMC ve renal resident hücrelerden olduğu kadar makrofajlar, T ve B lenfositlerden de sentez edilebilir. Ang II TGF- β 1 geni ve protein çıkışını artırır. AT1R eksikliği olan farelerde ya da RAS blokajı uygulanarak kalp, böbrek ve karaciğerde lokal olarak artmış Ang II'nin TGF- β 1 ile güçlü ilişkisi ve artmış ekstraselüler matriks protein yapımı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Ang II artışı CTGF (connective tissue growth factor=bağ doku büyüme faktörü) mRNA ekspresyonu ve üretimini artırmaktadır. CTGF bir profibrojenik sitokindir ve TGF- β 1'in profibrotik aktivitesinin önemli bir mediyatörü olabileceği bildirilmiştir. Bu büyüme faktörü TGF- β 1 tarafından güçlü olarak upregüle edilir ve glomerüloskleroz ve tübülointerstisiyel fibrozisin gelişmesi ve ilerlemesinden rolü olabileceği düşünülmektedir. Klinik çalışmalarda ve deneysel olarak Ang II blokajının fibrozis progresyonunu yavaşlatabileceği bildirilmiştir. Endotelin yolu gibi diğer RAS bileşenleri de interstisiyel

fibrozise katkıda bulunur [128].

Ang II hücre dışı matriks birikimi, hücre çoğalması ve hipertrofi gibi önemli biyolojik etkilere yol açan TGF- β 1 sentezinin güçlü bir uyarıcısıdır [6]. TGF- β 1 naklin ilk yılından sonra greft kaybının başlıca sebebi olan kronik allogreft nefropati patogeneğinde anahtar bir sitokindir. Patolojik olarak kronik allogreft nefropatide olay tübülointerstisiyel hasarın olduğu başlangıç fazı ve mikrovasküler ve glomerüler hasarın olduğu geç faz olmak üzere iki fazdan oluşur. Geç faz histolojik olarak progresif arteriyoller hiyalinozis, iskemik glomerülozis ve interstisiyel fibrozis ile karakterizedir. TGF- β 1'in çeşitli organlarda (karaciğer, kalp, deri, akciğer) doku fibrozisine yol açan ekstraselüler matriks üretimiyle ilişkisi gösterilmiştir. Böbrekte TGF- β 1 mezengial hücrelerden ve glomerüler epitel hücrelerinden bazı matriks komponentlerinin (chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans, decorin ve biglycan) üretimini stimüle eder [128-129]. TGF- β 1, matriks yıkımında bir proteaz inhibitör olan plazminojen aktivatör inhibitör 1'in aktivitesini artırarak matriks yıkım oranını azaltabilir [6].

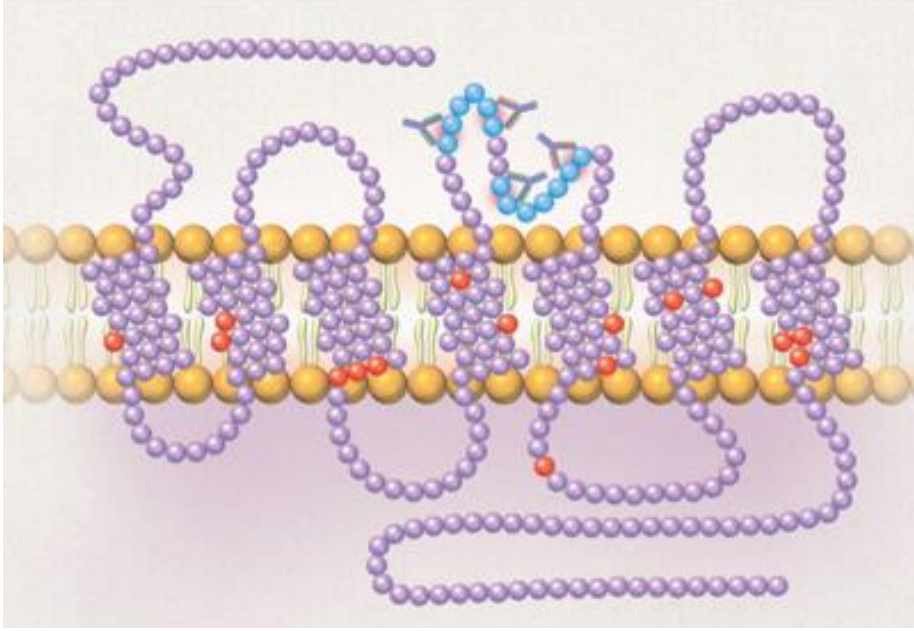
Böbrek nakli olan hastalarda RAS blokajının hipertansiyonun, posttransplant eritrositozun ve proteinürinin tedavisinde yararlı olabileceğine dair güçlü kanıtlar mevcuttur [130]. Bir retrospektif çalışmada 2031 nakil yapılan hastada RAS blokajı ile hasta ve greft sağ kalımında %20-30 artış olduğu bildirilmiştir [131]. 17 209 böbrek ve 1 744 kalp naklinin incelendiği başka bir çalışmada ise [132] anlamlı farklılık gösterilememiştir. Henüz yeterli randomize çalışma olmadığı için RAS blokajının nakil sonrası sistematik kullanımı tam açıklığa kavuşmamıştır [7, 133].

Tüm bu bilgiler ışığında RAS ve immün sistem ilişkisi üzerine olan çalışmalar ümit verici niteliği nedeniyle bilim insanları tarafından son zamanlarda ilgi odağı olmuştur.

2.3.5. Anti AT1R, önemi ve transplantasyondaki yeri

AT1R glomerüllerde Ang II için esas reseptördür ve arteriyel kan basıncını ve tuz dengesini ayarlar. Ayrıca proksimal tübül fırçamsı kenarında, bazolateral membranda ve damarlarda da eksprese olur. AT1R yedi transmembran G protein reseptör ailesinin (GPCR) bir üyesidir. Ekstraselüler glikolize bölgesi, yedi transmembran alfa helikse

ilişiktir. AT1R antikorları ise (AT1R-Ab=AT1R-AA) AT1R'nin ikinci ekstraselüler kısmına bağlanmaktadır (şekil 2.11) [8, 85, 134].



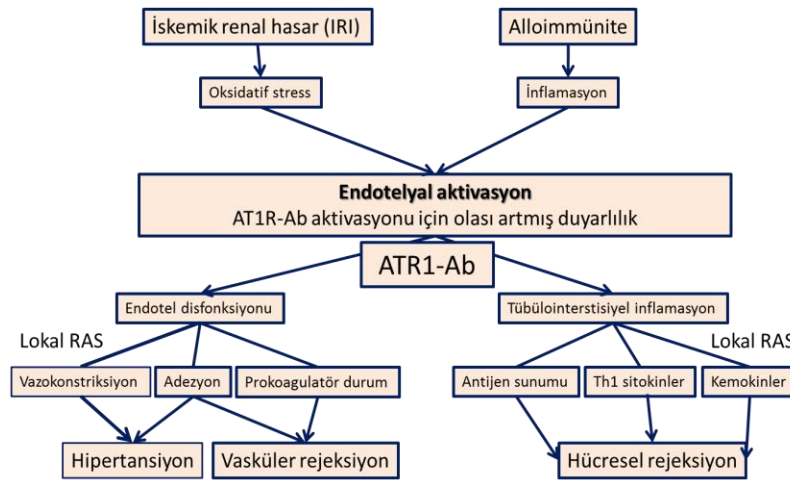
Şekil 2.11 AT1R yapısı ve AT1R-Ab ile etkileşiminin şematik diyagramı [85]

Ang reseptörleri endoplazmik retikulum, golgi aparatı ve çekirdek gibi hücre içi organellerde bulunur, bu Ang II'nin gen ekspresyonunun modülasyonu dâhil olmak üzere birçok hücre içi etkiye sahip olabileceğini de göstermektedir [118]. Ang II/AT1R transkripsiyon faktör NF- κ B ve AP-1 yolağıyla makrofajlarda TNF- α ve İL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ve salınımına aracılık edebilir [135-137].

Ang II-AT1R sisteminde aşırı aktivasyon hipertansiyona, vasküler remodeling nedeniyle kardiyak ve renal komplikasyonlara yol açar. İnsan AT1R geni 3. kromozomdadır ve 4 eksona sahiptir. Bazı AT1R geni polimorfizmlerinin (A1166C) artmış Ang II yanıtı ve çeşitli kalp ve böbrek patolojileri ile ilişkisi gösterilmiştir [138-140].

İlk olarak 2005 yılında Dragun ve arkadaşları [7] nakil sonrası bir kadın hastada yüksek tansiyon, titreme nöbetleri gözlemlemiş ve hastanın öyküsünde nakilden 20 yıl önce aynı bulgularla preeklampsi atağı geçirdiğini öğrenmiştir. Araştırmalar sonrasında preeklampsi etiyolojisinde var olan AT1R-Ab pozitifliğinin hastada saptanması üzerine diğer vakaları da taramaya almışlardır. 33 böbrek nakli yapılan vakanın 16'sında anti-HLA Ab yokluğuna rağmen vasküler rejeksiyon ve malin hipertansiyon geliştiğini saptamış ve hasta

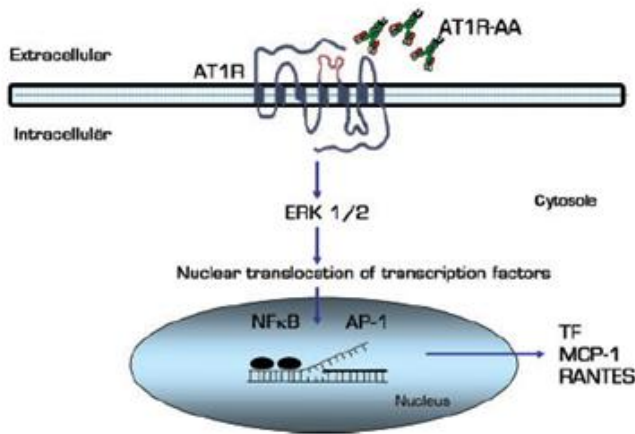
serumlarında AT1R'ye karşı aktive olmuş Ig G tipi antikorların varlığını göstermişlerdir. Nakil sonrası böbrekte vasküler hasar oluşumunda Ang II Tip I Reseptör aktivatorü antikorların (AT1R-AA; AT1R-Ab) rolü ile ilgili olası mekanizma gene ilk kez 2007 yılında Duska Dragun [74] tarafından öne sürülmüştür. Şekil 2.13'de şematize edilen bu mekanizmanın iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve nakil sonrası alloantijene bağlı immün uyarılar, oksidatif stres ve inflamatuvar cevaplara yol açması olduğu düşünülmektedir [141]. Bu kolaylaştırıcı faktörler, endotelde homeostatik dengeyi veya antikorun hedef reseptöre bağlanmasının biyofiziksel özelliklerini değiştirebilirler. Böylece AT1R-Ab atağına duyarlılık artışı olduğu düşünülmektedir. AT1R-Ab endotel disfonksiyonuna yol açarak; vazokonstriktif arteriel cevaba, efektör hücre transmigrasyonuna neden olabilir veya prokoagülant duruma yol açabilir. Tüm bu mekanizmalar, hipertansiyon ve vasküler hasar patogenezinde rol oynar. Diğer taraftan AT1R-Ab, tübül epitelinin ve renal interstisiyel hücreleri etkileyerek lokal inflamasyonu artırır. Sonuçta lokal antijen sunucu hücre ile antijen sunumu artar ve /veya Th1 sitokinlerin ve inflamatuvar kemokinlerin yapımı artarak hücrel rejeksiyonla sonuçlanır [85, 141-143].



Şekil.2.12:Böbrek naklinde vasküler rejeksiyon gelişiminde AT1R/AT1R-Ab ilişkili mekanizmalar [141]

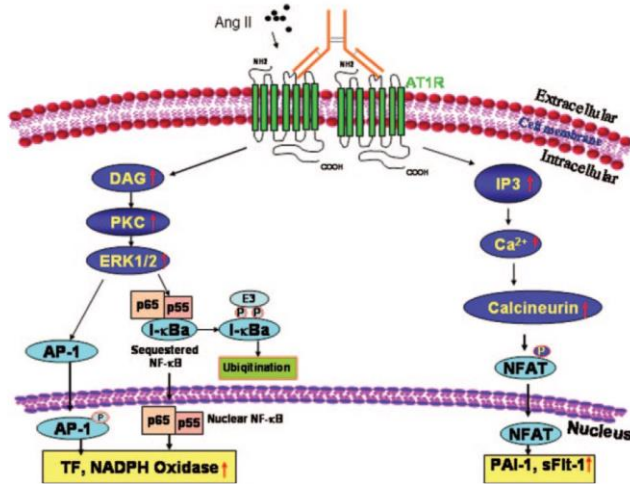
AT1R-Ab'ları birkaç yoldan alloreaktif ya da otoreaktif yanıt gösterebilir. Protein antijenik determinantlar, hasar sonrası ya da doğrudan nakil yoluyla oluşabilir ya da inflamatuvar olaylar otoantijen de novo ekspresyonuna öncülük edebilir. HLA özgül antikor oluşumuna yol açan transfüzyon, gebelik ya da önceki nakil sürecinin, AT1R-Ab oluşumuna da yol açabildiği bildirilmiştir [144].

Böbrek nakli sonrası organ hasarının antikor ilişkili mekanizmaları arasında ana mekanizmanın vasküler endotel aktivasyonu sonucu endotelde meydana gelen değişiklikler olduğu düşünülmektedir. Endotel hücrelerinin AT1R eksprese ettiği ve bu reseptörlerin AT1R-Ab'larının AT1R'nin doğal ligandları gibi allosterik aktivatör olabileceği bildirilmiştir [143]. AT1R-Ab'nun AT1R' e bağlanmasının nakil sonrası böbrek hasarında kritik bir basamak olduğu düşünülmektedir. AT1R-Ab'larının, komplemanı fiks eden Ig-G1 ve Ig-G3 izotipinde olduğu belirlenmiş olmakla birlikte, AT1R–Ab aracılı rejeksiyon patogeneğinde komplemandan bağımsız mekanizmalar ön plandadır. AT1R-Ab'larının ERK 1/2 sinyal transdüksiyon kaskadı yoluyla etki gösterdiği; ERK kinaz fosforilasyonu, Aktivatör protein 1 (AP-1) ve NF-KB aktivasyonu sonucu kemokinlerden MCP-1 ve RANTES üzerinden, ayrıca TF ve ROS oluşumuna yol açıp inflamatuvar cevapları uyarak rejeksiyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (şekil 2.13) [143, 145].



Şekil 2.13 Rejeksiyonda AT1R'nin olası hücre içi etki mekanizması [143]

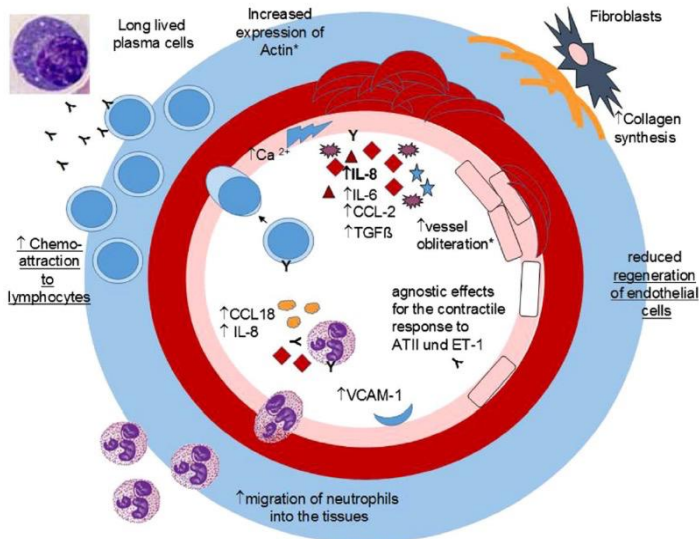
2007'de yayınlanan başka bir çalışmada AT1R-Ab aracılı AT1R aktivasyonunda şekil 2.14 de şematize edildiği gibi çoklu sinyal yolağı üzerinden fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir. AT1R-Ab aracılı AT1R aktivasyonu kalsinörin aktivitesi ve protein kinaz C (PKC) artışına öncülük eder. Sonuç olarak AP-1, NF-KB ve NFAT gibi transkripsiyon faktörleri ile gen ekspresyonu aktive edilerek sitoplazmadan nükleusa translokasyon gerçekleşir. AT1R-Ab bivalan Ig G protein kompleksleridir ve AT1R homodimerlerini stabilize ederek çapraz bağlanma ile agonistik etki gösterir [134].



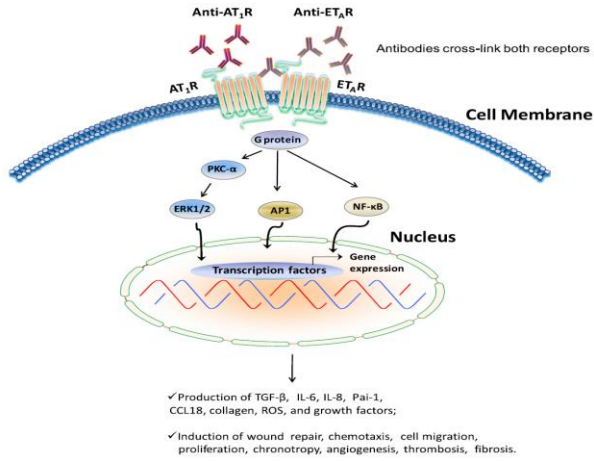
DAG indicates diacylglycerol; IP3, inositol triphosphate; PKC, protein kinase C

Şekil 2.14 AT1R-Ab aracılı AT1R aktivasyonunun moleküler mekanizması [134]

Sistemik sklerozisli hastalarda 2015 ve 2016 yıllarında yapılan çalışmalarda AT1R etki mekanizması için başka ek faktörlerin de rol aldığı öne sürülmüştür. Şekil 2.15 ve şekil 2.16'da gösterildiği gibi TGF- β ve İL-6 yanı sıra İL-8 artışı ve Aktin ekspresyonu artışının da AT1R-Ab aktivasyonu sonrası gerçekleşebileceği [146], ayrıca AT1R-Ab ile Endotelin-1 antikorlarının (Anti-ETAR) aynı reseptörler üzerinden çapraz bağlantı ile etki edebileceği düşünülmektedir [147].



Şekil 2.15 Anti-AT1R/Anti-ETAR ın sistemik sklerozisli hastalardaki etkileri-1 [146]



Şekil.2.16: Anti-AT1R/Anti-ETAR ın sistemik sklerozisli hastalardaki etkileri-2 [147]

Böbrek nakli yapılan AT1R-Ab pozitif hastalarda, antikorun plazmaferezle uzaklaştırılmasının ve hastanın farmakolojik AT1R blokajı (Losartan) ile tedavisinin; renal fonksiyon ve greft ömrü üzerinde olumlu sonuçlar sağladığı bildirilmiştir [7-8, 130-131, 139]. Aynı çalışmanın hayvan modelinde allojenik transplante, normotansif ve rejeksiyon gözlenmeyen ratlarda pasif olarak AT1R-Ab taşıyan serum verildiğinde vasküler rejeksiyona benzer transmural arteritis geliştiği gözlenmiştir. Fakat bunu desteklemeyen çalışmalar da mevcuttur [132].

Yapılan çalışmalarda AT1R-Ab tespit edilen böbrek nakil hastalarında, donör spesifik antikorlardan bağımsız, şiddetli vasküler rejeksiyon bildirilmiştir. Ancak nadir hastalarda AT1R-Ab artışı olmasına rağmen rejeksiyon görülmediği de gözlenmiştir [148].

2.4.Sitokin Polimorfizmi

2.4.1.Nakil ve sitokinler

Sitokinler birçok farklı hücre tipi tarafından sekrete edilen, büyük, geniş heterojen bir grup proteindir. Polipeptid ya da glikoprotein yapıdadırlar. Doğal ve kazanılmış immünitenin tüm basamaklarını düzenleyici rolü olan esansiyel mediyatörlerdir. Salgılanan sitokinler hedef hücredeki reseptörüne bağlandığında, o hücredeki hücresel fonksiyonları aktive ederler. İmmüniteyi, inflamasyonu ve hematopoiezisi düzenleyen ve bunlara aracılık eden protein ailelerinden oluşurlar [58]. Otokrin, parakrin ya da endokrin etki gösterirler.

Sitokin ailesi çok geniş bir yelpazeye sahiptir. Fonksiyon temelinde sınıflandırılabilirler. TNF, İL-1, İFN, İL-6, İL-12, İL-17 ve İL-18 proinflatuvar sitokinler iken İL-4, İL-10, İL-13, İFN ve TGF- β anti-inflatuvar sitokinlerdir [68, 149]. Genel olarak 6 sitokin ailesi tanımlanmıştır [150]:

- 1.İnterlökin I ailesi (İL-1 α , İL-1 β , İL-1Ra, İL-18, İL-33),
- 2.Hematopoietin (Sınıf I sitokin) Ailesi; İL-2, İL-3, İL-4, İL-5, İL-6, İL-7, İL-12, İL-13, İL-15, İL-21, İL-23, GM-CSF, G-CSF, Growth hormon, Prolaktin, Eritropoietin/hematopoietin
- 3.İnterferon (Sınıf II sitokin) Ailesi: İFN- α , İFN- β , İFN- γ , İL-10, İL-19, İL-20, İL-22, İL-24
- 4.Tümör Nekroz Faktör Ailesi: TNF- α , TNF- β , CD40L, Fas (CD95), BAFF, APRIL, LT β
- 5.İnterlökin 17 Ailesi: İL-17 (İL17-A). İL1-7B, C, D, F
- 6.Kemokinler: İL-8, CCL19, CCL21, RANTES, CCL2 (MCP-1), CCL3(MIP-1 α)

Proinflatuvar ve antiinflatuvar sitokinler rejeksiyonda karmaşık mekanizmanın elçileri olarak rol oynamaktadır [9-10].

Allogreft rejeksiyonu sırasında gelişen özgül olmayan inflamatuvar reaksiyon ve immün yanıt, alloreaktif T hücreleri ile diğer hücrelerin etkileşimine ve çeşitli sitokinlerin salınmasına neden olur. Günümüzde klasik bilgi olarak sitokinler, T hücrelerinin Th1 ve Th2 alt gruplarının regülasyonuna veya aktivasyonuna neden olurlar. Basitleştirilmiş olarak Th1 yanıt inflamasyonla, Th2 yanıt immünoşüpresyon ile ilişkilidir [151]. Th1 hücreleri, sitotoksik T hücreleri, makrofajlar ve NK hücrelerin yer aldığı hücrel immün yanıtta İL-2, İFN- γ ve lenfotoksin salınmasına neden olurlar. Diğer taraftan Th2 hücreleri, antikora bağımlı hücrel immün yanıtı uyararak İL-4, İL-5, İL-6, sitokin sentez inhibitör faktör (CSIF) ve İL-10 salınmasına neden olurlar. Her iki tip klon birlikte; immün yanıt süresince T hücre aktivitesini modüle ederek İL-3, GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) ve TNF salınmasını sağlarlar. İL-1 β , İL-2, İFN- γ ve TNF- α gibi proinflatuvar sitokinler akut rejeksiyonun güçlü mediatörleridir [151]. Th2 hücrelerinin de greft kabulü ve immün yanıtın çapraz regülasyonuna karıştıkları gösterilmiştir.

Hücrel rejeksiyon sırasında T hücrelerin aktivasyonu İL-2 salınımı baskın olarak uyarır, ki bu da T hücre stimülasyonunda major role sahiptir. İL-2 ile stimülasyonu takiben T

hücreler otokrin ve parakrin etki ile proliferasyona uğrar, transplantasyonda rejeksiyona öncülük eden Th1 kaskatını başlatır. İL-2 dual bir role sahiptir ve T hücre aktivasyonu için de gereklidir [151].

Allogreft rejeksiyonunda gelişen inflamatuvar yanıtta salınan sitokinler, makrofajlar, eozinofiller ve NK hücrelerini uyarırlar. İL-6 ve İL-10' un doku hasarı ve enfeksiyona immün yanıt olarak ve inflamasyon süresince, monosit ve makrofajlar tarafından salındığı gösterilmiştir. NK hücreleri, Tc'ye benzer sitotoksikite mekanizmalarında da yer alırlar. NK hücreleri sitokinler tarafından aktive olabilir ve aktive olduklarında kendileri önemli miktarda İFN- γ oluşturabilirler [152].

Weidanz ve arkadaşları ise AT1R blokajının lenfositlerden invivo ve invitro olarak İFN- γ üretimini azalttığını bildirmiştir [127].

Akut rejeksiyonlu hastalarda TNF'nin plazma seviyesinin rejeksiyon olmayan hastalara göre arttığı [152], plazma kreatinin düzeyi yüksekliği öncesi İL-6 seviyesinin arttığı [153], tolerans ile ilişkili olarak İL-4 ve İL-10 ekspresyonunun hayvan modellerinde arttığı [154] gösterilmiştir. Th2 alt tipinde bir sitokin olan İL-4'ün ise humoral ve hücreyel aracılı immünitede önemli rolü olduğu bildirilmiştir [43, 155].

2.4.2.Nakil ve sitokin polimorfizmi

İnsan popülasyonunda DNA dizisi %99,9 oranında özdeştir, %0,1 oranındaki fark bireylerin birbirlerinden farklı olmasını sağlamaktadır. Polimorfizm bireyler arasında normal varyasyonlara yol açan genomda kalıtılabilir farklılıklardır. Bu genetik varyasyonların çoğu fenotipi etkileyebilir, hastalığa neden olmaz ancak hastalığa yatkınlık nedeni olabilirler [58]. Polimorfizm, toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi ya da gen seçenekleri olarak tanımlanmaktadır. İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotid (SNP: single nucleotid polymorphism) polimorfizmleridir¹.

¹ Bir kromozom zincirinde tek bir nükleotidin bir diğeriyle yer değiştirmesi sonucunda oluşan mutasyonlar tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak adlandırılırlar.

Binlerce aday polimorfik gen bulunmaktadır ve hücre metabolizması için önemli olan yollarda¹ rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır. Polimorfizme örnek olarak ABO Rh kan grubu, HLA ve sitokin gen polimorfizmleri verilebilir. Günümüzde milyonlarca sık ve nadir görülen SNP dbSNP bilgi bankasında rapor edilmiştir [58].

Sitokin gen polimorfizimleri de sitokinlerin üretim düzeyini, reseptörlerine olan afinitesini ve aktivitelerini etkilemektedir. Üretim, bağlanma ve sinyal yollarında genetik nedenle oluşan farklılıklar kişilerin immün cevaplarını belirgin şekilde etkilemektedir. Birçok hastalıkta sitokin gen polimorfizmi çalışılmış ve hastalık ile ilişkileri gösterilmiştir.

Sitokin gen polimorfizm etkisinin böbrek naklinde rejeksiyon ile ilişkisi üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sitokinlerden TNF- α , TGF- β 1, İFN- γ , lenfotoksin, İL-1, İL-4, İL-6 ve İL-10 üzerine çalışma yapılan polimorfizmlerdir [1, 10, 156-161]. Ancak TNF- α , İL-10, İL-6 ve İFN- γ 'nın genetik varyasyonları ve nakil ilişkisi ise çok daha fazla araştırmacı tarafından araştırılmıştır [58]. İFN- γ +874 A/T, UTR5644 polimorfizmi, İL-10 -1082 G/A, İL-10 -819 C/T polimorfizmi, İL-10 -592, 571 C/A polimorfizmi, İL-2 -330 T/G polimorfizmi, İL-4 -590 T/C polimorfizmi, İL-6 -174 G/C polimorfizmi, TGF- β +869 C/T, +29, Leu10Pro, c10 polimorfizmi, TGF- β +915 G/C, Arg25Pro, +74, c25 polimorfizmi, TNF- α -308 G/A, TNF 1/2 polimorfizmi üzerine çalışma yapılarak böbrek naklinde ilişkili olduğu bildirilen polimorfizmlerdir [162].

İnterlökin 10 (Interleukin-10; İL-10) polimorfizmi

İL-10 antiinflamatuvar bir sitokindir. İmmün tolerans gelişiminde ve proinflamatuvar sitokin üretiminin azaltılmasına yardımcı olmaktadır. B hücre aktivasyonu için önemli bir faktördür. Alıcı T hücre aktivasyonunu ve allogenik reaksiyonları minimize eder. İL-10 geni içinde, promotor bölgede -1082 (A/G), -819 (C/T), -592 (C/A) pozisyonlarındaki polimorfizmler, uyarılmış lökositlerde farklı düzeylerde İL-10 üretimi ile ilişkili

¹ DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.

bulunmuştur [58, 159]. -1082G, -819C, -592C alelleri, “yüksek düzeyde İL-10 üreticisi”dirler [163].

Tümör Nekroz Faktör- α (Tumor necrosis factor- α ; TNF- α) polimorfizmi

TNF- α , multifonksiyonel proinflamatuvar bir sitokindir ve genellikle otoimmün hastalıklar ve yaygın inflamasyonun başlangıç aşaması ile ilişkilidir. Özellikle nötrofil ve makrofaj fonksiyonlarını uyarır, inflamasyonda anahtar sitokin olarak görev alır [149] ve geç tip aşırı duyarlılık yanıtının artmasına katılır. Makrofaj aktivasyonunu MHC sınıf II antijen ekspresyonunu arttırarak uyarır, böbrek ve karaciğer transplantasyonunun akut ve kronik reddinde etkilidir [58]. Ang II’nin monositlerde NF-kB aktivasyonu ve fibroblastlardan TNF- α üretimini indüklediği, TNF- α ve TGF- β ’nin ekspresyonunun Ang II tarafından artırıldığı, ACE inhibitörleri ve Ang II antagonistleri tarafından proinflamatuvar sitokin üretiminin inhibe edildiği bildirilmiştir [164].

Gebelikte preeklampside AT1R-Ab üretiminin TNF- α , İL-17 ve İL-6 salınımına yol açarak hipertansiyona neden olduğu bildirilmiştir [163-164]. TNF- α ’daki polimorfizmin fonksiyonel etkileri gösterilmiştir. Promotor bölgedeki -308 (-308G/A) pozisyonundaki SNP bölgesinin, invitro protein ekspresyonu ve transkripsiyonunun artışı ile ilişkili olduğu saptanmıştır [165-166].

İnterlökin 6 (Interleukin-6; İL-6) polimorfizmi

İL-6 hem proinflamatuvar hem antiinflamatuvar etki gösteren bir sitokindir. T-hücre farklılaşmasının önemli bir belirleyicisidir. Doğal ve adaptif immün yanıtı katılan birçok hücre tipi tarafından oluşturulsa da anlamlı olarak Th2 lenfositler tarafından sekrete edilir. Preeklampsisi üzerine yapılan çalışmalarda hipertansiyon patogenezinde İL-6/AT1R-Ab etkileşiminin önemli olduğu [167], AT1R-Ab ve renin aktivite artışı ile oluşan İL-6 yüksekliği ve böbrek fonksiyonlarında azalma nedeniyle hipertansiyon yanıtı olduğu [168-169] bildirilmiştir. Bu yüzden, İL-6’ nın tocilizumab kullanılarak inhibisyonunun, AT1R-Ab’nin etkilerini, sadece B hücrelerini ve plazma hücrelerini modüle eden antikör üretimini azaltma yoluyla değil, ayrıca inflamatuvar yanıtları yatıştırarak da değiştirebileceği, ek olarak plazma hücrelerinin barteptomib ile modüle edilmesi ile AT1R-

Ab üretiminin azaltılabileceği düşünülmektedir [167]. Nitekim 2017 yayınlanan çalışmada DSA ve AT1R-Ab pozitifliği olan bir vakada kombinasyon tedavisine Bortezomib eklenerek rejeksiyon gelişiminin tedavi edildiği bildirilmiştir [170].

Promotor bölgede -597(G-C), -572(G-A), -174(G-C) bölgelerinde 3 polimorfizm mevcuttur. Fonksiyonel analizler İL-6 transkripsiyonel regülasyonu üzerinde bu SNP'ler arasında ortak etkiler gösterir. -174 pozisyonunda G aleli, İL-6 plazma düzeyinin artması ile bağımsız olarak ilişkilidir [171] ve -174G/C polimorfizmi İL-6 üretimini arttırmaktadır [58]. 2015 yılında yayınlanan bir çalışmada evre 2-5 kalp hastalığı olan hastalarda yüksek İL-6 yüksek serum konsantrasyonu ve -174 G/C polimorfizmi saptanmış ve bu polimorfizm yüksek kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir [172]. Ama bazı çalışmalarda ilişki saptanamamıştır [173].

Transforming growth factor- β 1; (TGF- β 1) polimorfizmi

TGF- β 1, T hücre aktivasyonunu inhibe eden immünoregülatör bir sitokindir. Birçok hücre tipinin farklılaştırılması, apoptozis ve proliferasyon regülasyonunda görevli çok güçlü bir antiinflamatuvar sitokindir. Profibrotik süreç aktivasyonundaki görevi nedeniyle kronik rejeksiyonda önemlidir [149].

TGF- β 1'in kolajenaz sentezini azaltıp, proteaz inhibitör sentezini artırarak, çeşitli hücre tipleri tarafından kolajen üretimini arttırdığı ve bu yoldan fibrozis oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. TGF- β 1 gen polimorfizmi özellikle +869 ve +915 pozisyonundadır ve sitokin üretimini modifiye eder. Gen polimorfizmi ile akciğer transplantasyonları sonrasında görülen fibrozis ilişkili bulunurken, kalp transplantasyonlarında sonuçların farklı olduğu görülmektedir. Diğer taraftan kalp transplantasyonu yapılan erişkin ve çocuklarda, renal fonksiyonların gecikmesinin ve bozulmasının TGF- β 1 gen polimorfizmi ile ilişkili olduğu görülmektedir [174]. Bazı çalışmalarda da polimorfizm ilişkisine ait çelişkili sonuçlar bulunmaktadır [173].

İnterferon-gama (İnterferon- γ ; İFN- γ) polimorfizmi

İFN- γ , adaptif ve doğal immün yanıt ile oldukça yakından ilişkili proinflamatuvar bir Th1 sitokindir. Aktive CD4⁺ hücrelerden üretilir ve ana rolü antiinfektif ve antitümör immün yanıttır. Hem antirejeksiyon hem de prorejeksiyon sitokindir. HLA moleküllerinin ekspresyonunu artırır ve hasarlanmış organda mikrovaskülarizasyonu indükler [149].

Sitokin gen polimorfizminin araştırılması, rejeksiyon ve greft fonksiyonları üzerine yeni bilgiler eklerken, aynı zamanda istenmeyen sonuçlardan korunmak için de yol göstermektedir. Böbrek nakli öncesinde yapılan doku uyum testlerine ek olarak sitokin gen polimorfizminin de incelenmesi, rejeksiyon sıklığının azaltılması yönünde yardımcı olabilir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışma Hazırlığı

3.1.1.Materyal

Çalışmada kullanılan materyal olarak kitler, cihazlar ve sarf malzemeleri aşağıdaki bölümlerde gruplandırılarak anlatılmıştır.

3.1.2.Kitler

Kullanılan kitlerin, kullanım amacı, markaları ve üretim yerleri çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kitler

Kitin adı	Kullanım amacı	Markası ve üretim yeri
EZ1 DNA Blood 200 µl Kit	DNA izolasyonu	Qiagen, Hilden, Almanya
Cytokine Genotyping Tray	Sitokin gen polimorfizm çalışması	One Lambda, Canoga Park, CA, ABD
EIA for Quantitative Determination of anti-Angiotensin II Receptor 1 (AT1R)- Antibodies	ELISA ile AT1R Antikor çalışılması	One Lambda, Canoga Park, CA, ABD

3.1.3.Cihazlar

Çalışma sırasında kullanılan cihazlar çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Kullanım Amacı	Cihazın markası, modeli	SERİ NO
Standart ELISA okuyucusu	ELISA plaklarının okunması	Euroimmun / Asys Expert plus	28493
ELISA yıkayıcı	Mikroplakaların hazırlanması	Euroimmun / Asys Expert plus	28493
(+4) Soğutucu-1	Örneklerin saklanması	Beko / BK9610M	0910492210

Çizelge 3.2 Kullanılan cihazlar (Devam)

Cihazın Adı	Kullanım Amacı	Cihazın markası, modeli	SERİ NO
(+4) Soğutucu -2	Örneklerin saklanması	Beko / BK9610M	1010088502
(+4) Soğutucu -3	Örneklerin saklanması	Beko / BK9610 NFY	14-100883-04
(-20) derin dondurucu 2	Örneklerin saklanması	Beko / D7215SMF	09-103434-11
(-20) derin dondurucu-3	Örneklerin saklanması	Uğur / UDD 500 BK	–
(-20) derin dondurucu -4	Örneklerin saklanması	Arçelik / 2572D	0410199307
(-20) derin dondurucu -1	Örneklerin saklanması	Beko / D7215SMF	09-101464-10
(-80) derin dondurucu -1	Örneklerin saklanması	Wisecryo / WUF400	4089260995001
(-80) derin dondurucu -2	Örneklerin saklanması	Panasonic/MDF-U 53865-PE	12100066
Mini Santrifüj / Vorteks-1	Örnek hazırlanması	Biosan / FVL2400N	010202-1203-0155
Mini Santrifüj / Vorteks-2	Örnek hazırlanması	Biosan / FVL2400N	010202-1111-1121
-3	Örnek hazırlanması	Biosan / V1	580705114
VORTEX-4	Örnek hazırlanması	LMS / VTX 3000L	VTX09010106
Hassas Terazı	Örnek çalışılması	Kern / PFB-3000-2	WF136156
Saf distile su damıtıcı cihaz	Örnek çalışılması	Merck Millipore / Direct-Q 03 UV	F4PA39770
DNA izolasyon cihazı	Örnek çalışılması	Qiagen / GENO M6	0505F0837
Spektrofotometre	Örnek çalışılması	Maestrogen Nano / MN-913	436020166118
PCR Kabin	Örnek çalışılması	Scanlaf / Titan	1090188
Palm Cyler PCR / PCR 1	Örnek çalışılması	Corbett Research / CG1-96	C060831
Labcyler PCR / PCR 2	Örnek çalışılması	Sensquest / Labcycler	1123280171
Labcyler PCR / PCR 3	Örnek çalışılması	Sensquest / Labcycler	1124230191
Mini shaker	Örnek hazırlanması	Euroclone / ENB101S	13N101S004
Mini shaker	Örnek hazırlanması	Biosan / MR1	N038224

Çizelge 3.2 Kullanılan cihazlar (Devam)

Cihazın Adı	Kullanım Amacı	Cihazın markası, modeli	SERİ NO
Mikrosantrifüj	Örnek hazırlanması	Hermle / Z 233-MZ	51130055
Santrifüj	Örnek hazırlanması	Nüve / NF800	03-2180
UV Transilluminator	Örnek çalışılması	Wealtec	UVW200199
UV Transilluminator (Görüntülemeye bağlı)	Örnek çalışılması	Cleaver	UVTS10104010
Elektroforez	Örnek çalışılması	Wealtec/ Elite3000	E3W0447
Mikrodalga Fırın	Örnek hazırlanması	Beko / MD1500	200091206
Görüntüleme Cihazı	Örnek çalışılması	Cleaver / DI-HD	G10-100726040
Otomatik Pipet (100-1000 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	340562885
Otomatik Pipet (100-1000 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	340562884
Otomatik Pipet (20-200 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	340552192
Otomatik Pipet (20-200 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	340552196
Otomatik Pipet (10-100 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	240540756
Otomatik Pipet (10-100 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	240540752
Otomatik Pipet (2-20 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	340530110
Otomatik Pipet (2-20 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	340530130
Otomatik Pipet (0.5-10 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	340520017
Otomatik Pipet (0.5-10 uL)	Örnek hazırlanması	HTL	940520324
Otomatik Pipet (10-100uL) (8 kanallı)	Örnek hazırlanması	Ependorf	4392039
Otomatik Pipet (0.5-50uL) (8 kanallı)	Örnek hazırlanması	HTL	951220045

3.1.4.Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar çizelge 3.3, 3.4 ve 3.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3 Kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Marka	Üretim yeri, Lot no:
Rekombinant Taq polimeraz	Recombinant Taq polymerase, Thermo Scientific, (5 U/μL)	Carlsbad, California, ABD; EP0402
DNA ladder	Olerup SSP® DNA Size Marker, (20 ng/μl)	Stockholm, İsveç; 1D0
Agaroz	SeaKem® LE Agarose, Lonza	Rockland, ABD; 0000410527
Tris Borate EDTA (TBE) Tamponu	BioWhittaker® 10X TBE, Lonza	Verviers, Belçika; 4MB105
Etidyum Bromür	Olerup SSP® Ethidium Bromide Dropper Bottle	Stockholm, İsveç; Lot no:89V

AT1R antikor belirlenirken kullanılan ticari ELISA kitinin içerdiği kimyasalları çizelge 3.4.'da verilmiştir.

Çizelge 3.4 ELISA kiti içinde bulunan kimyasallar

Tanım	EIA-AT1R	
	Katalog no	İçeriği
Mikro titre şeritleri, AT1R kaplamalı	ATP-MS	12x8
Yıkama tamponu (10x)	ATP-WB	50 ml
Numune Seyreltici, kullanıma hazır	ATP-SD	50 ml
Konjugat Seyreltici, kullanıma hazır	ATPN-CD	14 ml
Kalibrasyon Standartları, kullanıma hazır (2.5-5-10-20-40 U/ml)	ATP-CS1 ATP-CS2 ATP-CS3 ATP-CS4 ATP-CS5	1 ml
Pozitif Kontrol, kullanıma hazır	ATP-PC	1 ml
Negatif Kontrol, kullanıma hazır	ATP-NC	1 ml
Anti-hüman IgG, HRP konjugatı, 100x kalibrasyon	ATP-IGG	1 ml
TMP substrat, kullanıma hazır	ATP-TMB	12 ml
Stop solüsyonu, kullanıma hazır (0.5 M sülfürik asit)	ATP-SS	12 ml

Sitokin polimorfizmi için kit içinde bulunan ve kullanılan materyal çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.5 Sitokin polimorfizm kit içeriği (kimyasal ve malzeme)

Kit içeriği	Miktar
96 kuyucuklu mikrotiter plak, her reaksiyon kuyusunda kurutulmuş primerler	4 adet/kutu
D-mix (180 µl her birinde) dNTP-buffer mix	24 tüp/kutu
Tray seals	6 adet/kutu

3.1.5.Sarf malzemeleri

Kullanılan sarf malzemeleri çizelge 3.6'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 Sarf malzemeleri

Sarf malzemesi adı	Marka, üretim yeri
Distile Su (Distile Su Cihazı)	Merck Millipore, ABD
Mezür	Pyrex, Almanya
Steril Filtreli Pipet Ucu (10, 20, 100, 200, 1000 µL)	Axygen, Almanya
Örnek Saklama Kutuları	Isolab, Almanya
Otomatik Pipet Tekli ve Çoklu (10, 20, 100, 200, 1000 µL)	HTL, Polonya
8 ml Jelsiz Örnek Tüpü (Biyokimya Tüpü)	Becton Dickinson, ABD
3 ml EDTA'lı Örnek Tüpü (CBC Tüpü)	Becton Dickinson, ABD
Tüp Standı	Isolab, Almanya
Elektroforez Jel Sistemi (Yürütme Tankı, Jel Tepsisi, Jel Tarakları)	Olerup, İsviçre
Plastik Örnek-Solüsyon Tüpleri (2, 5, 15, 50 ml)	Isolab, Almanya
Steril enjektör (10, 50 ml)	Hayat, Türkiye

3.2.Çalışma Grubu

Çalışma grubu ve özellikleri aşağıdaki bölümlerde belirtilmiştir.

3.2.1.Çalışma etik kurul onayı ve onamlar

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA14/329) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Etik kurul onayı Ek-1' de sunulmuştur

Çalışma grubuna alınan hasta ve gönüllülere gerekli bilgiler verilerek onamları alınmış ve örneği Ek-2 ve Ek-3'de sunulmuştur.

3.2.2.Çalışma grubunun özellikleri

Çalışmaya dâhil edilen denek sayısı, cinsiyet dağılımı, yaş dağılımı, prognoz ve nakil için donör değişkenleri çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çalışma 100 hasta ve 50 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 150 denek [44 kadın (%29,3), 106 Erkek (%70,7)] ile yapılmıştır. Hasta grubu Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi ABD'de 2010-2016 yılları arasında böbrek nakli olmuş olgulardan seçilmiştir.

Hasta grubunun olmak üzere 73 tanesi (%73) erişkin (21 kadın, 52 erkek; ortalama yaş $38,3 \pm 11,5$ yıl; 19-68 yaş), 27 tanesi pediatrik (8 kadın, 19 erkek; ortalama yaş $13,0 \pm 4,7$ yıl; 3-18 yaş) olmak üzere böbrek nakli yapılan hastalardır (29 kadın, 72 erkek; ortalama yaş $33,8 \pm 14,4$ yıl).

Sağlıklı kontrol grubu ise 50 gönüllüden (15 kadın, 35 erkek; ortalama yaş $38,8 \pm 8,8$ yıl) oluşmaktadır. Sağlıklı kontrol grubu tıbbi sorgulama ve fizik muayene ile değerlendirilerek herhangi bir hastalığı olmayan, aşağıda belirtilmiş olan dâhil edilme ve çalışmadan dışlama koşullarına uygun olarak seçilmiş gönüllü kişilerden oluşmaktadır.

Çizelge 3.7 Çalışma grubunun dağılım özellikleri

	Parametre		n	%
Cinsiyet	Erkek		106	70,7
	Kadın		44	29,3
Çalışma grubu dağılımı	Hasta grubu	Erişkin	73	48,7
		Pediyatrik	27	18,0
	Sağlıklı kontrol	Erişkin	50	33,3
Hasta grubu cinsiyeti	Erişkin	Erkek	52	71,2
		Kadın	21	28,8
	Pediyatrik	Erkek	19	70,4
		Kadın	8	29,6
Kontrol grubu cinsiyeti	Erkek		35	70
	Kadın		15	30
Prognoza göre dağılım	Normal seyir		69	46,0
	Rejeksiyon		31	20,7
	Sağlıklı kontrol		50	33,3
Nakil için donör dağılımı	Canlı nakil		69	69
	Kadavra nakil		31	31
Nakillerde donör cinsiyeti	Erkek		48	48
	Kadın		52	52
Nakil sonrası rejeksiyon durumuna göre hasta dağılımı	Rejeksiyon yok		70	70
	Akut hümorale rejeksiyon		9	9
	Akut hücresele rejeksiyon		14	14
	Akut hücresele+hümorale rejeksiyon		4	4
	İnfeksiyon		1	1
	Kronik rejeksiyon		2	2
Canlı nakillerde donör yakınlığı	Eşten nakil		5	7,2
	Çocuktan nakil		1	1,4
	Kardeşten nakil		24	34,8
	Babadan nakil		9	13,1
	Anneden nakil		22	31,9
	Diğer yakından nakil		8	11,6

Hastaların çalışmaya dâhil edilme koşulları

Nakil sonrası takiplerinin merkezimizde yapılması, nakil sonrası herhangi bir malignite saptanmamış olması ve zihinsel ve kognitif bozukluk olmaması olarak belirlenmiştir.

Hastaların çalışmadan dışlanma koşulları

Hastaların tedaviyi hekimin bilgisi olmadan kesmesi, aksatması veya değiştirmesi, malignite saptanması hastaların çalışmadan dışlanma koşulları olarak kabul edilmiştir.

Sağlıklı kontrol grubunun çalışmaya dâhil edilme koşulları

Herhangi bir tedavi gerektiren hastalığının olmaması ve zihinsel ve kognitif bozukluğun olmaması kontrol grubu seçiminde çalışmaya dâhil edilme koşulları olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilmiş olan koşullara göre çalışmaya dâhil edilen kişilerde yeni bir dışlama koşulu ortaya çıktığı zaman çalışmadan çıkarılmıştır.

Hastaların klinik izlemi ve takibi

Hastalar Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi ABD’de böbrek nakli yapılarak, Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Pediatrik Nefroloji ve/veya Erişkin Nefroloji BD’ de takip edilmiştir.

Hasta takibinde fizik muayene, laboratuvar testleri kullanılmıştır. Laboratuvar testleri olarak hemogram, idrar üre, kreatinin, kan üre azotu ile takip edilmiştir. Takipte böbrek fonksiyon testlerinde bozulma, idrar çıkışında değişiklik gözlenen ve klinik bulgularla rejeksiyon düşünülen hastalara ayrıntılı laboratuvar testleri, %PRA tarama ve tanımlama, biyopsi (hücrel ve humoral rejeksiyon bulguları) uygulanmıştır. Tüm parametrelerin hepsi beraber değerlendirilerek rejeksiyon tanısı konulmuştur.

3.3.Çalışma Metodu

3.3.1.Kan örneği toplanması

Böbrek nakli yapılmış olup durumu istikrarlı olan hastalardan nakil öncesi ve nakil sonrası dönemde olmak üzere 2 kez, rejeksiyon gelişenlerde ise nakil öncesi, nakil sonrası ve klinik ve/veya patolojik olarak kanıtlanmış rejeksiyon atağı döneminde olmak üzere 3 kez rutin tetkikleri için alınmış olan kan örneğinden ayrılan 1 ml serum örneği ve 0,5 ml EDTA'lı kan örneği kullanıldı.

Sağlıklı gönüllülerden onam alındıktan sonra asepsi koşullarına uyularak 1 defaya mahsus olmak üzere anteküital venden 2 tüp (1 adet EDTA'lı tüpde 2 ml ve 1 adet biyokimya tüpünde 5 ml) kan örneği alınarak kullanıldı.

3.3.2.Kan örneklerinin saklanması ve çalışma öncesi hazırlanması

Tüm çalışma süresince hastaların ve gönüllülerin kan örnekleri toplandı. Biyokimya tüpündeki örnekler santrifüjde 3500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen serumlar 2 ml'lik plastik ependorf tüplerine ayrıldı.

EDTA'lı tüpe alınan örnekler yine 3500 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen plazma 2 ml'lik plastik ependorf tüplerine ayrıldı. Elde edilen serum/plazma örnekleri çalışmaya kadar -20 ve -80°C de dondurucularda saklandı. Çalışma öncesi derin dondurucudan çıkartılarak +4 °C de soğutucuda saklandı.

3.3.3.Genomik DNA izolasyonu

EDTA'lı tüpe alınmış olan hasta ve sağlıklı gönüllü kanlarından otomatize sistem GENO-VISION GENOM™ -6 cihazı kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. 200 µl kan ile işlem yapan reagent kartuşları kullanıldı. İki tabladan oluşan cihazın arkada bulunan çalışma tablasına ticari olarak hazır bulunan reagent kartuşları yerleştirildi. 4 ayrı kuyu içeren öndeki tablaya önden arkaya sıralı olmak üzere; 1 numaralı kuyuya 1.5 ml' lik elution tüpü,

2 numaralı kuyuya tip holders ve içine filter tip, 4 numaralı kuyuya 2 ml' lik sample tüp ve bu tüp içine izole edilecek EDTA'lı tüpten 200 µL kan filtreli pipetle alınarak konuldu (Resim 3.1). Çalışma prosedürüne uygun olarak 3 numaralı kuyu boş bırakıldı. Tablalar uygun numuneler eklendikten sonra cihaza kullanma talimatına uygun olarak yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı. DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra 1. kuyudaki elution tüpte izole edilen DNA örneklerinden DNA konsantrasyonu ölçüldü. A260/A280 oranı 1,65-1,80 arasında olacak şekilde saflaştırılan ve final DNA konsantrasyonu 200 ng/µl olan DNA örnekleri üreticinin talimatları doğrultusunda çalışmaya kadar -20 °C saklandı.



Resim 3.1 DNA izolasyonu için kullanılan örnek tüpler

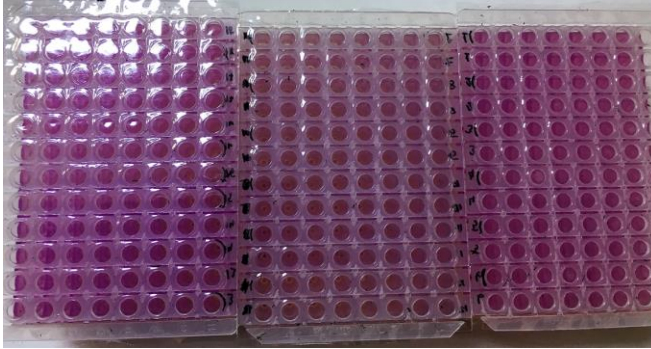
3.3.4. Sitokin gen polimorfizmi çalışması

İzole edilen genomik DNA örnekleri TGF-β1, TNF-α, İL-6, İL-10, İFN-γ için düşük, orta ve yüksek sitokin salınımıyla uyumlu polimorfizm bölgelerinin belirlenmesini sağlayacak ticari sitokin gen polimorfizm kiti “Cytokine Genotyping Tray” (One lambda, Inc., CanogaPark, CA, ABD) kullanılarak, PCR-SSP¹ yöntemi ile çoğaltılıp belirlenen sitokinler için polimorfik bölgeler saptandı.

¹ Klasik bilgilere göre PCR, hedef DNA dizisinin enzimatik olarak çoğaltılması ile bir DNA molekülünün çok sayıda kopyalarının oluşturulmasına izin veren bir tekniktir. PCR-SSP sekansa özgün primerler kullanılarak uygulanır. 1992 yılında Olerup, 1995 yılında Bunce tarafından tanımlanmıştır. Çalışmada tek örnek eş zamanlı çok sayıda test yapılır. Her test sadece özgün sekansın varlığı ya da yokluğuna göre değerlendirilir. Bu testte Taq DNA polimeraz aktivitesi önemlidir. Bu enzim kullanılarak primerler, hangi alel için hazırlanmışsa DNA'nın o aleli taşıyan kısmına bağlanarak thermal cycler cihazında PCR reaksiyonunun başlamasını sağlar. Primerin özgün olduğu DNA segmenti varsa çoğalma gerçekleşir. Her reaksiyon plak/tüpüne kontrol olarak özgün primer set eklenir. Bu kontrol seti genelde ubiquitinli hüman β

Uygulanan test aşamaları;

1. Test başlangıcında kit içinde bulunan D-mix solüsyonu ve DNA örnekleri soğutucudan çıkarılarak oda sıcaklığına (21 °C) getirildi. DNA örneklerini içeren tüpler vorteks ile karıştırıldı.
2. 20 °C de derin dondurucuda saklanan rekombinant Taq polimerazdan pipetleme cihazı ve pipet kullanılarak her bir D-mix tüpüne 5 U/μl eklendi. Taq polimeraz eklenen D-mix tüpleri 5 sn vorteks ile karıştırıldı.
3. Pipetleme cihazı kullanılarak her bir rekombinant Taq polimeraz eklenmiş olan D mix tüpüne 19 μL DNA eklendikten sonra tüpler yeniden 5 sn vorteks ile karıştırıldı.
4. İçine DNA ve Taq polimeraz eklenmiş olan D-mix tüplerinden 10 μL örnek çapraz kontaminasyondan kaçınılarak pipetleme cihazı ile çekilerek primer set traydeki her bir reaksiyon kuyusuna (negatif kontrol hariç) eklendi.
5. Primer set traydeki negatif kontrol olan reaksiyon kuyularına 1 μl distile su ve 9 μL D-mix pipet ile eklenerek 10 μL'ye tamamlandı.
6. Kuyulara DNA ekimi tamamlandıktan sonra, PCR'da kaybı önlemek için primer set tray üzeri seal ile kapatılarak mühürlendi (Resim 3.2).



Resim 3.2 Hazırlanmış olan primer set tray örneği

7. Hazırlanmış olan primer set tray thermal cycler cihazına yerleştirildi (Resim 3.3)

globülinidir. Pozitif reaksiyon olan tüplerde 2 adet gen görünürken negatif reaksiyon olan tüplerde sadece kontrol için kullanılan gen görünür. Negatif ve pozitif reaksiyon jel (%2 agaroz jel) elektroforez yöntemiyle belirlenir. UV ışığı altında "ethidium bromide" ile boyanmış DNA bantları görüntülenir.



Resim 3.3 PCR cihazına yerleştirme

8.Üreticinin talimatları doğrultusunda thermal cycler cihazı için PCR programı çizelge 3.8’da verilmiş olan adımlar olarak düzenlendi.

Çizelge 3.8 PCR programı

Sikluslar	Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Bitiş	1	4	----

9.2.5% Agaroz Jel Hazırlanması: 50 ml TBE (Tris Borate EDTA) ve 950 ml distile su eklenerek %5’lik TBE solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan %5’lik TBE solüsyonundan 100 ml içine 2 g agaroz eklenerek erlene konulup mikrodalga fırında 5 dk 350 watt ile ısıtıldı. Isıtılan agaroz+ TBE solüsyonu içine ethidium bromide (Olerup SSP® Ethidium Bromide Dropper Bottle) eklenerek jel tepsisine döküldü. 10 dk sonra hazır hale gelen agaroz jel, üzerine TBE solusyonu eklenmiş elektroforez tankı içine alındı.

10.Jel Elektroforezi: Elektroforez tankı içine alınan %2,5 agaroz jel plak üzerine PCR cihazından çıkartılan örnekler her bir pipette 10 µL ürün olmak üzere 8 kanallı multipipetlerle pipetleme cihazı kullanarak sırayla transfer edildi. 5 µL DNA ladder uygulaması sonrası elektroforez cihazında 160 volt, 400 amper ile 16 dk yürütüldü (Resim 3.4).



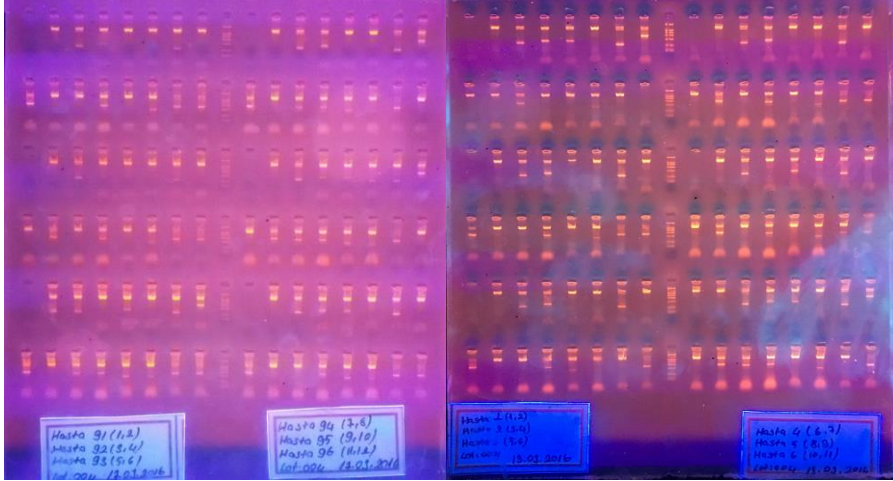
Resim 3.4 Elektroforez cihazına yerleştirilmiş jel

11. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV transilluminatöre transfer edildi. Jel üzerindeki reaksiyonlar şekil 3.1’de gösterildiği gibi çift bant (internal control band ve positive typing band) gözlenen örnekleri pozitif, tek bant (internal control band) gözlenen örnekler negatif olarak kabul edildi ve fotoğraflandı (Resim 3.5). Amplifikasyon saptanmayan örnekler tekrar çalışıldı. Pozitif ve negatif bantlar belirlendikten sonra üreticinin belirlemiş olduğu değerlendirme formu kullanılarak sitokin polimorfizmleri değerlendirildi.
12. İşlem tüm hasta ve sağlıklı kontrol grubu tamamlanana kadar tekrarlandı.

Gel Interpretation*

	Positive Reaction	Negative Reaction	Non-amplification
Well			
Internal Control Band			
Positive Typing Band			
Primer Band			

Şekil 3.1 Elektroforez jel görüntülerinin değerlendirilmesi



T/A orta düzey salınım (üretici) ve A/A düşük salınım (üretici) olarak kabul edildi.

Elektroforez jel görüntüleri üzerinden sitokin gen polimorfizm varlığının değerlendirilmesi birer örnek ile Ek-6 da sunulmuştur.

