

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**RENAL TRANSPLANTASYON ÖNCESİ
İMMUNOSUPRESANLARA HASSASİYETİN
HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

(Yüksek Lisans Tezi)

107619

Bio. Hayriye ŞENTÜRK

Danışman:
Doç. Dr. Saliha Gülay SÖNMEZ

İstanbul-2001

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden beri bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mahmut ÇARİN'e,

Yüksek Lisans Eğitimim boyunca yardımlarından dolayı Danışmanım Saliha Gülay SÖNMEZ'e,

Tez çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Filiz AYDIN'a, Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN'e, Araş.Gör.Dr Selvi KAYA'ya ve yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Eğitim yaşıntımda bana her konuda destek olan Annem ve Babama,

Tez çalışmalarım süresince benden desteğini esirgemeyen ve yardımcı olan Dr. Cemal ÇİFTÇİ'ye,

Sevgi ve Teşekkürler

Hayriye ŞENTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
1. İmmun Sistem.....	3
1.1. T Lenfositleri.....	3
1.2. B Lenfositleri.....	5
1.3. Antijen Sunan Hücreler	5
2. Major Histokompatibilite Kompleksi	6
2.1. MHC Sınıf I Gen Bölgesi	7
2.2. MHC Sınıf II Gen Bölgesi	7
2.3. MHC Sınıf III Gen Bölgesi	8
3. İmmun Yanıt.....	8
4. Sitokinler	10
4.1. İnterlökin-2 (IL-2)	11
5. Mitojenler	13
6. Kronik Böbrek Yetmezliği	14
7. Böbrek Transplantasyonu	15
8. Böbrek Transplantasyonunda İmmüsupresif Tedavi	17
8.1. Kortikosteroidler	18
8.2. Azatioprin (Aza).....	19
8.3. Siklosporin-A (Cyc-A).....	20
8.4. Takrolimus (FK506)	21
8.5. Mikofenolat Mofetil (MMF)	22
9. Karışık Lenfosit Kültür (MLC).....	24
III. GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
1. Hasta Grubu	26
2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	27
2.1. Cihazlar	27
2.2. Kimyasal Maddeler	27
2.3. Diğer Malzemeler	28
3. Yöntem	28
IV. BULGULAR	31

V. TARTIŞMA	41
VI. ÖZET	48
VII. SUMMARY	50
VIII. KAYNAKLAR	52
IX. ÖZGEÇMİŞ	61



I. GİRİŞ ve AMAÇ

Transplantasyon; son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların bir çoğunda, iyi yaşam kalitesi şansını veren ve bazı durumlarda hastanın yaşamasının tek yolu olan başarılı bir tedavi şekli olarak değerlendirilmektedir (1). İlk başarılı böbrek transplantasyonu 1954'te yapılmıştır (2,3). 1960' lı yıllardan bu yana böbrek transplantasyonu, kronik böbrek yetmezliği olan birçok hastanın sağlıklı ve uzun bir hayat sürmesini sağlamıştır (4).

Alıcı ve vericinin transplantasyon öncesi immünolojik değerlendirmesi; ABO kan grupları, doku uygunluk testi (Human Leukocyte Antigens=HLA) ile doku gruplarının uyumu, HLA antijenlerine karşı hassasiyet, viral seroloji, sitomegalovirüs'ü kapsamaktadır (5). Bilindiği gibi nakledilen dokunun veya organın, kabul ya da red edilmesi, HLA genleri tarafından kodlanan proteinlerin kontrolü altındadır (6,7).

Bunun yanında böbrek nakli olacak hastanın daha önceden yapılmış ve red olmuş transplantasyonları kadar, gebelik ve kan transfüzyonlarından dolayı herhangi bir HLA antijenine karşı immünize olup olmadığının araştırılması da büyük önem taşımaktadır. Bu araştırmalar yapılmadan gerçekleştirilen transplantasyonlarda hiperakut rejeksiyonlar görülebilmektedir. Bir hastanın serumunda HLA antijenlerine karşı antikörlerin varlığının saptanması için Screening (tarama) testi yapılmaktadır ve bu antikörler da Panel Reaktif Antikörler (PRA) olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca verici HLA antijenlerine karşı var olan herhangi bir antikörün belirlenmesi amacıyla crossmatch test uygulanmaktadır (8).

Nakledilen organ organizma tarafından kabul edilmediği zaman, T hücreleri sitokin adı verilen maddeler salgırlar. Bunların en önemlisi olan interlökin-2 (IL-2), nakledilen organın reddinde rol oynayan hücrelerin aktif hale geçmesini ve çoğalmasını sağlamaktadır. Sitokinlerin etkilerini engellemek için çeşitli tedaviler uygulanmaktadır. Bu tedavilerde antijene spesifik ve antijene spesifik olmayan ajanlar

kullanılmaktadır (9). Transplantasyon sonrası immüsupresif tedavi, nakledilen doku veya organın alıcıda uzun süre yaşaması için önemlidir. İmmüsupresif ajanların dört büyük tipi kullanılmaktadır. Bunlar; anti-lenfosit tedavi, anti-metabolitler, glukokortikoidler ve kalsinörin inhibitörleridir (3).

Son yıllarda bilinen immüsupresif ajanlardan Metil-Prednizolon (Prednol-L), Azatioprin (Imuran) ve Siklosporin-A (Neoral)'in yanısıra FK506-Takrolimus (Prograf), Mikofenolat Mofetil (Cell Cept) gibi yeni immüsupresifler de kullanıma sunulmuştur. Pek çok yeni immüsupresifin geliştirilmesi, akut rejeksiyon insidansının azaltılması ve graft survisinin artırılması konusunda ümit vadetmektedir (10).

Çeşitli araştırmacılar ise immüsupresif ajanların etkinliklerini görmek amacıyla, standart Karışık Lenfosit Kültür (standart Mixed Lymphocyte Culture = sMLC) testte lenfositlerin proliferasyon cevaplarını tespit ederek değerlendirmeye çalışmışlardır (11).

Bu çalışmada, transplantasyona hazırlık aşamasında olan hasta ve verici çiftlerine sMLC testini uyguladık. sMLC testine paralel olarak, kültürü yapılan hücre kombinasyonlarına phytohemagglutinin (PHA) ekleyerek stimüle ettik. Ayrıca stimüle edilen MLC serileri açarak, immüsupresif ajanlardan Siklosporin-A, Takrolimus, Mikofenolat Mofetil, Metil Prednizolon ve Azatiopriini, tek ve kombinasyonlar şeklinde, stimüle edilmiş hücreleri içeren kuyulara ekledik. PHA ile stimüle edilen lenfosit proliferasyonunun, immüsupresif ajanlar tarafından inhibisyonunu değerlendirmeye çalıştık. Bu immüsupresif ajanlara karşı duyarlılık ve dirençliliği saptayarak, hastalara transplantasyon sonrası uygulanacak immüsupresif tedavide yardımcı olmayı amaçladık.

II.GENEL BİLGİLER

1. İMMÜN SİSTEM

İmmün sistem, ortamdaki sayısız enfeksiyon etkenlerine karşı organizmayı koruma mekanizmasını oluşturmaktadır. İmmün sistem hem enfeksiyonlara karşı hem de enfeksiyon kaynağı olmayan yabancı maddelere karşı yanıt meydana getirecek spesifik ve nonspesifik unsurlara sahiptir (12). Nonspesifik immünite, temelde hastalıklara karşı direnç oluşturacak şekilde bireyin doğumu ile birlikte ortaya çıkan bir korunma sistemidir. Nonspesifik immünite çeşitli savunma engellerini kapsamaktadır. Bunlar inflamatuvar, fagositik, endositik, fizyolojik ve anatomiktir. Spesifik immünite de ise, lenfositler ve diğer immün sistem hücreleri tarafından salgılanan sitokinler aracılığı ile immün sistem aktive edilmektedir. Spesifik immünitede yabancı mikroorganizmalar ve moleküller spesifik olarak tanınmakta ve seçici olarak elimine edilmektedir. Nonspesifik immüniteden farklı olarak spesifik immünitede dört temel özellik vardır:

- a) Antijeni spesifik olarak tanıma,
- b) Farklılaşma,
- c) İmmünolojik hafıza,
- d) Organizmanın kendinden olan ile olmayana ayırması (Self ve nonself ayrım) (13).

Lenfositler ve antijen sunan hücreler immün yanıtta rol oynayan en önemli hücrelerdir. Morfolojik olarak benzer olan, birbirinden bağımsız olarak gelişen, görevleri ve yapıları farklı olan iki tip lenfosit bulunmaktadır. Bunlar; T ve B lenfositlerdir (13,14).

1.1. T Lenfositler:

Kanda dolaşan lenfositlerin % 70 - 80 kadarnı oluştururlar. T lenfositleri, kemik iliğinde hematopoietik kök hücrelerden meydana gelmekte ve timosit hücreleri olarak kemik iliğinden timusa göç edip burada olgunlaşmaktadırlar (13,15). Olgunlaşmaları sırasında farklılaşma geçirerek, antijenleri tanımaları için gerekli olan glikoprotein yapıda yüzey reseptörlerini (cluster of differentiation- CD) kazanırlar (12,13).

T lenfositleri yüzeyinde bulunan T hücre reseptör kompleksi, iki farklı yapıdan oluşur. Bunlar; T Cell Receptor (TCR) ve CD3'tür. TCR 100 kD ağırlığında olup, immünglobulinler (Ig) gibi, değişken (V) ve sabit (C) domainlerden oluşmuş, heterodimer yapıda bir çift polipeptid zincirden meydana gelmiştir. % 95'i $\alpha\beta$, % 5'i $\gamma\delta$ heterodimeridir. TCR, antijenleri özgül olarak tanıyabilmektedir. CD3 ise her biri 21-26 kD ağırlığındaki 3 membran proteininden oluşmuştur. CD3 kompleksi $\gamma, \epsilon, \delta, \zeta, \eta$ zincirlerin dimer oluşturması ile meydana gelir. η zinciri ile ζ zinciri aynı genden orijin alır. RNA splicing'deki farklılıktan dolayı karboksil terminal uçlarında farklılık vardır. ζ ve η diğerlerinden farklı olarak kısa (9 aa.) external bölge, transmembran bölge ve uzun bir internal kuyruğa sahiptir. İnternal kuyruk, η 'da 113 aa., ζ 'da ise 155 aa. dir. CD3'ün transmembran bölgesindeki aspartik asit moleküle (-) yük kazandırır. Bu özellikle, CD3'ün TCR'nin transmembran bölgesinde (+) yüklü olan 1 ya da 2 aa. ile etkileşimini sağlar. CD3'ün sitoplazmik kuyrukları, İmmünreseptör Tyrosine based Aktivasyon Motif (ITAM) adı verilen bir motif içerir. Bunların sinyal iletilmesinde önemli rolleri vardır. Tirozin kinazlar ile etkileşmektedirler. CD3 molekülünün antijenik sinyali, internal kuyruk aracılığı ile hücre içine ilettiği kabul edilmektedir (13).

T hücre reseptörleri, antijenleri serbest olarak tanıyamaz, ancak yabancı antijeni Major Histocompatibility Complex (MHC) molekülleriyle birlikte kompleks halinde sunulduğunda tanır. T hücreleri yüzeylerindeki CD reseptörleri genelde CD2, CD3 ve CD5 olarak tanımlanırlarken, alt grupları $CD4^+$ ve $CD8^+$ olarak ayırım gösterir. T helper (Th) lenfositler $CD4^+$ moleküllerini, T sitotoksik/supresör (Tc/Ts) lenfositler $CD8^+$ moleküllerini yüzeylerinde taşırlar (15).

Th lenfositleri, MHC sınıf II reseptörleri ile birlikte sunulan antijenik determinantları tanır ve hücrel immün yanıtı başlatırlar. B lenfositler, Tc lenfositler, Ts lenfositler, makrofajlar ve diğer hücreler aktive olur ve çeşitli sitokinlerin salgılanmasını sağlarlar.

Tc lenfositler yabancı organizmalara (virus, tümör hücresi, yabancı doku hücresi, parazit) doğrudan saldırarak onları lize eder ve ölümüne neden olur.

Ts lenfositler ise, T ve B lenfositlerin fonksiyonlarını baskılayarak immün yanıtı düzenlerler (14).

1.2. B Lenfositler:

B lenfositleri, kemik iliğinde hematopoietik kök hücrelerden gelişimlerine başlar ve memelilerde (insanda) burada olgunlaşmalarını tamamlarlar. Hümmoral immüniteden sorumlu hücrelerdir.

B hücreleri yüzeylerinde reseptör olarak glikoprotein yapıdaki Ig moleküllerini taşırlar. B lenfositlerinin yüzeyinde IgM, IgD ve IgG'nin Fc kısmına karşı reseptörler vardır. Yüzeylerinde Ig moleküllerini taşıyan B hücreleri, antijenik bir uyarı aldıkları zaman, aktive T hücreleri ve makrofajlardan salınan çoğalma ve farklılaşma faktörlerinin etkisi altında proliferere olurlar ve plazma hücrelerine dönüşerek antikor salgırlarlar (15,16).

1.3 Antijen Sunan Hücreler:

T hücrelerinin aktivasyonu için, özelleşmiş bir grup hücre tarafından antijenin onlara sunulması gerekir. Bu hücreler antijen sunan hücreler =ASH (Antigen Presenting Cells= APC) olarak isimlendirilir. ASH'ler kemik iliğinden köken alırlar. Bunlar: Makrofajlar, Dendritik hücreler, Langerhans hücreleri, Parmaksı (interdigitating) hücreler ve B hücreleridir.

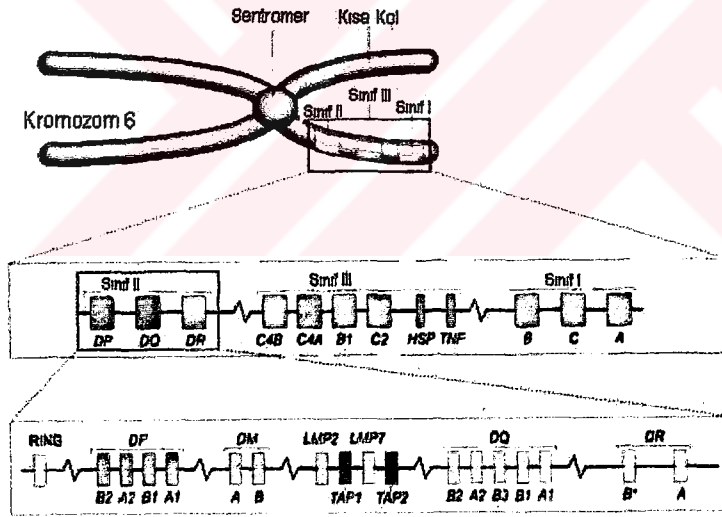
Antijen sunan hücrelerin özellikleri;

- Antijenik peptidleri işleyerek epitoplari sunar.
- Yabancı antijenleri lenf nodlarına taşır.
- T hücrelerinin yüzeyindeki moleküller için aksesuar adezyon molekülleri bulundurarak ve TCR'nün peptid-MHC kompleksine bağlanmasında spesifik bir stabilite sağlayarak etkin bir hücre-hücre etkileşimine izin verir.
- Yardımcı uyarı (Ko-stimülatör) ile T hücrelerin aktivasyonuna yardım eder (13).

2. MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX

Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex-MHC), hücre yüzey glikoproteinlerini kodlayan polimorfik genlerin bulunduğu kromozom bölgesidir (17). MHC gen bölgesi insanda 6. kromozomun kısa kolu (6p21.3) üzerinde 4 santimorgan uzunluğundadır ve yaklaşık olarak 4 kilobazlık yer kaplamaktadır (18,19).

MHC gen bölgesi ilk kez 1930 yılında deneysel olarak yapılan doku transplantasyonları sırasında keşfedilmiştir (20). 1958'de Dausset tarafından bu genlerin ürünleri olan moleküller tanımlanmıştır (21). Aynı yıl van Rood ve arkadaşları birden fazla kan transfüzyonu yapılmış kişilerin ve çok doğum yapmış kadınların serumlarında lökositlere karşı oluşmuş antikorları göstermişlerdir (22). MHC gen bölgesi ürünleri olan ilk doku antijenleri lökositlerin yüzeyinde tespit edildiğinden insan lökosit antijenleri (Human Leucocyte Antigens=HLA) olarak tanımlanmışlardır (23).



Şekil 1: MHC gen bölgesi (Peakmen and Vergani)

MHC gen bölgesi çeşitli hücrelerin yüzeyinde var olan proteinleri kodlayan gen gruplarını içerir. Bu proteinler graft rejeksiyonların temel belirleyicileridir. Bu nedenle aynı MHC moleküllerini taşıyan bireyler birbirlerinin doku graftlarını kabul edebilirler. Farklı MHC gen bölgelerine sahip bireyler arasında ise graft reddi gerçekleşebilir (23).

MHC yapı ve fonksiyonları birbirinden farklı olan üç ayrı gen bölgesini içermektedir (24).

2.1. MHC Sınıf I Gen Bölgesi:

MHC Sınıf I molekülleri, bütün çekirdekli hücrelerde bulunmaktadır. Bu bölgede HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -J ve -X lokusları bulunur. HLA -A, -B, -C lokusları klasik sınıf I lokusu olarak bilinir, polimorfik ve fonksiyoneldir. HLA -E, -F, -G, -H ve -J lokuslar non klasik (klasik olmayan) sınıf I lokusları olarak bilinirler. Bunlar pseudogen (yalancı gen) olup herhangi bir protein ürünü kodlamazlar (25).

MHC Sınıf I molekülleri iki ayrı polipeptid zincirden oluşmuşlardır. Bunlardan α polipeptid zinciri 44 kD ağırlığında ve 338 amino asit (aa) uzunluğunda birbirine disülfid köprüleri ile bağlı üç domeinden oluşur. α zinciri amino ucundan başlayarak, ekstrasellüler hidrofilik bölge (1-281 aa), transmembran hidrofobik bölge (282-306 aa) ve intrasellüler hidrofilik bölge (307-338 aa)'lerden oluşur. Ekstrasellüler bölge α_1 , α_2 ve α_3 olmak üzere 3 domainden meydana gelmiştir. Bu bölgedeki α_1 ve α_2 domainleri peptid bağlama bölgesidir. Molekülün yapısındaki ikinci zincir olan β_2 mikroglobulin zinciri 15. kromozomdan gelen 12 kD ağırlığında küçük bir protein molekülüdür. Her iki zincir birbirine nonkovalent olarak bağlanmaktadır (24,26).

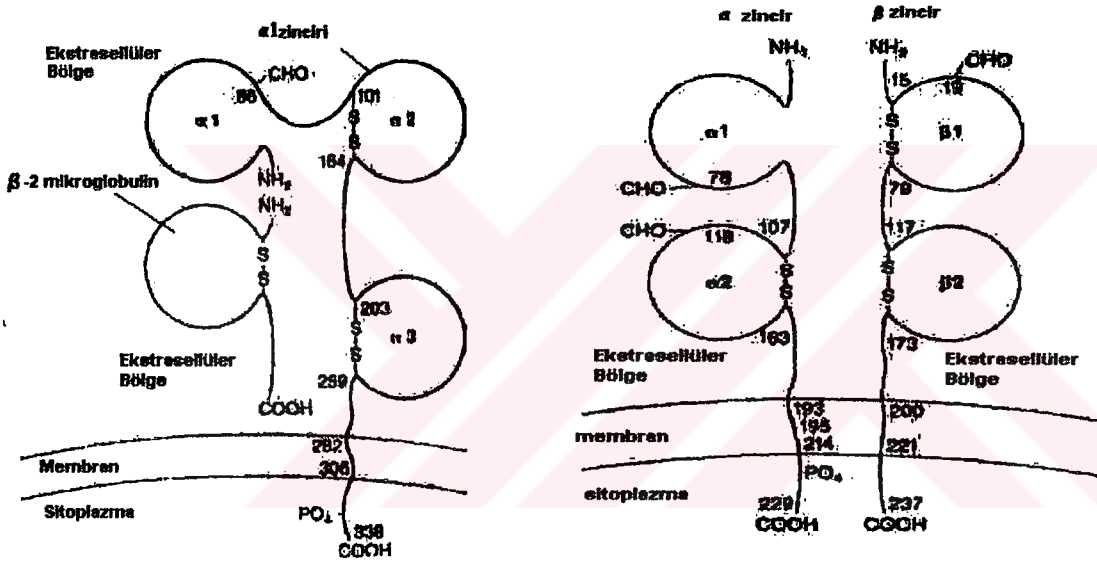
2. 2. MHC Sınıf II Gen Bölgesi:

MHC Sınıf II molekülleri HLA -DM, -DN, -DO, -DP, -DQ ve -DR olmak üzere altı farklı lokusdan oluşmuştur. HLA -DM, -DN, -DO pseudogendir (19). İkinci sınıf antijenler özellikle B lenfositlerde, makrofajlarda, dendritik hücrelerde, endotel hücrelerde ve aktive T hücrelerinde bulunur. MHC Sınıf II molekülleri, heterodimer olup nonkovalent birbirine bağlanan α ve β polipeptidlerinden oluşmaktadır. α zinciri 32-34 kD ağırlığında, β zinciri ise 29-32 kD ağırlığındadır (25).

MHC Sınıf II moleküller α ve β primer aa dizisine ve kristal yapısına göre dört bölgeye ayrılır.

- a) Amino terminal ekstrasellüler peptid bağlayan bölge,
- b) Ekstrasellüler Ig benzeri bölge,
- c) Transmembran bölge,
- d) Sitoplazmik bölge.

Bu zincirlerin hücre dışındaki kalan parçalarında 90 aa'lık $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ ile $\beta 1$ ve $\beta 2$ olmak üzere ikişer domain ayırılmaktadır. Peptid bağlama bölgesi, $\alpha 1$ ve $\beta 1$ domainlerinin karşılıklı etkileşimleri sonucu oluşur. 2. bölgede, $\alpha 2$ ve $\beta 2$ domainleri Ig domainleri gibi birbirine bağlanmışlardır. 25 aa'lık hidrofobik kısımdan oluşan transmembran bölgeyi hidrofilik özellikteki sitoplazmik bölge izler (17).



Şekil 2: MHC Sınıf I ve II Molekül Yapısı (Stites, Terr, Parslow)

2.3. MHC Sınıf III Gen Bölgesi:

Kompleman komponentleri, polimorfizm gösteren sınıf III bölgesindeki kompleman lokusu tarafından tanımlanırlar. Sınıf I ve II gen bölgeleri arasında yer almıştır. Bu bölgede, kompleman genleri (C2, C4 ve Faktör B), tümör nekrozis faktör üyeleri (TNF- α , TNF- β , LTA, LTB) ve ısı şok proteinlerini kodlayan genler bulunmaktadır (27,28).

3. İMMÜN YANIT

İmmün yanıt birçok hücrenin rol aldığı kompleks bir olaydır. Hücresel immün sistemin aktif hale gelmesi; konak organizmaya bir antijenin

girmesi, ASH'ler tarafından işlenerek lenfositlere sunulması ve lenfositler tarafından tanınmasıyla başlamaktadır (15,29).

ASH'ler tarafından hücre içine alınan antijenler, hücre fagolizozomları içinde proteolitik enzimler yardımıyla işlenerek, küçük peptid parçaları halinde, T lenfositleri tarafından tanınabilecek forma getirilirler.

Antijen, ASH yüzeyinde MHC molekülleri ile birlikte sunulduğunda T hücreleri tarafından tanınır. MHC Sınıf I molekülü ile sunulan antijen, CD8⁺ molekülünü taşıyan Tc hücreleri tarafından, MHC Sınıf II molekülü ile sunulan antijen ise CD4⁺ molekülünü taşıyan Th hücreleri tarafından tanınır. Th hücreleri uyarıldıklarında sitokin salgılayarak, immün sistem hücrelerini uyarır ve hücrel immün yanıtı oluşturur.

T hücre aktivasyonu immün cevabın erken döneminde oluşur. Aktivasyonun meydana gelebilmesi için, en az iki sinyal gerekmektedir. Birinci sinyal ASH yüzeyindeki antijenik peptid-MHC kompleksine TCR'nün bağlanmasıyla sağlanır ve uyarı CD3 protein kompleksi aracılığı ile iletilir. ASH ile antijene spesifik Th hücrelerinin arasındaki etkileşim sonucu ASH'den IL-1 salgınır. IL-1, MHC sınıf II moleküllerinin yüzey ekspresyonunu ve çeşitli adezyon moleküllerinin artmasını sağlar. İkinci sinyal de ASH ile bağlantıyı gerektirir. Bu etkileşim, T hücre yüzeyindeki CD28 ile ASH yüzey proteini B7'nin bağlantı kurması ile sağlanır. Buna ko-stimülatör sinyal de denmektedir.

ASH ve T hücresi arasındaki reseptörler aracılığı ile oluşan temas, membrandaki reseptörün aktivasyonu sonucu, fosfatidilinositoldifosfatın, fosfodiesterazlarla, Inositol-3-fosfat (IP3) ve Diasil Gliserol'e (DAG) hidrolize olmasına yol açar. IP3, hücre içine Ca⁺⁺ akışını sağlar, DAG ise protein kinaz aktivasyonunu tetikler ve sinyal bir dizi kimyasal olay sonucu nükleusa iletilir. Bunun sonucunda IL-2 ve IL-2 reseptör (IL-2R) genlerinin aktivasyonu hızla gerçekleşir. Bu yolla uyarılan T lenfositlerinden salgılan IL-2, hücrenin yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak T lenfosit aktivasyonunu ve mitozla hücre klonunun genişlemesini sağlar. IL-2'nin yanında IL-3, IL-4, IL-5, İnterferon gamma (IFN γ) ve Tümör Nekrozis Faktör (TNF) gibi sitokinleri salgılayan T

Genel özellikleri;

- Sitokinler 30 kD ağırlıktan daha az, glikoprotein yapıda düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir.
- Sitokinler 10^{-10} - 10^{-12} M konsantrasyonlarda biyolojik olarak aktiftirler.
- Sitokinler, hedef hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. Bu spesifik reseptörler sitokinin salgılandığı hücre üzerinde ise otokrin etki, yakındaki hücreler üzerinde ise parakrin etki gerçekleşir. Salınan sitokin dolaşım aracılığı ile uzaktaki bir hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanıyorsa endokrin etki gösterir.
- Sitokinler sıklıkla diğer sitokinlerin sentezini de etkiler. İkinci ve üçüncü sitokinin salınımı ilk sitokin tarafından indüklenebilir.
- Sitokinler, diğer sitokinler üzerinde etkilidirler. İki sitokin birbirinin etkisini antagonize (birbirine karşı etki) edebilir veya sinerjik etki göstererek birbirlerinin etkilerini arttırabilmektedirler.
- Sitokinler, farklı hücreler üzerinde etkilidirler. Bu özellik pleiotropizm olarak isimlendirilir.
- Aynı sitokin farklı hücre tipleri tarafından sentezlenebilir.
- Sitokinler sıklıkla aynı hedef hücreler üzerinde çok farklı etkilere sahip olabilmektedir.
- Çoğu sitokin reseptörlerinin ekspresyonu, spesifik sinyallerle düzenlenir.

Sitokinler lokal veya sistemik immün ve inflamatuvar yanıtı desteklemenin yanında hematopoiesis olayını da düzenlerler. Yapısal olarak birbirinden farklı ve genetik olarak da ilişkisiz görünen yüzden fazla sitokin tanımlanmaktadır (33,34,35).

4.1. İnterlökin-2 (IL-2):

T hücre büyüme faktörü olarak bilinen IL-2, T lenfositlerinin aktivasyonu ve proliferasyonu için temel sitokin olup lenfosit aktivasyonunda anahtar role sahiptir. İmmün yanıtta regülatör faktör olarak tanımlanır. Aktif hale gelmiş T hücreleri tarafından sentezlenir.

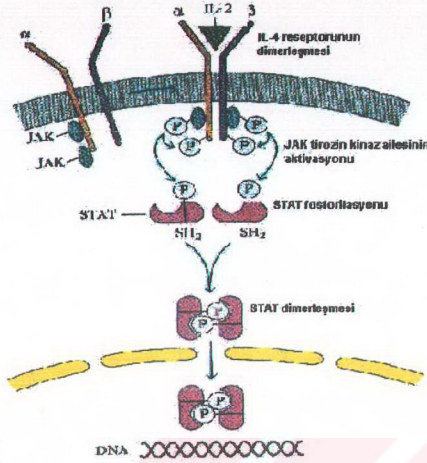
4. Kromozom üzerindeki tek bir gen tarafından sentezlenen sitokin 14-17 kD ağırlığında bir glikoproteindir.

Bu glikoprotein önemli özelliği otokrin ve parakrin etkilerinin olmasidir. Kendi salgılandığı hücreyi, yakınındaki T hücrelerini ve IL-2R'ü taşıyan diğer immün sistem hücrelerini etkiler. T hücrelerinin G1 fazından S fazına geçmelerini sağlayarak DNA replikasyonu için sinyal gönderirler. Bir T hücresi, bağlantı kurduğu ASH'den her iki aktivasyon sinyalini alsa bile, IL-2 yokluğunda veya kendi yüzey IL-2R'nün baskılanması durumunda proliferasyon gerçekleşmez. IL-2 molekülleri, IL-2R vasıtasıyla hedef hücre üzerinde etkisini gösterir. T hücresi uyarımından sonra IL-2 salgısı en yüksek seviyeye ulaşır.

IL-2R, 55 kD ve 70-75 kD ağırlığında olan yüzey proteininden oluşmaktadır. 55 kD ağırlığındaki IL-2R α proteinine T-Cell Activation (TAC) adı verilir. IL-2 R α , 10⁻⁸ M affinite ile IL-2'yi bağlar. IL-2'yi bağlayan ikinci reseptör, IL-2R β 'nin (70-75 kD) IL-2'ye bağlanması daha kuvvetlidir (10⁻⁹ M). IL-2R β , γ zinciri adı verilen 64 kD'luk bir polipeptid ile birlikte eksprese edilir.

Sinyal iletimi için minimal reseptör kombinasyonu IL-2R $\beta\gamma$ heterodimeridir. IL-2'nin öncelikle IL-2R α 'ya bağlandığına, bununda IL-2R $\beta\gamma$ ile bağlantıyı kolaylaştırdığına inanılmaktadır.

IL-2'nin, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ kompleksine bağlanması Janus family kinases (Jak) ve Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) proteinleri yolu ile sinyalin iletilmesini sağlar. Sitokinler spesifik reseptörüne bağlandıktan sonra, tirozin residuellerinin otokatalitik fosforilasyonu başlatan Jak'ı aktive ederek sinyal oluşturur. Aktive olan Jak'lar sitokin reseptörünün intrasellüler bölgesindeki tirozin residuellerinin fosforilasyonunu kataliz eder. Fosforile olan residuellerin bir kısmı scr- homology-2 (SH-2) domainleri aracılığı ile Jak'ı bağlar. Bir kısmı da, SH-2 aracılığı ile STAT'ı bağlar. Bağlanan Jak'lar STAT proteinlerdeki tirozin residuellerinin fosforilasyonunu kataliz eder. Fosforile olan STAT proteinleri reseptörden ayrılır ve dimer özelliği kazanır. STAT dimerleri nukleusa giderek genlerin transkripsiyonunu başlatır (33,34).



Şekil 4 : Sitokin reseptörleri aracılığıyla sinyal iletim modeli (Stites, Terr, Parslow)

5. MİTOJENLER

Mitojenler, T ve B hücre klonlarını aktive edebilen poliklonal aktivatörlerdir. Bu moleküller lektin olarak isimlendirilen ve şeker bağlayan proteinlerdir. Mitojenik lektinler çeşitli bitkiler ve bakterilerden elde edilir. Hücresel aktivasyonu ve proliferasyonu başlatabilirler.

Lenfositlerin in vitro olarak uyarılması sonucu morfolojik değişiklikler olmaktadır. En erken olay sitoplazmik protein tirozin kinazların aktivitesindeki artıştır. Bunlar diğer proteinlerdeki tirozin dizilerinin fosforilasyonunu kataliz etme yeteneğine sahiptirler. Bu artış 2 saniye içinde meydana gelmektedir. Aktive olan protein tirozin kinazların direkt veya indirekt olarak lenfosit aktivasyonunu başlattığı bilinmektedir. İkinci olay; intrasellüler Ca^{++} iyonlarının konsantrasyonlarındaki belirgin artıştır. Protein tirozin kinaz aktivasyonu gibi, Ca^{++} artışı da lenfosit aktivasyonunu başlatmak için bir kriter olarak düşünülmektedir.

Stimülasyon sonrası ilk saatler içinde RNA sentezinde, protein sentezinde, oksidatif metabolizmada yükselme olmaktadır. 2-4 saat sonra hücrelerde biyokimyasal olaylar ile birlikte, mitoz bölünmeye gidebilen blast halindeki hücrelere dönüşme olayı da meydana gelmektedir. Bu

olaya blastik dönüşüm adı verilmektedir. Blastik dönüşüm esnasında nukleus çapı ve sitoplazma genişler, nuklear kromatin soluk boyanır ve hücre çıkıntılı bir nukleolusa sahip olur. DNA sentezi 18-24 saat sonra başlar. Senkronize mitozların ilk belirtisi yaklaşık 48 saat sonra görülür ve hücreler yaklaşık 24 saatlik sikluslarla bölünmeye girer (36,37).

PHA tetramer yapıda olup ligandı N-asetilgalaktosamindir. Barbunya'dan (Red Kidney Bean) elde edilir (36). PHA'nın etkisi mitoz öncesidir (38). T hücrelerini aktive eden PHA, periferik kan kültüründeki lenfositleri uyararak onları mitoz bölünmeye itmektedir (36). İlk 24 saat içinde RNA sentezinde artış olmaktadır. Kültürün ilk 30 saatinde DNA sentezi düşüktür. 30 ile 60 saat arasında ise artış göstermektedir. En yüksek mitotik aktiviteye 60 ile 70 saat sonra ulaşılmaktadır.

PHA'nın mukoprotein olan PHA-M ve saflaştırılmış güçlü bir protein olan PHA-P olarak iki formu bulunmaktadır (38).

Yapılan in vitro çalışmalarda sıkça kullanılan mitojenler; PHA, Concanavalin A (Con A), Pokeweed Mitojen (PWM)'dir (36).

