



T.C SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

“KOMPOZİT DOKU ALLOTRANSPLANTASYONUNDA AKUT
DÖNEMDE GÖRÜLEN İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER”

Dr. Malik ABACI

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Yard. Doç. Dr. Mehtap KARAMEŞE

KONYA

2015

İÇİNDEKİLER TABLOSU

İÇİNDEKİLER TABLOSU.....	i
ŞEKİLLER TABLOSU	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler.....	2
1.1.1 Kompozit Doku Allotransplantasyonunun Tarihçesi.....	2
1.1.2 Kompozit Doku Allotransplantasyonunda Allogreft Kabulü Ve Rejeksiyonu.....	5
1.1.3 Kompozit Doku Allotransplantasyonunda Donör-Alıcı Eşleşmesi	7
1.1.4 Kompozit Doku Allotransplantasyonunda İmmüsupresif Ajanlar	7
1.1.5 İmmüsupresif İlaçların Uzun Dönem Kullanımında Ortaya Çıkan Yan Etkileri.....	11
1.1.6 Kompozit Doku Allotransplantasyonunda “Graft Versus Host Hastalığı”	12
1.1.7 İnterlökin-6.....	12
1.1.8 İnterlökin-10.....	14
1.1.9 İnterlökin-18.....	14
1.1.10 C-Reaktif Protein.....	15
1.1.11 Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)	16
1.1.12 Neutrophil Gelatinase – Associated Lipocalin (NGAL)	18
1.1.13 Serum Amiloid- A Protein (SAA)	19
1.1.14 Kompleman C5a.....	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1 Deney Grupları.....	22
2.2 Transplantasyon Öncesi Hazırlıklar.....	22
2.3 Transplantasyonda Cerrahi İşlem	22
2.4 Transplantasyon Sonrası Hayvan Bakımı	25
2.5 Kan Örneklerinin Toplanması	25
2.6 Eksremite Allotransplantasyonu.....	25
2.7 Kan Örneklerinin Biyokimyasal Analizi	27
2.8 İstatistiksel Analiz.....	29
3. BULGULAR.....	30
4. TARTIŞMA	37
5. SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR	44
7. ÖZET	50

8. ABSTRACT	51
9. ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1. Aziz Cosmas ve Aziz Damian'ın, bir kölenin bacağını, başka bir hastaya transplantasyonu resmedilmiş.(9)	2
Şekil 2. A. Her iki ekstremitesi kullanılmak üzere hazırlanmış verici Spraque Dawley sıçanı B. Sağ ekstremitesi transplantasyona hazırlanmış alıcı Wistar Albino sıçanı.	21
Şekil 3. a. Verici sıçan (spraque dawley) b-c. Alıcı sıçanlar(wistar albino).	23
Şekil 4. Transplantasyon işlem basamakları	24
Şekil 5. a-b. Transplantasyon sonrası ekstremitenin koruyucu kafes ile otofajiden korunması	24
Şekil 6. Restrainer yardımı ile sıçan kuyruk veni yoluyla kan örneklerinin toplanması.	26
Şekil 7. Spraque dawley ekstremitesi transplante edilmiş alıcı wistar albino sıçanı, transplantasyon sonrası görünümü.	26
Şekil 8. CRP nin günlere göre dağılımı	33
Şekil 9. SAA nın günlere göre dağılımı	34
Şekil 10. C5a nın günlere göre dağılımı	34
Şekil 11. IL-6 nın günlere göre dağılımı	35
Şekil 12. TNF- α nın günlere göre dağılımı	35
Şekil 13. IL-10 un günlere göre dağılımı	36
Şekil 14. IL-6, IL-10 ve C5a nın korelasyon analizi	36
Şekil 15. Transplantasyon sonrası oluşan lökosit ve sitokin cevabı.	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

IL-6	İnterlökin 6
IL-10	İnterlökin 10
IL-18	İnterlökin 18
Tnf α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
SAA	Serum Amiloid A
C5a	Kompleman 5a
CRP	C Reaktif Protein
NGAL	Nötrofil Gelatinazı İle İlişkili Lipokalin
S-NGAL	Nötrofil Gelatinazı İle İlişkili Lipokalin-Serum Fraksiyonu
U-NGAL	Nötrofil Gelatinazı İle İlişkili Lipokalin-Üriner Fraksiyonu
Csa	Siklosporin A
MMF	Mikofenolat Mofetil
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
ATG	Antitimosit Globulin
FK506	Takrolimus
MHC	Majör Histokompabilite Kompleksi
IFN Gama	Gama İnterferon
GVHD	Graft Versus Host Hastalığı
PGE2	Prostaglandin E2
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Uyarıcı Faktör
NK	Natural Killer
LPS	Lipopolisakkarit
TNFR	Tümör Nekrozis Faktör Alfa Reseptörü
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı

1. GİRİŞ

Kompozit doku allotransplantasyonu; deri, kemik, damar, sinir, kıkırdak gibi çeşitli dokular içeren anatomik yapıların transplantasyon işlemidir. Eylül 1998 de, Fransa'nın Lyon şehrinde ilk el allotransplantasyonunun gerçekleşmesiyle birlikte rekonstrüktif cerrahide kompozit doku allotransplantasyon dönemi başlamıştır(1). Bu tarihten başlayarak günümüze dek yüzden fazla kompozit doku allotransplantasyonu bildirilmiş olup, bunların içinde önkol, diz, abdominal duvar, dil, larinks ve parsiyel yüz gibi dokuların transplantasyonu bulunmaktadır.

Bir yapının rekonstrüksiyonunun en iyi yolu söz konusu dokunun benzeri ile onarımıdır(Gillies Prensibi). Modern immünsupresif protokollerin geliştirilmesi, kompozit doku allotransplantasyonlarının uzun dönem yaşamalarını mümkün kılarken, organ toksisiteleri, sekonder malignansiler ve enfeksiyonlar, uzun dönem kullanılan immünsupresiflerin yan etkileri arasında yer almaktadır(2-5). Kompozit doku allotransplantasyonunun rutin klinik uygulamaya geçmesindeki en büyük engel, alıcıların, hayatlarının devamı için vazgeçilmez olmayan bir transplantasyon için, hayat boyu immünsupresan ilaç alma zorunluluğudur. Her ne kadar geçtiğimiz yirmi yıl içinde immünsupresif ajanların, özgünlük ve etkinliklerinde büyük gelişmeler kaydedilmiş olsa da, bu ilaçların yan etkilerinden doğan problemler kullanımlarını kısıtlamaktadır. Erken dönemde meydana genel immun reaksiyonların çeşitli parametrelerle ölçülmesine ve morbiditesi minimal olan tedavi modalitelerinin geliştirilmesine fazlaca ihtiyaç vardır.

Allotransplantasyonda akut dönemde çeşitli parametreler bazında immünolojik değişimin belirlenmesi yaşamsal organların fonksiyonlarını korumak için son derece önemlidir.

Çalışmamızın amacı kompozit doku nakli alıcılarında, allogreft fonksiyonunun takibi, immün yükün oluşturduğu sistemik hasar ve akut rejeksiyon tanısında serum interlökin- 6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), interlökin-18 (IL-18), tümör nekroz fakör alfa (TNF- α), Serum Amiloid A (SAA), kompleman 5a (C5a), C-reaktif protein (CRP) ve neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) seviyelerinin kullanılabilirliğini değerlendirmektir.

Alloimmün reaksiyonların oluşumuna engel olmamak amacıyla çalışmaya dahil edilen sıçanlara immünsüpresyon uygulanmamıştır.

1.1. Genel Bilgiler

Kompozit doku transplantasyonu esnasında deri, kemik, kas, damar, sinir, kıkırdak gibi farklı anatomik yapıların transplantasyonu gerçekleştirilmektedir. Kompozit dokuların komponentlerinin her biri farklı düzeylerde antijeniteye sahiptirler, farklı karakteristik özellikler taşırlar ve dolayısıyla da her komponent alıcıda farklı şekil ve düzeyde rejeksiyonu tetikleyebilir. Bu özellik kompozit doku allotransplantasyonunu, homojen dokulardan oluşan organ transplantasyonlarından ayırır da oluşan immun reaksiyonlar her iki transplantasyon türünde de benzerdir(6, 7).

1.1.1 Kompozit Doku Allotransplantasyonunun Tarihçesi

Kompozit doku allotransplantasyonunun tarihçesi bir efsaneye göre milattan sonra dördüncü yüzyıla dayanmaktadır. Bu efsaneye göre Arabistan yarım adasında o yıllarda yaşayan Aziz Cosmas ve Aziz Damian ikiz kardeşler, bir hastanın gangren olan bacağına kesip, Etiyopyalı bir kölenin kadavrasından bacağına bu hastaya nakletmişlerdir (8). Bu efsane bize insanoğlunun kompozit doku allotransplantasyonunu gerçekleştirme arzusunun ez az on yedi asır öncesine dayandığını göstermektedir (Şekil-1).



Şekil 1. Aziz Cosmas ve Aziz Damian'ın, bir kölenin bacağına, başka bir hastaya transplantasyonu resmedilmiş.(9)

Kayıtlardaki ilk kompozit doku allotransplantasyonu klinik uygulaması 1964'de Ekvator'da gerçekleştirilmiştir. Travma sonrası elini kaybetmiş bir hastaya el transplantasyonu gerçekleştirilmiş ve böbrek transplantasyonlarında kullanılan protokol olan Azothioprine ve Hidrokortizon immüsupresif tedavisi uygulanmıştır. Allogreft post operatif ikinci haftasında akut rejeksiyona uğrayarak kaybedilmiştir.(8)

İlk trake allotransplantasyonu ise 1979'da Rose ve ark. Tarafından bildirilmiştir. Allogreft önce heterotopik olarak, alıcının sternokleidomastoid kasına sarılmış ve üç hafta sonra da yerine taşınmıştır. Dokuz haftalık takibinde rejeksiyon ya da herhangi bir immüsupresif tedaviden bahsedilmemiş olup, uzun dönem sonucu hakkında da mevcut bir bilgi günümüze ulaşmamıştır.(10)

1993 yılında Levashov ve ark. ikinci trake allotransplantasyonunu bildirmişlerdir. 24 yaşındaki bir alıcıya, omentum ile sarılı bir şekilde trake allotransplantasyonu gerçekleştirilmiş ve alıcıya siklosporin A (CsA) immüsupresyonu uygulanmıştır. Erken dönemdeki bir akut rejeksiyon atağının başarılı bir şekilde, CsA dozunu artırarak tedavi edilmesine rağmen, hastanın geri kalan ömrü boyunca trakesine stent uygulanması gerekmiştir.(11)

Klepetko ve ark. 2004 yılında abdominal kaviteye trake heterotopik allotransplantasyonu gerçekleştirmiş olup, allogrefti alıcının omentumuna sarmışlardır. Alıcıya CsA, Mycophenolate mofetil (MMF) ve kortikosteroidden oluşan üçlü immüsupresif protokol uygulanmıştır. Transplante edilen trakenin kullanılmasına daha sonra ihtiyaç kalmamış ve transplantasyondan sekiz ay sonra geri çıkartılmıştır. Yapılan incelemede trakenin çok güzel bir şekilde revaskülarize olduğu, kıkırdak yapının canlı olduğu ve tamamen respiratuvar epitelle kaplandığı görülmüştür.(12)

1997 yılında Hofmann ve ark. kadavradan diz allotransplantasyonu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.(13) 1998 yılında ise toplam dört hastada diz allotransplantasyon serilerini yayınlamışlardır. Alıcı ve donörler kan ABO grupları uyumlu ama insan lökosit antijenleri (HLA) uyumsuz olarak bildirilmiştir. İmmüsupresif tedavi, CsA, Azothioprine, Anti-timosit globülin (ATG) ve Metilprednizolondan oluşmuştur.(14)

İlk larinks allotransplantasyonu ise Strome tarafından 1998 yılında gerçekleştirilmiş olup, Bircholl tarafından bildirilmiştir.(15) Allogreft, larinks, tiroid, paratiroidler ve farenksin % 70'inden oluşmaktaydı. İndüksiyon tedavisi monoklonal antikor OKT-3, kortikosteroidler, MMF ve CsA'den oluşurken, idame tedavisinde MMF, Takrolimus (FK-506) ve steroidler kullanılmıştır. Dugue ve ark. yakın zamanda 13 hastadan oluşan larinks allotransplantasyon serilerini yayınlamışlardır.(15)

Guimberteau ve ark. 1988 ve 1989 yıllarında iki hastada başarılı dijital fleksor tendon kılıfı allotransplantasyonu gerçekleştirdiklerini yayınlamışlardır. Alıcılar, transplantasyon sonrasında altı ay süre ile CsA mono-terapisi almışlardır ve uzun dönem takiplerinde rejeksiyon bildirilmemiştir.(16)

Eylül 1998'de Fransa'nın Lyon şehrinde ilk el allotransplantasyonunun gerçekleştirildiğinin bildirilmesiyle birlikte kompozit doku allotransplantasyonunda yeni bir dönem başlamıştır.(1)

Mackinnon ve ark. 2001 yılında, yedi hastadan oluşan, periferik sinir allotransplantasyon serisini yayınlamıştır. Bu seri günümüzde de uzun dönem takibe sahip en büyük seri olma özelliğini devam ettirmektedir.(17)

Birchall ve ark. 2003 yılında dil kanseri bulunan bir hastaya, rezeksiyon sonrasında dil allotransplantasyonu gerçekleştirmişlerdir. Transplantasyon sonrası sekizinci ayda hastada rejeksiyon belirtisi görülmemiş olup, tükürüğünü ve bazı sıvıları yutabilir hale gelmiştir, ama tat duyusunu geri kazanamamıştır.(18)

Levi ve ark. 2003 yılında sekiz hastaya kadavradan abdominal duvar transplantasyonu gerçekleştirmişlerdir. Allogreftler abdominal duvar ile birlikte ince bağırsak segmenti veya çeşitli organları içermekteydi. Alıcılarda Alemtuzumab veya Daclizumab indüksiyon tedavisi için kullanılmış olup idame tedavisi için de Takrolimus kullanılmıştır. Kortikosteroidlere sadece rejeksiyon ataklarında başvurulmuştur.(19)

Kasım 2005'de, Fransa'nın Lyon şehrinde Dubernard ve Devauchelle tarafından ilk parsiyel yüz allotransplantasyonu gerçekleştirilmiştir.(20) Bu operasyon estetik görünüm, duyuların geri kazanılması ve rejeksiyon ataklarının

tedavisi yönünden başarılı olarak kabul edilse de, beraberinde medikal ve etik tartışmaların başlamasına yol açmıştır. (21) (21)

1.1.2 Kompozit Doku Allotransplantasyonunda Allogreft Kabulü Ve Rejeksiyonu

Allotransplantasyonlardaki en büyük problem, donör ve alıcı arasındaki majör histokompatibilite kompleks (MHC) uyumsuzluğuna bağlı olarak ortaya çıkan immünolojik tepkidir. Allogreftin MHC antijenlerindeki kodlanış şekli, onun kimliğini temsil eder ve dokunun kabulünü ya da rejeksiyonunu belirler. HLA (Human leukocyte antigen) sistemi ise MHC antijenlerinin insan hücrelerindeki şeklidir ve transplantasyon sonrasında T-hücrelerinin aktivasyonunu tetiklerler. İki tip MHC antijenleri bulunmaktadır: “MHC sınıf 1” antijenleri, tüm çekirdekli hücrelerde bulunurlar. “MHC sınıf 2” antijenleri ise sadece antijen sunum görevi bulunan B-lenfositleri, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, endotel hücreleri ve aktive T-hücrelerinin membran yüzeylerinde bulunurlar. Transplante edilen dokulardaki MHC antijenleri direk veya indirek yolla immünolojik tepkiyi tetikleyebilirler. Direk yolda, alıcının T-hücreleri donör antijen sunum hücreleri üzerindeki MHC sınıf 2 antijenlerini tanır ve inflamatuvar reaksiyonu başlatırlar. İndirek yolda ise transplant hücreleri üzerindeki MHC sınıf 1 antijenleri, bakteri veya virüs antijenlerine olan aynı biçimde, alıcının antijen sunum yapan hücreleri tarafından tanınırlar ve alıcıdaki inflamatuvar reaksiyon bu şekilde başlar.(22)