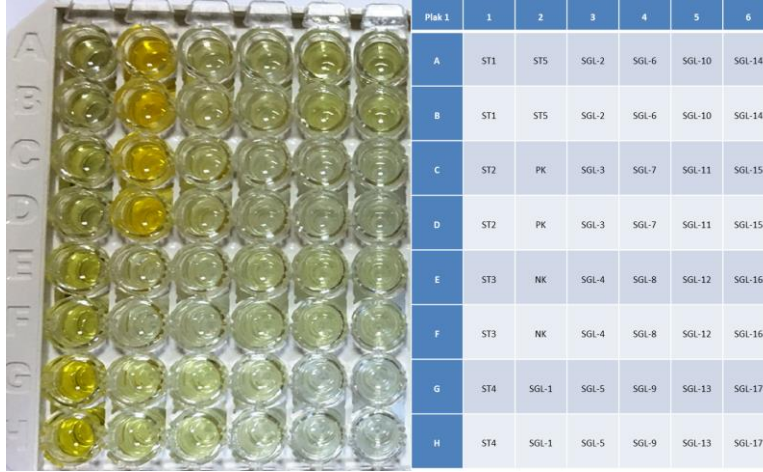
3.3.5.ELISA ile AT1R antikor çalışması

AT1R antikor ölçümü ELISA yöntemiyle yapıldı. Ticari olarak temin edilen “Anti-Anjiotensin II Reseptör Alt Tipi I Antikorlarının nicel olarak belirlenmesi için ELISA immunoassay (EIA)” (One lambda, Inc., Canoga Park, CA, ABD)¹ kiti kullanıldı.

Üreticinin talimatları doğrultusunda uygulanan test aşamaları:

- 1.Tüm reaktiflerin kullanımdan önce oda sıcaklığına erişmesi sağlandı.
- 2.Yıkama tamponu distile su ile 1:10 oranında seyreltilerek kullanıldı (50 ml + 450 ml su). Seyreltilmiş solüsyon 2-8°C’de stabil olarak test boyunca saklandı.
- 3.HRP (Horseradish peroxidase) konjugatı konjugat seyreltici ile 1:100 oranında seyreltildi (50 µl + 4950 µl konjugat seyreltici). Gereken konjugat solüsyonu miktarı taze olarak hazırlandı.
- 4.Kit içinde mevcut olan kalibrasyon standartları 1-5, pozitif kontrol, negatif kontrol, numune seyreltici, konjugat seyreltici, TMB substratı ve stop solüsyonu hazır olarak kullanıldı (resim 3.6 daki gibi yerleştirildi).

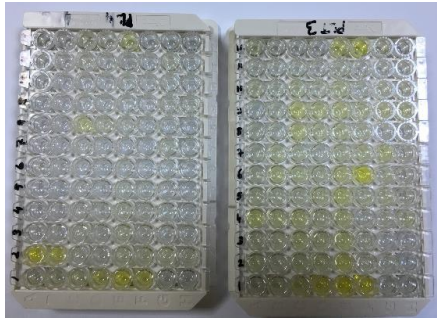
¹ Bu test insan serum ve plazmasında AT1R karşıtı antikorların saptanması için geliştirilmiş olan bir testtir. Bu antikorların hedef antijen epitop konformasyonu için geliştirilmiş olan hücre temelli sandviç Enzym Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) testinin özgülüğü %100, duyarlılığı %88 olarak kabul edilmektedir. Bu kitte Anjiotensin II reseptörü, bir mikrotitre plakası üzerine önceden kaplanmış. Alıcı serumları bu plaklar üzerine eklenerek, Anti-AT1R antikorları ile AT1R’lerin bağlanması sağlanmaktadır. Üzerine HRP ile işaretlenmiş anti-hüman IgG AT1R antikorları eklenerek enzimatik reaksiyon ile ortamda bulunan anti AT1R-AT1R kompleksinden elde edilen kromojenik verilerin spektrofotometre ile okunarak konsantrasyonu belirlenmektedir. Birinci inkübasyon sırasında, numunenin anti-anjiotensin II reseptör I antikorları plaka üzerinde hareketsizleştirilir. Peroksidaz (POD) etiketli anti-hüman IgG antikorları ile yapılan ikinci bir inkübasyonda, enzimatik substrat reaksiyonu, anti-anjiotensin II reseptör I antikorunun konsantrasyonu ve/veya aviditesi ile korelasyonlu bir renk yoğunluğu oluşturmaktadır.



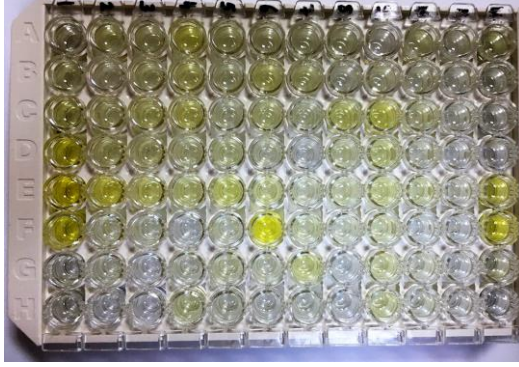
Resim 3.6 ELISA plak yerleşimi ve planı (Plak 1)

ST: Standart, PK: pozitif kontrol, NK: negatif kontrol, SGL: sağlıklı gönüllü

5. Serum örnekleri numune seyreltici ile 1:100 oranında seyreltilmiştir.
6. Seyreltilmiş numuneden, standarttan, kontrolden her hazneye 100 µl pipetle eklenip, hazneler yapışkan şeritle kapatılıp 2-8 °C sıcaklıkta 2 saat inkübe edildi.
7. Sıvı haznelerden çıkartılıp, 300 µl yıkama tampon ile 3 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra ters çevrilip temiz bir kâğıt havlu üzerine yerleştirilip sıvı plakadan çıkartıldı.
8. Her hazneye 100 µl seyreltilmiş HRP konjugatı eklenip, hazneler yapışkan şeritle kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
9. Yıkama işlemi tekrarlanıp her hazneye 100 µl TMP substrat solusyonu koyularak karanlık ortamda oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi.
10. Daha sonra her hazneye 100 µl stop solüsyonu eklenip absorbansı 30 dk içinde 450 nm’de tespit edilerek 620 nm dalga boyunda okundu (örnek ELISA plağı resim 3.7 ve 3.8 de verilmiştir).



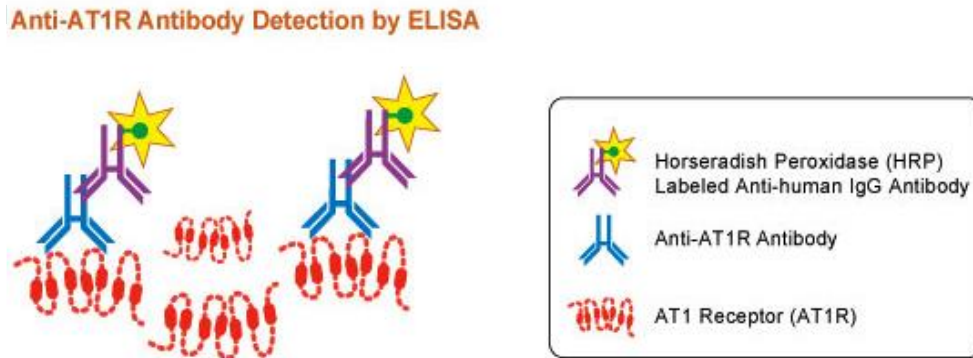
Resim 3.7 ELISA plak örneği 1



Resim 3.8 ELISA plak örneği 2

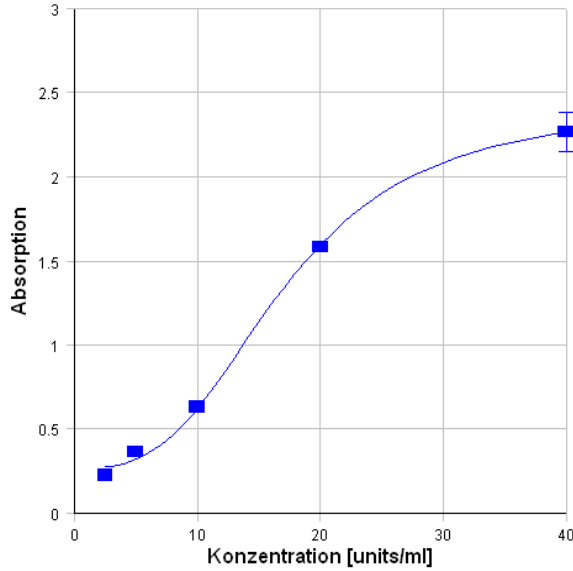
- 11.Kullanıcı talimatına göre numuneler en yüksek standarttan daha yüksek değerler verdiğinde, numuneleri uygun numune seyreltici ile seyreltilip test tekrarlandı.
- 12.Her kit ile 40 hasta örneği eşzamanlı çalışıldı.

Şekil 3.2’de ELISA testinin temeli özetlenmiştir (kullanım talimatından alınmıştır).



Şekil 3.2 ELISA ile AT1R-Ab testinin temeli

- 13.Sonuçların hesaplanması sırasında dört parametrelili bir lojistik uyum eğrisi oluşturulup x eksenini: lineer, anti-AT1R-Ab standart konsantrasyonları (2,5 U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml, 20 U/ml, 40 U/ml), y eksenini: lineer, absorbans olarak kabul edildi
- 14.Numune konsantrasyonları bu standart eğriden hesaplandı. Her testle birlikte bir standart eğrisi çalıştırıldı. Örnek eğri aşağıda şekil 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.3 Anti-AT1R-Ab için örnek konsantrasyon eğrisi

15. Veri analizi sırasında pozitif kontrol beklenen aralıkta ve negatif kontrol kesinti düzeyinden (10 U/ml) küçük ise çalışma geçerli sayıldı. Üreticinin talimatına göre >17 U/ml olan numuneler pozitifken, 10-17 U/ml olan numuneler riskli; <10 U/ml olan numuneler negatif kabul edildi.

3.3.6. Veri analizi

Veriler SPSS for Windows 23.0 versiyonu ile analiz edildi. Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma; kategorik değişkenler sayı ve yüzdeler ile ifade edildi. Değişkenlerin dağılımı çarpıklık (skewness) katsayısı, basıklık (kurtosis) katsayısı ve Kolmogorov Simirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin analizinde parametrik testler, normal dağılım göstermeyen verilerde ise non-parametrik testler kullanıldı. İkili grup karşılaştırmalarında normal dağılmayan verilerin analizinde Mann Whitney U testi, normal dağılım gösteren verilerde ise Student's t testi kullanıldı. İki'den fazla grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığı normal dağılmayan verilerde Kruskal Wallis, normal dağılan verilerde One-Way Anova ile değerlendirildi. Kategorik değişkenlerin oluşturduğu gruplarda gruplar arası fark Ki-kare testi ve Linear by Linear Association testi ile değerlendirildi. Tüm hesaplamalar iki uçlu olarak yapıldı ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.Çalışma grubu demografik özellikleri ve rejeksiyon ilişkisi

Çalışma grubunun yaş ortalaması $31,1 \pm 15,9$ (pediatrik grubun yaş ortalaması $13,0 \pm 4,7$ ve erişkin hasta grubunun yaş ortalaması $38,3 \pm 11,5$) idi. Kontrol grubunun yaş ortalaması $38,8 \pm 8,8$ idi. Kontrol grubunun yaş ortalaması çalışma grubundan daha büyük idi ($p < 0.001$). Pediatrik kontrol grubu olmaması nedeniyle kontrol grubu yaş ortalamasının yüksek olarak saptandığı düşünüldü. Çalışma grubunun %71,0'u ($n=71$), kontrol grubunun %70,0'i ($n=35$) erkekti; cinsiyet yönünden her iki grup benzerdi ($p=0.899$).

Çizelge 4.1 Çalışma grubunun prognoz ve rejeksiyon dağılımı

	n	%
Rejeksiyon durumu		
Normal seyir	69	69,0%
Rejeksiyon	31	31,0%
Rejeksiyon tipi		
Akut hüморal rejeksiyon	9	30,0%
Hücrel rejeksiyon	14	46,7%
İnfeksiyon	1	3,3%
Hücrel ve hüморal rejeksiyon	4	13,3%
Kronik rejeksiyon	2	6,7%

Nakil yapılan hastaların %31,0' inde ($n=31$) rejeksiyon görüldü (çizelge 4.1). En sık görülen rejeksiyon tipi hücrel rejeksiyon ve en az enfeksiyona bağlı rejeksiyon görülmüştü.

Çizelge 4.2 Prognoz ve rejeksiyon tipine göre yaş dağılımı

	Yaş			
	Standart			
	Ortalama	Sapma	Minimum	Maximum
Prognoz				
Kontrol	38,8	8,8	22	63
Rejeksiyon	36,4	14,1	9	66
Normal	28,8	16,2	3	68
Rejeksiyon tipi				
Akut hüморal rejeksiyon	40,4	18,3	18	66
Hücreşel rejeksiyon	37,4	8,2	27	56
İnfeksiyon	59	.	59	59
Hücreşel ve hüморal rejeksiyon	27,3	11,6	18	43
Kronik rejeksiyon	32,0	14,1	22	42

Çizelge 4.3 Cinsiyete göre prognoz ve rejeksiyon tipi dağılımı

	Cinsiyet				P
	Kadın		Erkek		
	N	%	n	%	
Rejeksiyon durumu					
Normal	26	89,7%	43	60,6%	0.004
Rejeksiyon	3	10,3%	28	39,4%	
Rejeksiyon tipi					
Akut hüморal rejeksiyon	1	33,33%	8	29,63%	0.700*
Hücreşel rejeksiyon	1	33,33%	13	48,15%	
İnfeksiyon			1	3,7%	
Hücreşel ve hüморal rejeksiyon	1	33,33%	3	11,11%	
Kronik rejeksiyon			2	7,41%	

*Rejeksiyon olmayan hastalar hesaba dahil edilmedi

Erkeklerde rejeksiyon belirgin olarak kadınlardan daha sık görülmekteydi (**p=0.004**). Rejeksiyon tipi ile cinsiyet arasında ilişki yoktu (p=0.700). Kadınlarda aynı oranda akut

hümorale, hücresele ve her ikisinin birlikte görüldüğü 3 rejeksiyon gerçekleşti. Erkeklerde en sık hücresele rejeksiyon ve bunu akut hümorale rejeksiyon izlemekteydi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.4 Yaşa göre prognoz ve rejeksiyon tipi dağılımı

	Yaş grubu				p
	Pediatrik		Erişkin		
	N	%	n	%	
Rejeksiyon durumu					
Normal seyir	24	88,9%	45	61,6%	0.009
Rejeksiyon	3	11,1%	28	38,4%	
Rejeksiyon tipi					
Akut hümorale rejeksiyon	1	50,0%	8	28,6%	0.718
Hücresele rejeksiyon			14	50,0%	
İnfeksiyon			1	3,6%	
Hücresele ve hümorale rejeksiyon	1	50,0%	3	10,7%	
Kronik rejeksiyon			2	7,1%	

Erişkinde rejeksiyon pediatrik gruba göre daha sık idi ($p=0.009$) (çizelge 4.4).

Çizelge 4.5 Pediatrik ve erişkin hastalarda rejeksiyonun yaş ve cinsiyet ile ilişkisi

	Pediatrik Hasta	Erişkin Hasta	p
Yaş; ort$\pm$ss (min-max)	13.0 $\pm$ 4.7 (3-18)	38.3 $\pm$ 11.5 (19-68)	
Cinsiyet; n (%)			
Kadın	8 (29.6%)	36 (29.3%)	0.970
Erkek	19 (70.4%)	87 (70.7%)	
Rejeksiyon durumu; n (%)			
Rejeksiyon	3 (11.1%)	28 (38.4%)	0.009
Normal Seyir	24 (88.9%)	45 (61.6%)	

Erişkin yaş grubunda rejeksiyon oranı %38,4 düzeyinde iken pediatrik yaş grubunda rejeksiyon %11,1 oranında idi. Erişkin yaş grubunda rejeksiyon belirgin olarak daha fazla idi ($p=0.009$). Donör tipi ve yakınlığının rejeksiyon ile ilişkisi yoktu, donör cinsiyetinde erkek donörlerde rejeksiyon daha sık görülmüştü ($p=0.035$) (çizelge 4.5).

Çizelge 4.6 Rejeksiyon saptanan hastalarda donör özellikleri ile rejeksiyon ilişkisi

		Rejeksiyon durumu				p
		Normal seyir		Rejeksiyon		
		N	%	n	%	
Donör tipi						
	Kadavra	20	64,5%	11	35,5%	0.516
	Canlı	49	71,0%	20	29,0%	
Donör cinsiyeti						
	Erkek	38	79,2%	10	20,8%	0.035
	Kadın	31	59,6%	21	40,4%	
Donör yakınlığı						
	Eşi	4	80,0%	1	20,0%	0.403
	Çocuğu	1	100,0%			
	Kardeşi	16	66,7%	8	33,3%	
	Babası	8	88,9%	1	11,1%	
	Annesi	15	68,2%	7	31,8%	
	Diğer	25	64,1%	14	35,9%	

Kadın alıcılarda verici cinsiyetinin rejeksiyon ile ilişkisi yokken ($p=0.527$), erkek alıcılarda kadın donörlerde daha sık rejeksiyon görülmekte idi ($p=0.032$) (çizelge 4.6).

Çizelge 4.7 Rejeksiyonda cinsiyete göre ilişki

		Rejeksiyon durumu				
		Normal seyir		Rejeksiyon		
Alıcı	Verici	N	%	n	%	p
Kadın	Kadın	13	86,70%	2	13,30%	0.527
	Erkek	13	92,90%	1	7,10%	
Erkek	Kadın	18	48,60%	19	51,40%	0.032
	Erkek	25	73,50%	9	26,50%	

Kadın nakil hastalarında rejeksiyon ile vericinin cinsiyeti arasında anlamlı ilişki saptanmazken, erkek nakil hastalarına kadın vericiden yapılan nakillerde daha yüksek oranda rejeksiyon gözlemlendi ($p= 0.032$) (çizelge 4.7).

4.2.AT1R-Ab düzeyi ile hastalık seyri ilişkisi

Çizelge 4.8 AT1R-Ab düzeylerinin çalışma grubuna göre dağılımı

AT1R-Ab Düzeyi (U/ml)							
	Negatif (<10)		Şüpheli (10-17)		Pozitif (>17)		
	N	%	n	%	n	%	p
Yaş grubu							
Pediyatrik	19	70,4%	6	22,2%	2	7,4%	<0.001
Erişkin	115	93,5%	7	5,7%	1	0,8%	
Donör tipi							
Kadavra	26	83,9%	3	9,7%	2	6,5%	0.606
Canlı	58	84,1%	10	14,5%	1	1,4%	
Donör cinsiyeti							
Erkek	40	83,3%	7	14,6%	1	2,1%	0.959
Kadın	44	84,6%	6	11,5%	2	3,8%	
Donör yakınlığı							
Eşi	5	100,0%					0.320
Çocuğu	1	100,0%					
Kardeşi	20	83,3%	4	16,7%			
Babası	7	77,8%	2	22,2%			
Annesi	19	86,4%	2	9,1%	1	4,5%	
Diğer	32	82,1%	5	12,8%	2	5,1%	

AT1R-Ab negatif oranı erişkin yaş alıcılarda daha sık görülmekteydi ($p<0.001$). AT1R-Ab düzeylerinin donör tipi, donör cinsiyeti, donör yakınlığı ile ilişkisi saptanmadı (çizelge 4.8).

Çizelge 4.9 Nakil öncesi, sonrası ve rejeksiyon sonrasında AT1R-Ab pozitiflik oranları

AT1R-Ab (U/ml)	Nakil Öncesi		Nakil Sonrası		Rejeksiyonda	
	N	%	N	%	N	%
Negatif (<10)	86	86,0%	96	96,0%	31	100,0%
Şüpheli (10-17)	13	13,0%	1	1,0%		
Pozitif (>17)	1	1,0%	3	3,0%		

Rejeksiyon görülen hastaların tümünde nakil sonrasında ve rejeksiyon döneminde bakılan AT1R-Ab düzeyi negatif olarak tespit edildi. Çizelge 4.9 ve çizelge 4.10’ da gösterildiği gibi nakil öncesi veya sonrasında bakılan AT1R-Ab pozitifliği ile rejeksiyon durumunun ilişkisi yoktu.

Çizelge 4.10 Rejeksiyon durumuna göre nakil öncesi, sonrası ve rejeksiyon sırasındaki AT1R-Ab pozitiflik oranları

	Rejeksiyon durumu				p
	Normal seyir		Rejeksiyon		
	N	%	n	%	
Nakil öncesi AT1R-Ab pozitifliği					
Negatif (<10 U/ml)	61	88,4%	25	80,6%	0.450
Şüpheli (10-17 U/ml)	7	10,1%	6	19,4%	
Pozitif (>17 U/ml)	1	1,4%	-	-	
Nakil sonrası AT1R-Ab pozitifliği					
Negatif (<10 U/ml)	66	95,7%	30	96,8%	0.477
Şüpheli (10-17 U/ml)	-	-	1	3,2%	
Pozitif (>17 U/ml)	3	4,3%	-	-	
Rejeksiyon sonrası AT1R-Ab pozitifliği					
Negatif (<10 U/ml)	-	-	31	100, %	
Şüpheli (10-17 U/ml)	-	-	-	-	
Pozitif (>17 U/ml)	-	-	-	-	

Çizelge 4.11 Cinsiyete göre nakil öncesi, sonrası ve rejeksiyon sonrası AT1R-Ab pozitifliği dağılımı

	Cinsiyet			
	Kadın		Erkek	
	N	%	n	%
Nakil öncesi AT1R-Ab pozitifliği				
Negatif (<10 U/ml)	27	93,1%	59	83,1%
Şüpheli (10-17 U/ml)	2	6,9%	11	15,5%
Pozitif (>17 U/ml)	-	-	1	1,4%
Nakil sonrası AT1R-Ab pozitifliği				
Negatif (<10 U/ml)	28	96,6%	68	95,8%
Şüpheli (10-17 U/ml)	-	-	1	1,4%
Pozitif (>17 U/ml)	1	3,4%	2	2,8%
Rejeksiyon sonrası AT1R-Ab pozitifliği				
Negatif (<10 U/ml)	3	100,0%	28	100,0%
Şüpheli (10-17 U/ml)	-	-	-	-
Pozitif (>17 U/ml)	-	-	-	-

Çizelge 4.11’ de gösterildiği gibi nakil öncesi, sonrası ve rejeksiyon sonrası AT1R-Ab pozitifliği ile cinsiyete arasında anlamlı bir ilişki yoktu.

4.3.Sitokin polimorfizm ve rejeksiyon ilişkisi

Cinsiyete göre sitokin polimorfizm dağılımında her iki cinsiyette sitokin polimorfizmi benzer oranlarda görüldü (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 Cinsiyete göre sitokin polimorfizm pozitifliği dağılımı ve karşılaştırması

	Cinsiyet				p
	Kadın		Erkek		
	n	%	n	%	
TNF- α G/G (Low)	33	75,0%	88	83,0%	0.258
TNF- α G/A (High)	11	25,0%	18	17,0%	0.258
TNF- α A/A (High)	-	-	-	-	-
TGF- β 1 T/T G/G (High)	14	31,8%	31	29,2%	0.754
TGF- β 1 T/C G/G (High)	24	54,5%	45	42,5%	0.176
TGF- β 1 T/C G/C (Intermediate)	-	-	3	2,8%	0.556
TGF- β 1 C/C G/G (Intermediate)	5	11,4%	21	19,8%	0.213
TGF- β 1 T/T G/C (Intermediate)	-	-	-	-	-
TGF- β 1 C/C G/C (Low)	1	2,3%	6	5,7%	0.674
TGF- β 1 C/C C/C (Low)	-	-	-	-	-
TGF- β 1 T/T C/C (Low)	-	-	-	-	-
TGF- β 1 T/C C/C (Low)	-	-	-	-	-
İL-10 GCC/GCC (High)	6	13,6%	19	17,9%	0.521
İL-10 GCC/ACC (Intermediate)	10	22,7%	21	19,8%	0.688
İL-10 GCC/ATA (Intermediate)	8	18,2%	18	17,0%	0.873
İL-10 ACC/ACC (Low)	5	11,4%	17	16,0%	0.710
İL-10 ACC/ATA (Low)	10	22,7%	14	13,2%	0.148
İL-10 ATA/ATA (Low)	5	11,4%	17	16,0%	0.873
İL-6 G/G (High)	28	63,6%	70	66,0%	0.665
İL-6 G/C (High)	13	29,5%	29	27,4%	0.786
İL-6 C/C (Low)	3	6,8%	7	6,6%	0.664
İFN- γ T/T (High)	6	13,6%	23	21,7%	0.255
İFN- γ T/A (Intermediate)	26	59,1%	53	50,0%	0.310
İFN- γ A/A (Low)	12	27,3%	30	28,3%	0.991

Çizelge 4.13 Yaş grubuna göre sitokin polimorfizmi dağılımı

	Yaş grubu				
	Pediatrik		Erişkin		p
	n	%	n	%	
TNF-α G/G (Low)	22	81,5%	99	80,5%	0.906
TNF-α G/A (High)	5	18,5%	24	19,5%	0.906
TNF-α A/A (High)	-	-	-	-	-
TGF-β1 T/T G/G (High)	6	22,2%	39	31,7%	0.330
TGF-β1 T/C G/G (High)	15	55,6%	54	43,9%	0.271
TGF-β1 T/C G/C (Intermediate)	1	3,7%	2	1,6%	0.451
TGF-β1 C/C G/G (Intermediate)	5	18,5%	21	17,1%	0.786
TGF-β1 T/T G/C (Intermediate)	-	-	-	-	-
TGF-β1 C/C G/C (Low)	-	-	7	5,7%	0.352
TGF-β1 C/C C/C (Low)	-	-	-	-	-
TGF-β1 T/T C/C (Low)	-	-	-	-	-
TGF-β1 T/C C/C (Low)	-	-	-	-	-
İL-10 GCC/GCC (High)	6	22,2%	19	15,4%	0.399
İL-10 GCC/ACC (Intermediate)	1	3,7%	30	24,4%	0.016
İL-10 GCC/ATA (Intermediate)	5	18,5%	21	17,1%	0.786
İL-10 ACC/ACC (Low)	5	18,5%	17	13,8%	0.551
İL-10 ACC/ATA (Low)	5	18,5%	19	15,4%	0.772
İL-10 ATA/ATA (Low)	5	18,5%	17	13,8%	0.551
İL-6 G/G (High)	17	63,0%	81	65,9%	0.775
İL-6 G/C (High)	9	33,3%	33	26,8%	0.495
İL-6 C/C (Low)	1	3,7%	9	7,3%	0.691
İFN-γ T/T (High)	4	14,8%	25	20,3%	0.511
İFN-γ T/A (Intermediate)	17	63,0%	62	50,4%	0.237
İFN-γ A/A (Low)	6	22,2%	36	29,3%	0.460

Proгноza göre sitokin polimorfizm dağılımında her iki cinsiyette sitokin polimorfizmi benzer oranlarda görüldü (Çizelge 4.14.)