Mitojenlerin immün hücreler üzerindeki aktivasyon etkisine baktığımızda; PHA ve Con A'nın T hücreleri üzerinde, PWM'nin ise hem T hem de B hücreleri üzerinde etkili oldukları bilinmektedir.

Bunların dışında çok güçlü T hücre mitojenleri olarak bilinen süperantijenler bulunmaktadır. Bunlar intrasellüler işlemde geçmeksizin, MHC Sınıf II moleküllerine dıştan ve yüksek affinite ile bağlanırlar. Süperantijenler belirli V (değişken) genini taşıyan bütün T lenfositleri ile reaksiyona girerek aktive etmektedirler.

Tüm mitojenler lektin değildir. Gram negatif bakteriyal hücre duvarının bileşeni lipopolisakkarit (LPS), B hücre mitojeni olarak fonksiyoneldir. Plasma membranı ile etkileştiği düşünülen LPS'nin mitojenik aktivitesi, onun lipitli olmasından kaynaklanmaktadır (36,37).

6.KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ

Kronik böbrek yetmezliği, geri dönüşümsüz ve genellikle ilerleyici olan böbrek yetersizliğini tanımlamaktadır. Bu evre, böbrek fonksiyonunun

artık hayatı sürdürmeye yeterli olmadığı ve sağlıklı bir fizyolojik denge sağlamak için gerekli uyum mekanizmalarının, kalıcı böbrek fonksiyonunun bozulmasına bağlı olarak kaybı şeklinde tanımlanmaktadır (39). Hasta tüm böbrek fonksiyonlarını yitirdiğinde, yaşamayı uzatmaya ve yaşam kapasitesini sağlamaya yönelik renal replasman (böbrek telafi) tedavisine başlanmaktadır. Diyaliz ve transplantasyon düşünülen hastalarda, böbrek hastalığının sık rastlanan etyolojileri; kronik glomerülonefrit, hipertansif nefroskleroz, kronik interstisyel nefrit, polikistik böbrek hastalığı ve diabetes mellitus'dur. Uygun hastalarda böbrek nakli, son dönem böbrek hastalığı olan kişilerin tedavisinde geçerli bir tercih olmaktadır. Transplantasyona ihtiyaç gösteren en sık böbrek hastalığı glomerülonefrittir (1,39).

7. BÖBREK TRANSPLANTASYONU

İlk başarılı böbrek transplantasyonu 1954'te Joseph Murray tarafından yapılmıştır (2,3). 1960'lardan bu yana ise böbrek nakli, böbrek yetmezliği olan bir çok hastanın sağlıklı ve uzun bir hayat sürmesini sağlamıştır (4). Bugün böbrek transplantasyonu için, canlıdan ve kadavradan organ temin edilmektedir. Bir böbrek naklinin başarısı için etkili faktörler arasında hasta ve verici arasındaki HLA antijenlerinin uyumu, ABO kan grupları uygunluğu ve immünsupresif tedavi önemlidir (40).

Nakledilen doku veya organın durumu alıcı ve verici arasındaki kalıtsal yakınlığa bağlıdır. Vericiyle alıcı arasındaki genetik ilişkilere göre dört graft tipi bulunmaktadır. Aynı genetik özelliklere sahip bireyler arasında nakledilen grafta singraft denir. Aynı türün genetik bakımından birbirlerinden farklı bireyleri arasında nakledilen grafta allograft denir. Farklı türlerin bireyleri arasında nakledilen grafta ksenograft, bir doku ya da organın aynı bireyde bir yerden başka bir yere nakledilmesinde kullanılan grafta ise otograft denir (41).

Transplantasyon öncesi hasta ile verici arasında uyumu aramak için immünolojik değerlendirmeler yapılmaktadır.

ABO kan grubu testleri tüm alıcı ve vericilere uygulanmaktadır. ABO uyumsuzluğu böbrek transplantasyonu için çok önemli bir engel oluşturur

ve vericinin kan grubu ile potansiyel alıcıların kan gruplarının mutlaka uygun olması gerekmektedir. ABO uyumsuzluğu olan transplantların çoğunda hiperakut veya akut rejeksiyon meydana gelmektedir. Rejeksiyonun; A veya B kan grubu antijenleri ile vasküler endotel üzerinde reaksiyona giren antikor nedeniyle meydana geldiği tahmin edilmektedir. Bu nedenle organ nakillerinde ilk ve önemli parametredir (40). Öncelikle aynı kan grubu olanlar tercih edilmektedir.

Yakın akraba vericileri arasında yapılan nakillerde; O genel verici, AB genel alıcı ve her grup kendi içinde verecek şekilde tercih edilmektedir. Kadavra nakillerinde ise O kan grubundan A kan grubuna takılması önerilmez. A kan grubundan olan kişiler ya A1 yada A2 alt tipine sahiptir. Bu alt gruplar kişilerde belirlenemediğinden dolayı O kan grubundan A'ya nakil yapılması risklidir. Diğer kan gruplarında ise canlı nakillerinde olduğu gibidir (42,43,44).

HLA tiplmesi geleneksel olarak serolojik yöntemlere dayanmaktadır. Bu yöntemde, alloantisera ve monoklonol antikorlar kullanılarak tersiyer epitoplara ve hücre yüzeyindeki HLA glikoproteinlerinin çapraz reaksiyon veren grupları tanımlanmaktadır. Seroloji değerli bir yöntem olsa da yeterli miktarda antiserumun olmaması ve lenfosit izolasyonunda karşılaşılan zorluklar nedeniyle, allelleri birbirinden ayırmada bazen yetersiz kalabilir. Bu nedenle HLA'nın saptanmasında daha güvenilir olan moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Moleküler teknikler, allelleri DNA dizisi düzeyinde çözümlenebilmektedir (45,46).

Crossmatch alıcı serumunda vericinin lenfositlerine karşı antikor oluşturup oluşturmadığı gösteren bir test sistemidir (8). Crossmatch testi pozitif olan hastaların verici hücrelerine karşı reaksiyon geliştirdiği düşünüldüğünden transplantasyondan vazgeçilir.

Hastanın daha önceki graft rejeksiyonları, gebelik ve kan transfüzyonları nedeni ile transplantasyon sonrasında hasta kanında anti-HLA molekülleri oluşmasına neden olmaktadır. Bu antikorlar incelenmeden ve dikkate alınmadan transplantasyon gerçekleştirilirse hiperakut rejeksiyonlar görülebilmektedir. Bu antikorlara panel reaktif antikorlar (PRA) denmektedir (41).

Transplantasyon sonrası rejeksiyon görülmesi, vericiyle alıcı arasındaki antijenik uyumsuzluğun derecesine, alıcının vericiye ait HLA antijenlerine karşı daha önce duyarlı duruma geçmiş olmasına ve alıcının bağışıklık fonksiyonlarının immünsupresif tedavi ya da mevcut hastalık nedeniyle baskı altında bulunma derecesine göre olmaktadır. Rejeksiyon hücrel ve humoral mekanizmaların birlikte veya ayrı ayrı yabancı antijenlere yanıt oluşturduğu karmaşık reaksiyonlar dizisidir. Rejeksiyon tipleri, geçen süre ve olası mekanizmalar Tablo 1’de gösterilmiştir (41).

Tablo 1: Rejeksiyon tipleri

Rejeksiyon Tipi	Transplantasyon sonrası geçen süre	Olası mekanizma
Hiperakut	Birkaç dakika	Önceden mevcut antikorlar
Akut	Bir iki hafta ya da daha çok	T lenfositleri, Gecikmiş tipte aşırı duyarlılık
Kronik	Aylar, yıllar	T lenfositleri, antikorlar

8.BÖBREK TRANSPLANTASYONUNDA İMMÜNSUPRESİF TEDAVİ

Graft rejeksiyonlarının kontrolü ve immünopatolojik reaksiyonların şiddetini azaltmak için immünsupresif tedavi uygulanmaktadır. Bu tedavi transplantasyon grubunun deneyimine, tercihine ve nakil yapılan organa göre değişir. İmmünsupresif tedavinin antijene spesifik ve nonspesifik olmak üzere iki tipi vardır (41). Spesifik immünsupresyon, infeksiyon riskini arttırmaksızın rejeksiyon riskini azaltır (47). Kullanılan immünsupresif ajanların çoğu nonspesifiktir. Bu ajanlar, aktifleşen lenfositlerin proliferasyonunu azaltmayı amaçlar. Bu arada tedavi alan hastaların infeksiyona yakalanma riskini arttırdığından, hayati tehlikeye sebep olabilecek komplikasyonları da ortaya çıkarabilmektedir (41,48).

Böbrek transplantasyonunda immünsupresyonun temel amacı, rejeksiyonu önlemek ya da oluşmuş rejeksiyonu geri çevirmektir. İdeal bir immünsupresif ajan, bu fonksiyonları yerine getirirken diğer yabancı antijenlere karşı verilen reaksiyonları önlemelidir. Klinik uygulamada en çok kullanılan ajanlar; Steroidler, Siklosporin-A (Cyclosporine-A=Cyc-A) ve Azatioprin (Aza) dır (49).

Organ transplantasyonunda immüsupresyon için ilk denemeler Paris, Boston ve diğer merkezlerde 1959-1962 yılları arasında tüm vücut ışınlanması şeklinde başlamıştır (50). 1961'de Imuran (Azatioprin) insanlar için kullanıma sunulmuştur (51). Daha sonra 1978'de Calne ve arkadaşları Cyc-A' yı kullanıma sunmuşlardır. Cyc-A tek başına ya da Aza veya steroidlerle beraber kullanılarak daha önceki uygulamaların yerini almaya başlamıştır (52). Daha sonraları bu immüsupresif tedavi birçok merkezde en etkili immüsupresyon şekli olarak kabul edilmiştir.

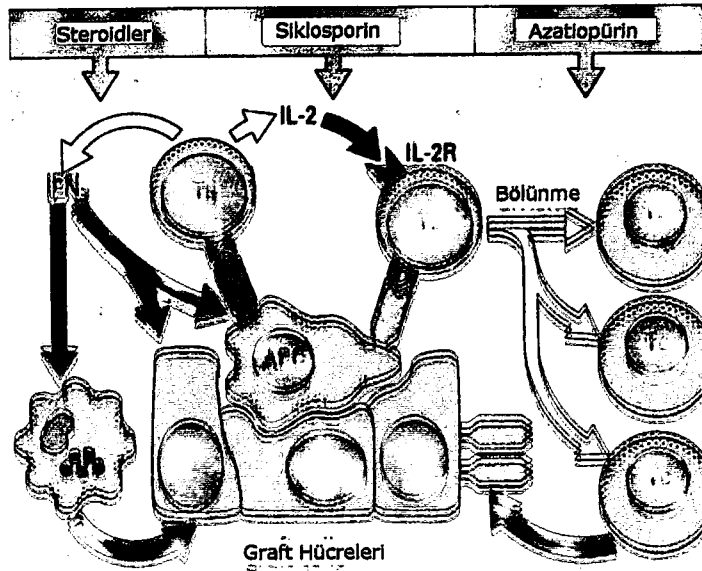
Günümüzde Takrolimus (FK506), Mikofenolat Mofetil (MMF) gibi yeni immüsupresif ajanlar da kullanıma sunulmuştur. Bu immüsupresif ajanların geliştirilmesi, akut rejeksiyon insidansının azaltılması, daha iyi organ sürvisi ve daha az yan etkinin ortaya çıkması konusunda ümit vermektedir (53). Doku ve organ nakillerinde klinik olarak alınmış bulunan başarılı sonuçların, dikkatle seçilip uygulanmış bir immüsupresif tedavi sayesinde elde edildiği de bir gerçektir (53).

8. 1. Kortikosteroidler

Kortikosteroidler; adrenal korteks tarafından salgılanan steroid yapılı kortizol ve aldosteron gibi hormonlardan sentezlenerek elde edilen aynı yapıdaki analoglarıdır. Kortikosteroidler anti enflamatuar, anti allerjik ve immüsupresif etkileri nedeniyle en sık kullanılan ajanlardandır (54).

Kortikosteroidler, kortizonun 1960'da akut rejeksiyon epizodlarının tedavisinde kullanılmasından sonra, organ transplantasyonunda en önemli immüsupresif ajanlar olarak kabul edilirler (40,55). Kortikosteroid ajanlardan immüsupresif olarak genellikle Metilprednisolon (MeP) kullanılır. Hem rejeksiyon profilaksisinde hem de rejeksiyonun önlenmesinde etkilidir. Çoğu merkezde diğer immüsupresif ajanlarla birlikte kullanılmaktadır. Kortikosteroidlerin depresyon, hiperglisemi, ödem, hipertansiyon, kemikte aseptik nekroz gibi ciddi yan etkileri mevcuttur (49).

Kortikosteroidler makrofajların ve T lenfositlerin sitokin (IL-1, IL-2, IL-6) salgılamasını ve T hücrelerinin uyarımını engeller. Aynı zamanda B lenfositlerin antikör oluşturma yeteneğini inhibe ederler.



Şekil 5: Steroidlerin, Cyc-A'nın ve Azatioprinin rejeksiyon gelişimini engellediği basamaklar. (Roitt, Brastoff, Male)

Kortikosteroidler hidrofobik yapıları nedeniyle hücre içine diffüzyonla girerler ve sitoplazmik reseptörlerine bağlanırlar. Reseptörleri 90 kD ağırlıkta ısı şok protein ile birliktedir. Glukokortikoidlerin bağlanması, bu kompleksten ısı şok proteinlerinin ayrılmasına ve ligand-reseptör kompleksinin nukleus içine geçmesine sebep olur. Burada geri dönüşümsüz olarak DNA'ya bağlanır. Böylece immün reaksiyonda rol oynayan sitokin sentezi için gerekli olan genlerin transkripsiyonu ve translasyonu engellenmiş olur (56,57,58). En önemli etkilerinden biri de makrofaj ve monositler tarafından salınan IL-1'i baskılamasıdır (59,60). Aynı zamanda IL-6 sentezini engelleyerek (61,62), IL-2 ve IFN γ 'yı da bloke etmektedir (63,64,65,66,67).

8. 2. Azatioprin (Aza)

Purin anti-metaboliti olan ve 6-merkaptopurinin nitroimidazol türevi bir ajandır (68). Güçlü bir mitotik inhibitördür. Aza aktiflenmeden önce karaciğerde metabolize olur. Önce 6-merkaptopurine sonra aktif metaboliti olan 6- thioinosinik asite dönüşmektedir.

İlk kez 1961'de kullanılan Aza kısa bir süre sonra son dönem böbrek yetmezliğinin tedavi yöntemlerinden biri haline gelmiştir. Cyc-A'nın gelişiminden sonra kliniklerde, kortikosteroidlerle birlikte Aza'da graft rejeksiyonu inhibisyonu için standart bir rejim olarak kombine halde kullanılmıştır. Aza'nın miyelosit supresyonu, lökopeni, dermatitis gibi yan etkileri de bulunmaktadır (69).

İn vitro çalışmalar Aza'nın karışık lenfosit kültür reaksiyonunda IL-2 üretimini bloke ettiğini göstermiştir (70). Aza hücre siklusunun S fazında, inosinik asitten adenilik ve guanilik asit sentezini önleyerek, pürin sentezi prekürsörlerinin birbirine dönüşümünü önler ve negatif feedback ile de novo pürin sentezi aktivasyonunu baskılayarak hem DNA hem de RNA sentezini önler. T hücre proliferasyonunu ve B hücre proliferasyonunu azaltır. Aza'nın sekonder immün cevaplara etkisi yoktur. O nedenle oluşmuş reaksiyona etkili değildir (49,71).

8. 3. Siklosporin-A (Cyc-A)

1970'de Tolypocladium inflatum adlı mantardan izole edilen 11 amino asitli siklik bir polipeptiddir. Molekül ağırlığı 1200 kD'dur. Cyc-A güçlü in vivo ve in vitro immünsupresif etkiye sahiptir (71,72). 1978'de ilk olarak Calne ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (73). Cyc-A'nın klinikte kullanılmaya başlamasından sonra hasta ve graft sağ kalımında önemli iyileşmeler görülmüştür. Bugün Cyc-A immünsupresyonun bütün formlarının temelini oluşturan immünsupresif ajandır. Klinikte ikili, üçlü, dörtlü tedavi şeklinde uygulanmaktadır (72).

Cyc-A'nın çok ciddi yan etkileri vardır. En önemli yan etkisi yüksek konsantrasyonlarda nefrotoksisitedir. Diğer yan etkiler ise malign tümör gelişim sıklığı, nörotoksisite, akne, ateş, hepatoksisitedir.

Cyc-A suda çözünmez, fakat lipid ve organik çözücülerde çözünür. Pasif olarak diffüzyonla hücre sitoplazması içine girmektedir (74).

Cyc-A lenfoid dokularda ve sitosolde bulunan molekül ağırlığı 15.000 kD olan siklofilin olarak tanımlanan ve immünsupresif ajanları bağlayan bazik bir proteine bağlanmaktadır. Siklofilin bir cis-trans peptidil prolil izomerazıdır. Sitosoldeki siklofilin ve Cyc-A kompleksi immünsupresif

molekölü oluşturur. Bu kompleks daha sonra nukleus içine taşınır. Ajan ve immünofilin kompleksi Ca^{++} ve kalmoduline bağlı bir fosfataz olan kalsinörine bağlanır. Kalsinörin IL-2 geninin enhancer (çoğaltıcı) bölgesinin aktivasyonunu sağlayan Ca^{++} 'a bağlı sinyalin iletilmesinde önemli bir rol oynar. Aktive T hücrelerinin nükleer faktörünün sitosolik formunu (NFATc) defosforile edebilir ve devamında NFATn olarak IL-2 geninin enhancer bölgesini aktifler ve transkripsiyon başlar. Ajan ve immünofilin kompleksi kalsinörine bağlandığı zaman NFATc'nin defosforilasyonunu bloke eder ve böylece nukleusda translokasyon ve sonuçta IL-2 geninin transkripsiyonu engellenmiş olur. Buna bağlı olarak IL-3, IL-4, IFN γ 'yı kapsayan bir çok erken T hücre aktivasyon genlerinin transkripsiyonu için gerekli olan, sinyal transdüksiyon engellenmiş olur (75,76).

Sonuçta, Th ve Tc hücrelerinin prekürsörlerinin proliferasyonu ve oluşumu gibi sitokinlere bağlı sinyallerin çoğu inhibe edilmektedir (74).

Yapılan in vitro çalışmalarda mitojenlerle uyarımda lenfositlerin proliferatif yanıtını önlediği gösterilmiştir (77).

8. 4. Tacrolimus (FK506)

FK506 23 üyeli halkalı bir bileşiktir ve moleköl ağırlığı 804 kD'dur. Yüksek derecede lipofilik olan ve suda düşük düzeyde çözünen ve streptomyces tsukubaensis'den elde edilen bir makrolid antibiyotiktir. Gerek in vivo ve gerekse in vitro çalışmalarda çok güçlü bir immünsupresif ajan olduğu görülmüştür (78). Karaciğer, böbrek transplantasyonlarında ve çeşitli otoimmün hastalıkta tecrübe edilmektedir. FK506 ilk olarak Pittsburgh üniversitesinde böbrek transplantasyonunda kullanılmıştır (75).

FK506, allojenik lenfosit ve mitojenlere karşı oluşan T hücrel proliferasyon cevabının engellenmesinde, Cyc-A'ya göre 100 kat daha güçlüdür (78).

Otoimmün hastalığı veya organ transplantasyonu olan hastalar ile yapılan klinik denemelerde, Cyc-A kadar etkili olmasına karşın daha az yan etkileri olduğu bulunmuştur. Özellikle karaciğer ve böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda organ reddi profilaksisinde

kullanılmıştır. FK506, yapılan çalışmalarda steroidlerle birlikte ikili tedavi, steroid, Aza ile birlikte üçlü tedavi ve bazı çalışmalarda da MMF ile birlikte kullanılmıştır (75,79).

FK506'nın yan etkileri; insülin tedavisi gerektiren glukoz intoleransı, hiperkalemi, hiperürisemi, çarpıntıdır (75).

FK506'nın hücre içi etki mekanizması Cyc-A'ya benzemektedir. FK506, hücre sitoplazmasında yer alan FK506 bağlayıcı protein olan (FKBP-12) immünofiline bağlanmaktadır. FKBP12 de siklofilin gibi bir cis-trans peptidil prolil izomerazıdır. FK506 / FKBP12 kompleksi Ca^{++} kalmodiline bağımlı fosfataz olan kalsinörine bağlanmaktadır. FK506 ve FKBP12 kompleksi de kalsinörine bağlanınca IL-2 geninin enhancer bölgesinin aktivasyonunu, dolayısıyla da transkripsiyonu engellemektedir. Diğer aktivasyon genlerinin transkripsiyonu da engellenmektedir (75,76).

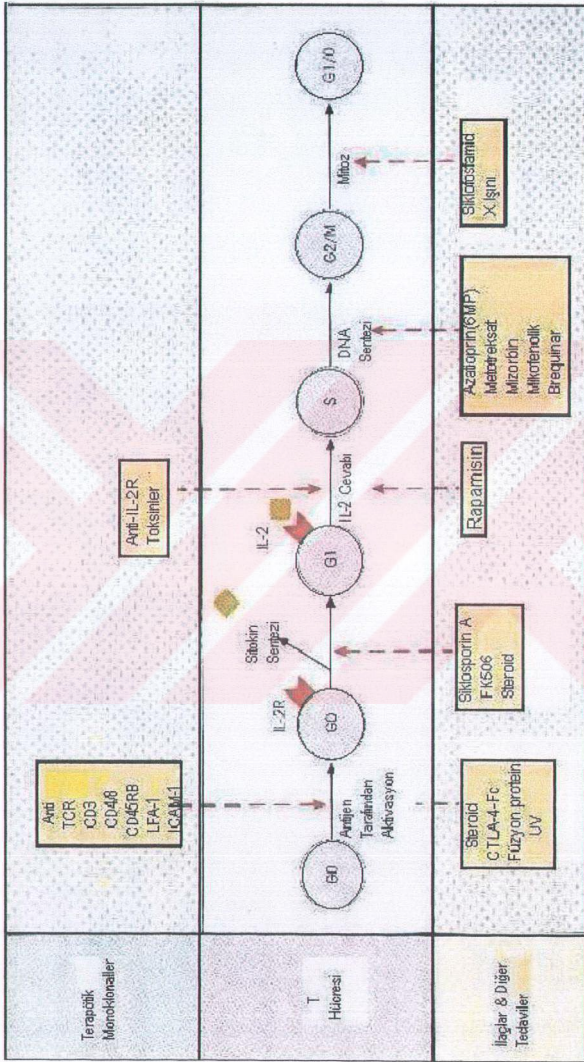
8. 5. Mikofenolate mofetil (MMF)

MMF, birkaç penisilyum türlerinin fermantasyon ürünü immünsupresif özellikte mikofenolik asidin ön ilacı morfolinoetil esteridir. Mikofenolik asid ilk olarak 1960'larda transplantasyonda immünsupresif ajan olarak kullanılmadan önce antibiyotik, antineoplastik, antipisoriatik özellikleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yan etki profili oldukça olumlu olup sadece gastrointestinal sisteme özgüdür (80). Yapılan çalışmalarda diğer immünsupresif ajanlarla birlikte kullanılmıştır.

Gelecekte üçlü tedavide Aza'nın yerini alabilecek ajan olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde rejeksiyonu önlemek amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir (75,81).

MMF, inozin monofosfatı guanozin trifosfata çeviren inozin monofosfat dehidrogenazı (IMPDH) inhibe ederek de novo guanozin nükleotidlerin sentezini bloke etmektedir. Böylece DNA ve RNA sentezi de inhibe edilmektedir (80).

MMF, PHA gibi mitojenlere karşı lenfositlerin poliklonal cevabını inhibe etmekte ve antijene karşı T ve B hücrelerinin spesifik proliferatif cevaplarını engellemektedir (82).



Şekil 6: Immunosupresif Ajanların Moleküler Etki Mekanizması (Roitt)

9. KARIŞIK LENFOSİT KÜLTÜR (MLC)

Standart MLC (Standart Mixed Lymphocyte Culture = sMLC), verici hücrelerinde bulunan yabancı doku uyum antijenlerine karşı alıcı lenfositlerinin geliştirdiği reaksiyonun belirlendiği bir test yöntemidir (83).

1965' de X. Ginsburg ve D. H. Sach sıçan lenfositlerini fare fibroblast hücreleri ile kültür yaptıklarında, sıçan lenfositlerinin proliferere olduğunu ve fare fibroblastlarını parçaladıklarını gördüler. 1970' de fonksiyonel sitotoksik T lenfositlerinin allogeneik dalak hücreleriyle bir arada kültüre edilmesiyle çoğaldığı anlaşılmıştır. Bu sistem sMLC olarak isimlendirilmiştir (84). MLC test Friedman ve arkadaşları tarafından ilk kez doku tiplendirme tekniği olarak kullanılmıştır (85). Daha sonra standart MLC test olarak da bilinen bu test Bach ve Hirschhorn ile Bain ve arkadaşlarının gözlemlerine dayandırılmıştır (86).

MLC'nin genetik kontrolünün MHC gen bölgesinin bulunduğu kromozom üzerinden yapıldığını ilk kez Bach ve Amos adlı araştırmacılar bulmuşlardır (87). Yine Amos ve Yunis adlı araştırmacılar tarafından yapılmış çalışmalarda 6. kromozomda HLA-A ve HLA-B lokusundan ayrı olan HLA-D lokusu tarafından MLC'nin kontrolünün yapıldığı bildirilmiştir (88).

sMLC testi, tek yönlü (one way) olarak uygulanmaktadır. Tek yönlü sMLC'de test popülasyonlarından lenfositlerin bir tanesi antimitotik bir ajan olan mitomisin C ile veya X ışını ile muamele edilerek proliferasyon yetenekleri bastırılmasıdır. Bu durumda, proliferatif yetenekleri baskılanmayan hücreler yanıt geliştirirken, diğer hücreler stimülatör olarak iş görürler (89).

DNA sentezi ve proliferasyonu 2 ile 3 gün içinde başlar, 4-6 günde en yüksek seviyeye ulaşır ve sonra hızla azalır. Alloreaktif T hücrelerinin iki farklı popülasyonu da ($CD4^+/CD8^+$) allogeneik sMLC testi esnasında stimüle olur (83). Esas olarak bu test HLA-D grubu antijenlerin farklılığını yansıtmaya yönelik bir test olduğu için, proliferasyona uğrayan hücreler $CD4^+$ T lenfositler olacaktır. sMLC'de $CD8^+$ T lenfositler de aktif hale gelmelerine karşın $CD4^+$ T lenfositlere oranla daha az proliferatif yanıt verirler. Test sonucunda iki ayrı değerlendirme, Stimülasyon İndeksi (SI) ve Relative Response İndeks (RRI)'ne bakılmaktadır. MLC'de RRI

değerinin (-) ve SI değerinin ≤ 1 olması kemik iliği transplantasyonu için uygunluğu belirtirken, RRI değerinin (+) ve SI değerinin >1 olması uyumsuzluğu ve HLA-D bölgesi determinantları için farklılığı yansıtmaktadır (83,90,91).

MLC'nin ilk klinik kullanımı, organ transplantasyonu için uygun bir vericinin seçimi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Özellikle kemik iliği transplantasyonunda bir HLA identik verici seçimi önemlidir.

Opelz ve Terasaki, 131 adet kadavra ile yapılan böbrek transplantasyonlarında alıcı ve verici arasındaki MLC'de düşük yanıt ile daha iyi graft yaşam süresi arasında bir ilişki bulmuşlardır (92).



III. GEREÇ ve YÖNTEM

1. Hasta Grubu:

Çalışmamıza, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Nefroloji polikliniğinde takipleri yapılan ve böbrek transplantasyonuna hazırlık aşamasında olan, 30 hasta ve bu hastaların birer sağlıklı vericisi (kardeş veya ebeveyn) olmak üzere, toplam 60 kişi dahil edildi. Hasta grubunun yaş ortalaması $29,57 \pm 10,19$ (12-49), verici grubunun yaş ortalaması $50,4 \pm 13,27$ (19-75) olarak bulundu. Tablo 2.

Tablo 2: Böbrek transplantasyonu planlanan hastaların ve vericilerin yaşları ve akrabalık dereceleri

Hasta/Verici No	Hasta yaşı	Verici Yaşı	Akrabalık Derecesi
1	24	40	Baba
2	37	67	Baba
3	40	41	Kardeş
4	30	31	Eşi
5	30	63	Anne
6	32	37	Kardeş
7	46	75	Baba
8	25	60	Baba
9	19	44	Anne
10	28	50	Baba
11	20	19	Kardeş
12	20	30	Kardeş
13	49	44	Eşi
14	25	50	Baba
15	17	53	Anne
16	28	57	Baba
17	30	59	Anne
18	23	47	Anne
19	25	63	Baba
20	27	53	Anne
21	40	40	Kuzen
22	16	44	Anne
23	12	48	Baba
24	39	65	Anne
25	49	52	Kardeş
26	17	34	Anne
27	21	47	Anne
28	38	63	Anne
29	39	40	Kardeş
30	40	70	Anne

Çalışmaya dahil edilen hastaların, daha önceden Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarında mikrolenfotoksiste yöntemi ile yapılan crossmatch testleri negatif olarak bulunmuştur. Ayrıca bu hastalar çalışma öncesinde herhangi bir immünsupresif ajan kullanmamıştır.

2.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler:

2.1. Cihazlar

- Santrifüj (Heraeus) Labofuge 400R
- Laminar-flow (Forma Scientific)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- Infrared CO₂ incubator (Forma Scientific)
- β-Counter (Packard)
- Cell-harvester (Nunc-Intermed)
- Pipetus-Akku (Hiscmann Laborgerate)

2.2. Kimyasal Maddeler

- Heparine
- İzotonik Sodyum Klorür Eczacıbaşı (Baxter)
- Ficol Hypaque (Nycomed 500 MI)
- RPMI 1640 Medium (Seromed 500 MI)
- Fetal Calf Serum Harlan (Biochrom Kg Berlin)
- Complete medium (Fetal Calf Serum/Rpmı 1640-1/9)
- Trypan Blue (Merck)
- Thymidine-Methyl-³h (Sigma)
- Toluol (Merck)
- PPO (2,5 Diphenyl Oxazole) (Sigma)
- Phytohaemagglutinin -M (PHA) (Sigma)
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Sigma)
- Azathioprine (İmuran) (Glaxowellcome)
- Methyl Prednisolone (Prednol) (M. Nevzat)
- Cyclosporine-A (Sandimmun Neoral) (Novartis)
- FK506 (Prograf) (Tacrolimus) (Eczacıbaşı)
- MMF (Mikofenolat Mofetil) (Cell-Sept) (Roche)

- Penisilin-G (Kristapen) (Deva)
- Streptomycine (İ.E.Ulagay)

2.3 Diğer malzemeler

- 2 ml, 5 ml, 10 ml'lik cam pipetler
- Pasteur pipetler
- 15 ml kapaklı steril tüpler
- 50 ml kapaklı steril falkon tüpler
- Steril 96 kuyulu U dipli kapaklı plaklar
- Otomatik pipet (20 µl, 100µl) (Gilson)
- 200 µl hacimli sarı pipet ucu
- Neubauer hücre sayım kamarası (Laba)

3. Yöntem

Çalışma öncesinde hücre kültürü ortamı için, tüm malzemeler ve çalışma ortamı steril edildi.

Hasta ve vericilerin periferal kan mononukleer hücreleri, (PBMC) Ficol hypaque gradient santrifüj yöntemi ile elde edildi.

- 7.5 ml antikoagüle (heparin ile) periferal kan eşit oranda izotonik sodyum klorür içeren 50 ml'lik falkon tüplere eklendi ve resuspanse edildi.
- 15 ml'lik falkon tüplere 5 ml ficol hypaque koyuldu. (Her birey için 1 adet tüp hazırlandı)
- Ficol üzerine dilue edilmiş periferal kan yüklendi.
- 2600 rpm'de +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Ficol'un üzerindeki bulut görünümünde lenfosit tabakası pastör pipetle alındı ve üzeri numaralandırılmış boş tüplere aktarıldı.
- Lenfositler üzerine 8 ml RPMI 1640 (Penisilin + Streptomycine ilaveli) eklenerek resuspanse edildi.1500 rpm' de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülerek pelet üzerine 4 ml RPMI 1640 eklendi.
- Resuspanse edildikten sonra yine 1500 rpm' de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Pelet üzerine 1 ml complete medium eklendi.

- Trypan blue ile ışık mikroskopunda alıcı hücre sayısı 1.10^6 hücre / ml'ye, verici hücre sayısı 2.10^6 hücre / ml'ye ayarlandı.
- Stimülatör (verici) ve kontrol hücreleri 3000 Rad' la ışınlandı.
- sMLC için Alıcı-Alıcı (AA), Alıcı-Verici (AV), Alıcı-Kontrol (AK) olmak üzere toplam 6 kuyu açıldı.
- sMLC'yi stimüle etmek için PHA eklenmek üzere benzer şekilde toplam 6 kuyu açıldı. Bu kuyulardaki hücrelerin üzerine 20 μ l PHA (10 μ g/ml) eklendi. İmmünsupresif ajanlardan Cyc-A, FK506, MeP, Aza distile su'da, MMF DMSO'da hazırlandı.
- PHA ile stimüle edilen MLC' de bu ajanların etkilerini görmek için hazırlanan serilere;
40 μ l Cyc-A (5 μ g/ml), 2 μ l FK506 (1 mg/ml), 2 μ l MMF (1 μ mol/ml), 2 μ l Aza (1 μ g/ml), 40 μ l MeP (5 μ g/ml) olacak şekilde ve ayrıca ajanların çeşitli kombinasyonları hazırlanarak hücreler üzerine eklendi. Yukarıda verilmiş olan konsantrasyonlar çeşitli çalışmalarda MLC cevaplarını \geq %50 inhibisyonunu oluşturmaktadır (93,94,95). Testin kültür plağında yerleşim düzeni Tablo 3'da görülmektedir.

Tablo 3: Kültür plağında hücrelerin yerleşim düzeni

Alıcı-alıcı (AA)	Alıcı-verici (AV*)	Alıcı-kontrol (AK*)
sMLC	sMLC	sMLC
PHA+MLC	PHA+MLC	PHA+MLC
PHA+Cyc-A	PHA+Cyc-A	PHA+Cyc-A
PHA+FK-506	PHA+FK-506	PHA+FK-506
PHA+MMF	PHA+MMF	PHA+MMF
PHA+Aza	PHA+Aza	PHA+Aza
PHA+MeP	PHA+MeP	PHA+MeP
PHA+Cyc-A + Aza+MeP	PHA+Cyc-A+ Aza+MeP	PHA+Cyc-A+ Aza+MeP
PHA+Cyc-A+ MMF+MeP	PHA+Cyc-A+ MMF+MeP	PHA+Cyc-A+ MMF+MeP
PHA+FK506+ Aza+MeP	PHA+FK506+ Aza+MeP	PHA+FK-506+ Aza+MeP
PHA+FK506+ MMF+MeP	PHA+FK506+ MMF+MeP	PHA+FK-506+ MMF+MeP

- Kültür plağına yerleştirilen hücreler 37°C nemli %5 CO₂ bulunan inkübatöre alındı.
- 96. saatte kültür ortamında her kuyuya 50 µl ³H thymidin eklendi.
- 16-18 saat sonra cell-harvester (hücre toplayıcı) ile hücreler filtre kağıdı üzerine toplanarak bir gün oda ısısında kurutuldu.
- Sintilasyon sıvısı (toluol / PPO, 2 ml / 0.06 gr) eklendi.
- β counter (β sayacı)'da sayım yapıldı.

Test sonucunda iki ayrı değerlendirme, Stimülasyon İndeksi (SI) ve Relative Response İndeks (RRI)'ne bakılmaktadır. MLC'de RRI değerinin (-) ve SI değerinin ≤1 olması kemik iliği transplantasyonu için uygunluğu belirtirken, RRI değerinin (+) ve SI değerinin >1 olması uyumsuzluğu ve HLA-D bölgesi determinantları için farklılığı yansıtmaktadır (83,90,91).

sMLC ve PHA ile stimüle edilerek elde edilen değerler, Relatif Response İndeks (RRI) formülüne göre hesaplandı. Bizim çalışmamızda SI formülü kullanılmadı.

$$RRI = \frac{AV^* - AA}{AK^* - AA} \times 100 = (\pm)$$

Testimizde, stimüle edilen serilere eklenen immünsupresif ajanlara karşı direnç ve duyarlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \left[1 - \frac{\text{İmmünsupresifli değer (PHA+İmmünsupresif)}}{\text{İmmünsupresifsiz değer (PHA ile stimüle edilen değer)}} \right] \times 100$$

Hücre proliferasyonu inhibisyonu ≥%50 olan hastalarımızı immünsupresiflere karşı duyarlı, <%50 olan hastalarımızı immünsupresiflere karşı dirençli olarak değerlendirdik (93,94,95).

İstatistiksel Yöntemler: Çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde temel istatistiksel yöntemlerden Wilcoxon testi kullanılmıştır.

*: Işınlanmış

IV. BULGULAR

Çalışmada elde edilen sonuçlar 3 sınıf altında değerlendirildi:

1. sMLC ve PHA ile stimule edilen serilerde saptanan bulgular,
2. Stimule edilmiş kuyular üzerine immünsupresif ajanların eklenmesi ile oluşan serilerde saptanan bulgular,
3. İmmünsupresiflerin etkilediği hastalarda ortaya çıkan duyarlılık ve dirençlilik değerleri ile ilgili saptanan bulgular.

1- sMLC ve PHA ile stimule edilen serilerde saptanan bulgular:

Çalışma grubumuzu oluşturan hasta ve vericilerinin HLA-Sınıf I antijenleri mikrolenfositotoksiste, HLA-Sınıf II antijenleri PCR-SSP (Polimerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer) yöntemiyle belirlenmişti (Tablo 4).

Tablo 4: Hasta ve vericiler in MHC antijenleri

No	HLA-A	HLA- B	HLA-DR	Doku uyumu
1	24,33/28,33	8,35/8,39	17/16,17	1A1B1DR
2	1,24/1,24	7,57/7,41	4,11/7,11	2A1B1DR
3	2,26/2,26	38,35/38,35	17,14/17,14	2A2B2DR
4	3,30/24,26	38/38,35	13,14/13	1B1DR
5	1,32/2,32	8,50/51,8	17,7/17,13	1A1B1DR
6	2,28/2	51,60/51	13/17,13	1A1B1DR
7	11,29/29	8,65/8,35	1,17/15,17	1A1B1DR
8	28,32/31,32	38,49/49,35	15,11/17,11	1A1B1DR
9	2,24/1,2	50,35/44,50	4,7/7	1A1B1DR
10	24,35/24,35	35,60/35,60	11,14/11,14	2A2B2DR
11	3,26/3,26	35,49/35,49	15,17/15,17	2A2B2DR
12	23,24/3,24	35,49/7,35	11/4,11	1A1B1DR
13	26,30/23,26	55,60/60,41	7/4,7	1A1B1DR
14	2,25/1,25	18,38/18,51	15,4/15,11	1A1B1DR
15	2,24/3,24	51,60/60,62	15,4/16,4	1A1B1DR
16	11,31/2,11	14,38/44,38	1,15/15,4	1A1B1DR
17	2/2	57,50/7,57	17/17	1A1B1DR
18	2,25/2,34	18,41/18,51	17,4/4,11	1A1B1DR
19	2,30/24,30	44,13/13,50	4,13/4,10	1A1B1DR
20	1,26/1,2	18,35/18,41	4/4	1A1B1DR
21	1,2/2,28	39,62/18,62	11,15/11,15	1A1B2DR
22	26,28/3,28	35,51/14,51	4/4,10	1A1B1DR
23	11,25/11,24	8,51/51	17,4/15,4	1A1B1DR

Tablo 4: Devam

24	1,26/26,31	18,57/18,41	17,13/15,17	1A1B1DR
25	24,32/24,32	52,13/52,13	7,15/7,15	2A2B2DR
26	2,26/1,2	44,73/49,73	16,7/16,8	1A1B1DR
27	2,11/3,11	35,62/35	11,17/11,13	1A1B1DR
28	24,32/26,32	7,52/52,61	4,13/4,10	1A1B1DR
29	2,24/2,24	51,55/51,55	1,16/1,16	2A2B2DR
30	25,28/26,28	44,41/44,14	4,13/4	1A1B1DR

30 hasta ve verici çiftine, sMLC'nin ve PHA ile stimülasyonun alıcı yönü uygulandı. Testimizde, sMLC'ye paralel olarak yaptığımız PHA ile stimüle edilen kuyulardaki proliferasyon değerlerinde, sMLC'deki proliferasyon değerlerine göre anlamlı artışlar gözlemlendi. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde; proliferasyon değerleri ortalamalarının AA için, 8472'den (sMLC) 36176'ya (PHA), AV için ise 12085'den (sMLC) 50868'ya (PHA) çıktığını belirledik. Wilcoxon testine göre PHA eklenmesi ile oluşan proliferasyon değerlerindeki artış anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Bu sonuçlar her hasta RRI formüne göre düzenlenip (+) ya da (-) olarak yorumlandığında; doku uyumu dikkate alınır, HLA-Sınıf I ve Sınıf II antijenleri 2A2B2DR uyumlu olan beş çiftin (3, 10, 11, 25, 29 no'lu) sMLC ve PHA ile stimüle MLC sonucu negatif olarak bulundu. Doku uyumu 1A1B2DR olan 21 no'lu çiftin, 2A1B1DR olan 2 no'lu ve 1B1DR olan 4 no'lu çiftin sonucu pozitif, doku uyumu 1A1B1DR olan 22 çiftin (1, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 30 no'lu), sonucu yine pozitif olarak bulundu (Tablo 5).

Tablo 5 : AA ,AV ve serilerinde sMLC ve PHA+sMLC testlerindeki hücre proliferasyon sayımları.

No	sMLC			PHA+sMLC			sMLC	PHA+sMLC
	AA	AV	AK	AA	AV	AK		
1	30238	55289	60259	35213	72699	85265	Pozitif	Pozitif
2	24850	53008	58256	33750	79348	82544	Pozitif	Pozitif
3	60889	58769	65233	62201	61057	70556	Negatif	Negatif
4	2788	3245	10554	36421	44488	49520	Pozitif	Pozitif
5	2103	3296	9885	40458	63800	76985	Pozitif	Pozitif
6	2503	2772	6998	45214	52121	62547	Pozitif	Pozitif
7	3882	4308	9556	10061	14116	29878	Pozitif	Pozitif

Tablo 5: Devam

8	12771	12800	22356	28986	42469	48699	Pozitif	Pozitif
9	5512	6317	8665	26305	37089	42513	Pozitif	Pozitif
10	1052	1016	5589	1912	1875	12053	Negatif	Negatif
11	2220	2070	6995	21043	20686	28978	Negatif	Negatif
12	1720	1860	4936	68026	77870	79654	Pozitif	Pozitif
13	2190	2363	17895	12078	66895	99875	Pozitif	Pozitif
14	1150	1259	12563	41381	88748	94561	Pozitif	Pozitif
15	4493	4981	25456	60687	84065	92556	Pozitif	Pozitif
16	25462	26482	42653	31381	38748	53213	Pozitif	Pozitif
17	8245	9846	19568	41087	58153	65220	Pozitif	Pozitif
18	20241	20356	29589	28232	28844	46543	Pozitif	Pozitif
19	1790	3363	14532	10300	38166	42311	Pozitif	Pozitif
20	1940	2172	8547	33623	45972	50218	Pozitif	Pozitif
21	19101	19953	22506	43205	46408	60082	Pozitif	Pozitif
22	3840	3921	8863	25486	40281	50002	Pozitif	Pozitif
23	13040	14096	29500	52715	57916	88226	Pozitif	Pozitif
24	8120	9042	20009	33597	45546	56012	Pozitif	Pozitif
25	9461	4692	15644	54027	45353	60560	Negatif	Negatif
26	7402	8005	22563	49360	67657	77456	Pozitif	Pozitif
27	7360	8819	19563	22363	53372	70251	Pozitif	Pozitif
28	12047	13139	21456	65340	82784	97546	Pozitif	Pozitif
29	1735	1516	7502	65023	58176	84521	Negatif	Negatif
30	2140	3780	11300	5802	11338	26587	Pozitif	Pozitif

2- PHA ile stimule edilmiş kuyular üzerine immüsupresif ajanların eklenmesi ile oluşan serilerde saptanan bulgular,

Çalışmamızın amacına uygun olarak, tüm hasta ve verici çiftlerin sMLC, stimüle edilen kuyulardaki hücrelerin proliferasyon değerleri, immüsupresif ajanları tek tek ve kombine olarak uyguladığımızda elde edilen proliferasyon değerleri Tablo 6' de görülmektedir.

Tablo 6: sMLC, PHA ile Stimülasyon ve İmmünsupresif Ajanların Eklenmesi ile Elde Edilen Proliferasyon Değerleri

No	sMLC		PHA		Cyc-A		FK506		MMF		MeP		AZA		Cyc+AZA+MeP		Cyc+MMF+MeP		FK506+AZA+MeP		FK506+MMF+MeP	
	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV
1	30238	55289	35213	72699	9235	18045	4128	2290	4093	2488	62298	63368	60498	89472	8900	9088	900	710	1106	929		
2	24850	53008	33750	79348	8014	2119	1510	1020	968	678	3210	6327	27623	72356	600	235	240	103	3259	478		
3	60889	58769	62201	61057	3015	1918	4965	1597	1409	1227	86889	96942	62135	34533	1030	650	219	144	317	128		
4	2788	3245	36421	44488	8696	13190	3136	2428	3320	2563	1823	1746	1958	2250	290	1410	410	1440	272	217		
5	2103	3296	40458	63800	4491	4509	1510	1810	1490	1150	1481	1915	1852	10500	295	301	165	117	167	108		
6	2503	2772	45214	52121	1810	2103	1616	1777	1879	1489	1789	1250	1989	10520	906	1225	995	986	698	282		
7	3882	4308	10061	14116	3400	4420	1592	1603	1374	1852	1756	1625	8360	29444	575	881	340	443	1777	1021		
8	12771	12800	28986	42469	1647	1175	1892	1705	1696	2336	5850	2360	9630	8870	518	194	324	268	158	133		
9	5512	6317	26305	37089	2820	4480	1495	1763	1652	2236	1474	1489	4327	38190	270	197	1184	642	254	308		
10	1052	1016	1912	1875	1276	1038	1221	1592	1231	1612	1343	1393	1288	1463	152	146	2127	897	904	1022	1105	1227
11	2220	2070	21043	20686	1070	1220	1729	1505	2092	1733	1336	1470	1322	2694	226	207	246	223	268	254	250	225
12	1720	1860	68026	77870	1680	1550	1858	1685	1944	2489	6520	5580	5890	4590	275	178	132	122	130	110	140	128
13	2190	2363	12078	66895	3189	3975	1440	1210	1602	1389	5360	4500	23630	26753	205	253	770	483	490	279	450	259
14	1150	1259	41381	88748	11666	15375	2730	2910	3345	2885	9920	44393	33402	56515	269	302	142	189	883	995	1136	335
15	4493	4981	60687	84065	1347	1340	1650	1983	2134	2096	25950	20800	21970	20930	306	149	183	161	184	179	145	105
16	25462	26482	31381	38748	1331	1396	1469	1034	2348	2150	19920	24393	33400	56515	1690	2020	1420	1060	883	890	264	244
17	8245	9846	41087	58153	6500	9830	1650	1083	4187	6109	21072	25184	31179	60924	1117	1192	1006	1430	289	309	164	262
18	20241	20356	28232	28844	1410	2700	1199	1031	1277	1960	61796	65950	21970	40936	1201	1780	1432	1557	882	354	614	230
19	1790	3363	10300	38166	1640	2090	8231	12320	19380	23056	37443	31409	26354	41988	1062	952	3129	3376	691	969	240	399
20	1940	2172	33623	45972	1600	1870	3981	3518	1966	1888	18443	11699	26225	28713	1223	1078	576	493	237	137	298	182
21	19101	19953	43205	46408	2956	1397	2568	1321	2372	2148	36553	30552	26354	44988	1062	452	1291	762	691	469	467	310
22	3840	3921	25486	40281	39811	35180	5209	3046	11920	2750	8787	9015	12681	11324	815	777	1254	869	581	451	585	454
23	13040	14096	52715	57916	18469	22794	16168	15048	17900	19460	18870	13270	27071	12450	2777	3040	311	169	132	126	469	162
24	8120	9042	33597	45546	5375	480	3932	3701	14334	13609	8520	9256	12681	3246	315	227	145	135	307	209	383	202
25	9461	4692	54027	45353	2250	1851	2050	2125	1985	2850	25231	27577	27577	30709	1550	1265	1082	1001	1588	1092	1148	1442
26	7402	8005	49360	67657	14023	5918	1994	1527	4390	3545	11460	6690	25996	73397	1590	3003	201	195	265	148	399	197
27	7360	8819	22363	53372	1512	1906	13678	1221	2258	5077	5530	2660	50999	77220	274	179	180	197	780	609	129	106
28	12047	13139	65340	82784	1600	1432	3260	5202	5772	4740	8720	4700	30176	56989	232	222	890	775	227	190	519	205
29	1735	1516	65023	58176	57623	24850	8177	2690	9423	3810	6917	6200	4041	10264	2250	1448	259	205	228	204	850	335
30	2140	3780	5802	11338	3726	1640	2007	1033	5772	3050	3140	2150	8141	12339	450	310	167	126	203	162	112	101

Bu immünsupresif ajanlar tek olarak uygulandığında; stimüle edilmiş kuyulardaki proliferasyon ile, immünsupresiflerle inhibe edilen serilerdeki proliferasyon karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda elde edilen proliferasyon değerlerindeki düşüşlerin, Wilcoxon testine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 7-8, Grafik 1-2).

Proliferasyon değerlerinin ortalamalarına bakılacak olursa, FK506, Cyc-A ve MMF'in lenfosit proliferasyonunu, birbirlerine yakın değerlerle inhibe ettiği, Aza'nın ise inhibisyonda daha az etkili olduğu görüldü.

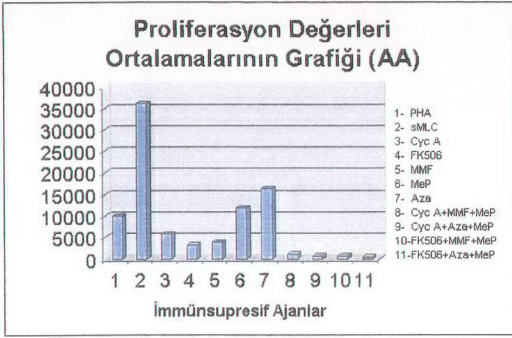
Tablo 7: AA yönünde ilave edilen immünsupresiflerin hücre proliferasyonundaki inhibisyon etkisi

İmmünsupresifler	PHA+sMLC	İmmünsupresif ilavesi ile	P değeri
Cyc-A	36.176	5.739	P<0,05
FK506	36.176	3.268	P<0,05
MMF	36.176	3.915	P<0,05
MeP	36.176	11.947	P=0,001
Aza	36.176	16.457	P=0,001

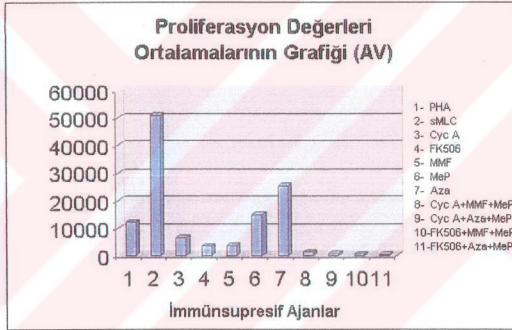
Tablo 8: AV yönünde ilave edilen immünsupresiflerin hücre proliferasyonundaki inhibisyon etkisi

İmmünsupresifler	PHA+sMLC	İmmünsupresif ilavesi ile	P değeri
Cyc-A	50.868	6.393	P<0,05
FK506	50.868	3.425	P<0,05
MMF	50.868	4.147	P<0,05
MeP	50.868	14.862	P<0,05
Aza	50.868	25.369	P=0,002

İmmünsupresif ajanların testteki inhibisyon etkisi birbirleri ile karşılaştırıldığında; en düşük inhibisyon etkisi Aza'da görüldü. Aza'nın diğer immünsupresif ajanlarla arasındaki farkın istatistiksel olarak (AA ve AV yönünde) anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$). En iyi inhibe eden immünsupresif ajan FK506'nın ise immünsupresif ajanlarla arasındaki farka bakıldığında, MeP ve Aza ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$), MMF, Cyc-A ile istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).



Grafik 1: İmmünespresif Ajanların ve Kombinasyonların Proliferasyon Değerleri Ortalamalarının Grafiği (AA)



Grafik 2: İmmünespresif Ajanların ve Kombinasyonların Proliferasyon Değerleri Ortalamalarının Grafiği (AV)

30 hasta ve verici çiftimiz için açılan ve stimüle edilen tüm kuyulara, Cyc-A+Aza+MeP, Cyc-A+MMF+MeP, FK506+Aza+MeP kombinasyonları, ve 21 çift (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 no'lu) için açılan kuyulara, ayrıca kombine olarak FK506+MMF+MeP eklendi. Bu kombinasyon, 9 çifte (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) hücre yetersizliğinden dolayı uygulanamadı. Bu kombinasyonlardan elde edilen sonuçların, ortalama değerleri ve Wilcoxon testine göre p değerleri (Tablo 9-10, Grafik 1, 2)' de görülmektedir.

Tablo 9: AA yönünde ilave edilen immünosupresiflerin hücre proliferasyonundaki inhibisyon etkisi

Kombinasyonlar	PHA+sMLC	İmmünosupresif ilavesi ile	P değeri
Cyc-A+Aza+MeP	36.176	1.080	P<0,05
Cyc-A+MMF+MeP	36.176	724	P<0,05
FK506+Aza+MeP	36.176	628	P<0,05
Fk506+MMF+MeP	36.176	470	P<0,05

Tablo 10: AV yönünde ilave edilen immünosupresiflerin hücre proliferasyonundaki inhibisyon etkisi

Kombinasyonlar	PHA+sMLC	İmmünosupresif ilavesi ile	p değeri
Cyc-A+Aza+MeP	50.868	1.112	P<0,05
Cyc-A+MMF+MeP	50.868	643	P<0,05
FK506+Aza+MeP	50.868	425	P<0,05
Fk506+MMF+MeP	50.868	339	P<0,05

Bu ajanların kombinasyonlarının testteki inhibisyon etkisi birbirleri ile karşılaştırıldığında; en düşük inhibisyon etkisi olan kombinasyonun Cyc-A+Aza+MeP olduğu tespit edildi. Diğer kombinasyonlar ile arasındaki farkına bakılacak olursa; Cyc-A+MMF+MeP ile arasındaki farkın (AA ve AV yönünde) anlamlı olmadığı ($p=0,206$ ve $p=0,156$) görüldü. FK506+Aza+MeP ve FK506+MMF+MeP ile arasındaki farkın ise anlamlı olduğu ($p<0,05$) tespit edildi. En iyi inhibe eden kombinasyon FK506+MMF+MeP'in ise diğer kombinasyonlarla arasındaki fark göz önüne alınarak incelendiğinde ise; FK506+Aza+MeP arasındaki farkın (AA ve AV yönünde) anlamlı olmadığı ($p=0,217$ ve $p=0,217$) görüldü. Cyc-A+Aza+MeP Cyc-A+MMF+MeP ile arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0,05$) belirlendi.

3-İmmünosupresiflerin etkilediği hastalarda ortaya çıkan duyarlılık ve dirençlilik değerleri ile ilgili saptanan bulgular:

Çalışmada, PHA ile stimüle edilmiş kuyulara eklenen immünosupresif ajanlara olan proliferasyon cevap dikkate alınarak incelendiğinde; tüm immünosupresif ajanların her hastanın proliferasyon cevabını farklı derecede inhibe ettiği saptandı. Bu değerler gereç ve yöntemde verilen formüle göre bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 11 : Stimüle edilmiş kuyulara eklenen immüsupresif ajanların etkisi ile oluşan proliferasyon cevaptaki % inhibisyon değerleri

NO	Cyc-A		FK506		MMP		MeP		Aza	
	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV	AA	AV
1	73,77	75,18	88,28	96,85	88,38	96,58	36,68	12,84	13,39	4,44
2	76,25	97,33	95,53	98,71	97,13	99,15	90,49	92,03	18,15	8,81
3	76,12	70,35	91,39	94,54	90,88	94,24	94,99	96,08	94,62	94,94
4	88,9	92,93	96,27	97,16	96,32	98,2	96,34	97	95,42	83,54
5	96	95,97	96,43	96,59	95,84	97,14	96,04	97,6	95,6	79,82
6	66,21	68,69	84,18	88,64	86,34	86,88	82,55	88,49	16,91	26,01
7	94,32	97,23	93,47	95,99	94,15	94,5	79,82	94,44	66,78	79,11
8	89,28	87,92	94,32	95,25	93,72	93,97	94,4	95,99	83,55	50,96
9	97,53	98,01	97,27	97,84	97,14	96,8	90,42	92,83	91,34	94,11
10	73,6	94,06	88,08	98,19	86,74	97,92	55,62	93,27	53,39	60,01
11	71,81	82,68	93,4	96,72	91,92	96,75	76,03	49,98	19,28	36,32
12	97,78	98,41	97,28	97,64	96,48	97,51	57,24	75,26	63,8	75,1
13	95,76	96,4	95,32	97,33	92,52	94,45	36,52	37,05	9,5	26,41
14	84,18	83,1	95,98	98,14	89,81	89,49	53,58	56,69	24,11	12,43
15	95,01	90,64	95,75	96,43	95,48	93,2	22,8	10,03	22,18	27,42
16	84,08	94,52	20,09	15,32	57,48	78,89	27,74	17,7	18,89	16,19
17	95,24	95,93	88,16	92,35	94,15	95,89	68,94	74,55	22	37,54
18	93,16	96,99	94,06	97,15	94,51	95,37	15,4	34,17	39	3,06
19	18,34	12,66	79,56	92,44	53,23	93,17	65,52	77,62	58,09	71,89
20	64,96	60,64	69,33	74,02	66,04	66,4	64,2	77,09	67,62	78,5
21	84	98,95	88,3	91,87	57,34	70,12	74,64	79,68	62,26	92,87
22	71,59	91,25	95,96	97,74	91,23	94,76	76,78	90,11	47,33	21,08
23	93,24	96,43	83,55	97,71	89,9	90,49	75,27	95,02	54,84	67,74
24	97,55	98,27	95,01	93,72	91,17	94,27	86,65	94,32	53,82	31,16
25	70,25	85,54	65,41	90,89	52,22	73,1	63,12	81,04	13,12	17,63
26	95,15	96,86	92,02	97,38	97,73	97,99	8,54	6,74	16,18	43,44
27	33,26	44,64	36,14	15,09	35,62	14,03	29,76	25,71	32,64	21,97
28	94,92	94,1	91,78	92,72	90,06	91,62	93,65	92,89	93,72	86,98
29	95,84	95,92	96,21	95,31	96,33	93,72	53,3	39,19	48,96	32,29
30	57,52	57,28	87,42	95,38	85,51	93,45	89,36	89,34	93,79	82,36

Hücreleri; proliferasyonlarını \geq % 50 oranda inhibe eden immünsupresiflere karşı duyarlı, $<$ % 50' den daha az oranda inhibe eden immünsupresiflere karşı dirençli kabul ederek 30 hastayı değerlendirdiğimizde; Cyc-A'ya 2 hasta dirençli (no: 22, 10) (%6.7) diğerleri duyarlı (%93,3), FK-506'ya 2 hasta dirençli (no:10, 19) (%6,7) diğerleri duyarlı (%93,3), MMF'e hasta dirençli 1 (no:10) (%3,3) diğerleri duyarlı (%96,7), Mep'e 9 hasta dirençli (no:1, 3, 10, 14, 16, 18, 19, 21, 25) (%30) diğerleri duyarlı (%70) ve Aza' ya 16 hasta dirençli (no:1, 2, 3, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 30) (%53,3) diğerleri duyarlı (%46,7) olarak tespit edildi (Tablo 12).

Tablo 12: İmmünsupresif ajanlara duyarlı ve dirençli olan hasta sayılarının gösterilmesi

	Cyc-A	FK-506	MMF	Mep	Aza
\geq 50	28 (%93,3)	28 (%93,3)	29 (%96.7)	21 (%70)	14 (%46.7)
$<$ 50	2 (%6,7)	2 (%6.7)	1 (%3.3)	9 (%30)	16 (%53.3)
Toplam	30	30	30	30	30

Çalışmamızda, sMLC deki elde edilen proliferasyon oranlarına göre, PHA ile stimule edilmiş kuyulardaki proliferasyon oranlarındaki artışa bakıldığında; mismatch durumuna bağlı olarak değişiklik gösterdi. Hiç mismatch olmayan gruplarda (no: 3, 10, 11, 25, 29) MLC'de %175'lik bir proliferasyon artışı görülürken, 2A1B1DR mismatch'e sahip olan 4 no'lu hastada en yüksek proliferasyon (%1270) artışı görüldü (Tablo 13).

Tablo 13: HLA antijenlerindeki mismatch'lere göre hasta gruplarında PHA ile hücre proliferasyonundaki değişiklikler

Hasta No	Mismatch (MM)	PHA (%) Hücre Proliferasyonu	sMLC (AV) Hücre Proliferasyonu	sMLC+PHA (AV) Hücre Proliferasyonu
3,10,11,25,29	0 MM	175	13613	37429
21	1A1B MM	133	19953	46408
2	1B1DR MM	50	53008	79348
1,5,6,7,8,9,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,23,24,26,27,28,30	1A1B1DR MM	435	9921	53120
4	2A1B1DR MM	1270	3245	44468

Çalışmaya dahil edilen ve böbrek transplantasyonu yapılan hastalar, almakta olduğu immünsüpresif tedavileri ve genel durumları Tablo 14'da görülmektedir.

Tablo 14: Böbrek Transplantasyonu yapılan hastaların nakil tarihleri (Tx), tedavileri, gelişen Komplikasyonlar

Hasta No	Tx Tarihi	Tedavi	Komplikasyonlar
1	25.05.2000	Cyc-A+Aza+PRD	Sağlıklı
2	01.06.2000	FK506+Aza+PRD	Sağlıklı
4	17.05.2000	FK506+MMF+PRD	Sağlıklı
6	08.02.2001	Cyc-A+MMF+PRD	Sağlıklı
8	15.06.2000	Cyc-A+Aza+PRD	Sağlıklı
9	22.06.2000	FK506+MMF+PRD	Sağlıklı
10	13.06.2000	FK506+MMF+Delta Kortil	Akut Rejeksiyon Atağı
16	10.08.2000	Cyc-A+Aza+PRD	Akut Rejeksiyon
17	27.06.2000	FK506+MMF+Delta Kortil	Sağlıklı
19	01.08.2000	FK506+MMF+Delta Kortil Geçiş Cyc-A+MMF+Delta Kortil	(Gastrointestinal yan etki)
20	25.01.2001	FK506+MMF+PRD	Sağlıklı
22	17.10.2000	FK506+MMF+Delta Kortil	Sağlıklı
25	03.07.2000	FK506+MMF+Delta Kortil	Üriner Enfeksiyon
26	10.08.2000	FK506+MMF+Delta Kortil	Sağlıklı
27	14.11.2000	Cyc-A+MMF+PRD	Sağlıklı
28	21.11.2000	FK506+MMF+Delta Kortil	Sağlıklı
29	11.01.2001	Cyc-A+Aza+PRD	Sağlıklı

V. TARTIŞMA

Günümüzde gerek kemik iliği ve organ nakli sonrasında, gerekse çeşitli otoimmün hastalıkların tedavisi amacıyla farklı immüsupresif ajanlar kullanılmaktadır. Bunlardan Cyc-A, MeP ve Aza klinikte oldukça sık uygulanmaktadır. Son yıllarda ise, iki yeni ürün FK506 ve MMF immüsupresif tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Böbrek nakli düşünülen hastalarda, nakilden sonra immüsupresif tedavi, nakledilen doku veya organın alıcıda uzun süre yaşaması için son derece önemlidir. Hem hücresel hem de humoral immün yanıtları inhibe edebilen bu immüsupresif ajanların, akut ve kronik rejeksiyonun kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir.

Yapılan birçok çalışmada tedavi amaçlı kullanılan immüsupresiflerin tek tek yada kombine uygulanması sonucunda oluşturabilecekleri yan etkiler araştırılmış ve hasta gruplarında ortaya çıkan graft survi, hasta survi, rejeksiyon oranları, serum kreatinin düzeyleri incelenmiş ve uygulanan immüsupresif tedavi şekillerine alternatif öneriler getirilmiştir (10,54).

Hücre kültüründe immüsupresif ajanlarla ilgili olarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda hücreler çeşitli mitojenlerle stimüle edilmişler ve stimüle edilen hücrelerin üzerine immüsupresif ajanlar eklenerek, proliferatif cevapların inhibisyonuna bakılmıştır. Mitojenler T ve B hücre klonlarını aktive edebilen poliklonal aktivatörler olarak bilinirler. Mitojenlerden T hücrelerini aktive edebilen PHA, periferik kan kültüründeki lenfositleri uyararak, onları mitoz bölünmeye itmektir (35).

Testimizde, sMLC'ye paralel olarak yaptığımız PHA ile stimüle edilen kuyulardaki proliferasyon değerlerinde, sMLC'deki proliferasyon değerlerine göre anlamlı artışlar gözlemlendi. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde; proliferasyon değerleri ortalamalarının AA için, 8472'den (sMLC) 36176'ya (PHA), AV için ise 12085'den (sMLC) 50868'ya (PHA) çıktığını belirledik. Wilcoxon testine göre PHA eklenmesi ile oluşan proliferasyon değerlerindeki artış anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Yapılan birçok in vitro çalışmalarda, tüm immüsupresif ajanların, karışık lenfosit kültür reaksiyonlarında, IL-2 üretimini bloke ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca PHA gibi mitojenlere karşı lenfositlerin proliferatif cevaplarını önlediği gösterilmiştir (69,76,77,81).

Çalışmamızda da PHA ile stimüle edilen kuyulara eklenen immüsupresif ajanların MLC cevapları inhibe ettiğini gördük (Tablo 7-8).

İmmüsupresif ajanlar sinerjik özelliklerinden dolayı çoğunlukla kombine olarak uygulanmaktadır. Kültür çalışmalarında, immüsupresif ajanların çeşitli kombinasyonları ile karşılaştırmalar yapılmaktadır. Kalsinörin inhibitörleri olan Cyc-A ve FK506 temel alınarak oluşturulan kombinasyonlarda MeP, MMF ve Aza kullanılmaktadır. Purin ve pirimidin inhibitörlerinden olan MMF ve Aza'lı karşılaştırmalarda, MMF'in Aza'ya göre daha güçlü bir immüsupresif ajan olduğu gösterilmiştir (96,97).

Çalışmamızda, bu ajanların kombinasyonlarının testteki inhibisyon etkisi birbirleri ile karşılaştırıldığında; en düşük inhibisyon etkisi olan kombinasyonun Cyc-A+Aza+Mep olduğu tespit edildi.

Diğer kombinasyonlar ile arasındaki farkına bakılacak olursa;

Cyc-A+MMF+Mep ile arasındaki farkın (AA ve AV yönünde) anlamlı olmadığı ($p=0,206$ ve $p=0,156$) görüldü.

FK506+Aza+Mep ve FK506+MMF+Mep ile arasındaki farkın ise anlamlı olduğu ($p<0,05$) tespit edildi.

En iyi inhibe eden kombinasyon FK506+MMF+Mep'in ise diğer kombinasyonlarla arasındaki fark göz önüne alınarak incelendiğinde ise;

FK506+Aza+Mep arasındaki farkın (AA ve AV yönünde) anlamlı olmadığı ($p=0,217$ ve $p=0,217$) görüldü.

Cyc-A+Aza+Mep Cyc-A+MMF+Mep ile arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0.05$) belirlendi.

Pollak ve arkadaşları, kültürde immüsupresif ajanlarla ilgili lenfosit hassasiyet çalışmaları yaparak, kullanılan ajanlara karşı saptanan direnç ve hassasiyetin böbrek allograft alıcılardaki rejeksiyon ve graft kaybı riskini belirlemede kullanılabileceğini, böylece transplantasyon sonrası

hastalara hangi immüsupresif ajanın kullanılması gerektiği konusunda yardımcı olunabileceğini belirtmişlerdir (93).

Pollak grubu ve Francis grubu çalışmalarında, glukokortikoidlere karşı lenfositlerin böbrek transplantasyonundan önce direnç ve duyarlılıklarını belirlemeye çalışmışlar, dirençli olan hastalarda böbrek transplantasyonundan sonra graft kaybı olasılığı ve akut rejeksiyon ataklarının görülme riskinin arttığını tespit etmişlerdir (93,98).

Zeevi ve arkadaşları antiproliferatif ajanlardan MMF, Mizorbin (MZR), FK506 ve Cyc-A'nın inhibitör etkilerini karşılaştırdıkları bir çalışmada; tüm antiproliferatif ajanların, Ca^{++} 'a bağlı ve Ca^{++} 'a bağlı olmayan T hücre aktivasyon yollarında, benzer in vitro potansiyele sahip olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca bu çalışmada FK506 ve Cyc-A'nın, erken aktivasyon genlerinin transkripsiyonunu inhibe ederek, T hücre reseptörleri yoluyla T hücre sinyal iletimini bloklamada daha etkili olduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmada tüm antiproliferatif ajanların, G1'den sentez fazına kadar hücrelerin gelişimini bloklayarak hücre aktivasyonunun son fazındaki etkileri test edilmiş olup, FK506 ve Cyc-A hücre bölünme siklusunu, G0/G1 interfazında inhibe ederek T hücre aktivasyonunu erken basamaklarda etkilediğini bildirmişlerdir (95).

Francis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise; böbrek transplantasyonu yapılacak hastalara in vitro ortamda lenfositlerin hassasiyetini araştırmışlar, Cyc-A, MeP ve ATG varlığında MLC test cevaplarını ölçmüşlerdir. Hastaların, MLC inhibisyonu % 50'den fazla ise duyarlı, % 50' den az ise dirençli olarak sınıflandırmışlardır. Çalışmalarına aldıkları 50 hastadan 29' unun tüm immüsupresiflere karşı duyarlı olduğunu bulmuşlar. Diğer 21 hastanın 4'ü Cyc-A'ya, 5'i MeP'e ve ATG'ye, 6'sı Cyc-A ve MeP'e, 6 tanesi ise sadece MeP'e dirençli bulunmuştur (11).

Pollak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Cyc-A ve MeP' e karşı lenfosit duyarlılığının in vitro çalışma ile tahmin edilebileceğini göstermişlerdir. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalara, in vitro Cyc-A ve MeP uygulayarak, hastaların bu ajanlara karşı olan duyarlılık ve direnç durumlarını saptamaya çalışmışlar ve % 50 inhibisyona neden olan dozları kabul ederek, her iki ajana duyarlı olan lenfositlere sahip bireyler

duyarlı-duyarlı, dirençli olan lenfositlere sahip bireyler dirençli-dirençli ve bunlardan birine duyarlı olan bireyler duyarlı-dirençli (Cyc-A / MeP ya da MeP / Cyc-A) olmak üzere gruplandırmışlardır (93).

Takeuchi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da, böbrek transplantasyonu sonrasında uygulanan immünsupresif tedavide kullanılan Cyc-A ve FK506' ya karşı lenfosit hassasiyetini in vitro çalışma ile tahmin edilebileceğini göstermişler ve bireylerde duyarlılık ve direnç durumlarını saptamaya çalışmışlardır. Bireyler düşük hassasiyet (LS), standart hassasiyet (SS), yüksek hassasiyet (HS) olarak sınıflandırılmıştır. Sonuçlar lenfosit inhibisyonu (IC50) olarak değerlendirildiğinde; FK506 ve Cyc-A'nın inhibisyon açısından anlamlı bir farka neden olmadığı görülmüştür (99).

Çalışmamızda da ise, hastalarımızın immünsupresif ajanlara olan hassasiyeti % 50 inhibisyon oranı göz önüne alınarak incelendiğinde; farklı hastaların farklı immünsupresif ajanlara karşı duyarlılık ve dirençlilik gösterdiği bulunmuştur (Tablo 11). Hasta grubumuzdan 28 bireyin Cyc-A'ya, 28 bireyin FK506'ya, 29 bireyin MMF'e, 21 bireyin MeP'e ve 14 bireyin de Aza'ya karşı daha duyarlı olduğunu saptadık. 2 bireyin Cyc-A'ya, 2 bireyin FK506'ya, 1 bireyin MMF'e, 9 bireyin MeP'e ve 16 bireyin de Aza'ya karşı dirençli olduğunu tespit ettik (Tablo 12).

Bu aşamada, Cyc -A ve FK-506'nın aynı yönde etki ettiği düşünülürse, benzer hasta gruplarının etkilendiği görülmektedir. Halbuki MMF ile Aza benzer yönde etki ettiği halde, daha az sayıda hasta grubunun aynı şekilde etkilendiği dikkati çekmektedir (Tablo 12).

Francis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, transplantasyon yapılan hastaların akut rejeksiyon geçirme ve graft kaybı açısından dirençli ve duyarlı gruplar arasındaki farkına bakmışlardır. Dirençli gruplar arasında, akut rejeksiyondan dolayı graft kaybı ($p<0.02$) ve akut rejeksiyon ataklarının ($p<0.05$) çok duyarlı gruba göre daha sık olduğu bildirilmiştir (11).

Pollak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, transplantasyon yapılan grupta, dirençli-dirençli ve tek bir immünsupresif ajana dirençli olan hastalarda, akut rejeksiyon riskinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Dirençli- dirençli hasta grubunda, allograft rejeksiyon oranı %78 iken, tek bir immünsupresif ajana dirençli grubunda %63 ve duyarlı-duyarlı grubunda ise %38 olarak belirlemişlerdir (93).

Takeuchi'nin çalışmasında ise, transplantasyon yapılan grupta HS hastalarda graft sürvi oranının SS ve LS' ye göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Transplantasyon yapılan grupta LS gösteren hastalarda akut rejeksiyon riskinin yüksek olduğu açıklanmıştır. LS hasta grubunda, allograft rejeksiyon oranı %60 iken, SS grubunda %54 ve HS grubunda %44 olarak bulunmuştur. Böbrek transplantasyon öncesinde in vitro testlerle immünsupresiflere karşı lenfosit hassasiyetinin ölçülmesinin böbrek allograft alıcılarındaki rejeksiyon ve graft kaybı riskinin belirlenmesinde kullanılabileceğini ve tedavide hangi ajanın hasta için en uygun olduğunun saptanabileceğini vurgulamışlardır (99).

Çalışmamızda da hastalardan 17 tanesine (1,2,4,6,8,9,10, 16,17,19,20,22,25,26,27,28,29 no'lu) (%56) böbrek transplantasyonu yapılmıştır. Akut rejeksiyon (16 no'lu) ve akut rejeksiyon atağı (10 no'lu) geçiren iki hastadan 10 no'lu hastanın tüm immünsupresiflere, 16 no'lu hastanın ise MeP ve Aza'ya karşı dirençli olduğu saptanmıştır. MeP ve Aza'ya dirençli olan 25 no'lu hastanın nakilden sonra ağır derecede enfeksiyon geçirdiği bildirilmiştir. FK506, Aza ve MeP'e karşı dirençli olduğu saptanan 19 no'lu hastanın transplantasyon sonrası FK506+MMF tedavisi alırken, gastrointestinal yan etkilerinden dolayı Cyc-A'ya geçtiği bildirilmiştir (Tablo14).

Buc ve arkadaşları sMLC'de alıcı ve verici kombinasyonları arasında mismatch varsa bu mismatch'e bağlı olarak, çoğalan hücre sayısında değişiklik olduğunu saptamışlardır. Alıcı ve vericinin MHC Sınıf II antijenlerinin arasında uyumsuzluk olduğu zaman hücre proliferasyonunun, Sınıf I antijenleri arasında uyumsuzluk olduğunda saptanan hücre proliferasyonundan daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (100).

Çalışmamızda, PHA ile stimüle edilmiş kuyulardaki proliferasyon sonuçları ile, sMLC deki kuyularda elde edilen proliferasyon sonuçlarındaki artış oranı, hastaların mismatch durumları dikkate alınarak

incelendiğinde; doku uyumunda mismatch olmayan gruplarda (no: 3, 10, 11, 25, 29), mismatch olan gruplara kıyasla, özellikle en fazla mismatch'e sahip olan hasta'ya (no: 4) göre, proliferasyon artış oranının daha az olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13).

Bir çok araştırmacı, immünsupresif ajanlarla ilgili lenfosit hassasiyet çalışmalarında, ajanlara karşı saptanan direnç ve hassasiyetin, böbrek allograft alıcılardaki rejeksiyon ve graft kaybı riskini belirlemede kullanılabileceğini saptamışlardır. Böylece transplantasyon sonrası hastalara hangi immünsupresif ajanın kullanılması gerektiği konusunda yardımcı olunabileceği belirtmişlerdir (93).

İn vitro da yapılan bir çok çalışmada, immünsupresif ajanlar tek başlarına ve kalsinörin inhibitörleri temel alınarak MMF, Aza ve kortikosteroidlerden oluşan çeşitli kombinasyonların MLC cevapları üzerinde etkilerine bakılmıştır. MMF'in Aza'ya göre hücre proliferasyonunu daha iyi inhibe ettiği belirtilmiştir. Cyc-A ve FK506'nın da hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (96).

Biz de çalışmamızda immünsupresif ajanları ayrı ayrı ve çeşitli kombinasyonlarda uygulayarak, stimüle edilen lenfosit proliferasyonunu bu ajanlar tarafından inhibisyonunu görmeye çalıştık. Aynı moleküler etki mekanizmasına sahip olan Cyc-A ve FK506'nın, proliferasyon cevapları birbirlerine yakın derecelerde inhibe ettiğini gördük. MMF'in de Aza'ya oranla hücre proliferasyonunu daha iyi inhibe ettiğini saptadık (Tablo 7-8). Kalsinörin inhibitörleri olan Cyc-A ve FK506'lı kombinasyonlara bakacak olursak; MMF içeren 3'lü kombinasyonlar Aza'lı kombinasyonlara göre daha iyi inhibisyon göstermiştir.

Çalışmamıza aldığımız 30 hastanın 17'sine böbrek transplantasyonu yapılmıştır. Transplantasyonu takiben 6 ay içinde 2 hastada (10, 16 no'lu) (%11,7) akut rejeksiyon olayı görülmüştür. Transplantasyon sonrası Cyc-A+Aza+MeP tedavisi alan ve akut rejeksiyondan dolayı graft kaybı yaşayan 16 no'lu hastanın Aza ve MeP'e karşı dirençli olduğu saptanmıştır. FK506+MMF+Deltakortil tedavisi alan 10 no'lu hastanın ise tüm immünsupresif ajanlara karşı dirençli olduğu görülmüştür. FK506'ya karşı dirençli olan 19 no'lu hastanın ise transplantasyon sonrası

tedavisinde FK590+MMF+Deltakortil tedavisi aldığı daha sonra gastrointestinal yan etkilerden dolayı FK506'dan Cyc-A'ya geçtiği bildirilmiştir. MeP ve Aza'ya dirençli olan 25 no'lu hastanın nakilden sonra ağır derecede enfeksiyon geçirdiği bildirilmiştir. Diğer 13 hasta, 6 ay için herhangi bir rejeksiyon göstermeden klinik olarak iyi durumdaydı.

Böbrek transplantasyonundan sonra graft rejeksiyonunu önlemek amacı ile kullanılan immünsupresif ajanlar her hastayı farklı şekilde etkilemektedir. Bu nedenle tedavi protokolüne alınacak ajanların hastalara uygunluluğunun belirlenebilmesi önemlidir. Yapılan in vitro çalışmalar ile hastaların immünsupresif ilaçlara karşı dirençli veya duyarlı olabileceklerini belirlemenin mümkün olduğu gösterilmiştir. Biz de yaptığımız bu çalışmada, elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, böbrek transplantasyonuna hazırlanan hastalara, uygulanan MLC testi ile en uygun immünsupresif tedavi protokolünü belirlenebileceğini saptadık.

VI. ÖZET

Böbrek transplantasyonu, son dönem kronik böbrek yetmezliğinde en başarılı tedavi şekli olarak bilinmektedir. Transplantasyon sonrası uygulanan immünsupresif tedavi, nakledilen doku ve organın alıcıda uzun süre yaşaması için önemlidir. Son yıllarda immünsupresif tedavi amacıyla bilinen ajanlar yanı sıra, yeni immünsupresifler de kullanıma sunulmuştur.

Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, bu ajanlara karşı saptanan direnç ve hassasiyetin, böbrek alıcılarındaki rejeksiyon ve graft kaybı riskini belirlemede kullanılabileceği saptanmıştır. Bu nedenle biz de stimüle edilen MLC'ye, transplantasyon sonrası kullanılan ajanları ekleyerek proliferasyon cevaplarını inhibe etme derecelerini değerlendirdik.

Çalışmamızda, immünsupresif ajanlardan FK506, Cyc-A, MMF, MeP ve Aza' nın, tek tek ve kombinasyonları, sMLC ve PHA ile stimüle MLC' de kullanıldı. Stimüle edilen lenfosit proliferasyonunun immünsupresif ajanlar tarafından inhibisyonu değerlendirildi. Elde edilen veriler doğrultusunda, aynı etki mekanizmasına sahip Cyc-A ve FK506'nın proliferasyon cevaplarını inhibe etme derecesinin, birbirlerine yakın değerlerde olduğunu, MMF'in ise Aza'ya göre daha iyi bir inhibisyon sağladığını tespit ettik.

Çalışmamızda, hastalarımızın immünsupresif ajanlara olan hassasiyeti, % 50 inhibisyon oranı göz önüne alınarak incelendiğinde; farklı hastaların farklı immünsupresif ajanlara karşı duyarlılık ve dirençlilik gösterdiği bulunmuştur. Çalışmayı oluşturan gruptan 28 bireyin Cyc-A'ya, 28 bireyin FK506'ya, 29 bireyin MMF'e, 21 bireyin MeP'e ve 14 bireyin de Aza'ya karşı daha duyarlı olduğu saptandı. 2 bireyin Cyc-A'ya, 2 bireyin FK506'ya, 1 bireyin MMF'e, 9 bireyin MeP'e ve 16 bireyin de Aza'ya karşı dirençli olduğu tespit edildi

Çalışmamızda, bu ajanların kombinasyonlarının testteki inhibisyon etkisi birbirleri ile karşılaştırıldığında; en düşük inhibisyon etkisi olan kombinasyonun, Cyc-A+Aza+Mep, en yüksek inhibisyon etkisi olan kombinasyonun FK506+MMF+Mep olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak böbrek transplantasyonundan sonra, graft rejeksiyonunu önlemek için kullanılan immünsupresif ajanların etkinliklerinin, hastalar arasında farklılık gösterdiğini ve bu farklılıkların da çalışmamızda yapmış olduğumuz MLC testi ile in vitro olarak önceden tespit edilebileceğini ve böylece, hastanın en uygun immünsupresif ajanı kullanması ile, gelişebilecek rejeksiyon riskinin en aza indirilebileceği kanısına vardık.



VII. SUMMARY

Kidney transplantation is known to be the most successful treatment for the last term chronic renal deficiency. The immunosuppressive treatment applied after the transplantation is very important for a long-time survey of the transplanted tissue and organ in the patient. In recent years, new immunosuppressives are being used besides the conventional agents.

The sensitivity and resistance to these agents can be used as a marker in determining the risk of rejection and graft failure by cell culture studies. For this reason, in our study we added the agents that are used after the transplantation to the stimulated MLC to evaluate the inhibition levels of the proliferation responses.

In our study, different combinations or single forms of immunosuppressive agents such as FK506, Cyc-A, MMF, MeP and Aza are used in sMLC and PHA stimulated MLC. The inhibition of the stimulated lymphocyte proliferation by the immunosuppressive agents is evaluated. The data obtained from the cell culture studies showed us that two immunosuppressives which have the same effect mechanism, Cyc-A and FK506, have levels of inhibition of proliferation responses close to each other, whereas MMF provides a better inhibition when compared to Aza.

In our study, when the sensitivity of our patients to the immunosuppressive agents with a 50 % inhibition is searched, it is found that different patients showed different sensitivity and resistance to different immunosuppressive agents. It is determined that 28 patients of the study group were sensitive to Cyc-A, 29 of them were sensitive to MMF, 21 patients were sensitive to Mep and 14 were more sensitive to Aza. 2 patients were found to be resistant to Cyc-A, 2 were resistant to FK506, 1 of them was resistant to MMF, 9 were resistant to MeP and 16 of them were determined to be resistant to Aza.

In our study, when the inhibition of the combination of these agents in the assay is compared to each other it is found that, Cyc-A+Aza+MeP combination had the lowest inhibition effect where

FK506+MMF+Mep combination had the highest inhibition effect.

As a result, the immunosuppressive agents used after the kidney transplantation to prevent graft rejection differs from patient to patient and these differences can be obtained before by the MLC assay as done in our study, and we concluded that by the application of the most appropriate immunosuppressive agent to the patient, the risk of probable rejection can be decreased.



VIII. KAYNAKLAR

1. Andreoli TE., Carpenter CC. J., Plum F., Smith LH.: Cecil Essentials of Medicine, Second edition, WB. Saunders Company. 1990; 302-315
2. Murray JE., Merrill JP. and Harrison JH.: Kidney transplantation between seven pairs of identical twins, Ann. Surg. 1958; 148:343
3. Pirsch JD. : Care of the Transplant Patient. Clinical Symposia. 1998; 1. 50:2
4. Strom TB., Tilney NL.: Renal transplantation: Clinical aspects, in Brenner BM., Rector FJ. (eds): The Kidney. Philadelphia; WB. Saunders Company. 1986; 1941-1976
5. Stites DP., Terr AI., Parslow TG.: Clinical Transplantation, Basic and Clinical Immunology, Eighth edition. 1994; 744-763
6. Peakman M., Vergani D.: Transplantation, Basic and Clinical Immunology. 1997; 147-160
7. Sachs DH.: The major histocompatibility complex, in Paul W. (ed): Fundamental Immunology. New York, Raven Press. 1984; 303-346
8. Stites DP., Terr AI., Parslow TG.: Histocompatibility Testing, Basic and Clinical Immunology, Eighth edition. 1994; 237-255
9. Roitt I., Brostoff S., Male D.: Transplantation and Rejection, Cellular and Molecular Immunology Second Cellular and Molecular Immunology, Fourth edition. 1996; 26.8
10. Crespo JF., Gorriz JL., Sancho A., Avila A., Alcoy E. And Pallardo LM.: Triple Therapy With Mycphenolate Mofetil, Cyclosporine, and Prednisone in renal Transplantation, Transplantation Proceedings. 1999; 31: 2261-2262
11. Francis D.M.A., Dumble L.J., Bowes L., G.J.A. Clunie, and I.M. Macdonald.: Adverse Influence of Recipient Lymphoid Resistance to In Vitro Immunosuppression on the Outcome of Kidney Transplants, Transplantation. 1988; 46: 853-857
12. Dyer P., Middleton D.: Histocompatibility testing a practical Approach. 1992; 3-8

13. Kuby J.: Overview of the immun system, *Immunology*, Third edition. 1997; 3-22
14. Weir DM., Stewart J.: *Immunology seventh edition ELBS with Churchill Livingstone Educational Low-Priced Books Scheme funded by the British Government*. 1993; 8
15. Stites DP., Terr AI. Parslow TG.: *Cells of the Immune Response: Lymphocytes and Mononuclear Phagocytes. Basic and Clinical Immunology*, Seventh edition. 1991; 61-68
16. Stites DP., Terr AI., Parslow TG.: *Lymphocytes Lymphoid tissue*, Basic and Clinical Immunology, Eighth edition. 1993; 22-30
17. Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS.: *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia; W.B. Saunders Company. 1997; 97-113
18. Trowsdale J. Organization of the human MHC. In: Svejgaard A., Buus Soren., Fugger L., (eds). *HLA and Disease- the Molecular Basis*. Alfred Benzon Symposium 40, Copenhagen. 1997; 21-32
19. Peakman M., Vergani D.: The human leukocyte antigens, *Basic and Clinical Immunology*. 1997; 54-57
20. Strominger JL., Wiley DC.: The class I and class II proteins of the human major histocompatibility complex. In: Svejgaard A., Buus Soren., Fugger L., (eds). *HLA and Disease-the Molecular Basis*. Alfred Benzon symposium 40, copenhagen. 1997; 38-45
21. Dausset J. Leuco-agglutinins IV, Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang*. 1954; 4:190
22. Rood JJ van., Emis JG., Leeuwen A van. Leukocyte antibodies in sera pregnant women. *Nature*. 1958; 1881:1735
23. Roitt I., Brostoff J, Male D.: *Immunology*. London; Mosby-Year Book. 1993; Chapter 5.
24. Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS.: *The major Histocompatibility Complex. Cellular and Molecular Immunology*. Second edition. By WB. Saunders Company 1994; 104-114
25. Kuby J.: *Major histocompatibility Complex*, *Immunology*. Third edition. 1997; 224-240

26. Stites DP., Terr IA., Parslow TG.: Antigen presentation and The Major Histocompatibility Complex. Basic and Clinical Immunology. Eighth edition. 1994; 58-65
27. Roitt I.: The recognition of antigens, Roitt's Essentials Immunology, Ninth edition. 1997; 72-79
28. Rohades DA., Trowsdale J.: Genetics and molecular genetics of the MHC. Reviews in immunogenetics. 1999; 1: 21-31
29. Weir DM., Stewart J.: Antigen processing and presentation, Immunology. Seventh edition. 1993; 113-118
30. Braciale TJ., Braciale VL.: Antigen presentation structural themes and functional variations, Immunol Today. 1991; 12:124
31. Stites DP., Terr IA., Parslow TG.: The Immune response, Basic and Clinical Immunology, Eighth edition. 1993; 42-49
32. Kuby J.: T-Cell Maturation, Activation and Differentiation, Immunology, Third edition. 1997; 295-299
33. Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS.: Cytokines. Cellular and Molecular Immunology. Second edition. By WB. Saunders Company. 1994; 239-260
34. Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS.: Effector mechanism of immun responses, Cellular and Molecular Immunology, Second edition. 1997; 250-267
35. Kuby J.: Cytokines, Immunology, Third edition. 1997; 329-333
36. Kuby J.: Mitogens, Immunology, Third edition. 1997; 101-104
37. Stites DP., Terr AI., Parslow TG.: Lymphocytes and Lymphoid Tissues, Eighth edition. 1994; 29-31
38. Barch MJ., Lawce HJ., Arshan MS.: Periferal Blood Culture. The ACT Cytogenetics Laboratory Manual. Second edition, Raven Press New York. 1991; 18
39. Gülay H.: Böbrek nakline hazırlık, Aktüel Tıp Dergisi. 1996; 1: 42
40. Brostoff J. Male DK.: Clinical Immunology. By Mosby, an imprint of Times Mirror International Publishers Limited Printed by Grafos S.A. Arte sobre papel, Barcelona, Spain. 1994; 24-106

- 41.Kirkpatrick HC.: Transplantation Immunology, JAMA. 1987; 258: 2993-3000
- 42.Çarin M.: Transplantasyon İmmünolojisi, Aktüel Tıp Dergisi. 1996; 1: 33-37
- 43.Breimer ME., Samuelsson BE.: The specific distribution of glycolipid-based blood group A antigens in human kidney related to A1/A2, Lewis, and secretor status of single individuals. Transplantation. 1986; 42: 88
- 44.Rydberg L., Breimer ME., Brynger H., and Samuelsson BE.: Abo-incompatible kidney transplantation (A2 to O). Transplantation. 1990; 49: 954
- 45.Akkoç N. And Scornik JC.: Intramolecular specificity of anti-HLA alloantibodies. Hum. Immunol. 1991; 30: 91
- 46.Olerup O. And Zetterquist H.: HLA-DRB1*01 subtyping by allelespecific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. Tissue Antigens. 1991; 37: 2197
- 47.Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS.: Immune responses to tissue transplants, Cellular and Molecular Immunology, Second edition. By WB. Saunders Company. 1994; 339-343
- 48.Kuby J.: Transplantation Immunology, Immunology, Third edition. 1997; 567
- 49.Arik N.: Renal Transplantasyonda İmmünsüpresif Tedavi. Aktüel Tıp Dergisi.1996;1: 51-54
- 50.Murray JE., Merril JP., Dammin GJ. Et al. Study of transplantation immunity after total body irradiation: clinical and experimental investigation. Surgery. 1960; 48: 272
- 51.Murray JW., Merrill JP., Harrison JH., Wilston RE., and Dammin GJ.: Prolonged survival of human kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. N. Engl. J. Med. 1963; 268: 1315
- 52.Calne RY., White DJG., Thiru S., et al.: A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologous renal transplants in dogs. Lancet. 1978; 2: 1323

53. Kahl A., Bechstein WO., Platz K., Müller A., Berweck S., Venz S., Neuhaus P., and Frei U.: First results with a Quadruple Therapy Regimen Including Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil in Patients After Combined Pancreas and Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 1998; 30: 505-506
54. Rang HP., Dale MM., Ritter HP.: *Corticosteroids. Pharmacology*. Fourth edition, Churchill Livingstone Harcourt Broce and Company Limited. 1999; 416-417
55. Billingham RE., Krohn PL., Medawar PB.: Effects of cortisone on survival of skin homografts in rabbits, *Br Med J*. 1951; 1: 4716
56. Hollenberg SM., Giguere V., Segui P., Evans RM.: Colocalization of human glucocorticoid receptor, *Cell*. 1987; 49: 39
57. Giguere V., Hollenberg SM., Rosenfeld MG., Evans RM.: Functional domains of the human glucocorticoid receptor, *Cell*. 1986; 46: 645
58. Donald EH., Wossim YA., and Terry BS.: Trends In The Use of Glucocorticoids In Renal Transplantation, *Transplantation*. 1994; 57: 979-989
59. Knudsen PJ., Dinarello CA., Strom TB.: Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of IL-1' in U937 cell, *J Immunol*. 1987; 139: 4129
60. Kern JA., Lamb RJ., Reed JC., Danielle RP., Nowell PC.: dexamethasone inhibition of IL-1 β production by human monocytes. Posttranscriptional mechanism, *J Clin Invest*. 1988; 81: 237
61. Zanker B., Walz G., Wieder KJ., Strom TB.: Evidence that glucocorticosteroids block expression of human IL-6 gene by accessory cells, *Transplantation*. 1990; 49:183
62. Ray A., Sehgal PB.: cytokines and their receptors: Molecular mechanism of IL-6 gene expression by glucocorticosteroids, *J Am Soc Nephrol*. 1992; 2 (suppl): 214
63. Vacca A., Felli MP., Farina AR., et al.: Glucocorticoid receptor-mediated suppression of IL-2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements, *J Exp med*. 1992; 175: 637

64. Granelli-Piperno A., Nolan P., Inaba K., Steinman RM.: The effects of immunosuppressive agents on the induction of nuclear factors that bind to sites on the IL-2 promoter, *J Exp Med.* 1990; 172: 1869
65. Vacca A., Martinotti S., Screpanti I., et al.: Transcriptional regulation of the IL-2 gene by glucocorticoid hormones, *J Biol Chem.* 1990; 265: 8075
66. Gessani S., McCandless S., Baglioni C.: The glucocorticoid dexamethasone inhibits synthesis of IFN by decreasing the level of its mRNA, *J Biol Chem.* 1988; 263: 7454
67. Arya SK., Wong-Staal F., Gallo RC.: Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma interferon mRNA, *J Immunol.* 1984; 133: 273
68. Ellion GB., Callahan S., Bieber S., Hitchings GH., and Rundles RW.: A summary of investigations with 6-(1-methyl-4-nitro-1H-imidazo-5-yl) thio purine (BW 57-322) *Cancer Chemother. Rep.* 1961; 14:93
69. Murray JE., Merrill JP., Harrison JH., Wilson RE., and Dammin GJ.: Prolonged survival of human-kidney homograft by immunosuppressive drug therapy. *N. Engl. J. Med.* 1963; 263: 1315
70. Mussche MM., Ringoir SGM. And Lamiere NN.: High intravenous doses of methylprednisolone for acute cadaveric renal allograft rejection. *Nephron.* 1976; 16:289
71. Stites DP., Terr AI., Parslow TG.: *Immunosuppressive Therapy, Basic and Clinical Immunology*, Eighth edition. 1994; 765-779
72. Sandorama *The Physician's Panorama.* 1986; 18-20
73. Calne RY., Rolles K., White DJG., et al.: Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 36 recipients of cadaveric organs: 32 kidney, 2 pancreas and 2 livers. *Lancet* 1979; 2:1033
74. Konuk N.: Akut Graft Versus Host Hastalığı, *Klinik Gelişim.* 1997; 10: 57-59
75. Roy First M. An Update on New Immunosuppressive Drugs Undergoing Preclinical and Clinical Trials: Potential Applications in Organ Transplantation. *American Journal of Kidney Diseases.* 1997; 29,2: 303-317

76. Stuart LS. and Gerald RC.: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today* 1992; 13: 137-141
77. Wiesinger D. and Borel JF.: Studies on the mechanism of action of cyclosporin A. *Immunobiology*. 1979; 156: 454
78. Yoshimura N. and Oka T.: FK506, a new immunosuppressive agent: a review. *J Immunol Immunopharmacol*. 1990; 10:32-36
79. J. Forsythe for the European Multicentre Tacrolimus/MMF Study Group.: Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil in Cadaveric Renal Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*. 1999; 31 (Suppl 7A) 69-71
80. Fulton B. and Markham A.: Mycophenolate Mofetil. A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacy in Renal Transplantation. *Drugs*. 1996; 51(2): 278-298
81. Shaw LM., Sollinger HW., Halloran P., Morris RE., Yatscoff RW., Ransom J., Tsina I., Keown P., Holt DW., Lieberman R., Jaklitsch A. and Potter J.: Mycophenolate Mofetil: A Report of the Consensus Panel. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1995; 17: 690-699
82. Allison AC., Eugui EM. and Sollinger HW.: Mycophenolate Mofetil (RS-61443): mechanism of action and effects in transplantation. *Transplant. Rev.* 1993; 7: 129
83. Stites DP., Terr AI., Parslow TG.: Clinical Laboratory Methods for Detection of Cellular Immunity, *Basic and Clinical Immunology*. 1994; 208
84. Kuby J.: Cell Mediated and Humoral Effector Responses, *Immunology*, Third edition *Immunology*. 1997; 391
85. Friedman EA., Rektan JW., Marshall DC., Henry L., Merrill JP.: Accelerated skin graft rejection in humans preimmunized with homologues peripheral leukocytes. *J Clin Invest*. 1961; 40:2162
86. Bain M., Vas MR., Lowenstein L.: The development of large immature mononuclear cells in mixed lymphocyte cultures. *Blood*. 1964; 8:108
87. Bach FH. and Amos DB.: Hu-I: Major histocompatibility locus in man. *Science*. 1967; 56: 1506
88. Yunis EJ. and Amos DB.: Three closely linked genetic systems relevant to transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68: 3031

89. Bach FH and Vognow NK.: One way stimulation in mixed lymphocyte cultures. *Science*. 1966; 153:545
90. Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS.: *Immunity in defense and disease, Cellular and Molecular Immunology, Third edition, 1997; 366-370*
91. Christopher Paryton: *Matching techniques and HLA typing. Bone Marrow Transplantation in Practice Ed.: Jennifer Treleaven, John Barrett. Churchill Livingstone, London 1992; 187*
92. Opelz G., Terasaki PI.: Significance of mixed leukocyte culture testing in cadaver kidney transplantation. *Transplant*. 1977; 23: 375
93. Pollak R., Dumble L.J., Lazda VA., Maddux MS., Stormoen B., and Ward M.: Utility of an In Vitro Immunoassay to Guide Immunosuppressive Therapy, *Transplantation Proceedings*. 1991; 23: 1113-1114
94. Pukhalsky AL., Elena A., Kalashnikova VN., Lyashko and LA. Pevnitsky.: Inhibition of Phytohemagglutinin-Induced Lymphocyte Proliferation by Dexamethasone: Mechanism of Individual Susceptibility. *Int. J. Immunopharmac*. 1990; 12 (6): 657-663
95. Zeevi G., Yao Z., Venkataraman R., Duquesnoy R., Todo S., Fung J., Starzl TE.: Comparative In Vitro Studies on the Immunosuppressive Effects of Purine and Pyrimidine Synthesis Inhibitors, *Transplantation Proceedings*. 1993; 25(1): 781-783
96. Hibbins M., Inutsuka S., Chapman JR.: Inhibition of PHA induced mononuclear cell proliferation by FK506 in combination with cyclosporine, methylprednisolone, 6-mercaptopurine and mycophenolic acid, *Transplant Immunol*. 1993; 1 (1): 66-71
97. Nagashima N., Shalabi A., Watanabe T., Ogawa N., Koyama I., Kyo S., and Burdick JF.: Immunocompetence Assay for Net Effect of Combined Immunosuppression, *Transplantation Proceedings*. 2001; 33: 2350-2351
98. Francis DMA., Dumble LJ., Bowes LG., Macdonald IM., Kincaid-Smith P., and Clunie GJA.: Preoperative Identification of High-Risk Recipients of First Kidney Transplants by In Vitro Lymphocyte Resistance to

**Immunosuppressive Agents, Transplantation Proceedings. 1991; 23:
1323-1324**

**99. Takeuchi H., Hirano T., Oka K., Mizumoto K., Akashi T., Sakurai E.,
Degawa T., Uchiyama M., Kozaki K., Matsuna N., Nagao T., and Kozaki
M.: Lymphocyte sensitivity to Cyclosporine and Tacrolimus in Chronic
renal Failure Patients and Clinical Significance in renal transplantation,
Transplantation Proceeding. 1998; 30: 36-39**

**100. Buc M., Niks M., Blaha M., Steruska M., Mistrik M.: Possibilities finding
identical HLA donor-recipient pairs for bone marrow transplantation,
Bratisl Lek Listy. 1990; 91: 516-520**



IX. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Çanakkale’de doğdum ilk ve orta eğitimimi Çanakkale’de, Liseyi İstanbul’da tamamladıktan sonra 1990 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüne girdim. 1995 yılında mezun oldum. 1998 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım.