



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RİTUKSİMAB KULLANIMININ RENAL TRANSPLANTASYON HASTALARINDA ATEROSKLEROTİK SÜRECE ETKİLERİ

İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Dr. Numune Aliyeva

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydın Türkmen

İSTANBUL

2017

ÖNSÖZ

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ihtisasım sürecinde bana emeği geçen başta Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ ve nezdinde tüm hocalarıma,

Bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıları ve tez çalışmam sırasında hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Aydın TÜRKMEN'e,

Tez çalışmam sırasında gerekli laboratuvar çalışmaları gerçekleştiren İ.Ü. Tıbbi Biyoloji Bilim Dalında görevli sayın Biyolog Sabahat AKGÜL ve Aydın Üniversitesinde görevli sayın Biyolog Ayşe EROL 'a,

Tezin yürütülmesinde büyük emek harcayan başta hemşire Meryem SALHAOĞLU olmak üzere İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı tüm hemşire, tıbbi sekreter ve sağlık personeline,

İhtisas sürem boyunca beraber çalıştığım İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nda görevli tüm araştırma görevlisi, uzman doktor, hemşire ve diğer sağlık çalışanlarına,

Benim günlere gelmemde büyük emeği olan saygıdeğer anneme, babama ve tüm yakınlarıma,

Teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Dr. Numune Aliyeva

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR	III
TABLolar DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	1
AMAÇ	17
HASTALAR VE YÖNTEM	18
BULGULAR	22
TARTIŞMA	31
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ	39

KISALTMALAR

KBH	Kronik böbrek hastalığı
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
ATG	Anti-timosit globulin
ALG	Anti-lenfosit globulin
İL-2ra	İL-2 reseptör alfa geni
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
DSA	Donör Spesifik Antikor
CMV	Sitomegalovirüs
CMV DNA	CMV deoksiribonukleik asit
BKV DNA	BKV deoksiribonukleik asit
MDA	Malondialdehid
ApoB	Apolipoprotein B
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein (low density lipoprotein)
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein (high density lipoprotein)
Ox-LDL	Oksidize düşük dansiteli lipoprotein
IFN-gamma	İnterferon-gamma
İL-4	İnterlökin-4
İL-10	İnterlökin-10
İL-12	İnterlökin-12
İL-18	İnterlökin-18
İL-18 BP	İL-18 bağlayıcı protein

İL-1ra	İnterlökin-1 reseptör antagonisti
TGF-beta	Doku Büyüme Faktörü-beta (tissue growth factor)
TNF-alfa	Tümör Nekroz Faktör-alfa (tumor necrosis factor)
SMC	Düz kas hücresi (smooth muscle cell)
EC	Endotel hücresi (endothelial cells)
MAC	Makrofaj antijeni
Th1	T helper-1 hücresi
Th2	T helper-2 hücresi
Treg	Düzenleyici T hücresi
TCR	T hücre reseptörü
BCR	B hücre reseptörü
MDA	Malondialdehid
Pc	Fosforilkolin
IRA	İnnate response activator
BAFFR	B cell activating factor reseptörü
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
Anti-GBM	Anti-glomerüler bazal membran antikoru
HÜS	Hemolitik üremik sendrom
RF	Romatoid faktör
DAS28	Disease activity score 28
FMD	Flow mediated vasodilation
ccIMT	Common carotid intima-media thickness

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Rituksimab ve kontrol grubu, yaş ve cinsiyet dağılımı	22
Tablo 2: Rituksimab ve kontrol grubu, KBH nedenleri	23
Tablo 3: Rituksimab ve kontrol grubu, diyaliz sıklığı ve süresi dağılımı	24
Tablo 4: Rituksimab ve kontrol grubu, indüksiyon tedavisi, idame tedavisi, infeksiyonlar, aterosklerotik olaylar, akut rejeksiyon sıklığı, dağılımı	27
Tablo 5: Rituksimab ve kontrol grubu, immün hücrelerin mutlak sayısı, yüzdesi, anti- ve proinflamatuar sitokinlerin kantitatif düzeyi dağılımı	28
Tablo 6: Rituksimab ve kontrol grubu, tx-örnekleme süresi dağılımı	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Kronik Böbrek Hastalığı kriterleri (KDIGO)	1
Şekil 2: Kronik Böbrek Hastalığında GFR kategorileri (KDIGO)	1
Şekil 3: Aterosklerozun patogenezinde yer alan hücreler	8
Şekil 4: Aterosklerozun patogenezinde yer alan sitokinler	9
Şekil 5: T lenfositler ve sitokinler	10
Şekil 6: Lenfositler ve hücre yüzey belirteçleri	10
Şekil 7: B lenfosit fonksiyonları.....	11
Şekil 8: B lenfositlerin gelişim basamakları	12
Şekil 9: B lenfosit alt grupları	13
Şekil 10: Rituksimab, CD 20 aracılı apoptoz mekanizması.....	14
Şekil 11: Rituksimab, klasik kompleman kaskadını aktivasyonu mekanizması	14
Şekil 12: Rituksimab, C3b opsonizasyonu ve fagositoz mekanizması	15
Şekil 13: Rituksimab, IgG opsonizasyonu ve fagositoz mekanizması.....	15
Şekil 14: Rituksimab, NK hücre aracılı antikor ilişkili hücrel sitotoksite mekanizması ...	16
Şekil 15: B lenfositlerin flow sitometrik görüntüsü	20

ÖZET

Giriş ve amaç: Transplantasyon pratiğinde sıkça kullanılan Rituksimabın aterosklerotik süreçte yer alan inflamatuvar sitokinler ve ox-LDL antikorları gibi bazı parametrelere olası etkileri sözkonusu olabilir. Bu konu transplantasyon pratiğinde detaylı olarak irdelenmemiştir. Transplantasyon sonrası en önemli mortalite nedeni olan kardiyovasküler hastalıklar açısından bu potansiyel etkinin ortaya konulması amaçlanarak bu çalışma planlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya özgeçmişlerinde önemli bir kardiyovasküler olay geçirmemiş ve renal transplantasyon yapılmış olan toplam 40 hasta alındı. Hastalar değişik amaçlarla Rituksimab (RTX) alan (n: 27) ve kontrol grubu (n:13) olarak ikiye ayrıldı. Hastaların poliklinik kartları incelenerek demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri ile posttransplant gelişen kardiyovasküler ve diğer komplikasyonlar kaydedildi. Her iki gruba dahil edilen hastalardan alınan kan örneklerinde CD19(+) B lenfosit, CD3(+) T lenfosit, CD16 ve CD56(+) NK hücrelerin sayımları ile İL-10, TNF-alfa, TGF-beta gibi sitokinlerin ve anti-oxLDL antikorlarının düzeyleri ölçüldü. Alınan kantitatif ölçüm sonuçları RTX ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı.

Bulgular: RTX ve kontrol grubuna alınan hastaların yaş ortalamaları ve cinsiyetleri sırası ile 42.9 ± 13.5 (17 E-10 K) ve 42.6 ± 15.4 (8 E – 5 K) olarak saptandı. Kontrol grubundaki hastalarda renal transplantasyon öncesinde ve sonrasında aterosklerotik olay öyküsü yoktu. RTX grubunda ise transplantasyon öncesinde aterosklerotik olay öyküsü yokken, transplantasyon sonrasında 2 hastada aterosklerotik olay gelişmişti. RTX grubunda CD19(+) B lenfosit yüzdesi ve mutlak sayısı ile CD3(+) T lenfosit , CD16 ve CD56(+) NK hücresi, CD45(+) T lenfosit mutlak sayısı kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşük bulundu. Gruplar arasında CD3(+) T lenfosit, CD16 ve CD56(+) NK hücresi yüzdesi, TNF-alfa, TGF-beta ve anti-oxLDL düzeylerinin anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermediği gözlemlendi. Düzey tayini yapılan sitokinlerden sadece İL-10 değeri RTX grubuna dahil edilen hastalarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($p < 0.05$) olarak yüksek ölçüldü.

Sonuç: Sonuç olarak, renal transplantasyon hastalarında Rituksimabın aterosklerotik süreçte yer alan immün olaylarda rol alan T ve B lenfosit fonksiyonlarını ve bazı sitokinleri etkileyebileceği görülmüştür. Bu nedenle posttransplant kardiyovasküler olay gelişimine olumsuz bir etkisinin olmayacağı söylenebilir. Olgu sayısının arttırılması olumlu etki açısından da daha net yargılara ulaşılmasını sağlayabilecektir.

ABSTRACT

Introduction: Rituximab, which is frequently used in transplantation practice, may have potential effects on certain parameters such as inflammatory cytokines and ox-LDL antibodies that affect the atherosclerotic process. There is no detailed discussion about this issue in transplantation practice. This study was planned with the aim of presenting this potential effect in terms of cardiovascular diseases which is the most important mortality cause after transplantation.

Method: A total of 40 patients who did not have a significant cardiovascular event on their background and underwent renal transplantation were included in the study. Patients were divided into two groups as rituximab (RTX) (n: 27) (patients who had treated with RTX for different indications) and control group (n: 13). Demographic, clinical and laboratory features and post-transplant cardiovascular and other complications were recorded. In blood samples taken from patients included in both groups, counts of CD19(+) B lymphocytes, CD3(+) T lymphocytes, CD16(+) and CD56(+) NK cells, the levels of cytokines such as IL-10, TNF-alpha, TGF-beta and anti-oxLDL antibodies were measured. Quantitative measurement results were compared between RTX and control groups.

Results: The mean age and gender of RTX and control group were 42.9 ± 13.5 (17 E-10 K) and 42.6 ± 15.4 (8E-5 K) respectively. Patients in the control group had no atherosclerotic event before and after renal transplantation. In the RTX group, there was no atherosclerotic event prior to transplantation, but it developed in 2 patients after transplantation. The percentage and absolute number of CD19(+) B lymphocyte and the absolute number of CD3(+) T lymphocyte, CD16 and CD56(+) NK, CD45(+) T lymphocyte in the RTX group was significantly lower ($p < 0.05$) than the control group. It was observed that CD3(+) T lymphocyte, CD16 and CD56(+) NK cell percentage, TNF-alpha, TGF-beta and anti-oxLDL levels did not differ significantly between groups ($p > 0.05$). Only IL-10 levels were significantly ($p < 0.05$) higher in the patients included in the RTX group than in the control group.

Conclusion: As a result, it has been shown that rituximab can affect B and T lymphocyte functions and some cytokines involved in the atherosclerotic process in renal transplant patients. Therefore, it can be said that there is no negative effect on posttransplant cardiovascular event development. Increasing the number of cases could also lead to clearer judgments on the positive impact.

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Kronik böbrek hastalığı, tanımlaması

Kronik böbrek hastalığı, glomerüler filtrasyon hızında azalma sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik (3 aydan uzun) ve ilerleyici bozulma hali olarak tanımlanabilir.

Şekil 1: Kronik Böbrek Hastalığı kriterleri (KDIGO)

Böbrek hasarı belirteçleri (biri veya birkaçı)	Albuminüri Üriner sediment anormallikleri Tübüler bozukluklara bağlı elektrolit ve diğer anormallikler Biyopside tespit edilen anormallikler Görüntülemelerde tespit edilen yapısal anormallikler Böbrek transplantasyonu öyküsü
GFR'de azalma	GFR < 60 ml/dk/1.73 m ² (G3a-G5 kategorileri)

Şekil 2: Kronik Böbrek Hastalığında GFR kategorileri (KDIGO)

GFR kategorisi	GFR (ml/dk/1.73 m ²)	Tanımlama
G1	≥90	Normal veya yüksek
G2	60-89	Hafif azalmış
G3a	45-59	Hafif-orta azalmış
G3b	30-44	Orta-ciddi azalmış
G4	15-29	Ciddi azalmış
G5	<15	Böbrek yetmezliği

Renal transplantasyon, transplantasyona hazırlık, indüksiyon ve idame tedavisi

Progresif KBH olanlara (1 yıl içinde son dönem böbrek yetmezliği riski %10-20'den fazla olan hastalar) renal replasman tedavisi (hemodiyaliz, periton diyalizi, renal transplantasyon) hazırlığı planlanır.

Tek yumurta ikizleri dışında tüm renal transplantasyon alıcılarına rejeksiyonu önlemek için immunsupresyon ilaç tedavisi uygulanır. İmmunsupresyon ilaç tedavisi indüksiyon ve idame tedavisi olmak üzere 2 gruba ayrılır.

İndüksiyon tedavisi, antijen sunumu anında T hücre yanıtını baskılayarak rejeksiyonun önlenmesine katkıda bulunur. İndüksiyon tedavisi için lenfosit baskılayıcı ajanlar veya İL-2 reseptör antagonisti (İL2-RA) kullanılmakta olup, transplantasyondan önce, transplantasyon anında veya transplantasyondan hemen sonra başlanması gerekir. Lenfosit baskılayıcı ajanlar, anti-timosit globulin (ATG), anti-lenfosit globulin (ALG) ve monoklonal CD3; İL2-RA'ler ise basiliximab ve daclizumab içermektedir. İL2-RA'ler aktive edecek T lenfositlerin yüzeyindeki CD25 antijenine (İL-2 reseptörü α zinciri) bağlanarak İL-2 aracılı T hücre aktivasyonunu baskırlar. Lenfosit baskılayıcı ajanlara bağlı yan etki sıklığı daha fazla olduğundan indüksiyon tedavisi için öncelikle İL2-RA önerilse de yüksek immünolojik riskli hastalarda lenfosit baskılayıcı ajanlar halen daha çok tercih edilmektedir. HLA "mismatch" sayısı, alıcının genç yaşta olması, vericinin yaşlı olması, PRA > %0, vericiye spesifik antijenlerin varlığı, kan grubu uyumsuzluğu, greftin fonksiyon göstermeye geç başlaması, soğuk iskemi zamanının 24 saatten uzun sürmesi akut rejeksiyon riskini arttırmakta olup riskli durumlar olarak değerlendirilmektedir (1).

İdame tedavisi, akut rejeksiyonu ve greft disfonksiyonunu önlemek amacıyla uygulanan uzun süreli tedavidir. Tedavi transplantasyondan önce veya transplantasyon anında başlanmakta olup kombinasyon tedavisi yapılır. Amaç, ayrı ayrı ajanlara bağlı toksik etkileri minimuma indirirken optimal immunsupresyonu sağlamaktır. Transplantasyondan sonraki ilk 3 ayda akut rejeksiyon riski en yüksek olduğundan bu periyotta immunsupresif ajanlar yüksek dozda kullanılır; fakat sonraki dönemde toksik etkiyi azaltmak için stabil hastalarda doz azaltılması yapılır. İdame tedavisi için kortikosteroid ile birlikte veya kortikosteroid verilmeksizin kalsinörin inhibitörü ve antiproliferatif ajan kullanılır. Kalsinörin inhibitörü olarak öncelikle takrolimus, 2.sırada siklosporin önerilmektedir. Mikofenolat mofetil ise antiproliferatif ajanlar içinde ilk tercihtir. Düşük immünolojik riske sahip olan ve indüksiyon

tedavisi uygulanan hastaların kortikosteroid tedavisi transplantasyondan 1 hafta sonra kesilebilir (1).

Renal transplantasyon sonrası gelişebilecek komplikasyonlar

Transplantasyon immünolojisinde büyük başarılar sağlanmasına rağmen renal transplantasyon sonrasında gelişen en önemli sorunlardan biri allogreft rejeksiyonudur. Rejeksiyonlar farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Kreatinin yüksekliği ve diğer bulgularla kendini gösteren klinik rejeksiyonların yanı sıra sadece protokol biyopsilerinde saptanan, normal kreatinin düzeyi ile karakterize subklinik rejeksiyonlara da rastlanmaktadır. Ortaya çıkma zamanına göre hiperakut (dakikalar), akut (günler, haftalar), geç akut (3-6 aydan sonra) ve kronik (aylar, yıllar sonra) diye ayrabiliriz. Patofizyolojik mekanizmaya göre ise T hücre aracılı (hücresel, interstisyel) ve B hücre aracılı (antikor aracılı, humoral) olarak sınıflandırılmaktadır (2).

Akut hücresel rejeksiyon, verici alloantijenlerine karşı gelişen yanıt sonucu günler içinde ortaya çıkan greft fonksiyon bozukluğudur. Akut hücresel rejeksiyon en sık nakil sonrası ilk haftalar içinde gelişmekte olup, ilk 6 aydan sonra sıklığı azalmaya başlar. Akut hücresel rejeksiyon genelde asemptomatik olsa da, nadiren ateş yüksekliği, halsizlik, oligüri, greft ağrısı veya hassasiyeti, hipertansiyon ve ödem görülür. Çoğu hasta asemptomatik olduğu için sadece kreatinin yüksekliği akut rejeksiyon açısından şüphe uyandırır (2). Akut hücresel rejeksiyon genelde kortikosteroid tedavisine yanıt verir. Kortikosteroidde yanıtız ve tekrarlayan akut hücresel rejeksiyonlarda ise lenfosit basılayıcı antikorlar kullanılır.

Akut antikor aracılı rejeksiyon, dolaşan, anti-HLA, donör spesifik antikorların yol açtığı greft fonksiyon bozukluğudur. Tedavi için kortikosteroidlerle birlikte veya kortikosteroidler verilmeksizin plazmaferez, intravenöz immünoglobulin, anti-CD20 antikor, lenfosit baskılayıcı antikor gibi tedavi seçeneklerinden biri veya birkaçının birlikte uygulanması önerilir. Akut rejeksiyon döneminde Azatiyopurin veya Mikofenolat Mofetil tedavisi almayanların tedavisine Mikofenolat Mofetil eklenmesi, Azatiyopurin kullananlarda ise Mikofenolat Mofetil'e dönüşüm yapılması tavsiye edilir (1).

Kronik rejeksiyon veya kronik allogreft nefropatisinde, böbrek greft fonksiyonunda tedrici bozulma olup, bu tabloya histopatolojik olarak interstisyel fibrozis ve tubuler atrofi (İF/TA) eşlik etmektedir. Hipertansiyon, kalsinörin toksisitesi, kronik antikor aracılı rejeksiyon ve diğer nedenler yol açmaktadır. Kalsinörin toksisitesi biyopsi ile kanıtlanmış,

eGFR'si 40 ml/dk/1.73 m²'den yüksek ve 500 mg/gün'den az proteinürisi olan transplant hastalarında kalsinörin inhibitörünün mTOR inhibitörü ile değiştirilmesi önerilmektedir (2).

Renal transplantasyon hastalarında en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri infeksiyonlardır. Posttransplant BKV infeksiyonu, immunsupresif tedavi protokollerinin güçlendiği dönemlerde dikkat çekmeye başlayan ve zamanında tanınarak önlem alınmadığı takdirde %50'nin üzerinde greft kaybına yol açabilen bir infeksiyondur (2). O nedenle transplantasyondan sonraki ilk 3-6 ayda aylık, sonraki süreçte ise 1 yıl tamamlanana kadar 3 ayda bir, ayrıca serum kreatinin düzeyinde açıklanamayan yükselme olduğunda, akut rejeksiyon tedavisinden sonra plazmada BKV DNA düzeyine bakılması gerekmektedir. Plazmada BKV DNA düzeyi 10000 kopya/ml'den fazla olduğunda transplant hastasının kullanmakta olduğu immunsupresif ilaç dozlarının azaltılması önerilir (2).

CMV infeksiyonu da posttransplant önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Ülkemizde anti-CMV IgG pozitifliği %90'nın üzerindedir (2). Hem alıcı, hem vericinin CMV serolojisinin negatif olduğu durumlar dışında, tüm transplant alıcılarına CMV profilaksisi önerilmektedir. Profilaksi için oral Gansiklovir veya Valgansiklovir kullanılmakta olup transplantasyondan sonra en az 3 ay devam edilmesi gerekir. Ayrıca T hücre baskılayıcı tedavi sonrasında da 6 hafta uygulamaya devam edilir. CMV hastalığı olanlarda haftalık CMV DNA monitorizasyonu yapılır. Ciddi CMV hastalığı olanlarda intravenöz Gansiklovir, ciddi olmayan durumlarda ise intravenöz Gansiklovir veya oral Valgansiklovir ile tedavi uygulanır. Tedaviye plazmada CMV DNA kaybolana dek devam edilir, hatta hayati tehdit oluşturan durumlarda ve tedavi altında CMV hastalığı sebat edenlerde plazmada CMV DNA kaybolana dek immunsupresif ilaçların dozu azaltılır (1).

Kronik böbrek hastalığı olanlarda kardiyovasküler sorunlar, aterosklerozun patogenezi

Renal disfonksiyonda tüm organlar etkilenmekte olup, kronik böbrek yetmezliğinde (KBY) aterosklerozun da hızlandığı ve dolayısıyla kardiyovasküler hastalık riskinin arttığı kanıtlanmıştır. Yıllardır son dönem böbrek hastalığına ateroskleroz için ciddi geleneksel (hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabetes mellitus) ve üremi ilişkili (hemodinamik yüklenme, anemi, hiperhomosisteinemi, artmış oksidatif stress) risk faktörlerinin eşlik ettiği bilinmektedir. Bu nedenle kronik böbrek hastalığı olanlarda kardiyovasküler morbidite ve mortalite artışı, özellikle diyaliz hastaları için savunulan "hızlanmış ateroskleroz" hipotezi ile açıklanmaktadır.

Fakat son yıllarda aterosklerozda mevcut risk faktörlerinin yanısıra inflamasyonun anahtar rol oynadığı ileri sürülmüştür. Ayrıca son dönem böbrek hastalığı olanlarda immün yanıtın bozulduğu; özellikle çeşitli faktörlerin monosit/makrofajları uyarak proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını arttırdığı ve inflamasyonu tetiklediği de gösterilmiştir (3).

Oksidatif stress ve üremik mikroçevre, dolaşan lipitler ve lipoproteinlere etki göstererek onların biyolojik özelliklerini değiştirir.

Renal disfonksiyon dislipidemi ve aterojenik partiküllerin birikimine de yol açmaktadır. Çünkü kompleks özellik taşıyan lipoprotein metabolizmasında yer alan birçok mekanizma (örn., karaciğer, kolon, plazma, makrofajlar ve endotel hücreleri) KBY'den etkilenmektedir. KBY'de hipertrigliseridemi, LDL-kolesterol düzeyinde artış, ApoB içeren lipoproteinlerin birikimi, lipoprotein (a) partikülleri konsantrasyonunda artış ve HDL-kolesterol düzeyinde azalma gibi değişiklikler görülmektedir (4).

Serum albümini, antioksidan özelliğe sahip majör ekstrasellüler molekül olup (5), böbrek yetmezliğinde ortaya çıkan proteinürinin albümin kaybı nedeniyle kardiyovasküler mortalite artışına katkıda bulunduğu gösterilmiştir(6).

Renal transplantasyon hastalarında kardiyovasküler risk genel popülasyona kıyasla belirgin artsa da, transplantasyon sonrasında kardiyovasküler hastalıklarda önemli oranda azalma görülmektedir. Renal transplantasyon hastalarında kardiyovasküler hastalık riskini arttırdığı düşünülen risk faktörleri de geleneksel ve geleneksel olmayan olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

Geleneksel risk faktörleri :

Değiştirilebilir	Değiştirilemez
Hipertansiyon	Yaş (erkek >45 yaş, kadın >55 yaş)
Diyabetes mellitus	Cins
Dislipidemi	İrk / etnik faktörler
Sigara	Ailede erken (1.derece akrabada <55 yaş erkek veya <65 yaş kadın) kardiyovasküler hastalık öyküsü
Obezite veya metabolik sendrom	

Geleneksel olmayan risk faktörleri :

Transplantasyon ile ilişkili	Transplantasyon ile ilişkili olmayan
İmmünesupresifler	İnflamasyon
Kronik böbrek hastalığı	Homosistein
Proteinüri	CRP
Anemi	İleri glikasyon son ürünleri

İmmünesupresif ilaçların kardiyovasküler risk faktörleri üzerine etkileri :

Etki	Steroid	Siklosporin	Takrolimus	m-TOR inhibitörü	Antimetabolitler
Hiperlipidemi	++	++	0/+	+++	0
Hipertansiyon	++	++	+	0	0
Diyabet	+	+	++	0/+	0

Ateroskleroz, büyük ve küçük çaplı arterlerin kronik inflamatuvar hastalığı olup, koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı ve inme gibi önemli vasküler olayların altında yatan major nedenidir.

Ateroskleroz, enzimatik ve non-enzimatik değişikliklere uğrayarak inflamatuvar yanıt kaskadına yol açan düşük dansiteli lipoproteinlerin arter duvarında birikimi ile karakterizedir. Subendotelyal alanda biriken LDL-kolesterolün oksitleşmesi sonucu oksidize LDL(ox-LDL) oluşur. ox-LDL inflamatuvar ajan özelliğine sahip olup, endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır, monositlere kemoatraktant etki gösterir, onların makrofajlara dönüşümünü tetikler, fakat mobilitesini baskılar. İnfiltrate makrofajlar çöpçü reseptörler (CD36) aracılığıyla ox-LDL'yi yakalayarak lipid yüklü köpüksü hücrelere dönüşür.

ox-LDL, makrofajlarda sitokin salınımını uyararak, mevcut sitokinler aracılığıyla proinflamatuvar medyatörler salgılayabilen düz kas hücrelerini ve endotel hücrelerini aktif hale getirirler. Bir Th2 hücre sitokini olan İL-4'ün de endotel hücreleri üzerine uyarıcı etkisi mevcuttur.

Makrofajlarda oluşan İL-10 ve TGF-beta gibi antiinflamatuvar sitokinler antiaterojenik özelliğe sahip T reg hücrelerinin differensiasyonunu sağlar. Makrofajlarda İL-1 reseptör antagonisti (İL-1ra) ve İL-18 bağlayıcı protein (İL-18BP) gibi diğer antiinflamatuvar sitokinlerin de sentezlendiği gösterilmiştir.

Makrofajlarda sentezlenen İL-12 ve İL-18 gibi sitokinler, naif T hücrelerinin proaterojenik olduğu bilinen Th1 hücrelerine dönüşümünü sağlar, otokrin etki göstererek makrofajlarda İFN-gamma sentezini uyarır. İFN-gamma'nın makrofajlar dışında Th1 CD4(+) hücreleri, CD8(+) hücreleri, NK T hücrelerinde de sentezlendiği gösterilmiştir.

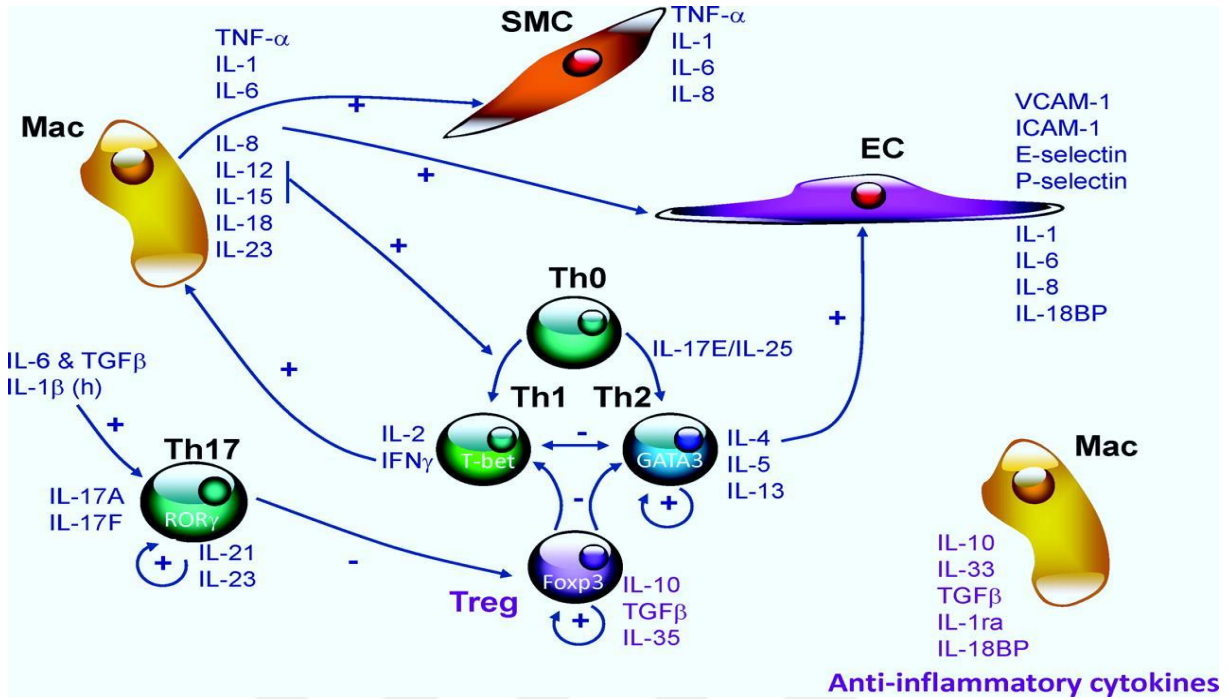
Çevre dokuda yer alan adipositler de hem pro-, hem antiaterojenik sitokinler salgırlar. Bu sitokinler içinde yer alan leptin, Th1 hücrelerini uyarırken Treg hücrelerinin fonksiyonlarını baskılar, adiponektin ise makrofaj aktivasyonunu olumsuz etkiler.

Aterosklerotik plak geliştikçe çok sayıda köpüksü hücre apoptoza uğrar ve asellüler nekrotik çekirdek ortaya çıkar. Nekrotik çekirdeği saran fibrotik doku aşındığında veya rüptüre olduğunda açığa çıkan materyal dolaşan koagülan sistem ile temas ettiği için trombüs oluşumu uyarılır, inme ve myokard enfarktüsü gibi olaylara yol açar (7,8).

Aterosklerozun histopatolojik özellikleri, aterosklerozda yer alan immün hücreler ve sitokinler

Aterogeneizde hem doğumsal, hem kazanılmış bağışıklık yer almakta olup, lezyonlarda plak antijenlerine (örn., ox-LDL) karşı antikorlar ve aktif T hücreleri bulunur. Kazanılmış bağışıklık, makrofaj ve dendritik hücre gibi antijen sunan hücreler tarafından antijen spesifik TCR'ye antijen sunumunu ve ilave kostimülatör signaller (örn., CD40L ile CD40 veya B7-1/2 ile CD28 arasındaki etkileşim) gerektirir.

Şekil 3: Aterosklerozun patogenezinde yer alan hücreler (8)

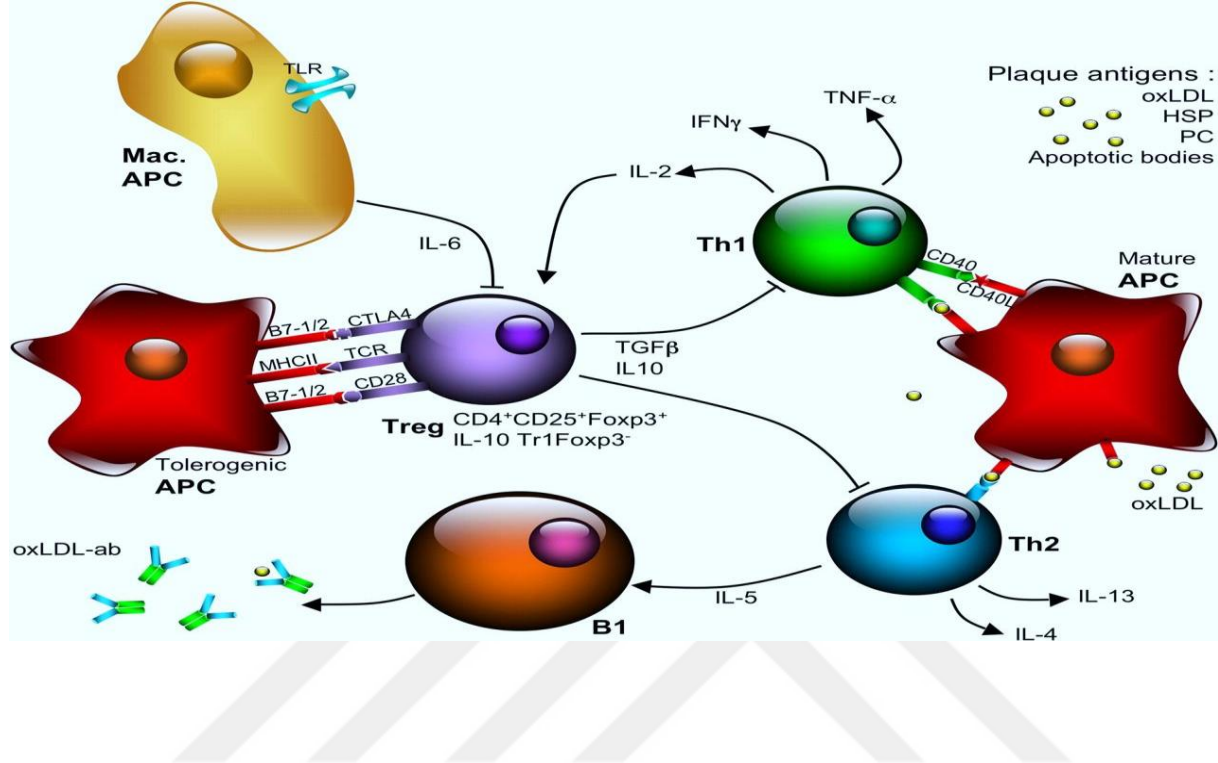


Aterosklerotik plaklarda yer alan T hücrelerinin çoğu, $\alpha\beta$ -TCR eksprese eden ve MHC II molekülleri ile etkileşebilen CD4(+) Th hücreleridir. Th hücreleri, salgıladıkları sitokinlerin özelliğine göre Th1 ve Th2 hücreleri olmak üzere 2 gruba ayrılır. Aynı prekürsöre sahip olan Th1 ve Th2 hücrelerinin tipini ise geliştikleri sitokin mikroçevresi belirler. Th1 hücre gelişimi için mikroçevrede IL-12 ve TCR aktivasyonu, Th2 hücre için IL-4 varlığı gerekir. Yukarıda bahsettiğimiz gibi IL-12 doğal bağışıklıkta yer alan makrofajlar ve dendritik hücrelerden kaynaklanmakta iken IL-4'ün başlangıç kaynağı ve üretim mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Th1 hücreleri IL-2 ve IFN-gamma salgılamakta olup, hücrel bağışıklıkta, IL-4, -5, -10, -13 gibi sitokinler salgılayan Th2 hücreleri ise humoral bağışıklıkta yer alır. Th2 hücrelerinin, sentezledikleri IL-15 aracılığıyla B lenfositlerde antikor üretimini uyarma özelliği mevcuttur. Ayrıca IL-10 ve TGF-beta dendritik hücrelerin, Th1 hücreleri uyaran hücrelerden Th2 hücreleri veya Treg hücrelerini uyaran hücelere dönüşümünü sağlamaktadır. IL-10, Th2 hücreler dışında B lenfositlerde, monositlerde ve makrofajlarda da üretilir; Th1 hücrelerde sitokin sentezini, antijen sunumunu, antijen spesifik T hücre proliferasyonunu baskılayarak geniş bir immun yanıt yelpazesini inhibe eder. IL-10, makrofajlar üzerine de antiinflamatuvar etki göstererek damar duvarında inflamatuvar yanıtın baskılanmasında yer

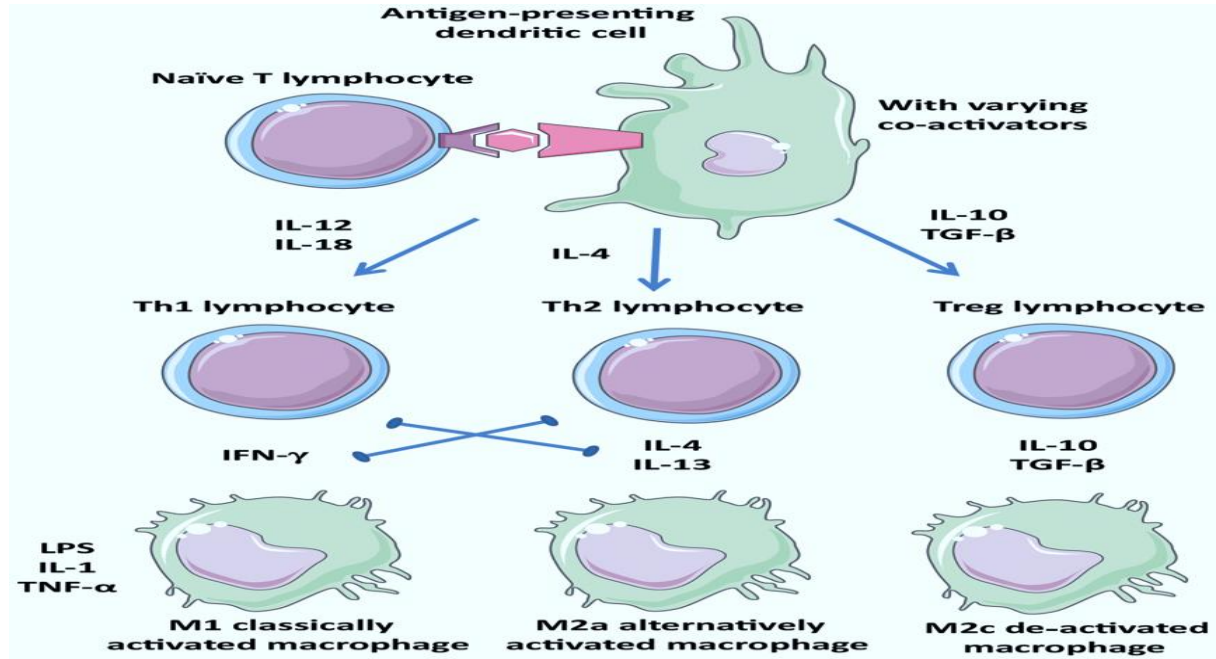
alır. TGF-beta'nın antiinflamatuvar etkisinden ziyade profibrotik özelliğe sahip olması onun olası antiaterojenik fonksiyonunu desteklemektedir.

Şekil 4: Aterosklerozun patogenezinde yer alan sitokinler (8)



Aterosklerotik lezyon gelişiminin başlangıcında Th1 hücreleri dominantlık oluştururken kronik fazda Th2 hücrelerinin daha çok öneme sahip olduğu gözlemlenmiştir. CD4(+) T hücreleri majör sitokin salgılayan T hücreleri olsalar da CD8(+) T hücreleri de TNF-alfa, limfotoksin gibi sitokinler üretirler. Proaterojenik T hücre alt gruplarının aktifliği ise TGF-beta gibi fibrojenik sitokin salgılayarak plağın özelliklerini değiştirebilen Treg hücreleri tarafından ayarlanır.

Şekil 5: T lenfositler ve sitokinler (9)



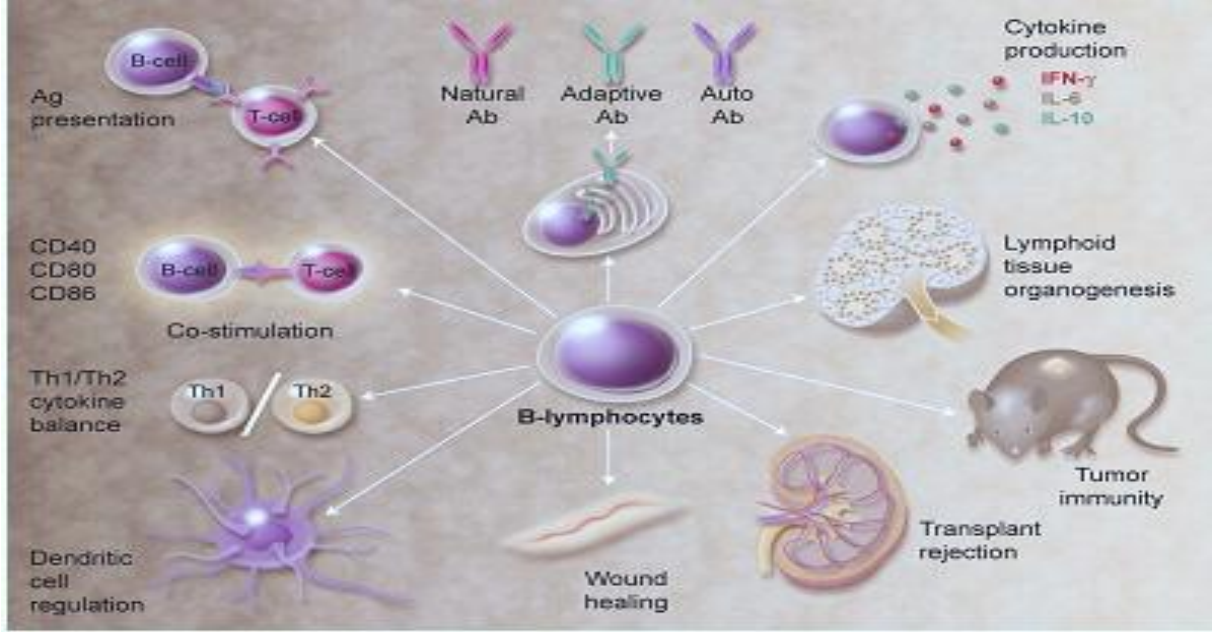
Şekil 6: Lenfositler ve hücre yüzey belirteçleri

Hücre tipi	Hücre yüzey belirteçleri
Kök hücreleri	CD34+, CD31-, CD117
Tüm lökosit grupları	CD45+
Granulosit	CD45+, CD11b, CD15+, CD24+, CD114+, CD182+
Monosit	CD4, CD45+, CD14+, CD114+, CD11a, CD11b, CD91+, CD16+
T lenfosit	CD45+, CD3+
T helper hücresi	CD45+, CD3+, CD4+
T reglatuvar hücre	CD4, CD25, Foxp3
T sitotoksik hücre	CD45+, CD3+, CD8+
B lenfosit	CD45+, CD19+, CD20+, CD24+, CD38, CD22
Natürel killer hücresi	CD16+, CD56+, CD3-, CD31, CD30, CD38

B hücreleri, T hücrelerinin aksine lezyonlarda az sayıda bulunmakta olup, etkilenen arterlerin adventisyasında lenfoid infiltratlarda yer alır. Onlar immunoglobulin üreterek ve

ardışık olarak tanıdıkları antijenlerle immun kompleks oluşturarak ; bazı antijenleri nötralize ederek ve onların klirensini hızlandırarak aterosklerozda yer almaktadırlar. B hücrelerinin, BCR (B cell reseptör) aracılığıyla endositoza uğrattıkları antijenleri çeşitli işlemler sonrasında MHC II molekülleri ile kompleks şeklinde Th1 CD4(+) hücrelerine sunduğu; İL-10, TNF-alfa dahil farklı sitokinler salgılamak gibi fonksiyonları olduğu da bilinmektedir (7,8,10).

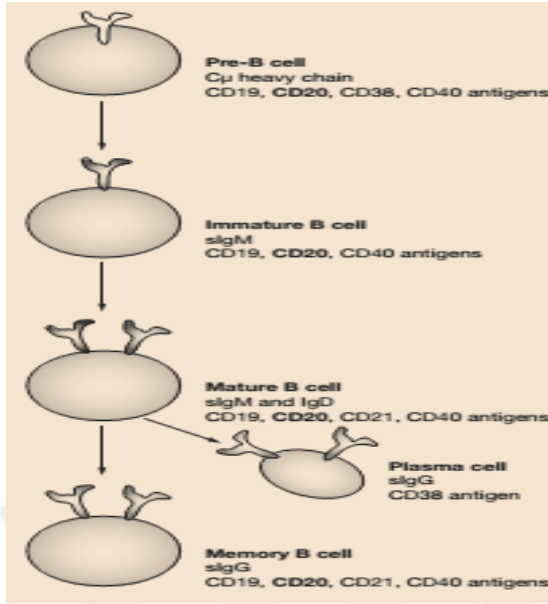
Şekil 7: B lenfosit fonksiyonları (4)



B hücreleri, sonuç olarak 3 majör modalite ile aterosklerozu etkiler:

- 1) Antikor aracılığıyla
- 2) T hücre yanıtını düzenleyerek
- 3) Sitokin salınımı aracılığıyla

Şekil 8: B lenfositlerin gelişim basamakları (5)



B hücreleri, gelişim kaynağına göre iki gruba ayrılmaktadır:

a) B1 hücreleri: fetal karaciğerde gelişmekte olup, yetişkinde yaşam döngüsünü hematopoetik kök hücrelerinden bağımsız şekilde kendi kendine sürdürmektedir.

b) B2 hücreleri: yetişkinde kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerinden gelişmektedir (10).