Çizelge 4.14 Proгноza göre sitokin polimorfizm dağılımı ve karşılaştırması

	Prognoz						p*
	Kontrol		Rejeksiyon		Normal		
	n	%	n	%	n	%	
TNF- α G/G (Low)	38	76,0%	28	90,3%	55	79,7%	0.191
TNF- α G/A (High)	12	24,0%	3	9,7%	14	20,3%	0.191
TNF- α A/A (High)	-	-	-	-	-	-	-
TGF- β 1 T/T G/G (High)	19	38,0%	9	29,0%	17	24,6%	0.643
TGF- β 1 T/C G/G (High)	23	46,0%	13	41,9%	33	47,8%	0.585
TGF- β 1 T/C G/C (Intermediate)	1	2,0%	-	-	2	2,9%	0.474
TGF- β 1 C/C G/G (Intermediate)	6	12,0%	7	22,6%	13	18,8%	0.665
TGF- β 1 T/T G/C (Intermediate)	-	-	-	-	-	-	-
TGF- β 1 C/C G/C (Low)	1	2,0%	2	6,5%	4	5,8%	0.607
TGF- β 1 C/C C/C (Low)	-	-	-	-	-	-	-
TGF- β 1 T/T C/C (Low)	-	-	-	-	-	-	-
TGF- β 1 T/C C/C (Low)	-	-	-	-	-	-	-
İL-10 GCC/GCC (High)	4	8,0%	8	25,8%	13	18,8%	0.429
İL-10 GCC/ACC (Intermediate)	9	18,0%	6	19,4%	16	23,2%	0.669
İL-10 GCC/ATA (Intermediate)	13	26,0%	3	9,7%	10	14,5%	0.378
İL-10 ACC/ACC (Low)	8	16,0%	4	12,9%	10	14,5%	0.551
İL-10 ACC/ATA (Low)	8	16,0%	4	12,9%	12	17,4%	0.403
İL-10 ATA/ATA (Low)	8	16,0%	6	19,4%	8	11,6%	0.231
İL-6 G/G (High)	31	62,0%	20	64,5%	47	68,1%	0.723
İL-6 G/C (High)	18	36,0%	6	19,4%	18	26,1%	0.466
İL-6 C/C (Low)	1	2,0%	5	16,1%	4	5,8%	0.101
İFN- γ T/T (High)	9	18,0%	5	16,1%	15	21,7%	0.517
İFN- γ T/A (Intermediate)	27	54,0%	17	54,8%	35	50,7%	0.703
İFN- γ A/A (Low)	14	28,0%	9	29,0%	19	27,5%	0.878

* Rejeksiyon ve normal seyir grubunun karşılaştırılması. Ki-kare testi

Çizelge 4.15 Salınım özelliğine göre sitokin polimorfizm prognoz ilişkisi

		Prognoz						p*
		Kontrol		Rejeksiyon		Normal		
		n	%	N	%	n	%	
TNF- α								
Low	Yok	12	24,0%	3	9,7%	14	20,3%	0,191
	Var	38	76,0%	28	90,3%	55	79,7%	
High	Yok	38	76,0%	28	90,3%	55	79,7%	0,191
	Var	12	24,0%	3	9,7%	14	20,3%	
TGF- β 1								
High	Yok	8	16,0%	9	29,0%	19	27,5%	0.878
	Var	42	84,0%	22	71,0%	50	72,5%	
Intermediate	Yok	43	86,0%	24	77,4%	54	78,3%	0.925
	Var	7	14,0%	7	22,6%	15	21,7%	
Low	Yok	49	98,0%	29	93,5%	65	94,2%	0.607
	Var	1	2,0%	2	6,5%	4	5,8%	
İL-10								
High	Yok	46	92,0%	23	74,2%	56	81,2%	0.429
	Var	4	8,0%	8	25,8%	13	18,8%	
Intermediate	Yok	28	56,0%	22	71,0%	43	62,3%	0.402
	Var	22	44,0%	9	29,0%	26	37,7%	
Low	Yok	26	52,0%	17	54,8%	39	56,5%	0.875
	Var	24	48,0%	14	45,2%	30	43,5%	
İL-6								
High	Yok	1	2,0%	5	16,1%	4	5,8%	0.131
	Var	49	98,0%	26	83,9%	65	94,2%	
Low	Yok	49	98,0%	26	83,9%	65	94,2%	0.131
	Var	1	2,0%	5	16,1%	4	5,8%	
İFN- γ								
High	Yok	41	82,0%	26	83,9%	54	78,3%	0.517
	Var	9	18,0%	5	16,1%	15	21,7%	
Intermediate	Yok	23	46,0%	14	45,2%	34	49,3%	0.703
	Var	27	54,0%	17	54,8%	35	50,7%	
Low	Yok	36	72,0%	22	71,0%	50	72,5%	0.878
	Var	14	28,0%	9	29,0%	19	27,5%	

* Rejeksiyon ve normal seyir grubunun karşılaştırılması. Ki-kare testi

Çizelge 4.16 Sitokin polimorfizmi salınım düzeyi/yaş grupları dağılımı

		Yaş Grubu				p
		Pediatrik		Erişkin		
		N	%	n	%	
TNF- α						
Low	Yok	5	18,5%	24	19,5%	0.906
	Var	22	81,5%	99	80,5%	
High	Yok	22	81,5%	99	80,5%	0.906
	Var	5	18,5%	24	19,5%	
TGF- β 1						
High	Yok	6	22,2%	30	24,4%	0.811
	Var	21	77,8%	93	75,6%	
Intermediate	Yok	21	77,8%	100	81,3%	0.675
	Var	6	22,2%	23	18,7%	
Low	Yok	27	100,0%	116	94,3%	0.352
	Var			7	5,7%	
İL-10						
High	Yok	21	77,8%	104	84,6%	0.399
	Var	6	22,2%	19	15,4%	
Intermediate	Yok	21	77,8%	72	58,5%	0.062
	Var	6	22,2%	51	41,5%	
Low	Yok	12	44,4%	70	56,9%	0.239
	Var	15	55,6%	53	43,1%	
İL-6						
High	Yok	1	3,7%	9	7,3%	0.691
	Var	26	96,3%	114	92,7%	
Low	Yok	26	96,3%	114	92,7%	0.691
	Var	1	3,7%	9	7,3%	
İFN- γ						
High	Yok	23	85,2%	98	79,7%	0.511
	Var	4	14,8%	25	20,3%	
Intermediate	Yok	10	37,0%	61	49,6%	0.237
	Var	17	63,0%	62	50,4%	
Low	Yok	21	77,8%	87	70,7%	0.460
	Var	6	22,2%	36	29,3%	

Çizelge 4.17 Sitokin polimorfizmi salınım düzeyi/cinsiyet dağılımı

		Cinsiyet				p
		Kadın		Erkek		
		N	%	n	%	
TNF- α						
Low	Yok	11	25,0%	18	17,0%	0.258
	Var	33	75,0%	88	83,0%	
High	Yok	33	75,0%	88	83,0%	0.258
	Var	11	25,0%	18	17,0%	
TGF- β 1						
High	Yok	6	13,6%	30	28,3%	0.056
	Var	38	86,4%	76	71,7%	
Intermediate	Yok	39	88,6%	82	77,4%	0.111
	Var	5	11,4%	24	22,6%	
Low	Yok	43	97,7%	100	94,3%	0.674
	Var	1	2,3%	6	5,7%	
İL-10						
High	Yok	38	86,4%	87	82,1%	0.521
	Var	6	13,6%	19	17,9%	
Intermediate	Yok	26	59,1%	67	63,2%	0.636
	Var	18	40,9%	39	36,8%	
Low	Yok	24	54,5%	58	54,7%	0.985
	Var	20	45,5%	48	45,3%	
İL-6						
High	Yok	3	6,8%	7	6,6%	0.605
	Var	41	93,2%	99	93,4%	
Low	Yok	41	93,2%	99	93,4%	0.605
	Var	3	6,8%	7	6,6%	
İFN- γ						
High	Yok	38	86,4%	83	78,3%	0.255
	Var	6	13,6%	23	21,7%	
Intermediate	Yok	18	40,9%	53	50,0%	0.310
	Var	26	59,1%	53	50,0%	
Low	Yok	32	72,7%	76	71,7%	0.898
	Var	12	27,3%	30	28,3%	

4.4.Sitokin polimorfizmi ve AT1R-Ab ilişkisi

Çizelge 4.18 Sitokin polimorfizmine göre AT1R-Ab pozitifliği dağılımı

		AT1R-Ab Pozitifliği (U/ml)						
		Negatif		Şüpheli		Pozitif		
		(<10)		(10-17)		(>17)		
		N	%	N	%	n	%	p
TNF-α G/G	Yok	28	96,6%	1	3,4%			0.156
(Low)	Var	106	87,6%	12	9,9%	3	2,5%	
TNF-α G/A	Yok	106	87,6%	12	9,9%	3	2,5%	0.156
(High)	Var	28	96,6%	1	3,4%			
TNF-α A/A (High)	Yok	134	89,3%	13	8,7%	3	2,0%	-
TGF-β1 T/T G/G	Yok	92	87,6%	10	9,5%	3	2,9%	0.217
(High)	Var	42	93,3%	3	6,7%			
TGF-β1 T/C G/G	Yok	72	88,9%	7	8,6%	2	2,5%	0.756
(High)	Var	62	89,9%	6	8,7%	1	1,4%	
TGF-β1 T/C G/C	Yok	131	89,1%	13	8,8%	3	2,0%	0.569
(Intermediate)	Var	3	100,0%					
TGF-β1 C/C G/G	Yok	111	89,5%	11	8,9%	2	1,6%	0.695
(Intermediate)	Var	23	88,5%	2	7,7%	1	3,8%	
TGF-β1 T/T G/C	Yok	134	89,3%	13	8,7%	3	2,0%	-
(Intermediate)								
TGF-β1 C/C G/C	Yok	130	90,9%	11	7,7%	2	1,4%	0.002
(Low)	Var	4	57,1%	2	28,6%	1	14,3%	
TGF-β1 C/C C/C (Low)	Yok	134	89,3%	13	8,7%	3	2,0%	-
TGF-β1 T/T C/C (Low)	Yok	134	89,3%	13	8,7%	3	2,0%	-
TGF-β1 T/C C/C (Low)	Yok	134	89,3%	13	8,7%	3	2,0%	-
İL-10 GCC/GCC	Yok	110	88,0%	13	10,4%	2	1,6%	0.512
(High)	Var	24	96,0%			1	4,0%	
İL-10 GCC/ACC	Yok	107	89,9%	10	8,4%	2	1,7%	0.578
(Intermediate)	Var	27	87,1%	3	9,7%	1	3,2%	
İL-10 GCC/ATA	Yok	112	90,3%	9	7,3%	3	2,4%	0.695
(Intermediate)	Var	22	84,6%	4	15,4%			
İL-10 ACC/ACC	Yok	114	89,1%	12	9,4%	2	1,6%	0.899
(Low)	Var	20	90,9%	1	4,5%	1	4,5%	
İL-10 ACC/ATA	Yok	113	89,7%	10	7,9%	3	2,4%	0.982
(Low)	Var	21	87,5%	3	12,5%			
İL-10 ATA/ATA	Yok	114	89,1%	11	8,6%	3	2,3%	0.641
(Low)	Var	20	90,9%	2	9,1%			

Çizelge 4.18 Sitokin polimorfizmine göre AT1R-Ab pozitifliği dağılımı (devam)

		AT1R Pozitifliği						
		Negatif		Şüpheli		Pozitif		p
		(<10)		(10-17)		(>17)		
		n	%	n	%	n	%	
İL-6 G/G (High)	Yok	49	94,2%	3	5,8%			0.114
	Var	85	86,7%	10	10,2%	3	3,1%	
İL-6 G/C (High)	Yok	93	86,1%	12	11,1%	3	2,8%	0.044
	Var	41	97,6%	1	2,4%			
İL-6 C/C (Low)	Yok	126	90,0%	11	7,9%	3	2,1%	0.538
	Var	8	80,0%	2	20,0%			
İFN-γ T/T (High)	Yok	107	88,4%	11	9,1%	3	2,5%	0.374
	Var	27	93,1%	2	6,9%			
İFN-γ T/A (Intermediate)	Yok	64	90,1%	7	9,9%			0.403
	Var	70	88,6%	6	7,6%	3	3,8%	
İFN-γ A/A (Low)	Yok	97	89,8%	8	7,4%	3	2,8%	0.881
	Var	37	88,1%	5	11,9%			

TGF- β 1 C/C G/C (Low) sitokin polimorfizmi yokluğunda AT1R-Ab negatifliği, varlığında AT1R-Ab pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı saptandı (**p=0.002**).

İL-6 G/C (High) sitokin polimorfizmine sahip olanlarda AT1R-Ab negatifliği açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptandı (**p=0.044**)

5.TARTIŞMA

5.1.Böbrek naklinde AT1R-Ab ve rejeksiyon ilişkisi

Böbrek naklinde klasik HLA antikorlarına ek olarak non-HLA antikorlardan AT1R-Ab'nın AT1R' ye bağlanmasının nakil sonrası böbrek hasarında kritik bir basamak olduğu düşünülmektedir. Ang II-AT1R sisteminde aşırı aktivasyon hipertansiyona, vasküler remodeling nedeniyle kardiyak ve renal komplikasyonlara yol açar. Ağır vasküler rejeksiyon ve malin hipertansiyonu olan ve anti-HLA antikor bulunmayan böbrek alıcılarında, agonistik AT1R-Ab varlığı ilk çalışmalarda saptanmıştır. Diğer non-HLA faktörler arasında değerlendirildiğinde AT1R-Ab'ları organ reddiyle nedenselliği en iyi gösterilmiş faktördür. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile rejeksiyon ile ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmaktadır. AT1R-Ab pozitifliğinin böbrek naklinde rejeksiyon ile ilişkili olduğunu söyleyen çalışmalar mevcutken, son yıllarda ilişki olmadığı yönünde bildirimde bulunan çalışma sayıları artmıştır.

Dragun ve arkadaşlarının Mayıs 2016'da yayınladıkları derlemesinde renal transplantasyonda AT1R-Ab etkisini araştıran 16 makale yayınlandığı, toplam 1883 hastada AT1R-Ab ile ilgili çalışma yapıldığı bildirilmiştir [79].

2016 yılında Bjerre ve arkadaşlarının pediatrik vakaları da içeren çalışmasında böbrek nakli geçirmiş olan 30 çocuk ve 28 erişkin ele alınmış, sağlıklı kontrol grubu ile beraber AT1R-Ab düzeyleri ölçülmüştür. Pediatrik grupta medyan total AT1R-Ab düzeylerinin erişkin transplant hastalarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir [175]. Bizim çalışmamızda da rejeksiyon ile ilişkili bulunmasa da Bjerre ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak pediatrik hasta grubunun AT1R-Ab düzeyleri erişkin grubuna göre yüksek saptanmıştır ($p<0.001$). Pediatrik çalışma grubumuzda rejeksiyon sayımızın kısıtlı olması ve pediatrik kontrol grubumuzun olmaması istatistiksel olarak sıkıntı yaratmış olabilir. Bunu çalışmamızın sınırlılıklarından biri olarak kabul etmekteyiz.

Reinsmoen ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada renal transplant alıcılarında AT1R-Ab varlığının rejeksiyonla kuvvetli bir ilişkisi olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada toplam 97 hasta nakil öncesi ELISA ile AT1R-Ab açısından taranmış, 32 hastada yüksek

düzeyde AT1R-Ab saptanmıştır. HLA ya da MICA'ya karşı DSA pozitifliği olmayan 63 renal transplant alıcısının 16'sında akut rejeksiyon saptanmış, bu rejeksiyonların 7 tanesi antikor aracılı, 9 tanesi hücrel rejeksiyon olarak belirlenmiştir. Antikor aracılı rejeksiyon görülen 7 hastanın 6'sında yüksek seviyede AT1R-Ab saptanırken hücrel rejeksiyon gözlenen hastalarda AT1R-Ab bulunmadığı bildirilmiştir [148].

Kelsch ve arkadaşları 2011'deki yayınlarında annesinden böbrek nakli olmuş bir çocukta nakil öncesi düşük düzeyde DSA ve yüksek titrede AT1R-Ab saptandığını, 3. günde hastada hipertansiyon, hipertansif ensefalopati ve eş zamanlı B hücre CDC-LCM pozitifliği saptandığını bildirmiştir. DSA ve AT1R-Ab varlığında sinerjistik bir etki ile şiddetli rejeksiyon olabileceğine dikkat çekmişlerdir [176].

Pre ve post transplant serum örneklerinin çalışıldığı 351 hastalık başka bir çalışmada da AT1R-Ab ve DSA birlikte saptanan hastalarda sadece DSA varlığına göre daha düşük greft yaşamı bildirilmiştir [177].

2012 yılında Lukitsch ve arkadaşları, renal transplant hastalarında AT1R aktivasyonunun renal arter kontraksiyonuna etkisini araştırmak amacıyla ratlarda bir çalışma yapmıştır. Lewis ratlarından izole edilen renal ve mezenterik arterleri anti-HLA-Ab negatif olmasına rağmen rejeksiyon gözlenen hastalardan saflaştırılan AT1R-Ab ile inkübe etmiş ve vasküler kontraksiyonu ölçmüşlerdir. Mezenterik arterlerde etki gözlemezken renal arterlerde kontraksiyon gözlemlenmiş ve transplantasyonda arterial kontraksiyona etkisinin dikkate alınması gerektiğini ve özgül epitoplara karşı geliştirilen nötrolizan antikorlar ile iyileşme sağlanabileceğini bildirmişlerdir [178].

2013'de Giral ve arkadaşları 599 hasta ile yaptıkları çalışma sonrasında nakil öncesi AT1R-Ab varlığının akut rejeksiyonla ilişkili olmakla birlikte aynı zamanda uzun dönem greft kaybı için de bağımsız bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir [179]. 2014'de yayınlanan 2 ayrı çalışmada aynı bulgular elde edilmiştir. Polonya'dan Banasik ve arkadaşları 117 hasta ile, Meksika'dan Hernández-Méndez ve arkadaşları 174 hasta ile yaptıkları çalışmalarda; nakil öncesi dönemde AT1R-Ab pozitifliği olan grubun nakil sonrası 1 yıl içinde olmayan gruba göre rejeksiyon oranının yüksek bulunduğunu ve greft ömrünün az olduğunu bildirmişlerdir [180-181]. Reinsmoen ve arkadaşları kalp nakli

yapılan olgularda da DSA ile AT1R-Ab varlığı beraberliğinin greft üzerine artmış negatif etkiye sahip olduğunu bildirmiştir [182].

2014 yılında Güney Kore'den bildirilen bir çalışmada böbrek nakli yapılan, pretransplant dönemde DSA negatif olan ve rejeksiyon saptanan 37 vaka (AMR n:6, ACR n:23, AMR+ACR n:8) değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AMR ve AMR+ACR grubunda AT1R-Ab yüksekliği saptanırken (>10 U/mL), ACR grubunda anlamlı farklılık gözlenmediği, AT1R-Ab yüksekliği ile antikor bağımlı rejeksiyon arasında bir ilişkinin olabileceği bildirilmiştir [183].

Banasik ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınlanan çalışmasında AT1R-Ab ve anti-ETAR (Endothelin-1 Type A Receptor Antibody) beraber çalışılmış ve renal allogreft hasarında non-HLA antikorların etkisi araştırılmıştır. 65 hasta değerlendirilerek AT1R-Ab düzeyi >9 U/mL anlamlı kabul edilmiş ve non-HLA- Ab yüksekliği saptanan hastalarda morfolojik ve fonksiyonel allogreft hasarı ve greft kaybı ile anlamlı ilişki saptanmış, greft yetmezlik riskinin tahmininde non-HLA Ab çalışmasının yararlı olabileceği bildirilmiştir [184].

2015 de yapılan bir vaka bildirimi ile nakil öncesi AT1R-Ab pozitifliği (109,55 U/ml) olan 7 yaşında bir çocukta Ang reseptör blokajı ile tedavi ve desensitizasyona rağmen hızlandırılmış vasküler ve hücrel rejeksiyon ve renal allogreftte tromboz geliştiği bildirilmiştir. Bu çalışmada AT1R-Ab ve mikrovasküler oklüzyon arasında bir ilişki daha önce tanımlanmış olmasına rağmen, ilk defa erken ve yıkıcı allogreft yetmezliğine yol açan renal arter trombozu ile AT1R-Ab ilişkisinin olabileceği vurgulanmıştır. AT1R-Ab'nın tromboz açısından bir risk olabileceği ve AT1R-Ab mekanizmasında yer alabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada hastada plazmaferez, IVIG ve rituximab ile AT1R-Ab seviyesinin azaltılabildiği fakat asla normal düzeye indirilemediği de (en düşük 12,87 U/ml) bildirilmiştir [167].

2015 de Juhan Lee ve arkadaşları Kore'de yaptıkları çok merkezli bir çalışmada 166 hastada nakil öncesi AT1R-Ab taraması sonrası AT1R-Ab düzeyi eşik değerini 9,05 U/ml olarak kabul ederek %59 oranında (98/166 hasta) antikor pozitifliği saptamışlardır. Antikor pozitif hastalarda negatif olanlara oranla anlamlı olarak yüksek düzeyde biyopsi ile kanıtlanmış akut rejeksiyon geliştiğini bildirmişlerdir. Nakil öncesi AT1R-Ab pozitifliği olan hastalarda, mismatch HLA, ABO uyumsuzluğu, PRA, DSA gibi geleneksel

immünolojik risk faktörlerinden bağımsız olarak naklin ilk yılı içinde akut ret riskini 3,2 kat yüksek olarak bildirmişlerdir [185].

2015 yılında Fuss ve arkadaşları yayınladıkları C4d negatif, biyopsi kanıtlı AMR saptanan ve dolaşımında DSA antikoru olmayan böbrek nakli yapılmış olan 11 vakalık bir çalışmada AT1R-Ab pozitifliği için cut-off (eşik) değeri 10 U/ml olarak kabul etmişlerdir. Vakalarda rejeksiyon ile ilişki saptadıklarını ve merkezlerinde rutin olarak AT1R-Ab taraması yapılmakta olduğunu bildirmişlerdir [186].

Robert ve arkadaşlarının 2015’de yayınladıkları bir vaka bildiriminde böbrek nakli yapılan bir erkek hastada posttransplant 4. günde gelişen akut vasküler rejeksiyonda DSA yokluğuna rağmen artmış AT1R-Ab varlığı (14,1 U/mL) saptanmıştır. Sonrasında steroid+ ATG+ plazmaferez+ candesartan ile tedaviyle rejeksiyonun önlendiği ve DSA yokluğunda AT1R-Ab pozitifliğinin rejeksiyon tanısında kullanılabileceği bildirilmiştir [187].

2015 yılında nakil öncesi AT1R-Ab varlığının posttransplant FSGS (focal segmental glomerulo sclerosis) nüksü için bir risk faktörü olduğunu bildiren başka bir çalışmada da 28 hasta ele alınmış ve AT1R-Ab eşik değeri 9,1 U/mL olarak kabul edilmiştir. Nakil öncesi AT1R-Ab seviyesinin çalışılmasının post-transplant FSGS rekürrensi için yüksek risk taşıyan hastaların ortaya konulmasında yardımcı bir biyomarker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [188].

2015 yılında Kore’den Lee ve arkadaşları DSA ve AT1R-Ab eş zamanlı çalışılan 53 vakalık (AMR n:22; ACR n:29; AMR+ACR n:2) bir çalışma bildirmiştir. Bu çalışmada AT1R-Ab eşik değeri 10 U/mL olarak kabul ederek değerlendirme yapılmış ve AT1R-Ab varlığının renal allograft rejeksiyonlu hastalarda sınıf 1 HLA-DSA ile önemli şekilde ilişkili olduğu yayınlanmıştır. Renal allograft rejeksiyonlu hastalarda AT1R-Ab ve DSA birlikte pozitifliği AMR ile ilişkili bulunmuştur [189].

2016 da bildirilen başka bir çalışmada da Meksika’dan Cuevaz ve arkadaşları çalışmaya aldıkları renal transplantasyon yapılmış 162 vakadan 147 tanesinde AT1R-Ab pozitifliği saptadıklarını (%90,7), medyan pretransplant AT1R-Ab seviyesinin 9,12 U/ml (min–max 1,56–500) saptandığını, pretransplant AT1R-Ab saptanmasının HLA-DSA oluşumu için bağımsız bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir [190].

2016 yılında Urban ve arkadaşlarının *kalp nakli* yapılan 69 hasta ile yaptıkları, nakil öncesi ve nakil sonrasında AT1R-Ab çalıştıkları bir diğer çalışmada; nakil öncesi 8 hastada (%11,6) antikor pozitifliği saptandığı, 44 hastanın (%63,8) nakil öncesi negatif iken sonradan pozitiflik geliştirdiği, 17 hastanın (%24,6) tamamen negatif antikor profiline sahip olduğu, eşik değeri olarak 17 U/ml ele alındığı ve AT1R-Ab ile *kardiyak* rejeksiyon arasında bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir [191].

2016 yılında Bjerre ve arkadaşlarının pediatrik vakaları da içeren çalışmasında böbrek nakli geçirmiş olan 30 çocuk ve 28 erişkin ele alınmış, sağlıklı kontrol grubu ile beraber AT1R-Ab düzeyleri ölçülmüştür. Pediatrik grupta medyan total AT1R-Ab düzeylerinin erişkin transplant hastalarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir [175].

2016 yılında Philogene ve arkadaşları tarafından 70 böbrek nakli hastası posttransplant olarak değerlendirmiş ve AT1R-Ab ve AECA varlığı araştırılmış, özellikle AT1R-Ab düzeylerinin AMR saptanan hastalarda rejeksiyon saptanmayan gruba göre yüksek olduğu yayınlanmıştır. Ortalama AT1R-Ab konsantrasyonları AMR saptanan hastalarda $18,8 \pm 10,6$ U/ml iken, rejeksiyon saptanmayanlarda $11,8 \pm 7,4$ U/ml, hücresel rejeksiyon saptananlarda $12,9 \pm 6,7$ U/ml olarak bildirmiştir [192].

Guzzo ve arkadaşlarını 2017’de yayınladıkları bir vaka sunumunda, ilk böbrek nakli steroid dirençli akut hücresel rejeksiyon ile sonuçlanan ve ikinci nakil gerçekleştirilen 13 yaşında bir erkek çocuk bildirilmiştir. İkinci nakil sonrası erken hümorale rejeksiyon gözlenen hastada DSA ve MICA negatifken AT1R-Ab pozitif saptanmıştır. Hastanın retrospektif olarak ilk nakil öncesi serumu çalışıldığında nakil öncesi AT1R-Ab pozitifliği (128 U/ml) gözlenmiş ve Losartan tedavisi başlanan vakanın mükemmel bir klinik ve histolojik iyileşme gösterdiği bildirilmiştir [193]. Mayıs 2017’de başka bir vaka sunumunda 39 yaşında bir erkek hastada posttransplant 7. yılda gelişen renal yetmezlik tablosunda DSA ve AT1R-Ab pozitifliği (>50 U/ml) saptandığı ve hastanın klasik immünosüpresyon kombinasyonuna Bortezomib eklenerek uygulanan tedavi sonrası klinik tablonun düzeldiği bildirilmiştir [170].

Mayıs 2017’de yapılan bir metaanalizde Kasım 2016’ya kadar yapılmış olan AT1R-Ab ve erişkin hastalarda rejeksiyon ile ilişkili 154 çalışma değerlendirilmiştir. AT1R-Ab yüksekliği ile akut yetmezlik ya da böbrek greft yetmezliği arasında ilişki olduğu, fakat

nakil öncesi AT1R-Ab düzeyinin bir biyomarker olarak kullanılamayacağı bildirilmiştir [194].

Mart 2017’de yayımlanan başka bir çalışmada, Lim ve arkadaşları, DSA negatif olan böbrek nakli yapılmış 27 hastada histopatolojik olarak AT1R-Ab ile rejeksiyon ilişkisini araştırmışlar ve AT1R-Ab pozitif olan hastalarda antikor aracılı rejeksiyonun negatif olan gruba göre daha yüksek oranda saptandığını bildirmişlerdir [195].

Oysa Mart 2017’de yayınlanan Pinelli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 142 canlı donörden yapılan böbrek nakli değerlendirilmiş ve greft yetmezliği ile DSA ilişki bulunmuşken, AT1R-Ab ve AECAs ilişkisiz bulunmuştur. Bizim çalışmamıza benzer şekilde bu çalışmada greft yetmezliğinin önceden bilinmesi için AT1R-Ab düzeyinin iyi bir gösterge olmayabileceği belirtilmiştir [196].

Gene çalışmamıza benzer olarak Deltombe ve arkadaşları Temmuz 2017’de, Fransa’da 3 merkezden 940 böbrek nakli hastasında yapılan DIVOT çalışmasında AT1R-Ab düzeyi ile akut rejeksiyon ya da greft yetmezliği açısından anlamlı risk saptanmadığını bildirilmiştir [197]. Deltombe ve arkadaşlarının, 2013’de AT1R-Ab rejeksiyon ilişkisi olduğunu bildiren çalışmalarının [179] aksine aynı ekiple daha geniş hasta grubu ile çok merkezli olarak yeniden çalışma yapıldığına ve AT1R-Ab ile rejeksiyon arasında ilişki saptanmadığına değinmesi önemlidir [179, 197].

Temmuz 2017’de yayımlanan Kimball ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise 73 normal birey ve 72 böbrek hastasında AT1R-Ab değerlendirilmiş ve nakil öncesi AT1R-Ab düzeyi yüksekliğinin doku hasarı için uyarıcı olabileceği, fakat antikor aracılı rejeksiyon için bir biyomarker olarak kullanılamayacağı, olası kötü prognozu düşündüreceği bildirilmiştir [198].

Çalışmamızda elde edilen rejeksiyon gelişimi ile nakil öncesi AT1R-Ab yüksekliği ilişkisi daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur [37, 197-198].

Reinsmoen ve arkadaşlarının [148] ve In ve arkadaşlarının [183] çalışmalarında hücresel ve humoral rejeksiyon ayrı değerlendirilerek humoral rejeksiyon ile de anlamlı ilişki

bulunmuş olmasına rağmen bizim çalışmamızda bu ayrım hasta sayımızın az olması nedeniyle yapılamamış, tüm rejeksiyon hastaları birlikte ele alınmıştır.

Gelişen rejeksiyon tablosuna göre değerlendirildiğinde:

- 1) Çalışmamızda toplam 9 akut hücrel rejeksiyon gözlenen hastadan sadece iki tanesinde (denek no 38 ve denek no 99) riskli AT1R-Ab düzeyi saptanmıştır. Bu vakalarda nakil öncesi 11,335 U/ml ve 15,934 U/ml olan AT1R-Ab değerinin nakil sonrası 6,956 U/ml ve <2,5 U/ml düzeyine, rejeksiyon döneminde ise her ikisinin de <2,5 U/ml düzeyine indiği gözlenmiştir. Bunun dışında üç vakada (denek no 7, 10, 14) nakil öncesi sırasıyla 6,115 U/ml- 5,221 U/ml ve 5,376 U/ml değerleri saptanmıştır. Nakil sonrası bu değerlerin sırasıyla <2,5 U/ml-<2,5 U/ml ve 4,984 U/ml düzeyini indiği, rejeksiyon döneminde ise sırasıyla 4,024 U/ml-<2,5 U/ml ve <2,5 U/ml olarak saptandığı görülmüştür. Değerler arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Başka iki vakada (denek no 24, 33) ise nakil öncesi <2.5 U/ml olan değerin ortalamanın üstüne çıktığı, nakil sonrası sırasıyla 8,317 U/ml ve 7,274 U/ml saptandığı, 24 nolu denekte rejeksiyon döneminde değerin <2.5 altına indiği fakat 33 nolu denekte 6,966 U/ml olarak devam ettiği gözlenmiştir.
- 2) Çalışmamızda toplam 14 akut hücrel rejeksiyon geliştiği gözlenmiştir. Akut hücrel rejeksiyon gelişen hastalar arasında yapılan değerlendirmede 4 denekte (denek no 21, 22, 27, 36) nakil öncesi 10<U/ml değer (sırasıyla 13,341 U/ml, 11,379 U/ml, 12,807 U/ml, 11,292 U/ml) saptanmıştır. Dört hastada da (denek no 2, 13, 28, 30) nakil öncesi ortalamanın üzerinde değer (sırasıyla 7.06 U/ml, 7,644 U/ml, 7,037 U/ml, 7,855 U/ml) saptanmıştır. Tüm akut hücrel rejeksiyon gelişen hastaların nakil sonrası AT1R-Ab değerinin düştüğü ve rejeksiyon döneminde <2,5 U/ml'ye gerilediği gözlenmiştir. In ve arkadaşları [181] AT1R-Ab eşik değerini 10 U/ml olarak değerlendirme yapmıştır. Bu göz önüne alınırsa akut hücrel rejeksiyon ile AT1R-Ab yüksekliğinin ilişkisiz olduğundan söz edilebilir.

AT1R-Ab'larının varlığının Dragun tarafından rapor edilmesinden sonra geliştirilen sandviç ELISA metodu ile AT1R-Ab'larının serumda saptanması gündeme gelmiş bugüne kadar çalışmalarda değişik eşik değerleri kullanılmıştır. Reinsmoen ve arkadaşları AT1R-Ab'larının >17 U/ml [148], Giral ve arkadaşları >10 U/mL [179], Banasik ve arkadaşları >9 U/ml [180], In ve arkadaşları >10 U/ml [183], Taniguchi ve arkadaşları >15 U/mL

[177], Kore'den J. Lee ve arkadaşları >9,05 U/ml [185], gene Kore'den H. Lee ve arkadaşları 10 U/ml [189], Fuss ve arkadaşları >10 U/ml [186], Hindistan'dan Mujtaba ve arkadaşları >9,1 U/mL[188] antikor pozitifliği ile rejeksiyon ilişkisini bildirmiştir. 2016 yılında bildirilen başka bir çalışmada da Meksika'dan Cuevaz ve arkadaşları medyan pretransplant AT1R-Ab seviyesinin 9,12 U/ml (min-max 1,56-500) saptandığını ve rejeksiyonla ilişkili olduğunu bildirmiştir [190].

