

T.C.

İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BÖBREK TRANSPLANTASYONU SONRASINDA IL-2 SİTOKİN
GEN PROFİLİNİN İNCELENMESİ

Hatice İlayhan KARAHAAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ

İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN

2018 - İZMİR

Hatice İlayhan KARAHAAN

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2018

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BÖBREK TRANSPLANTASYONU SONRASINDA IL-2 SİTOKİN
GEN PROFİLİNİN İNCELENMESİ

Hatice İlayhan KARAHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ

İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN

Bu tez İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2017-TYL-SABE-0046 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2018 - İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/09/2018

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. İbrahim PİRİM İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye:

Dr. Öğr. Üyesi Ergün METE Pamukkale Üniversitesi

ONAY: Bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

(İMZA)

(Ünvanı, Adı Soyadı)

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ahmet KOYU

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.
(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)
- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)
- Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.
- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

03/09/2018

İmza

Hatice İlayhan KARAHAN

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ ve İkinci Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

03/09/2018

İmza

Hatice İlayhan KARAHAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans bitirme tezimin başından sonuna kadar benden desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanlarım Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ ve Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans çalışmalarımda bilgi birikimleri ile sağladıkları destekler için Prof. Dr. İbrahim PİRİM ve Doç. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Başta arkadaşlarım Aslı ELDEM ve Sinem TOPÇU olmak üzere, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı çalışanları ve öğrencilerine her türlü yardımlarını esirgemedikleri için minnet duymaktayım. Bozyaka Eğitim ve Araştırma hastanesi Organ Nakli birimindeki Doç. Dr. Erhan TATAR ve Prof. Dr. Adam USLU hocalarıma, örneklerimi toplamamda yardımcı olan tüm ekibe teşekkürlerimi iletiyorum. Tezimi değerlendiren sayın hocalarıma da teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışması İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje Koordinatörlüğünce (İKÇÜ BAP) öncelikli alan projeleri kapsamında desteklenen 'İmmün Yanıtta Rol Alan Sitokin Genleri (Inf Gamma, IL-17, IL-4, IL-2) Metilasyon Profillerinin Ve Ekspresyonlarının Transplantasyon Öncesi Ve Sonrası Araştırılması' başlıklı 2017-ÖNAP-TIPF-0001 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür. Ayrıca İKÇÜ BAP tarafından yüksek lisans tezi desteği verilmiştir. Çalışmamı destekleyen kurumlara desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte maddi-manevi tüm yardımlarını esirgemedikleri ve yanımda oldukları için başta değerli ailem annem İlknur KARAHAN, babam İzzet KARAHAN, kardeşim İlterhan KARAHAN'a ve nişanlım Furkan Ozan ÇÖVEN olmak üzere, yakınlarım ve arkadaşlarıma da minnetlerimi sunuyorum.

ÖZET

BÖBREK TRANSPLANTASYONU SONRASINDA IL-2 SİTOKİN GEN PROFİLİNİN İNCELENMESİ

Karahan, Hatice İlayhan

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
İzmir, 2018

Giriş ve Amaç: Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY) böbreğin işlevini kaybederek fonksiyonlarını yerine getirememesidir. Organ nakli ile tedavi edilmeye çalışılan KBY hastalarındaki en önemli sorun hastanın tedaviye verecekleri yanıtları önceden tahmin edememektir. Hastanın immün yanıtı, nakil sonrası böbrek durumunu belirleyen en önemli etkenlerden biridir. Sitokinler, immün yanıtta rol alan hücrelerin aktivasyonlarına yön veren araçlardır. CD4+ T hücreleri antijen sunan hücreler (APC) tarafından uyarıldıktan sonra IL-2 sitokini salgılayarak yardımcı T hücre immün yanıtının oluşmasını sağlarlar. Bu immün yanıtın organ reddine neden olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada; nakil sonrası hastaların nakil öncesine göre IL-2 ekspresyon seviyesinin organ reddi ile olası ilişkisinin incelenmesi amaçlandı.

Yöntemler: KBY tanısı konulmuş 21 hastadan nakil öncesinde ve nakil sonrasında 6.ayda alınan periferik kan örneklerinden lenfosit hücreleri izole edildi. Lenfosit hücrelerinden manyetik hücre ayırılma yöntemi ile CD4+T hücreleri ayrıldı. Ayrılmış bu hücrelerin saflık oranı akım sitometri yöntemi ile kontrol edildi. CD4+ T hücrelerinden total RNA izolasyonu sonrasında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile IL-2 ekspresyon seviyelerine bakıldı.

Bulgular: Rejeksiyon olmayan hastalar arasında, 12 hastada IL-2 ekspresyon seviyesinin azaldığı bu hastalardan örnek 3, 5 ve 15'teki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) görüldü. 5 hastada IL-2 ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenirken örnek 18'de ki artışın anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Rejeksiyon görülen 3 hastada ise IL-2 ekspresyon seviyesi artış gösterdi, örnek 13 ve 21'de bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

Sonuç: Hasta özelinde değerlendirilme yapıldığında böbrek nakli sonrasında CD4+ T hücrelerinde IL-2 ekspresyon seviyeleri ile organ reddi arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir. Hastaların klinik verileri ve uygulanan immün supresif tedavileri de gözönüne alınarak immün cevapta çok önemli rolleri olan sitokinlerin nakil sonrası değerlendirilmesinin önemli olacağı kanaatindeyiz. Hasta sayısının arttırılması ve sık aralıklarla örnek çalışılması ile daha anlamlı veriler elde edilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik böbrek yetmezliği, böbrek nakli, rejeksiyon, sitokin, IL-2

ABSTRACT

INVESTIGATION OF IL-2 CYTOKINE GENE PROFILE AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Karahan, Hatice İlayhan

**MSc in Medical Biology and Genetic
Izmir, 2018**

Introduction and purpose: Chronic Kidney Failure (CKF) is a disease that the kidney is not able to perform its functions. The most important problem in CKF patients is the unpredictability of the immune response after kidney transplant. The immune response of the patient is one of the most important factors determining post-transplant kidney status. Cytokines are mediators that direct the activation of cells involved in the immune response. After being stimulated by antigen presenting cells (APC), CD4+ T cells provide the T helper response by secreting IL-2 cytokines. This immunological response may cause organ rejection. In this study; it was aimed to investigate the possible association of IL-2 expression level with organ rejection after transplantation.

Methods: Lymphocyte cells were isolated from peripheral blood samples taken from 21 CKF diagnosed-patients prior to transplantation and post-transplantation at the 6th month. CD4+ T cells are separated from lymphocyte cells by magnetic cell sorting method. The purity of these cells was controlled by flow cytometry. After total RNA isolation from CD4+ T cells, IL-2 were examined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

Results: Among non-rejection patients, the level of IL-2 expression decreased in 12 patients. The decreases in samples 3, 5 and 15 were statistically significant ($p<0.05$). Increase in the level of IL-2 expression was observed in 5 patients, whereas the increase in sample 18 was significant ($p<0.05$). IL-2 expression level was also increased in the 3 patients who rejected the graft and this increase was statistically significant in the samples 13 and 21 ($p<0.05$).

Conclusion: When the patients were individually evaluated, it was observed that there might be a relationship between IL-2 expression levels in CD4 + T cells and rejection after kidney transplantation. The clinical data of the patients and the immunosuppressive therapies and post-transplant evaluation of cytokines which is important in the immune response should be considered. Increasing the number of samples at certain intervals may give more meaningful results.

Key words: Chronic renal failure, renal transplantation, rejection, cytokine, IL-2

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	i
Yayımlama ve Fikri Mülkiyet Hakları Beyanı	ii
Etik Beyan	iii
Teşekkür	iv
Özet	v
Abstract	vii
İçindekiler	ix
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	xi
Şekiller Dizini	xiv
Tablolar Dizini	xv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Böbrek Yetmezliği ve Nakli	2
2.2. Ökaryot Gen İfadesinin Düzenlenmesi	3
2.3. Büyük Histokompatibilite Kompleksi (MHC)- T ve B Hücreleri	6
2.3.1. CD4+ T Hücreleri	7
2.4. Sitokin	7
2.4.1. İnterlökin 2 (IL-2)	8
2.5. IL-2 Sitokini ve Organ Nakli İlişkisi	11
3.GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Araştırmanın Tipi	13
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	13
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	13
3.4. Çalışma Materyali	13
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	13
3.6. Veri Toplama Araçları	14

3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	14
3.6.2. Deneysel Çalışmalar	15
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	21
3.8. İstatiksel Analiz	22
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	22
3.10. Etik Kurul Onayı	22
4.BULGULAR	23
4.1. Çalışmada Yer Alan Hastaların Demografik Bilgileri	23
4.2. Hastaların Laboratuvar Verileri	24
4.3. Böbrek Hastalarında Nakil Öncesi-Sonrası IL-2 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	26
4.3.1. Hasta Örneklerinden CD4+ T Hücre İzolasyonu	26
4.3.2. Hasta Örneklerinden Total RNA İzolasyonu	27
4.3.3. Hasta Örneklerinde IL-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri	27
5.TARTIŞMA	32
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38
EKLER	
Ek1	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
≈	Yaklaşık değer
%	Yüzde
A	Adenin
APC	Antijen sunan hücre
BAP	Bilimsel araştırma projesi
BSA	Bıvin (sığır) serum albümin
C	Sitozin
Ca	Kalsiyum
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CK	Kreatin kinaz
Ct	Döngü eşiği
dk	Dakika
dL	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik asit
ERK	Hücre dışı sinyal düzenleyen protein kinaz
FITC	Floresan izotiyosiyanat
G	Guanin
g	Yerçekimi kuvveti
g	Gram
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
IL	İnterlökin
iTREG	Düzenleyici hücreler

Jak	Janus kinazlar
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LYM	Lenfosit
m ²	Metrekare
MACS	Manyetik hücre ayırlama yöntemi
MAPK	Mitojen aktif protein kinaz
mg	Miligram
MHC	Büyük histokompatibilite kompleksi
ml	Mililitre
mL	Mikrolitre
mm ³	Milimetreküp
mmol	Milimol
mM	Mikromol
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
Na	Sodyum
NCBI	Biyoteknolojik bilgi için ulusal merkez
ng	Nanogram
NK hücreleri	Doğal öldürücü hücreler
P	Fosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PBS	Fosfat tuz tamponu
perCP	Peridinin klorofil-II protein
pg	Pikogram
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PTH	Parathormon

PerCP	Peridinin chlorophyll protein
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PCR	Gerçek zamanlı
STAT	Ainyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü
T	Timin
TAC	T hücre aktivasyonu
Tfh	Uyarılmış T hücresi
tGFH	Glomerüler filtrasyon hızı
Th	Yardımcı T hücreleri
Tr	Düzenleyici tip
Treg	Düzenleyici T
tRNA	Tranfer Rna
Tyk2	Tirozin kinaz 2
U/L	Dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı
WBC	Beyaz kan hücresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Ökaryotik gen regülasyonu.	4
Şekil 2: Sitokin ekspresyonu ve hücrelere etkisi.	8
Şekil 3: IL-2 sitokin Jak/STAT sinyal yolağı.	10
Şekil 4: IL-2 ekspresyonu ve organ nakli ilişkisi.	12
Şekil 5: Çalışma akış şeması.	15
Şekil 6: MACS ile ayrımlanan CD4+ T hücrelerinin saflığının akım sitometrisi ile kontrol edilmesi.	26
Şekil 7: RT-PCR’da IL-2 genine ait amplifikasyon eğrileri.	27
Şekil 8: Nakil sonrasında hastaların, nakil öncesine göre IL-2 ekspresyon değişimleri.	29

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	14
Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazlar	15
Tablo 3: cDNA reaksiyon içeriği.	19
Tablo 4: cDNA dönüşüm reaksiyon ısı profili.	20
Tablo 5: RT-PCR reaksiyon içeriği.	20
Tablo 6: RT-PCR için ısı profili.	21
Tablo 7: Araştırma zaman çizelgesi.	21
Tablo 8: Hastaların ve donörlerin demografik bilgileri.....	23
Tablo 9: Hastaların klinik verilerinin değerlendirilmesi.	24
Tablo 10: IL-2 sitokin geni RT-PCR analiz sonuçları	28
Tablo 11: Hasta-donör doku uyumuna göre ekspresyon düzeylerindeki değişim.....	29
Tablo 12: IL-2 gen ekspresyonu değişimi ve rejeksiyon ilişkisi	30
Tablo 13: Çalışma verilerinin rejeksiyon ile ilişkilendirilmesi	30

1.GİRİŞ

Böbreğin temel fonksiyonlarının bozulması böbrek yetmezliğine sebep olmaktadır. Kronik böbrek yetmezliği (KBY), çeşitli hastalıklara bağlı olarak gelişen sürekli ilerleyen ve geri dönüşümsüz olarak hasara sebep olan nefrolojik bir sendromdur. KBY tedavisinde en geçerli yöntem böbrek naklidir. Nakil başarılı bir şekilde gerçekleşse dahi sonrasında oluşan komplikasyonların nedenleri tam olarak bilinmemektedir ve organ reddine sebep olabilmektedir.

Lenfosit hücre popülasyon grubundan biri olan T hücreleri trasnplantasyonda immün yanıtın oluşmasını sağlar. Sitokinler lenfosit akivasyonunu ve farklılaşmasını düzenler. Aktif hale getirildikten ve farklı efektör alt tiplerine ayrıldıktan sonra CD4+ T hücreleri, spesifik sitokinler aracılığıyla bağışıklık yanıtına aracılık etmede önemli bir rol oynar.

Gen fonksiyonları üzerinde birçok faktör etkilidir. Nakil sonrası dönemde yaş, cinsiyet, beslenme, spor vb. gibi çevresel faktörlerin genetik modifikasyon yoluyla organ reddine etkisi belirsizliğini korumaktadır. İnterlökin (IL-2), CD4+ T hücreleri tarafından üretilen immün yanıtta önemli rol oynayan sitokin moleküllerinden biridir. IL-2 sitokin seviyesinin belirlenmesinin nakil sonrasındaki immün yanıtın aydınlatılmasında rol oynayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle hipotezimiz; nakil sonrasındaki dönemde IL-2 gen ekspresyonu artışının organ reddinde etkili olduğu yönündedir. Nakil sonrası dönemde hastaların IL-2 gen ekspresyon seviyesinin takibinin yapılmasının, reddin önceden anlaşılacak uygun tedavi seçimine yardımcı olabileceği görüşündeyiz.