B1 hücreleri, mukozal yüzeylerin bariyer fonksiyonunun sürdürülmesinde majör role sahip olup, genel patojen ilişkili epitoplara karşı spesifik ve germline kodlanmış B hücre reseptörleri taşırlar. Doğal antikor kaynağı olan B1 hücreleri herhangi dış antijenden bağımsız bir şekilde oluşurlar. Fosforilkolin (Pc) ve malondialdehid (MDA) gibi oksidasyon ürünlerine karşı B1 lenfositler tarafından antikor üretilmektedir. Bu oksidasyon ürünleri apoptotik ve nekrotik hücreler, modifiye lipoprotein partikülleri (örn., ox-LDL) gibi endojen debriste de sıkça görülebilmektedir. Sonuç itibarıyla doğal antikorlar ve bahsedilen antijenleri hedef alan diğer antikorlar, ölmüş hücreler, ox-LDL dahil debris materyalinin homeostatik klirensinde önemli rol oynarlar (10).

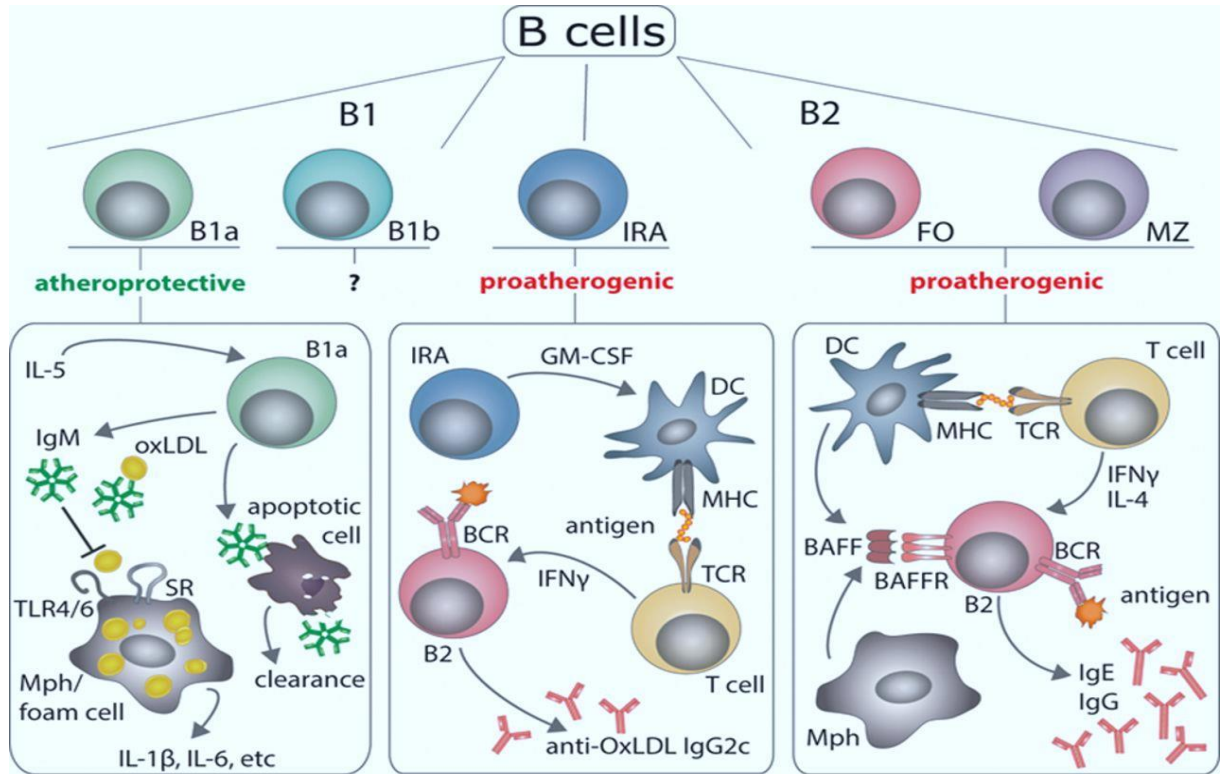
Ayrıca farklı bir B1 hücre grubu mevcut olup, bunlar IRA olarak (innate response activator) adlandırılmaktadır. Bu hücreler;

- İmmatür B hücre belirteci olan CD93 eksprese ederler;
- Yaşamlarını B1 hücrelerinin aksine BAFFR (B cell activator factor receptor) sinyal yolağına bağımlı şekilde sürdürürler;
- Lipopolisakkarit uyarısına GM-CSF sekresyonu ile yanıt verirler.

IRA B hücreleri, matür dendritik hücrelerin gelişimini uyarmakta olup, IFN-gamma salgılayan Th1 hücrelerinin oluşumuna katkıda bulunurlar(10).

Matür B2 hücreleri, sekonder lenfoid organlardan tekrar dolaşıma geçip, makrofajlar ve dendritik hücrelerin sunduğu antijenlerle karşılaşılır. Ardından B2 hücreleri aktifleşir ve çoğalır, kısa ömürlü plazma hücreleri, kemik iliğine göç eden uzun ömürlü plazma hücreleri, yaşam boyu immünolojik hafızayı sağlayan hafıza B hücrelerine dönüşürler. B2 hücreleri Fc reseptörleri aracılığıyla makrofajları aktifleştiren IgG2 antikorlarının üretimi, proaterojenik Th1 CD4(+) hücrelerinin aktifleşmesine katkıda bulunarak proaterojenik etki de göstermektedirler (10).

Şekil 9: B lenfosit alt grupları (6)



Rituksimabın yapısı, etki mekanizmaları, endikasyonları

Rituksimab şimerik fare/insan monoklonal antikoru olup, bir fare anti-CD20 monoklonal antikoru olan 2B8'in ağır ve hafif zincirlerinin değişken rejyonları ile insan Ig1'nin ağır zincirinin ve insan kappa tip hafif zincirin sabit rejyonlarını içermektedir (5,11). Fare kaynaklı değişken rejyonlar selektif olarak normal B lenfositleri ve B hücreli lenfomaların çoğunun yüzeyinde bulunan CD 20 antijenine bağlanmakta olup, insan kaynaklı sabit rejyonların varlığı ise rituksimabın insan efektör hücrelerindeki (örn., nötrofiller, makrofajlar) Fc reseptörlerine bağlanmasını sağlamaktadır (12).

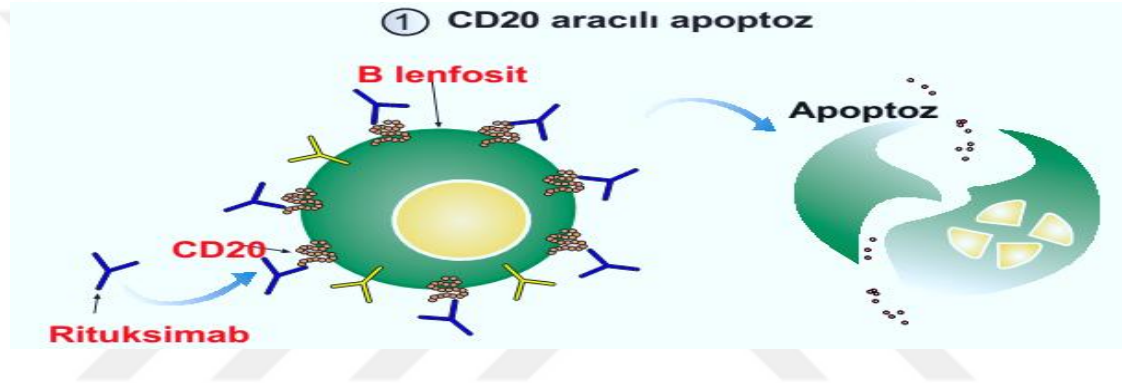
CD20 yaklaşık 35 kD moleküler ağırlığında transmembran glikozilleşmemiş fosfoproteindir. Pre B- ve matür B lenfositlerde eksprese olan bu hidrofobik protein transmembran kalsiyum iletimini sağlayarak B lenfositlerin proliferasyonuna ve differensiasyonuna aracılık yapmaktadır (5,11,13).

Rituksimabın CD 20 antijenine bağlanması farklı yollarla B hücreleri etkilemektedir:

1) CD20 aracılı apoptoz:

Rituksimabın B hücre yüzeyinde bulunan CD20'ye bağlanması B lenfositlerin apoptotik yolağa girişini uyarır.

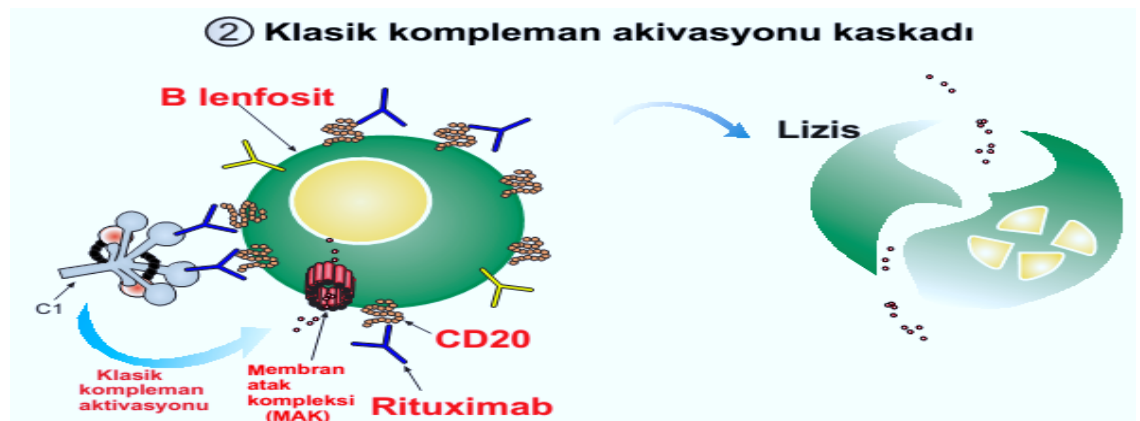
Şekil 10: Rituksimab, CD 20 aracılı apoptoz mekanizması (14)



2) Klasik kompleman kaskadının aktivasyonu:

Rituksimab, B lenfositlerde bulunan CD20'ye bağlandıktan sonra Fc (sabit rejyon) kısmı C1 komplemanına bağlanarak klasik kompleman kaskadının aktivasyonuna, membran atak kompleksinin oluşmasına ve sonuçta hücre lizisine yol açar.

Şekil 11: Rituksimab, klasik kompleman kaskadını aktivasyonu mekanizması (14)



3) C3b opsonizasyonu ve fagositoz:

Yukarda bahsettiğimiz mekanizma ile klasik kompleman kaskadının aktivasyonu solubl C3 kompleman proteinlerinden C3b kompleman proteinlerinin oluşmasına yol açar. C3b, kovalent bağlarla B hücre yüzeyine bağlanarak onları opsonize eder. C3b opsonize hücreler, nötrofil, dendritik hücre ve makrofaj gibi fagositlerin yüzeyinde bulunan kompleman reseptörleri tarafından tespit edilir. C3b opsonize hücrelerin fagositler tarafından tanınması, fagositozu uyararak hücre destrüksiyonuna yol açar.

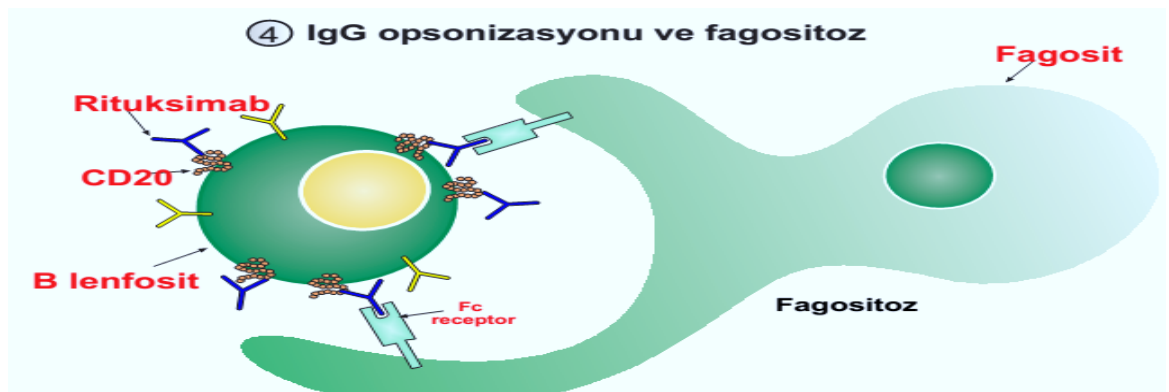
Şekil 12: Rituksimab, C3b opsonizasyonu ve fagositoz mekanizması (14)



4) IgG opsonizasyonu ve fagositoz:

Ritüksimab molekülü IgG yapılı antikor olup, Fc kısmı, nötrofil, dendritik hücre ve makrofaj gibi fagositlerin yüzeyinde bulunan Fc reseptörleri tarafından tanınmaktadır. Ritüksimabın B lenfositlerde bulunan CD20'ye bağlanması, IgG opsonize B hücrelerinin fagositler tarafından fagosit edilmesine ve hücre destrüksiyonuna yol açar.

Şekil 13: Ritüksimab, IgG opsonizasyonu ve fagositoz mekanizması (14)



- 5) Natürel killer (NK) hücreleri aracılı antikor-ilişkili hücresel sitotoksiste (ADCC): Ritüksimab molekülünün IgG yapısındaki Fc kısmı, natürel killer hücrelerinin yüzeyinde bulunan Fc reseptörleri tarafından da tanınmaktadır. IgG opsonize B hücrelerinin natürel killer hücreleri tarafından tanınması onların degranülasyonuna ve hücrelerin lizisine yol açar (10).