AT1R-Ab'larının böbrek naklinde önemli rolü olduğunun gösterilmesine rağmen bununla beraber AT1R-Ab eşik değerleri henüz yerleşmiş değildir. Etnik farklılıklar ve farklı immünogenetik alt yapılar dikkate alınması gerekliliği ve eşik değerlerinin farklı olabileceği bildirilmiştir [199]. Asya'dan bildirilen çalışmalarda da bu farklılık gözlenmektedir [183, 185, 189, 199]. Türkiye'den şu ana kadar bildirilen AT1R-Ab düzeyleri ile ilişkili bir çalışma olmadığı için ülkemiz için eşik değerleri çalışmamızla karşılaştırılarak bir yorum yapılamamıştır. Bizim çalışmamızda üreticinin talimatları doğrultusunda AT1R-Ab için >17 U/ml pozitif kabul edilmiştir. Ayrıca kitimiz 2,5 U/ml altını saptayamadığı için 2,5 U/ml altı değerlerin değerlendirilememiş olması bir sınırlılık olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle birçok çalışma ile farklı sonuçlar gözlenmiştir. Dolayısıyla halen AT1R-Ab düzeyi eşik değerlerinin belirlenebilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.2.Böbrek naklinde rejeksiyon ile sitokin gen polimorfizm ilişkisi

Sitokin gen polimorfizminin nakil üzerine etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır. Bazı yayınlarda yüksek ilişki saptanırken bazı çalışmalarda ilişki bulunmamıştır. Böbrek naklinde sitokin gen polimorfizm etkilerinin halen tartışmalı olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur [11, 162].

Çalışmamızda TNF- α , TGF- β 1, İL-10, İL-6, İFN- γ olmak üzere 5 sitokin için toplam 24 farklı polimorfizm çalışılmış olup çalışma grubunda 19 polimorfizm varlığı tespit edilmiştir (bkz Çizelge 4.12).

TNF- α G/G (Low), TNF- α G/A (High= -308 polimorfizm), TGF- β 1 T/T G/G (High), TGF- β 1 T/C G/G (High), TGF- β 1 T/C G/C (Intermediate), TGF- β 1 C/C G/G (Intermediate),

TGF- β 1 C/C G/C (Low), İL-10 GCC/GCC(High), İL-10 GCC/ACC(Intermediate), İL-10 GCC/ATA(Intermediate), İL-10 ACC/ACC(Low), İL-10 ACC/ATA(Low), İL-10 ATA/ATA(Low), İL-6 G/G (High), İL-6 G/C (High), İL-6 C/C (Low), İFN- γ T/T (High), İFN- γ T/A (Intermediate) ve İFN- γ A/A (Low) çalışma grubumuzda saptanan polimorfizmlerdir.

Fakat TNF- α A/A (High), TGF- β 1 C/C G/G (Intermediate), TGF- β 1 C/C C/C (Low), TGF- β 1 T/T C/C (Low) ve TGF- β 1 T/C C/C (Low) polimorfizmleri hiçbir denekte saptanmamıştır.

5.2.1.TNF- α sitokin gen polimorfizmi

TNF- α G/G (Low) polimorfizmi çalışmamızda en sık rastlanan polimorfizm tipi olarak saptanmıştır ($n=121/150$, *pediatrik vakalarda* 81,5% ve $n=22$, *erişkin vakalarda* 80,5% ve $n=99$ $p=0.906$). Tüm çalışma gruplarında yüksek saptanmış olup rejeksiyon ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (*kontrol grubunda* $n=38$ ve 76,0%, *rejeksiyon grubunda* $n=28$ ve 90,3%, *normal seyirli hastalarda* $n=55$ ve 79,7%, $p=0.191$).

TNF- α G/A (High) polimorfizmi 29/150 denekte saptanmış olup rejeksiyon ile anlamlı ilişki gözlenmemiştir (*kontrol grubu* $n=12$ ve 24,0%, *rejeksiyon grubu* $n=3$ ve %9,7, *normal seyirli hasta grubu* $n=14$ ve 20,3%, $p=0.191$). TNF- α A/A (High) polimorfizmi ise hiçbir denekte saptanmamıştır.

TNF- α sitokin gen polimorfizminde yaş grubu, cinsiyet, prognoz ve AT1R-Ab düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

2005 yılında Gençtoy ve arkadaşlarının Türkiye’den bildirdikleri çalışmada 22 hemodiyaliz hastası irdelenmiş ve hemodiyaliz hastalarında inflamasyonda proinflamatuvar sitokin seviyelerinin hem RAS hem de TNF- α -308 G>A gene polimorfizminin modülatör etkisi altında olabileceği yayınlanmıştır [164].

TNF- α -308G aleli ve İL-10 -1082G aleli (yüksek düzeyde üretici) kombinasyonuna sahip böbrek transplant alıcılarında, HLA-DR uyumsuz vericilerden yapılan

transplantasyonlarda akut rejeksiyon oranı yüksekken, yalnız TNF- α -308G aleline sahip bireylerde ise, steroidde daha dirençli akut rejeksiyon epizotları görülmüştür [174]. Daha sonra yapılan çalışmalarda 3 genotip tanımlanmıştır; G/G genotipi üretimin düşük seviyeleri ile G/A ya da A/A genotipi üretimin yüksek seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir [161, 173]. Pek çok çalışmada böbrek ve karaciğer nakillerinde bu SNP ve reddi arasında ilişki olduğu bildirilmiş olmasına rağmen diğer çalışmalarda bu bilgi doğrulanmamıştır [58]. Seyhun ve arkadaşlarının Türk hastalarda yaptıkları çalışmada da herhangi bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir [200]. Bizim çalışmamızda da buna benzer olarak TNF- α -308 G >A gen polimorfizmi ile rejeksiyon ilişkisi saptanamamıştır.

5.2.2.İL-10 sitokin gen polimorfizmi

İL-10 çalışmamızda altı farklı gen polimorfizminin çalışıldığı diğer bir sitokindir. İL-10 GCC/GCC (High) gen polimorfizmi 25/150 denekte, İL-10 GCC/ACC (Intermediate) gen polimorfizmi 31/150, İL-10 GCC/ATA (Intermediate) gen polimorfizmi 26/150, İL-10 ACC/ACC (Low) gen polimorfizmi 22/150, İL-10 ACC/ATA (Low) gen polimorfizmi 24/150, İL-10 ATA/ATA (Low) gen polimorfizmi 22/150 denekte saptanmıştır.

Çalışmamızda İL-10 gen polimorfizminin cinsiyet, prognoz, AT1R-Ab düzeyi ile ilişkisi açısından istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. ***Sadece İL-10 GCC/ACC (Intermediate) polimorfizminin pediatrik vakalardan daha çok erişkin vakalarda var olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,016).***

Rejeksiyon ve polimorfizm ilişkisi için daha önce bildirilen çalışmalarda çelişkili sonuçlar mevcuttur. Yüksek salınım ile uyumlu gen polimorfizmi taşıyan hastalarda akut rejeksiyon sıklığının arttığını bildiren çalışmalar olduğu gibi [58], İL-10 polimorfizminin akut ya da kronik rejeksiyonla ilişkisi olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur [58, 173, 200-201].

Nakil öncesi İL-10 gen polimorfizmleri ve serum İL-10 düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, hastalar nakil sonrası dönemde üç ay süre ile rejeksiyon açısından izlenmiş ve İL-10 -1082 GG genotipine sahip hastaların yüksek düzeyde, AA genotipine sahip hastaların ise düşük düzeyde sitokin ürettikleri görülmüştür. Yüksek düzeyde İL-10 üretimine neden olan genotipi taşıyan hastalarda akut rejeksiyon sıklığı anlamlı olarak

artmıştır. Fakat Dhaouadi ve arkadaşları 2013’de yaptıkları çalışmada İL-10 polimorfizmi ile kronik ya da akut rejeksiyon arasında bir ilişki saptayamamıştır [173]. 2008 yılında yayınlanan metaanalizde İL-10’un 3 polimorfizmi (-1082, -819, -592) ile rejeksiyon arasında anlamlı ilişki olduğu bildirilmesine rağmen [201], 2015 yılında yayınlanan başka bir metaanalizde 595 rejeksiyon hastası ve 1239 istikrarlı greft hastası değerlendirilmiş ve İL-10 polimorfizmi ile rejeksiyon arasında bir ilişki saptanmadığını bildirmiştir [202]. Seyhun ve arkadaşlarının çalışmasında da bizim çalışmamıza benzer şekilde İL-10 sitokin gen polimorfizmi ile rejeksiyon arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır [200].

Çalışmamızda önceden yayınlanan birçok çalışma ile uyumlu sonuçlara ulaşılmıştır [58, 173, 200-202].

5.2.3.İL-6 sitokin gen polimorfizmi

Çalışmamızda İL-6 G/G (High) gen polimorfizmi çalışma grubunda ikinci olarak en sık rastlanan polimorfizm olarak saptanmış ($n=98/150$, *pediatrik vakalarda* 63,0% ve $n=17$, *erişkin vakalarda* 65,9% ve $n=81$, $p=0.775$). İL-6 G/G (High) gen polimorfizminde rejeksiyon ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (*kontrol grubunda* $n=31$ ve 62,0%, *rejeksiyon grubunda* $n=20$ ve 64,5%, *normal seyirli hastalarda* $n=47$ ve 68,1%, $p=0.723$).

Fakat İL-6 G/G (High) polimorfizminin AT1R-Ab düzeyi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,044$). İL-6 G/G (High) polimorfizmi olanlarda AT1R-Ab düzeylerinde anlamlı şüpheli pozitiflik ve pozitiflik saptanmıştır.

İL-6 gen polimorfizmlerinden ikinci sıklıkta görülen ise İL-6 G/C (High) polimorfizmi idi ($n=42/150$, *pediatrik vakalarda* 33,3% ve $n=17$, *erişkin vakalarda* 26,8% ve $n=33$, $p=0,495$). En az görülen ise İL-6 C/C (Low) sitokin gen polimorfizmi idi ($n=10/150$, *pediatrik vakalarda* 3,7% ve $n=1$, *erişkin vakalarda* 7,3% ve $n=9$, $p=0,691$).

İL-6 G/C (High) ve İL-6 C/C (Low) sitokin gen polimorfizlerinde yaş grubu, cinsiyet, prognoz ile ilişki açısından istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir.

İL-6 için promotor bölgede -597(G-C), -572(G-A), -174(G-C) bölgelerinde 3 polimorfizm mevcuttur. -174 pozisyonunda G aleli, İL-6 plazma düzeyinin artması ile bağımsız olarak ilişkilidir [169] ve -174G/C polimorfizmi İL-6 üretimini arttırmaktadır [200]. 3 promotor SNP kombinasyonlarının fonksiyonel etkilerine karşın, akut böbrek rejeksiyon oranı arasında ilişki şimdiye kadar gösterilmemiştir. Bununla beraber beklenenin aksine, yüksek İL-6 fenotip (-174G/G aleli) ekspresyonunun, posttransplant 5 yıl sonra düşük sıklıktaki koroner vaskülopati ve fonksiyonların geç başlaması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [203-204]. Yani böbreklerde akut rejeksiyon oranı ile bir ilişkisi bulunmamış iken G- alelinin uzun dönem böbrek greft ömründe olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir [58, 203]. Muller-Steinhardt ve arkadaşlarının çalışmasında G alelinin C/C fenotipinin rejeksiyon açısından olumlu etkisini desteklediği bildirilmiştir [203].

Seyhun ve arkadaşlarının Türk hastalarda yaptıkları çalışmada herhangi bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir [200]. Bizim çalışmamızda da İL-6 sitokin gen polimorfizminin rejeksiyona etkisi açısından Seyhun ve arkadaşlarının çalışmasını desteklediği gözlenmiştir.

Çalışmamızda gözlenen İL-6 G/C (High) sitokin gen polimorfizminin AT1R-Ab düzeyine olan etkisi daha önce bildirilmemiştir. İL-6 G/C (High) polimorfizmi olanlarda AT1R-Ab şüpheli pozitifliğinin daha çok gözlendiği saptanmıştır.

Preeklampsi üzerine yapılan çalışmalarda hipertansiyon patogenezinde İL-6 / AT1R-Ab etkileşiminin önemli olduğu [167], AT1R-Ab ve renin aktivite artışı ile oluşan İL-6 yüksekliği ve böbrek fonksiyonlarında azalma nedeniyle hipertansiyon yanıtı olduğu [168-169] bildirilmiştir. Bu yüzden, İL-6' nın tocilizumab kullanılarak inhibisyonunun, AT1R-Ab'nin etkilerini, sadece B hücrelerini ve plazma hücrelerini modüle eden antikor üretimini azaltma yoluyla değil, ayrıca inflamatuvar yanıtları yatıştırarak da değiştirebileceği, ek olarak plazma hücrelerinin barteptomib ile modüle edilmesi ile AT1R-Ab üretiminin azaltılabileceği düşünülmektedir [167]. 2017'de yayınlanan çalışmada DSA ve AT1R-Ab pozitifliği olan bir vakada kombinasyon tedavisine Bortezomib eklenerek rejeksiyon gelişiminin tedavi edildiği bildirilmiştir [170]. Bizim çalışmamızda da İL-6 yüksek düzey salınım polimorfizminin AT1R-Ab pozitifliği ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Literatürdeki bazı çalışmalar ile uyumsuz, bazı çalışmalar ile uyumlu veriler gözlenmiştir.

5.2.4.TGF- β 1 sitokin gen polimorfizmi

TGF- β 1 sitokin gen polimorfizmi en çok çeşitliliğe sahip polimorfizm olup toplam 9 farklı polimorfizm tipi çalışılmıştır. Çalışılan 9 polimorfizmin 5 tanesi gözlenirken, 4 polimorfizm hiç gözlenmemiştir.

Çalışılan polimorfizmlerden TGF- β 1 T/T G/G (High) polimorfizmi 45/150, TGF- β 1 T/C G/G (High) gen polimorfizmi 69/150, TGF- β 1 T/C G/C (Intermediate) gen polimorfizmi 3/150, TGF- β 1 C/C G/G (Intermediate) gen polimorfizmi 26/150, TGF- β 1 C/C G/C (Low) gen polimorfizmi 7/150 denekte saptanmıştır. Oysa TGF- β 1 T/T G/C (Intermediate), TGF- β 1 C/C C/C (Low), TGF- β 1 T/T C/C (Low), TGF- β 1 T/C C/C (Low) gen polimorfizmleri çalışma grubunda hiçbir denekte saptanmamıştır.

TGF- β 1 sitokin gen polimorfizmi için daha önceki çalışmalarda rejeksiyon ilişkisine ait çelişkili sonuçlar bulunmaktadır [173]. 2008 yılında yapılan bir meta-analizde TGF- β 1'in 2 polimorfizminin (10 T/C ve 25 G/C) renal transplantasyonda rejeksiyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [201]. 2010 yılında yapılan başka bir meta analizde donör TGF- β 1 +869 T/C polimorfizminin özellikle CsA (FK-506 ile karşılaştırılırsa) alan hastalar başta olmak üzere solid organ transplantasyonunda anlamlı olarak akut rejeksiyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [205].

Çalışmamızdan farklı olarak Türkiye'den Seyhun ve arkadaşları tarafından bildirilen çalışmada rejeksiyon ile yüksek sitokin salınlı genotip arasında bir ilişki saptanmamışken düşük sitokin salınımı sağlayan genotip rejeksiyon saptanmayan grupta daha yüksek oranda gözlenmiştir [204].

Çalışmamıza benzer şekilde TGF- β 1 sitokin gen polimorfizminin rejeksiyon ile ilişkisi olmadığını bildiren çalışmalarda mevcuttur. 2014 yılında Chen ve arkadaşlarının yaptığı 325 hastalık bir çalışmada renal transplantın ilk yılındaki hastalar değerlendirilmiş ve akut rejeksiyon ile TGF- β 1, polimorfizmleri arasında bir farklılık saptanmadığı bildirilmiştir [206].

TGF- β 1 sitokin gen polimorfizlerinde yaş grubu, cinsiyet, prognoz ile ilişki açısından istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir.

Fakat TGF- β 1 C/C G/C (Low) sitokin gen polimorfizmi ile AT1R-Ab düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmiştir ($p= 0,002$). Diğer TGF- β 1 sitokin gen polimorfizimleri ise AT1R-Ab düzeyi ile ilişkisiz olarak saptanmıştır. TGF- β 1 C/C G/C (Low) polimorfizminin olmadığı hastalarda daha fazla oranda AT1R-Ab negatifliği, mevcut olduğu vakalarda şüpheli pozitiflik ve pozitiflikte artış saptanmıştır.

Çalışmamızda gözlenen TGF- β 1 C/C G/C (Low) sitokin gen polimorfizminin AT1R-Ab düzeyine olan etkisi daha önce bildirilmemiştir.

5.2.5.İFN- γ sitokin gen polimorfizmi

Çalışmamızda son olarak çalışılan sitokin İFN- γ olmuştur. İFN- γ T/T (High) gen polimorfizmi 29/150, İFN- γ -T/A (Intermediate) gen polimorfizmi 79/150, İFN- γ A/A (Low) gen polimorfizmi 42/150 denekte saptanmıştır. Hiçbir polimorfizm rejeksiyon ile ilişkili bulunmamıştır.

Çalışmamızda İFN- γ sitokin gen polimorfizminde yaş grubu, cinsiyet, prognoz ve AT1R-Ab düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Çoğu sitokin polimorfizminde olduğu gibi İFN- γ sitokin gen polimorfizmi de değişik çalışmalarda farklı sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bazı çalışmalarda hem akut hem kronik rejeksiyon ile ilişkilendirilmiş olarak bildirilmiştir. Dhauoadi ve arkadaşları akut ya da kronik rejeksiyon ile ilişki saptayamamışken 2013 yılında Çin’de Ge ve arkadaşlarının yaptığı bir meta-analizde +874 polimorfizmi rejeksiyon ile ilişkili bulunmuştur [173, 205].

Türk hastalarda Seyhun ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada herhangi bir ilişki saptanmadığı bildirilmiştir [200]. Bizim çalışmamızda da Seyhun ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak İFN- γ polimorfizmi ile rejeksiyon arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Ayrıca sitokin gen polimorfizmleri salınım düzeylerine göre düşük, orta ve yüksek olarak gruplandırılarak değerlendirildiğinde de cinsiyet, yaş grubu, prognoz, AT1R-Ab düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

Sitokin gen polimorfizminin araştırılmasının, rejeksiyon ve greft fonksiyonları üzerine yeni bilgiler eklerken, aynı zamanda istenmeyen sonuçlardan korunmak için de yol gösterme açısından anlamlılığı önemlidir. Böbrek nakli öncesinde yapılan doku uyum testlerine ek olarak sitokin gen polimorfizminin de incelenmesi, rejeksiyon sıklığının azaltılması yönünde yardımcı olabileceği savının daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir.

Sitokin salınımına olan etkilerine göre¹ polimorfizmlerin birlikte değerlendirilmesi sonrasında yapılan değerlendirmede de rejeksiyon açısından anlamlı bir polimorfizm saptanmamıştır.

Çalışılan sitokin gen polimorfizm sonuçları daha önce yayınlanan çalışmalarla karşılaştırıldığında bazı çalışmalarla benzer bulgular saptanmıştır. *Yapılan analizler sonucunda AT1R-Ab varlığı ile TGF- β 1 C/C G/C (Low) gen polimorfizmi ve IL-6 G/G (High) gen polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır* (çizelge 5.1).

Çizelge 5.1 AT1R-Ab düzeyi ile istatistiksel olarak anlamlı sitokin gen polimorfizmlerinin ilişkisi

Gen polimorfizmi		AT1R-Ab pozitifliği						p
		Negatif		Şüpheli pozitif		Pozitif		
İL-6 G/C (High)	Yok	93	86,1%	12	11,1%	3	2,8%	0,044
	Var	41	97,6%	1	2,4%			
TGF-β1 C/C G/C (Low)	Yok	130	90,9%	11	7,7%	2	1,4%	0,002
	Var	4	57,1%	2	28,6%	1	14,3%	

Çalışmamızda amaçladığımız AT1R-Ab düzeyi ile sitokin gen polimorfizmi ilişkisinin gösterilmesi açısından hedefe ulaşılmıştır. AT1R-Ab düzeylerinin rejeksiyon ile ilişkisiz görülmesi henüz tam oturmamış eşik değerleri nedeniyle anlamsız saptanmış olabilir.

¹ Düşük, orta ve yüksek salınımlı sitokin gen polimorfizmleri birleştirilmiştir

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Böbrek naklinde klasik HLA antikorlarına ek olarak non-HLA antikorların önemi giderek artmaktadır. Özellikle AT1R-Ab rejeksiyonda en dikkat çeken non-HLA antikorlardandır. AT1R-Ab pozitifliğinin böbrek naklinde rejeksiyon ile ilişkisi üzerine özellikle son yıllarda yapılan daha yüksek hasta sayılı çalışmalarda, AT1R-Ab pozitifliği ile rejeksiyon arasında ilişki olmadığı yönünde bildirimde bulunan çalışma sayıları artmıştır. Bizim çalışmamızda da buna benzer bir sonuç saptanmıştır.

Çalışmamızdan çıkarılabilecek sonuçlar özetlenecek olursa:

- Nakil yapılan hastaların demografik özelliklerine göre rejeksiyon ile olan ilişkileri değerlendirildiğinde:
 - Kadın nakil hastalarında rejeksiyon ile vericinin cinsiyeti arasında anlamlı ilişki saptanmazken, erkek nakil hastalarına kadın vericiden yapılan nakillerde daha yüksek oranda rejeksiyon gözlenmiştir ($p=0,032$).
 - Donör tipi ve yakınlığının rejeksiyon ile ilişkisi yokken donör cinsiyeti değerlendirildiğinde erkek donörlerde rejeksiyon daha sık görülmüştür ($p=0,035$).
 - Erişkinde rejeksiyon pediatrik gruba göre daha sık saptanmıştır ($p=0,009$).
 - Cinsiyete göre değerlendirildiğinde erkeklerde rejeksiyon belirgin olarak kadınlardan daha sık görülmüştür ($p=0,004$).
- Rejeksiyon ile AT1R-Ab düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Bu nedenle AT1R-Ab düzeyinin nakil öncesi yüksekliğinin rejeksiyonda marker olarak kullanımının uygun olmadığı gözlenmiştir.
- AT1R Ab negatiflik oranı erişkin yaşa sahip hastalarda daha sık saptanmıştır ($p<0,001$). Pediatrik yaşta AT1R-Ab değerinin erişkin yaşa göre yüksek olduğu gözlenmiştir.
- Rejeksiyon ile çalışılan sitokin gen polimorfizmleri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Çalışma grubumuzda TNF- α G/G (Low), TNF- α G/A (High= -308 polimorfizm), TGF- β 1 T/T G/G (High), TGF- β 1 T/C G/G (High), TGF- β 1 C/C G/G (Intermediate), TGF- β 1 C/C G/C (Low), İL-10 GCC/GCC(High), İL-10 GCC/ACC(Intermediate), İL-10 GCC/ATA(Intermediate), İL-10 ACC/ACC(Low),

İL-10 ACC/ATA(Low), İL-10 ATA/ATA(Low), İL-6 G/G (High) ve İL-6 G/C (High) saptanan sitokin gen polimorfizmleridir. Hiçbir polimorfizm varlığında rejeksiyon ile ilişki gözlenmemiştir. TNF- α G/G düşük salınım gen polimorfizmi çalışmamızda tüm gruplar ele alındığında en sık rastlanan polimorfizm tipi olarak saptanmıştır. Çalışmamız Adana bölgesindeki nakil hastaları ile yapılmıştır. Bu nedenle daha önce Türk toplumunda çalışılan sitokin gen polimorfizm çalışmaları ile farklılıklar gözlenmesi, etnik grup farklılıkları olması ve bölgede yaşayan halkın çok değişkenlik göstermemesi ile açıklanabilir.

- Sitokin polimorfizmi ve AT1R-Ab düzeylerinin birbiri ile olan ilişkisi karşılaştırıldığında:

- TGF- β 1 C/C G/C (Low) sitokin gen polimorfizmi yokluğunda AT1R-Ab negatifliği, varlığında AT1R-Ab pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (p=0,002).
- İL-6 G/C (High) sitokin gen polimorfizmine sahip olanlarda AT1R-Ab negatifliği açısından istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır (p=0,044).

İL-6 ve TNF- α IRI'de renal hasar oluşumunda majör rolü oynamaktadır. İL-6 proinflamatuvar ve profibrotik faktörlerin salınımına ve/veya ekspresyonuna yol açarak akut inflamasyona katkıda bulunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda İL-6 ile AT1R-Ab etkileşiminin önemli olduğu ve AT1R-Ab ve renin artışı ile ilişkili İL-6 yüksekliğinin hipertansiyona neden olduğu bildirilmiştir. Ang II glomerüler endotelial hücrelerde aktivitesini AT1R ve AT2R üzerinden gösterir. Ang II NF- κ B kontrolü altında kemokinlerden MCP-1 ve RANTES, sitokinlerden İL-6, adezyon molekülü VCAM-1 ve ICAM-1 ve anjiotensinojeni içerenproinflamatuvar genleri artırır. AT1R için İL-6, MCP-1 ve anjiotensinojen aracılığı; AT2R için RANTES aracılığı önemli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca İL-6'nın inhibisyonunun AT1R-Ab düzeyi düşüşü ve rejeksiyon gelişimini önlemesi üzerine çalışmalar da yapılmıştır. Dolayısıyla İL-6'nın yüksek düzeyde salınımı akut rejeksiyon ile ilişkili olabilir. İL-6 G/C (High) sitokinpolimorfizmine sahip olanlarda AT1R-Ab yüksekliği bu nedenle anlamlıdır.

Böbrek hasarında RAS kaynaklı fibrojenizisin büyük oranda TGF- β 1 yoluyla olduğu gösterilmiştir. Bu aktivite kısmen AT1R aracılığıyla gerçekleşir. AngII hücre dışı matris birikimi, hücre çoğalması ve hipertrofi gibi önemli biyolojik etkilere yol açan TGF- β 1 sentezinin güçlü bir uyarıcısıdır ve TGF- β 1 geni ve protein çıkışını artırır. Ang II artışı

CTGF mRNA ekspresyonu ve üretimini artırmaktadır. CTGF bir profibrogenik sitokindir ve TGF- β 1'in profibrotik aktivitesinin önemli bir mediyatörü olabileceği ve TGF- β 1 tarafından güçlü olarak upregüle edildiği, glomerüloskleroz ve tübülointerstisyel fibrozisin gelişmesi ve ilerlemesinden rolü olabileceği düşünülmektedir. TGF- β 1 naklin ilk yılından sonra greft kaybının başlıca sebebi olan kronik allogreft nefropati patogenezinde anahtar bir sitokindir. Dolayısıyla TGF- β 1 yüksek düzey salınımına neden olan polimorfizme sahip olanlarda AT1R-Ab yüksekliği uyumludur.

Sonuç olarak çalışmamızda, TGF- β 1 C/C G/C (Low) gen polimorfizmi ile IL-6 G/G (High) gen polimorfizminin AT1R-Ab düzeyine birbirinin tersi etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. IL-6 (High) polimorfizmi olanlarda AT1R-Ab düzeylerinde şüpheli pozitiflik ve pozitiflik açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu polimorfizme sahip hastalarda IL-6 fazla miktarda salınarak proinflamatuvar etkide artışa neden olabileceği düşünülebilir.

IL-6 hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar bir sitokinken, TGF- β 1 antiinflamatuvar etkiye sahiptir. TGF- β 1 düşük salınım polimorfizmi varlığında daha düşük düzeyde TGF- β 1 salınımı olmaktadır. Düşük düzeydeki TGF- β 1 ise antiinflamatuvar etkinin az olmasına neden olmaktadır.

Bundan sonra yapılması önerilenler:

- Çalışmamızda AT1R-Ab değeri içineşik değeri saptamamıştır. Kullanılan kit <2,5 U/ml altı değerleri saptayamadığı için ve bu sonuçlara numerik değer verilemediği için anlamlı bir ortalama bulunamamıştır. AT1R-Ab düzeyleri toplum ve etnik farklılıklara göre değişiklik gösterebilir. AT1R-Ab değerlerinin düzgün değerlendirilebilmesi için daha fazla sayıda çalışma yapılmasına ve ölçümde standardizasyona gereksinim vardır. Ayrıca pediatrik dönemde AT1R-Ab düzeyi yüksekliğini ve nedenini anlamlandırmak için bulgularımızın, pediatrik vakaların sayısal olarak daha fazla olduğu başka çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.
- Sitokin polimorfizm çalışmaları çok sayıda vaka ile yapılması gereken çalışmalardır. Türkiye yapılan sitokin polimorfizm çalışmaları sınırlıdır. Türk toplumunun sitokin polimorfizm profilinin çıkartılabilmesi ve doğru sonuçlara ulaşılabilmesi için tüm bölgeleri içeren ve çok sayıda kişi ile çalışma yapılması gerekmektedir.

- Nakil öncesi uygun verici seçiminin yapılmasının tedavi giderlerini azalttığı gibi greft yaşam ömrünü ve işlevselliğinin devamını arttırdığı kabul edilen bir gerçektir. Ayrıca rejeksiyon tedavileri hasta için oldukça yıpratıcı olmasının yanı sıra sosyal güvenlik kurumları için de maliyeti yüksek tedavilerdir. Nedenin belirlendiği hedefe yönelik tedaviler hem hasta açısından hem sosyal güvenlik kurumlarında maliyet açısından çok daha avantajlı olacaktır. Bu nedenle hastaya uygun, kişiye yönelik tedavilerin geliştirilmesi önümüzdeki yıllarda gündeme gelebilir. Nakil öncesi çalışılan parametre sayısının artması bunun bir yoludur ve non-HLA Ab'lerden biri olan AT1R-Ab ve sitokin gen polimorfizminin bu parametreler arasında yer alabileceği düşünülmektedir. Fakat bizim çalışmamızda her iki parametre de rejeksiyon öncesi biyomarker olarak kullanım açısından uygun bulunmamıştır.
- Ayrıca AT1R-Ab pozitifliğinin tek başına değil, başka faktörlerle birlikteliğinin rejeksiyona etkisi olabileceği düşünülebilir ve yanında ek faktörlerle beraber rejeksiyona etkisinin değerlendirileceği çalışmalar yapılabilir..