Çalışmamızda immün yanıtta rol alan sitokin IL-2 geninin ekspresyon düzeyi nakil öncesi ve sonrası analiz edilerek karşılaştırıldı. Bu amaçla hastaların periferik kanından lenfosit izolasyonu yapılarak, manyetik hücre ayırılma yöntemi ile CD4+ T hücreleri ayrımlandı. Elde edilen CD4+ T hücrelerinin saflığı akım sitometrisi ile kontrol edildi. CD4+ T hücrelerinden elde edilen total RNA örnekleri ile gen ifadesinin belirlenmesi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yapılarak IL-2 ekspresyon düzeyi belirlendi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Yetmezliği ve Nakli

Böbrekler, yaşamın devamı için önemli fonksiyonlara sahip olan organlardır. Normal şartlarda insanlarda omurganın iki yanında, karın organlarının arkasında ve göğüs kafesinin altında konumlanmış iki adet böbrek bulunur. Böbreklerin normal anatomisi fasulyeye benzer (1). Atık maddeleri fizyolojik süreçte uzaklaştırmak için kanın filtrelenmesi, atığın vücuttan idrar olarak atılması ve gerektiğinde su ve kimyasalların vücuda geri gönderilerek elektrolit dengesinin sağlanması, çeşitli hormonlarla kan basıncının düzenlenmesi fonksiyonlarını yerine getirir. İdrar, üreterler vasıtasıyla mesaneye taşınır ve burada depolanır. Vücut, mesanenin dolduğunu hissettiğinde idrar üretra yoluyla mesaneden atılır (1,2).

Böbrek hastalığının genel nedenleri arasında şeker hastalığı, yüksek tansiyon, glomerülonefrit, polikistik böbrek, idrar yollarındaki anatomik sorunlar gösterilebilir. Böbrekler düzgün gerçekleşen bu fonksiyonlarını yerine getirmezlerse böbrek yetmezliği meydana gelir. Böbrek yetmezliği devam ederse (kronik olarak), vücutta toksik atık ürünlerin birikimi ile böbrek hastalıkları ortaya çıkar. Bu durum, başlangıçta diyaliz daha ileri aşamalarda ise nakil gerektirir. Hemodiyaliz; kanın atık ürünlerden temizlenmesi için gerçekleştirilen mekanik bir işlem iken, peritoneal diyaliz atık ürünlerin karın boşluğundan kimyasal solüsyonlar geçirilerek uzaklaştırılması işlemidir. Böbrek nakli ise, son dönem organ yetmezliğindeki hastaların konforunu arttırmaya yönelik kullanılan bir tedavi yöntemidir (2).

Nakil için böbrekler canlı veya kadavra donörden alınabilir. Nakil için değerlendirme sürecinde özel testler yapılmaktadır. Bu test sonuçları, verici böbreğinin alıcıyla uyumunun değerlendirilmesini sağlar. Değerlendirme sürecinde doku tiplendirmesi yapılarak alıcı ve vericinin doku uyumuna bakılır. Yaşam boyunca vücut, yabancı maddeleri yok etmek için antikor üretir. Bireylerde, enfeksiyon, gebelik, kan nakli ya da böbrek nakli yapılması antikor oluşumunu arttırabilir. Donör böbreğine karşı antikor varsa, vücut böbreği reddedebilir. Bu nedenle, donör bulunduğu anda, alıcının donöre karşı önceden oluşturulmuş antikorları

olup olmadığına bakmak için crossmatch testleri yapılır. Crossmatch, alıcının serumunun donörden alınan hücrelerle inkübe edilmesiyle gerçekleştirilir. Crossmatch pozitif ise, donöre karşı antikor geliştiği anlamına gelir (1,2).

Nakil sonrası dönemde böbrek fonksiyonunun yakından izlenmesi, reddin erken belirtilerinin fark edilmesini, ilaçların dozunun ayarlanmasını ve bağışıklığın baskılanmasına yönelik etkilerin ortadan kaldırılmasını sağlayabilir. Vücut, hastalığa sebep olan bakteri ve virüslere karşı savunma gerçekleştirdiği gibi, nakledilen organı da "kendinden olmayan" şeklinde tanıyıp organa karşı savunmaya geçebilir. Organın reddedilmesi, nakilde beklenen bir yan etkidir. Çoğu reddetme, nakilden altı ay sonra gerçekleşir, ancak herhangi bir zamanda, hatta yıllar sonra ortaya çıkabilir. Önceden müdahale ile çoğu vakada reddin önüne geçilebilir. İmmünsupresif ajanlar olarak da bilinen anti-rejeksiyon ilaçları, reddin önlenmesine ve tedavisine yardımcı olurlar (2).

2.2. Ökaryot Gen İfadesinin Düzenlenmesi

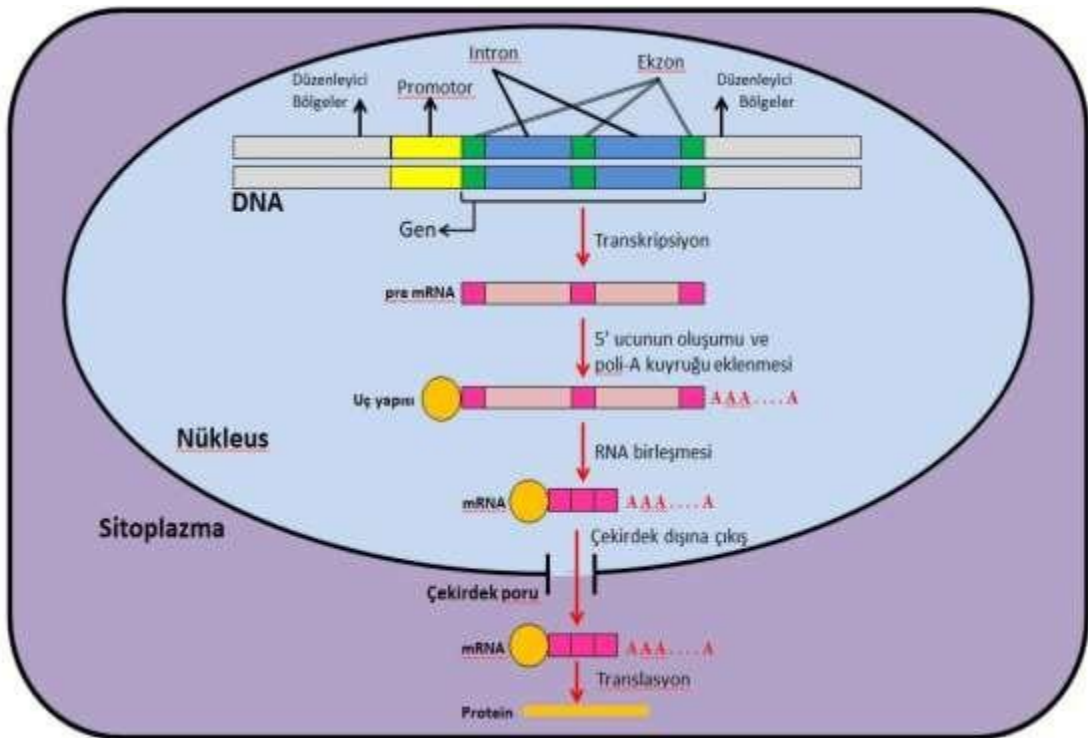
Bakterilerden insanlara kadar olan tüm hücrelerde, genetik bilgiler moleküler biyolojinin santral dogması olarak isimlendirilen temel prensip ile ifade edilir. Santral dogma evrensel kabul edilmesine rağmen, bilginin DNA'dan proteine geçişinde organizmalar arasında önemli farklılıklar vardır (3).

Gen ekspresyonu, tüm organizmalarda genotip-fenotip ilişkisinin düzenlenmesini sağlar (1). Gen ekspresyonunun kontrolü ökaryotlarda bakterilere göre çok daha karmaşıktır. Fakat aynı temel prensipler geçerlidir. Genetik kodlama şeker ve fosfat grupları ve Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Sitozin (C) bazlarıyla oluşturdukları nükleotid dizilerinden oluşmaktadır. DNA baz dizisi genlerin fonksiyonunu belirler. DNA dizisinde bir değişim gen fonksiyonunu etkileyebilir (4). Transkripsiyon ve translasyon, hücrelerin genlerindeki genetik talimatları ifade etmeyi sağlayan araçlardır. Ökaryotik hücrelerdeki RNA transkriptleri, çekirdekten çıkıp proteine çevrimine kadar çekirdek içinde bir dizi işleme maruz kalmaktadır (5).

Ökaryotik genlerin ifadesi transkripsiyonun başlangıç seviyesinde kontrol edilir, bazı durumlarda transkripsiyon sonraki adımlarda tekrar düzenlenebilir.

Bakterilerde olduğu gibi, ökaryotik hücrelerde de transkripsiyon, spesifik regülatör dizilere bağlanan ve RNA polimerazın aktivitesini modüle eden proteinler tarafından kontrol edilir. Çok hücreli organizmaların birçok farklılaşmış hücre tiplerinde gen ekspresyonunu düzenlemesi farklı transkripsiyonel düzenleyici proteinlerin ortak eylemleri ile gerçekleştirilir. Aynı genden birçok özdeş RNA kopyası yapılabilir, her bir RNA molekülü, birçok özdeş protein molekülünün sentezini yönlendirebilir, hücreler gerektiğinde bir genden çok miktarda proteini sentezleyebilir. Ayrıca, DNA'nın kromatin içinde paketlenmesi ve epigenetik modifikasyonlar ökaryotik gen ifadesinin kontrolünün daha kompleks olmasına neden olmaktadır (3,5).

RNA polimeraz transkripsiyonu başlatmak için transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyar. Tüm genler için bazı genel transkripsiyon faktörleri gereklidir. Bazıları TATA kutusu (başlangıç bölgesinin giriş bölgesinde, ≈ 25 baz çifti olan yüksek oranda korunan bir dizi (5')) gibi belirli DNA dizilerine bağlanır. Diğerleri, RNA polimeraz II gibi proteinlere bağlanır. Bu genel transkripsiyon faktörleri genellikle yüksek oranlarda transkripsiyon üretmez ve bu nedenle, aktivatör veya baskılayıcı olarak adlandırılan gene özgü transkripsiyon faktörleri de gereklidir (6).



Şekil 1: Ökaryotik gen regülasyonu (7).

Transkripsiyon, DNA çift sarmalının küçük bir kısmının açılması ile başlar ve DNA dizisi üzerindeki bazlar açığa çıkar. DNA çift sarmalının iki şeridinden biri, RNA molekülünün sentezi için bir şablon işlevi görür. DNA replikasyonunda olduğu gibi, RNA zincirinin nükleotid dizisi, gelen nükleotidler ve DNA arasındaki tamamlayıcı baz eşleştirmesi ile belirlenir. Adenin ile urasil, timin ile adenin, guanin ile sitozin ve sitozin ile guanin eşleşmesi ile meydana gelen ribonükleotid, enzimatik olarak katalize edilen reaksiyonla RNA zincirini oluşturmaya başlar. Transkripsiyon ile üretilen RNA zincirine transkript denir. Bu transkript kalıp olarak kullanılan DNA dizisini tam olarak tamamlayıcı olan bir nükleotid dizisine sahiptir (8).

RNA iplikçığı, DNA kalıp zincirine hidrojen bağ ile bağlı kalmaz. Ribonükleotidlerin eklendiği bölgenin hemen ardından, RNA zinciri yer değiştirir ve DNA sarmalı yeniden oluşur. Böylece, transkripsiyon ile üretilen RNA molekülleri, DNA şablonundan tek iplikçikler halinde salınır. RNA molekülleri DNA'nın belirli bir bölgesinden kopyalandıkları için DNA moleküllerinden daha kısadır. Bir insan kromozomundaki bir DNA molekülü 250 milyon nükleotid çifti uzunluğunda olabilirken RNA, birkaç bin nükleotid uzunluğundadır (5).

Ökaryotlar transkripsiyon için üç farklı, RNA polimeraz kullanırlar (I, II ve III). Her biri farklı bir alt grubunu transkripte eder. Ökaryotik mRNA'lar genellikle monosistroniktir, yani her biri sadece bir polipeptidi kodlar. RNA molekülleri, çekirdekte sitoplazmaya transfer edildikleri ve bir proteine çevrildikleri süre boyunca bozunmadan korunmak için birkaç işlem adımından geçmelidirler. Birincil transkript (aynı zamanda pre-mRNA olarak da adlandırılır), işlenip çekirdeğin dışına aktarılırken bozulmasını önlemek için RNA stabilize edici proteinlerle kaplanır (9).

İlk işlem türü, birincil transkript hala sentezlenirken başlar. Büyüme; transkripsiyonunun 5' ucuna 5' kapak adı verilen özel bir 7-metilguanosa nükleotidi eklenir. Ayrıca protein sentezinde yer alan faktörler, ribozomlar tarafından translasyonun başlatılmasına yardımcı olan kapağı tanır. Uzama tamamlandıktan sonra, başka bir işleme enzimi daha sonra 3' ucuna, poli-A kuyruğu denilen yaklaşık 200 adenin nükleotid dizisi ekler. Bu modifikasyon, mRNA'nın bozulmasını korur ve transkriptin sitoplazmaya aktarılması gereken hücrel faktörlere sinyal verir.

Polipeptitleri kodlayan ökaryotik genler, ekzon ve intronlar olarak adlandırılan dizilerinden oluşur. Intronlara karşılık gelen transkribe RNA dizileri, işlevsel polipeptidin bölgelerini kodlamaz ve işlem sırasında pre-mRNA'dan çıkarılır. Tüm intron dizilerinin protein sentezi öncesi bir pre-mRNA'dan tamamen ve kesin olarak uzaklaştırılması önemlidir. Böylece ekzonla kodlanmış RNA sekansları, fonksiyonel bir polipeptidi kodlamak için uygun şekilde bir araya getirilir. Bir polipeptidi kodlayan mRNA, translasyon için sitoplazmaya hedeflenen çekirdeğin dışına taşınır (7).