Şekil 14: Ritüksimab, NK hücre aracılı antikor ilişkili hücresel sitotoksiste mekanizması (14)



Ritüksimab uygulamasını takiben, sonuç olarak, kompleman aracılı ve kompleman aracılı olmayan mekanizmalarla B hücre proliferasyonunun önlenmesi, apoptozu ve lizisi gerçekleşmektedir. Uygulamadan 1-3 gün sonra periferik kanda B lenfosit düzeyinde azalma başlar, 1-6 hafta sonra ise hastaların çoğunda bu süreç tamamlanır. B hücre deplesyonu, hastaların %80'den fazlasında 6-9 ay devam eder, hatta 2 yıla kadar uzayabilir. B hücre onarımı uygulamadan 6 ay sonra başlasa da ortalama B hücre düzeyinin normale ulaşması 12 ay sonra gerçekleşir (5,15,16). CD20 antijeni eksprese etmeyen plazma hücrelerinde ise benzer etki görülmez (13).

Ritüksimab ile B hücre deplesyonu sonucu matür B lenfositlerinin antikor üreten plazma hücrelerine dönüşümü, dolayısıyla alloreaktif antikor yapımı engellenir; B lenfosit antijen sunumu ve kostimülasyonu azaldığı için T hücre yanıtı da baskılanır(16).

Ritüksimab, yukarda bahsedilen etki mekanizmalarına dayanılarak nefroloji pratiğinde ABO uyumsuz transplantasyonda rejeksiyonun önlenmesi, HLA duyarlı hastaların pretransplant desensitizasyonunda, posttransplant akut ve kronik antikor aracılı rejeksiyonda, posttransplant lenfoproliferatif hastalığın (PTLD) tedavisinde kullanılmaktadır (11).

AMAÇ

Özellikle romatolojik hastalıklarda yoğun kullanım alanı bulan Rituksimab tedavisinin ateroskleroz üzerine etkisi ilgi uyandırmış ve bu konuda bazı çalışmalar yapılmıştır. Nefroloji pratiğinde de son dönemlerde rituksimab sık kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle vaskülitlerin renal tutulumları, renal transplantasyon hazırlık aşamasındaki desensitizasyon tedavileri ve transplantasyon sonrası süreçteki antikor aracılı rejeksiyon tedavilerinde yoğun kullanım alanı bulmaktadır. Kronik böbrek hastalıklarının iyi bilinen kardiyovasküler risk faktörlerini taşımaları Rituksimabın bu hasta grubunda, ateroskleroza etkisi konusunda daha büyük önem taşımaktadır. Elimizde bu konuda henüz netleşmiş ve kanıtlanmış veri yoktur. Aterosklerotik süreçte etkin rol oynayabilecek bazı sitokin ve antikorlar üzerine Rituksimabın etki göstermesi beklenebilir.

Bu nedenle yüksek kardiyovasküler risk taşıyan renal transplantasyon hastalarında rituksimabın aterosklerotik sürece etkilerini klinik ve laboratuvar açısından araştırmak amacı ile bu çalışma planlanmıştır.

HASTALAR VE YÖNTEM

Hastalar

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Nefroloji Polk. ve Şişli Memorial Hastanesi Organ Nakli Polk'den takipli 27'si Rituksimab grubu ve 13'ü kontrol grubu olmak üzere renal transplantasyon öyküsü olan toplam 40 hasta alındı. Rituksimab (RTX) grubuna takip sürecinde farklı nedenlerle en az bir kez Rituksimab uygulanmış renal transplantasyonlu hastalar, kontrol grubuna ise Rituksimab kullanım öyküsü olmayan renal transplantasyonlu hastalar dahil edildi. Kontrol grubu, RTX grubu ile donör kaynağı açısından aynı tür transplantasyon yapılmış ve ardışık olarak poliklinik takibimize girmiş olan hastalardan oluşturuldu.

Yaş ve cinsiyet ayırımı yapılmaksızın çalışmaya dahil edilen hastaların poliklinik takip dosyaları ve renal transplantasyon nedeniyle hastaneye yatış sürecinde hazırlanan epikriz dosyaları detaylı olarak incelendi. Her iki gruba dahil edil edilen hastaların demografik özellikleri (yaş, cinsiyet), primer böbrek hastalığı, hemodiyaliz ve periton diyalizi uygulanma süresi, renal transplantasyon donör kaynağı, renal transplantasyon öncesinde indüksiyon tedavisi, renal transplantasyondan sonraki süreçte uygulanan immunsupresif tedavi rejimleri, uygulanan ilaçlara bağlı gelişen komplikasyonlar, renal transplantasyon öncesinde ve sonrasında aterosklerotik olay (myokard enfarktüsü, periferik arter hastalığı, serebrovasküler olay) hikayesi, renal transplantasyon sonrasında geçirilmiş CMV, BKV enfeksiyonu öyküsü ile ilgili bilgiler toplandı. RTX grubuna dahil edilen hastaların ayrıca Rituksimab uygulanma endikasyonları, uygulama sayısı, uygulanma tarihi ile ilgili veriler kaydedildi.

Her iki gruba dahil edilen hastalar çalışmanın amacı ve dizaynı ile ilgili bilgilendirildikten sonra kan örnekleri alındı. Kan örnekleri, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji BD'nin laboratuvarlarında deneyimli biyologlar tarafından aşağıda detaylı olarak bahsedilen metodlarla değerlendirildi. Mevcut örneklerde CD19(+) B lenfosit, CD3(+) T lenfosit , CD45(+) T lenfosit, CD16 ve CD56(+) NK hücrelerin yüzdesi ve mutlak sayısı, İL-10, TNF-alfa, TGF-beta gibi sitokinlerin, anti-oxLDL antikorların düzeyi ölçüldü. Alınan kantitatif ölçüm sonuçları RTX ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı.

Yöntemler

Çalışmada transplantasyon polikliniğinde izlenen ve farklı nedenlerle Rituximab kullanan hastalardan CD19(+) B hücre, CD3(+) T hücre, CD16 ve CD56(+) NK hücresi, CD45(+) T hücresi yüzdesi ve mutlak sayısı akım sitometri yöntemiyle değerlendirmek için EDTA'lı tüplere kan alındı. Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen tüm hastalardan ELİSA yöntemi ile anti-ox-LDL antikor, İL-10, TNF- α ve TGF- β düzeyi tayini için serum örnekleri ayrıldı. Testler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda incelendi.

Akım Sitometri ile Lenfosit Alt Grupları yüzdesinin Belirlenmesi

Tüm hastalardan CD19(+) B hücre, CD3(+) T hücre, CD16 ve CD56(+) NK hücresi, CD45(+) T hücresi yüzdesi ve mutlak sayısı değerlendirilmesi için BD Trucount™ tüpüne 20 μ L BD Multitest CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 reaktifi ve 50 μ l kan örneği konuldu. Karanlıkta, oda sıcaklığında (20 ila 25°C) 15 dakika inkübe edildikten sonra eritrositleri parçalamak için 450 μ l lizis solüsyonu eklendi. Tüp karanlıkta, oda sıcaklığında (20 ila 25°C) 15 dakika inkübe edildi ve örnek akım sitometresinde analiz edildi.

Kit içerisindeki antikorlar ve işlevleri:

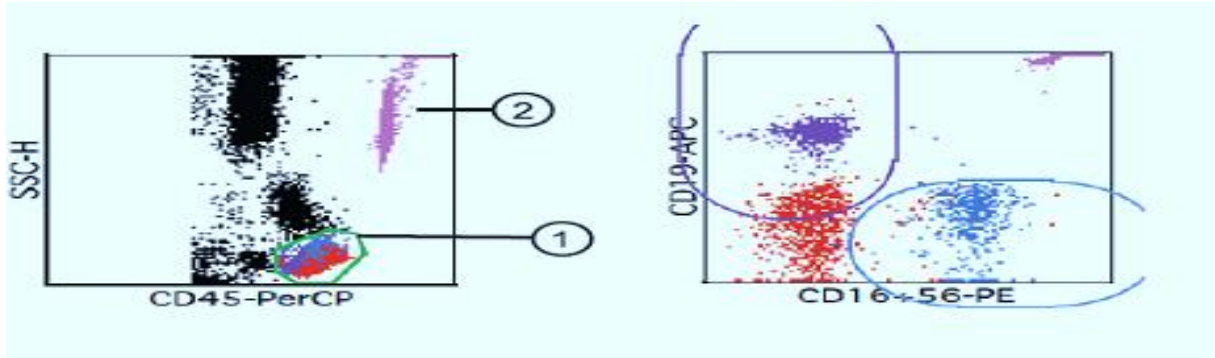
CD3, CD3 antijeni/T-hücresi antijeni reseptörü (TCR) kompleksinin epsilon zinciriyle reaksiyona girer. CD3 antijeni normal periferik kan lenfositlerinin %61 ila %85'i üzerinde bulunmaktadır.

CD16 ve CD56, NK lenfosit popülasyonunun saptanmasını kolaylaştırır.

CD45 antijeni, lenfositler, monositler, granülositler, eosinofiller dahil tüm insan lökositlerinde ve periferik kandaki bazofillerde bulunmaktadır.

CD19 insan B lenfositleri üzerinde bulunan bir antijeni tanıır. CD19 antijeni insan periferik kan lenfositlerinin yaklaşık %7 ila %23'ünde bulunmaktadır.

Şekil 15: B lenfositlerin flow sitometrik görüntüsü (20)



ELİSA Yöntemi ile Anti-ox-LDL antikoru, İL-10, TNF- α ve TGF- β Düzey Tayini

Örneklerin hazırlanması ve test prosedürü

Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen tüm hastaların serum örneklerinde anti-ox-LDL antikoru, İL-10 (Diacclone, Fransa), TNF- α (Diacclone, Fransa) ve TGF- β (Diacclone, Fransa) düzey tayini ELİSA yöntemi ile yapıldı. Plakta önceden belirlenmiş standart kuyucuklarına 100 μ l standartlar sırasıyla yerleştirildi. Blank kuyucuğuna 100 μ l ve örnek kuyucuklarına 50 μ l analiz tamponu eklendi. Örnek kuyucuklarına örneklerden 50 μ l eklendi. Biotin konjugat hazırlandı. Hazırlanan biotin konjugattan 50 μ l bütün kuyucuklara eklendi. Plak kapatıldı ve 400 RPM 'de 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Streptavidin-HRP hazırlandı. Kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkandı. Hazırlanan streptavidin-HRP 100 μ l bütün kuyucuklara eklendi. Plak kapatıldı ve 400 RPM 'de 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkandı. TMB substrat solüsyon 100 μ l bütün kuyucuklara eklendi. Plak kapatıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. 100 μ l stop solüsyonu eklendi. Plak ELİSA okuyucuda 450nm'de okutuldu ve optik dansite (OD) değerleri belirlendi. Standartların OD değerine göre oluşturulan standart eğri ile örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Simirnov testi ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde Mann-Whitney u testi kullanıldı. Nitel bağımsız verilerin analizinde Ki-Kare test, Ki-Kare test koşulları sağlanmadığında Fischer testi kullanıldı. Analizlerde SPSS 22.0 programı kullanılmıştır.



BULGULAR

Çalışmaya toplam 40 hasta alındı. KBH tanısı konulduktan sonraki süreçte farklı nedenlerle en az bir kez Rituksimab uygulanmış olan 27 hasta ile RTX grubu oluşturuldu. Kontrol grubuna ise Rituksimab kullanım öyküsü bulunmayan renal transplantasyonlu 13 hasta dahil edildi.

RTX grubuna dahil edilen hastaların %62.9'na (n=17 hasta) antikor aracılı rejeksiyon, %22.2'ne (n=6 hasta) desensitizasyon, %3.7'ne (n=1 hasta) de novo membranöz glomerülonefrit, %3.7'ne (n=1 hasta) anti-GBM hastalığı, %3.7'ne (n=1 hasta) fokal segmental glomerüloskleroz, %3.7'ne (n=1 hasta) fokal segmental glomerüloskleroz ve antikor aracılı rejeksiyon nedeniyle Rituksimab uygulanmıştı.

Ritüksimab kullanan hastalardan 20 hastanın kan örneği son uygulamadan 6 ay geçtikten sonra, 7 hastanın kan örneği ise uygulamadan sonraki 6 aylık süre içinde alınmıştı.

Çalışmaya alınan tüm hastaların yaş ortalaması 42.8 ± 13.8 (ortalama 44 yaş) idi. RTX grubuna dahil edilen hastaların yaş ortalaması 42.9 ± 13.5 (ortalama 44 yaş), kontrol grubuna dahil edilenlerin yaş ortalaması 42.6 ± 15.4 (ortalama 44 yaş) olarak hesaplandı.

RTX grubunu oluşturan hastaların %63.0'ü (n=17 hasta) erkek, %37.0'i (n=10 hasta) kadın; kontrol grubunu oluşturan hastaların benzer şekilde %61.5'i (n=8 hasta) erkek, %38.8'i (n=5 hasta) idi. Her iki gruba alınan hastaların yaşları, cinsiyet dağılımı açısından karşılaştırıldığında anlamlı ($p > 0.05$) farklılık olmadığı tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1: Ritüksimab ve kontrol grubu, yaş ve cinsiyet dağılımı

		RTX (-) (n=13)		RTX (+) (n=27)		P
		Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	
Yaş		42.6 ± 15.4	44.0	42.9 ± 13.2	44.0	0.623 ^m
Cinsiyet	Kadın	5	38.5%	10	37.0%	0.931 ^{x2}
	Erkek	8	61.5%	17	63.0%	

^m Mann-whitney u test / ^{x2} Ki-kare test (Fischer test)

RTX grubunu oluşturan hastalar arasında KBH'nın bilinen nedenleri arasında hipertansiyon en sık rastlanmakta iken, kontrol grubunu oluşturan hastalarda KBH nedenleri arasında kaydedeğer farklılık yoktu.

Tablo 2: Rituksimab ve kontrol grubu, KBH nedenleri

Ritüksimab grubu (n=27)	Kontrol grubu (n=13)
Etyolojik faktör belli değil (n=9)	Etyolojik faktör belli değil (n=3)
HT (n=4)	MPGN (n=2)
Kronik Pyelonefrit (n=2)	HT (n=2)
IgA nefropatisi (n=2)	IgA nefropatisi (n=1)
Polikistik böbrek hastalığı (n=1)	Alport sendromu (n=1)
Fokal segmental glomerülosklerozis (n=1)	FMF (n=1)
Lupus Nefriti (n=1)	VUR nefropatisi (n=1)
Diyabetes Mellitus Tip1 (n=1)	Tek böbrek (n=1)
Anti-GBM hastalığı (n=1)	Polikistik böbrek hastalığı (n=1)
Postrenal böbrek yetmezliği (n=1)	
FMF (n=1)	
VUR nefropatisi (n=1)	
MPGN (n=1)	
Hemolitik Üremik Sendrom (n=1)	

RTX grubunu oluşturan hastaların ortalama %59.3'ne (n=16 hasta) yaşamının farklı dönemlerinde diyaliz tedavisi uygulanmışken kontrol grubunu oluşturan hastaların ortalama %92.3'de (n=12 hasta) diyaliz tedavisi öyküsü mevcuttu.

RTX grubundaki hastaların kullanmış oldukları renal replasman tedavi yöntemleri aşağıda özetlenmiştir:

Hemodiyaliz: %37 (n=10 hasta)

Periton diyalizi: %11.1 (n=3 hasta)

Hemodiyaliz, periton diyalizi: %11.1 (n=3 hasta)

Diyaliz öyküsü bulunmayanlar: %40.7 (n=11 hasta)

Kontrol grubundaki hastaların ise renal replasman tedavi yöntemleri aşağıdaki gibidir:

Hemodiyaliz: %76.9 (n=10 hasta)

Periton diyalizi: %7.7(n=1 hasta)

Hemodiyaliz, periton diyalizi: %7.7 (n=1 hasta)

Diyaliz öyküsü bulunmayanlar: %7.7 (n=1 hasta)

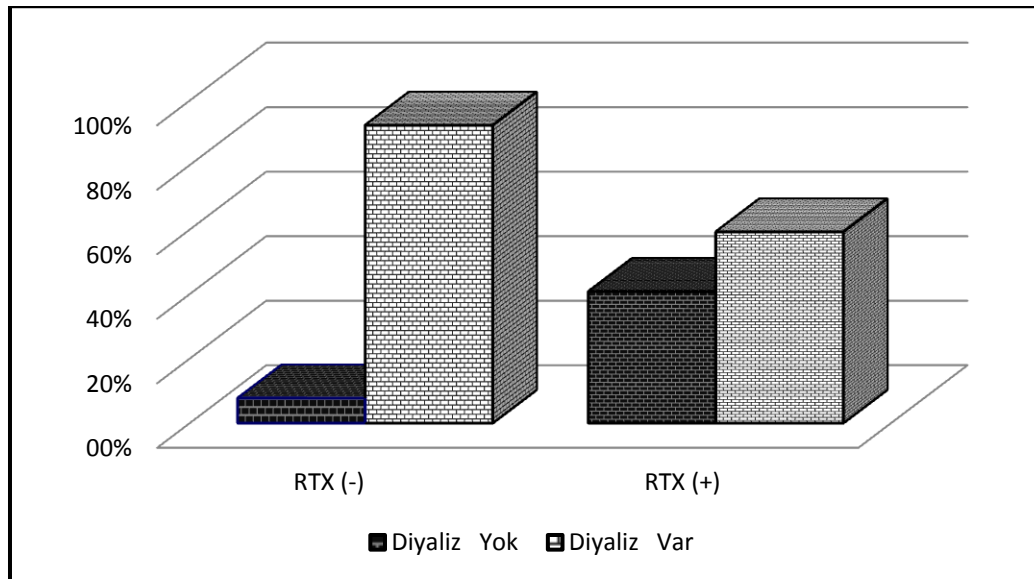
RTX grubunu oluşturan hastaların diyalize girme süreleri ortalama 4.1 ± 4.1 yıl, kontrol grubunu oluşturan hastalar için bu süre 4.9 ± 4.2 yıl olarak hesaplandı.

Her iki gruba dahil edilen hastalar hemodiyaliz ve periton diyalizi gibi renal replasman tedavi gereksinimleri ve süresi açısından karşılaştırıldı, Rituksimab kullanan hasta grubunda diyaliz tedavisi görme oranının anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşük olduğu, fakat iki grup arasında diyaliz süresi açısından anlamlı ($p > 0.05$) farklılık olmadığı saptandı (Tablo 3).

Tablo 3: Rituksimab ve kontrol grubu, diyaliz sıklığı ve süresi dağılımı

		RTX (-) (n=13)		RTX (+) (n=27)		p
		Ort.±s.s./n-%	Med	Ort.±s.s./n-%	Med	
Diyaliz	Yok	1	7.7%	11	40.7%	0.033 ^{x²}
	Var	12	92.3%	16	59.3%	
Diyaliz süresi		4.9 ± 4.2	4.0	4.1 ± 4.1	2.5	0.427 ^m

^m Mann-whitney u test / ^{x²} Ki-kare test (



RTX grubuna dahil edilen hastaların herhangi birinde renal transplantasyon öncesinde koroner anjiyografi, koroner stentleme, koroner by-pass gibi aterosklerotik olay öyküsüne rastlanmadı. Fakat 2 hastada renal transplantasyon sonrasında aterosklerotik olay gelişmişti. Her 2 hastada da aterosklerotik olay Rituksimab uygulamasından önce gerçekleşmişti. Canlıdan renal transplantasyon öyküsü bulunan hastalardan birine transplantasyondan 4 yıl sonra 2 damara koroner by-pass cerrahisi, 8 yıl sonra Cx'e stent implantasyonu, diğer bir hastaya ise transplantasyondan 1 yıl sonra AMI sonrası LAD ve OM'e stent implantasyonu, 5 yıl sonra ise sol ana iliak artere stent implantasyonu uygulanmıştı. Aynı hastaya LAD'a stent implantasyonundan 4 yıl sonra tekrarlanan koroner anjiyografide LAD yine total tıkalı saptanmıştı. Ayrıca bir hastada renal transplantasyondan 4 yıl sonra common iliak arterde trombus geliştiği bilgisine ulaşıldı.

Kontrol grubuna dahil edilen hastaların herhangi birinde renal transplantasyona kadarki ve transplantasyondan sonraki takip sürecinde aterosklerotik olay gelişmemişti. Mevcut verilere dayanarak iki grup arasında renal transplantasyondan sonra aterosklerotik olay sıklığında anlamlı ($p<0.05$) değişiklik saptanmadığı görüldü.

Kontrol grubuna dahil edilen hastaların herhangi birinde transplantasyondan önceki takip sürecinde immunsupresif tedavi gereksinimi olmamıştı. RTX grubunu oluşturan hastaların ise sadece ikisinin transplantasyon öncesinde immunsupresif tedavi öyküsü mevcuttu : 1 hastaya MPGN tanısıyla farklı zamanlarda “pulse” steroid, Mikofenolat Mofetil tedavisi; diğer hastaya ise anti-GBM tanısıyla “pulse”steroid, Siklofosfamid, Mikofenolat Mofetil, İntravenöz İmmunoglobulin tedavisi uygulanmıştı.

Kontrol grubuna dahil edilen hastaların %30.8'inde ($n=4$ hasta), RTX grubuna dahil edilenlerin ise %29.6'sında ($n=8$ hasta) indüksiyon tedavisi uygulanmıştı. İki grup indüksiyon tedavisi uygulanma sıklığı açısından kıyaslandığında anlamlı ($p>0.05$) farklılık bulunmadı.

Hem RTX, hem kontrol grubuna dahil edilen hastalar renal transplantasyon sonrasında siklosporin bazlı (siklosporin, mikofenolat mofetil, prednizolon) ya da takrolimus bazlı (takrolimus, mikofenolat mofetil, prednizolon) immunsupresif tedavi rejimleri ile takip edilmekteydi. Transplantasyon sonrasında RTX grubunu oluşturan hastaların %44.4'ne ($n=12$ hasta) siklosporin bazlı rejim, %55.6'na ($n=15$ hasta) ise takrolimus bazlı rejim; kontrol grubuna giren hastaların ise %38.5'ne ($n=5$ hasta) siklosporin, %53.8'ne ($n=7$ hasta) takrolimus bazlı rejim başlanmıştı. İki grup renal transplantasyon sonrasında uygulanan

immünsüpresif tedavi rejimleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı ($p>0.05$) farklılık saptanmadı.

Renal transplantasyondan sonraki takip sürecinde ayrı ayrı ilaçlara bağlı gelişen yan etkiler nedeniyle bazen tedavi değişikliği yapılması gerekmişti. Örneğin RTX grubundan 2 hastanın, benzer şekilde kontrol grubundan da 1 hastanın Mikofenolat Mofetil yerine Azatiyopurin kullandığı tespit edildi. Siklosporine bağlı olarak 2 hastada hirsutizm, 1 hastada diş eti hiperplazisi, 1 hastada mikroanjiyopatik hemolitik anemi, 1 hastada böbrek biyopsisinde kalsinörin toksisitesi ile uyumlu bulgular saptanmıştı. Takrolimusa bağlı olarak 1 hastada atipik HÜS, 1 hastada kan şekeri yüksekliği, 1 hastada böbrek biyopsisinde fokal izometrik vakuolizasyon, 1 hastada anemi saptanmıştı. Bu hastalarda bu yan etkiler nedeni ile kalsinörin tedavileri kesilmişti. Mikofenolat Mofetil'e bağlı olarak ise 1 hastada sitopeni, 1 hastada ishal gözlemlendiği için tedavi değişikliği gereksinimi olmuştu.

Her iki gruba dahil edilen hastalarda renal transplantasyon sonrası takipte CMV ve BKV enfeksiyonu öyküsü incelendi. Kontrol grubuna dahil edilen hastaların herhangi birinde CMV enfeksiyonu gelişmezken RTX grubundaki hastalarda %29.6 oranında ($n=8$ hasta) CMV enfeksiyonu öyküsü mevcuttu.

Kontrol grubuna dahil edilen hastaların %7.7'sinde ($n=1$ hasta), RTX grubu hastalarının %18.5'de ($n=5$ hasta) BKV enfeksiyonu gelişmişti. Sonuç olarak transplantasyon sonrası dönemde iki grup arasında BKV enfeksiyonu açısından anlamlı fark gözlemlenmezken Rituksimab alan hastalarda CMV enfeksiyonunun anlamlı olarak ($p<0.05$) daha yüksek oranda geliştiği tespit edildi.

Renal transplantasyon sonrasında gelişebilecek komplikasyonlardan biri de akut rejeksiyondur. Akut rejeksiyonun kontrol grubuna dahil edilen hastaların %7.7'sinde ($n=1$ hasta), Rituksimab kullanım öyküsü bulunan hastaların ise %37'sinde ($n=10$ hasta) gelişmiş olduğu gözlemlendi. Mevcut sonuçlara dayanarak farklı nedenlerle Rituksimab alan hastalarda akut rejeksiyon sıklığının anlamlı ($p>0.05$) farklılık göstermediği tespit edildi.

Tablo 4: Rituksimab ve kontrol grubu, indüksiyon tedavisi, idame tedavisi, infeksiyonlar, aterosklerotik olaylar, akut rejeksiyon sıklığı, dağılımı

		RTX (-) (n=13)		RTX (+) (n=27)		P
		n	%	n	%	
Posttx KAH	Yok	13	100.0%	25	92.6%	1.000 ^{x²}
	Var	0	0.0%	2	7.4%	
Prettx İndüksiyon	Yok	9	69.2%	19	70.4%	0.941 ^{x²}
	Var	4	30.8%	8	29.6%	
Posttx BKV İnflamasyon	Yok	12	92.3%	22	81.5%	0.369 ^{x²}
	Var	1	7.7%	5	18.5%	
Posttx CMV İnflamasyon	Yok	13	100.0%	19	70.4%	0.028 ^{x²}
	Var	0	0.0%	8	29.6%	
CsA Bazlı Rejim	Yok	8	61.5%	15	55.6%	0.720 ^{x²}
	Var	5	38.5%	12	44.4%	
FK Bazlı Rejim	Yok	6	46.2%	12	44.4%	0.919 ^{x²}
	Var	7	53.8%	15	55.6%	
Akut Rejeksiyon	Yok	12	92.3%	17	63.0%	0.052 ^{x²}
	Var	1	7.7%	10	37.0%	

^{x²} Ki-kare test (Fischer test)

Her iki gruba dahil edilen hastalardan alınan kan örneklerinde CD19(+) B lenfosit, CD3 (+) T lenfosit , CD16 ve CD56(+) NK hücrelerin yüzdesi ve mutlak sayısı, CD45(+) T lenfosit mutlak sayısı, İL-10, TNF-alfa, TGF-beta gibi sitokinlerin, anti-ox-LDL antikorları düzeyi tayini yapıldı. Bahsedilen lenfosit yüzey belirteçlerinin ve antikorların kantitatif düzeyleri ve immun hücrelerin mutlak sayısı, yüzdesi Tablo-5’de özetlenmiştir. İki grup mevcut sonuçlara göre kıyaslandığında RTX grubunda CD19(+)B lenfosit yüzdesi, CD19(+) B lenfosit, CD3(+) T lenfosit, CD16 ve CD56(+) NK hücresi değeri, CD45(+) T lenfosit mutlak sayısının kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşük ölçüldüğü saptandı.

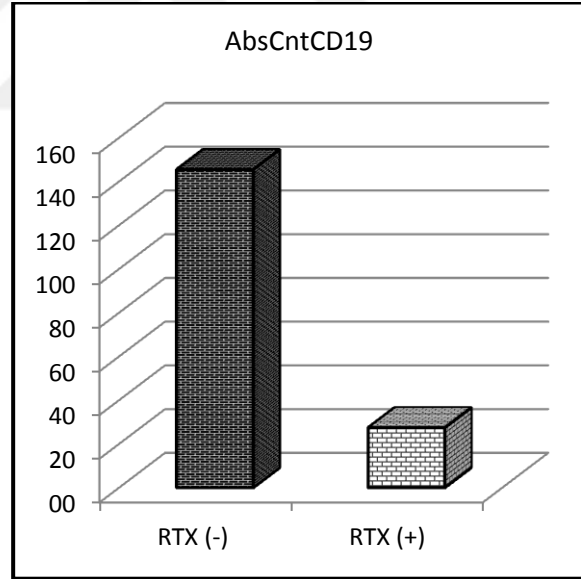
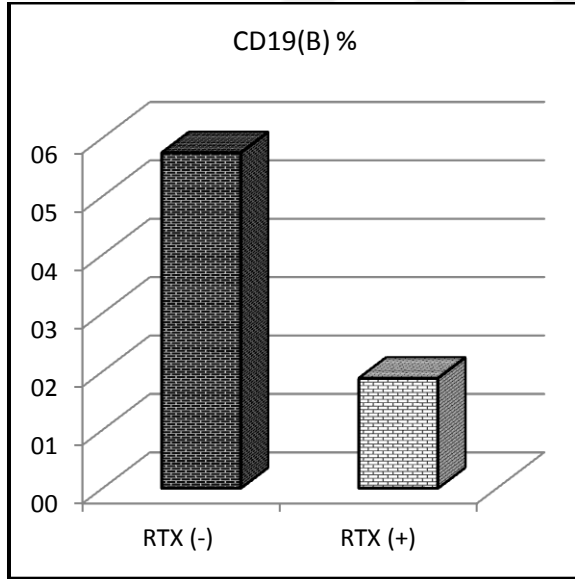
Her iki grup arasında CD3(+) T lenfosit, CD16 ve CD56(+) NK hücresi yüzdesi, TNF-alfa, TGF-beta ve anti-ox-LDL düzeylerinin anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermediği gözlemlendi.

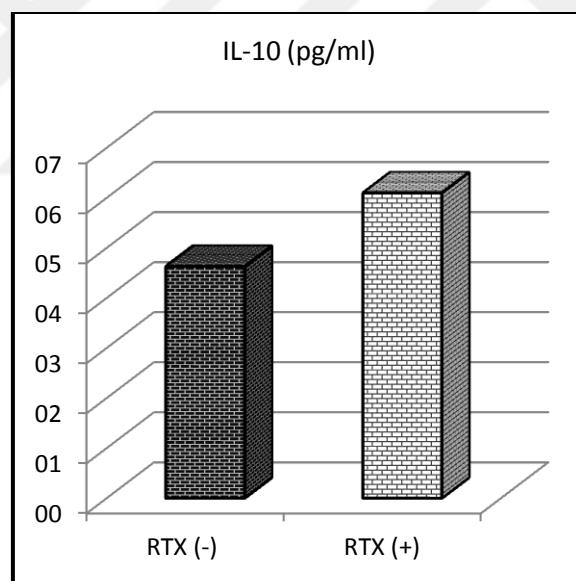
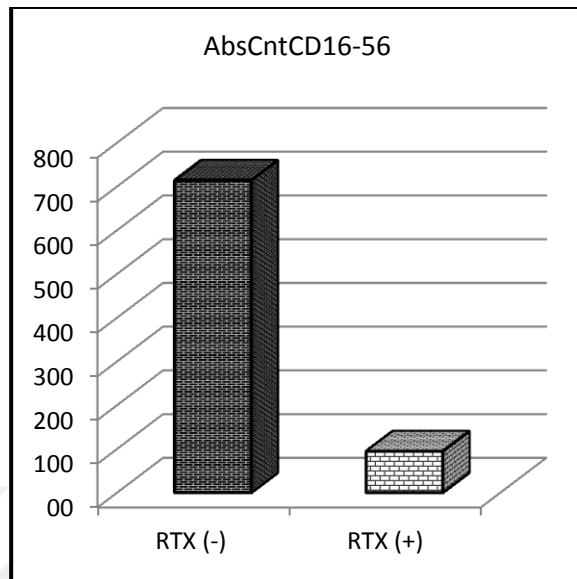
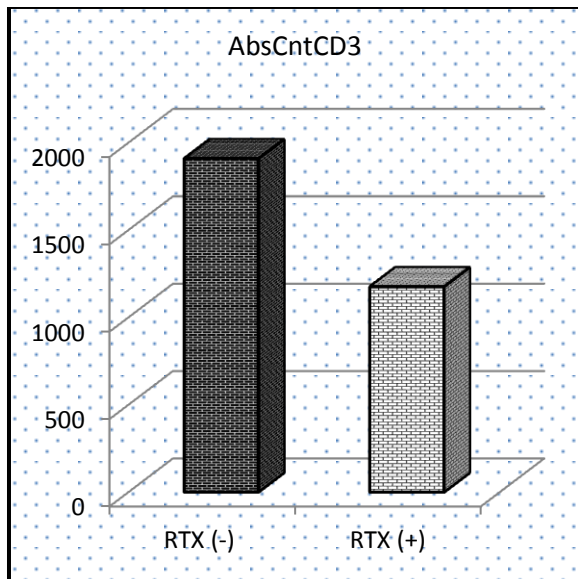
Düzyey tayini yapılan sitokinlerden sadece İL-10 değeri RTX grubuna dahil edilen hastalarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($p < 0.05$) olarak yüksek ölçüldü.

Tablo 5: Rituksimab ve kontrol grubu, immun hücrelerin mutlak sayısı, yüzdesi, anti- ve proinflatuvar sitokinlerin kantitatif düzeyi dağılımı

	RTX (-) (n=13)		RTX (+) (n=27)		P
	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	
CD19(B) %	5.7 ± 4.8	5.6	1.9 ± 2.5	0.9	0.002 ^m
CD3(T)%	86.9 ± 6.6	89.3	89.6 ± 7.6	91.7	0.141 ^m
AbsCntCD19	145.5 ± 149.9	106.1	27.4 ± 50.2	6.2	0.000 ^m
AbsCntCD3	1908 ± 622	2190	1175 ± 700	1082	0.008 ^m
AbsCntCD16-56	713.9 ± 1996.2	106.5	94.6 ± 90.0	79.7	0.049 ^m
AbsCntCD45	2219 ± 781	2467	1333 ± 777	1322	0.005 ^m
NK(CD16-56)%	6.8 ± 5.1	5.7	7.6 ± 6.4	5.1	0.988 ^m
IL-10 (pg/ml)	4.6 ± 0.9	4.4	6.1 ± 2.4	5.4	0.043 ^m
TNF-alfa(pg/ml)	10.5 ± 3.4	9.0	58.3 ± 111.1	12.1	0.112 ^m
TGF-beta(ng/L)	613.1 ± 496.7	334.8	465.6 ± 395.7	315.0	0.254 ^m
Oxldl (ng/L)	4597 ± 4167	2162	3845 ± 3386	2092	0.634 ^m

^m Mann-whitney u test



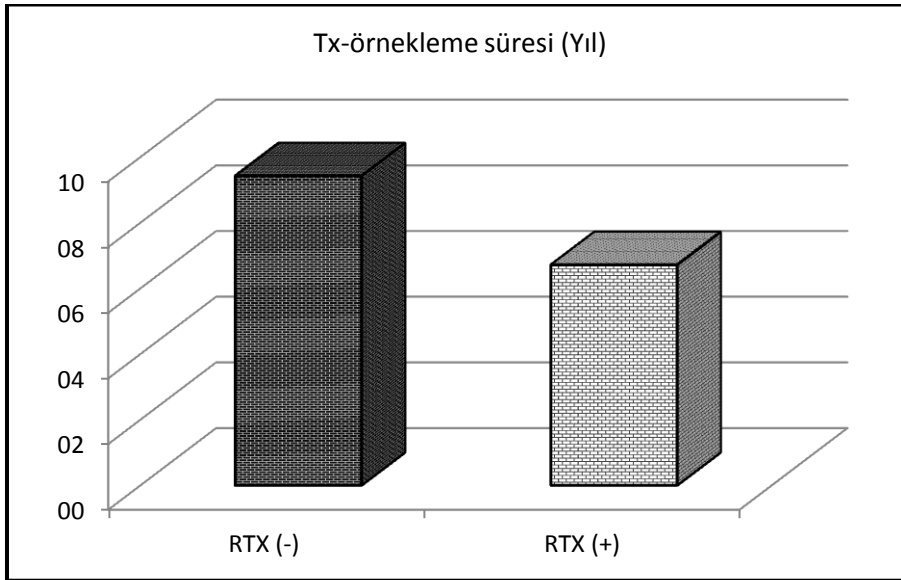


RTX grubunda renal transplantasyondan kan örneklerinin alınmasına kadar geçen süre kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı ($p < 0.05$) olarak daha düşük bulundu (Tablo 6).

Tablo 6: Rituksimab ve kontrol grubu, tx-örnekleme süresi dağılımı

	RTX (-) (n=13)		RTX (+) (n=27)		P
	Ort.±s.s.	Med	Ort.±s.s.	Med	
Tx-örnekleme süresi (Yıl)	9.4 ± 3.1	9.0	6.7 ± 4.7	8.0	0.024^m

^m Mann-whitney u test



TARTIŞMA

Kardiyovasküler olaylar günümüzde renal transplantasyonlu hastaların mortalite nedenlerinin başında gelmektedir. Bu patolojik sürecin başlangıcı olan aterosklerozla ilgili, bu hasta grubu bilinen birçok risk taşımaktadır. Bu risklerden bazıları kronik böbrek hastalığı ve diyaliz sürecinden gelmekte, bazıları da transplantasyon sonrası eklenmektedir. Örneğin kalsinörin inhibitörlerine bağlı endotel disfonksiyonu, üzerinde iyi çalışılan ve ateroskleroz patogeneze katkısı netleşmiş önemli bir sorundur (18). Buna benzer şekilde renal transplantasyon hastalarında aterosklerotik sürece potansiyel etkileri olabilecek diğer ilaçlar da merak konusu olmaktadır. Rituksimab da bu ilaçlardan birisidir. Son yıllarda renal transplantasyon pratiğinde sık uygulanmaya başlanmıştır. Özellikle transplantasyon öncesinde immünolojik yönden duyarlı hastaların desensitizasyonu ve posttransplant dönemde de gelişen antikor aracılı rejeksiyonların tedavisi en yoğun endikasyon bulduğu alanlardır. Bunun dışında orijinal hastalıkların nüksü ve de novo gelişen FSGS olgularında da kullanılmaktadır. İsveç grubunun induksiyon tedavisinde RTX kullandıkları bir hasta grubu ile ilgili yayımladıkları 3 senelik bir gözlem RTX'in ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklarla ilgili bazı olumsuz etkileri olabileceği şüphesini uyandırmıştır. Bu çalışmada induksiyon tedavisi olarak Rituksimab kullanan 68 hastadan oluşan grupta kontrol grubuna göre kardiyovasküler mortalite anlamlı olarak artmıştır (19,20). Bundan sonraki dönemde de bu konuyu irdeleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma özellikle aterosklerotik süreçteki inflamatuvar sitokinler ve ox-LDL antikorları gibi serolojik belirteçler üzerine Rituksimabın etkisinin araştırılacağı bir çalışma olarak düzenlenmiştir. Primer hedef noktası olarak bu belirteçlerdeki değişiklikler bize uzun dönemdeki aterosklerotik sürece yönelik de projeksiyon yapma imkanı tanıyabilecektir. Bunun yanında kısa izlem süresi nedeni ile kardiyovasküler olay gelişimi ile ilgili önemli bir çıkarım yapılamayacağı çalışma başlangıcında öngörülmüştür.

Literatüre baktığımızda renal transplantasyon dışı alanlarda özellikle romatolojik hastalıklarda Rituksimabın vasküler etkileri konusunda çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde G.Kerekes ve ark. romatoid artrit hastalarında rituksimab tedavisinin endotelyal disfonksiyon, karotis aterosklerozu ve lipid profili üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmaya alınan romatoid artritli 5 kadın hastaya, 2 hafta ara ile 1000 mg Rituksimab intravenöz yolla uygulanmış ve 1.uygulamadan 2, 6 ve 16 hafta sonra yüksek rezolüsyonlu B-mod ultrasonografi ile brakiyal arterde akım aracılı vazodilatasyon (flow mediated

vasodilation; FMD) ve common karotis intima-mediya kalınlığı (common carotid intima-media thickness; ccIMT), lipit profili tayini yapılmıştır. Rituksimab uygulamasından sonra 2., 6. ve 16. haftalarda FMD'de ortalama %30, %22 ve %81 oranında iyileşme saptanarak bu değişiklik FMD'de hızlı ve kalıcı iyileşme olarak değerlendirilmiştir. Fakat 2, 6. ve 16. haftalarda yapılan ölçümlerde ccIMT'de sadece %10, %9 ve %2 oranında azalma görülerek RTX'ın kısa periyotta ateroskleroz üzerine az etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Laboratuvar ölçümlerinde trigliserit düzeyinde %3-11 azalma izlenirken, HDL-kolesterol düzeyinde ise %14-35'lik artış saptanmıştır (21).

Mevcut konuyu ele alan ikinci büyük çalışma D.Novikova ve ark. tarafından romatoid artritte Rituksimabın lipitlere, arteriyel sertliğe ve karotis intima-mediya kalınlığına etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmaya romatoid artrit tanılı ve aşıkardiyovasküler hastalığı olmayan 54 hasta alınarak, 2 hafta ara ile intravenöz yolla 500 mg veya 1000 mg Rituksimab uygulanmıştır. Bu hastalarda uygulamadan önce ve 24 hafta sonra lipitler, C-reaktif protein, eritrosit sedimentasyon hızı, RF IgM, DAS 28, dijital volüm nabız kontur analizi ile arteriyel sertlik (SI : sertlik indeksi, RI: rezolüsyon indeksi), yüksek rezolüsyonlu B-mod karotis ultrasonografi ile common karotis intima-mediya kalınlığı tayini yapılmıştır. EULAR kriterlerine dayanarak hastalar 2 gruba ayrılmıştır: 1) 24 haftadan sonra Rituksimab tedavisine orta/iyi yanıt verenler (41 hasta;%75); 2) Rituksimab tedavisine yanıt vermeyenler (14 hasta; %25). Son ölçümlerde trigliserit düzeyinde %9, HDL-kolesterol düzeyinde %23'lük artış, aterojenik indekste %14 azalma; SI'de %57'lik ve RI'de %24'lük azalma, common karotis intima-mediya kalınlığında %9'lük azalma saptanmıştır. Birinci grupta C-reaktif protein, eritrosit sedimentasyon hızı, RF IgM, DAS 28'de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) azalmaya kardiyovasküler parametrelerin iyileşmesi eşlik etmiştir. İkinci grupta ise lipitler, arteriyel sertlik ve common karotis intima-mediya kalınlığında anlamlı düzeyde değişiklik izlenmemiştir. Sonuç olarak, kardiyovasküler hastalığı olmayan romatoid artritli hastalarda Rituksimab kullanımının sistemik inflamasyonu baskıladığı, lipit profilini ve aterojenik indeksi iyileştirdiği, karotis intima-mediya kalınlığını azalttığı, arter duvarının elastik özelliklerini düzelttiği gösterilmiştir (22).

Priscilla Y. Hsue ve ark. tarafından ise "Romatoid artritli hastalarda Rituksimab ile B hücre depleasyonu endotelial fonksiyonu iyileştirir ve inflamasyonu azaltır" başlığı altında son geniş kapsamlı çalışma gerçekleştirilmiştir. %95'ini kadınların oluşturduğu bu çalışmaya 20 hasta dahil edilmiştir. 0. ve 15. günlerde intravenöz yolla 1000 mg Rituksimab uygulanan bu hastalarda 0., 12. ve 24. haftalarda FMD, inflamatuvar belirteçler ölçümü ve reaktif hiperemi

ile klinik değerlendirmeler yapılmıştır. FMD'nin bazal değeri 4.5 ± 0.4 iken 12. haftada 6.4 ± 0.6 ($p < 0.0001$) ölçölmöş, 24. haftada bu beklenen olumlu değişim devam etmiştir. Hiperemik velositede de benzer azalma paterni izlenen bu hastalarda 24. haftada yüksek sensitif C-reaktif protein, eritrosit sedimentasyon hızı ve dolaşan CD19(+) B hücre düzeyinde sebat eden bir gerileme gözlemlenmiştir. Çalışma sürecinde kolesterol ve trigliserit düzeyinde orta düzeyde artış izlense de diğer sonuçlar göz önünde bulundurularak Rituksimabın romatoid artritli hastalarda artmış kardiyovasköler riskin azaltılmasında etkin role sahip olabileceği sonucuna varılmıştır (23).

Bahsedilen çalışmalarda sadece romatoid artritli hastaların yer aldığını, çalışmaya daha az sayıda hasta katıldığını, kontrol grubu oluşturulmadığını, ayrıca aterosklerozun immün temelinde yer alan inflamatuvar belirteçlerin değerlendirilmediğini göz önünde bulundurarak Rituximabın yoğun olarak kullanım alanı bulduğu renal transplantasyonlu hastaların bu açılardan incelenmesi amacı ile bu çalışmayı tasarladık.

Çalışmamıza 13'ü kontrol grubu olmak üzere renal transplantasyon yapılmış 40 hasta dahil edildi. Ayrıca aterosklerotik süreçte yer alan immün hücrelerin [CD19(+) B lenfositler, CD3(+) T lenfositler, CD16(+) ve CD56(+) NK hücreleri] mutlak sayısı ile yüzdeleri, CD45(+) T hücresi mutlak sayısı ve İL-10, TNF-alfa, TGF-beta gibi sitokinlerin ve anti-ox-LDL antikorların düzeyinin tayinleri yapıldı.

Aterosklerotik sürecin değişik aşamalarına olumsuz katkıları olabilecek lenfosit alt gruplarından CD19(+) B lenfosit, CD3(+) T lenfosit, CD45(+) T lenfosit, CD16 ve CD56(+) NK hücreleri ve mutlak sayıları RTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Ateroskleroz açısından olumlu bir sürece yol açabilecek bu tabloya Rituksimabın da katkıda bulunduğunu söylemek mümkündür. Bu belirteçlerden özellikle CD19(+) B lenfosit düzeyinin azalışı Rituksimabın etkinliği ile olmaktadır. Bu etkinliğin hasta grubumuzdaki son Rituksimab kullanım tarihleri göz önüne alındığında oldukça uzun süre olarak devam ettiği de anlaşılmaktadır. Rituksimab grubunda bu süre ortalama 26 ay olarak bulunmuştur. Buradaki diğer lenfosit alt gruplarına olan etkinlik açısından başka faktörlerin de devrede olduğunu unutmamak gerekir. Çalışmamızdaki Rituksimab grubu ile kontrol grubuna fokuslanarak incelediğimizde immunolojik açıdan iki grup arasında heterojen bir yapının olduğu söylenebilir. Bunlardan belki en önemlisi RTX grubunun immunolojik riski yüksek hastalardan oluşması ve ilave başka immunsupressif ajanları da kullanma gereksinimleri olmasıdır. Bu grupta en çok karşılaşılan kullanım endikasyonu akut antikor aracılı rejeksiyon

olarak bulundu. Dolayısı ile bu hastalar daha yoğun ve potent immunsupressif ajanlar kullanmışlardı. Pulse steroid ve ATG kullanımı da özellikle CD3(+) T lenfosit sayımındaki azalma üzerine etkili olarak yorumlandı.

İki grup arasındaki çarpıcı farklılıklardan birisi de RTX grubundaki preemtif transplantasyon yapılan hasta sayısının fazlalığıydı. Bu durum ateroskleroz ve potansiyel kardiyak olaylar açısından bu gruba bir üstünlük kazandırmaktaydı. Hastaların üremik ortamda daha kısa süre kalmalarının da bu konuda bir avantaj sağlayacağı öngörülebilir.

Düzey tayini yapılan sitokinlerden TGF beta profibrotik özellikleri ile vasküler açıdan inflamasyonu baskılayıp atreoskleroz gelişimini önleyebilmektedir. Ancak çalışmamızda TGF beta açısından iki grup arasında farklılık bulunmamıştır.

Ateroskleroz açısından incelenen renal transplantasyon hastalarında bu olumsuz sürecin ilk basamağı olan endotel disfonksiyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle transplantasyon sonrası kullanılan en temel ilaçlardan kalsinörin inhibitörlerinin endotel disfonksiyonu yarattığı bilinmektedir (24). Bu çalışmalarda Takrolimusun Siklosporine göre daha az olumsuz etkisi olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda her iki grupta da Takrolimus alan hastalar çoğunlukta olmasına rağmen kalsinörin inhibitörleri kullanımları açısından bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak hastalardaki T lenfosit ve sitokin değişimlerinde bu ilaç grubunun da etkin olabileceği gözardı edilmemelidir.

Bizim çalışmamızdaki protokollerde burada adı geçen romatolojik çalışmalardaki gibi endotel disfonksiyonu ve orta dönemde vasküler yapısal değişikliklerin incelenmesi bulunmamaktadır. Ancak bu çalışmalarda vurgulanan inflamatuvar değişikliklerin düzelmesi gözlemlenen olumlu değişiklikler bizim çalışmamızdaki bazı parametrelerle de örtüşmektedir. Örneğin inflamatuvar süreçlerde rol aldığı bilinen T lenfosit alt gruplarından CD19(+), CD3(+), CD16(+), CD56(+) ve CD45(+) T lenfosit sayılarının düşmesi ve antiaterojenik etkiye sahip İL-10 düzeyinin artması bu görüşü desteklemektedir. Ancak unutulmamalıdır ki romatoloji çalışmalarındaki yüksek inflamasyon potansiyeli taşıyan hasta grubu ile renal transplantasyonlu hastaların özellikleri oldukça farklıdır. Bizim hasta grubumuzda akut inflamasyondan çok CMV viremisi gibi uzun dönemde düşük derecede inflamasyon yaratan durumlar daha sık görülebilmektedir. Ayrıca bu grupla bizim hasta popülasyonu arasında kullanılan RTX dozu ile ilgili farklılıklar bulunmaktadır. Biz daha çok tek doz kullanmışken, romatolojik hastalıklarda tekrarlayan dozlarda kullanım görülmektedir.

T hepler yolağında görevli olan İL-10 değeri ise anti-aterojenik özellikleri olduğu bilinen bir sitokindir. İL-10 düzeyi rituksimab grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($p < 0.05$) olarak yüksek bulundu. Bu durum önceden de belirtildiği gibi romatoloji gruplarının yaptığı çalışmalarda olumlu kardiyovasküler gelişmeleri desteklemektedir.

Posttransplant kardiyovasküler olaylar açısından iyi bilinen risk faktörlerinden birisi de CMV virusunun yarattığı kronik inflamatuvar süreçtir. Gerek prospektif, gerekse retrospektif birçok çalışmada düşük düzeydeki CMV viremisinin bile aterosklerotik süreci olumsuz etkilediği bilinmektedir. Çalışma grubumuzda RTX grubundaki CMV enfeksiyonu sıklığının fazlalığı büyük olasılıkla bu riskli gruba verilen ilave ve potent immunosupresif tedavilerle ilgili bulundu. Rituksimabın yarattığı olumlu etkiyi maskeleyebileceği düşünülen bu durumun kısa izlem sürecinde karşımıza çıkmayabileceği düşünüldü. Takip süresinin uzunluğu ve vireminin devamı durumunda belki de olumsuz etkiler gözlemlenebilecektir.

Genelde Rituksimab alan hasta gruplarında CMV ve BKV açısından çok olumsuz sıklıklar bildirilmemiştir.

Çalışma başlangıcındaki öngörülerimizden birisi olan anti-ox-LDL antikorlarının rituksimab grubunda düşük çıkmasıydı. Ancak bu sonuca ulaşamadık. Bu durum belki de bu antikorları üreten veya üretecek olan B lenfosit repertuarının genişliği ile ilgiliydi. Rituksimab tedavisinin sadece belirli bir hücre yüzey belirteci olan B lenfositleri hedeflemesi bunun yanında diğer B lenfosit öncü hücrelerinin ve plazma hücrelerinin etki alanı dışında kalması ile açıklanabilir.

Her iki grup arasında CD3(+) T lenfosit, CD16 ve CD56(+) NK hücresi yüzdesi, TNF-alfa, TGF-beta ve anti-oxLDL düzeylerinin anlamlı ($p > 0.05$) farklılık göstermediği gözlemlendi.

Çalışma kapsamına aldığımız hasta sayımızın düşük olmasına karşın, ilk aldığımız sonuçlar ve edindiğimiz izlenim RTX tedavisinin kardiyovasküler açıdan olumlu yönde olabileceği, ya da en azından olumsuzluk içermediği yönündedir. İsveç grubunun yapmış olduğu 3 senelik izlem sonuçlarına dayanan verilerle çelişen bu durum özellikle her iki çalışmadaki hasta gruplarının farklı özellikleri ile ilişkili olabilir. Örneğin İsveç grubundaki hasta yaş ortalamalarının bizim hastalarımıza kıyasla daha fazla olması, yine kadavra tranplantasyon oranlarının daha fazla olması gibi önemli farklılıklar bulunmaktadır (19,20). Ayrıca İsveç grubunun hastalarında yayında detaylı olarak verilmeyen bazal kardiyovasküler

risk faktörlerinin daha fazla olması da olasıdır. Bu da RTX’la ilişkilendirilen mortaliteyi etkileyebilecek önemli bir ayrıntı olabilir.

Sonuç olarak, çalışma grubumuzdaki RTX tedavisi kullanmış olan renal transplantasyonlu 27 hastamızda aterosklerotik süreçte rol oynayabilen lenfosit alt grupları ve bazı sitokinlerde olumlu değişimler elde edilmiştir. Bu laboratuvar verilerinin klinik yansımalarının daha net şekilde ortaya çıkması için daha uzun süreli izlem ve fazla sayıda hasta ile yapılan yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

1. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. American Journal of Transplantation supplement 3 vol 9 2009
2. Türkmen A. Transplantasyon Nefrolojisi Pratik Uygulama Önerileri 2016
3. Arıcı M and Walls J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: Is C-reactive protein the missing link? *Kidney International*, Volume 59 (2001), pp. 407–414
4. W. LeBien T and F. Tedder T. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood Journal*, Volume 112 Number 5 (2008), pp.1570-1580
5. D Salama A and D Pusey D. Drug Insight: rituximab in renal disease and transplantation. *Nature Clinical Practice Nephrology*, Volume 2 Number 4 (2006), pp 221-230
6. Tsiantoulas D, P. Sage A, Mallat Z, J. Binder CH. Targeting B Cells in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Volume 35 (2015) pp 296-302
7. Tsiantoulas D, J.Diehl C, L. Witztum J, J. Binder Ch. B cells and Humoral Immunity in Atherosclerosis. *Circ. Resc.*, Volume 114 Number 11 (2014) pp 1743-1756
8. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *American Physiological Society Physiological Reviews* 1 April 2006 Vol 86 No 2, 515-581
9. Yla-Herttuala S, Fog Bentzon J, Daemen M, Falk E et al. Stabilization of atherosclerotic plaques: an update. *Eur Heart J* (2013) 34 (42): 3251-3258
10. P.Sage A, Mallat Z. Multiple potential roles for B cells in atherosclerosis. *Annals of Medicine* 2014; 46: 297-303
11. Pescovitz M.D. Rituximab, an Anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of Action. *American Journal of Transplantation* 2006; Volume 6 pp 859-866
12. Morgan Wood A. Rituximab: Pharmacology and Pharmacokinetics of Rituximab. *Am J Health Syst Pharm*. 2011, Volume 58 Number 3
13. R. Barnett A N, G. Hadjianastassiou V, Mamode N. Rituximab in renal transplantation. *Transplant International* Volume 26 Number 6 (2013) pp 536-575
14. <https://www.immunopaedia.org.za/wp-content/uploads/.../rituximab-30-nov-08>
15. Rituximab: Drug Information, Uptodate 2015
16. Tai Yeon Koo, Jaeseok Yang. Current progress in ABO-incompatible kidney transplantation. *Kidney Res Clin Pract* Volume 34 (2015) pp 170-179

17. BDMultitestCD3FITC/CD16+CD56PE/CD45PerCP/CD19APCwith BD Trucount Tubes Cat. No. 342446
18. Oflaz H, Turkmen A, Kazancioglu R, Kayacan M, Bunyak B, Genchallac H, Erol B, Mercanoglu F, Umman S, Sever M. The effect of calcineurin inhibitors on endothelial function in renal transplant recipients. *Clinical Transplantation* Volume 17, Issue 3 June 2003 pp 212–216
19. Tyden G, Genberg H, Tollemar J, Ekberg H et al. A Randomized, Doubleblind, Placebo-Controlled, Study of Single-Dose Rituximab as Induction in Renal Transplantation. *Transplantation* Volume 87, No 9, Ma 2009
20. Tyden G, Ekberg H, Tufveson G, Mjörnstedt L. A Randomized, Doubleblind, Placebo-Controlled, Study of Single-Dose Rituximab as Induction in Renal Transplantation: A 3-Year Follow-Up. *Transplantation* Volume 94 No 3 August 2015
21. Kerekes G, Soltesz P, Der H, Veres K et al. Effects of rituximab treatment on endothelial dysfunction, carotid atherosclerosis, and lipid profile in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* Volume (2009) pp 705-710.
22. S.Novikova D, V.Popkova T, V.Lukina G, L.Luchikhina E et al. The Effects of Rituximab on Lipids, Arterial Stiffess, and Carotid Intima-Media Thckness in Rheumatoid Arthritis. *J Korean Med Sci* Volume 31 (2016) pp 202-207
23. Y.Hsue P, Scherzer R, Grunfeld C, Imboden J. Depletion of B-Cells With Rituximab Improves Endothelial Function and Reduces Infl ammation Among Individuals With Rheumatoid Arthritis. *Journal of the American Heart Association* 2017
24. Şenturk Ciftci H, Kılıcaslan T, Calıskan Y, Turkmen A, Gurtekin M. Lipid Parameters, Doses and Blood Levels of Calcineurin Inhibitors in Renal Transplant Patients. *Indian J Clin Biochem*. 2013 Apr; 28(2): 164–168

ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ

T.C. KİMLİK NO : 99622356732

ÜNVANI ADI SOYADI : Dr. Numune ALİYEVA

DOĞUM TARİHİ / YERİ : 09.04.1988- Beylegan, Azerbaycan

YAZIŞMA ADRESİ : İÜ İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları ABD,

Çapa/FATİH, 34093, İSTANBUL

TELEFON : 05360706066

E-POSTA : numune_alieva@hotmail.com

EĞİTİMİ: 2013-2017 Tıpta Uzmanlık İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları

2005-2011 Lisans Azerbaycan Tıp Üniversitesi