Günümüzde transplant hazırlık aşamasında ve hasta takibinde kullanılan birçok parametreye rağmen halen rejeksiyon önlenememekte ve bilim insanlarının nakil öncesi rejeksiyon gelişimini önlemeyi ya da nakil sonrası gelişen rejeksiyonu durdurmayı hedefleyen çalışmaları büyük bir hızla devam etmektedir. Fakat halen yeni tanısal yaklaşımlar ve hedefe yönelik tedaviler geliştirilmesi için açıklanmayı bekleyen immünolojik mekanizmalar mevcuttur. Transplant immünolojisi ilk çalışılmaya başlandığından bu yana çok yol kat edilmiştir, fakat yeni çalışmalar göstermektedir ki daha da fazla yol kat edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Girnita, D. M., Burckart, G. and Zeevi, A. (2008). Effect of cytokine and pharmacogenomic genetic polymorphisms in transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), 614-25.
2. Ponticelli, C. (2012). The mechanisms of acute transplant rejection revisited. *Journal of Nephrology*, 25(2), 150-8.
3. Lim, W. H., Chadban, S. J., Clayton, P., Budgeon, C. A., Murray, K., Campbell, S. B., Cohney, S., Russ, G. R., and McDonald, S. P. (2012). Human leukocyte antigen mismatches associated with increased risk of rejection, graft failure, and death independent of initial immunosuppression in renal transplant recipients. *Clinical Transplantation*, 26(4), 428-37.
4. Banasik, M., Boratynska, M., Koscielska-Kasprzak, K., Mazanowska, O., Bartoszek, D., Zabinska, M., Myszka, M., Nowakowska, B., Halon, A., Szyber, P., Patrzalek, D., and Klinger, M. (2013). Long-term follow-up of non-HLA and anti-HLA antibodies: incidence and importance in renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, 45(4), 1462-5.
5. Sumitran-Holgersson, S. (2008). Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), 607-13.
6. Geara, A. S., Azzi, J., Jurewicz, M. and Abdi, R. (2009). The renin-angiotensin system: an old, newly discovered player in immunoregulation. *Transplantation Reviews*, 23(3), 151-8.
7. Dragun, D., Muller, D. N., Brasen, J. H., Fritsche, L., Nieminen-Kelha, M., Dechend, R., Kintscher, U., Rudolph, B., Hoebeke, J., Eckert, D., Mazak, I., Plehm, R., Schonemann, C., Unger, T., Budde, K., Neumayer, H. H., Luft, F. C., and Wallukat, G. (2005). Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *The New England Journal of Medicine*, 352(6), 558-69.
8. Dragun, D., Philippe, A. and Catar, R. (2012). Role of non-HLA antibodies in organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 17(4), 440-5.
9. Dallman, M. J. (1993). Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. *Current Opinion in Immunology*, 5(5), 788-93.
10. Gaafar, A., Iqniebi, A., Sheereen, A., Eldali, A., Turpeinen, H., Adra, C., Al Meshari, K., and Al Hussein, K. (2014). Study of the cytokine polymorphisms in correlation to rejection and graft survival in renal allograft donors and recipients from a homogenous Saudi population. *Transplant Immunology*, 30(1), 34-9.
11. Laperrousaz, S., Tiercy, S., Villard, J. and Ferrari-Lacraz, S. (2012). HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation. *Swiss Medical Weekly*, 142, w13668.
12. İnternet: Deniz, M. N. Böbrek Fizyolojisi. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.jcam.com.tr%2Ffiles%2FJCAM-3906.pdf&date=2017-12-03>, Son erişim tarihi: 03.12.2017.

13. Titiz, M.İ. (Eds.). (2010). **Renal Transplantasyona Pratik Yaklaşım** Üçüncü Basım ed. İstanbul, Türkiye: 2, 35, 36, 60-66, 105, 106, 108, 109, 110, 122, 123, 137, 138, 143.
14. Nishio-Lucar, A., Balogun, R. A. and Sanoff, S. (2013). Therapeutic apheresis in kidney transplantation: a review of renal transplant immunobiology and current interventions with apheresis medicine. **Journal of Clinical Apheresis**, 28(1), 56-63.
15. İnternet: T.C. Sağlık Bakanlığı Organ, Doku Nakli ve Diyaliz Hizmetleri Daire Başkanlığı Güncel V erileri. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Forgan.saglik.gov.tr%2F0TR%2F70Istatistik%2FOrganNakilIstatistikKamusal.aspx&date=2017-12-03>, Son erişim tarihi: 03.12.2017.
16. Hume, D. M., Merrill, J. P., Miller, B. F. and Thorn, G. W. (1955). Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. **Journal of Clinical Investigation**, 34(2), 327-82.
17. Akçam, F. Z. (2005). HLA Sistemi. **Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, 25(6), 829-834.
18. Beksaç, M., **HLA ve Doku Tiplendirilmesi**, in **THD Kan ve Kemik iliği Transplantasyonu Kurs Kitabı**. 2004. 42-49.
19. Billingham, R. E., Brent, L. and Medawar, P. B. (1953). Activity acquired tolerance of foreign cells. **Nature**, 172(4379), 603-6.
20. Tutkak, H. (2013). Organ Nakillerinde HLA Antikorları. **Türkiye Klinikleri Journal of Immunology Allergy Special Topics**, 6(2).
21. Haberal, M. (1995). Historical evolution of kidney and liver transplantation in Turkey. **Transplantation Proceedings**, 27(5), 2771-4.
22. İnternet: Prof. Dr. Mehmet Haberal'ın İlkleri. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.mehmethaberal.com.tr%2Filkler.php&date=2017-12-03>, Son erişim tarihi:03.12.2017.
23. Tait, B. D., Susal, C., Gebel, H. M., Nickerson, P. W., Zachary, A. A., Claas, F. H., Reed, E. F., Bray, R. A., Campbell, P., Chapman, J. R., Coates, P. T., Colvin, R. B., Cozzi, E., Doxiadis, II, Fuggle, S. V., Gill, J., Glotz, D., Lachmann, N., Mohanakumar, T., Suciu-Foca, N., Sumitran-Holgersson, S., Tanabe, K., Taylor, C. J., Tyan, D. B., Webster, A., Zeevi, A., and Opelz, G. (2013). Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. **Transplantation**, 95(1), 19-47.
24. Amico, P., Honger, G., Biemann, D., Lutz, D., Garzoni, D., Steiger, J., Mihatsch, M. J., Dragun, D., and Schaub, S. (2008). Incidence and prediction of early antibody-mediated rejection due to non-human leukocyte antigen-antibodies. **Transplantation**, 85(11), 1557-63.
25. Grafft, C. A., Cornell, L. D., Gloor, J. M., Cosio, F. G., Gandhi, M. J., Dean, P. G., Stegall, M. D., and Amer, H. (2010). Antibody-mediated rejection following transplantation from an HLA-identical sibling. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 25(1), 307-10.

26. Opelz, G. (2005). Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. **Lancet**, 365(9470), 1570-6.
27. Pratschke, J., Dragun, D., Hauser, I. A., Horn, S., Mueller, T. F., Schemmer, P., and Thaïss, F. (2016). Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. **Transplantation Reviews**, 30(2), 77-84.
28. İnternet: HLA Manual; A Guide to the completion of the EBMT Form Histocompatibility. EBMT. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ebmt.org%2FContent%2FData-Management%2FRegistrystructure%2FMED-ABdatacollectionforms%2FDocuments%2FHLAManual.pdf&date=2017-12-03>, Son erişim tarihi: 03.12.2017.
29. Dalva, K. (2004, Eylül). **Her Yerde Karşımda; Nedir Bu HLA Tiplendirme?** . Antalya: XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi. Türk Hematoloji Derneği, 42-52.
30. İnternet: HLA Alleles Numbers. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fhla.alleles.org%2Fnomenclature%2Fstats.html&date=2017-12-03>, Son erişim tarihi: 03.12.2017.
31. McPherson, R.A., Pincus, M.R. and Henry, J.B., (2007). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. (Eds.), 21nd Edition. Saunders Elsevier, 750-790.
32. İnternet: HLA Alleles. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fhla.alleles.org%2Falleles%2Findex.html&date=2017-12-03>. Son erişim tarihi: 03.12.2017
33. Sheldon, S. and Poulton, K. . (Eds.). (2006). **Transplantation Immunology: Methods and Protocols**, Humana Press Inc., 157-174.
34. Buckingham, L. (Eds.). (2007). **Molecular Diagnostics-Fundamentals Methods and Clinical Applications**, F.A. Davis Company.
35. Coleman, W.B. and Tsongalis, G.J. (Eds.). (2006). **Molecular Diagnostics: for The Clinical Laboratorian**, Second Edition edHumana Press, 485-494.
36. Bohmig, G. A., Farkas, A. M., Eskandary, F. and Wekerle, T. (2015). Strategies to overcome the ABO barrier in kidney transplantation. **Nature Reviews Nephrology**, 11(12), 732-47.
37. Becker, L. E., Susal, C. and Morath, C. (2013). Kidney transplantation across HLA and ABO antibody barriers. **Current Opinion in Organ Transplantation**, 18(4), 445-54.
38. Tinckam, K. J., (2012). Basic Histocompatibility Testing Methods. In A. Chandraker, M.H. Sayegh, and A.K. Singh (Eds.), **Core Concepts in Renal Transplantation**. Springer Science & Business Media, 21-42.
39. Patel, R. and Terasaki, P. I. (1969). Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. **The New England Journal of Medicine**, 280(14), 735-9.

40. Minucci, P. B., Grimaldi, V., Casamassimi, A., Cacciatore, F., Sommesse, L., Picascia, A., Resse, M., Sabia, C., Russo, A., and Napoli, C. (2011). Methodologies for anti-HLA antibody screening in patients awaiting kidney transplant: a comparative study. *Experimental and Clinical Transplantation*, 9(6), 381-6.
41. Bostock, I. C., Alberu, J., Arvizu, A., Hernandez-Mendez, E. A., De-Santiago, A., Gonzalez-Tableros, N., Lopez, M., Castelan, N., Contreras, A. G., Morales-Buenrostro, L. E., Gabilondo, B., and Vilatoba, M. (2013). Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA. *Transplant Immunology*, 28(4), 154-8.
42. Kendi Çelebi, Z. and Keven, K. (2013). Böbrek Transplantasyonu: İmmünolojik Değerlendirme ve İmmüsupresyon, . *Türkiye Klinikleri Journal of Immunology Allergy Special Topics*, 6(2), 79-83.
43. Wu, W., Liu, Y., Li, S., Hu, L., Sun, X., Cai, L., and Gong, G. (2013). Association between IL-4 polymorphism and acute rejection of solid organ allograft: a meta-analysis. *Gene*, 513(1), 14-21.
44. Keven, K., Sengul, S., Celebi, Z. K., Tuzuner, A., Yalcin, F., Duman, T., and Tutkak, H. (2013). Kidney transplantation in immunologically high-risk patients. *Transplantation Proceedings*, 45(3), 919-22.
45. Duman, T., Tutkak, H. and Süsal, C. (2013). HLA Antikor Taramalarında Konsensüs. *Türkiye Klinikleri Journal of Immunology Allergy Special Topics*, 6(2), 69-78.
46. Yalınay Çırak, M. (1999). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Sistemleri *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 242-248.
47. Zachary, A. A., Ratner, L. E., Graziani, J. A., Lucas, D. P., Delaney, N. L., and Leffell, M. S. (2001). Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance. *Human Immunology*, 62(3), 236-46.
48. Pei, R., Lee, J., Chen, T., Rojo, S. and Terasaki, P. I. (1999). Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Human Immunology*, 60(12), 1293-302.
49. Güngör, Ö., Tatar, E. and Töz, H. (2013). Böbrek Nakli Hastalarında Plazmaferez Tedavisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 22(1), 1-6.
50. Tanabe, K., Ishida, H., Shimizu, T., Omoto, K., Shirakawa, H., and Tokumoto, T. (2009). Evaluation of two different preconditioning regimens for ABO-incompatible living kidney donor transplantation. A comparison of splenectomy vs. rituximab-treated non-splenectomy preconditioning regimens. *Contributions to Nephrology*, 162, 61-74.
51. Vacher-Coponat, H., Moal, V., Indreies, M., Purgus, R., Loundou, A., Burtey, S., Brunet, P., Moussi-Frances, J., Daniel, L., Dussol, B., and Berland, Y. (2012). A randomized trial with steroids and antithymocyte globulins comparing cyclosporine/azathioprine versus tacrolimus/mycophenolate mofetil (CATM2) in renal transplantation. *Transplantation*, 93(4), 437-43.
52. Cristelli, M. P., Tedesco-Silva, H., Medina-Pestana, J. O. and Franco, M. F. (2013). Safety profile comparing azathioprine and mycophenolate in kidney transplant recipients receiving tacrolimus and corticosteroids. *Transplant Infectious Disease*, 15(4), 369-78.

53. Kwon, O., Cho, J. H., Choi, J. Y., Park, S. H., Kim, Y. L., Kim, H. K., Huh, S., and Kim, C. D. (2013). Long-term outcome of azathioprine versus mycophenolate mofetil in cyclosporine-based immunosuppression in kidney transplantation: 10 years of experience at a single center. ***Transplantation Proceedings***, 45(4), 1487-90.
54. Pascual, J., Royuela, A., Galeano, C., Crespo, M. and Zamora, J. (2012). Very early steroid withdrawal or complete avoidance for kidney transplant recipients: a systematic review. ***Nephrology Dialysis Transplantation***, 27(2), 825-32.
55. Zhang, X., Huang, H., Han, S., Fu, S. and Wang, L. (2013). Is it safe to withdraw steroids within seven days of renal transplantation? ***Clinical Transplantation***, 27(1), 1-8.
56. Page, E. , Kwun, J., Oh, B. and Knechtle, S. (2013). Lymphodepletional Strategies in Transplantation. ***Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine***, 3(7).
57. Page, E. K., Dar, W. A. and Knechtle, S. J. (2012). Biologics in organ transplantation. ***Transplant International***, 25(7), 707-19.
58. Soysal, Y. and Tosun, M. (2013). Transplantasyon ve Genetik. ***Turkiye Klinikleri Journal of General Surgery Special Topics***, 6(1), 185-189.
59. Malek, M. and Nematbakhsh, M. (2015). Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. ***Journal of Renal Injury Prevention***, 4(2), 20-7.
60. Cucchiari, D., Podesta, M. A. and Ponticelli, C. (2016). The Critical Role of Innate Immunity in Kidney Transplantation. ***Nephron Experimental Nephrology and Genetics: Review***, 132(3), 227-37.
61. Brennan, T. V., Lunsford, K. E. and Kuo, P. C. (2010). Innate pathways of immune activation in transplantation. ***Journal of Transplantation***, 2010.
62. Muşabak, U. (2013). Organ Naklinde Rejeksiyon Mekanizmaları. ***Turkiye Klinikleri Journal of Immunology Allergy Special Topics***, 6(2), 114-118.
63. Hirohashi, T., Chase, C. M., Della Pelle, P., Sebastian, D., Alessandrini, A., Madsen, J. C., Russell, P. S., and Colvin, R. B. (2012). A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. ***American Journal of Transplantation***, 12(2), 313-21.
64. Günnur, D. (2013). Organ nakillerinde Doğal Öldürücü Hücrelerin Rolü. ***Turkiye Klinikleri Journal of Immunology Allergy Special Topics***, 6(2), 36-40.
65. Sacks, S. H. and Zhou, W. (2012). The role of complement in the early immune response to transplantation. ***Nature Reviews Immunology***, 12(6), 431-42.
66. Farrar, C. A., Kupiec-Weglinski, J. W. and Sacks, S. H. (2013). The innate immune system and transplantation. ***Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine***, 3(10), a015479.
67. Roumenina, L. T., Zuber, J. and Fremeaux-Bacchi, V. (2013). Physiological and therapeutic complement regulators in kidney transplantation. ***Current Opinion in Organ Transplantation***, 18(4), 421-9.

68. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (Eds.). (2014). **Cellular and Molecular Immunology**, Elsevier Health Sciences, 73, 368, 370-376, 359-380, 493-501.
69. Huang, X. and Yang, Y. (2011). Targeting co-stimulatory pathways in gene therapy. **Frontiers in Microbiology**, 2, 202.
70. Afzali, B., Lechler, R. I. and Hernandez-Fuentes, M. P. (2007). Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. **Tissue Antigens**, 69(6), 545-556.
71. Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Reviews Immunology**, 4(5), 336-47.
72. Colvin, R. B. (2007). Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. **Journal of the American Society of Nephrology**, 18(4), 1046-56.
73. Solez, K., Colvin, R. B., Racusen, L. C., Haas, M., Sis, B., Mengel, M., Halloran, P. F., Baldwin, W., Banfi, G., Collins, A. B., Cosio, F., David, D. S., Drachenberg, C., Einecke, G., Fogo, A. B., Gibson, I. W., Glotz, D., Iskandar, S. S., Kraus, E., Lerut, E., Mannon, R. B., Mihatsch, M., Nankivell, B. J., Nickleit, V., Papadimitriou, J. C., Randhawa, P., Regele, H., Renaudin, K., Roberts, I., Seron, D., Smith, R. N., and Valente, M. (2008). Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. **American Journal of Transplantation**, 8(4), 753-60.
74. Dragun, D. (2007). Non-HLA Antibody Induced Agonism on the Angiotensin II Type 1 Receptor in Renal Allograft Vascular Injury. **Trends in Transplantation**, 1, 113-120.
75. Zhang, Xiaohai and Reinsmoen, Nancy L. (2017). Impact of Non-Human Leukocyte Antigen-Specific Antibodies in Kidney and Heart Transplantation. **Frontiers in Immunology**, 8, 434.
76. Ekşioğlu Demiralp, E. (2013). Antikor Aracılı Transplantasyon Red Reaksiyonlarında Rolü Olan Yeni HLA Dışı Antikorlar. **Türkiye Klinikleri Journal of Immunology Allergy Special Topics**, 6(2), 53-56.
77. Banasik, M., Boratynska, M., Koscielska-Kasprzak, K., Krajewska, M., Mazanowska, O., Kaminska, D., Bartoszek, D., Zabinska, M., Myszk, M., Nowakowska, B., Halon, A., Dawiskiba, T., Chudoba, P., and Klinger, M. (2014). The impact of non-HLA antibodies directed against endothelin-1 type A receptors (ETAR) on early renal transplant outcomes. **Transplant Immunology**, 30(1), 24-9.
78. Zhang, Q. and Reed, E. F. (2010). Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. **Current Opinion in Immunology**, 22(5), 682-8.
79. Dragun, D., Catar, R. and Philippe, A. (2016). Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. **Kidney International**, 90(2), 280-8.
80. Mak, T.W., Saunders, M.E. and Jett, B.D. (Eds.). (2013). **Primer to the Immune Response**, Second Edition edElsevier Science.
81. Şengül, A. (2009). Solid Organ Transplantasyonlarında Humoral İmmün Reaksiyonlar ve Değerlendirme Yöntemleri. **Türkiye Klinikleri Journal of Hematology Special Topics**, 2(1), 7-11.

82. Bos, I. G., Ten Berge, I. J. and Hack, C. E. (2002). Role of complement in graft rejection after organ transplantation. *Transfusion Medicine Reviews*, 16(3), 251-64.
83. Stegall, M. D., Chedid, M. F. and Cornell, L. D. (2012). The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nature Reviews Nephrology*, 8(11), 670-8.
84. Piotti, G., Palmisano, A., Maggiore, U. and Buzio, C. (2014). Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Frontiers in Immunology*, 5, 505.
85. Ingelfinger, J. R. (2005). Agonistic autoantibodies and rejection of renal allografts. *The New England Journal of Medicine*, 352(6), 617-9.
86. Mehra, N. K., Siddiqui, J., Baranwal, A., Goswami, S. and Kaur, G. (2013). Clinical relevance of antibody development in renal transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1283, 30-42.
87. Valenzuela, N. M., McNamara, J. T. and Reed, E. F. (2014). Antibody-mediated graft injury: complement-dependent and complement-independent mechanisms. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 19(1), 33-40.
88. Banasik, M., Koscielska-Kasprzak, K., Myszk, M., Bartoszek, D., Zabinska, M., Boratynska, M., Kaminska, D., Mazanowska, O., Zmonarski, S., Krajewska, M., Halon, A., Dawiskiba, T., Nowakowska, B., and Klinger, M. (2014). A significant role for anti-human leukocyte antigen antibodies and antibody-mediated rejection in the biopsy-for-cause population. *Transplantation Proceedings*, 46(8), 2613-7.
89. Wasowska, B. A. (2010). Mechanisms involved in antibody- and complement-mediated allograft rejection. *Immunologic Research*, 47(1-3), 25-44.
90. Bingaman, A. W. and Farber, D. L. (2004). Memory T Cells in Transplantation: Generation, Function, and Potential Role in Rejection. *American Journal of Transplantation*, 4(6), 846-852.
91. Tigerstedt, R. and Bergman, P.G. (1898). Niere und Kreislauf. *The Scandinavian Physiological Society* 8.
92. Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F. and Munoz, J. M. (1940). The substance causing renal hypertension. *The Journal of Physiology*, 98(3), 283-98.
93. Page, I. H. and Helmer, O.M. (1940). A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *Journal of Experimental Medicine*, 71(1), 29-42.
94. Ferrao, F. M., Lara, L. S. and Lowe, J. (2014). Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? *World Journal of Nephrology*, 3(3), 64-76.
95. Dzau, V. J., Baxter, J. A., Cantin, M., de Bold, A., Ganten, D., Gross, K., Husain, A., Inagami, T., Menard, J., Poole, S., and et al. (1987). Report of the Joint Nomenclature and Standardization Committee of the International Society of Hypertension, American Heart Association and the World Health Organization. *Journal of Hypertension*, 5(4), 507-11.

96. Brunner, H. R., Gavras, H., Laragh, J. H. and Keenan, R. (1973). Angiotensin-II Blockade in Man by Sar1-Ala8-Angiotensin Ii for Understanding and Treatment of High Blood-Pressure. **The Lancet**, 302(7837), 1045-1048.
97. Ondetti, M. A., Rubin, B. and Cushman, D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science**, 196(4288), 441-4.
98. Holappa, M., Vapaatalo, H. and Vaajanen, A. (2015). Ocular renin-angiotensin system with special reference in the anterior part of the eye. **World Journal of Ophthalmology**, 5(3), 110.
99. Fyhrquist, F. and Saijonmaa, O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, 264(3), 224-36.
100. Paul, M., Poyan Mehr, A. and Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological Reviews**, 86(3), 747-803.
101. Zhuo, J. L., Ferrao, F. M., Zheng, Y. and Li, X. C. (2013). New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. **Frontiers in Endocrinology/Cellular Endocrinology**, 4, 166.
102. Campbell, D. J. (2014). Clinical relevance of local Renin Angiotensin systems. **Frontiers in Endocrinology/Cellular Endocrinology**, 5, 113.
103. Guang, C., Phillips, R. D., Jiang, B. and Milani, F. (2012). Three key proteases--angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin--within and beyond the renin-angiotensin system. **Archives of Cardiovascular Disease**, 105(6-7), 373-85.
104. Santos, R. A., Ferreira, A. J., Verano-Braga, T. and Bader, M. (2013). Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **Journal of Endocrinology**, 216(2), R1-R17.
105. Hildebrand, D., Merkel, P., Eggers, L. F. and Schluter, H. (2013). Proteolytic processing of angiotensin-I in human blood plasma. **PLoS One**, 8(5), e64027.
106. Masuyer, G., Yates, C. J., Sturrock, E. D. and Acharya, K. R. (2014). Angiotensin-I converting enzyme (ACE): structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence. **Biological Chemistry**, 395(10), 1135-49.
107. Vaajanen, A., Luhtala, S., Oksala, O. and Vapaatalo, H. (2008). Does the renin-angiotensin system also regulate intra-ocular pressure? **Annals of Medicine**, 40(6), 418-27.
108. Ribeiro-Oliveira, A., Jr., Nogueira, A. I., Pereira, R. M., Boas, W. W., Dos Santos, R. A., and Simoes e Silva, A. C. (2008). The renin-angiotensin system and diabetes: an update. **Vascular Health and Risk Management**, 4(4), 787-803.
109. Passos-Silva, D. G., Verano-Braga, T. and Santos, R. A. (2013). Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. **Clinical Science**, 124(7), 443-56.
110. Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., Soares, E., Barbosa, C.,

- Kjeldsen, F., Oliveira, A., Braga, J., Savergnini, S., Maia, G., Peluso, A. B., Passos-Silva, D., Ferreira, A., Alves, F., Martins, A., Raizada, M., Paula, R., Motta-Santos, D., Klempin, F., Pimenta, A., Alenina, N., Sinisterra, R., Bader, M., Campagnole-Santos, M. J., and Santos, R. A. (2013). Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*, 112(8), 1104-11.
111. Oshima, Y., Morimoto, S. and Ichihara, A. (2014). Roles of the (pro)renin receptor in the kidney. *World Journal of Nephrology*, 3(4), 302-7.
112. Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T., and Sraer, J. D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(11), 1417-27.
113. Oğuz, A. (2009). Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi inhibisyonu ve kardiyovasküler koruma. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 37 (6), 4-12
114. Becari, C., Oliveira, E. B. and Salgado, M. C. O. (2011). Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(9), 914-919.
115. Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., and Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8258-63.
116. Miura, R., Nakamura, K., Miura, D., Miura, A., Hisamatsu, K., Kajiya, M., Hashimoto, K., Nagase, S., Morita, H., Fukushima Kusano, K., Emori, T., Ishihara, K., and Ohe, T. (2006). Aldosterone synthesis and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 102(3), 288-95.
117. Weber, K. T. (2001). Aldosterone in congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine*, 345(23), 1689-97.
118. Gonzalez, A. A., Luffman, C., Bourgeois, C. R., Vio, C. P. and Prieto, M. C. (2013). Angiotensin II-independent upregulation of cyclooxygenase-2 by activation of the (Pro)renin receptor in rat renal inner medullary cells. *Hypertension*, 61(2), 443-9.
119. Ruiz-Ortega, M., Esteban, V. and Egido, J. (2007). The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 17(1), 19-25.
120. Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., and Egido, J. (2003). Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(6), 881-900.
121. Friedland, J., Setton, C. and Silverstein, E. (1977). Angiotensin converting enzyme: induction by steroids in rabbit alveolar macrophages in culture. *Science*, 197(4298), 64-65.

122. Reilly, C. F., Tewksbury, D. A., Schechter, N. M. and Travis, J. (1982). Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. ***The Journal of Biological Chemistry***, 257(15), 8619-22.
123. Lapteva, N., Nieda, M., Ando, Y., Ide, K., Hatta-Ohashi, Y., Dymshits, G., Ishikawa, Y., Juji, T., and Tokunaga, K. (2001). Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 285(4), 1059-65.
124. Jurewicz, M., McDermott, D. H., Sechler, J. M., Tinckam, K., Takakura, A., Carpenter, C. B., Milford, E., and Abdi, R. (2007). Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. ***Journal of the American Society of Nephrology***, 18(4), 1093-102.
125. Hoch, N. E., Guzik, T. J., Chen, W., Deans, T., Maalouf, S. A., Gratzke, P., Weyand, C., and Harrison, D. G. (2009). Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. ***American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology***, 296(2), R208-16.
126. Sagawa, K., Nagatani, K., Komagata, Y. and Yamamoto, K. (2005). Angiotensin receptor blockers suppress antigen-specific T cell responses and ameliorate collagen-induced arthritis in mice. ***Arthritis & Rheumatology***, 52(6), 1920-8.
127. Weidanz, J. A., Jacobson, L. M., Muehrer, R. J., Djamali, A., Hullett, D. A., Sprague, J., Chiriva-Internati, M., Wittman, V., Thekkumkara, T. J., and Becker, B. N. (2005). ATR blockade reduces IFN-gamma production in lymphocytes in vivo and in vitro. ***Kidney International***, 67(6), 2134-42.
128. Nakamura, T., Miller, D., Ruoslahti, E. and Border, W. A. (1992). Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor- β 1. ***Kidney International***, 41(5), 1213-1221.
129. Border, W. A. and Noble, N. A. (1997). TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. ***Kidney International***, 51(5), 1388-96.
130. Cruzado, J. M., Rico, J. and Grinyo, J. M. (2008). The renin angiotensin system blockade in kidney transplantation: pros and cons. ***Transplant International***, 21(4), 304-13.
131. Heinze, G., Mitterbauer, C., Regele, H., Kramar, R., Winkelmayr, W. C., Curhan, G. C., and Oberbauer, R. (2006). Angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II type 1 receptor antagonist therapy is associated with prolonged patient and graft survival after renal transplantation. ***Journal of the American Society of Nephrology***, 17(3), 889-99.
132. Opelz, G., Zeier, M., Laux, G., Morath, C. and Dohler, B. (2006). No improvement of patient or graft survival in transplant recipients treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II type 1 receptor blockers: a collaborative transplant study report. ***Journal of the American Society of Nephrology***, 17(11), 3257-62.
133. Philogene, M. C. and Jackson, A. M. (2016). Non-HLA antibodies in transplantation: when do they matter? ***Curr Opin Organ Transplant***, 21(4), 427-32.

- 134.Xia, Y., Ramin, S. M. and Kellems, R. E. (2007). Potential roles of angiotensin receptor-activating autoantibody in the pathophysiology of preeclampsia. **Hypertension**, 50(2), 269-75.
- 135.Guo, F., Chen, X. L. and Wang, F. (2011). Role of angiotensin II-angiotensin II type 1 receptor pathway in the production of proinflammatory cytokines in macrophage. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi**, 27(2), 88-91.
- 136.Luft, F. C. (2013). Activating autoantibodies and cardiovascular disease. **Physiology (Bethesda)**, 28(4), 254-61.
- 137.Dragun, D. and Hegner, B. (2009). Non-HLA antibodies post-transplantation: clinical relevance and treatment in solid organ transplantation. **Contributions to Nephrology**, 162, 129-39.
- 138.Dragun, D. (2008). Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. **Transplantation**, 86(8), 1019-25.
- 139.Dragun, D., Catar, R., Kusch, A., Heidecke, H. and Philippe, A. (2012). Non-HLA-antibodies targeting Angiotensin type 1 receptor and antibody mediated rejection. **Human Immunology**, 73(12), 1282-6.
- 140.Dragun, D., Catar, R. and Philippe, A. (2013). Non-HLA antibodies in solid organ transplantation: recent concepts and clinical relevance. **Current Opinion in Organ Transplantation**, 18(4), 430-5.
- 141.Dragun, D. (2007). The role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in renal allograft vascular rejection. **Pediatric Nephrology**, 22(7), 911-4.
- 142.Hilbrands, L., Hoitsma, A. and Wetzels, J. (2005). Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. **The New England Journal of Medicine**, 352(19), 2027-8; author reply 2027-8.
- 143.Dragun, D. (2007). Agonistic antibody-triggered stimulation of Angiotensin II type 1 receptor and renal allograft vascular pathology. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 22(7), 1819-22.
- 144.Reinsmoen, N. L. (2013). Role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in solid organ transplantation. **Human Immunology**, 74(11), 1474-7.
145. Michielsen, L. A., van Zuilen, A. D., Krebber, M. M., Verhaar, M. C. and Otten, H. G. (2016). Clinical value of non-HLA antibodies in kidney transplantation: Still an enigma? **Transplantation Reviews Journal (Orlando)**, 30(4), 195-202.
- 146.Kill, A. and Riemekasten, G. (2015). Functional autoantibodies in systemic sclerosis pathogenesis. **Current Rheumatology Reports**, 17(5), 34.
- 147.Cabral-Marques, O. and Riemekasten, G. (2016). Vascular hypothesis revisited: Role of stimulating antibodies against angiotensin and endothelin receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, 15(7), 690-694.