Translasyon dört aşamaya ayrılabilir; başlangıç, uzama, sonlanma ve geri döngü. Başlangıç aşamasında, ribozom, peptidil (P) bölgesinde bağlı bir metionil başlatıcı tRNA ile mRNA'da başlatma kodonuna bağlanır. Uzama aşamasında, aminoasil tRNA'ları, kod çözmenin gerçekleştiği alıcı (A) bölgesine girer. Eğer doğru tRNA ise, ribozom bir peptit bağının oluşumunu katalize eder. tRNA'lar ve mRNA, kodon A bölgesine taşınacak şekilde yer değiştirildikten sonra, işlem tekrarlanır. Sonlanma aşaması ise bir durdurma kodonuna rastlandığında ve tamamlanmış peptid, ribozomdan serbest bırakıldığında gerçekleşir. Son aşama olan geri döngüde, ribozomal alt birimler ayrıştırılır, mRNA ve deasile tRNA serbest bırakılır. Başka bir döngü için başlangıç aşaması tekrar kurulur (10).

2.3. Büyük Histokompatibilite Kompleksi (MHC) - T ve B Hücreleri

Büyük histokompatibilite kompleksi (Major histocompatibility complex-MHC) bağışıklık sistemine antijen sunan glikoproteinleri kodlayan sistemdir. MHC sınıf I antijenleri hemen hemen tüm çekirdekli hücrelerde bulunurken, sınıf II antijenleri hücreler tarafından seçici olarak eksprese edilir. Organ reddinin ilk aşaması T hücreleri tarafından alloantijenin tanınmasıdır (11, 12).

T lenfositleri olarak da adlandırılan T hücresi, bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan lökosit tipidir. T hücreleri, B hücresi ile birlikte vücuttaki antijenlere (yabancı maddeler) karşı bağışıklık cevabının özgülüğünü belirler. B lenfositleri, B hücre reseptörünün yabancı antijenlere karşı yüksek afinitesi nedeniyle organ reddinde önemli bir rol oynar. Tamamlayıcı bir epitop ile etkileşime girdikten sonra B hücresi, onun aynı kökenli T hücresi ile iletişim kurar. Direk sinyal ve T hücre

sitokin üretimi, B hücrelerinin plazma hücrelerine ve hafıza hücrelerine olgunlaşmasını, aktivasyonunu ve farklılaşmasını uyarır (13).

2.3.1. CD4+ T Hücreleri

Bağışıklık sisteminin başlıca işlevleri, yabancı antijenlerin yok edilmesi, immünolojik bellek oluşturulması ve antijenlere karşı kendisine tolerans geliştirilmesidir. Hücresel bağışıklığa aracılık eden T-lenfositleri, humoral bağışıklığı yönlendiren B lenfositleri ile birlikte, adaptif immünite sağlar. Doğal bağışıklık sistemi ile yakın işbirliği içerisinde çalışır. B lenfositleri kemik iliğinde kendiliğinden olgunlaşırken, T-lenfositleri timusta olgunlaşır (14).

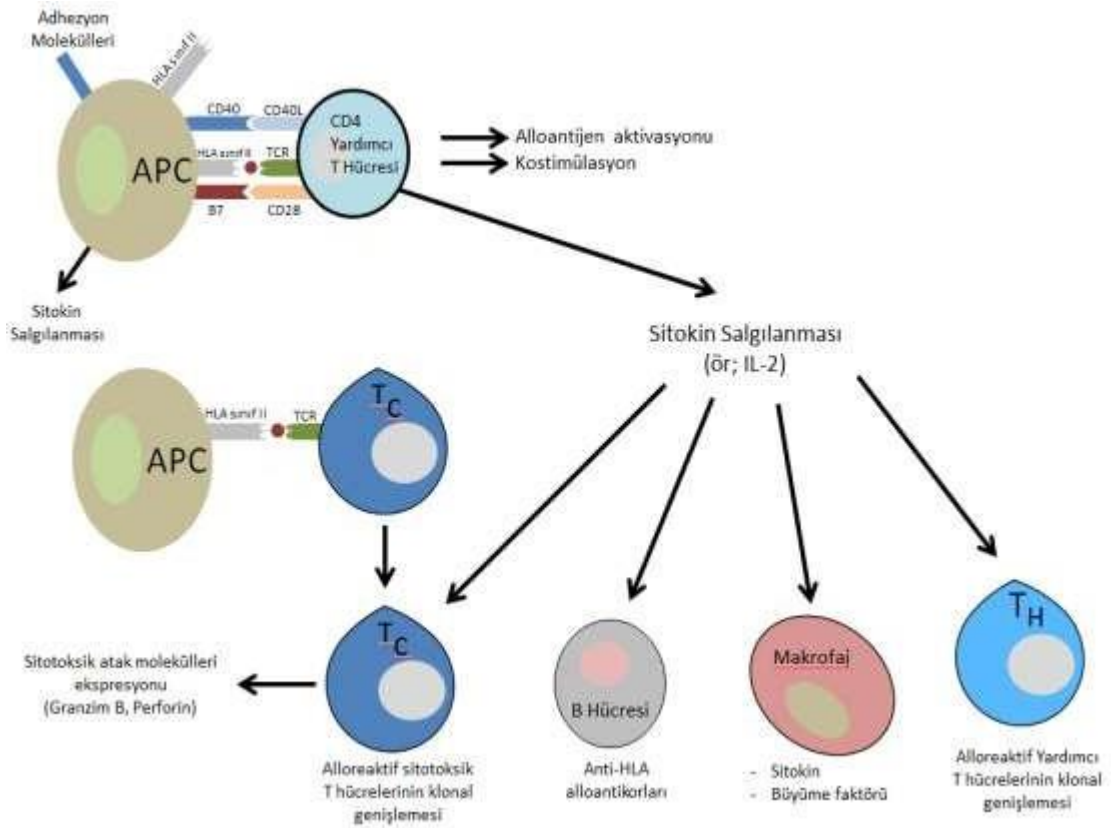
CD4+ T hücreleri CD8+ T hücreleri ile birlikte T-lenfositlerin çoğunu oluşturur. Aktive olduktan ve farklı efektör alt tiplerine ayrıldıktan sonra CD4+ T hücreleri, spesifik sitokinlerin salgılanması yoluyla bağışıklık cevabının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Devam eden çalışmalar, klasik T-yardımcı 1 (Th1) ve T-yardımcı 2 (Th2) hücrelerinin yanı sıra CD4+ hücrelerinin yeni alt gruplarını tanımlamaktadır. Bunlar, T-yardımcı 17 (Th17), folliküler yardımcı T hücresi (Tfh), uyarılmış T düzenleyici hücreler (iTreg) ve düzenleyici tip 1 hücreleri (Tr1) ve potansiyel olarak farklı T yardımcı 9 (Th9) hücrelerdir. Spesifik sitokin sinyalizasyonu, transkripsiyon faktörlerinin etkileri ve epigenetik modifikasyonlar farklı soyların oluşumuna katkı sağlamaktadır (15).

2.4. Sitokin

Sitokinler, düşük moleküler ağırlıklara sahip küçük, yapısal olmayan proteinlerdir. İnflamasyon ve bağışıklık üzerinde karmaşık bir düzenleyici etkiye sahiptirler. Sitokinler bağışıklık sistemindeki hücreler arası habercilerdir. Bunlar sadece çok çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir. Ayrıca birçok farklı hücre tipi ve dokusunda da etki gösterirler. Sitokinler aynı hedef hücre üzerinde birçok etkiye sahiptir. Bir sitokin diğer sitokinlerin sentezini ve fonksiyonlarını indükleyebilir veya inhibe edebilir. Hedef hücrelerin hücre yüzeyinde spesifik reseptörlere bağlandıktan sonra, sitokinler etkilerini hedef hücre üzerinde gösterir (16).

2.4.1. İnterlökin 2 (IL-2)

İnterlökin-2 (IL-2), 133 amino asit kalıntılı tek bir polipeptit zinciri olan bir yapıdır ve esas olarak bağışıklık düzenleyici hücreler olan T hücreleri tarafından üretilir. Yardımcı T hücresi CD28 kullanılarak bir antijen sunan hücreye (APC) bağlandığında, CD4+ hücreleri IL-2 üretir. CD28 molekülü, aktif antijen sunan hücreler üzerinde eksprese edilen CD80/CD86 ligandlarına bağlanan bir moleküldür (16,17). IL-2, yüksek afiniteli IL-2 reseptörlerine sahip olan herhangi bir hücrenin proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. T hücrelerinin aktivasyonu için gereklidir. CD4+ veya CD8+ alt kümelerine ait olan T lenfositler (uyarılmamış), yüksek afiniteli IL-2 reseptörüne sahiptir. Spesifik antijen ile uyarılmasının ardından, sayılarında önemli bir artış olmaktadır. IL-2, T lenfositlerin başlıca büyüme faktörüdür. IL-2'nin yardımcı T (Th) hücreleri üzerindeki spesifik reseptörlerine bağlanması, bu hücrelerin çoğalmasını ve bu hücrelerden bir dizi sitokin salınmasını uyarır. Antiviral yanıtlarda önemli olan CD8+ sitolitik T hücrelerinin üretimi için IL-2 gereklidir (16).



Şekil 2: Sitokin ekspresyonu ve hücelere etkisi (18).

2.4.1.1. IL-2 Reseptör Sinyal Yolakları

IL-2 reseptörü, farklı afinitelerde farklı alt birim zincirlerine sahiptir; alfa, beta ve gamma zincirleri. Monomerik IL-2R-alfa düşük afiniteye, dimerik IL-2-beta-gamma orta afiniteye, trimerik IL-2R-alfa-beta-gamma yüksek afiniteye sahiptir. Alfa zinciri naif T hücrelerinde ifade edilmez sadece aktif T hücrelerinde ifade edilir. Ayrıca TAC (T hücre aktivasyonu) reseptörü olarak da adlandırılır. Beta ve gamma IL-2 reseptörleri aracılı sinyal transdüksiyonu için gerekli zincirlerdir. Düşük afiniteli ve yüksek afiniteli IL-2 reseptörleri aktif CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde ve aktif B hücrelerinde az sayıda eksprese edilir. Ara-afiniteli IL-2 reseptörleri, NK hücrelerinde ve naif T hücreleri üzerinde az sayıda ifade edilir. IL-2, yüksek afiniteli reseptörlere bağlandığında, reseptör aracılı endositozu takiben içeriye alınır. Yüksek afiniteli bağlanma sonrasında, fosfoinositol döngüsü uyarılır (16).

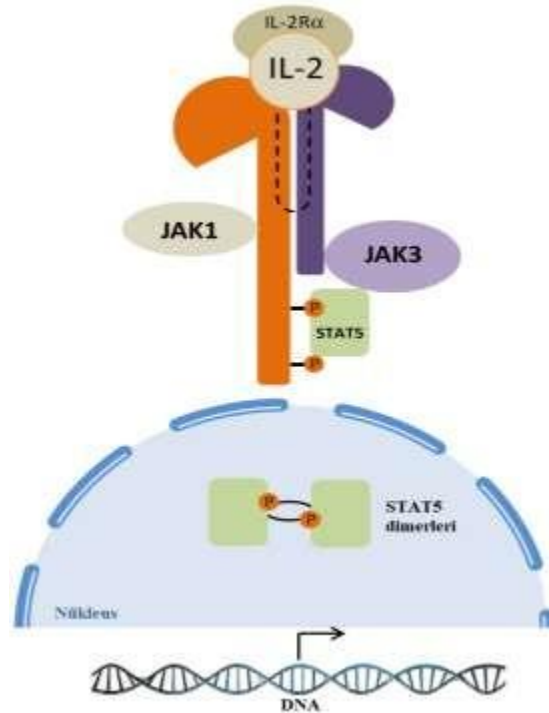
Bağışıklık sistemindeki lenfosit popülasyonları, hücresel proliferasyon, hücresel sağkalım ve programlanmış hücre ölümü arasında iyi organize edilmiş bir denge ile korunur. Sitokinlerin temel işlevlerinden biri, bu süreçleri koordine etmektir. Bu sitokinlerin aracılık ettiği moleküler sinyal yollarının ayrıntıları tam olarak açıklanmamıştır. IL-2 sitokin ailesinde, lenfositlerin sağkalımı ve proliferasyonundan sorumlu olduğu düşünülen üç ana sinyal yolu vardır; Jak/STAT, MAPK (mitojen aktif protein kinazı) ve PI3K (fosfatidilinositol 3-kinaz) yolu (19).

IL-2 sitokin ailesi varlığında; reseptör alt birimlerinin oligomerizasyonu, Janus kinazlar olarak adlandırılan bir protein tirozin kinaz sınıfının aktivasyonu ile gerçekleşir. Dört farklı Jak tanımlanmıştır; Jak1, Jak2, Jak3 ve Tyk2. Jak1, Jak3 ve Tyk2 yaygın olarak ifade edilir ve birçok farklı sitokin reseptörü tarafından kullanılır. Aktivasyondan sonra Jak, sitoplazmik tirozin fosforilasyonunu indükler. STAT (sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü) proteinleri daha sonra SH2 domainleri aracılığıyla reseptöre alınırlar, daha sonra Jak tarafından tirozin üzerinde fosforile edilirler (19).

IL-4 ve IL-2, Th2 farklılaşması için önemlidir. Th2 hücre farklılaşması, IL-2, IL-6 ve IL-21 de dahil olmak üzere çeşitli sitokinlerin aşağı yönde aktive edilen birkaç transkripsiyonel faktörünü içerir. Örneğin STAT5, Th2 soylarında önemli bir role sahiptir. IL-2 tarafından kolaylıkla aktive edilir (20, 21).

IL-2, CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu teşvik eder (22, 23). T hücresi büyüme faktörü rolü dışında IL-2, antijen hazırlandıktan sonra CD8+ bellek hücrelerinin gelişimini teşvik ederek sağlam bir sekonder bağışıklık tepkisi sağlar (24).

Doğal Treg (timus türevi) hücreleri aktivasyon için IL-2'ye ihtiyaç duyar. Aşağı yönde IL-2 sinyal iletimi, STAT5'in aktivasyonunu sağlar ve naif hücrelerde FoxP3'ün sentezlenmesini artırır, dolayısıyla güçlü bir bağışıklık kazanılmasını sağlar (25).



Şekil 3: IL-2 sitokin Jak/STAT sinyal yolağı (26).