Kompozit doku allogrefti yapısındaki değişik komponentlere göre inflamatuvar reaksiyon da değişkenlik gösterir. Tüm dokular içinde deri en yüksek antijeniteye sahiptir. Bunu sırasıyla kas, kemik, sinir, tendon ve kan damarları izlemektedir.(23-26)

Allogreft rejeksiyonunun erken dönemde klinik belirtileri eritem ve ödemdir. İmmüsupresiflerin dozlarının uygun şekilde yeniden ayarlanmasıyla bu belirtiler geri dönebilmektedir.(27) Kompozit doku allogreftlerinin klinik izleminde rejeksiyonun kesin olarak tespiti için en güvenilir yöntem allogreftten gerçekleştirilen cilt biyopsileridir.(28)

Transplantasyon sonrasında klinik rejeksiyon üç şekilde görülmektedir;

Hiperakut/akselere Rejeksiyon: Bu rejeksiyon şekli, allogreftin perfüzyonundan sonra dakikalar veya saatler içerisinde oluşmaktadır. Alıcının kan dolaşımında, transplantasyon öncesinde oluşmuş olan antikorlar tarafından tetiklenmektedir. Antikorların allogreft antijenlerine bağlanması sonrası oluşan immünolojik kompleksler, hiperakut rejeksiyon esnasında oluşan hasarın büyük kısmını oluştururlar. Bu reaksiyon, allogreftin arteriol ve venüllerinde endotel hasarı oluşturup, allogreftin kaybına yol açarlar. Hiperakut rejeksiyon geri dönüşsüzdür, bu nedenle de transplantasyon öncesi yapılan hazırlıklarda, bu antikorların taranması gereklidir. Transplantasyondan sonra yirmi dört saat ile beş gün arasındaki sürede ise rejeksiyonun akselere fazı görülür, bu esnada vasküler tromboz, lökosit infiltrasyonları ve proinflammatuar mediatörlerin dolaşıma salınması gerçekleşir.(29)

Akut Rejeksiyon: Transplantasyon sonrasında bir kaç gün ile bir kaç ay arasında bir sürede oluşur. Günümüze kadar klinik uygulamada gerçekleştirilmiş tüm kompozit doku allotransplantasyonları, en az bir kez akut rejeksiyon atağı geçirmişlerdir. T-hücrelerinden yoksun deney hayvanlarında akut rejeksiyonun görülmemesi, bu rejeksiyon tipinin çoğunlukla T-hücreleri aracılığıyla gerçekleştiğini ihtimalini güçlendirmektedir.(30)

Akut rejeksiyon esnasında fokal nekroz ve ekstrasvasküler sızıntıya sekonder olarak vasküler tıkanmalar oluşur. Perivasküler inflammatuar infiltratlar allogreftte birikirler. Çoğunluğu transplantasyon sonrasında ilk 3 ila 6 ay süresinde görülür ve genellikle immünsupresif ilaçların uygun doz ayarlamalarıyla geri dönüşebilmektedir.(27, 28)

Kronik Rejeksiyon: Transplantasyondan sonra aylar ve hatta yıllar sonra görülebilmektedir.(29) Kronik rejeksiyonun nedeni tam olarak anlaşılamamakla birlikte, akut rejeksiyon ataklarının sayısı, alıcı sensitizasyonu, yetersiz MHC uyumu, yetersiz immünsupresyon, transplantta iskemiye bağlı doku hasarı, alıcı ve donör arasındaki yaş farkı, sitomegalovirüs enfeksiyonu, alıcının sigara kullanması, hipertansiyon, hiperlipidemi gibi bir çok faktörün rolü olduğu düşünülmektedir.(29) Kronik rejeksiyon geri dönüşsüzdür. Lümen obstrüksiyonu, arterioskleroz ve progresif fibrozis sonrasında allogreft kaybedilir.(31)

1.1.3 Kompozit Doku Allotransplantasyonunda Donör-Alıcı Eşleşmesi

Organ veya kompozit doku allotransplantasyonlarında hiperakut rejeksiyonu önlemek için donör ve alıcının aynı kan grubundan olması gerekir. İdeal olarak, donör ve alıcının sitomegalovirüs enfeksiyonu yönünden de aynı durumda olması beklenir. Organ allotransplantasyonlarından elde edilen tecrübeler, MHC uyumsuzluğunun miktarıyla rejeksiyon ataklarının sayısının doğru orantılı olarak arttırdığını gösterse de, kompozit doku allotransplantasyonlarındaki etkisi henüz gösterilememiştir.

Kompozit doku allotransplantasyonlarını organ transplantasyonlarından ayıran bir diğer husus da, kozmetik uyum gerektirmeleridir. El, yüz ve ayak gibi yapıların görülebilir ve estetik yönden önemli olmaları nedeni ile cinsiyet, etnik köken ve yaş gibi unsurlar önem kazanmaktadır.(32)

1.1.4 Kompozit Doku Allotransplantasyonunda İmmüsupresif Ajanlar

Kompozit doku allotransplantasyonlarında kullanılan immüsupresif protokollerin çoğunluğu, böbrek allotransplantasyonlarında kullanılan standart protokoller baz alınarak oluşturulmuştur. Bu protokollerde, steroidler, kalsinörin inhibitörleri (siklosporin A, takrolimus), anti-proliferatif ajanlar (mycophenolate mofetil, azothioprine), poliklonal antikorlar anti-lenfosit globülin ve anti-timosit globülin ve monoklonal antikorlar (anti-CD25, anti-CD23) kullanılmaktadır.

Transplantasyon sonrasında immüsupresif ajanlar üç fazda kullanılırlar:

- a) İndüksiyon Tedavisi,
- b) İdame Tedavisi,
- c) Rejeksiyon Tedavisi

İndüksiyon tedavisinin amacı, akut rejeksiyon ataklarını azaltmak amacıyla immün sistemi baskılamaktır. Anti-thymocyte globülin (ATG), anti-CD3 antikorları (OKT-3) ve interlökin-2 (IL-2) reseptör antikorları (Baclizumab, Daclizumab,

Basiliximab) gibi monoklonal antikorlar günümüzde indüksiyon tedavisi için kullanılan ajanlardır.(4)

İdame tedavisi, immün sistemin transplante edilen dokuyu tanımasını ve reddetmesini önleyen ajanlardan oluşur. Siklosporin-A (CsA) ve takrolimus (FK-506) gibi kalsinörin inhibitörleri, T-hücrelerinden IL-2 salınımını engelleyerek, T-hücre aktivasyonunu engellerler. Mycophenolate mofetil (MMF), rapamycin gibi yeni geliştirilen kalsineurin inhibitörleri daha selektif bir şekilde T-hücrelerini baskılamakta, allograft ömrünü uzatmakta ve daha az sistemik toksisiteye neden olmaktadır.(4)

Kortikosteroidler transplantasyonlarda en sık kullanılan ajanlardır. Prednizolon prototipik ajandır ve majör endojen kortizolun analogudur, ama kortizolden dört kat fazla etkilidir. Steroid hormon-reseptör kompleksleri, DNA'ya bağlanarak protein sentezini etkilerler. Lenfosit ve makrofajlardan IL-1, IL-6, interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) salınımını önlerler. IL-2 sekresyonu ve reseptörüne bağlanmasını da aynı şekilde engellemektedirler. Ayrıca makrofaj aktivasyon faktörü ve prostoglandin sentezini de baskılamaktadırlar. Daha çok T-hücrelerinin etkilendiği lenfositopeniye neden olurlar. Günümüzde diğer idame ilaçlarıyla kombine bir şekilde kullanıldıkları için steroid dozları çok azaltılmıştır. Akut rejeksiyon dönemlerinde ise kısa süreli olarak yüksek dozlar kullanılmaktadır.(4)

Siklosporin A'nın (CsA) 1970 yılında Borel tarafından bulunmasından sonra organ transplantasyonunda yeni bir dönem başlamıştır. Önceleri organ transplantasyonlarında kullanılmış olup, ilk olarak 1982 yılında kompozit doku allotransplantasyonunda kullanılmıştır.(3) O zamana kadar kullanılmış olan diğer ilaçlarla kıyaslandığında çok daha etkili bir ajandır ve allograft ömrü öncesine kıyasla çok uzamıştır. CsA, kalsinörin ve sonrasında da proinflammatuvar bir sitokin olan IL-2 prodüksiyonunu engelleyerek immün sistemi baskılamaktadır. (33)

1987 yılında bulunan Takrolimus (FK-506, Prograf ®) diğer bir kalsinörin inhibitörüdür. İlk olarak organ transplantasyonlarında etkinliği gösterilmiş olup, daha sonra el transplantasyonunda(1), abdominal duvar transplantasyonunda(19) ve parsiyel yüz transplantasyonunda kullanılmıştır.(20) Takrolimusun aksenal

rejenerasyonu da hızlandırdığı gösterilmiştir ve bu özelliği el transplantasyonlarında daha başarılı sonuçlar elde edilmesine neden olmuştur.(34)

Mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept ®) de ilk olarak 1990 yılında organ transplantasyonlarının indüksiyon ve akut rejeksiyon tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Protein sentezini, T ve B lenfosit proliferasyonunu engellemektedir. Ayrıca aktive olmuş T-hücrelerinin apoptozuna neden olmakta ve antikor oluşumunu da azaltmaktadır. MMF antimetabolit grubunda yer almaktadır ve Azothioprine'nin yerini almıştır. Kompozit doku allotransplantasyonlarında ilk kullanımı ise 1993 yılında bildirilmiştir.(35)

Rapamycin (Sirolimus) böbrek transplantasyonlarının akut rejeksiyon ataklarını önlemede kullanılan bir ajandır. IL-2 reseptörüne bağlanarak, T-hücresi aktivasyon ve proliferasyonunu engelleyerek etki göstermektedir. Ayrıca B-hücrelerinin sitokinlere bağımlı olan diferensiyasyonlarını önleyerek antikor üreten hücrelere dönüşümelerini de engellemektedir. Organ toksisitesine neden olmaması ve diğer ajanlarla sinerjistik olarak kullanılabilmesi nedeniyle transplantasyon protokollerinde sıklıkla kullanılmaktadır.(36, 37)

Transplantasyondan sonra indüksiyon tedavisinde çeşitli antikorlar da kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan poliklonal antikorlar anti-lenfosit globülin (ALG) ve anti-timosit globülin (ATG)'dir. Etkinliklerinin ve spesifisitelerinin artırılması amacıyla daha sonra anti-CD23 ve anti-CD25 monoklonal antikorlar üretilmiştir.

Günümüzde kullanılan immünsupresanlar ve etki mekanizmaları **Tablo-1** de özetlenmiştir.

Tablo 1. Günümüzde kullanılan immünsupresanlar ve etki mekanizmaları.

İmmünsupresan		Etki Mekanizması
Kortikosteroidler	Prednizolon	Sitokinlerin kodlanmasını sağlayan genleri inhibe ederek hücreyel ve humöral immünüteyi baskılar
	Metilprednizolon	
Kalsinörin inhibitörleri	Siklosporin-A	IL-2 transkripsiyonu için gerekli olan Kalsinörin'i bloke eder ve IL-2 prodüksiyonu baskılanır
	FK-506 (Takrolimus)	
Anti-proliferatif ajanlar	Azathioprine	Pürin sentezini bloke ederek DNA sentezini engellerler.T-lenfositlerin klonal çoğalmasını ve B-lenfositlerin antikor salınımını önlerler
	Mycophenolate mofetil	
Sitokin bloke edici ajanlar	Rapamycin (Sirolimus)	Lökosit hücre sikluslarının G1 fazını etkiler, IL-2, IL-4, IL-6 nın T-hücrelerini aktivasyonunu engeller, B-hücrelerinin sitokinlere bağımlı olan antikor prodüksiyonunu engeller
Poli-klonal antikorlar	Anti-timosit globulin (ATG)	Matüre T-hücrelerini non-selektif şekilde yok ederler
	Anti-lenfosit globulin (ALG)	
Mono-klonal antikorlar	Anti-CD3	Tüm T-hücrelerini hedef alarak non-selektif şekilde T-hücrelerini yok eder
	Campath-H1 (anti-CD52 mAb)	Tüm T-hücrelerini, B-hücrelerini ve monositleri hedef yok eder
	Dacilizumab, Basilliximab (anti-CD25 mAb)	IL-2 reseptörüne bağlanarak IL-2 salınımını engeller

1.1.5 İmmüsupresif İlaçların Uzun Dönem Kullanımında Ortaya Çıkan Yan Etkileri

İmmüsupresif ilaçların yan etkileri üç kategoriye ayrılabilir;

Fırsatçı Enfeksiyonlar: Kütanöz, fungal, tinea enfeksiyonları, sitomegalo virüs ve herpes enfeksiyonları ve reaktivasyonları, Ebsteinbar virüs ve poliyoma virüs enfeksiyonları görülebilmektedir.

Metabolik Düzensizlikler: Edinsel diyabet ve Cushing Sendromu görülebilmektedir.

Malignansiler: Bazal hücreli karsinom, skuamoz hücreli karsinom ve B-hücreli lenfoproliferatif hastalıklar ortaya çıkabilmektedir.

Bu yan etkiler çoğunlukla fiziksel, estetik ve fonksiyonel özelliklerin restorasyonu için gerçekleştirilen, yaşamın devamı için vazgeçilmez olmayan ama yaşam kalitesini ciddi ölçüde arttıran kompozit doku allotransplantasyonlarının klinikte rutin uygulamaya geçmesine engel oluşturmaktadır.

Sıklıkla kullanılan immüsupresan ilaçların yan etkilerine örnek vermek gerekirse;

CsA nefrotoksik olup, hipertansiyon, hiperglisemi, hiperlipidemi ve gastrointestinal komplikasyonlara yol açar. Takrolimus nefrotoksik olup, diyabete neden olmaktadır. MMF gastrointestinal komplikasyonlara ve lökopeniye yol açmaktadır. Steroidler yara iyileşmesini geciktirirler, diyabet ve gastrointestinal yan etkilere sebep olurlar.

Tüm transplant alıcıların %80'inde fırsatçı enfeksiyonlar (%50 bakteriyel, %30 viral, %20 fungal) görülmektedir. Bunun yanında hastaların %10'unda karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler karsinoma yol açabilen Hepatit B ve C enfeksiyonları görülür.

İmmüsupresif ajanların en ciddi yan etkisi malignansilere neden olmalarıdır ve görülme sıklığı çeşitli merkezlerde %4 ila %20 arasında değişmektedir. Malignansilerin %80'i cilt kanserleridir. Post-transplant lenfoproliferatif hastalık, immüsupresanların ölümcül komplikasyonları arasında sayılmakta olup, B hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile karakterizedir.(32)

1.1.6 Kompozit Doku Allotransplantasyonunda “Graft Versus Host Hastalığı”

İmmün kompetan donör lökositlerinin, allotransplantasyon sonrasında, alıcı hücrelerini yabancı olarak algılayıp, onlara saldırmasına “Graft Versus Host Hastalığı” (GVHD) denilir.

El, ayak gibi kompozit dokuların allotransplantasyonu esnasında vaskülarize kemik iliği nakli de gerçekleşmektedir. İmmün kompetan donör lökositlerinin, kemik iliği veya lenf nodları ile birlikte taşınması GVHD oluşturma potansiyeli taşımaktadır.

GVHD, kompozit doku allotransplantasyon deneysel modellerinde oluşturulmuştur, ama klinik allotransplantasyonlarda hiçbir alıcı da henüz bildirilmemiştir.(38, 39)

1.1.7 İnterlöklin-6

IL-6 pleotropik bir sitokin olup immün sistem dışında çoğu hücrede ve immün regülasyonda anahtar bir rol oynamaktadır.

Hepatositler ve B lenfositleri üzerinde önemli etkilere sahip olan IL-6, akut faz yanıtında rol alan plazma proteininin hepatositler tarafından sentezini indüklenmektedir.(40) İnsan IL-6’sı ilk kez, fitohemaglutinin veya antijen ile uyarılmış periferik mononükleer hücrelerin kültür süpernatantlarında B hücre farklılaşma faktörü olarak bulunmuştur. 1985 yılında insan IL-6’sı saflaştırılmış ve 1986’da IL-6 DNA’sının aminoasid dizisi ortaya konmuştur. T ve B hücre fonksiyonlarının ayarlanması, Ig sekresyonu, akut faz inflamasyon reaksiyonları, hematopoez gibi birçok biyolojik etkisi vardır. IL-6 ve reseptörü kromozomal yerleşimi 7p21-14 (IL-6) genleriyle kodlanmaktadır. IL-6; T ve B lenfositleri, monositler/makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler, epitelyal hücreler, mast hücreleri, nöronal hücreler, astrositler, mikrogliya, mezengial hücreler, osteoblastlar, epidermal langerhans hücreleri, dentritik hücreler ve keratinositler gibi çok geniş bir hücre grubu tarafından üretilmektedir.(41, 42) Hedef hücreye bağlı olarak büyümeyi uyaran, büyümeyi inhibe eden ve farklılaşmayı sağlayan etkinliğe sahiptir. IL-6 üretimi sitokinler arası zengin iletişim ağı ile düzenlenmektedir.(43) IL-1 in,

glioblastları ya da astrositleri uyarılması ile IL-6 mRNA'sının ekspresyonu indüklenmektedir. Bu durum IL-6'nın sinir hücreleri üzerine etkili olabileceğini düşündürmektedir.(43, 44)

IL-6'nın etkileri sınıflandırılırsa:

1. IL-6, T ve B lenfosit gelişimi ve farklılaşmasını uyarak antikor üretimini artırır.
2. Doğal öldürücü (Naturel killer-NK) hücre etkinliğini artırır.
3. IL-6, çeşitli AFP'lerinin (CRP, C1 esterase inhibitör, C3, α 1-antitripsin, α -asit glikoprotein, fibrinojen ve haptoglobulin gibi) üretimini artırır.
4. IL-6, prostaglandin E_2 (PGE₂)'ye bağımlı bir mekanizma yoluyla ateşe neden olur ve hipotalamus-hipofiz-adrenal aksını etkinleştirir. Hipofiz bezinden ACTH ve böbreküstü bezinden glukokortikosteroidlerin salınmasına neden olur,
5. IL-6'nın B lenfositlerden Ig üretimini artırır,
6. Granülosit-makrofaj uyarıcı faktör (GM-CSF) ile sinerjik etki yaparak hematopoietik progenitor hücrelerin granülositlere dönüşümünde önemli bir rol üstlenir,
7. IL-2 üretimi ve IL-2 reseptörlerinin etkinliğini arttırdığı kaydedilmektedir.
8. IL-6, nötrofil ve makrofajların olgunlaşmasını ve sitotoksik T lenfositler ile NK hücrelerin farklılaşmasını sağlar.
9. Nöron farklılaşması ve gelişiminde önemli bir rol üstlenir. Beyin serotonin ve triptofan metabolizmasını arttırdığı bildirilmiştir.
10. IL-6, T lenfosit çoğalması, IL-2 üretimi ve sitotoksik T lenfosit farklılaşmasında IL-1 ile sitotoksik T lenfosit farklılaşmasında IL-2 ile ve megakaryosit kolonilerinin sayısını artırmada ise IL-3 ile sinerjik etki gösterir.
11. IL-6'nın tek başına periferik kan trombosit sayısını arttırdığı da bildirilmektedir.(45)

IL-6'nın, immün ve akut faz cevabında, hematopoezde, nöronların fonksiyonunda ve gelişmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Hem nöronlar hem de mikroglialar tarafından salgılanır ve SSS'de nörotrofik bir faktör olarak görev alır. Örneğin IL-6 T-hücrelerini IL-2 üretmesi için indükler ve IL-2R'i baskılar.(46) İnflamasyon markırlarından olan IL-6 serum seviyesinin, böbrek nakli hastalarında uzun dönem greft sağkalımı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.(47) Böbrek nakli hastalarının, transplantasyon öncesi dönemde serum IL-6 seviyesi yüksek bulunurken, transplantasyon sonrası greft fonksiyonunun stabil olduğu dönemde serum IL-6 seviyesinin düşük olduğu bildirilmiştir. Akut rejeksiyon ve kronik rejeksiyon atağında tekrar yükseldiği konusunda da çalışmalar vardır.(48-50)

1.1.8 İnterlökin-10

IL-10 un majör fonksiyonu antiinflamatuvar ve immünsüpresif etkidir. IL-10 reseptörü makrofaj, mast hücresi ve diğer non-hematopoietik hücrelerde ipopolisakkarit (LPS) indüksiyonu ile üretilmektedir.

IL-10, güçlü bir şekilde IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF ve diğer sitokinlerin üretimini inhibe etmektedir. Makrofajların antijen sunma fonksiyonlarını inhibe eder ve MHC sınıf II, adezyon molekülleri ve ko-stimulan moleküllerin üretimini baskılar.

IL-10 aktive makrofajlardan, keratinositlerden ve bronşial epitel hücrelerinden salgılanmaktadır. LPS ve TNF, IL-10 üretiminin stimülatörleridir. IL-10 TNF ve interferon gama (IFN- γ) sentezini baskılayıcı özelliklere sahiptir. IL-10 septik şok, diğer inflamatuvar durumlar ve immünolojik olaylarda kanda yükselmektedir. IL-10 antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı çeşitli otoimmün hastalıkların tedavisinde deneysel modellerde kullanılmaktadır. IL-10 seviyesi sistemik lupus eritematosusta antikör seviyesi ile korele şekilde artmaktadır.(51)

1.1.9 İnterlökin-18

IL-18 yeni tanımlanmış IL-1 ailesinden proinflamatuvar bir sitokindir(52). İlk kez fare karaciğerinde sırasıyla P. acnes bakterisi ve lipopolisakkarit maruziyetinden sonra saptanmıştır(53). Başlangıçta interferon gama (IFN- γ) indükleyici faktör olarak

adlandırılan IL-18, IFN- γ 'nın güçlü bir uyarıcısıdır ve konak savunmasında önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca hücre içinde yaşayan mikroorganizmalara karşı gelişen immün yanıtta da kritik bir role sahiptir. IL-18 konak immün yanıtının oluşması ve düzenlenmesinde önemli roller üstlenmektedir. Bu nedenle de IL-18'in pek çok inflamatuvar ve otoimmün hastalığın patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir(52, 53). IL-18, inaktif öncü molekül olan prointerlökin-18'den intrasellüler sistein proteaz (ICE) ya da daha çok bilinen adıyla kaspaz-1 enzimi aracılığıyla aktif formuna dönüşür. Aynı enzim IL-1 β 'nın aktif formuna dönüştürülmesi işlemini de meydana getirir(52). Renal hasarlanmada proksimal tübül hücrelerinden salınır. Ancak interkaler hücreler ve iskemik hasarlanma sonrasında makrofajlardan da salındığına dair kanıtlar mevcuttur(54). IL-18 son zamanlarda hem tanısal bir araç hem de tedavi edici bir silah olarak kullanılmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde hedefe yönelik tedavinin umut vaat eden faktörlerinden biridir(52, 53). IL-18, böbreği tutan pek çok hastalıkta örneğin iskemi/reperfüzyon hasarı, allograft rejeksiyonu, otoimmün hastalıklar, enfeksiyon, nefrotik sendrom, ilaç ilişkili nefropati ve malignenside aktif rol oynamaktadır(52, 53). Böbrek nakli yapılacak hastalarda serum IL-18 seviyesi, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Böbrek nakli sonrası serum IL-18 seviyesinin azalmaya başladığı görülmüştür. Bununla beraber hastalardan akut rejeksiyon geçirenlerde, IL-18 serum seviyesinin yüksek olduğu saptanmıştır(55).

1.1.10 C-Reaktif Protein

CRP 5 çeşit alt birimden oluşan polimerik yapıda bir proteindir. İnsan CRP'si fosfokoline bağlanma spesifitesi olan, Ca⁺² bağlayıcı bir akut faz protein (AFP)'inidir.(56) Hastaların serumunda bulunan Streptokok Pnömonia hücre duvarındaki C-polisakkaridine bağlanma özelliği vardır. Protein elektroforezinde yavaş γ ile orta β arasında bir bölgeye göç etmektedir. Sentez yeri karaciğerdir. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar etkilere sahip olan bir AFP'inidir.(57) CRP sadece çeşitli bakteri,mantar, protozaal parazitlerde bulunan polisakkaride değil, kalsiyum iyonlarının varlığında fosforilkolin, lesitin gibi fosfatidilkolinler ve nükleik asitler gibi polianyonlara da bağlanabilmektedir. Bu şekilde bazı yabancı patojenleri ve hasar gören hücredeki fosfolipid bileşenlerini tanıyabilmektedir.(58) CRP

fosfokolin içeren polisakkaridlere de bağlanabilmektedir. CRP polivalan bir ligand ile kompleksleştigizaman, C1q ile başlayan klasik kompleman yolunu uyarmaktadır.(56) Son yıllarda yapılan çalışmalar, kompleman sisteminde yer alan faktör H'nin CRP'ye bağlandığını ve bu bağlanmanın alternatif yolu ve C5 konvertazları güçlendirdiğini göstermektedir.(59) CRP antikorlar gibi opsonizasyonu, fagositozu, inflamatuvar tepkimenin bir yanıtıolarak invaze olan hücrelerin lizisini başlatabilmektedir.(56) Monositlerde ise inflamatuvar sitokinleri ve koagülasyon mekanizmasının başlamasında önemli bir role sahip doku faktörünü indüklemektedir.(56, 58, 60, 61)

Son olarak CRP'nin yüksek afinite ile Fc reseptörüne bağlandığı gösterilmiştir. Bu (56)bağlanmanın CRP bağımlı fagositozda rol aldığı sanılmaktadır. CRP'nin temel işlevi, muhtemelen hasarlı dokudan açığa çıkan, potansiyel olarak toksik, otojen substansları tanımak, onlara bağlanmak, zehirsizleştirmek ya da kandan uzaklaştırmaktır. CRP opsonizasyon işlemi sırasında metabolize olmaktadır. CRP'nin antiinflamatuvar etkileri, nötrofillerin endotel hücrelerine adezyonunu ve nötrofillerde süperoksid oluşumunu engellemesi, mononükleer hücrelerde IL-1 reseptör antagonistinin sentezini uyarması gibi mekanizmalarla açıklanmaktadır .(62)

1.1.11 Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

TNF- α , ilk kez 1975 yılında Carswell ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İlk tanımlandığı dönemde endotoksinler ile indüklenen ve sarkomlarda hemorojik nekroza neden olan bir glikoprotein olarak tariflenen TNF- α 'nın zaman içinde birçok inflamatuvar, enfeksiyöz ve malign olayda rol oynadığı tespit edilmiştir.(63) TNF- α , çok sayıda sitokin tarafından oluşturulan peptid mediyatör ailesinin bir üyesidir. Bu aileye ait diğer üyeler arasında lenfotoksin- α , Fas ligand ve CD40 ligand yer alır. TNF- α doğal ve kazanılmış immünite, hücre proliferasyonu ve apoptoziste rol oynayan ve önemli proinflamatuvar özelliklere sahip olan bir sitokindir. Bu sitokin başta makrofaj ve monositler olmak üzere, T hücreleri, düz kaslar, adipositler ve fibroblastlar tarafından üretilmektedir .(63) TNF- α hücre içinde N terminali olan tip II transmembranöz bir proteindir. Başlangıçta plazma membranında yerleşen 26 kDa molekül ağırlığında pro- TNF- α 'nin hücre dışı domaini TNF- α converting enzyme (TACE, ADAM- 17) tarafından kesilir ve 17 kDa

molekül ağırlığında solubl form oluşur. Biyolojik aktiviteleri birbirlerinden tamamen farklı olan bu iki tip TNF- α 'nın trimerik formları aktiftir .(64) TNF- α biyolojik aktivitesini farklı 2 reseptöre bağlanarak gerçekleştirir. Bu reseptörler tip 1 TNF reseptörü (TNFR I) ve tip 2 TNF reseptörüdür (TNFR II). TNFR I eritrositler dışında hemen her hücre tipinde mevcuttur ve ligandı solubl TNF- α 'dır. TNFR II ise asıl olarak hematopoetik hücrelerde eksprese olur ve ligandı membranabağı TNF- α 'dır. TNF reseptörlerinin ekspresyonları farklı hücre tiplerinde ve normal yada hastalıklı dokularda farklılık göstermektedir. TNF reseptörleri hücre membranına bağı halde bulunabileceğı gibi TACE tarafından kesilmiş solubl halde de bulunabilir. Solubl TNF reseptörü bir TNF- α bağlayıcısı gibi davranır ve TNF- α 'ya bağlanıp onun biyolojik aktivitesini inhibe etmek için hücre yüzey molekülü ile yarışır. Bu etkisinin tersine solubl-TNF reseptörü ayrıca timerik TNF- α 'ya bağlanıp onu stabilize eder. Böylece hem TNF- α 'nın yarılanma ömrünü uzatır hem de TNF- α 'nın yavaş salınımını sağılayan bir kaynak gibi davranır. Sonuç olarak bir hücrede TNF- α ile uyarılmayı takiben ortaya çıkan net sonuç bu iki reseptörün birbiri ile iletişimi sonucu belirlenir .(64)

TNF- α , proinflamatuvar ve programlı hücre ölümü yollarını TNFR I aracılığı ile gerçekleştirirken doku tamiri ve anjiyogenez fonksiyonunu TNFR II aracılığı ile yapmaktadır.(63) Sağlıklı kişilerin serum ve dokularında TNF- α ekspresyonu tespit edilememektedir. Ancak organizma inflamatuvar ya da enfeksiyöz bir uyarı ile karşılaştığında TNF- α üretimi gerçekleşmektedir. TNF- α 'nın majör biyolojik rolü bakteriyel, viral ya da paraziter enfeksiyonlara karşı organizmayı savunmaktır. Adaptif immünitede TNF- α ve TNFR I önemli rol oynar. Bunlar organizmanın patojene maksimum yanıt vermesini sağılar. TNFR I, T hücre aktivasyonunda bir kostimülatördür ve aktif T hücreleri tarafından eksprese edilir. TNF- α 'nın en önemli fonksiyonu ise doğal immün sistem tarafından gerçekleştirilen inflamatuvar reaksiyonu başlatmasıdır.(65) Doğal immün sistemde bakteriyel patojenler toll- like reseptörler ve NF κ B aracılığı ile TNF- α üretimini stimüle eder. Üretimi artan TNF- α hem kemokin, sitokin ve endotel adezyon moleküllerini etkileyerek nötrofil, makrofaj ve lenfositlerin aktivasyonve göçünü sağılar hem de NF κ B'yi aktive ederek kendisinin ve granülosit-makrofaj uyarıcı faktör (GM-CSF), IL-8 gibi sitokinlerin üretimini artırmak suretiyle inflamatuvar kaskadı tetikler. Etkin ve kontrollü bir inflamatuvar yanıt için TNF α 'nın doğru yerde, doğru zamanda ve

uygun miktarda üretilmesi gerekmektedir. Organizmada TNF- α üretimi farklı zamanlarda farklı hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir. Örneğin, lipopolisakkarit(LPS) ile uyarılmayı takiben asıl olarak monosit ve makrofajlar, bakteriyel yükün fazla olduğu durumlarda T hücreleri ve erken alerjik yanıtta mast hücreleri TNF- α sentezlemektedir .(66) Uygunsuz ya da artmış TNF- α üretimi organizmaya zarar verebilmektedir. Kanseri, kronik enfeksiyon ve kronik inflamasyon durumlarında ortaya çıkan anoreksi, kilo kaybı ve protein yıkımı gibi durumlardan TNF- α sorumludur.

1.1.12 Neutrophil Gelatinase – Associated Lipocalin (NGAL)

Glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ndaki düşme kreatinin seviyesinde yükselme olmadan meydana gelmekte olup kreatinin değeriindeki değişiklikler biyokimyasal analizlere yansıdığı zaman böbrek fonksiyonlarında yaklaşık %40-50 oranında fonksiyon kaybı meydana gelmiştir. Doğal olarak kreatininin böbrek fonksiyonlarını göstermede özellikle allotransplantasyon gibi ağır bir böbrek yükü oluşturan durumlarda her zaman güvenilir bir parametre olarak değerlendirilmemektedir.(67-70)

Böbrek fonksiyon bozukluklarının monitörizasyonunda kullanılabilecek belirteç sayısı sınırlıdır. Onlardan biri yakın zamanda nötrofillerden izole edilen ve biyomarker olarak kabul edilen NGAL'dir (neutrophil gelatinase–associated lipocalin). NGAL diğer isimleri ile siderokalin ve/veya lipokalin-2 ve/veya onkogen 24p3; renal epitelyal hücreleri, nötrofiller ve böbrek proksimal tübülleri tarafından salgılanan proteindir. NGAL'in demir taşıyan proteinlere bağlanma özelliğinden dolayı siderokalin ismini de almıştır. Protein gruplarından Lipokalin ailesine ait olup, yapısında 178 amino asit vardır ve ortalama ağırlığı 28 dalton kadardır. Akut böbrek yetmezliği, nefrotoksisite, gecikmiş greft fonksiyonu gibi durumlarında yapılan hayvan deneyleri ve insanlarda yapılan klinik çalışmalar mevcut olmasına rağmen, kompozit doku ve solid organ allotransplantasyonu sonrasında böbrek fonksiyonlarını göstermede NGAL'in rolü ile ilgili olarak çok az bilgi mevcuttur.(71) Haase ve arkadaşlarının 2500 hastayı değerlendirdikleri bir çalışmanın meta-analizine göre; NGAL'in akut böbrek yetmezliğinde erken bir belirteç olduğu doğrulanmıştır.(72) NGAL kolayca idrarla atılmaktadır. Başlıca

serumda ve idrarda ölçülen s-NGAL ve u-NGAL formları bilinmektedir. NGAL akut böbrek patolojilerinde olduğu gibi kronik böbrek hastalıklarında aynı oranda yükselmemektedir. (71, 73) Bu verilere dayanarak NGAL in kompozit doku nakli sonrasında erken dönemde böbrek fonksiyonlarının monitörizasyonunda kullanılması planlandı.

1.1.13 Serum Amiloid- A Protein (SAA)

Serum amiloid- a protein (SAA) 104 aminoasitten oluşan, 12–14 kDA ağırlığında, asıl olarak karaciğerde sentezlenen polimorfik apolipoprotein ailesinden oluşmaktadır(74). Makrofajlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, adipositler gibi birçok karaciğer dışı sentez yerleri bulunmaktadır. Akut faz proteini olarak değerlendirilen bu protein infeksiyon süresince dikkate değer bir şekilde artmakta, bazal değerinin 1000 katı kadar arttığı bildirilmektedir. Ayrıca SAA gen transkripsiyonu IL–6, IL–1, TNF- α gibi sitokinler ve diğer etkili faktörler tarafından uyarıldığı bildirilmektedir(74). Kesin fonksiyonu bilinmemesine rağmen SSA'nın asıl etkisinin immünmodülasyon olduğu belirtilmektedir. Serbest SAA sitokin benzeri özelliklere sahip olduğu ve nötrofillerin, PMN lökositlerin, T lenfositlerin kemotaksisini uyardığı bildirilmektedir(75).

1.1.14 Kompleman C5a

Kompleman sisteminin aktivasyonu invaze olan organizmalara karşı güçlü bir savunma mekanizmasıdır. Kompleman sistemi birbiriyle etkileşime girerek bir şelale oluşturan yaklaşık 35 adet değişik serum proteinlerini kullanmaktadır.(76) Şu ana kadar üç kompleman aktivite yolu bulunmuştur. Klasik yol antijen-antikor kompleksi ile, alternatif yol bakterilerin ya da mantarların lipopolisakkarit gibi yüzeyel molekülleri ile,lektin bağlanma yolu da mannoz bağlanan lektin gibi proteinler aracılığıyla aktive olmaktadır(77, 78). Kompleman aktivasyonu sonrası immün defansa katkılı olan olaylar, proinflamatuvar mediatörlerin salınımı, fagositozun artırılması, bakteri hücre duvarında delikler oluşturarak lizis oluşturulması gibi olaylar meydana gelmektedir.

Kompleman aktivasyonu iki ucu keskin kılıç olarak tabir edilmekte ve fazla miktarda veya uygunsuz aktive olması konakçıda zararlı etkiler oluşturmaktadır. Allotransplantasyon komplemanın ve inflamatuvar yanıtın fazla aktivasyonuna bir örnek olarak verilebilir.

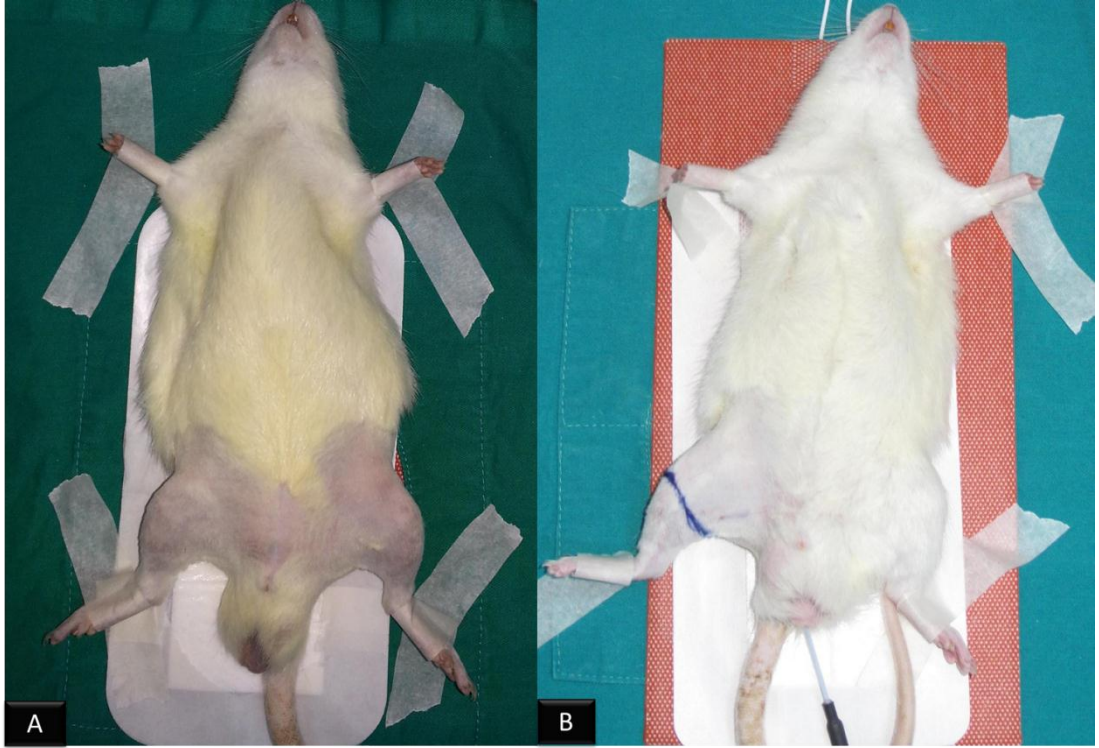
Kompleman aktivasyon ürünleri içinde geniş spektrumlu fonksiyona sahip olan C5a en kuvvetli inflamatuvar peptiddir . Aminoasitten oluşan bu protein nötrofiller için çok güçlü kemotaktik özelliğe sahiptir. Ayrıca fagositlerden granüler enzimlerin salınımı, nötrofillerde süperoksit anyonların oluşması, vazodilatasyonla birlikte vasküler permeabilitede artma gibi birçok proinflamatuvar özelliğe sahip olduğu bulunmuştur(79).

C5a sadece kompleman aktivasyon yolu ile sistemik değil aynı zamanda lokal olarak da üretilmektedir. Yakın zamanda C5a'nın çeşitli hücrelerden sitokin salınımında düzenleyici rol aldığı, nötrofil apoptozisini azalttığı, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırdığı, koagülasyon yolunu aktive ettiği bildirilmiştir(80-82).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi.

Çalışmada, 21-24 haftalık, 305 –380 gr. ağırlığında, 15 wistar albino (WA) (alıcı) ve 8 spraque-dawley(SD) (verici) türü olmak üzere toplam 23 erkek sıçan kullanıldı (Şekil 2,3). Tüm sıçanlara, on ikişer saatten oluşan ışık-karanlık döngüsü sağlandı. Cerrahi işlem sonrasında her sıçan ayrı ayrı kafeslenmiştir ve deney protokolü süresince su ve yiyeceğe erişimleri kısıtlanmamıştır. Tüm deneklerde anestezi için 60 mg/ kg ketamine-HCl (Ketalar©-Pfizer) ve 8 mg/kg Ksilazin HCL (Xylazinbio %2 © - Bioveta) intraperitoneal yoldan uygulandı. Transplantasyonlar esnasında, cerrahi mikroskop (Leica M651 MSD, Leica Microsystems (Schweiz) AG, Switzerland), mikrocerrahi el aletleri ve standart mikro cerrahi teknik kullanılmıştır.



Şekil 2. A. Her iki ekstremitesi kullanılmak üzere hazırlanmış verici Spraque Dawley sıçanı B. Sağ ekstremitesi transplantasyona hazırlanmış alıcı Wistar Albino sıçanı.

2.1 Deney Grupları

Çalışma iki kısma ayrıldı:

1. Kısım: Alıcı ve verici sıçanlarda transplante edilecek ekstremitelerin cerrahi hazırlığı
2. Kısım: Hazırlanan ekstremitelerin allotransplantasyonu

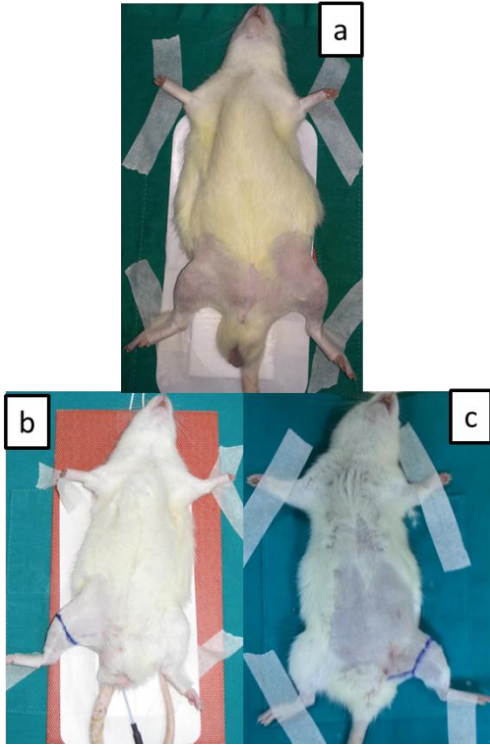
2.2 Transplantasyon Öncesi Hazırlıklar

Transplantasyon işleminden önce sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedildi ve ağırlığına göre sıçanlara anestezi uygulandı. Anestezik işlemden sonra alıcı sıçanların tek bacağı, verici sıçanların her iki arka bacağı traş edildi. Cerrahi işleme başlamadan önce povidon iodin ile cerrahi saha temizliği yapıldı. Uygun hazırlıklardan sonra cerrahi işleme geçildi.

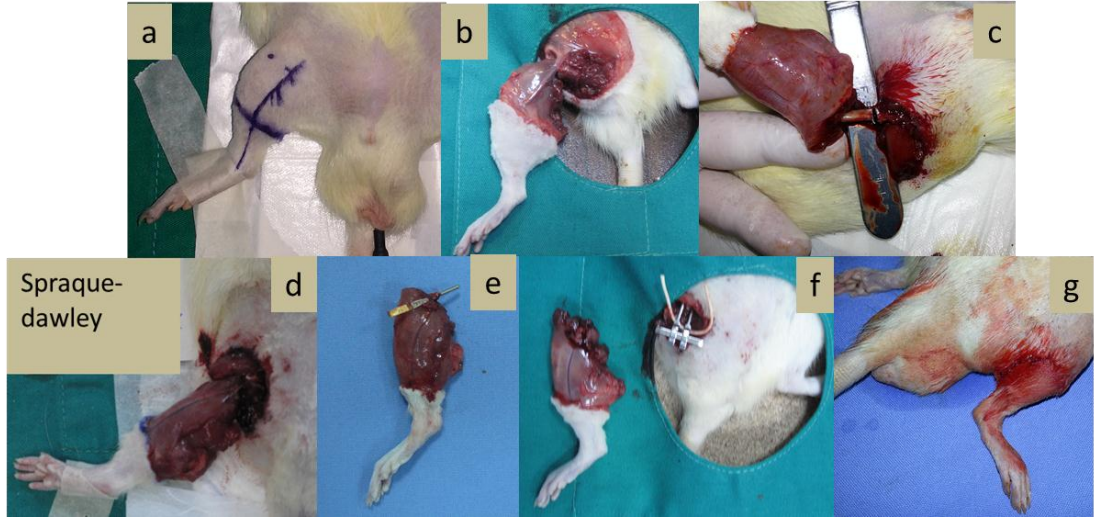
2.3 Transplantasyonda Cerrahi İşlem

Cerrahi öncesi gerekli hazırlıklar tamamlandıktan sonra alıcı WA sıçanda ekstremitenin nörovasküler pedikülü topografik olarak işaretlendi. Bacak ortasından itibaren cilt insizyonu ile işleme başlandı. Cilt proksimale doğru diseke edilerek kas yapılarına ulaşıldı. Kaslar tek tek orta noktasından elektrokoter ile kesilerek ayrıştırıldı ve femoral kemik açığa çıkarıldı. Vasküler pedikül kendi içinde femoral sinir, arter ve ven ayrı ayrı olacak ayrıştırıldı. Femoral kemik tur motoru ve sirküler bir kesme piyasemeni yardımı ile orta noktadan kesildi. Femoral arter ve vene ayrı ayrı tekli aproksimatör takıldıktan sonra uygun uzunlukta kesilerek ekstremitte uzaklaştırıldı. Diseke edilen cilt geride kalan dokuyu örtecek şekilde eski yerine geçici sütürler ile tutturuldu. Alıcı WA sıçanda damar ve kemik yapıları hazırlandıktan sonra verici SD sıçanda aynı işlem sırası ile trasplante edilecek ekstremitte hazırlandı (Şekil 4). Ekstremitte vericiden ayrılarak alıcı sıçan taşındı. Kesilen kemiğin medullasına 1,5 mm çaplı 2 cm lik Kirchner teli (K-teli) yerleştirilerek alıcı sıçan femuruna stabilize edildi. Anterior, posterior, lateral ve medial kas grupları sırayla 4/0 vikril (Ethicon) ile sütüre edildi. Kas sütürasyonunun ardından sırasıyla arter ve ven anastomozları mikroskop altında 10/0 poliamid

(Ethicon) ile yapıldı. Anastomoz öncesinde damar lümenleri heparinize edildi ve bupivakain ile dilate edildi. Antikoagülan herhangi bir ilaç veya başka bir işlem uygulanmadı. Dolaşımın intact olduğundan emin olduktan sonra cilt 4/0 ipek (Ethicon) ile onarıldı. Ekstremitayı otofajiden korumak amacıyla ekstremita bir tel kafese geçirildi ve kafes sıçan cildine dört farklı noktadan sütür yardımı ile tutturuldu (Şekil 5). Alıcı sıçan ayrı bir kafeste uygun ısıda derlenmeye bırakılarak takip edildi. Cerrahi işlem sonrasında 1. saatte alıcı sıçanlar takibin devam ettirileceği bakım odasına transfer edildi.



Şekil 3. a. Verici sıçan (sprague dawley) b-c. Alıcı sıçanlar(wistar albino).



Şekil 4. Transplantasyon işlem basamakları

- a. Alıcı Wistar albino sıçanında ekstremitenin hazırlanması
- b. Vasküler yapıların diseksiyonu ve kemik eksplorasyonu
- c. Femur osteotomisi
- d. Verici sprague dawley sıçanında ekstreitenin hazırlanışı
- e. Wistar albino ekstremitenin amputasyonu
- f. Alıcı wistar albino sıçanı ve verici sprague dawley ekstremitesi
- g. Transplantasyon sonrası erken dönem



Şekil 5. a-b. Transplantasyon sonrası ekstremitenin koruyucu kafes ile otofajiden korunması

2.4 Transplantasyon Sonrası Hayvan Bakımı

Transferin ardından derlenmeye bırakılan sıçanlar cerrahi işlemden 1 saat sonra tamamen anesteziye çıktı. Her bir alıcı sıçan ayrı bir kafes içerisinde izole bir şekilde takip edildi. Yeterli sıvı ve yem ile takip odasında takibe alındı. Uygun ısı ve karanlık- aydınlık döngüsü altında her alıcı sıçan 5 gün süre ile takip edildi. Günlük yem ve su takviyesi, beslenme kontrolü, genel durum değerlendirmesi, ekstremitelerde dolaşım takibi ve allojenik reaksiyon varlığının yanı sıra temizlik bakımı uygulandı.

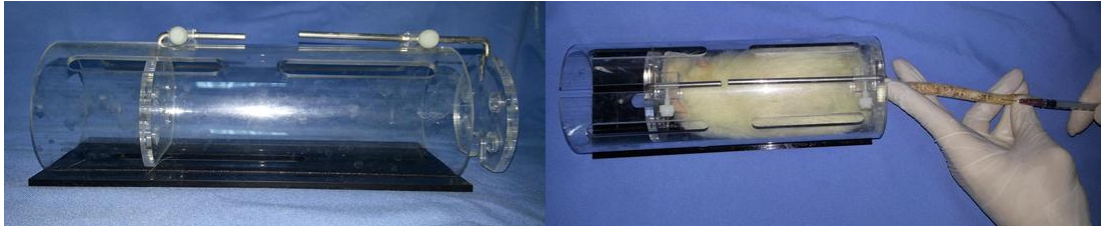
2.5 Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya dahil edilen alıcı sıçanlardan, cerrahi işlemden hemen önce 1.5 cc kan örnekleri toplandı. Alınan örnekler 3000 rpm de 10 dk santrifüj edildikten sonra serum örnekleri alınarak, uygun şekilde numaralandırılmış 1.5 cc lik ependorf tüplerine konuldu ve çalışma zamanına kadar -80 °C ısıda muhafaza edildi. 1.5 cc lik kan örneklerinden yaklaşık 0.7-1 cc serum elde edildi. Cerrahi işlemi takip eden 3. ve 5. günlerde alıcı sıçanlardan 1.5 cc kan alınarak aynı işlemlerden geçirildikten sonra uygun ısı ve ortamda saklandı. Beş gün süre ile yaşatılan alıcı sıçan sayısı 10 a ulaştığında ve tüm sıçanlardan kan örnekleri elde edildiği aşamada çalışma hedeflenen şekilde sonlandırıldı.

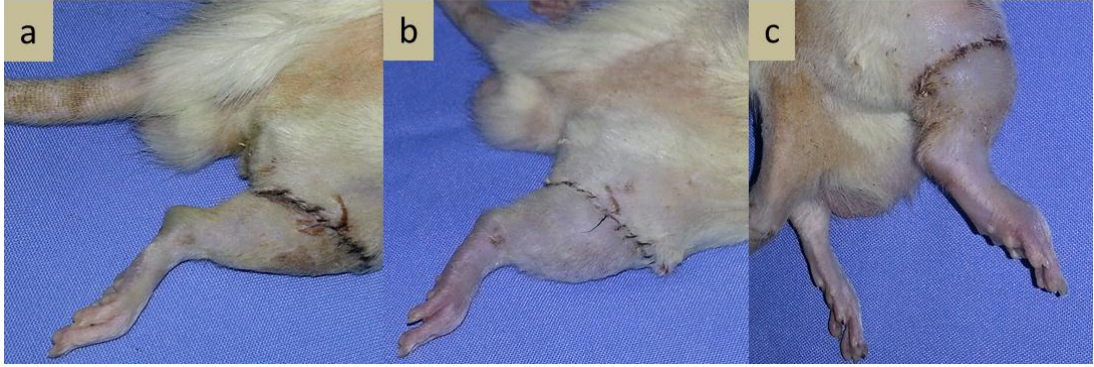
2.6 Ekstremitte Allotransplantasyonu

Çalışmanın bu kısmında 8 adet verici SD ve 15 adet WA alıcı sıçan arasında kompozit arka bacak allotransplantasyonu gerçekleştirilmiştir. Verici sıçandan elde edilen iki arka bacak, iki adet alıcı sıçana transplante edildi (Şekil 3). Alıcı sıçanların transplantı yemesini önlemek amacıyla ince tel kafesler transplantın etrafına yerleştirildi ve cilde sütüre dildi (Şekil 5). Transplantasyon sonrasında herhangi bir immünsüpresif ilaç uygulanmadı. Alıcılardan transplantasyon öncesinde, transplantasyon sonrası 3. ve 5. günlerde restrainer kullanılarak kuyruk veninden kan örnekleri toplandı (Şekil 6). Transplantasyon sonrasında sıçanlar ayrı ayrı kafeslerde takip edildi. Yem ve sıvı alımları kısıtlanmadı. Toplanan kan örnekleri 3000 rpm de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek serum ayrıştırıldı. Ayrıştırılan serum numuneleri numaralandırılmış 2 cc lik ependorf tüplerinde toplanarak deney bitiminde çalışılmak

üzere -80°C de muhafaza edildi. Sıçanların klinik takibinde fotoğraflama yöntemi kullanıldı (Şekil 7). Takiplerde transplante edilen ekstremitede rejeksiyonun klinik belirtileri monitörize edildi. Kompozit doku nakillerinde rejeksiyonun deri belirteci olarak kullanılan histolojik skorlamaya göre grade 0 da inflamasyon hiç görülmezken, grade 1 de inflamasyon minimal, grade 2 de az-orta derecede, grade 3 de orta seviyeli ve grade 4 de ise aşırı inflamasyon ve nekroz görülür(83). Toplamda 10 adet alıcı WA sıçan 5 er gün yaşatılarak 5. gün sonunda son kan örnekleri alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.



Şekil 6.Restrainer yardımı ile sıçan kuyruk veni yoluyla kan örneklerinin toplanması.



Şekil 7. Sprague dawley ekstremitesi transplante edilmiş alıcı wistar albino sıçanı, transplantasyon sonrası görünümü..

- a.** Transplantasyon sonrası 1. gün
- b.** Transplantasyon sonrası 3. gün
- c.** Transplantasyon sonrası 5. gün

2.7 Kan Örneklerinin Biyokimyasal Analizi

Toplanan kan örneklerinde IL-6, IL-10, IL-18, CRP, TNF alfa, SAA, NGAL ve C5a biyokimyasal olarak analiz edildi.

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilen kompozit doku allotransplantasyon işleminde, sıçanlardan işlem öncesi ve sonrasında kuyruk veninden jelli biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri 25-30 dakika bekletildikten sonra +4 °C de 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınıp eppendorflara porsiyonlandı. Çalışma gününe kadar numuneler -80°C saklandı. Çalışma günü numuneler oda ısısında çözündürüldükten sonra vortekslendi.

CRP: Abcam (USA) marka ticari kitler kullanılarak, kit çalışma prosedürlerine uygun olarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan Rayto-2100C Microplate Reader (India) cihazında, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile analiz edildi. Birimler ng/ml dir.

SAA: Siemens (Germany) marka orijinal ticari kitler kullanılarak, kit çalışma prosedürlerine uygun olarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında BNII cihazında nefelometrik yöntemle analiz edildi. Birimler mg/L dir.

Lipocalin-2/ NGAL: MyBiosource (USA) marka ticari kitler kullanılarak, kit çalışma prosedürlerine uygun olarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan Rayto-2100C Microplate Reader (India) cihazında, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile analiz edildi. Birimler ng/ml dir.

IL 6: RayBiotech (USA) marka ticari kitler kullanılarak, kit çalışma prosedürlerine uygun olarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan Rayto-2100C Microplate Reader (India) cihazında,

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile analiz edildi. Birimi pg/ml dir.

TNF α : RayBiotech (USA) marka ticari kitler kullanılarak, kit çalışma prosedürlerine uygun olarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan Rayto-2100C Microplate Reader (India) cihazında, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile analiz edildi. Birimi pg/ml dir.

IL 10 : RayBiotech (USA) marka ticari kitler kullanılarak, kit çalışma prosedürlerine uygun olarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan Rayto-2100C Microplate Reader (India) cihazında, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile analiz edildi. Birimi pg/ml dir.

IL-18: RayBiotech (USA) marka ticari kitler kullanılarak, kit çalışma prosedürlerine uygun olarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan Rayto-2100C Microplate Reader (India) cihazında, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile analiz edildi. Birimi pg/ml olarak kabul edildi. Ancak teknik bir problem sonucu veriler elde edilemediğinden IL-18 çalışma verileri arasında değerlendirilememiştir.

Ca5: MyBiosource (USA) marka ticari kitler kullanılarak, kit çalışma prosedürlerine uygun olarak Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan Rayto-2100C Microplate Reader (India) cihazında, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile analiz edildi. Birimi pg/ml dir.

2.8 İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm veriler IBM© SPSS© 16 paket programında değerlendirildi. Tüm veriler histogram analizinde değerlendirilerek verilerin nonparametrik olduğu gözlemlendi. Grupların kendi içinde nakil öncesi ve nakil sonrası biyokimyasal parametreler “Wilcoxon Signed Ranks Test” ile analiz edildi. Atoplanan kan örneklerinde IL-6, IL-10, IL-18, CRP, TNF alfa, SAA, NGAL ve C5a değerlerinin kendi arasında korelasyonu “Spearman Korelasyon Analizi” ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan sıçanların yaş aralığı 21-14 hafta olarak belirlendi. Sıçanların ağırlıkları 305-380 gram arasında değişmektedir. Toplamda 15 adet alıcı WA ve 8 adet verici SD sıçanı kullanıldı. Verici sıçanlardan elde edilen 16 adet arka ekstremitenin 15 tanesi, 15 adet alıcı sıçana transfer edildi. Çalışma sırasında exitus olan 2 adet ve ekstremitesinde dolaşım problemi olan 3 adet alıcı WA sıçanı çalışma dışında bırakılarak toplamda 10 adet alıcı WA sıçanı, transplantta dolaşım problemi olmadan yaşatılabildi. Böylece yaşatılması ve kan örneklerinin çalışılması hedeflenen 10 adet alıcı sıçan sayısına ulaşıldı. Çalışmamızda, immün reaksiyonların seyrine müdahale etmemek amacıyla immünsüpresif ilaçlar kullanılmadı.

Transplantasyondan hemen öncesinde ölçülen parametrelerin biyokimyasal değerleri bazal değerler olarak kaydedildi. Transplantasyon sonrası 3. ve 5. Günlerde elde edilen sonuçlar ile transplantasyon öncesinde elde edilen değerler kıyaslanarak istatistiksel veriler elde edildi. Sıçanların takiplerinde ekstremitte dolaşımı ve sıçanların genel durumları klinik olarak değerlendirilerek fotoğraflama yöntemi ile kayıt altına alındı.

Alıcı sıçanlarda ilk iki günlük sürede ekstremitelerde klinik takiplerde herhangi bir reaksiyonel değişiklik izlenmedi. Üçüncü günden itibaren ekstremitelerde şişlik ve enflamasyon izlendi. Takip sırasında ekstremitte dolaşımında problem tespit edilen 3 sıçan ve intraoperatif exitus olan 2 sıçan çalışmadan çıkarılarak yerine yenileri dahil edildi.

Deneye ait cerrahi işlem bilgileri tablo 2 de sunulmuştur.

Tablo 2. Cerrahi işlem verileri

WA	Yaş (hafta)	Ağırlık (gr)	Operasyon süresi (dk)	Anastomoz süresi (dk)
W1	21	308	67	23
W2	22	305	64	27
W3	22	345	72	21
W4	24	380	61	33
W5	23	372	58	29
W6	21	351	57	26
W7	21	330	60	31
W8	24	318	75	28
W9	24	376	55	41
W10	23	312	61	29

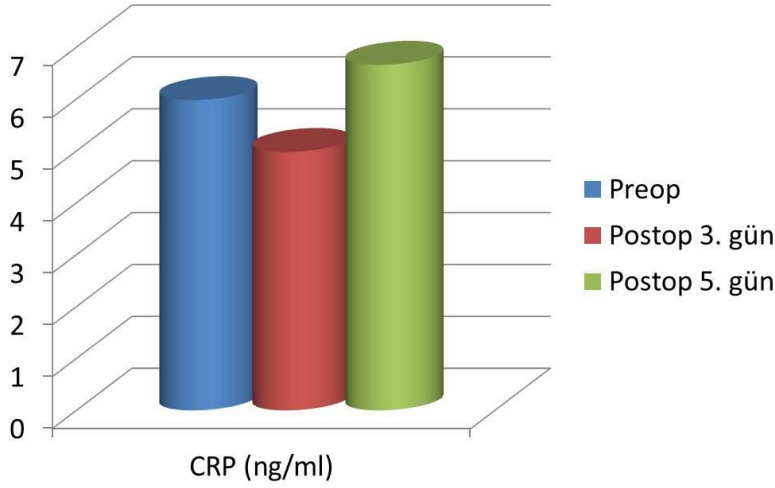
WA: wistar albino, Wn: 'n' numaralı denek

Deneklere ait biyokimyasal veriler tablo 3 de listelenmiştir.

Tablo 3. Deneklere ait biyokimyasal veriler

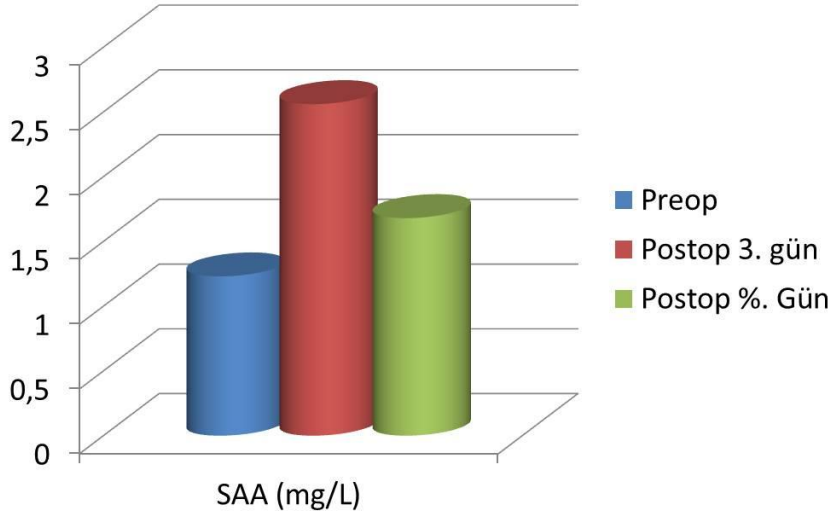
Parametre	Zaman	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10
IL-6	0. saat	69,82	117,3	21,37	46,28	120,65	91,03	43,68	132,46	110,71	41,09
	3. gün	48,01	41,96	20,51	39,37	40,41	39,37	62,81	42,82	54,96	69,82
	5.gün	28,2	48,01	63,68	39,37	40,41	121,55	225,28	141,61	96,37	108,02
IL-10	0. saat	462,98	942,45	757,03	1079,94	1056,39	858,85	874,78	726,28	970,2	703,4
	3. gün	623,78	573,68	484,25	208,17	140,12	259,28	479,98	365,59	711,01	828,78
	5.gün	1325,41	750,85	935,95	520,01	260,6	592,74	664,11	775,6	629,72	749,31
TNF-alfa	0. saat	280,2	333,93	184,42	152,42	197,63	150,07	93,52	353,5	151,25	136,05
	3. gün	301,76	107,2	180,84	123,3	98,67	119,84	364,02	272,65	144,22	220,66
	5.gün	133,73	95,79	145,39	140,72	147,73	155,95	562,52	232,91	364,02	194,02
C5a	0. saat	17,66	19,44	27,22	28,43	19,44	16,48	32,06	19,44	25,42	27,22
	3. gün	10	16,48	30,85	14,11	11,17	11,17	6,49	11,17	11,76	8,83
	5.gün	8,24	32,06	31,78	18,85	8,83	16,48	10	11,17	12,94	11,76
NGAL	0. saat	25,108	30,182	7,889	6,911	28,779	49,466	8,506	30,783	6,957	8,078
	3. gün	26,562	27,696	24,564	22,507	21,158	16,675	27,197	12,636	24,294	7,85
	5.gün	39,436	30,033	21,158	22,507	28,852	9,718	22,442	10,936	20,653	12,456
SAA	0. saat	1,4	1,2	1,2	0,9	1,3	1,3	1,2	1,1	1,2	1,5
	3. gün	1,6	4,5	1,6	1,6	1,5	3,5	1,6	3,6	4,6	1,5
	5.gün	1,4	3,7	1,5	1,5	1,4	1,5	1,6	1,4	1,5	1,3
CRP	0. saat	7	8	4	6	5	4,5	6	9	7,3	3
	3. gün	3,7	4	4,1	5	4,7	5,1	6	7,2	5,1	4,9
	5.gün	4,7	6	7,2	8,4	9	7,2	7,1	6,3	5,8	4,9
IL- 18	0. saat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. gün	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.gün	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Yapılan istatistiksel analizlerle elde edilen veriler değerlendirildiğinde CRP nin preoperatif ölçülen ortalama değeri ile postoperatif 5. Gün ölçülen ortalama değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmektedir($p<0.05$). CRP ve IL-10 değerleri korele edildiğinde ise her iki parametrenin de gösterdiği artış miktarları istatistiksel olarak anlamlı bulundu(Şekil 8) .



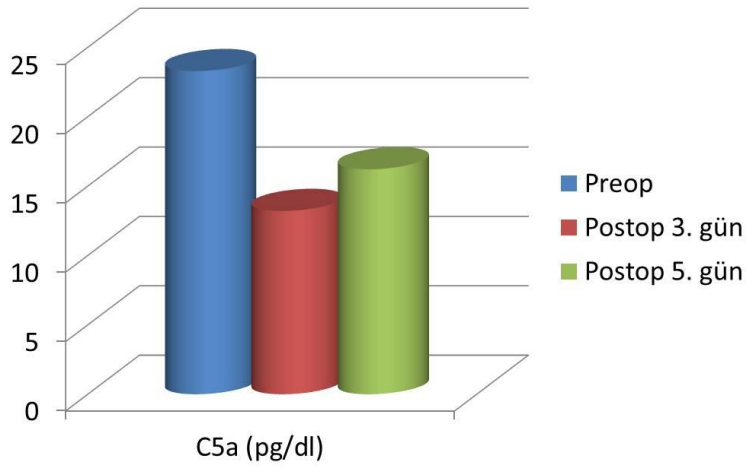
Şekil 8. CRP nin günlere göre dağılımı

SAA düzeyleri değerlendirildiğinde nakil öncesi dönemde ölçülen değerler ile nakil sonrası 5. Gün değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttur ($p<0.05$). Artış oranları değerlendirildiğinde CRP'ye göre, SAA'da daha yüksek artış oranı dikkati çekse de, bu artış oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). SAA, akut dönemde rejeksiyon takibinde kullanılabilir, istatistiksel olarak anlamlı bir parametre olarak değerlendirildi(Şekil 9).



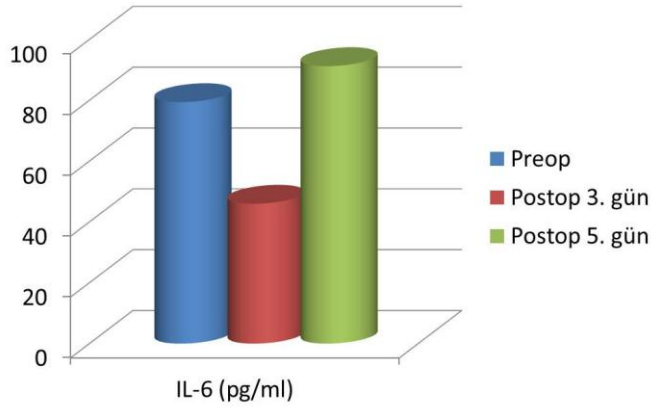
Şekil 9. SAA'nın günlere göre dağılımı

C5a'nın veri analizinde istatistiksel olarak anlamlı derecede değişmediği görüldü ($p>0.05$) (Şekil 10).



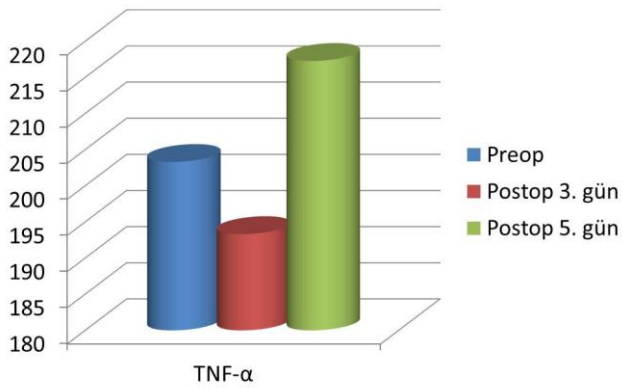
Şekil 10. C5a'nın günlere göre dağılımı

IL-6 değerlerinin istatistiksel anlamlı derecede yükseldiği ve inflamasyonu monitörize ettiği gösterilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 11). Postoperatif 5. gün sonuçları arasında yapılan korelasyon analizinde TNF-alfa ile IL-6'nın korele bir şekilde yükseldiği görüldü.



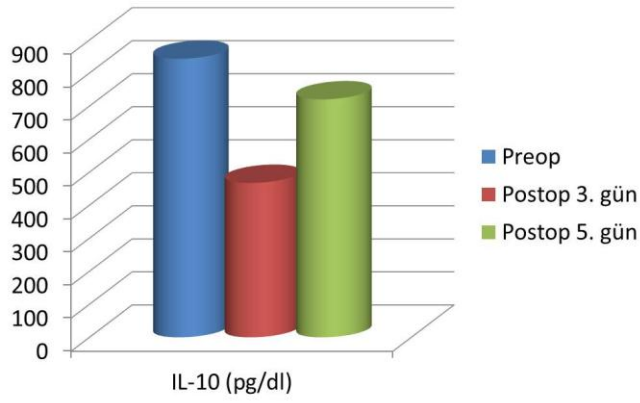
Şekil 11. IL-6'nin günlere göre dağılımı

Veri analizinde TNF- α 'nın anlamlı derecede artış göstermediği gözlemlendi ($p>0.05$). TNF- α 'nın hücrel immünite göstergesi olduğu göz önünde bulundurulursa erken dönemde hücrel yanıt oluşumunun istatistiklere yansıtılacak oranda olmadığı görülmektedir (Şekil 12).



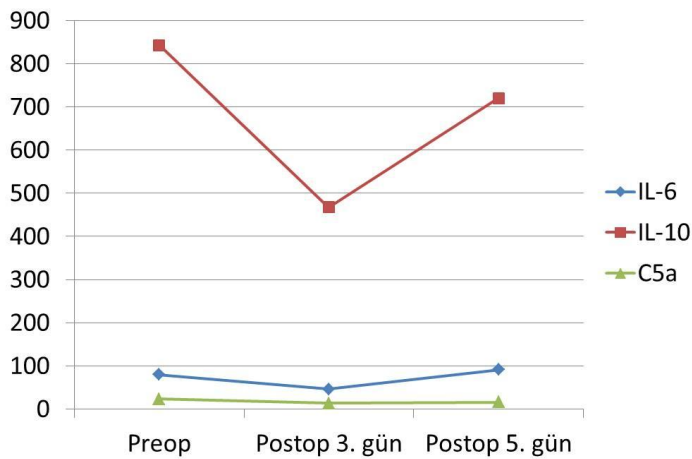
Şekil 12. TNF- α 'nın günlere göre dağılımı

Çalışmamızda elde edilen IL-10 değerleri analiz edildiğinde nakil sonrası 3 ve 5. günlerde elde edilen değerlerin, nakil öncesi değerlerden anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 13).



Şekil 13. IL-10 un günlere göre dağılımı

Parametreler arası korelasyon analizinde IL-6, IL-10 ve C5a'nın 3. gün sonunda elde edilen verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) azalma meydana geldiği tespit edildi (Şekil 14). Beşinci gün verileri arası korelasyon analizinde IL-6, TNF- α ve NGAL değerlerinin azalması istatistiksel olarak anlamlı korelasyon göstermektedir. 5. gün verilerinde aynı zamanda IL-10 ve CRP' nin artışı anlamlı oranda korelasyon göstermektedir.



Şekil 14. IL-6, IL-10 ve C5a'nın korelasyon analizi

4. TARTIŞMA

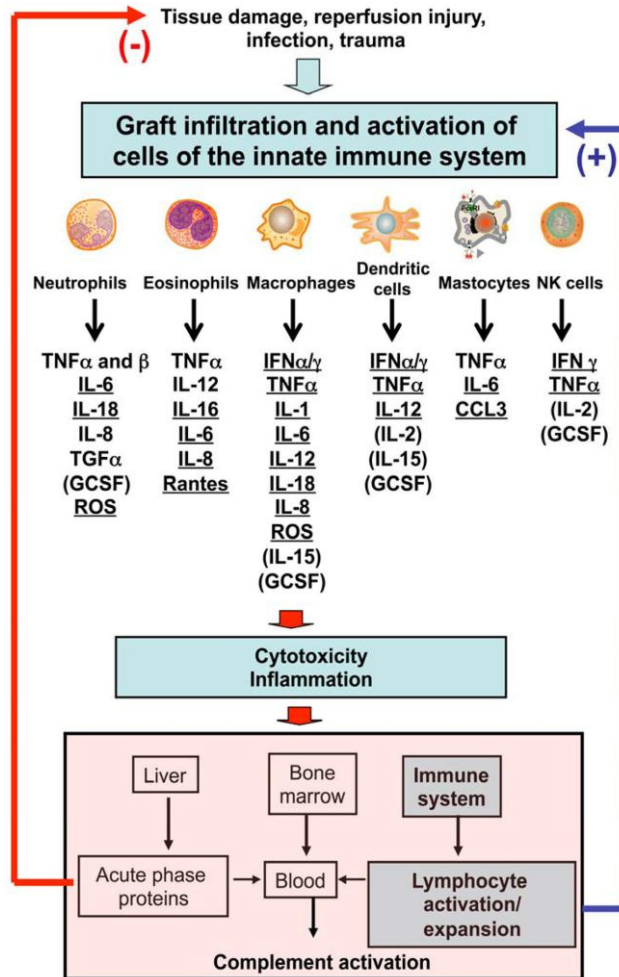
Organ yetmezliklerinin son evresinde organ transplantasyonları kabul edilmiş bir tedavi seçeneğidir. Transplantasyon uygulanan bireylerde , bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçlar kullanılmaktadır. Ayrıca bu ilaçların ömür boyu kullanımı gerekmektedir. Bağışıklık sisteminin uzun süreli baskılanması beraberinde enfeksiyon, malign transformasyonlar ve diğer toksik etkiler gibi alıcının hayatını tehdit eden yan etkileri getirmektedir. Organ transplantasyonları hayatın devamı için vazgeçilmez olabilmektedir ve bu komplikasyonları göze alınmayı mecburi kılmaktadır. Ama genellikle fonksiyonel ve estetik kazanımlar için gerçekleştirilen kompozit doku allotransplantasyonları, hayatın devamı için vazgeçilmez değildir. Bu nedenle hayatı tehdit eden yan etkilerin, kompozit doku allotransplantasyonunun getirdiği estetik ve fonksiyonel kazanımlara karşılık gelip gelmediği hala tartışmalıdır. Üstelik birçok komponent içeren kompozit doku allotransplantasyonlarında, özellikle de deri komponentinin çok fazla antijenik özellik taşıması nedeniyle, organ transplantasyonlarından daha yüksek dozlarda immünsupresiflere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu immünsupresiflerin kullanımı, kronik rejeksiyon riskini de ortadan tamamen kaldırmamaktadır.(84)

Allotransplantasyon sonrasında alıcıda meydana gelebilecek immün sistem değişikliklerinin mümkün olan en kısa zamanda tespit edilerek tedavi edilmesi, organ ve kompozit doku transplantasyon alanında ulaşılmaya çalışılan hedeflerdendir. Alıcı, kısa bir süre kadar transplanta karşı görülebilir herhangi bir reaksiyon oluşturmada da immün sistem bu dönemde çeşitli değişikliklere uğrayarak gelişebilecek tüm red reaksiyonlarının temellerini oluşturmaktadır. Bu erken dönemde meydana gelen değişikliklerin biyokimyasal olarak tespit edilmesi tedaviye olumlu katkılar sağlayacaktır. (85)

Allotransplantasyon sonrası vücutta greft antijenlerinin tanımlanması ve bu antijenlere karşı immünolojik bir yanıt oluşması kompleks bir olaylar dizisidir. Bu reaksiyonel yanıt oluşturulurken IL-6 ve TNF-alfa gibi proinflamatuvar sitokinler ile başlayan olaylar dizisi kısa sürede sitotoksik olaylar meydana getirmektedir. Sitotoksikite sonrasında akut faz proteinleri (CRP,SAA, vb.) ve kompleman sistemi (C5a gibi) devreye girerek vücuda yabancı olarak tanımlanan tüm dokuların (allogreft) yıkılmasına öncülük etmektedir. Öte yandan inflamatuvar reaksiyonların

da sınırlandırılabilmesi için vücutta çalışan bir antiinflamasyon sistemi de devreye girerek IL-10 ve buna benzer birçok sitokin kan düzeylerini artırmaktadır. İnflamatuvar ve antiinflamatuvar reaksiyonlar dengesi içerisinde allogreft alıcı organizma tarafından reddedilebilmektedir (Şekil 15)(86).

Kompozit doku nakillerinde nakil işlemini takip eden dakikalar ve saatler içerisinde inflamatuvar yanıt başlamaktadır. Özellikle doğal öldürücü (NK) hücreler erken dönemde inflamatuvar yanıtta önemli rol oynamaktadırlar. Bununla birlikte interlökinler (IL-1, IL-6) ve TNF- α inflamatuvar cevabın olgunlaşmasında etkilidirler. Kabaca ilk 6-8 saatlik dönemde inflamatuvar markerlar plazmada tespit edilebilmektedir. 20. Saatten itibaren meydana gelen aşırı inflamatuvar cevaplar rejeksiyonu akla getirmelidir. İnflamasyon ve rejeksiyonda plazmada değeri yükselen parametreler benzer parametreler olsa da birim zamanda ölçülen artış oranları her iki reaksiyon türünde farklı ve ayırtedici özelliktedir.



Şekil 15. Transplantasyon sonrası oluşan lökosit ve sitokin cevabı.

Bir akut faz proteini olan CRP nin çeşitli proinflamatuvar ve antiinflamatuvar markerlar ile birlikte değerlendirildiğinde akut dönemde meydana gelen immünolojik değişiklikler hakkında önemli bilgiler elde edilebileceği düşünülmektedir. Allotransplantasyon sonrasında CRP ile aynı özellikleri gösteren ancak CRP ye göre daha erken dönemde yükselen SAA değerlerinin akut dönemde oluşan immün değişiklikler hakkında önemli bilgiler verdiği konusunda çalışmalar mevcuttur.(23, 87, 88) Cerrahiye sekonder yükselen CRP nin normal seviyeye inmesinden sonra , ikinci kez yükselişe geçmesi diğer laboratuvar değerlerine göre daha erken meydana gelen bir rejeksiyon belirticidir.(84) Çalışmamızda elde edilen veriler değerlendirildiğinde CRP nin preoperatif ölçülen ortalama değeri ile postoperatif 5. Gün ölçülen ortalama değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmektedir($p<0.05$). CRP ve IL-10 değerleri korele edildiğinde ise her iki parametrenin de gösterdiği artış miktarları istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0.05$). İmmün yük oluşumundan sonra gelişen reaksiyonlar ile akut dönemde istatistiksel olarak anlamlı derecede sitotoksikite ve antiinflamatuvar yanıtın oluştuğu görülmektedir. Beş gün gibi kısıtlı bir sürede anlamlı derecede artış gösteren CRP nin bu dönemde rejeksiyon monitörizasyonunda kullanılabilir bir parametre olduğu lehine yorumlanabilir.

SAA da, CRP gibi bir akut faz proteinidir. Çeşitli uyarılara CRP ye benzer yanıtlar göstersen de inflamatuvar olaylarda SAA cevabı CRP ye göre daha hızlı ve hassastır. Yapılan çalışmalarda SAA değerlerinin yükselişi akut allograft rejeksiyonunun erken habercisi olmuş ve normal rejeksiyonun başlangıcından 1-2 gün önce hızlı bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir. (89, 90) Çalışmamızda elde edilen SAA düzeyleri değerlendirildiğinde nakil öncesi dönemde ölçülen değerler ile nakil sonrası 5. Gün değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttur ($p<0.05$). artış oranları değerlendirildiğinde CRP ye göre, SAA da daha yüksek artış oranı dikkati çekse de, bu artış oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). SAA, IL-6 ve TNF- α tarafından sentezi uyarılan proteinlerden olmasına rağmen her üç parametre arasında uygulanan korelasyon analizinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. SAA, akut dönemde rejeksiyon takibinde kullanılabilir, istatistiksel olarak anlamlı bir parametre olarak değerlendirildi.

Akut rejeksiyonda kompleman ürünleri de marker olarak değerlendirilerek bu alanda çalışmalar yapılmıştır.(91, 92) C5a kompleman sisteminin hem klasik hem de alternatif yollarının aktivasyon indikatörüdür. Müller ve ark yaptığı bir çalışmada renal allotransplantasyon yapılmış 28 olguda plazma ve üriner C5a seviyeleri ölçülmüş. Ölçümler değerlendirildiğinde plazma C5a'nın allograft rejeksiyonunda anlamlı bir parametre olduğu ortaya konmuştur.(82) Çalışmamızda olası bir immün reaksiyonda kompleman sisteminin aktivitesi değerlendirilerek allograft rejeksiyonundaki tanısal önemi C5a ile monitörize edildi. Elde edilen veriler ışığında C5a'nın istatistiksel olarak anlamlı derecede değişmediği görüldü. Söz konusu bir oluşan C5a depozitler halinde çeşitli dokularda birikebileceği düşünüldüğünde, periferik kanda ölçmek yerine muhtelif doku biyopsileri ile değerlendirilmesinin anlamlı olabileceği kanaati oluşmaktadır. Böylece C5a'nın akut dönemde rejeksiyon monitörizasyonunda kullanımı için daha fazla bilgi ve veriye ihtiyaç vardır.

Kompozit doku allotransplantasyonlarında postoperatif dönemde allograft yaşayabilirliği kadar renal fonksiyonların monitörizasyonu da alıcının hayati fonksiyonları açısından oldukça önemlidir. Mishra ve ark yaptığı bir çalışmada renal allotransplantasyon uygulanan 25 olguda renal biyopsilerdeki rejeksiyon belirtileri plazma NGAL seviyeleri ile korele edilerek karşılaştırılmış. Elde edilen veriler NGAL'in akut renal hasar ile korele bir şekilde değiştiğini istatistiksel olarak anlamlı kılmıştır.(70) Renal fonksiyonların değerlendirilmesi amacıyla spesifitesi ve sensitivitesi yüksek olan serum NGAL'inin kullanılması planlandı. NGAL ile beraber renal patolojilerde marker olarak kullanımının yararlı olabileceğine dair yayınlar olan IL-18'in de korelasyon amacıyla kullanılması planlanarak çalışmaya dahil edildi(52, 54). Ancak laboratuvar testlerinde meydana gelen teknik problemler nedeniyle IL-18 sonuçları değerlendirilemeyerek çalışma dışı bırakıldı. İstatistiksel veriler incelendiğinde NGAL değerlerindeki artışın minimal olduğu ancak istatistiksel anlam taşımadığı görüldü. Renal fonksiyonların monitörizasyonu amaçlanarak çalışılan NGAL seviyeleri, erken dönemde böbrek fonksiyonlarının minimal etkilendiğine ya da etkilenmediğine işaret etmektedir.

Allotransplantasyon sonrasında immün sistemin modülasyonunun monitörizasyonu reaksiyon şiddetinin öngörülmesi ve uygun tedavi planlamasının yapılması açısından önemlidir. Bu amaca yönelik olarak IL-6'nın serum değerleri ölçülerek immün sistem dengesi değerlendirildi. IL-6; T ve B lenfositleri,

monositler/makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler, epitelial hücreler, mast hücreleri, nöronal hücreler, astrositler, mikrogliya, mezengial hücreler, osteoblastlar, epidermal langerhans hücreleri, dentritik hücreler ve keratinositler gibi çok geniş bir hücre grubu tarafından üretilmektedir.(41-43) Bir çok doku ve hücre grubu tarafından sentezleniyor olması, IL-6'nın, birden fazla biyolojik dokuyu aynı anda içeren kompozit doku allotransplantasyonunda immün sistem ile ilgili önemli bir gösterge olduğuna işaret etmektedir. Çalışmamızda veri analizi sonucunda IL-6 değerlerinin anlamlı derecede yükseldiği ve inflamasyonu monitörize ettiği gösterilmiştir($p<0.05$). IL-6'nın oluşan immün yüke paralel olarak artış gösterdiği görüldü. Postoperatif 5. Gün sonuçları arasında yapılan değerlendirme sonrasında TNF-alfa ile IL-6'nın korele bir şekilde yükseldiği görüldü. Veriler ışığında IL-6, akut rejeksiyonda kullanılabilir bir parametre lehine değerlendirildi.

TNF- α doğal ve kazanılmış immünite, hücre proliferasyonu ve apoptoziste rol oynayan ve önemli proinflamatuvar özelliklere sahip olan bir sitokindir. Bu sitokin başta makrofaj ve monositler olmak üzere, T hücreleri, düz kaslar, adipositler ve fibroblastlar tarafından üretilmektedir. Böylece kompozit doku transplantasyonunda elde edilecek TNF- α değerlerinin, oluşan immün yanıtın şiddeti ve rejeksiyon habercisi olabileceğinin göstergesidir. Yapılan çalışmalarda T- hücrelerinin aktivasyonu ile korele bir TNF- α artışı gözlenmiştir.(63, 93) Hücrel yanıtın değerlendirilmesi amacıyla TNF- α seviyeleri değerlendirildi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde TNF-alfa'nın anlamlı derecede artış göstermediği gözlemlendi. TNF-alfanın hücrel immünite göstergesi olduğu göz önünde bulundurulursa erken dönemde hücrel yanıt oluşumunun istatistiklere yansiyacak oranda olmadığı görülmektedir. Hücrel yanıt oluşması ve parametrik olarak değerlendirilebilir anlamlı sonuçlar elde edilebilmesi için daha uzun sürelerle ihtiyaç vardır.

Kompozit doku allotransplantasyonunda immünolojik değişkenler değerlendirilirken, rejeksiyon reaksiyonlarında artması olası parametrelerle beraber, oluşması beklenen reaksiyonları engelleyici markerların değişimi de incelenmelidir. Bu düşünceden yola çıkarak antiinflamatuvar etkilere sahip IL-10 seviyeleri değerlendirildi. Çalışmamızda elde edilen IL-10 değerleri analiz edildiğinde nakil sonrası 3 ve 5. günlerde elde edilen değerlerin, nakil öncesi değerlerden anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu durumda antiinflamatuvar bir mediatör olan IL-10'nun düşük olması, olası bir inflamatuvar reaksiyonda vücudun inflamasyonu kontrol

etmede güçlük çekeceğine işaret etmektedir. Solid organ transplantasyonlarında yapılmış bir çalışmada nakil öncesi IL-10 seviyeleri değerlendirilerek nakil sonrası değerler ile karşılaştırılmış ve rejeksiyon açısından klinik ile korele edilmiş; nakil öncesi IL-10 değerlerinin nakil sonrası değerlere göre yüksek olan bireylerde akut rejeksiyon sıklığı daha fazla bulunmuştur(94). Literatür çalışmaları ve deneysel çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında, kompozit doku allotransplantasyonu uygulanan bir bireyde nakil öncesi IL-10 seviyeleri ölçülerek nakil sonrası değerler ile kıyaslandığında doku rejeksiyonu bakımından uygun veriler elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda denek olarak kullandığımız sıçanlardan kuyruk veni yolu ile kan alma en sık kullanılan kan alma yöntemidir. Deneklerdeki toplam kan hacmi göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızın en önemli sınırlayıcı, kan örneklerinin hacmi ve kan alma frekansı olarak görülmektedir. Ayrıca kan örnekleri toplama yolu olarak kuyruk veninin kullanılabilmesi ciddi tecrübe gerektirmektedir.

Oluşacak reaksiyonel olayların inflamasyonun bir sonucu mu yoksa rejeksiyon reaksiyonu mu olduğunu ayırt ederken stres faktörlerini tamamen ortadan kaldırmak mümkün olmamaktadır.

Kompozit doku allotransplantasyonu uyguladığımız deneysel çalışmamızda preoperatif, postoperatif 3. ve 5. gün elde ettiğimiz veriler ışığında IL-6, IL-10, CRP ve SAA'nın akut rejeksiyon reaksiyonlarının takibinde kullanılabilecek, istatistiksel olarak anlamlı parametreler olduğunu tespit edildi. Bu parametrelerin klinik uygulamalarda kullanılabilirliği açısından insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

5. SONUÇ

Bu çalışmada ekstremitte kompozit doku allotransplantasyonu uygulanan sıçanlarda, rejeksiyon reaksiyonlarının erken dönemde teşhis edilmesi amacıyla, akut dönemde meydana gelen değişiklikler IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , Serum Amiloid A (SAA), C5a, CRP ve neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) parametreleri ışığında değerlendirilmiştir. Çalışmada, deneysel veriler toplanarak biyokimyasal analizler ve istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Biyokimyasal analizlerle elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri sonucunda, çalışılan parametrelerden IL-6, IL-10, SAA ve CRP' nin akut dönemdeki değişimleri rejeksiyon reaksiyonlarını göstermede anlamlı bulunmuştur. Elde edilen somut veriler ile reaksiyonların kliniğe henüz yansımadan laboratuvar değerleri ile tespit edilebildiğini göstermiştir. Mevcut markerlar kullanılarak allotransplantasyon uygulanmış olgular klinik takipte rejeksiyon açısından monitörize edilebilir ve uygun rejeksiyon tedavileri planlanabilir. Elde edilen bilgilerin kliniğe uyarlanabilmesi amacıyla insan çalışmalarının yapılması gereklidir. Bununla birlikte daha spesifik ve sensitif parametrelerin tespitine ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, et al. Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet*. 1999;353(9161):1315-20.
2. Hewitt CW, Black KS, Fraser LA, Howard EB, Martin DC, Achauer BM, et al. Composite tissue (limb) allografts in rats. I. Dose-dependent increase in survival with cyclosporine. *Transplantation*. 1985;39(4):360-4.
3. Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, Howard EB, Martin DC, Achauer BM, et al. Composite tissue (limb) allografts in rats. II. Indefinite survival using low-dose cyclosporine. *Transplantation*. 1985;39(4):365-8.
4. Gorantla VS, Barker JH, Jones JW, Jr., Prabhune K, Maldonado C, Granger DK. Immunosuppressive agents in transplantation: mechanisms of action and current anti-rejection strategies. *Microsurgery*. 2000;20(8):420-9.
5. Cendales L, Hardy MA. Immunologic considerations in composite tissue transplantation: overview. *Microsurgery*. 2000;20(8):412-9.
6. Weissenbacher A, Hautz T, Pratschke J, Schneeberger S. Vascularized composite allografts and solid organ transplants: similarities and differences. *Current opinion in organ transplantation*. 2013;18(6):640-4.
7. Weissenbacher A, Boesmueller C, Brandacher G, Oellinger R, Pratschke J, Schneeberger S. Alemtuzumab in solid organ transplantation and in composite tissue allotransplantation. *Immunotherapy*. 2010;2(6):783-90.
8. Gordon CR, Nazzari J, Lozano-Calderan SA, Lee SG, Lee WP, Siemionow M, et al. From experimental rat hindlimb to clinical face composite tissue allotransplantation: historical background and current status. *Microsurgery*. 2006;26(8):566-72.
9. Limb. CaDRA. Cosmos and Damian Restoring A Limb. 2007. Ref Type: Internet Communication: <http://www.umm.maine.edu/faculty/necastro/medica/?q=medica>.
10. Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet*. 1979;1(8113):433.
11. Levashov Yu N, Yablonsky PK, Cherny SM, Orlov SV, Shafirovsky BB, Kuznetsov IM. One-stage allotransplantation of thoracic segment of the trachea in a patient with idiopathic fibrosing mediastinitis and marked tracheal stenosis. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 1993;7(7):383-6.
12. Klepetko W, Marta GM, Wisser W, Melis E, Kocher A, Seebacher G, et al. Heterotopic tracheal transplantation with omentum wrapping in the abdominal position preserves functional and structural integrity of a human tracheal allograft. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2004;127(3):862-7.
13. Hofmann GO, Kirschner MH, Wagner FD, Land W, Bühren V. Allogeneic vascularized grafting of a human knee joint with postoperative immunosuppression. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 1997;116(3):125-8.
14. Hofmann GO, Kirschner MH, Wagner FD, Brauns L, Gonschorek O, Bühren V. Allogeneic vascularized grafting of human knee joints under postoperative immunosuppression of the recipient. *World journal of surgery*. 1998;22(8):818-23.
15. Birchall M. Human laryngeal allograft: shift of emphasis in transplantation. *Lancet*. 1998;351(9102):539-40.
16. Guimberteau JC, Baudet J, Panconi B, Boileau R, Potaux L. Human allotransplant of a digital flexion system vascularized on the ulnar pedicle: a

preliminary report and 1-year follow-up of two cases. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992;89(6):1135-47.

17. Mackinnon SE, Hudson AR. Clinical application of peripheral nerve transplantation. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992;90(4):695-9.

18. Birchall M. Tongue transplantation. *Lancet*. 2004;363(9422):1663.

19. Levi DM, Tzakis AG, Kato T, Madariaga J, Mittal NK, Nery J, et al. Transplantation of the abdominal wall. *Lancet*. 2003;361(9376):2173-6.

20. Devauchelle B, Badet L, Lengele B, Morelon E, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. *Lancet*. 2006;368(9531):203-9.

21. Facial Transplantation - ASRM/ASPS Guiding Principles <http://www.microsurg.org/ft.htm>. 2007. 8-22-2007. Ref Type: Internet Communication.

22. Womer KL, Sayegh MH, Auchincloss H, Jr. Involvement of the direct and indirect pathways of allorecognition in tolerance induction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2001;356(1409):639-47.

23. Bourget JL, Mathes DW, Nielsen GP, Randolph MA, Tanabe YN, Ferrara VR, et al. Tolerance to musculoskeletal allografts with transient lymphocyte chimerism in miniature swine. *Transplantation*. 2001;71(7):851-6.

24. Lee WP, Rubin JP, Bourget JL, Cober SR, Randolph MA, Nielsen GP, et al. Tolerance to limb tissue allografts between swine matched for major histocompatibility complex antigens. *Plastic and reconstructive surgery*. 2001;107(6):1482-90; discussion 91-2.

25. Buttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U. Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plastic and reconstructive surgery*. 1996;97(1):139-48; discussion 49-51.

26. Cendales LC, Kirk AD, Moresi JM, Ruiz P, Kleiner DE. Composite tissue allotransplantation: classification of clinical acute skin rejection. *Transplantation*. 2005;80(12):1676-80.

27. Kanitakis J, Jullien D, Petruzzo P, Hakim N, Claudy A, Revillard JP, et al. Clinicopathologic features of graft rejection of the first human hand allograft. *Transplantation*. 2003;76(4):688-93.

28. Kanitakis J, Badet L, Petruzzo P, Beziat JL, Morelon E, Lefrancois N, et al. Clinicopathologic monitoring of the skin and oral mucosa of the first human face allograft: Report on the first eight months. *Transplantation*. 2006;82(12):1610-5.

29. Klimczak A, Siemionow M. Immune responses in transplantation: application to composite tissue allograft. *Seminars in plastic surgery*. 2007;21(4):226-33.

30. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunological reviews*. 2003;196:51-64.

31. Womer KL, Lee RS, Madsen JC, Sayegh MH. Tolerance and chronic rejection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2001;356(1409):727-38.

32. Hettiarachy S, Randolph MA, Petit F, Lee WP, Butler PE. Composite tissue allotransplantation--a new era in plastic surgery? *British journal of plastic surgery*. 2004;57(5):381-91.

33. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clinical immunology and immunopathology*. 1996;80(3 Pt 2):S40-5.

34. Jensen JN, Mackinnon SE. Composite tissue allotransplantation: a comprehensive review of the literature--Part II. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2000;16(2):141-57.
35. Benhaim P, Anthony JP, Lin LY, McCalmont TH, Mathes SJ. A long-term study of allogeneic rat hindlimb transplants immunosuppressed with RS-61443. *Transplantation*. 1993;56(4):911-7.
36. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney international*. 2001;59(1):3-16.
37. Lanzetta M, Petruzzo P, Dubernard JM, Margreiter R, Schuind F, Breidenbach W, et al. Second report (1998-2006) of the International Registry of Hand and Composite Tissue Transplantation. *Transplant immunology*. 2007;18(1):1-6.
38. Murase N, Starzl TE, Tanabe M, Fujisaki S, Miyazawa H, Ye Q, et al. Variable chimerism, graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to brown Norway rats. *Transplantation*. 1995;60(2):158-71.
39. Ramsamooj R, Llull R, Black KS, Hewitt CW. Composite tissue allografts in rats: IV. Graft-versus-host disease in recipients of vascularized bone marrow transplants. *Plastic and reconstructive surgery*. 1999;104(5):1365-71.
40. Hirano T. The biology of interleukin-6. *Chemical immunology*. 1992;51:153-80.
41. Woodroffe MN, Cuzner ML. Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: detection by non-radioactive in situ hybridization. *Cytokine*. 1993;5(6):583-8.
42. Licinio J, Kling MA, Hauser P. Cytokines and brain function: relevance to interferon-alpha-induced mood and cognitive changes. *Seminars in oncology*. 1998;25(1 Suppl 1):30-8.
43. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Advances in immunology*. 1993;54:1-78.
44. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989;74(1):1-10.
45. Önder F, Keskin E. İnterlökinlerin biyolojik etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2006;9:127-38.
46. Ringheim GE, Burgher KL, Heroux JA. Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain. *Journal of neuroimmunology*. 1995;63(2):113-23.
47. Dahle DO, Mjoen G, Oqvist B, Schamagl H, Weihrauch G, Grammer T, et al. Inflammation-associated graft loss in renal transplant recipients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(11):3756-61.
48. Karczewski M, Karczewski J, Poniedzialek B, Wiktorowicz K, Smietanska M, Glyda M. Distinct cytokine patterns in different states of kidney allograft function. *Transplantation proceedings*. 2009;41(10):4147-9.
49. Berber I, Yigit B, Isitmangil G, Tellioglu G, Ozgezer T, Gulle S, et al. Evaluation of pretransplant serum cytokine levels in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings*. 2008;40(1):92-3.
50. De Serres SA, Mfarrej BG, Grafals M, Riella LV, Magee CN, Yeung MY, et al. Derivation and validation of a cytokine-based assay to screen for acute rejection in renal transplant recipients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2012;7(6):1018-25.

51. Rich RR, MD, Philip M. Murphy. Clinical Immunology, Fourth Edition, chapter 10, p136-148. Elsevier. 2013.
52. Leslie JA, Meldrum KK. The role of interleukin-18 in renal injury. The Journal of surgical research. 2008;145(1):170-5.
53. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. Cytokine & growth factor reviews. 2001;12(1):53-72.
54. Gauer S, Sichler O, Obermuller N, Holzmann Y, Kiss E, Sobkowiak E, et al. IL-18 is expressed in the intercalated cell of human kidney. Kidney international. 2007;72(9):1081-7.
55. Liu Z, Wang LX, Wang FL, Qin WJ, Zhang G, Wang H, et al. [Significance of sequential monitoring of serum IL-18 in renal allograft recipients]. Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology. 2008;24(11):1082-3.
56. Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, Volanakis JE. C-reactive protein: structural biology and host defense function. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC. 1999;37(3):265-70.
57. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, et al. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? Circulation. 1999;100(1):96-102.
58. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. The New England journal of medicine. 1999;340(6):448-54.
59. Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. Immunopharmacology. 1999;42(1-3):23-30.
60. Whicher J, Biasucci L, Rifai N. Inflammation, the acute phase response and atherosclerosis. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC. 1999;37(5):495-503.
61. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ, 3rd, et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. The Journal of experimental medicine. 1997;185(1):171-5.
62. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG. Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. The Journal of clinical investigation. 1997;100(3):522-9.
63. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. The Journal of pathology. 2008;214(2):149-60.
64. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. Journal of lipid research. 2007;48(4):751-62.
65. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughon K, et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. Nature cell biology. 2004;6(2):97-105.
66. Simmonds RE, Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. Rheumatology (Oxford, England). 2008;47(5):584-90.
67. Malyszko J, Malyszko JS, Mysliwiec M. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin correlates with kidney function in renal allograft recipients. Clinical transplantation. 2009;23(5):681-6.

68. Halawa A. The early diagnosis of acute renal graft dysfunction: a challenge we face. The role of novel biomarkers. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*. 2011;16(1):90-8.
69. Lee EY, Kim MS, Park Y, Kim HS. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 as predictive biomarkers for delayed graft function after kidney transplantation. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2012;26(4):295-301.
70. Mishra J, Ma Q, Kelly C, Mitsnefes M, Mori K, Barasch J, et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2006;21(6):856-63.
71. Cheng CW, Chen YC, Chang CH, Yu HP, Lin CC, Yang MW, et al. The ratio of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury in patients undergoing liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2012;44(3):776-9.
72. Magnusson NE, Hornum M, Jorgensen KA, Hansen JM, Bistrup C, Feldt-Rasmussen B, et al. Plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) is associated with kidney function in uraemic patients before and after kidney transplantation. *BMC nephrology*. 2012;13:8.
73. Portal AJ, McPhail MJ, Bruce M, Coltart I, Slack A, Sherwood R, et al. Neutrophil gelatinase--associated lipocalin predicts acute kidney injury in patients undergoing liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(11):1257-66.
74. Benson MD, Cohen AS. Serum amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic, and neoplastic diseases. *Arthritis and rheumatism*. 1979;22(1):36-42.
75. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *The New England journal of medicine*. 1994;331(7):417-24.
76. Rother K, and G.O Till (Eds). *The Complement System*. Springer-Heidelberg- New York. 1998.
77. Hugli TE. Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin Immunopathol* 7193-219. 1984.
78. Morgan E. Modulation of immune response by anaphylatoxins. *Complement* 3: 128-136. 1986.
79. Yancey KB. Biological properties of human C5a: selected in vitro and in vivo studies. *Clin Exp Immunol* 71: 207-210. 1988.
80. Dalmaso AP. Complement in the pathophysiology and diagnosis of human diseases. *Crit Rev Clin Lab* 24: 123-183. 1986.
81. Hummerschmidt DE. Clinical utility of complement anaphylotoxin assay. *Complement* 3: 166-176. 1986.
82. Müller T, et al. Detection of renal allograft rejection by complement C5a and TCC in plasma and urine. *ILab Clin Med*. 1996.
83. Zdichavsky M, Jones JW, Ustuner ET, Ren X, Edelstein J, Maldonado C, et al. Scoring of skin rejection in a swine composite tissue allograft model. *The Journal of surgical research*. 1999;85(1):1-8.
84. Lee WP, Yaremchuk MJ, Pan YC, Randolph MA, Tan CM, Weiland AJ. Relative antigenicity of components of a vascularized limb allograft. *Plastic and reconstructive surgery*. 1991;87(3):401-11.
85. Gammie JS, Pham SM. Simultaneous donor bone marrow and cardiac transplantation: can tolerance be induced with the development of chimerism? *Curr Opin Cardiol*. 1999;14(2):126-32.

86. Benichou G, Tonsho M, Tocco G, Nadazdin O, Madsen JC. Innate immunity and resistance to tolerogenesis in allotransplantation. *Frontiers in immunology*. 2012;3:73.
87. Reek C, Conrad S, Huland H. The role of C-reactive protein in graft dysfunction after renal transplantation. *J Urol*. 1999;161(5):1463-6.
88. Bruzzone P, Sganga G, Castagneto M, Nanni G, Castiglioni GC. Temporal patterns of C-reactive protein and other acute phase proteins after kidney transplantation. *Transplantation proceedings*. 1987;19(5):3727-30.
89. Fukuda Y, Hoshino S, Tanaka I, Yoneya T, Takeshita T, Sumimoto R, et al. Examination of serum amyloid A protein in kidney transplant patients. *Transplantation proceedings*. 2000;32(7):1796-8.
90. Fukuda Y, Kanbe M, Sumimoto R, Yoneya T, Takeshita T, Hoshino S, et al. Examination of serum amyloid A protein in kidney transplant patients--comparison of serum amyloid A and C-reactive protein for monitoring the occurrence of renal-allograft-related complications. *Hiroshima J Med Sci*. 1998;47(2):63-7.
91. Muller TF, Kraus M, Neumann C, Lange H. Detection of renal allograft rejection by complement components C5A and TCC in plasma and urine. *J Lab Clin Med*. 1997;129(1):62-71.
92. Kirschfink M, Wienert T, Rother K, Pomer S. Complement activation in renal allograft recipients. *Transplantation proceedings*. 1992;24(6):2556-7.
93. Keen LJ, DeFor TE, Bidwell JL, Davies SM, Bradley BA, Hows JM. Interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha region haplotypes predict transplant-related mortality after unrelated donor stem cell transplantation. *Blood*. 2004;103(9):3599-602.
94. Fitzgerald JT, Johnson JR, Perez RV. Pre-transplant elevations of interleukin-12 and interleukin-10 are associated with acute rejection after renal transplantation. *Clinical transplantation*. 2004;18(4):434-9.

7. ÖZET

KOMPOZİT DOKU ALLOTRANSPLANTASYONUNDA AKUT DÖNEMDE GÖRÜLEN İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi Konya 2015.

Bir yapının rekonstrüksiyonunun en iyi yolu, o dokunun benzeri ile replasmanıdır. Kompozit doku allotransplantasyonu, deri, kemik, damar, sinir, kıkırdak gibi çeşitli dokular içeren anatomik yapıların transplantasyonu şeklinde tariflenmektedir. Allotransplantasyon sonrası akut ve kronik dönemde çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar allogreft kaybına sebep olan en sık nedendir. Akut dönemde meydana gelen bazı değişikliklerin daha iyi araştırılmasına ihtiyaç vardır. Çalışmamızın amacı kompozit doku nakli alıcılarında, allogreft fonksiyonunun takibi, immün yükün oluşturduğu sistemik hasar ve akut rejeksiyon tanısında serum IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , Serum Amiloid A (SAA), C5a, CRP ve neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) seviyelerinin kullanılabilirliğini değerlendirmektir.

Bu çalışmada, akut dönemde bazı serum değişkenleri incelenmiştir. İmmünsüpresyon uygulanmadan yapılan kompozit doku allotransplantasyonunun bu serum değişkenlerine etkileri araştırılmıştır.

Transplantasyondan önce, transplantasyondan sonra birinci, üçüncü, ve beşinci günde kan örnekleri toplandı. Transplantasyondan beş gün sonra alıcı sıçanlar kurban edildi. Kan değerleri karşılaştırılarak veriler toplandı. Bulgular istatistiksel analizlerle değerlendirildi.

Biyokimyasal analizlerle elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri sonucunda, çalışılan parametrelerden IL-6, IL-10, SAA ve CRP' nin akut dönemdeki değişimleri rejeksiyon reaksiyonlarını göstermede anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte daha spesifik ve sensitif parametrelerin tespitine ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler; Kompozit doku, allotransplantasyon, immünoloji.

8. ABSTRACT

IMMUNOLOGICAL CHANGES OBSERVED IN ACUTE PHASE OF COMPOSITE TISSUE ALLOTRANSPLANTATION

The best way to reconstruct a structure is to replace it with its similar. Composite tissue allotransplantation is being described as transplantation of anatomical structures including skin, bone, vessel, nerve, cartilage. After allotransplantation, various biochemical reactions occur in acute and chronic phases. These reactions are the most common reason of allograft loss. Some changes that occur in acute phase need more research. The aim of our study is to evaluate the availability of serum IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , serum amyloid A (SAA), C5a, CRP and neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) levels in the diagnosis of allograft function follow-up, systemic damage formed by immune load and acute rejection in composite tissue receivers.

In this study, some serum variables were examined. The effects of composite tissue allotransplantation which performed without immunosuppressions on these serum variables were investigated.

Blood samples were collected before transplantation, after first day, third day and fifth day of the transplantation. Receiver rats were sacrificed five day after the transplantation. Data were collected by comparing the blood values. Findings were evaluated with statistical analysis.

As a result of evaluation of the data's statistical analysis that collected from biochemical analysis, the acute phase changes of IL-6, IL-10, SAA and CRP was found significant for indicating the rejection reactions among the studied parameters. However, it is need for detection of more specific and sensitive parameters.

Keywords; Composite tissue, allotransplantation, immunology

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı: Araş. Gör. Dr. Malik ABACI

Doğum Yeri ve Tarihi : HATAY, 27.08.1984

Ev Adresi : Şeyh Şamil Mah. Eylül Sk. Yenikent Kardelen Sitesi P/46

Gsm : 0531 99 44 823

İş Adresi : Selçuk Ün. Selçuklu Tıp Fak. Plastik ve Rek. Cerrahi A.D. / KONYA

İş Telefonu: 0 332 224 52 55

Medeni Hali : Evli

Eğitim :

İlkokul: Sutaşı İlk Öğretim Okulu (Hatay)

Ortaokul: Hacı Hasibe Hüzmeli İlköğretim Okulu (Hatay)

Lise: Samandağ Lisesi /Y.D.A (Hatay)

Üniversite: Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi (Düzce)

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Y. Lisans	Tıp	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi	2009
Tıpta Uzmanlık	Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi	Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi	2015

Tıpta Uzmanlık Tezi Başlığı: “KOMPOZİT DOKU
ALLOTRANSPLANTASYONUNDA AKUT DÖNEMDE GÖRÜLEN
İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER”

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Mehtap KARAMEŞE

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş.Gör. Dr	Selçuklu Tıp Fakültesi Selçuk Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi (KONYA)	2009-2015