148. Reinsmoen, N. L., Lai, C. H., Heidecke, H., Haas, M., Cao, K., Ong, G., Naim, M., Wang, Q., Mirocha, J., Kahwaji, J., Vo, A. A., Jordan, S. C., and Dragun, D. (2010). Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation*, 90(12), 1473-7.
149. Trzcinska, M. (Ed). (2011). *Periodical Kidney Transplantation-New Perspectives*. Intech Open Science, 1-7, 9, 65-77, 223-228 .
150. Owen, J., Punt, J. and Stranford, S. (Eds.). (2013). *Kuby Immunology*, Seventh Edition ed. USA: W. H. Freeman, 113.
151. Wadia, P. P. and Tambur, A. R. (2008). Yin and yang of cytokine regulation in solid organ graft rejection and tolerance. *Clinics in Laboratory Medicine*, 28(3), 469-79, vii-viii.
152. Wiggins, M. C., Bracher, M., Mall, A., Hickman, R., Robson, S. C., and Kahn, D. (2000). Tumour necrosis factor levels during acute rejection and acute tubular necrosis in renal transplant recipients. *Transplant Immunology*, 8(3), 211-5.
153. Raasveld, M. H. M., Bloemena, E., Wilmlink, J. M., Surachno, S., Schellekens, P. T. A., and Berge, R. J. M. (1993). Interleukin-6 and neopterin in renal transplant recipients: a longitudinal study. *Transplant International*, 6(2), 89-94.
154. Mottram, P. L., Han, W. R., Purcell, L. J., McKenzie, I. F. and Hancock, W. W. (1995). Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-gamma in long-surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation*, 59(4), 559-65.
155. Tay, S. S., Plain, K. M. and Bishop, G. A. (2009). Role of IL-4 and Th2 responses in allograft rejection and tolerance. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 14(1), 16-22.
156. Nikolova, P. N., Ivanova, M. I., Mihailova, S. M., Myhailova, A. P., Baltadjieva, D. N., Simeonov, P. L., Paskalev, E. K., and Naumova, E. J. (2008). Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation--impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transplant Immunology*, 18(4), 344-8.
157. Sankaran, D., Asderakis, A., Ashraf, S., Roberts, I. S., Short, C. D., Dyer, P. A., Sinnott, P. J., and Hutchinson, I. V. (1999). Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney International*, 56(1), 281-8.
158. Yang, L. and Liu, Y. (2003). Cytokine gene polymorphisms predict acute rejection following renal transplantation. *International Congress Series*, 1255, 99-100.
159. Kruger, B., Schroppel, B. and Murphy, B. T. (2008). Genetic polymorphisms and the fate of the transplanted organ. *Transplantation Reviews*, 22(2), 131-40.
160. Gillaizeau, F., Giral, M., Dantan, E., Dragun, D., Soullillou, J. P., and Foucher, Y. (2014). Multi-state analysis of kidney transplant recipients outcome: a semi-Markov model for studying the role of pre-transplant sensitization against Angiotensin II Type 1 receptor. *Journal de la Société Française de Statistique*, 155(1), 117-133.

161. Hu, X., Bai, Y., Li, S., Zeng, K., Xu, L., Liu, Z., Song, X., Lu, X., Wang, L., and Ying, B. (2011). Donor or recipient TNF-A -308G/A polymorphism and acute rejection of renal allograft: A meta-analysis. *Transplant Immunology*, 25(1), 61-71.
162. Stojanova, J., Pouche, L. and Picard, N. (2016). Genetic polymorphisms in the immune response: A focus on kidney transplantation. *Clinical Biochemistry*, 49(4-5), 363-76.
163. Turner, D., Grant, S. C., Yonan, N., Sheldon, S., Dyer, P. A., Sinnott, P. J., and Hutchinson, I. V. (1997). Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation*, 64(5), 776-9.
164. Genctoy, G., Altun, B., Kiykim, A. A., Arici, M., Erdem, Y., Caglarg, M., Yasavul, U., Turgan, C., and Caglar, S. (2005). TNF alpha-308 genotype and renin-angiotensin system in hemodialysis patients: an effect on inflammatory cytokine levels? *Artificial Organs*, 29(2), 174-8.
165. Bouma, G., Crusius, J. B., Oudkerk Pool, M., Kolkman, J. J., von Blomberg, B. M., Kostense, P. J., Giphart, M. J., Schreuder, G. M., Meuwissen, S. G., and Pena, A. S. (1996). Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 43(4), 456-63.
166. Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O. and Duff, G. W. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3195-3199.
167. Pearl, M. H., Leuchter, R. K., Reed, E. F., Zhang, Q., Ettenger, R. B., and Tsai, E. W. (2015). Accelerated rejection, thrombosis, and graft failure with angiotensin II type 1 receptor antibodies. *Pediatric Nephrology*, 30(8), 1371-4.
168. Amaral, L. M., Kiprono, L., Cornelius, D. C., Shoemaker, C., Wallace, K., Moseley, J., Wallukat, G., Martin, J. N., Jr., Dechend, R., and LaMarca, B. (2014). Progesterone supplementation attenuates hypertension and the autoantibody to the angiotensin II type I receptor in response to elevated interleukin-6 during pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 211(2), 158 e1-6.
169. LaMarca, B. (2011). Hypertension in response to IL-6 during pregnancy: role of AT1-receptor activation. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 2011(3), 65.
170. Iesari, S., Lai, Q., Favi, E. and Pisani, F. (2017). Bortezomib-Containing Multimodality Treatment for Antibody-Mediated Rejection with Anti-HLA and Anti-AT1R Antibodies after Kidney Transplantation. *Yonsei Medical Journal*, 58(3), 679-681.
171. Lv, R., Hu, X., Bai, Y., Long, H., Xu, L., Liu, Z., Li, X., Huang, H., Wang, L., and Ying, B. (2012). Association between IL-6 -174G/C polymorphism and acute rejection of renal allograft: evidence from a meta-analysis. *Transplant Immunology*, 26(1), 11-8.
172. Spoto, B., Mattace-Raso, F., Sijbrands, E., Leonardis, D., Testa, A., Pisano, A., Pizzini, P., Cutrupi, S., Parlongo, R. M., D'Arrigo, G., Tripepi, G., Mallamaci, F., and Zoccali, C. (2015). Association of IL-6 and a functional polymorphism in the IL-6 gene with

cardiovascular events in patients with CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(2), 232-40.

173. Dhaouadi, T., Sfar, I., Bardi, R., Jendoubi-Ayed, S., Abdallah, T. B., Ayed, K., and Gorgi, Y. (2013). Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*, 45(6), 2152-7.
174. Durupınar, B. (2009). Transplantasyonda Sitokin ve Kemokin Profilleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Hematology Special Topics*, 2(1), 26-34.
175. Bjerre, A., Tangeraas, T., Heidecke, H., Dragun, D., Dechend, R., and Staff, A. C. (2016). Angiotensin II type 1 receptor antibodies in childhood kidney transplantation. *Pediatric Transplantation*, 20(5), 627-632.
176. Kelsch, R., Everding, A. S., Kuwertz-Broking, E., Brand, E., Spriewald, B. M., Sibrowski, W., Konrad, M., and Dragun, D. (2011). Accelerated kidney transplant rejection and hypertensive encephalopathy in a pediatric patient associated with antibodies against angiotensin type 1 receptor and HLA class II. *Transplantation*, 92(10), e57-9.
177. Taniguchi, M., Rebellato, L. M., Cai, J., Hopfield, J., Briley, K. P., Haisch, C. E., Catrou, P. G., Bolin, P., Parker, K., Kendrick, W. T., Kendrick, S. A., Harland, R. C., and Terasaki, P. I. (2013). Higher risk of kidney graft failure in the presence of anti-angiotensin II type-1 receptor antibodies. *American Journal of Transplantation*, 13(10), 2577-89.
178. Lukitsch, I., Kehr, J., Chaykovska, L., Wallukat, G., Nieminen-Kelha, M., Batuman, V., Dragun, D., and Gollasch, M. (2012). Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation*, 94(1), 8-13.
179. Giral, M., Foucher, Y., Dufay, A., Van Huyen, J. P., Renaudin, K., Moreau, A., Philippe, A., Hegner, B., Dechend, R., Heidecke, H., Brouard, S., Cesbron, A., Castagnet, S., Devys, A., Soullillou, J. P., and Dragun, D. (2013). Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *American Journal of Transplantation*, 13(10), 2567-76.
180. Banasik, M., Boratynska, M., Koscielska-Kasprzak, K., Kaminska, D., Bartoszek, D., Zabinska, M., Myszk, M., Zmonarski, S., Protasiewicz, M., Nowakowska, B., Halon, A., Chudoba, P., and Klinger, M. (2014). The influence of non-HLA antibodies directed against angiotensin II type 1 receptor (AT1R) on early renal transplant outcomes. *Transplant International*, 27(10), 1029-38.
181. Hernandez-Mendez, E. A., Arreola-Guerra, J. M., Morales-Buenrostro, L. E., Ramirez, J. B., Calleja, S., Castelan, N., Salcedo, I., Vilatoba, M., Contreras, A. G., Gabilondo, B., Granados, J., and Alberu, J. (2014). Pre-transplant angiotensin II type 1 receptor antibodies: a risk factor for decreased kidney graft function in the early post-transplant period? *Revista de Investigación Clínica*, 66(3), 218-24.
182. Reinsmoen, N. L., Lai, C. H., Mirocha, J., Cao, K., Ong, G., Naim, M., Wang, Q., Haas, M., Rafiei, M., Czer, L., Patel, J., and Kobashigawa, J. (2014). Increased negative impact of donor HLA-specific together with non-HLA-specific antibodies on graft outcome. *Transplantation*, 97(5), 595-601.

183. In, J. W., Park, H., Rho, E. Y., Shin, S., Park, K. U., Park, M. H., and Song, E. Y. (2014). Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody-mediated rejection in patients without preformed HLA-donor-specific antibody. *Transplantation Proceedings*, 46(10), 3371-4.
184. Banasik, M., Boratynska, M., Koscielska-Kasprzak, K., Kaminska, D., Zmonarski, S., Mazanowska, O., Krajewska, M., Bartoszek, D., Zabinska, M., Myszk, M., Kaminska, M., Halon, A., Dawiskiba, T., Szyber, P., Sas, A., and Klinger, M. (2014). Non-HLA antibodies: angiotensin II type 1 receptor (anti-AT1R) and endothelin-1 type A receptor (anti-ETAR) are associated with renal allograft injury and graft loss. *Transplantation Proceedings*, 46(8), 2618-21.
185. Lee, J., Huh, K. H., Park, Y., Park, B. G., Yang, J., Jeong, J. C., Lee, J., Park, J. B., Cho, J. H., Lee, S., Ro, H., Han, S. Y., Kim, M. S., Kim, Y. S., Kim, S. J., Kim, C. D., Chung, W., Park, S. B., Ahn, C., and Group, Know-Kt on behalf of the Study. (2015). The clinicopathological relevance of pretransplant anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies in renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 0, 1-7.
186. Fuss, A., Hope, C. M., Deayton, S., Bennett, G. D., Holdsworth, R., Carroll, R. P., and Coates, P. T. (2015). C4d-negative antibody-mediated rejection with high anti-angiotensin II type I receptor antibodies in absence of donor-specific antibodies. *Nephrology (Carlton)*, 20(7), 467-73.
187. Jobert, A., Rao, N., Deayton, S., Bennett, G. D., Brealey, J., Nolan, J., Carroll, R. P., Dragun, D., and Coates, P. T. (2015). Angiotensin II type 1 receptor antibody precipitating acute vascular rejection in kidney transplantation. *Nephrology (Carlton)*, 20 Suppl 1, 10-2.
188. Mujtaba, M. A., Sharfuddin, A. A., Book, B. L., Goggins, W. C., Khalil, A. A., Mishler, D. P., Fridell, J. A., Yaqub, M. S., and Taber, T. E. (2015). Pre-transplant angiotensin receptor II type 1 antibodies and risk of post-transplant focal segmental glomerulosclerosis recurrence. *Clinical Transplantation*, 29(7), 606-11.
189. Lee, H., Kim, J. I., Moon, I. S., Chung, B. H., Yang, C. W., Kim, Y., Han, K., and Oh, E. J. (2015). Investigation of Serum Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies at the Time of Renal Allograft Rejection. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 35(3), 314-20.
190. Cuevas, E., Arreola-Guerra, J. M., Hernandez-Mendez, E. A., Salcedo, I., Castelan, N., Uribe-Uribe, N. O., Vilatoba, M., Contreras-Saldivar, A. G., Sanchez-Cedillo, A. I., Ramirez, J. B., de Rungs, D., Granados, J., Morales-Buenrostro, L. E., and Alberu, J. (2016). Pretransplant angiotensin II type 1-receptor antibodies are a risk factor for earlier detection of de novo HLA donor-specific antibodies. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 31(10), 1738-45.
191. Urban, M., Slavcev, A., Gazdic, T., Ivak, P., Besik, J., and Netuka, I. (2016). The impact of angiotensin II type 1 receptor antibodies on post-heart transplantation outcome in Heart Mate II bridged recipients. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 22(3), 292-7.
192. Philogene, M. C., Bagnasco, S., Kraus, E. S., Montgomery, R. A., Dragun, D., Leffell, M. S., Zachary, A. A., and Jackson, A. M. (2017). Anti-Angiotensin II Type 1 Receptor and

Anti-Endothelial Cell Antibodies: A Cross-Sectional Analysis of Pathological Findings in Allograft Biopsies. *Transplantation*, 101(3), 608-615.

193. Guzzo, I., Morolli, F., Camassei, F. D., Piazza, A., Poggi, E., and Dello Strologo, L. (2017). Acute kidney transplant rejection mediated by angiotensin II type 1 receptor antibodies in a pediatric hyperimmune patient. *Pediatric Nephrology*, 32(1), 185-188.
194. Zhang, J., Wang, M., Liang, J., Zhang, M., Liu, X. H., and Ma, L. (2017). The Presence of Anti-Angiotensin II Type-1 Receptor Antibodies Adversely Affect Kidney Graft Outcomes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(5).
195. Lim, Mary Ann, Palmer, Matthew, Trofe-Clark, Jennifer, Bloom, Roy D., Jackson, Annette, Philogene, Mary Carmelle, and Kamoun, Malek. (2017). Histopathologic changes in anti-angiotensin II type 1 receptor antibody-positive kidney transplant recipients with acute rejection and no donor specific HLA antibodies. *Human Immunology*, 78(4), 350-356.
196. Pinelli, D. F., Friedewald, J. J., Haarberg, K. M. K., Radhakrishnan, S. L., Zitzner, J. R., Hanshew, W. E., and Tambur, A. R. (2017). Assessing the potential of angiotensin II type 1 receptor and donor specific anti-endothelial cell antibodies to predict long-term kidney graft outcome. *Human Immunology*, 78(5-6), 421-427.
197. Deltombe, C., Gillaizeau, F., Anglicheau, D., Morelon, E., Trebern-Launay, K., Le Borgne, F., Rimbert, M., Guerif, P., Malard-Castagnet, S., Foucher, Y., and Giral, M. (2017). Is Pre-transplant sensitization against Angiotensin II Type1 Receptor still a risk factor of graft and patient outcome in kidney transplantation in the anti HLA Luminex era? *Transpl Int*.
198. Kimball, Pamela M., Gupta, Gaurav and McDougan, Felecia. (2017). Circulating angiotensin type II receptor: Possible marker for antibody mediated rejection after renal transplantation? *Human Immunology*.
199. Lee, J., Park, Y., Kim, B. S., Lee, J. G., Kim, H. J., Kim, Y. S., and Huh, K. H. (2015). Clinical implications of angiotensin II type 1 receptor antibodies in antibody-mediated rejection without detectable donor-specific HLA antibodies after renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, 47(3), 649-52.
200. Seyhun, Y., Mytilineos, J., Turkmen, A., Oguz, F., Kekik, C., Ozdilli, K., Nane, I., Aydin, F., and Carin, M. (2012). Influence of cytokine gene polymorphisms on graft rejection in Turkish patients with renal transplants from living related donors. *Transplantation Proceedings*, 44(5), 1241-9.
201. Thakkestian, A., Dmitrienko, S., Gerbase-Delima, M., McDaniel, D. O., Inigo, P., Chow, K. M., McEvoy, M., Ingsathit, A., Trevillian, P., Barber, W. H., and Attia, J. (2008). Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(9), 3017-23.
202. Xiong, J., Wang, Y., Zhang, Y., Nie, L., Wang, D., Huang, Y., Feng, B., Zhang, J., and Zhao, J. (2015). Lack of Association between Interleukin-10 Gene Polymorphisms and Graft Rejection Risk in Kidney Transplantation Recipients: A Meta-Analysis. *Plos One*, 10(6), e0127540.

203. Muller-Steinhardt, M., Hartel, C., Muller, B., Kirchner, H. and Fricke, L. (2002). The interleukin-6 (-174) promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. ***Kidney International***, 62(5), 1824-1827.
204. Müller-Steinhardt, M., Fricke, L., Müller, B., Ebel, B., Kirchner, H., and Härtel, C. (2004). Cooperative Influence of the Interleukin-6 Promoter Polymorphisms -597, -572 and -174 on Long-Term Kidney Allograft Survival. ***American Journal of Transplantation***, 4(3), 402-406.
205. Ge, Y. Z., Yu, P., Jia, R. P., Wu, R., Ding, A. X., Li, L. P., Zhao, Y., Feng, Y. M., Gui, Z. L., and Liao, S. (2014). Association between transforming growth factor beta-1 +869T/C polymorphism and acute rejection of solid organ allograft: A meta-analysis and systematic review. ***Transplant Immunology***, 30(2-3), 76-83.
206. Chen, Z., Bouamar, R., Van Schaik, R. H., De Fijter, J. W., Hartmann, A., Zeier, M., Budde, K., Kuypers, D. R., Weimar, W., Hesselink, D. A., and Van Gelder, T. (2014). Genetic polymorphisms in IL-2, IL-10, TGF-beta1, and IL-2RB and acute rejection in renal transplant patients. ***Clinical Transplantation***, 28(6), 649-55.

EKLER

Ek-1. Etik kurul onayı



1993

Başkent Üniversitesi**Tıp ve Sağlık Bilimleri
Araştırma Kurulu**

Dr. Hakan Özkardeş
Dr. A. Eftal Yücel
Dr. Feride İ. Şahin
Dr. Şule Bulut
Dr. Fuat Büyüklü
Dr. Emine Aksoydan
Dr. Tolga R. Aydos
Dr. Elif Durukan
Dr. Şebnem İlhan

Sayı: 94603339 / 18-050.01.08.01-72
Konu: Proje onayı

22/01/2015

İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanlığına,

Anabilim Dalınızda görev yapmakta olan Prof. Dr. Bilkay Baştürk tarafından yürütülecek olan KA14/329 nolu "Böbrek nakli olan hastalarda organ reddinde anjiyotensin 1 reseptör antikor seviyesi ile sitokin gen polimorfizm ilişkisinin araştırılması" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 21/01/2015 tarih ve 15/13 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayınlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma
Kurulu Başkanı

Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Institutional Review Board and Ethics Committee (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.

LT

Başkent Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlığı
16. Sokak No. 11
Bahçelievler, 06490
Ankara

Tel : 0312 212 90 65

Faks : 0312 221 37 59

arastirma@baskent.edu.tr

İşlemlerinizi hızlandırmak için anabilim dalı üzerinden resmi yazışma ve imza gerektirmeyen her türlü bilgi alışverişinde arastirma@baskent.edu.tr e-posta adresimizi kullanınız (Bağlantı- Araştırma Kurulu Sekreteri: Lilifer Taşbilek).

Ek-1.(devam) Etik kurul onayı

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KARAR

KARAR TARİHİ	KARAR SAYISI	PROJE NO
21/01/2015	15/13	KA14/329

İmmünoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. Bilkay Baştürk tarafından yürütülecek olan KA14/329 nolu ve "Böbrek nakli olan hastalarda organ reddinde anjiyotensin 1 reseptör antikor seviyesi ile sitokin gen polimorfizm ilişkisinin araştırılması" başlıklı araştırma projesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna karar verildi.

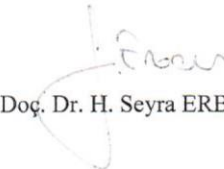

• Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ

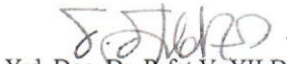

• Prof. Dr. Araş PİRAT


• Prof. Dr. Füsün ÖNER EYÜBOĞLU

Katılmadı.
• Prof. Dr. Hulusi B. ZEYNELOĞLU


• Prof. Dr. Neslihan ARHUN


• Doç. Dr. H. Seyra ERBEK


• Yrd. Doç. Dr. Rifat V. YILDIRIM

ASLI GİBİDİR

Lilifer TAŞBİLEK
Araştırma ve Etik Kurulu
Sekreteri

Ek-2. Sağlıklı gönüllü onam formu

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bilimsel araştırma amaçlı klinik bir çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini tam olarak anlamanız ve kararınızı, araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra özgürce vermeniz gerekmektedir. Bu bilgilendirme formu söz konusu araştırmayı ayrıntılı olarak tanıtmak amacıyla size özel olarak hazırlanmıştır. Lütfen bu formu dikkatlice okuyunuz. Araştırma ile ilgili olarak bu formda belirtildiği halde anlayamadığımız ya da belirtilemediğini fark ettiğiniz noktalar olursa hekiminize sorunuz ve sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım **gönüllülük** esasına dayalıdır. Araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra, kararınızı özgürce verebilmeniz ve düşünmeniz için formu imzalamadan önce hekiminiz size zaman tanıyacaktır. Kararınız ne olursa olsun, hekimleriniz sizin tam sağlık halinizin sağlanmasına ve korunmasına yönelik görevlerini bundan sonra da eksiksiz yapacaklardır. Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde formu imzalayınız.

1. ARAŞTIRMANIN ADI

Böbrek nakli olan hastalarda organ reddinde AT1R sitokin gen polimorfizm ilişkisinin araştırılması

2. GÖNÜLLÜ SAYISI

Bu araştırmada yer alması öngörülen toplam gönüllü sayısı 50 sağlıklı kontrol olmak üzere 150 gönüllüdür.

3. ARAŞTIRMAYA KATILIM SÜRESİ

Bu araştırmaya katılım süreniz bir defaya mahsus sizden alınacak kan örneği vermeniz ile tamamlanacaktır.

4. ARAŞTIRMANIN AMACI

Bu çalışmayla böbrek nakli yapılan hastalarda organ reddi ile ilişkili bağışıklık sistemi parametrelerinin araştırılması yapılacaktır.

5. ARAŞTIRMAYA KATILMA KOŞULLARI

Bu araştırmaya dâhil edilebilmeniz için gereken koşullar şunlardır:

1. Herhangi bir kanser hastalığınızın olmaması,
2. Zihinsel ve kognitif bozukluğunuzun olmaması.

6. ARAŞTIRMANIN YÖNTEMİ

Bu araştırmada sizden alınacak 2 tüp kan örneği ile immünolojik (bağışıklık) parametreleriniz çalışılacaktır.

7. GÖNÜLLÜNÜN SORUMLULUKLARI

1. Kan alma sırasında herhangi bir şekilde fenalık hissedilmesi durumunda ilgili doktora danışmalısınız,
2. Kan alındıktan sonra uyulması gereken bir program bulunmamaktadır.

İMZALAR: Gönüllü**(varsa) Vasi****Araştırmacı****Tanık****1**

Ek-2.(devam) Sağlıklı gönüllü onam formu

8. ARAŞTIRMADAN BEKLENEN OLASI YARARLAR

Bu araştırma, neden bazı nakillerde organ reddi olurken bazılarında olmadığı konusuna ışık tutacaktır. Araştırmamız yalnızca bilimsel amaçlı olup sizin doğrudan yarar görmeyiz beklenmemektedir. Ancak, bu araştırmadan elde edilen sonuçlar nakil olmuş hastaların tedavisinin planlanmasına katkı sağlayacaktır.

9. ARAŞTIRMADAN KAYNAKLANABİLECEK OLASI RİSKLER

Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında acı-ağrı duyma, nadiren bayılma, morarma, nadiren iğnenin giriş yerinde enfeksiyon, pıhtılaşma veya kanamanın uzaması çok nadiren de olsa bulunmaktadır. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

10. ARAŞTIRMADAN KAYNAKLANABİLECEK HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK / SORUMLULUK DURUMU

Yoktur

11. ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLARDA ARANACAK KİŞİ

Uygulama süresince, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da araştırma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki veya diğer rahatsızlıklarınız için herhangi bir saatte adresi ve telefonu aşağıda belirtilen ilgili hekime ulaşabilirsiniz.

İstediginizde Günü 24 Saati Ulaşılabilecek Hekimin Adres ve Telefonları:

Prof.Dr. Bilkay Baştürk

İş: 0 322 3272727 (2025)

12. GİDERLERİN KARŞILANMASI VE ÖDEMELER

Bu araştırmaya katılmanız için veya araştırmadan kaynaklanabilecek giderler için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Hastalığınızın gerektirdiği tetkiklere ilave olarak yapılacak her türlü tetkik, ve diğer araştırma giderleri size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kuruma ödetilmeyecektir.

13. ARAŞTIRMAYI DESTEKLEYEN KURUM

Çalışma Başkent Üniversitesi tarafından desteklenmektedir..

14. GÖNÜLLÜYE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILIP YAPILMAYACAĞI

Bu araştırmaya katılmanızla, araştırma ile ilgili çıkabilecek zorunlu masraflar tarafımızdan karşılanacaktır. Bunun dışında size veya yasal temsilcilerinize herhangi bir maddi katkı sağlanmayacaktır.

15. BİLGİLERİN GİZLİLİĞİ

Araştırma süresince elde edilen sizinle ilgili tıbbi bilgiler size özel bir kod numarası ile kaydedilecektir. Size ait her türlü tıbbi bilgi gizli tutulacaktır. Araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçla kullanılacaktır. Araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir. Ancak, gerektiğinde araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar tıbbi bilgilerinize ulaşabilecektir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabileceksiniz

16. ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILMA KOŞULLARI

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tamık

2

Ek-2. (devam) Sağlıklı gönüllü onam formu

Araştırma gereklerinin yerine getirilmediği düşünüldüğü durumda hekiminiz sizin izniniz olmadan sizi araştırmadan çıkarabilir.

Ancak araştırma dışı bırakılmanız durumunda da, sizinle ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla kullanılabilir.

17. ARAŞTIRMADA UYGULANACAK TEDAVİ DIŞINDAKİ DİĞER TEDAVİLER

Yoktur.

18. ARAŞTIRMAYA KATILMAYI REDDETME VEYA AYRILMA DURUMU

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; araştırmada yer almayı reddetmeniz veya katıldıktan sonra vazgeçmeniz halinde de kararınız size uygulanan tedavide herhangi bir değişikliğe neden olmayacaktır.

Araştırmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda da, sizle ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla kullanılabilir.

19. YENİ BİLGİLERİN PAYLAŞILMASI VE ARAŞTIRMANIN DURDURULMASI

Araştırma sürerken, araştırmayla ilgili olumlu veya olumsuz yeni tıbbi bilgi ve sonuçlar en kısa sürede size veya yasal temsilcinize iletilecektir. Bu sonuçlar sizin araştırmaya devam etme isteğinizi etkileyebilir. Bu durumda karar verene kadar araştırmanın durdurulmasını isteyebilirsiniz.

(Katılımcının/Hastanın/Anne-Baba/Yasal Temsilcinin Beyanı)

Sayın Prof. Dr. Bilkay Baştürk tarafından Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Bilim Dalları'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana gerekli güvence verildi.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca, tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim anlatıldı.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımuma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

3

Ek-2.(devam) Sağlıklı gönüllü onam formu

ARAŞTIRMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 4 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Araştırmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopması bana verildi.

GÖNÜLLÜ		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		
<i>TARİH</i>		

VASİ (Varsa)		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		
<i>TARİH</i>		

ARAŞTIRMACI		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM ve GÖREVİ</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		
<i>TARİH</i>		

ONAM ALMA İŞİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİ		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM ve GÖREVİ</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		
<i>TARİH</i>		

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

4

Ek-3. Hasta gönüllü onam formu

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bilimsel araştırma amaçlı klinik bir çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini tam olarak anlamanız ve kararınızı, araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra özgürce vermeniz gerekmektedir. Bu bilgilendirme formu söz konusu araştırmayı ayrıntılı olarak tanıtmak amacıyla size özel olarak hazırlanmıştır. Lütfen bu formu dikkatlice okuyunuz. Araştırma ile ilgili olarak bu formda belirtildiği halde anlayamadığınız ya da belirtilemediğini fark ettiğiniz noktalar olursa hekiminize sorunuz ve sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım **gönüllülük** esasına dayalıdır. Araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra, kararınızı özgürce verebilmeniz ve düşünmeniz için formu imzalamadan önce hekiminiz size zaman tanıyacaktır. Kararınız ne olursa olsun, hekimleriniz sizin tam sağlık halinizin sağlanmasına ve korunmasına yönelik görevlerini bundan sonra da eksiksiz yapacaklardır. Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde formu imzalayınız.