IL-2; CD4+, CD25+, doğal olarak oluşan düzenleyici T hücresi (Treg) homeostazı ve aktivasyonu için önemlidir. IL-2'nin reseptörüne bağlanması STAT5'in fosforilasyonuna yol açar ve fosforile STAT5'in FoxP3 promotörüne

bağlanması, FoxP3 transkripsiyonunu arttırır. Treg'ler de yüksek FoxP3 protein seviyelerine neden olur. Aktif Treg'ler de görülen kuvvetli baskılayıcı fonksiyon için yüksek FoxP3 seviyeleri ile transkripsiyonel düzenlemenin gerekli olduğu düşünülmektedir. Transkripsiyon faktörü FoxP3, Treg'leri CD4+ Th hücrelerinden ayıran bir marker olarak tarif edilmiştir. Treg'lerin IL-2 ile stimüle edilmesi, STAT5'in fosforilasyon ve aktivasyonuna neden olur ve dolayısıyla FoxP3 promotoruna bağlanır, böylece FoxP3 ekspresyonunda artış olur. Artmış FoxP3 seviyeleri tarafından indüklenen transkripsiyonel düzenlemenin, naif Treg'lerdeki güçlü, baskılayıcı aktiviteyi indüklediği görülmüştür (25).

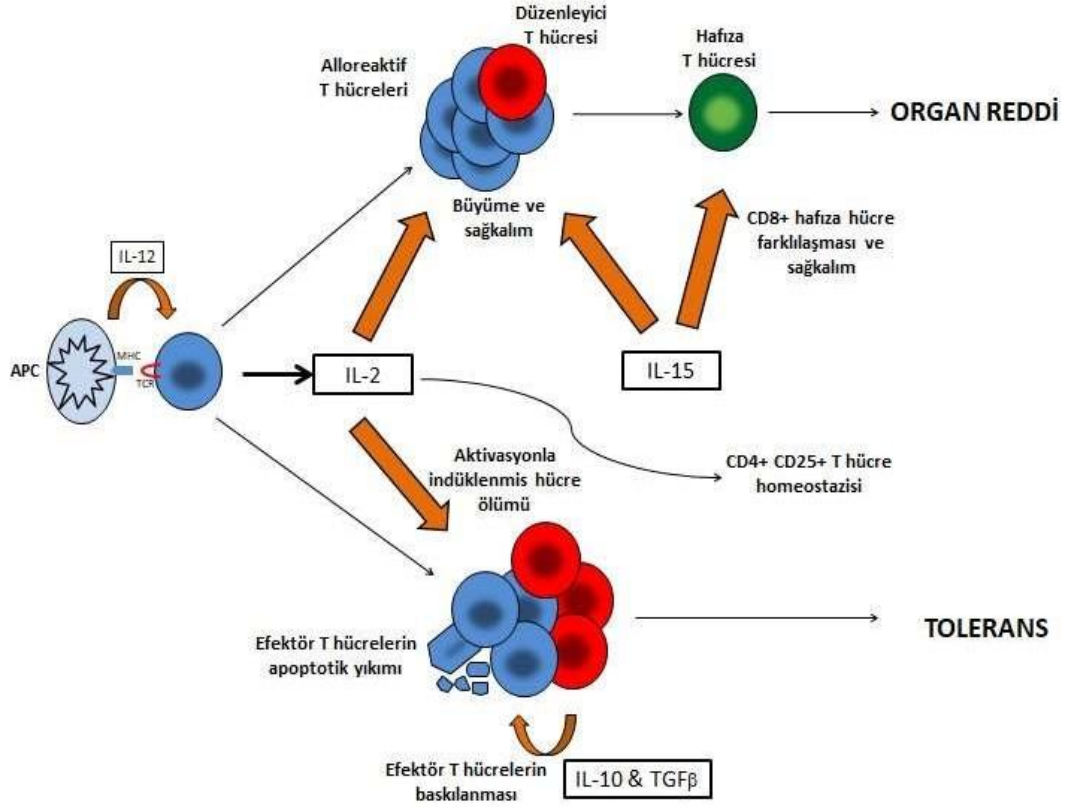
Mitojen aktif protein kinaz (MAPK), büyük bir serin/treonin kinaz ailesine ait olan, hücre yüzeyinden çekirdeğe giden ana enflamatuvar sinyal yollarını oluşturur. Hücre dışı sinyal-düzenleyen protein kinaz 1/2 (ERK1/2) sinyalleme modülü, büyüme, proliferasyon ve sağkalım dahil olmak üzere bir dizi hücresele olaya aracı olmasıyla karakterize edilen ilk MAP kinaz kaskadıdır. Hem ERK hem de MAPK yolları IL-2 tarafından aktive edilir. Aktive edildikten sonra MAPK'ler, hücresele fonksiyonları düzenlemek için transkripsiyon faktörlerini ve kinazlar dahil diğer proteinleri fosforile eder (19, 27, 28).

IL-2 sitokin ailesi tarafından aktive edilen üçüncü ve en iyi karakterize edilmiş sinyal bir lipit ve serin/treonin kinaz ailesine ait olan fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)'dır. Antijenler, uyarıcı moleküller, sitokinler ve kemokinler PI3K'ları plazma zarına yerleştirebilir. Böylece, PI3K, inositol halkasının 3-pozisyonundaki fosfoinositidleri fosforile eder. Hücre içi sinyalizasyon için önemli ikinci habercilerdir (19).

2.5. IL-2 Sitokini ve Organ Nakli İlişkisi

Sitokinlerin transplantasyon toleransı için dönüşümlü olarak önemli olduğu konusunda görüşler bulunmaktadır. Sitokinler, allospesifik immün yanıtın üretilmesi sırasında kritik noktaları düzenleyerek hem transplant toleransında hem de reddedilmesinde önemli bir rol oynar. IL-12 ve IL-15 gibi proinflamatuvar sitokinler, T hücre farklılaşmasını veya çoğalmasını yönlendirerek, hayatta kalma ve bellek

gelişimini destekleyerek organ reddini desteklemektedir. IL-2 ise, tolerojenik olabilir (Treg homeostazisini düzenler) veya reddedilmeyi (efektör T hücresi çoğalması ve sağkalımı) destekleyebilir. IL-2'nin pleiotropik etkileri, zamansal ve içeriğe bağlı olarak görülmektedir (29).



Şekil 4: IL-2 ekspresyonu ve organ nakli ilişkisi (29).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Mart 2017-Haziran 2017 tarihleri arasındaki süreçte, tez önerisi ve etik kurul başvuruları yapıldı. Kabul alındıktan sonra, BAP proje başvurusu tamamlandı. Deneysel çalışmalar, Haziran 2017-Temmuz 2018 tarihleri arasında Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tiplendirme Laboratuvarı ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında yapıldı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırma evreni; Uluslararası Çalışma Grubu Tanı Kriterlerine göre Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY) Hastalığı tanısı konulmuş, İzmir Bozyaka Eğitim Araştırma Hastanesi Organ Nakli birimince böbrek nakline karar verilen (+18 yaş) 21 hastadan oluşmaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda, 21 hastanın nakil öncesinde ve nakil sonrası 6. ayda alınan periferik kanı kullanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın bağımlı değişkenleri; CD4+ T hücre saflığı, izole edilen RNA'ların saflığı ve kalitesi, ekspresyon değişimleridir.

Araştırmanın bağımsız değişkenleri; hastaların ve donörlerin demografik özellikleri, alloimmünizasyonları, klinik veri düzeyleri, hastalara uygulanan tedavilerdir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

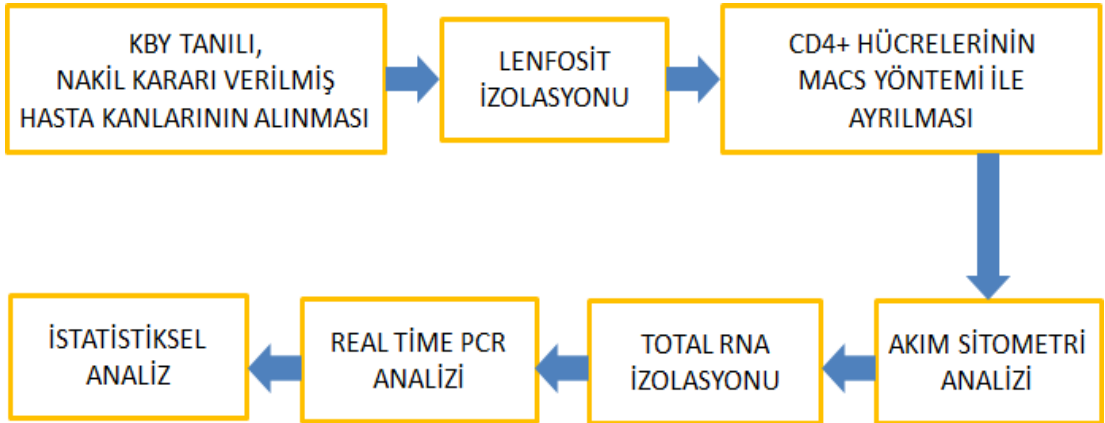
Malzeme Adı	Marka/Kod	Kullanım Amacı
Fosfat tuz tamponu (PBS)	Lonza Lot no: 7M8119	Lenfosit izolasyonu, CD4+ T hücre ayırılama
Fikol	Biocoll Lot no: CP16-1370	Lenfosit izolasyonu
BSA stok solüsyonu	Miltenyi biotec Lot No: 5170221489	CD4+ T hücre ayırılama
Durulama solüsyonu	Miltenyi biotec Lot No: 5170411423	CD4+ T hücre ayırılama
CD4+ FITC antikor	Miltenyi biotec Lot No: 5170926388	Akım sitometrisi
CD45+ Percp	BD bioscience Catalog No:347464	Akım sitometrisi
Etil alkol (%70)	Merck Index No: 603-002-00-5	RNA izolasyonu
50 ml'lik polipropilen tüp	HTL	Lenfosit izolasyonu
15 ml'lik polipropilen tüp	HTL	Lenfosit izolasyonu
5 ml polistiren yuvarlak tüp	Falcon Ref: 352052	Akım sitometrisi
1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri	HTL	Genel kullanım
LS ayırılama kolonu	Miltenyi biotec Lot No: 5170712003	CD4+ T hücre ayırılama
CD4+ mikro boncuk	Miltenyi biotec Lot No: 51708100098	CD4+ T hücre ayırılama
PCR tüpü	Qiagen Batch:160026436	cDNA sentezi
Buz bloğu	Qiagen	cDNA sentezi
Pastör pipet	Qiagen	Lenfosit izolasyonu
İzolasyon kiti Kit içeriği (Tampon RLT, Yıkama tamponu RPE, RNAaz içermeyen su, RNeasy mini spin kolon, Yıkama tamponu RW1, Toplama tüpleri, gDNA eliminasyon mini spin kolon)	RNeasy Plus Mini Kit Lot No: 154048034	RNA izolasyonu
Sentez kiti Kit içeriği (Buffer GE2, BC5 Reverse Transkriptaz)	RT ² HT First Strand Kit (96) Lot No: 75701236	cDNA sentezi

Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihazın Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
Santrifüj	Hettich zentrifugen	Lenfosit izolasyonu, CD4+ T hücre ayırılma
Santrifüj	Hermle	Lenfosit izolasyonu
Mikrosantrifüj	Hermle	RNA izolasyonu
MACS quadro cihazı	Miltenyi biotec	CD4+ T hücre ayırılma
Rotor gene q	ATQ-Qiagen	Ekspresyon analizi
Facs flow	Facs	Akım sitometrisi
Thermal cycler	Sensoquest	cDNA sentezi
Vorteks	Biosan	CD4+ T hücre ayırılma
Nanodrop	Thermo Nanodrop2000	RNA izolasyonu

3.6.2. Deneysel Çalışmalar

Böbrek hastalarında nakil öncesi ve sonrasında IL-2 gen ifade değişimlerinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmamızın akış şeması aşağıda Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5: Çalışma akış şeması.

3.6.2.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

Periferik kandan lenfosit izolasyonunu gerçekleştirmek için hastalardan 40 ml kan alındı.

Yöntem

- 1) 40 ml kan 1:1 oranında PBS ile seyreltildi.
- 2) Faz ayırılmasının yapılması için 8 adet 15 ml'lik tüplere 5 ml fikol konuldu.
- 3) Seyreltilmiş 10 ml kan örnekleri fikollerin üzerine yavaş bir şekilde yüklendi.
- 4) Yükleme tamamlanan tüplerin ağızları kapatılarak 2500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
- 5) Santrifüj sonunda fazlarına ayrıldığı görülen tüpten 2/3 oranında kan serumu kısmı atıldı. Yaklaşık 2 ml civarında oluşan bulut (buffy coat) kısmı dikkatli bir şekilde 15 ml'lik boş polipropilen tüpe aktarıldı.
- 6) Toplanan bulut kısmı lenfosit harici hücrelerin uzaklaştırılması için yıkandı. Yıkamada toplanan bulut tabakası üzerine tüp tamamen dolacak kadar PBS eklendi. 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldı. Hücre pelleti elde edildi.
- 7) Gerekli durumlarda 1200 rpm'de bir yıkama daha yapıldı. Üzerine 5 ml PBS eklenerek manyetik hücre ayırılmasına geçildi.

3.6.2.2. Hücre Sayımı

Elde edilen lenfositlerin yoğunluğunu belirlemek için Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Sayım işlemleri için lenfosit izolasyonundan sonra homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 10 µl alındı. Thoma lamı ile üzerine yerleştirilmiş olan lamelin arasındaki oluğa pipet ile kenardan sızdırılarak süspansiyonun yayılması sağlandı. Mililitredeki hücre sayısını belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı:
$$\text{Hücre sayısı/mL} = \text{Hücre sayısı (tüm lam üzerinde sayılan)} \times 10^4$$

3.6.2.3. Manyetik Hücre Ayırılma (MACS) Yöntemi ile CD4+ T Hücrelerinin Ayırılması

Hastaların periferik kanından izole edilen lenfosit hücrelerinden, manyetik hücre ayırılma yöntemi (MACS) kullanılarak antijenik yüzey özelliklerine göre ayırılma yapılmıştır.

Yöntem

- 1) Lenfosit içeren hücre süspansiyonu, 300g'de 10 dk santrifüj edildi, sonrasında süpernatant atıldı.
- 2) Hücre sayısı Thoma Lamı kullanılarak belirlendi.
- 3) 1/20 oranında BSA stok solüsyonu ve durulama solüsyonu karıştırılarak yıkama solüsyonu elde edildi.
- 4) 10^7 hücre/ml içeren hücre pelleti 80 µl yıkama solüsyonu eklendi.
- 5) CD4+ mikro boncuklar, yapışmasını önlemek için vortekslendi. 30 µl CD4+ mikro boncuklar hücre süspansiyonu üzerine eklendi. Karışım pipetajlanarak homojenizasyonu sağlandı.
- 6) 15 dakika +4°C'de inkübe edildi.
- 7) İnkübasyondan sonra 2 ml yıkama solüsyonu eklenerek 300g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 7) Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi ve karıştırıldı.
- 8) LS kolonundan yıkama için 3 ml yıkama solüsyonu geçirildi. 500 µl'lik hücre süspansiyonu kolona uygulandı.
- 9) Hücrelerin LS kolondan akışı 3 defa 3 ml yıkama solüsyonu konularak sağlandı.
- 10) Kolona 5 ml yıkama solüsyonu eklenerek steril bir tüpe hızlıca enjekte edildi. Böylece CD4+ hücreleri toplandı.
- 11) Hücre sayısı tekrar Thoma Lamı ile hesaplandı.
- 12) Toplama kabındaki CD4+ hücrelerini içeren süspansiyon 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- 13) Tüpün üzerine 1 ml'ye kadar PBS eklendi. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- 14) Pelletin üzerine 650 µL PBS eklendi, süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan 200 µl, RNA izolasyonunda kullanılmak üzere ayrıldı. 50 µl hücre süspansiyonu CD4+ manyetik ayırlamanın doğruluğunun kontrolü için akım sitometrisi analizine ayrıldı.

3.6.2.4. Akım Sitometrisi Analizi

Ayrımlanan CD4+ T hücrelerinin saflığını kontrol etmek için hücrelere akım sitometrisi analizleri yapıldı.

Yöntem

- 1) Manyetik ayırmadan sonra 50 µl'lik hücre süspansiyonu 5 ml'lik tüpe aktarıldı.
- 2) Hücre süspansiyonu üzerine 5 µl CD45+ percp, 5 µl CD4+ FITC antikor boyaları eklendi.
- 3) Vortekslenerek karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 4) İnkübasyondan sonra tüpe, 1000 µl PBS eklenerek 1900 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üzerindeki sıvı boşaltıldı.
- 5) Pellet üzerine 500 µl PBS eklenerek akım sitometrisi cihazında okutuldu.
- 6) Cihazda okutulan örnek, analizi yapılarak yorumlandı.

3.6.2.5. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, ayrımlanan CD4+ T hücrelerinden yapıldı. Bu izolasyon için Qiagen izolasyon kiti (RNeasy Plus Mini Kit Lot No: 154048034) kullanıldı. Yöntem, üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı.

Yöntem

- 1) 200 µl CD4+ hücre süspansiyonu 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- 2) Pellet üzerine 350 µl tampon RLT eklendi. 30 sn boyunca vortekslendi.
- 3) Bu lizat gDNA eliminasyon spin kolona aktarıldı ve 30 sn 8000 g'de santrifüj edildi.
- 4) Santrifüj sonunda altta kalan sıvıya 350 µl %70'lik etanol eklenerek pipetle karıştırıldı.
- 5) 700 µl olan sıvı "RNAeasy spin" kolona aktarıldı. 15 sn 8000 g'de santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- 6) 700 µl tampon RW 1 eklenerek 15 sn 8000 g'de santrifüj edildi, sıvı kısım atıldı.

- 7) 500 µl tampon RPE eklenerek 15 sn 8000 g de santrifüj edildi, sıvı kısım atıldı.
- 8) 500 µl tampon RPE eklenerek, 2 dk 8000 g de santrifüj edildi, sıvı kısım atıldı. Tekrar 14000 g de 1 dk santrifüj edildi.
- 9) Filtreli kısım 1,5 ml ependorfa konularak 50 µl RNAaz içermeyen su eklendi. 1 dk 8000 g de santrifüj edildi.
- 10) Alttaki sıvı RNA içeren kısımdır. Nanodropta konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü. Bir sonraki çalışmaya kadar -80 °C'de saklandı.

3.6.2.6. RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA dan 1,5 µl alınarak nanodrop cihazında 260-280 nm'de absorbansları ölçüldü. RNA saflık dereceleri kontrol edildi. RNA'nın saflık derecesinin 1,8-2,0 arasında olmasına dikkat edildi.

3.6.2.7. Komplementer cDNA Eldesi

İzole edilen RNA'lar cDNA sentezinde kalıp olarak kullanıldı. cDNA sentezi üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı.

Yöntem

- 1) Her bir RNA örneği için ayrı bir Genomik DNA Eliminasyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3: cDNA reaksiyon içeriği.

İçerik	Miktar
Total RNA	8 µl
Tampon GE2 (gDNA eliminasyon tamponu)	6 µl
Toplam Hacim	14 µl

- 2) 5 dakika 37 °C'de inkübe edildi ve hemen 1 dakika buz üzerinde bekletildi.
- 3) Her bir 14 µl genomik DNA'ya 6 µl BC5 ters transkriptaz karışımı eklendi. Eliminasyon Karışımının son hacmi 20 µl oldu.
- 4) Termal ısı döngüleyicide Tablo 4'te gösterilen reaksiyon kullanıldı.

Tablo 4: cDNA dönüşüm reaksiyon ısı profili.

DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
1	15 dk	42°C
1	5 dk	95°C

5) Bitirilen reaksiyon RT-PCR için kullanıma hazır olana kadar -20 °C'de saklandı.

3.6.2.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak öncül primerler aracılığı ile PCR reaksiyonu kuruldu. Çalışılacak sitokin gen için uygun primer dizaynı firma tarafından yapıldı (UniGene no:Hs.89679, Refseq Accession No: NM_000586.3). Kontrol olarak β -Aktin genine özgül primerler (Refseq Accession No: NM_001101) kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR, RT² SYBR® Green Mastermix kiti (Lot No: 7600546), Rotor-Gene Q döngüleyici cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Yöntem

1. cDNA'lar 91 μ l nükleaz içermeyen su ile seyreltildi.
2. Kapiler tüp içerisinde Tablo 5'te verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.
3. PCR tüpleri cihaza yerleştirildi ve Tablo 6'da verilen program kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 5: RT-PCR reaksiyon içeriği.

Kimyasal	Eklenen miktar
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 μ l
cDNA	5 μ l
RT ² qPCR Primer Assay (10 μ M stok)	1 μ l
RNaz içermeyen su	6,5 μ l
Toplam hacim	25 μl

Tablo 6: RT-PCR için ısı profili.

DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
1	10 dk	95°C
40	15 sn	95°C
	1 dk	60°C

4. Florasan ölçüm sonunda verilerin analizi gerçekleştirildi. Analizler Qiagen GeneGlobe Veri Analiz Merkezi web kaynağı üzerinden yapıldı.

3.7.Araştırma Planı Ve Takvimi

Tablo 7: Araştırma zaman çizelgesi.

İş Paketinin Adı/Tanımı	2017 Haziran	2017 Temmuz	2017 Ağustos	2017 Eylül	2017 Ekim	2017 Kasım	2017 Aralık	2018 Ocak	2018 Şubat	2018 Mart	2018 Nisan	2018 Mayıs	2018 Haziran	2018 Temmuz
Etik kurul ve tez öneri başvurusu	X	X	X											
Nakil öncesi ve sonrası kan örneklerinin toplanması				X	X	X	X	X	X	X	X			
Hastalardan alınan kanlardan lenfosit hücre izolasyonu				X	X	X	X	X	X	X	X			
Lenfosit hücrelerinden CD4+ T hücre ayırtılması				X	X	X	X	X	X	X	X			
TotalRNA izolasyonu				X	X	X	X	X	X	X	X			
cDNA sentezi					X	X	X	X	X	X	X	X		
RT-PCR ekspresyon çalışması													X	X
İstatistiksel analiz.													X	X

3.8. İstatiksel Analiz

IL-2 sitokin genine ait ekspresyon değerleri Qiagen'in <https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/rt2-primer-assay-data-analysis-center/?instrument=R> web sitesi ile, hastaların klinik verileri ise IBM SPSS Statistics 22.0.0.0 programı kullanılarak analiz edildi. Verilere uygun test olarak Ki-Kare ile değerlendirmeler yapıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda mRNA düzeyinde ekspresyonu incelenen IL-2 geninin aynı koşullar altında protein düzeyindeki olası değişimleri proje bütçesinin sınırlı olması nedeniyle incelenememiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamıza dahil edilen 21 hastanın nakil öncesinde ve nakil sonrası 6.ayda kan örnekleri İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 08.06.2016 tarihli ve 55 karar numarası izni ile alınmıştır (Ek1).

4.BULGULAR

4.1. Çalışmada yer alan hastaların demografik bilgileri

Çalışmamızda yer alan hastaların ve donörlerin demografik bilgileri Tablo 8’de verildi.

Tablo 8: Hastaların ve donörlerin demografik bilgileri.

Hasta No	Hasta Cinsiyeti	Hasta Yaşı	Donör Tipi	Donör Cinsiyeti	Donör Yaşı	Doku Uyumu	Gebelik	Eski Transplantasyon
1	Erkek	30	Canlı	Erkek	58	1A,1B, 1DR,1DQB1,1DQA	-	-
2	Erkek	25	Canlı	Erkek	29	1A,1B, 2DR	-	-
3	Kadın	51	Kadavra	Erkek	57	1A, 1DR	1 doğum	-
4	Kadın	37	Kadavra	Erkek	57	1DR	O	-
5	Kadın	52	Kadavra	Erkek	64	1A,1B, 2DR	2 doğum 1 kürtaj	-
6	Erkek	55	Canlı	Kadın	54	1A,1B, 1DR,1DQB1,1DQA	-	-
7	Erkek	49	Canlı	Kadın	29	1B, 1DQB,1DQA	-	-
8	Erkek	65	Canlı	Erkek	37	1A,1B, 1DR,1DQB1,1DQA	-	-
9	Erkek	42	Kadavra	Erkek	27	1A,2B,2DR	-	-
10	Kadın	41	Canlı	Erkek	48	2A,2B,2C, 2DR,2DQB2DQA	2 doğum	-
11	Erkek	51	Kadavra	Erkek	58	1B, 1DR	-	-
12	Kadın	40	Kadavra	Kadın	58	1B, 1DR	3 doğum	-
13	Erkek	61	Canlı	Kadın	33	1DQB,1DQA	-	-
14	Erkek	52	Canlı	Kadın	32	1A,1B,1C, 1DR,1DQA,1DQB	-	-
15	Erkek	47	Kadavra	Erkek	21	1A,2B, 1DR	-	-
16	Erkek	49	Kadavra	Erkek	18	1A, 1DR	-	-
17	Kadın	52	Kadavra	Erkek	25	1DR	2 doğum	-
18	Erkek	21	Canlı	Kadın	48	1A,1B,1C, 1DR,1DQA,1DQB	-	-
19	Erkek	35	Canlı	Kadın	60	1A,1B,1C, 1DR,1DQA,1DQB	-	-
20	Kadın	43	Kadavra	Erkek	28	2DR	2 doğum	-
21	Erkek	47	Kadavra	Erkek	28	1DR	-	1999 kadavradan

Çalışmada yer alan hastaların cinsiyet dağılımlarına bakıldığında erkek hastaların oranı kadın hastalara göre 2 kat daha fazladır. Kadın hastaların yaş ortalaması 45,14 (37-52); erkek hastaların ise 44,9 (21-65)'dir. İki grubun yaş ortalamaları birbirine yakındır.

Hastaların %52,4'ü kadavra donörden nakil olurken %47,6'sı canlı donörden nakil olmuştur. Canlı donörlerin yaş ortalaması 42,8 iken, kadavra donörlerin yaş ortalaması 40,09'dur.

Canlı donörden nakil olan hastaların %50'sinde 6. ayda IL-2 ekspresyon seviyesinde artış görülürken %40'ında azalma görülmüştür. Kadavradan nakil olan hasta grubunun %27,28'sinde artış görülürken %72,72'sinde azalma görülmüştür.

Hastalara başlangıçta benzer rutin immünsüpresif tedavi uygulanmış rejeksiyon durumunda doz artırımına gidilmiştir. Hastaların nakil sonrası kan transfüzyonu öyküsü bulunmaktadır. Nakil öncesi alınan örnekler için hastalarda enfeksiyon bulunmamaktadır ve panel reaktif antikor tarama test sonuçları negatiftir.

4.2. Hastaların Laboratuvar Verileri

Hastaların laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi Tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9: Hastaların laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi.

Klinik veri	Referans aralığı	Nakil öncesi ortalama değer	Nakil sonrası ortalama değer	Nakil öncesi min-max değer	Nakil sonrası min-max değer
Glukoz mg/dl	74-106	137,48	111,65	67,00-577,00	65,00-332,00
Üre mg/dl	17-43	114,38	54,25	28,00-242,00	23,00-100,00
Kreatinin mg/dl	0,84-1,25	7,11	1,97	2,30-10,90	1,03-8,18
LDL mg/dl	0-100	113,50	143,85	56,00-179,00	87,00-201,00
HDL mg/dl	40-60	41,35	49,58	26,00-78,00	14,00-86,00
Trigliserid mg/dl	0-150	148,75	181,55	43,00-443,00	94,00-250,00

Tablo 9 (Devam): Hastaların klinik verilerinin değerlendirilmesi.

Klinik veri	Referans aralığı	Nakil öncesi ortalama değer	Nakil sonrası ortalama değer	Nakil öncesi min-max değer	Nakil sonrası min-max değer
Amilaz U/L	22-80	109,00	62,55	11,00-764,00	22,00-93,00
(CK) Kreatinin Kinaz U/L	0-171	133,30	79,45	38,00-457,00	9,00-203,00
Total Bilurubin mg/dl	0,3-1,2	0,71	0,66	0,33-3,98	0,16-1,25
Total Protein g/dl	6,6-8,3	6,63	6,74	5,40-7,80	3,60-8,10
Albümin g/dl	3,5-5,2	4,07	4,15	2,80-4,80	2,90-4,80
(Na) Sodyum mmol/L	137-146	137,52	137,77	132,60-144,20	132,00-142,30
(K) Potasyum mmol/L	3,5-5,2	4,89	4,19	4,00-6,10	3,20-4,80
(Ca) Kalsiyum mg/dL	8,8-10,6	8,98	9,73	7,10-10,70	8,60-11,00
(P) Fosfor mg/dL	2,6-4,5	4,44	3,32	2,60-7,90	2,45-4,70
WBC mm ³	4-10	9,50	7,95	5,02-17,20	0,62-12,30
LYM %	20-40	19,06	19,72	1,10-31,40	2,70-51,80
LYM	0,8-4	1,65	1,38	0,14-3,40	0,14-2,80
(PTH) Parathormon pg/mL	15-88	405,86	140,82	6,50-1250,00	17,90-318,90
Ferritin ng/mL	23,9-336,2	720,47	591,30	20,50-1500,00	18,60-1500,00
Vitamin B12 pg/mL	141,37-543,3	300,10	238,47	148,00-1124,00	92,00-671,00
Folat ng/mL	3,1-19,9	7,33	4,86	2,95-20,26	2,77-8,86

Tablo 9’da belirtildiği gibi nakil öncesi referans değerleri aralığı dışında olan üre, kreatinin, trigliserid, ferritin, amilaz, fosfor değerleri ortalaması, nakil sonrası referans değerleri aralığında görüldü. Nakil öncesi referans aralığında olan HDL, kalsiyum (Ca) değerlerinde yine referans aralığı içerisinde artış görülürken, folat, vitamin B12, parathormon (PTH), potasyum (K), kreatin kinaz (CK) değerlerinde

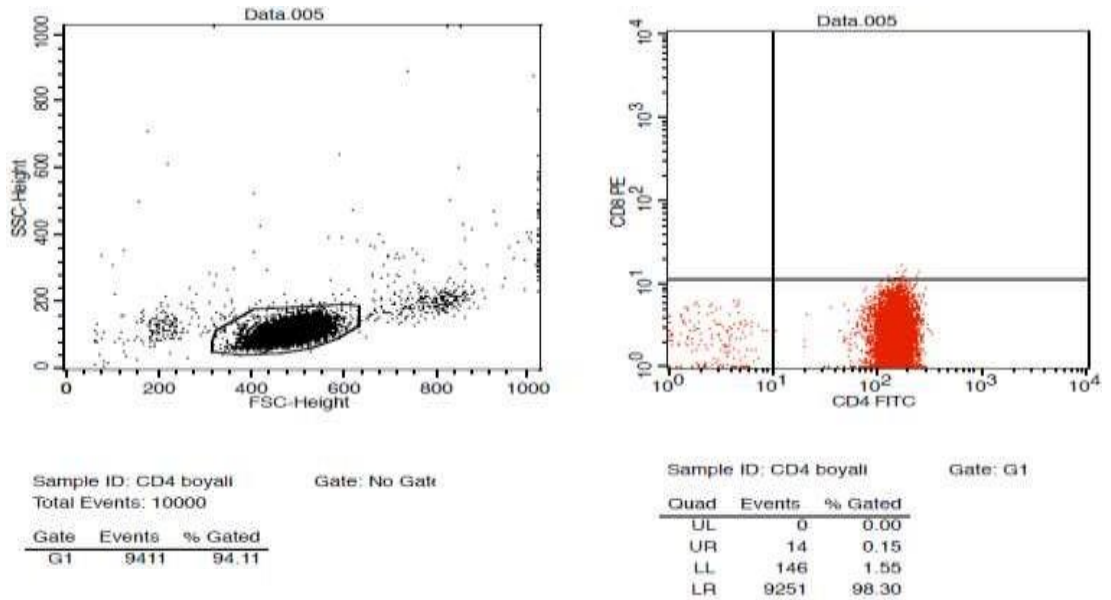
azalış görüldü. LDL değeri referans aralığı dışında kalmaya devam etti ve artış gösterdi.

4.3.Böbrek hastalarında nakil öncesi-sonrası IL-2 gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

Böbrek hastalarında nakil öncesi-sonrası IL-2 sitokin geninin genetik değişikliklerinin incelenmesi için gen ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Kullanılan yöntemler için incelenen gen dizisi NCBI gen bankasından alındı (Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p7 Primary Assembly NCBI Reference Sequence: NC_000004.12).

4.3.1. Hasta Örneklerinden CD4+ T Hücre İzolasyonu

Hastalardan alınan kan örneklerinden lenfosit hücreleri izole edildi. Bu hücrelerin yüzey antijen özelliklerinden yararlanılarak MACS yöntemi ile CD4+ T hücreleri ayrıldı. Ayrılmış CD4+ T hücrelerinin saflığının kontrolü için akım sitometri analizleri yapıldı. Akım sitometrisi analizi sonucunda CD4+ T hücrelerinin %98 saflıkta ayrıldığı gözlemlendi (Şekil 6).



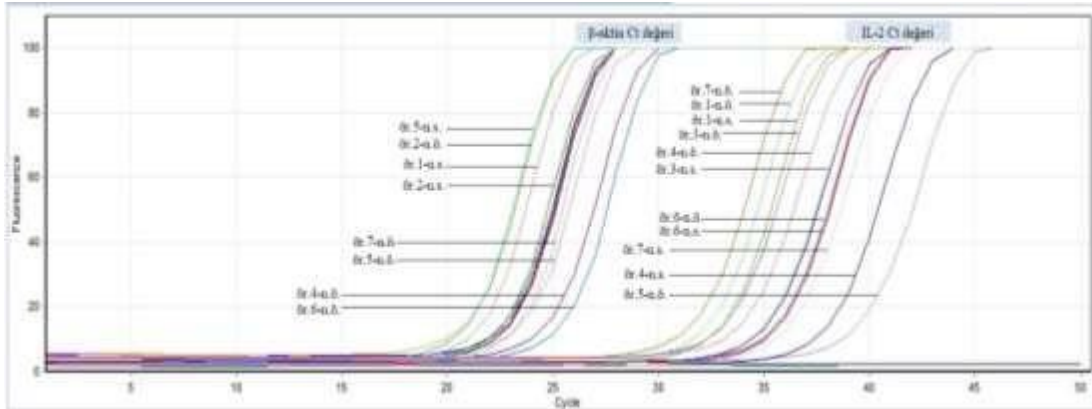
Şekil 6: MACS ile ayrılmış CD4+ T hücrelerinin saflığının akım sitometrisi ile kontrol edilmesi.

4.3.2. Hasta Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Ayrımlanan (nakil öncesi ve sonrası) CD4+ T hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. 260/280 nanometrede spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. RNA'ların saflık derecesinin 1.8-2.0 aralığında olduğu gözlemlendi.

4.3.3. Hasta örneklerinde IL-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri

Rotor Gene Q cihazında reaksiyonlar gerçekleştirildikten sonra hasta örneklerinin Cq değerleri elde edildi. Hasta örneklerinin nakil öncesi ve sonrası IL-2 ekspresyon düzeyleri, <https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/rt2-primer-assay-data-analysis-center/?instrument=R> web sayfasında bulunan “Geneglobe Data Analysis Center- RT2 Primer Assay” software programı kullanılarak analiz edildi. Cq cut-off değeri 35 alındı. Hastaların nakil öncesi ve sonrası Cq değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile rölatif kantitasyon yapıldı. Formül ile yapılan hesaplamalar sonucunda $2^{-\Delta\Delta C_t} > 1$ ise nakil sonrası gen ekspresyonunun arttığını, $2^{-\Delta\Delta C_t} < 1$ ise nakil öncesine göre azalmış olduğunu gösterir. $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ ise gen ekspresyonunun eşit olduğunu ifade etmektedir. Çalışmalar 3'lü tekrarlar 7'şer hasta şeklinde çalışıldı. RT-PCR'da, IL-2 genine ait bazı örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 7'de gösterildi.



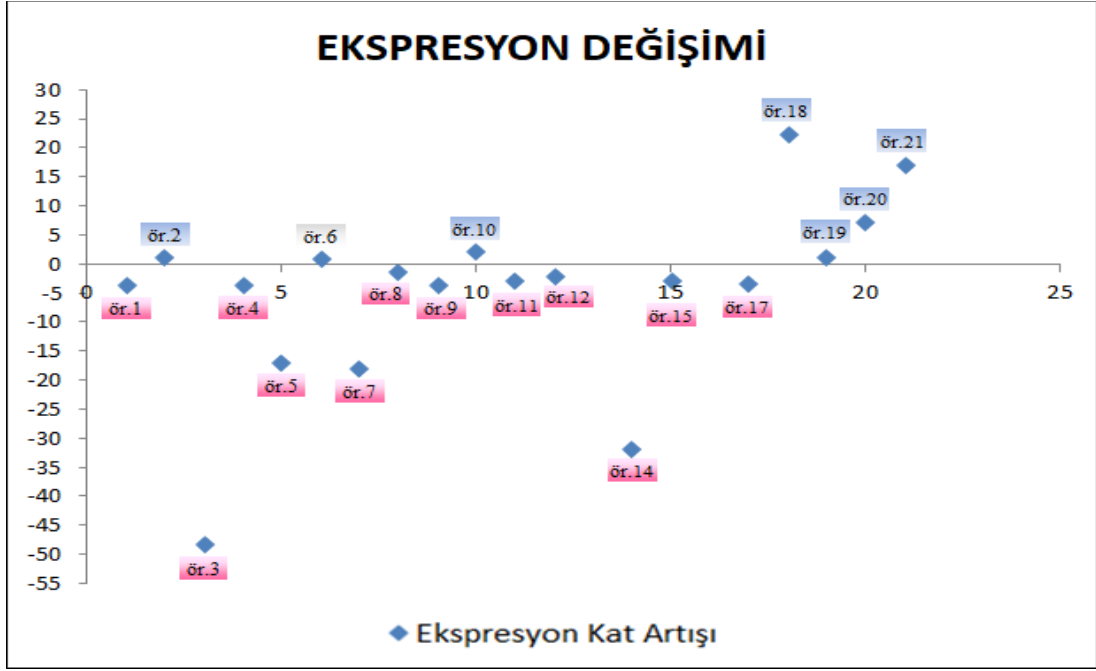
Şekil 7: RT-PCR'da IL-2 genine ait amplifikasyon eğrileri.

Grafikte PCR ürünlerinin florasan ışığa vermeye başladıkları döngü noktası ve eşik değeri gösterilmektedir (Şekil 7).

Nakil sonrasında hastaların IL-2 ekspresyonlarının nakil öncesine göre değişimleri ve kat artışları Tablo 10’da verildi. Ayrıca ekspresyon kat artışına göre hastaların dağılımı Şekil 8’de gösterildi.

Tablo 10: IL-2 sitokin geni RT-PCR analiz sonuçları.

Hasta No	Ekspresyon Değeri	Ekspresyon Kat Artışı	<i>P</i> Değeri
1	0,2736	-3,6553	0.095688
2	1,2983	1,2983	0.905349
3	0,0207	-48,2793	0.05535
4	0,2761	-3,6217	0.259157
5	0,0593	-16,8733	0.04401
6	1	1	0
7	0,0562	-17,7942	0.128764
8	0,8293	-1,2058	0.656949
9	0,2711	-3,6893	0.271254
10	2,3027	2,3027	0.211514
11	0,3423	-2,9214	0.350389
12	0,52	-1,923	0.302324
13	2817,1096	2817,1096	0.029628
14	0,0315	-31,7056	0.095112
15	0,3495	-2,8613	0.039739
16	835,5988	835,5988	0.079145
17	0,2994	-3,3404	0.09117
18	22,5752	22,5752	0.032705
19	1,4406	1,4406	0.272099
20	7,3445	7,3445	0.090702
21	17,188	17,188	0.037412



Şekil 8: Nakil sonrasında hastaların, nakil öncesine göre IL-2 ekspresyon değişimleri.

Nakil sonrası 6. ayda hastaların %38,1'inde ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlendi. Hastaların %57,1'inde azaldığı, %4,8'inde ise değişmediği görüldü. Artan hastalarda ekspresyon aralığı 1,30-2817,11 iken, azalan hastalarda ekspresyon aralığı 0,02-0,83'tür. 13 numaralı örneğin ekspresyon değişim düzeyi 2817,1096, 16 numaralı örneğin ise 835,5988'dir.

Hasta-donör doku uyumuna göre ekspresyon düzeylerindeki değişim incelendi ve Tablo 11'de gösterildi.

Tablo 11: Hasta-donör doku uyumuna göre ekspresyon düzeylerindeki değişim.

IL-2 Gen Ekspresyonu	SINIF I					SINIF II				
	Uyum yok n (%)	1 lokus uyumlu n (%)	2 lokus uyumlu n (%)	3 lokus uyumlu n (%)	6 lokus uyumlu n (%)	Uyum yok n (%)	1 lokus uyumlu n (%)	2 lokus uyumlu n (%)	3 lokus uyumlu n (%)	6 lokus uyumlu n (%)
Artmış	3 (75)	0	1 (25)	3 (50)	1 (100)	-	2 (25)	3 (50)	2 (33,3)	1 (100)
Azalmış	1 (25)	5 (100)	3 (75)	3 (50)	0	-	6 (75)	3 (50)	3 (50)	0
Değişmemiş	0	0	1 (25)	0	0	-	0	0 (11,2)	1 (16,6)	0
<i>p</i>	0,193					0,512				

Nakil sonrası IL-2 sitokin geninin ekspresyon seviyesindeki değişimin hasta-donör doku uyumu ile ilişkisi incelendiğinde anlamlı bir fark görülmedi. ($p>0,05$).

IL-2 gen ekspresyon değişimi ve rejeksiyon ilişkisi incelendi ve (tablo)'de gösterildi.

Tablo 12: IL-2 gen ekspresyonu değişimi ve rejeksiyon ilişkisi.

IL-2 Gen Ekspresyonu	Rejeksiyon atağı var*	Rejeksiyon atağı yok
Artmış	2	5
Azalmış	0	12
Değişmemiş	0	1
<i>P</i>	<0,005	

* Örnek 21'de erken dönemde (ilk 1 ay içerisinde) greft kaybı görüldüğü için ekspresyon- rejeksiyon ilişkisi değerlendirilmesine dahil edilmedi.

Hastaların nakil sonrası IL-2 gen ekspresyonu ile rejeksiyon durumları karşılaştırıldığında rejeksiyon atağı geçiren hastaların tümünde IL-2 ekspresyon düzeyi arttı. Rejeksiyon geçirmeyen hastaların ise %27,7'sinde artış görüldü. İstatistiksel olarak Ki-kare testi yapıldı ($p<0.005$).

Çalışma verilerinin rejeksiyon ile ilişkilendirilmesi Tablo 13'te gösterildi.

Tablo 13: Çalışma verilerinin rejeksiyon ile ilişkilendirilmesi.

Hasta No	Rejeksiyon atağı Var/Yok	Doku Uyumu	Ekspresyon Kat Artışı	Kreatinin (mg/dL) Ref.Değ.= 0,84-1,25		tGFH (mg/dL) Ref.Değ.= ≥ 0	
				Nakil Öncesi	Nakil Sonrası	Nakil Öncesi	Nakil Sonrası
1	Yok	1A,1B, 1DR,1DQB1,1DQA	-3,6553	6,0	1,73	11,4	51
2	Yok	1A,1B, 2DR	1,2983	9,7	1,21	6,7	83
3	Yok	1A, 1DR	-48,2793	3,8	1,25	13,02	42
4	Yok*	1DR	-3,6217	2,3	1,28	26,36	52
5	Yok	1A,1B, 2DR	-16,8733	10,9	1,14	3,6	55

Tablo 13 (Devam): Çalışma verilerinin rejeksiyon ile ilişkilendirilmesi.

Hasta No	Rejeksiyon atağı Var/Yok	Doku Uyumu	Ekspresyon Kat Artışı	Kreatinin (mg/dL) Ref.Değ.= 0,84-1,25		tGFH (mg/dL) Ref.Değ.= >= 0-	
				Nakil Öncesi	Nakil Sonrası	Nakil Öncesi	Nakil Sonrası
6	Yok	1A,1B, 1DR,1DQB1,1DQA	1	5,98	1,66	5,9	45
7	Yok	1B, 1DQB,1DQA	-17,7942	4,3	1,04	6,7	88
8	Yok	1A,1B, 1DR,1DQB1,1DQA	-1,2058	6,16	1,32	77,3	56
9	Yok	1A,2B,2DR	-3,6893	7,4		8,22	
10	Yok	2A,2B,2C, 2DR,2DQB2DQA	2,3027	5,3	1,65	9,3	38
11	Yok	1B, 1DR	-2,9214	10,7	2,7	4,9	26
12	Yok	1B, 1DR	-1,923	6,1	1,22	7,94	56
13	Var (8.ay)	1DQB,1DQA	2817,1096	4,5	1,3	13,12	59
14	Yok	1A,1B,1C, 1DR,1DQA,1DQB	-31,7056	7,4	1,71	7,7	45
15	Yok	1A,2B, 1DR	-2,8613	7,1	1,51	8,343	54
16	Var (6.ay)	1A, 1DR	835,5988	8,3	2,29	6,8	32
17	Yok	1DR	-3,3404	5,8	1,13	7,8	56
18	Yok	1A,1B,1C, 1DR,1DQA,1DQB	22,5752	8,4	1,72	8,1	55
19	Yok	1A,1B,1C, 1DR,1DQA,1DQB	1,4406	8,8	1,94	7	43
20	Yok	2DR	7,3445	8,5	1,03	5,24	67
21	Var (1.ay)	1DR	17,188	10,8	8,18	5,1	7

*Birinci ayda rejeksiyon atağı geçirmiş fakat tedavi ile düzelmiştir.

5. TARTIŞMA

Böbrek nakli sonrasında hastalarda organın fonksiyonlarını ve tedaviye verecekleri yanıtları önceden tahmin edebilmek zordur. Günümüze kadar nakil sonrası organ reddini belirleyebilmek için çeşitli yöntemler kullanılmasına rağmen, bu yöntemler kliniğe hala yeterli desteği sağlayamamaktadır. Nakil sonrasında görülen komplikasyonların nedenlerinin tanımlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda nakil sonrası reddi önceden tanımlayabilecek biyobelirteçlerin bulunması için birçok araştırma yapılmaktadır.

Böbrek naklinde sitokinlerin rolü son derece karmaşıktır. Hastaya nakli gerçekleştirilen organda; antijen sunan hücrelerin nötrofil ve lenfositleri uyarmasıyla sitokinler salgılanır. IL-2, TNF-alpha, IFN-gamma ve IL-1 β nakil sonrası salgılanan sitokinlerin başında yer alır. Bu sitokinler aracılığıyla alıcının T hücreleri greftin antijenik yapısı ile uyarılır. İmmün yanıt olarak; T hücreleri aracılığıyla B hücrelerinin antikor salgılaması veya sitotoksik T hücre aktivasyonu ortaya çıkar. Nakil sonrasında oluşan immün yanıtın daha iyi anlaşılabilmesi ve rejeksiyonun önceden belirlenebilmesi için sitokin profilinin iyi bilinmesi ve bilinmeyen mekanizmaların anlaşılması gerekmektedir (30).

Th1 sitokinleri (IL-2, IFN-gama); T sitotoksik lenfositler, monositler ve NK hücrelerinin aktivasyonu ile alloimmün yanıtı tetikler. Bazı yazarlar transplantasyonda Th1'den türetilmiş sitokinler ile akut rejeksiyon atakları arasındaki ilişkiyi gözlemlemiştir. Sadeghi ve ark. IFN-gama plazma düzeylerinin artışının akut rejeksiyonla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (31).

Hu ve Knechtle (32)'ye göre, sitokinler böbrek fonksiyonunu üç farklı yönden etkileyebilir. Bunlar; kan akışını düzenleyerek iskemi/reperfüzyon tipi hasara yol açabilmesi; immünolojik baskılama sırasında enfeksiyona karşı reseptör cevabı sağlaması ve akut rejeksiyon bileşenlerinin kontrolünü sağlamaktır (32). Cardoni ve ark.'na göre, böbrek naklinin inflamatuvar yanıtının tetiklenmesi sırasında IL-12, IL-18 ve TNF α varlığında; antijen sunan hücreler, aktif T lenfositler, NK ve Th1 hücrelerinin üretiminde artışa öncülük ederler (33).

Yamada ve arkadaşları, idrarda TGF β düzeyi ile böbrek reddini ilişkilendirmeyi denemişlerdir. Çalışmalarında yüksek TGF β 1 atılımı ve kuvvetli PRA yanıtı olan stabil transplant hastaları, düşük TGF β 1 atılımı ve zayıf PRA yanıtı olanlara göre daha yüksek oranda kronik allograft disfonksiyonu göstermiştir (34).

Başka bir çalışmada proinflamatuvar sitokin olan IL-6'nın transplantasyon öncesi serum seviyeleri, akut rejeksiyon atakları ve organ kayıplarının riski ile ilişkilendirilmiştir. Rejeksiyon görülen grupta kontrol grubuna göre IL-6 seviyesi daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (35). Diğer bir çalışmada ise, proinflamatuvar IL-12 ve anti-inflamatuvar sitokin IL-10'un transplantasyon sonrası artışının akut rejeksiyona bağlı olduğu görülmüştür (36).

Tez çalışmamızı, nakil sonrası organ reddi ile sitokin ilişkisinin incelendiği çalışmaları baz alarak tasarladık. Transplant adaylarının, transplantasyondan hemen önceki ve transplantasyon sonrasındaki immünolojik durumunun böbrek fonksiyonları üzerindeki etkisini inceledik. Nakil öncesi ve nakil sonrası hastalarında, mRNA düzeyinde immün yanıt ile ilişkili IL-2 sitokin geninin ekspresyonunu gerçek zamanlı PCR metodolojisi ile analiz ettik. Çalışmamızda yer alan hastaların nakil sonrası durumları da göz önüne alarak verilerimizi değerlendirdik.

Değerlendirilen 12 Hastada (1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17 numaralı örnekler) nakil sonrası 6. aya kadar rejeksiyon atağı görülmedi ve IL-2 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişim olmadığı tespit edildi. Transplantasyon öncesine göre IL-2 ekspresyonunda anlamlı bir değişimin olmamasından dolayı doku uyumu oranındaki artışın organ sağ kalımına katkı sağladığını düşünmekteyiz.

Örnek 6'da nakil sonrası ekspresyon seviyesi değişmedi, hastada rejeksiyon görülmedi. 4 numaralı örneğin nakil sonrası durumu değerlendirildiğinde; hastada 1. ayda rejeksiyon atağı görüldüğü bildirildi. Tedavi sonrası böbrek fonksiyonlarının düzeldiği belirtildi. Hastanın 6. ayında ekspresyon seviyesine bakıldığında anlamlı bir değişim gözlenmedi. 1. ayda geçirilen rejeksiyon atağından sonra yapılan tedavi sonrası immün yanıtın baskılandığı ve örnek alınan süre olan 6. aya kadar geçen

sürede IL-2 ekspresyon düzeyini arttırıcı bir immün yanıtın oluşmadığı düşünülmektedir.

Örnek 13 ve 16'da rejeksiyon atağı ile birlikte ekspresyon seviyelerinin de anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 13. örnekte 6. ayda ekspresyon çalışması yapıldı, hastanın 8. ayda rejeksiyon atağı geçirdiği belirtildi. Eşinden nakil olan hastanın 8. ay biyopsisinde T hücre aracılı rejeksiyon patoloji sonucu ile tespit edildi. Uygulanan tedavi sonucu greft fonksiyonuna devam etti. 16. örnek kadavra donörden nakil oldu ve hastada 6. Ayda örneklerimiz alındıktan sonra patoloji sonucuna göre antikor aracılı rejeksiyon tespit edildi. Tedavi ile greft fonksiyonu devam etti fakat hasta enfeksiyon sonucu kaybedildi. Rejeksiyon atağından önce ekspresyon seviyesindeki artışları yakalamamız, IL-2 ekspresyonun rejeksiyona dair biyobelirteç olabileceği öngörüsüne destek bir sonuç olabilir.

Değerlendirilen 5 Hastada (2, 10, 18, 19, 20 numaralı örnekler) rejeksiyon olmamasına rağmen ekspresyon seviyesinde artış gözlemlendi. Bu hastaların immünolojik durumlarının takibine devam edilmesi bu alanda yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

Örnek 21'in, 1.ayda patoloji sonucuna göre antikor aracılı rejeksiyon geçirdiği tespit edildi ve 6. ay örneği olmasına rağmen IL-2 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Rejeksiyon atağı sırasında ekspresyon seviyelerine bakılsaydı IL-2 seviyesinde daha yüksek kat artışları görülebilirdi. Hastada eski nakil öyküsü bulunmasının; hasta da kuvvetli bir immün yanıtın etkili olduğu ve bu durumun IL-2 ekspresyon seviyesindeki artış ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

Sonuçlarımızın genel değerlendirilmesi, IL-2 ekspresyon düzeyi ile rejeksiyon arasında ilişki olabileceğini göstermektedir.

Ateş ve arkadaşlarının 15 sağlıklı birey, 15 böbrek transplantasyonu hastası ile serum interlökin-2 reseptör (sIL-2R) düzeylerini ölçerek yaptıkları bir çalışmada transplantasyon sonrası organ fonksiyonu stabil olan hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak azalma, akut rejeksiyonlu hastalarda ise stabil organ fonksiyonlu

hastalara göre anlamlı olarak artış gözlemlenmiştir (37). Hücre bazda yaptığımız çalışma sonuçları serum düzeyinde yapılan bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Lessan-Pezeshki ve arkadaşlarının çalışmalarında 57 hastada TGF- β , IL-2, IFN γ sitokinlerini transplantasyon öncesi ve sonrası seviyelerinin belirlenmesi ile, allogreft reddinin erken teşhisini kolaylaştırabileceğini göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada nakilden 1 gün önce, nakil sonrası 1. hafta ve 2. haftada serum düzeyinde sitokin seviyelerine akut rejeksiyonu öngören anlamlı sonuçlar elde etmişlerdir (38). Bu çalışmada nakil sonrası kısa sürede sitokin ile akut rejeksiyon etkisine bakılırken çalışmamızda 6. ayda ekspresyon seviyesine bakarak uzun dönemde rejeksiyon etkileri hakkında öngörüle bulunması amaçlanmıştır. Gen ifadesindeki hassas değişimlerin serum seviyesine yansması daha güç olacağından uzun dönemde hücresel süreçlerin değerlendirilmesinin önemli olabileceği düşüncesindeyiz.

Millan ve arkadaşları, karaciğer ve böbrek alıcılarında IFN- γ , IL-17 ve IL-2 üretiminin ekspresyonunu hem transplantasyon hem de transplantasyon sonrası değerlendirmişlerdir (1. ve 2. hafta, 1., 2. ve 3. ay). Çalışmalarında 142 transplant hastası (63 karaciğer/79 böbrek) bulunmaktadır. 28 alıcıda (14 karaciğer/14 böbrek) akut rejeksiyon görmüşlerdir. CD4+CD69+ hücrelerinde ve CD8+CD69+ hücrelerinde % + IFN- γ 'nın transplantasyon öncesi ve sonrası hücre içi ifadesinin, CD8+ CD69+'da % + IL-2'nin transplantasyon öncesi ifadesinin akut rejeksiyonu tanımladığını göstermişlerdir (39). Bu çalışmanın sonuçları CD4+ T hücrelerinde IL-2 ekspresyon düzeyini belirlediğimiz çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Naderi ve arkadaşlarının donör tipini karşılaştırdıkları çalışmalarında, canlı donörden nakillerde kadavra donörlere göre organ sağkalım süresinin uzadığı ve akut rejeksiyon geçirme riskinin daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (40). Çalışmamızda kadavra donörden nakillerde rejeksiyon geçiren hasta sayısı daha fazladır ve IL-2 ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark vardır.

Vericiyle ilişkili konular arasında yaş, böbrek allogreftlerinin sonuçlarını olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerden biridir (41). Reutzel-Selke ve arkadaşları, donör yaşı ve böbrek fonksiyonu arasında başlangıçtan 2 yıla kadar

güçlü bir korelasyon bulmuşlardır (42). Daha yaşlı donörlerden alınan allogreftlerin genç donörlerden daha immünojenik olduğu bildirilmiştir (43, 44). Çalışmamızda yer alan hastaların yaş ortalaması 45 iken, donörlerin yaş ortalaması 41,3'tür. Çalışma grubumuzdaki en yaşlı donör 60 yaşındadır. Nakil yapılan hasta ile yaş farkı 25'tir. Nakil sonrası IL-2 ekspresyonu düzeyi artmış ve hastada rejeksiyon görülmemiştir. En genç donör ise 18 yaşındadır. Hasta ile arasında 31 yaş fark vardır. Nakil sonrası IL-2 ekspresyonu yüksek oranda artış görülürken hastada rejeksiyon görüldüğü gözlenmiştir.

Kalsiyum (Ca) miktarı hücresel fonksiyon için vücut içerisinde optimal aralıkta düzenlenir. Ca düzenleyici hormon parathormon ve vitamin D (vit D)'dir. Kemik, böbrek ve gastrointestinal sistem gibi hedef organlar üzerinde etkili olarak Ca miktarını düzenlerler. Ortalama diyet yaklaşık 1 gr Ca içerir, fakat geniş bir aralıkta olabilir. Glomerüllerden filtre edilir ve büyük çoğunluğu böbrek tübüllerinden geri emilir (45). İdrarda görülme oranı böbrek fonksiyonuyla ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda hasta klinik verileri değerlendirildiğinde; Ca ortalama değeri nakil öncesi yaklaşık 8,9 iken nakil sonrası 9,725 görüldü. Bu değerler klinikte kabul edilen referans değerleri arasındadır (Ref.Değ 8.8-10.6) ve rejeksiyonla ilişkili olarak nakil öncesi ve sonrasında fark gözlenmemiştir. Parathormon ortalama değeri nakil öncesi yaklaşık 405,86 iken nakil sonrası 142,3 görüldü. Nakil öncesi ve sonrası değerleri referans değerleri dışındadır (Ref.Değ 15-88). Bu veriler rejeksiyonla ilişkilendirilmedi.

Böbrek naklinden sonraki sonuçlar, birçok immünolojik ve immünolojik olmayan faktöre bağlıdır. Böbrek nakilli hastalarda kronik üremi ve böbrek nakli tedavisinin neden olduğu immün düzensizlik görülmektedir (46). Üreminin sitokin sentezini etkilediği bilinmektedir (47). Çalışmamızda yer alan hasta grubunun üre ortalama değeri nakil öncesi yaklaşık 115,35 iken nakil sonrası 54,25 görüldü. Nakil sonrası üre değerlerine bakıldığında her hastada iyileşme görüldü fakat üre değerleri IL-2 ekspresyonu ile ilişkilendirilemedi.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda IL-2 ekspresyonu ile rejeksiyon arasında ilişki olabileceği gözlemlendi.

Rejeksiyon olmayan 12 hastada IL-2 ekspresyon seviyesinin azaldığı 1 hastada değişmediği gözlemlendi. İmmünsüpresiflerin immün yanıt üzerindeki etkisi ile IL-2 ekspresyonunun azaldığı düşünülmektedir.

Rejeksiyon olmayan fakat IL-2 ekspresyon seviyesinde artış görülen 5 hastanın ise takibi devam edilerek rejeksiyon riski değerlendirilmesi yapılmalıdır.

Rejeksiyon görülen 3 hastada ise IL-2 ekspresyon seviyesi artış göstererek beklenildiği gibi IL-2 ekspresyonundaki artışın T hücre çoğalmasına ve farklılaşmasını sağlayarak organ reddine sebep olduğu görüşüyle paralellik gösterdi.

Bu veriler doğrultusunda, IL-2 ekspresyonu ve akut rejeksiyon arasındaki ilişki hakkında daha kesin yorumlar yapılabilmesi için; mRNA düzeyinde ekspresyonu incelenen IL-2 geninin aynı koşullar altında protein düzeyindeki olası değişimlerinin de etkisine bakılabilir. Hastalardan daha sık aralıklarla örnek alınarak rejeksiyon ile ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki araştırılabilir. Aynı hasta gruplarında farklı sitokinlerin ekspresyonlarının etkilerine bakılabilir. IL-2 geninin epigenetik düzenlenmesi incelenebilir. Daha fazla sayıda hastayı içeren bir çalışma ile anlamlılık düzeyi arttırılabilir.

KAYNAKLAR

1. University of California San Francisco's web site_
<https://transplant.surgery.ucsf.edu/conditions--procedures/kidneytransplant.aspx>
(14.12.2017)
2. Dr. Faruk Turgut and Dr. Sanjay Pandya Kidney Education's web site
<http://kidneyeducation.com/FileDownload.ashx?filename=/Download/Turkish/Kidney-Book-in-Turkish.pdf&lang=Turkish&typ=1> (17.05.2018)
3. Latchman DS. Transcriptional Gene Regulation in Eukaryotes. The Encyclopedia of Life Sciences 2011;
4. Soysal Y, Tosun M. Transplantasyon ve Genetik. *Turkiye Klinikleri J Gen Surg-Special Topics* 2013; 6:(1)
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell* (6 th ed), Garland Science, New York, 2015: 1342.
6. Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, et al. The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 2003; 20(9):1377–1419.
7. CSLS/The University of Tokyo's web site
http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/04_03.html (25.07.2018)
8. Shandilya JL, Roberts SG. The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1819(5):391-400.
9. Gao Z, Herrera-Carrilo E, Berkhout B. RNA Polymerase II Activity of Type 3 Pol III Promoters. *Molecular Therapy: Nucleic Acids* 2018; 12: 135-145
10. Kapp LD, Lorsch JR. The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73: 657–704.
11. Ingulli E. Mechanism of Cellular Rejection in Transplantation. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 61-74.
12. Batchelor JR, Lechler RI. Why MHC incompatible grafts induce strong primary alloimmunity. *Transplant Proc* 1982; 14(3): 535-7.
13. Clatworthy MR. Targeting B Cells and Antibody in Transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 1359-1367.
14. Düzgün N. İmmün Sistemin Tanıtımı. *Ankara Üniversitesi İç Hast Romatoloji.* 2014; 97–122.
15. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; 2012; 2012:925135.
16. Khan MM. *Immunopharmacology* (2nd ed), Springer, Boston, 2016:442

17. Prof. Dr. Cengiz Kırmaz's web site <http://www.alerjiklinigi.com/immun-sistem> (29.07.2018)
18. Kamoun M. Cellular and Molecular Parameters in Human Renal Allograft Rejection. *Clinical Biochemistry* 2001; 34: 29–34.
19. Benczik M, Gaffen SL. The Interleukin (IL)-2 Family Cytokines: Survival and Proliferation Signaling Pathways in T Lymphocytes. *Immunological Investigations* 2004; 33: 109–142,
20. Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, et al. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *PNAS* 2004; 101: 3880–3885.
21. Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. Stat5 Activation Plays a Critical Role in Th2 Differentiation. *Immunity* 2003; 19: 739–748.
22. Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2006; 17: 349–366.
23. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T Cells. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 1616–1626.
24. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 2006; 441:890–893.
25. Wuest TY, Willette-Brown J, Durum SK, Hurwitz AA. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84: 973–980.
26. Waldmann TA, Chen J. Disorders of the JAK/STAT Pathway in T Cell Lymphoma Pathogenesis: Implications for Immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 2017; 35: 533-50
27. Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJH. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 2003; 52:144–151
28. Yu TK, Caudell EG, Smid C, Grimm EA. IL-2 Activation of NK Cells: Involvement of MKK1/2/ERK But Not p38 Kinase Pathway. *J Immunol* 2000; 164: 6244-6251.
29. Walsh PT, Strom TB, Turka LA. Routes to Transplant Review Tolerance versus Rejection: The Role of Cytokines. *Immunity.* 2004; 20(2): 121–131.
30. Ertosun MG, Özkan Ö, Özkan Ö. Organ Redlerine Işık Tutabilecek Nakiller: Kompozit Doku Nakilleri. *Akd Tıp D* 2015; 2: 77-84.
31. Sadeghi M, Daniel V, Weimer R, et al. Pre-transplant Th1 and post-transplant Th2 cytokine patterns are associated with early acute rejection in renal transplant recipients. *Clinical Transplantation* 2003; 17: 151–157.

32. Hu H, Knetchle SJ. Elevation of multiple cytokines/chemokines in urine of human renal transplant recipients with acute and chronic injuries: potential usage for diagnosis and monitoring. *Transpl Rev* 2006; 20:165- 71.
33. Cardoni RL, Prigoshin N, Tambutti ML, Ferraris JR. Regulatory cytoquines in the response to the allogeneic renal transplant. *Medicina* 2005; 65:54-62.
34. Yamada K, Hatakeyama E, Arita S, et al. Prediction of chronic renal allograft dysfunction from evaluation of TGF β -1 and the renin-angiotensin system. *Clin Exp Nephrol* 2003; 7:238-42.
35. Berber I, Yiğit B, Isitmangil G. et al. Evaluation of pretransplant serum cytokine levels in renal transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 2008; 40: 92–93.
36. Fitzgerald JT, Johnson JR, Perez RV. Pre-transplant elevations of interleukin-12 and interleukin-10 are associated with acute rejection after renal transplantation. *Clinical Transplantation* 2004; 18: 434–439.
37. Ateş K, Aylı D, Duranay M, et al. Böbrek Transplantasyonu Yapılan Hastalarda Serum Solubl İnterlökin-2 Reseptör Düzeyi Ölçümünün Akut Rejeksiyon Tanısındaki Değeri. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1995; 1: 21-24.
38. Lessan-Pezeshki M, Amirzargar A, Fathi A. Value of pretransplantation cytokine profiles for predicting acute rejection in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2005; 37(7): 2982-4.
39. Millán O, Rafael-Valdivia L, San Segundo D. Should IFN- γ , IL-17 and IL-2 be considered predictive biomarkers of acute rejection in liver and kidney transplant? Results of a multicentric study. *Clin Immunol.* 2014; 154(2):141-54.
40. Naderi GH, Mehraban D, Kazemeyni SM, et al. Living or deceased donor kidney transplantation: a comparison of results and survival rates among Iranian patients. *Transplant Proc.* 2009; 41(7): 2772-4.
41. Oppenheimer F, Aljama P, Peinado CA, et al. The impact of donor age on the results of renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2004; 19: 11–5.
42. Reutzel-Selke A, Jurisch A, Denecke C, et al. Donor age intensifies the early immune response after transplantation. *Kidney International* 2007; 71: 629–636.
43. Pratschke J, Merk V, Reutzel-Selke A, et al. Potent early immune response after kidney transplantation in patients of the European senior transplant program. *Transplantation* 2009; 87: 992–1000.

44. Hricik DE, Poggio ED, Woodside KJ, et al. Effects of cellular sensitization and donor age on acute rejection and graft function after deceased-donor kidney transplantation. *Transplantation* 2013; 95: 1254–1258.
45. Shaker JL, Deftos L. Calcium and phosphate homeostasis. In: DenGroot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al (eds). *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000- 2014 Apr 11
46. Zager RA, Johnson ACM, Lund S. Uremia impacts renal inflammatory cytokine gene expression in the setting of experimental acute kidney injury. *American Journal of Physiology—Renal Physiology* 2009; 297: 961–970.
47. Stomp'or T, Pasowicz M, Sułowicz W, et al. An association between coronary artery calcification score, lipid profile, and selected markers of chronic inflammation in ESRD patients treated with peritoneal dialysis. *American Journal of Kidney Diseases* 2003; 41: 203–211.

EKLER

Ek 1.



İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İmmün yanıtta rol alan sitokin genleri (Inf gamma, IL17, IL4, IL2) metilasyon profillerinin ve ekspresyonlarının transplantasyon öncesi ve sonrası araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Atatürk Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Poliklinik 1. Kat F2058 numaralı oda Karabağlar 35360 İZMİR
	TELEFON	0232 245 04 38
	FAKS	0232 245 04 38
	E-POSTA	ikeetik@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Erhan TATAR		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Nefroloji		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi		
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	--		
	DESTEKLEYİCİ	--		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	--		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	--		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
FAZ 4		<input type="checkbox"/>		
Görsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>		
Diger ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı:
Yrd. Doç. Dr. Burç KARADAŞ
İmza:

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		İmmün yanıtta rol alan sitokin genleri (Inf gamma, IL17, IL4, IL2) metilasyon profillerinin ve ekspresyonlarının transplantasyon öncesi ve sonrası araştırılması			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		-			
DEĞERLEN DİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası		Dil
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	21.03.2017	1		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	21.03.2017	1		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	21.03.2017	1		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	-		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	21.03.2017	1	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	-		
	İLAN	<input type="checkbox"/>	-		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	-		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	-		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	-		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>	-			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 55	Tarih: 08.06.2017			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili 13.04.2017 tarihli etik kurul toplantısında istenen düzenlemeler araştırmacılar tarafından yapılmış uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmaları/çalışmaları için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.				

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Yrd. Doç. Dr. Barış KARADAŞ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Yrd. Doç. Dr. Barış KARADAŞ / Başkan	Tıbbi Farmakoloji	İKÇÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nihal OLGAC DÜNDAR / Başkan Yardımcısı	Çocuk Nörolojisi	İKÇÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet ÖZEREN	Kadın Hastalıkları ve Doğum	İKÇÜTEAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Servet AKAR	İç Hastalıkları/ Romatoloji	İKÇÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Abdü SAĞCAN	Kardiyoloji	Kent Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Koşhan Barış BAYRAM	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	İKÇÜ ATATÜRK EAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hatice Sabiha TÜRE	Nöroloji	İKÇÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI			İmmün yanıtta rol alan sitokin genleri (Inf gamma, IL17, IL4, IL2) metilasyon profillerinin ve ekspresyonlarının transplantasyon öncesi ve sonrası araştırılması						
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU			-						
Yrd. Doç. Dr. Utku Kürşat ERCAN	Biyomedikal Mühendisliği	İKÇÖMMF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Melih Kaan SÖZMEN	Halk Sağlığı	İKÇÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av. Fatma GÖLMEZOĞLU	Hukuk	İKÇÜ	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Meral MEHREKULA	Sivil	İKÇÜ ATATÖRK EAH	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı:
Yrd. Doç. Dr. Barış KARADAŞ
İmza:



ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğretimimi bu şehirde tamamladım. Lise eğitimimi Elazığ Çubuk Bey Anadolu lisesinde bitirdim. Üniversite eğitimime 2010 yılında İzmir'de Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde başladım. Üniversite öğretimim sırasında Erasmus Programı kapsamında 5 ay süre ile Polonya Bydgoszcz UTP Teknoloji ve Yaşam Bilimleri Üniversitesi'nde ve 1 ay Krakow Ekonomi Üniversitesi'nde eğitim aldım. Bölümüm ile ilgili stajımı 2014 yılında İlko İlaç San. Ve Tic. A.Ş.'de kalite kontrol mühendisi olarak gerçekleştirdim. 2016 yılı Ocak ayında lisans eğitimimi bitirdim ve İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimimi yapmaktayım. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası ve Araştırma Deneyim Sertifikasına sahibim. Temel düzeyde Matlab ve Visual Basic ile ileri düzeyde Office programları kullanabilmekte ve iyi düzeyde İngilizce, başlangıç düzeyinde ise Almanca ve Lehçe bilmekteyim.