1. ARAŞTIRMANIN ADI

Böbrek nakli olan hastalarda organ reddinde AT1R sitokin gen polimorfizm ilişkisinin araştırılması

2. GÖNÜLLÜ SAYISI

Bu araştırmada yer alması öngörülen toplam gönüllü sayısı 50 sağlıklı kontrol olmak üzere 150 dir.

3. ARAŞTIRMAYA KATILIM SÜRESİ

Bu araştırmaya katılım süreniz böbrek nakli yapılmadan önce, nakliniz yapıldıktan sonra 7. günde, nakil sonrası 1. Ay kontrolünüzde, eğer hekiminiz gerek görürse ve nakil sonrası vücudun böbreği kabul etmediği saptanırsa olmak üzere toplam 5 kez sizden alınacak kan örneği vermeniz ile tamamlanacaktır.

4. ARAŞTIRMANIN AMACI

Bu çalışmayla böbrek nakli yapılan hastalarda organ reddi ile ilişkili bağışıklık sistemi parametrelerinin araştırılması yapılacaktır.

5. ARAŞTIRMAYA KATILMA KOŞULLARI

Bu araştırmaya dâhil edilebilmeniz için gereken koşullar şunlardır:

1. Nakil sonrası takiplerinizin merkezimizde yapılması

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tamık

1

Ek-3. (devam) Hasta gönüllü onam formu

2. Nakil sonrası herhangi bir kanser hastalığınızın belirlenmemiş olması,
3. Zihinsel ve kognitif bozukluğunuzun olmaması.

6. ARAŞTIRMANIN YÖNTEMİ

Bu araştırmada sizden alınacak 2 tüp kan örneği ile immünolojik (bağışıklık) parametreleriniz çalışılacaktır.

7. GÖNÜLLÜĞÜN SORUMLULUKLARI

1. Kan alma sırasında herhangi bir şekilde fenalık hissedilmesi durumunda ilgili doktora danışmalısınız,
2. Kan alındıktan sonra uyulması gereken bir program bulunmamaktadır.
3. Nakil sırasında ve sonrasında doktorunuzun uygulamakta olduğu tedaviyi doktorunuzun haberi olmadan bırakmamanız, değiştirmemeniz ve aksatmamanız çalışmanın doğru sonuç vermesi açısından önemlidir.

8. ARAŞTIRMADAN BEKLENEN OLASI YARARLAR

Bu araştırma, neden bazı nakillerde organ reddi olurken bazılarında olmadığı konusuna ışık tutacaktır. Araştırmamız yalnızca bilimsel amaçlı olup çocuğunuzun doğrudan yarar görmesi ya da tedavisinin seyrini değiştirmesi beklenmemektedir. Ancak, bu araştırmadan elde edilen sonuçlar çocuğunuz gibi tanı almış diğer hastaların tedavisinin planlanmasına katkı sağlayacaktır.

9. ARAŞTIRMADAN KAYNAKLANABİLECEK OLASI RİSKLER

Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında acı-ağrı duyma, nadiren bayılma, morarma, nadiren iğnenin giriş yerinde enfeksiyon, pıhtılaşma veya kanamanın uzaması çok nadiren de olsa bulunmaktadır. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

10. ARAŞTIRMADAN KAYNAKLANABİLECEK HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK / SORUMLULUK DURUMU

Yoktur

11. ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLARDA ARANACAK KİŞİ

Uygulama süresince, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da araştırma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki veya diğer rahatsızlıklarınız için herhangi bir saatte adresi ve telefonu aşağıda belirtilen ilgili hekime ulaşabilirsiniz.

İstedığınızde Günü 24 Saati Ulaşılabilecek Hekimin Adres ve Telefonları:

Prof.Dr. Bilkay Baştürk

İş: 0 322 3272727 (2025)

12. GİDERLERİN KARŞILANMASI VE ÖDEMELER

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

2

Ek-3. (devam) Hasta gönüllü onam formu

Bu araştırmaya katılmanız için veya araştırmadan kaynaklanabilecek giderler için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Hastalığınızın gerektirdiği tetkiklere ilave olarak yapılacak her türlü tetkik ve diğer araştırma giderleri size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kuruma ödetilmeyecektir.

13. ARAŞTIRMAYI DESTEKLEYEN KURUM

Destek için herhangi bir kuruma başvurulmayacaktır.

14. GÖNÜLLÜYE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILIP YAPILMAYACAĞI

Bu araştırmaya katılmanızla, araştırma ile ilgili çıkabilecek zorunlu masraflar tarafımızdan karşılanacaktır. Bunun dışında size veya yasal temsilcilerinize herhangi bir maddi katkı sağlanmayacaktır.

15. BİLGİLERİN GİZLİLİĞİ

Araştırma süresince elde edilen sizinle ilgili tıbbi bilgiler size özel bir kod numarası ile kaydedilecektir. Size ait her türlü tıbbi bilgi gizli tutulacaktır. Araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçla kullanılacaktır. Araştırma yayınlanırsa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir. Ancak, gerektiğinde araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar tıbbi bilgilerinize ulaşabilecektir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabileceksiniz.

16. ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILMA KOŞULLARI

Uygulanan tedavinin hekimin bilgisi olmadan kesilmesi, aksatılması veya değiştirilmesi, maling (kanser) hastalığı tespit edilmesi durumunda hekiminiz sizin izniniz olmadan sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durum size uygulanan tedavide herhangi bir değişikliğe neden olmayacaktır.

Ancak araştırma dışı bırakılmanız durumunda da, sizinle ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla kullanılabilir.

17. ARAŞTIRMADA UYGULANACAK TEDAVİ DIŞINDAKİ DİĞER TEDAVİLER

Yoktur

18. ARAŞTIRMAYA KATILMAYI REDDETME VEYA AYRILMA DURUMU

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; araştırmada yer almayı reddetmeniz veya katıldıktan sonra vazgeçmeniz halinde de kararınız size uygulanan tedavide herhangi bir değişikliğe neden olmayacaktır.

Araştırmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda da, sizle ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla kullanılabilir.

19. YENİ BİLGİLERİN PAYLAŞILMASI VE ARAŞTIRMANIN DURDURULMASI

İMZALAR: Gönüllü (varsa) Vasi Araştırmacı Tanık 3

Ek-3. (devam) Hasta gönüllü onam formu

Araştırma sürerken, araştırmayla ilgili olumlu veya olumsuz yeni tıbbi bilgi ve sonuçlar en kısa sürede size veya yasal temsilcinize iletilecektir. Bu sonuçlar sizin araştırmaya devam etme isteğinizi etkileyebilir. Bu durumda karar verene kadar araştırmanın durdurulmasını isteyebilirsiniz.

(Katılımcının/Hastanın/Anne-Baba/Yasal Temsilcinin Beyanı)

Sayın Prof.Dr. Bilkay Baştürk tarafından Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Bilim Dalları'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana gerekli güvence verildi.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca, tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim anlatıldı.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

4

Ek-3. (devam) Hasta gönüllü onam formu

ARAŞTIRMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 6 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Araştırmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜ		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		
<i>TARİH</i>		

VASİ (Varsa)		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		
<i>TARİH</i>		

ARAŞTIRMACI		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM ve GÖREVİ</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		
<i>TARİH</i>		

İMZALAR: Gönüllü

(varsa) Vasi

Araştırmacı

Tanık

5

Ek-3. (devam) Hasta gönüllü onam formu

ONAM ALMA İŞİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİ		İMZASI
<i>İSİM SOYİSİM ve GÖREVİ</i>		
<i>ADRES</i>		
<i>TELEFON</i>		
<i>TARİH</i>		

İMZALAR: Gönüllü (varsa) Vasi Araştırmacı Tanık

Ek-4. Sitokin gen polimorfizm değerlendirme formu

WORKSHEET

Cytokine Genotyping Tray or Primer Pack, Lot 004

Cat. # CYTGEN, PCYTGEN

Name _____ ☐ Patient ☐ Male
☐ Donor ☐ Female

Sample I.D. _____ Race _____ Birthdate _____ ABO/Rh _____

Disease _____ Relationship to Patient _____

TNF-α Results _____
TGF-β1 Results _____
IL-10 Results _____
IL-6 Results _____
IFN-γ Results _____

Tray Exp. Date _____
 Tray Lot # _____
 D-mix Lot #Batch # _____

POSITIONS	TH3H/ SH7H	1G3G/ GG11G	1P3P/ GP11P	1E3E/ EE11E	1O3O/ OO11O	1C3C/ CC11C	1B3B/ BB11B	1A3A/ AA11A	2H4H/ HH12H	2G4G/ GG12G	2F4F/ FF12F	2E4E/ EE12E	2D4D/ DD12D	2C4C/ CC12C	2B4B/ BB12B	2A4A/ AA12A
RESULTS (mark positive locations)																
PRODUCT SIZE (bp)	750	125	125	175	175	125	125	300	300	300	350	250	175	175	250	250
SPECIFICITY *	Neg Ctrl	TNP-α promoter -38A	TNP-α promoter -38G	TGF-β1 codon +GT	TGF-β1 codon +GC	TGF-β1 codon +CG	TGF-β1 codon +GC	IL-10 promoter -105A-81T	IL-10 promoter -105G-4+G	IL-10 promoter -105A-4+G	IL-10 promoter -81T-55A	IL-10 promoter -59C-49G	IL-6 promoter -17AG	IL-6 promoter -17AG	IFN-γ intron 1 +GTAT	IFN-γ intron 1 +GTAA
TNF-α	G/G (low) G/A (high) A/A (high)															
TGF-β1	T/T G/G (high) T/C G/G (high) T/C G/C (intermediate) C/C G/G (intermediate) T/T G/C (intermediate) C/C G/C (low) G/C C/C (low) T/T C/C (low) T/C C/C (low)															
IL-10	GGCACC (high) GCCAAC (intermediate) GCCATA (intermediate) ACCAAC (low) ACCAAT (low) ATAATA (low)															
IL-6	G/G (high) G/C (high) C/C (low)															
IFN-γ	T/T (high) T/A (intermediate) A/A (low)															

* Note: Low, Intermediate and High refer to gene expression levels.

Photo Documentation

Tested by _____

Date _____

Read by _____

Date _____

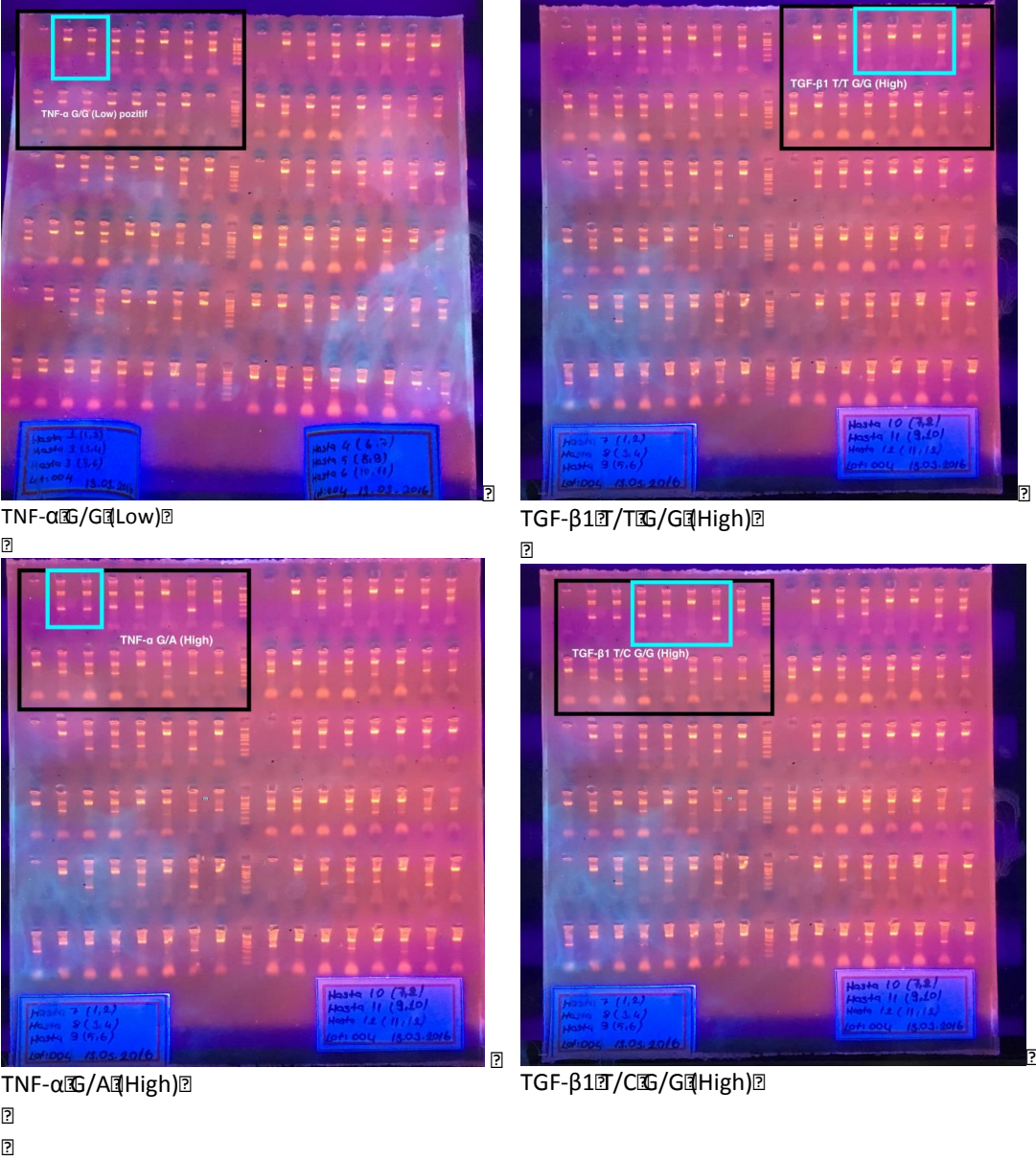
Reviewed by _____

Date _____

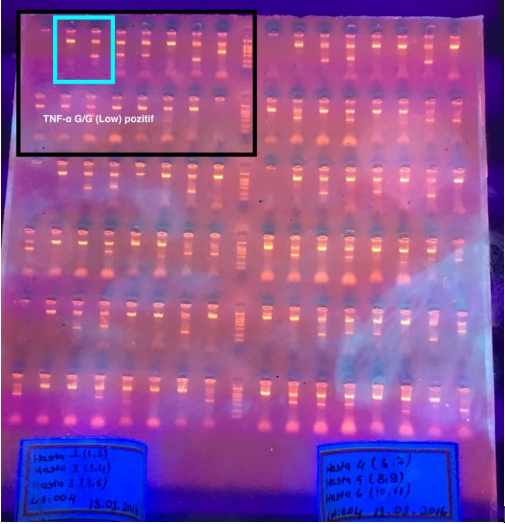
Ek-5. Sitokin gen polimorfizm değerlendirme için hazırlanmış örnek form

[illegible]

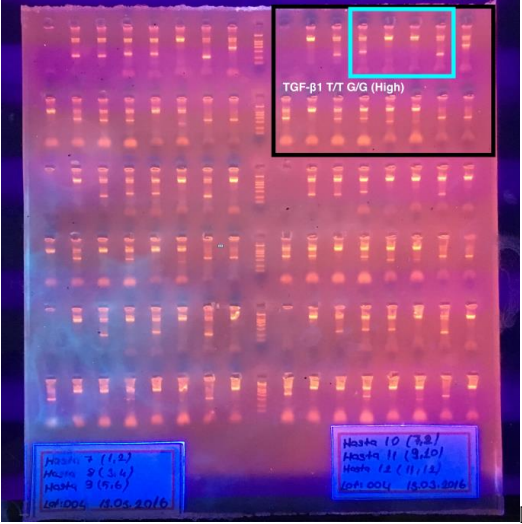
Ek-6. Elektroforez jel görüntülerinde sitokin gen polimorfizm varlığı



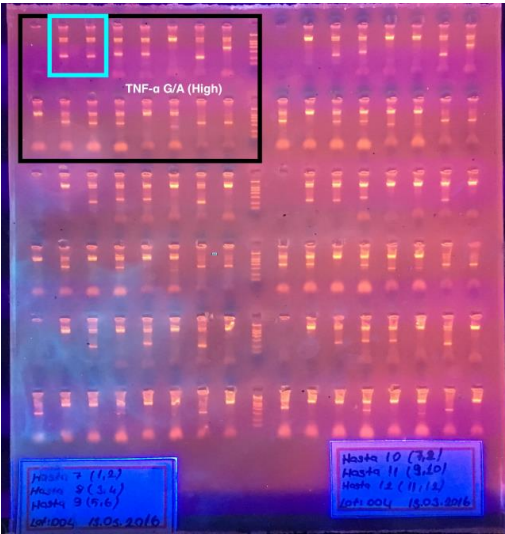
Ek-6. (devam) Elektroforez jel görüntülerinde sitokin gen polimorfizm varlığı



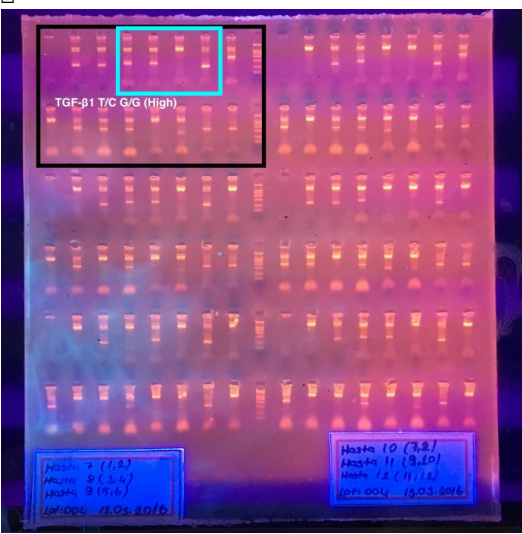
TNF-α G/G (Low) pozitif



TGF-β1 T/T G/G (High)

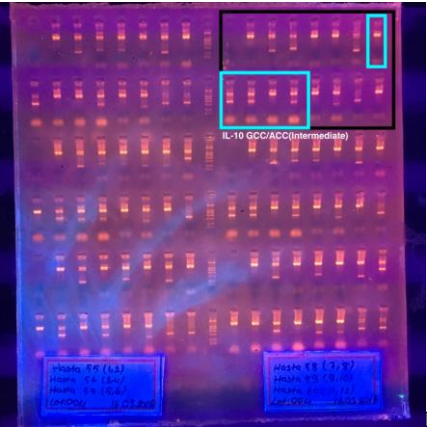


TNF-α G/A (High)

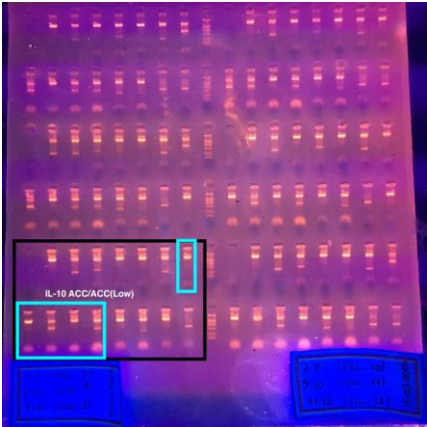


TGF-β1 T/C G/G (High)

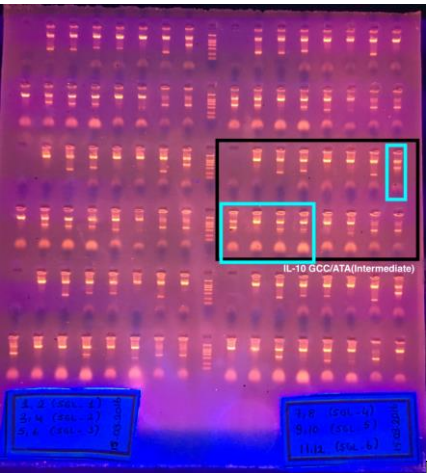
Ek-6. (devam) Elektroforez jel görüntülerinde sitokin gen polimorfizm varlığı



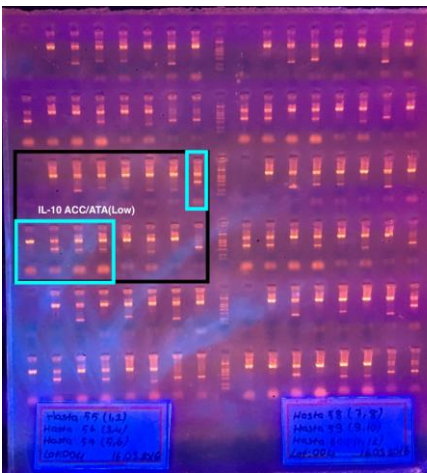
IL-10 GCC/ACC(Intermediate)



IL-10 ACC/ACC(Low)



IL-10 GCC/ATA(Intermediate)



IL-10 ACC/ATA(Low)

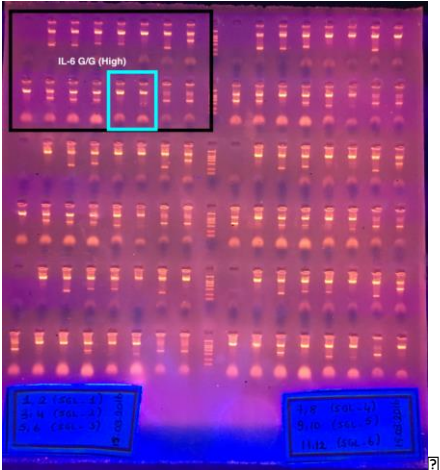
Ek-6. (devam) Elektroforez jel görüntülerinde sitokin gen polimorfizm varlığı



IL-10 ATA/ATA(Low)

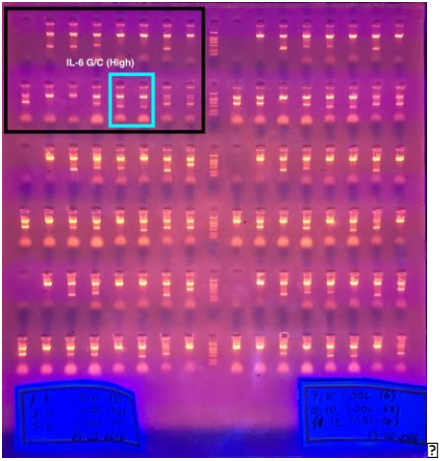
2

2



IL-6 G/G(High)

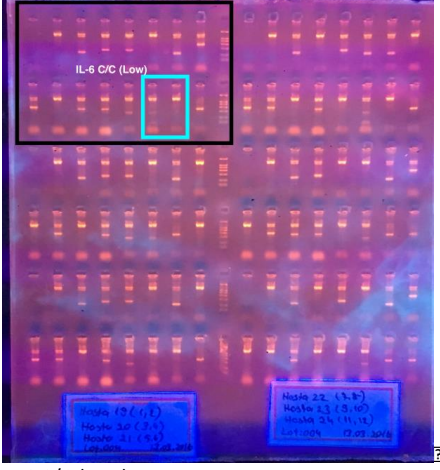
2



IL-6 G/C(High)

2

2



IL-6 C/C(Low)

2

2

Ek-6. (devam) Elektroforez jel görüntülerinde sitokin gen polimorfizm varlığı



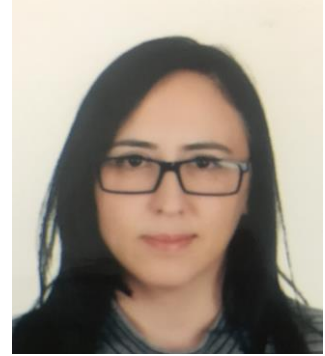
Resim 4-5 SGL 37-42 örneklerinin sitokin gen polimorfizm değerlendirilmesi

SGL 37 TNF- α G/G (Low) TGF- β 1 T/T G/G (High) IL-10 GCC/ACC (Intermediate) IL-6 G/C (High) IFN- γ T/A (Intermediate)	SGL 40 TNF- α G/G (Low) TGF- β 1 T/T G/G (High) IL-10 GCC/ATA (Intermediate) IL-6 G/G (High) IFN- γ T/A (Intermediate)
SGL 38 TNF- α G/G (Low) TGF- β 1 T/T G/G (High) IL-10 GCC/ACC (Intermediate) IL-6 G/C (High) IFN- γ T/A (Intermediate)	SGL 41 TNF- α G/G (Low) TGF- β 1 C/C G/C (Low) IL-10 ACC/ATA (Low) IL-6 G/G (High) IFN- γ T/A (Intermediate)
SGL 39 TNF- α G/A (High) TGF- β 1 T/C G/G (High) IL-10 GCC/ACC (Intermediate) IL-6 G/C (High) IFN- γ T/A (Intermediate)	SGL 42 TNF- α G/G (Low) TGF- β 1 T/C G/G (High) IL-10 ATA/ATA (Low) IL-6 G/C (High) IFN- γ T/A (Low)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Yantır, Emel
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 11.01.1975/ Eskişehir
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 05535856842
 e-mail : dremelyntr@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü / İmmünoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans /Yüksek Lisans:	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi/ Tıp Fakültesi	1998
Lise	Eskişehir Atatürk Lisesi	1992

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-	Halen Eskişehir Acıbadem Hastanesi	Hekim
2013–2015	Eskişehir Özel Sakarya Hastanesi	Hekim
2011–2013	Eskişehir Acıbadem Hastanesi	Hekim
2002–2011	Ankara LÖSEV-LÖSANTE Hastanesi	Hekim
1999–2000	Sağlık Bakanlığı Bilecik Küplü ve İstasyon Sağlık Ocağı	Hekim

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

- 1.Çitak, Funda Erkasar; Ezer, Üstün; Akkaya, Emel; Özbülül Nilgün; Bahçe, Muhterem; Kürekçi, Ahmet Emin, All-trans-retinoic acid induced myositis in a child with acute promyelocytic leukemia, 2006, ***Haematologica- The Hematology Journal***.
- 2.Citak, Funda Erkasar; Citak, Elvan Caglar; Akkaya, Emel; Kosan, Bekir; Ezer, Ustun; Kurekci, Ahmet Emin, Minor Anomalies in Children With Hematological Malignancies, 2011, ***Pediatric Blood&Cancer***
- 3.Akın, Dilara Fatma; Akkaya, Emel; Kurekci, A. Emin; Arslan, Çiğdem; Ezer, Ustun; Akar, Nejat, A Novel Homozygous Nucleotide Deletion in the JAK2 Gene in a Pediatric Patient with B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia, 2012, ***Turkish Journal of Hematology***

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

- 4.Kapiller elektroforez yöntemi ile evlilik öncesi taramalardaki hemoglobinopati sıklığı *Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2008
- 5.Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda ALL-BFM 95 Protokolü Tedavi Sonuçlarımız, Tek merkez Deneyimi, 40. *Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2014
- 6.Lösemili çocuklarda santral venöz kateter kolonizasyonunun önlenmesinde sefazolinin yeri var mı?, XXXII. *Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2006
- 7.Proptozis ile gelen relaps akut lenfoblastik lösemi- olgu sunumu, XXXII. *Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2006
- 8.Akut lenfoblastik lösemi tedavisinde yalancı ketonüri nedeni olarak MESNA, XXXII. *Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2006
- 9.Minor anomalies in children with hematological malignancies, XXXth *World Congress of the International Society of Hematology*, 2005
- 10.Recombinant activated factor VII for severe gastrointestinal bleeding after chemotherapy in children with leukemia, XXXth *World Congress of the International Society of Hematology*, 2005
- 11.Monosomy X as the sole cytogenetic abnormality in a child with acute lymphoblastic leukemia, XXXth *World Congress of the International Society of Hematology*, 2005
- 12.Complications of right atrial catheters in children with hematologic malignancy, XXXth *World Congress of the International Society of Hematology*, 2005

- 13.Oral glutamine supplements in the prevention of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity in children with hematologic malignancy, *XXXth World Congress of the International Society of Hematology*, 2005
- 14.All-Trans retinoic acid-induced myositis in a child with acute promyelocytic leukemia, *XXXth World Congress of the International Society of Hematology*, 2005
- 15.Akut Promyelositik Lösemili Çocuklarda Tedavi Sonuçlarımız, *XXXIII. Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2007
- 16.Akut Promyelositik Lösemili bir çocukta ALL-Trans Retinoik Asit kullanımına bağlı miyozit: Bir olgu sunumu, *XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2004
- 17.Lösemili çocuklarda yaşamı tehdit eden gastrointestinal sistem kanamalarının rekombinant faktör VIIa ile tedavisi, *XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2004
- 18.Hematolojik maligniteli çocuklarda saptanan minör konjenital anomaliler, *XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2004
- 19.Streptococcus mitis sepsismisi ve amorozis ile seyreden lösemili olgu, *35. Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2009
- 20.Nephromegaly in children with acute lymphoblastic leukemia, *International Society of Pediatric Oncology*, 2008
- 21.False positive ketonuria in children with acute lymphoblastic leukemia receiving, *International Society of Pediatric Oncology*, 2008
- 22.Akut lenfoblastik lösemili çocuk hastalarda nefromegali sıklığı, *7. Ulusal Pediatrik Hematoloji Kongresi*, 2009
- 23.İnme benzeri bulgularla seyreden toksik lökoensefalopatili akut lenfoblastik lösemili bir olgu, *7. Ulusal Pediatrik Hematoloji Kongresi*, 2009
- 24.Lösemili çocuklarda hemolitik olmayan erken transfüzyon reaksiyonlarının değerlendirilmesi, *3. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi*, 2010
- 25.Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten E. coli prevalansı ve antibiyotik duyarlılıkları: Tek merkez deneyimi, *9. Febril Nötropeni Sempozyumu*, 2010
- 26.Bir Olgu Nedeni İle Kranial Radyoterapi Sonrası Akut Parotitis, *34. Ulusal Hematoloji Kongresi*, 2008
- 27.Evaluation of the Cytokine Gene Polymorphisms on Rejection in Kidney Transplantation, *3. Uluslararası Moleküler İmmünoloji ve İmmünogenetik Kongresi (MIMIC-III)*, 27-30 Nisan 2016
- 28.Investigating the Effects of AT1R on Organ Rejection in Patients with Kidney Transplantation, *3. Uluslararası Moleküler İmmünoloji ve İmmünogenetik Kongresi (MIMIC-III)*, 27-30 Nisan 2016

29.Pretransplant Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies Are Risk Factor For Rejection In Adult But Not In Pediatric Patients. *15th Congress of the Middle East Society for Organ Transplantation (MESOT)*, ÜRDÜN-AMMAN; 21-24 Eylül 2016

Hobiler

Kitap okuma, müzik dinleme



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR