

**T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER TRANSPLANTASYONU
OLGULARINDA ERKEN İMMÜN
İYİLEŞME DÖNEMİNDE B HÜCRE
KİNETİĞİNİN, KREC (Kappa Deleting
Recombination Excision Circle)
DÜZEYİ İLE İZLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

ZEYNEP AKBULUT

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. GÜLDEREN YANIKKAYA DEMİREL**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


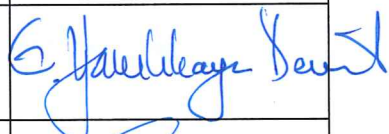
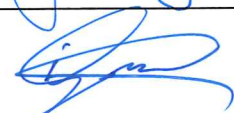
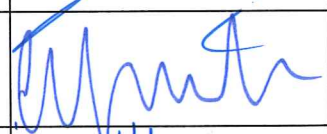

Program : Multidisipliner Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Tez Başlığı : Akciğer Transplantasyonu Olgularında Erken İmmün İyileşme Döneminde B hücre Kinetiğinin KREC (Kappa Deleting Recombination Excision Circle) Düzeyi ile İzlenmesi

Tez Sahibi : Zeynep Akbulut

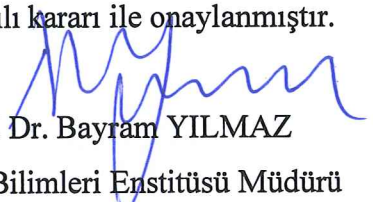
Sınav Tarihi : 20 Mart 2017

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı	Prof Dr Turgay İsbir Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD /Sağlık Bilimleri Enstitüsü /Moleküler Tıp ABD	
Üye: (Tez danışmanı)	Doç.Dr. Gülderen Yanıkkaya Demirel Yeditepe Üniversitesi İmmünoloji A.D	
Üye:	Prof. Dr. İlhan Yaylım İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp A.D	
Üye:	Prof.Dr. Cemal Asım Kutlu Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi A.D	
Üye:	Doç. Dr. Hasan Atilla Özkan Yeditepe Üniversitesi İç Hastalıkları A.D	

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 3.1/03/2017 tarih ve 2017/06-01.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Zeynep Akbulut



İTHAF

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili Anne ve Babam'a ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince deneysel çalışmalarım için laboratuvar olanaklarını sağlayan ve bu süreç içinde katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Gülderen Yanıkkaya Demirel'e, değerli katkıları ve desteği için bölüm başkanımız Sn. Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Deneysel çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgi ve yardımlarından dolayı Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı, Kök Hücre Laboratuvarı ve Genetik Tanı Merkezi Laboratuvarı hocalarına ve çalışanlarına, değerli katkılarından dolayı Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sn.Yrd. Doç. Dr. Timuçin Avşar'a,

Tezim için hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs Cerrahisi Kliniği Uzmanları Sn. Prof. Dr. Cemal Asım Kutlu, Sn. Doç. Dr. Ali Yeğinsu, Sn.Uzm. Dr. Mustafa Vayvada ve Göğüs Hastalıkları Uzmanı Sn. Yrd. Doç. Dr. Merih Kalamanoğlu Balcı'ya,

Doktora eğitimime başlamamda ve sonrasında vermiş olduğu destek ve ilgiden dolayı sorumlu hekimim Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Transfüzyon Merkezi Direktörü Sn. Prof. Dr. Meral Sönmezoğlu ve tüm mesai arkadaşlarıma,

Tez çalışmam süresince her anlamda yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen başta kıymetli dostum F. Tuba Akdeniz olmak üzere tüm arkadaşlarım ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xvi
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İmmün Sistem Nedir.....	4
2.1.1. İmmünite ve İmmün Sistem.....	4
2.1.2. Doğal ve Edinsel İmmünite.....	4
2.1.2.1. Edinsel İmmünite Çeşitleri.....	5
2.1.2.2. Edinsel İmmünitenin Özellikleri.....	6
2.1.3. Edinsel İmmünitede Antijen Tanıma.....	7
2.2. Hümorale İmmünite.....	7
2.2.1. Hümorale İmmünitenin Genel Özellikleri.....	8
2.3. B Lenfositler.....	9
2.3.1. B Lenfosit Gelişimi.....	9
2.3.1.1. Progenitör Hücre Proliferasyonu ve B Hücre Hattı	12
2.3.2. Antikorlar ve Yapıları.....	16
2.3.2.1. Antikorların Ağır Zincir Sınıf (İzotip) Dönüşümü.....	17
2.3.2.2. Antikorların Antijen Afinitelerinin Olgunlaşması.....	19

2.3.2.3.B Lenfosit Gelişiminde Pozitif ve Negatif Seçilim.....	20
2.3.2.4. B Lenfosit Aktivasyonu ve Antikor Üretimi.....	21
2.4. B Lenfositlerde Antijen Reseptör Gen Yeniden Düzenlenmesi	22
2.4.1. Ig Gen Lokusunun Organizasyonu.....	23
2.4.2. V(D)J Rekombinasyonu.....	25
2.4.3. V(D)J Rekombinasyon Mekanizması.....	28
2.5. Kappa Deleting Excision Circle (KREC).....	31
2.5.1. KREC Oluşum Mekanizması.....	31
2.5.2. KREC Seviyesinin Belirlenmesinin Önemi.....	35
2.5.3. T Cell Receptor Alpha Chain (TCRAC).....	36
2.6. Akciğer Transplantasyonu.....	37
2.6.1. Akciğer Transplantasyonu Endikasyonları.....	38
2.6.1.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH).....	38
2.6.1.2. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (IPF).....	39
2.6.1.3. Kistik Fibrozis (KF).....	39
2.6.1.4. Silikozis.....	40
2.6.1.5. Bronşiektazi.....	41
2.6.2. Transplant İmmünolojisi ve Solid Organ Transplantasyonu.....	41
2.6.2.1. Akciğer Transplantında Doğal ve Hümorale İmmünite.....	42
2.6.2.2. Alloantijenlerin Tanınması.....	44
2.6.3. Transplant ve B Lenfositler.....	45
2.7. Akciğer Transplantasyonu ve Sitokinler.....	47
2.7.1. Sitokin Nedir?.....	47
2.7.2. Sitokinlerin İmmün Cevapta Rolü ve Önemi.....	48
2.7.3. Akciğer Transplantında Sitokinlerin Önemi.....	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	53

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı.....	53
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	53
3.3. Kullanılan Gereçler.....	54
3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	54
3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	54
3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....	54
3.4.1.2. Lökosit Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer- WBL).....	55
3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl).....	55
3.4.1.4. 9 M Amonyum Asetat.....	55
3.4.1.5. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	55
3.4.1.6. %8'lik Dodecyltrimethylammoniumbromide (DTAB) buffer.....	55
3.4.1.7. Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) buffer.....	56
3.4.1.8. 0,1M Sodyum sitrat (%10 Etanol içinde).....	56
3.4.1.9. %75'lik Etanol.....	56
3.4.1.10. 1,2 M Sodyum Klorür.....	56
3.4.2. Agaroz Jel Elektrofrezde Kullanılan Çözeltiler.....	56
3.4.2.1. %4'lük Agaroz.....	56
3.4.2.2. 1X Tris-Borat-Etilendiamintetraasetat (TBE).....	56
3.4.3. Örneklerin Dondurularak Saklanması Kullanılan Çözeltiler.....	57
3.4.3.1. %10 FBS'li Roswell Park Memorial Institue (RPMI 1640) Medyumu.....	57
3.4.3.2. Lizat Solüsyonu.....	57
3.4.3.3. %10 Voluven ve %5 Dimetil sülfid (DMSO)'li RPMI Medyumu.....	57
3.5. Kullanılan Yöntemler.....	57
3.5.1. Hasta Örneklerinin Saklanması.....	57
3.5.2. Dondurulmuş Hücrelerin Çözündürülmesi.....	58
3.5.3. RNA Later ile Saklanmış Tam Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	58
3.5.3.1. Tuz Çöktürme Yöntemi ile DNA İzolasyonu.....	58
3.5.3.2. Ticari Kitler ile DNA İzolasyonu.....	59
3.5.3.3. DTAB-CTAB Buffer ile DNA İzolasyonu.....	59
3.5.3.4. Robot ile DNA İzolasyonu.....	60

3.5.4.Tam Kandan Lize Edilerek Ayrıştırılan Dondurulmuş Lökosit Hücrelerinden DNA İzolasyonu.....	60
3.5.4.1. DTAB-CTAB Buffer ile DNA İzolasyonu.....	60
3.5.4.2. Trizol ile DNA İzolasyonu.....	60
3.5.5. Elde Edilen DNA'ların Düzey ve Kalitesinin Tayini.....	62
3.5.6. Validasyon Yöntemi.....	62
3.6. KREC Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Yöntemi ile Çoğaltılması.....	63
3.6.1. PZR Yöntemi.....	63
3.6.2. KREC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için Kullanılan Primer Dizileri.....	64
3.6.3.KREC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için PZR Karışımının Optimizasyonu.....	64
3.6.4.KREC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için PZR Koşullarının Optimizasyonu.....	65
3.6.5. KREC PZR Ürünlerinin Kontrolü.....	66
3.6.6. PZR' da Çoğaltılan KREC DNA'sının Jelden Pürifikasyonu.....	69
3.6.7. Jelden Pürifiye Edilen KREC Geninin Kopya Sayısının Hesaplanması.....	69
3.7. TCRAC Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması.....	69
3.7.1. TCRAC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için Kullanılan Primer Dizileri.....	69
3.7.2.TCRAC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için Hazırlanan PZR Karışımının Optimizasyonu.....	70
3.7.3.TCRAC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için PZR Koşullarının Optimizasyonu.....	70
3.7.4. TCRAC PZR Ürünlerinin Kontrolü.....	71
3.7.5. PZR' da Çoğaltılan TCRAC DNA'sının Jelden Pürifikasyonu.....	72
3.7.6. Jelden Pürifiye Edilen TCRAC Geninin Kopya Sayısının Hesaplanması.....	73
3.8. Standart DNA Örneklerinin Dilüsyonu.....	73

3.9. KREC ve TCRAC için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR).....	74
3.9.1. KREC Geni için Kullanılan Primer ve Prob Dizileri.....	74
3.9.2. TCRAC Geni için Kullanılan Primer ve ProbDizileri.....	74
3.9.3. KREC için GT-PZR Protokolü.....	75
3.9.4. TCRAC için GT-PZR Protokolü.....	76
3.10. Sonuçların Sayısal Değerlendirilmesi.....	77
3.11. Sitokin Analizi.....	78
3.11.1. Sitokin Kiti Çözeltilerinin Hazırlanması.....	79
3.11.2. Sitokin Analizi Test Protokolü ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	80
3.12. Araştırmada Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	81
4. BULGULAR.....	82
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	110
KAYNAKLAR.....	122
HAM VERİLER.....	130
FORMLAR.....	138
ETİK KURUL KARARI-1.....	139
ETİK KURUL KARARI-2.....	140
ETİK KURUL KARARI-3.....	141
ÖZGEÇMİŞ.....	142

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. KOAH hastalarının transplant listesine alınmaları için gerekli kriterler.....	38
Tablo 2.2. IPF hastalarının transplant listesine alınmaları için gerekli kriterler.....	39
Tablo 2.3. Kistik fibrozisli hastaların nakil olma kriterleri.....	40
Tablo 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan örnek türleri ve uygulanan metodlar.....	61
Tablo 3.2. KREC gen bölgesinin çoğaltılması için PZR’da yapılan denemeler.....	65
Tablo 3.3. KREC gen bölgesinin çoğaltılması için PZR reaksiyonu termal profil şartları.....	65
Tablo 3.4. TCRAC gen bölgesinin çoğaltılması için PZR’da yapılan denemeler.....	70
Tablo 3.5. TCRAC gen bölgesinin çoğaltılması için PZR reaksiyonu termal profil şartları.....	71
Tablo 3.6. KREC ve TCRAC genleri için PZR’da yapılan optimizasyon çalışmalarının bir arada gösterilmesi.....	77
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait bilgiler.....	82
Tablo 4.2. Hasta grubunda üç zaman dilimine ait kan parametrelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	85
Tablo 4.3. Hasta grubunda üç farklı zaman dilimindeki KREC seviyelerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	86
Tablo 4.4. Hasta grubunda transplant öncesi KREC düzeyleri ve KREC kopya sayısı ile kan parametreleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi	88
Tablo 4.5. Hasta grubunda 24. saat zaman dilimine ait KREC düzeyleri ve KREC kopya sayısı ile kan parametreleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi	89
Tablo 4.6. Hasta grubunda 7. gün zaman dilimine ait KREC düzeyleri ve KREC kopya sayısı ile kan parametreleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi	90
Tablo 4.7. Hasta grubunda yaş limitine göre üç zaman dilimine ait KREC düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi	91
Tablo 4.8. Hasta grubunda yaş limitine göre üç zaman dilimine ait KREC kopya sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi	92

Tablo 4.9. Cinsiyete göre hasta grubunun üç zaman diliminde KREC düzeyleri ortalamalarının istatistiksel değerlendirilmesi	93
Tablo 4.10. Cinsiyete göre hasta grubunun üç zaman diliminde KREC kopya sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	94
Tablo 4.11. Hasta grubunda FEV1 değerleri ile üç zaman dilimine ait KREC düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi	96
Tablo 4.12. Hasta grubunda FEV1 değerleri ile üç zaman dilimine ait KREC kopya sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi	97
Tablo 4.13. Hasta ve kontrol gruplar arasında sitokin parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi	98
Tablo 4.14. Hasta grubunda preop zaman diliminde KREC düzey ve KREC kopya sayısı ile sitokin parametreleri arasındaki korelasyonun istatistiksel değerlendirilmesi.....	99
Tablo 4.15. Hasta grubunda 24. saatte KREC düzey ve KREC kopya sayısı ile sitokin parametreleri arasındaki korelasyonun istatistiksel değerlendirilmesi.....	100
Tablo 4.16. Hasta grubunda 7. günde KREC düzey ve KREC kopya sayısı ile sitokin parametreleri arasındaki korelasyonun istatistiksel değerlendirilmesi	101
Tablo 4.17. Hasta grubunda IL-8 ve MCP-1 ortalamalarının üç zaman dilimine göre istatistiksel değerlendirilmesi.....	102
Tablo 4.18. Hasta grubunda CD40L ve sP-selektin ortalamalarının üç zaman dilimine göre istatistiksel değerlendirilmesi	102
Tablo 4.19. Hasta grubunda IL-6 ve t-PA ortalamalarının üç zaman dilimine göre istatistiksel değerlendirilmesi.....	103
Tablo 4.20. Hasta grubu ve farklı dilüsyonlardaki standart DNA'ların KREC gen bölgesine yönelik GZ-PZR rapor örneği.....	104
Tablo 4.21. Hasta grubu ve farklı dilüsyonlardaki standart DNA'ların TCRAC gen bölgesine yönelik GZ-PZR rapor örneği.....	107

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Doğal ve edinsel immünite hücreleri ve etkin oldukları süre.....	5
Şekil 2.2. Farklı B lenfosit tipleri ile farklı antikor tanıma.....	9
Şekil 2.3. B hücre üretimi.....	10
Şekil 2.4.a. Aktive olmamış B hücresi elektron mikroskop görüntüsü b. Plazma hücresi elektron mikroskop görüntüsü.....	11
Şekil 2.5. Hümorale immünitenin evreleri.....	11
Şekil 2.6. B lenfosit alt tiplerinin gelişimi.....	13
Şekil 2.7. B hücre olgunlaşma safhaları.....	14
Şekil 2.8. B lenfositlerin gelişme ve farklılaşma gösterdikleri yerler.....	15
Şekil 2.9.a. Antikor genel yapısı şematik gösterimi b. IgG antikor yapısı şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.10. Hümorale immün cevap boyunca antikor yapısındaki değişiklikler.....	18
Şekil 2.11.B Hücresinde sinyal iletiminin şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.12. İnsan Ig gen soy hattı organizasyonu.....	23
Şekil 2.13. Ig zincirlerinde yer alan domainlerin şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.14.a. Ig μ (mü) ağır zincir oluşumu b. Ig κ (kappa) hafif zincir oluşumu.....	26
Şekil 2.15. V(D)J gen yeniden düzenlemesi ile allelik dışlama ve işlevsel olgun B hücre sağ kalım arasındaki ilişki.....	27
Şekil 2.16.V(D)J rekombinasyon aşamalarının şematik gösterimi.....	30
Şekil 2.17.KREC oluşumunun şematik gösterimi.....	32
Şekil 2.18.B hücre gelişimi boyunca Ig κ (kappa) ve Ig λ (lambda) zincirleri oluşumunun şematik gösterimi.....	33
Şekil 2.19.Sinyal ve kodlama parçasının yeni hücrelere aktarımının şematik gösterimi.....	34
Şekil 2.20. B hücre farklılaşma basamaklarında KREC oluşumunun şematik gösterimi.....	35
Şekil 2.21. Alloantijenlerin direkt ve indirekt tanınmasının şematik gösterimi.....	45
Şekil 3.1. Validasyon yöntemi iş akış şeması.....	63
Şekil 3.2.a. 58°C annealing sıcaklığında ve 0,9 μ L primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü.....	66

Şekil 3.2.b. 58°C annealing sıcaklığında ve 0,5 µL primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü.....	67
Şekil 3.2.c. 60°C annealing sıcaklığında ve 0,9 µL primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü.....	67
Şekil 3.2.d. 61°C annealing sıcaklığında ve 0,5 µL primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü.....	68
Şekil 3.2.e. 62°C annealing sıcaklığında ve 0,5 µL primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü.....	68
Şekil 3.3.a. 60°C annealing sıcaklığında ve 0,9 µL primer ile PZR'da çoğaltılan TCRAC geni jel elektroforez görüntüsü.....	72
Şekil 3.3.b. 62°C annealing sıcaklığında, 0,5 µL ve 0,9 µL primer ile PZR'da çoğaltılan TCRAC geni jel elektroforez görüntüsü.....	72
Şekil 3.4. Akan hücre ölçer ile sitokin ölçümü prosedürü şematik gösterimi.....	79
Şekil 4.1. Üç zaman diliminde KREC düzeyleri ortalamalarındaki değişimi gösteren grafik	87
Şekil 4.2. Yaşa göre KREC kopya sayıları (ml) korelasyonunu gösteren grafik.....	92
Şekil 4.3. Primer tanı gruplarına göre üç zaman dilimindeki KREC düzeylerinin grafiği.....	95
Şekil 4.4. Primer tanı gruplarına göre üç zaman dilimindeki KREC kopya sayısı grafiği.....	95
Şekil 4.5. Sitokin ortalamalarının hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırma grafiği.....	98
Şekil 4.6. Sitokinlerin zamanlara göre değişim grafiği.....	103
Şekil 4.7. KREC düzeyi hesaplanmasında kullanılan Quantity Mean değerlerinin yer aldığı GZ-PZR rapor örneği.....	105
Şekil 4.8. KREC gen bölgesine yönelik hazırlanmış standart DNA amplikasyonunu gösteren grafik örneği	106
Şekil 4.9. KREC gen bölgesine yönelik hazırlanmış standart kör eğrisi grafik örneği.....	106
Şekil 4.10. TCRAC düzeyi hesaplanmasında kullanılan Quantity Mean değerlerini gösteren GZ-RPZ rapor örneği.....	107

Şekil 4.11. TCRAC gen bölgesine yönelik hazırlanmış standart DNA amplifikasyonunu gösteren grafik örneği.....	108
Şekil 4.12. TCRAC gen bölgesine yönelik hazırlanmış standart kör eğrisi grafik örneği.....	108
Şekil 4.13. Akan hücre ölçer yöntem ile analiz edilmiş sitokinlere ait a. pozitif kontrol sonucu b. Negatif kontrol sonucu c. Hasta sonuç örneği.....	109



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

APC	Antijen sunan hücre
BHR	B hücre reseptörü
BODE indeks	Kütle vücut indeksi-hava yolu tıkanma derecesi-solunum güçlüğü-egzersiz kapasitesi'nden oluşan çoklu skor sistemi
BOS	Bronşiolitis obliteran sendrom
CD	Cluster of differentiation
CDR3	Tamamlayıcı belirleyici bölge
CCL	Kemokin C-C ligand
CTCF	Kromatin yapısal proteini
CRR	Kompleman reseptör
CYT	Sitoplasmik
CXCR	Kemokin C-X-C reseptör
DNA	Deoksirübönükleik Asit
DLCO	Karbonmonoksit difüzyon kapasitesi
Fab	Antijen bağlayan parça
Fc	Kristal parça
FEV-1	Zorlu ekspirasyonun birinci saniyesinde atılan volumü
FCV	Zorlu vital kapasite
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
HLA	İnsan lökosit antijeni
HSC	Hematopoietik kök hücre
Ig	İmünoglobulin
IL-	İnterlökin-
INF-	İnterferon-
IPF	İdiopatik pulmoner fibrozis
ISHLT	Uluslar arası kalp ve akciğer transplantasyonu topluluğu
ITAM	İmmun reseptör tirozin bazlı aktivasyon motifleri
Kde	Kappa deleting element

KREC	Kappa deleting recombination excision circle
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MHC	Major histocompatibility complex
MCP-1	Monosit kemotaktik protein1
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern
RAG	Rekombinasyon aktivasyon geni
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
P _{CO2}	Parsiyel karbondioksit basıncı
RSS	Rekombinasyon sinyal sekans
ROS	Reaktif oksijen türleri
SCF	Kök hücre faktör
SHM	Somatik hiper mutasyon
sP-selectin	soluble Plazma selektin
TCR	T hücre reseptörü
TCRAC	T cell receptor alpha constant
TdT	Terminal deoksinükleotid transferaz
TLR	Toll benzeri reseptör
TM	Transmebran
TNF	Tumör nekroz faktör
t-PA	tissue Plasminojen Aktivatör
TREC	T-cell receptor excision circle
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekül 1
VLA	Very late antigen

ÖZET

Akbulut Z. (2017). Akciğer Transplantasyonu Olgularında Erken İmmün İyileşme Döneminde B hücre Kinetiğinin, KREC (Kappa Deleting Recombination Excision Circle) Düzeyi ile İzlenmesi. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Akciğer transplantasyonunda immün sistem cevabının takibi, uygulanan tedavilere yön vermesi, sağ kalım süresi üzerinde etkisi ve buna bağlı olarak transplant başarısında önemlidir. Biz çalışmamızda post-transplant humoral immün sistem gelişimini, B hücrelerin oluşumu sırasında hücrede var olan Kappa deleting Recombination Excision Circle (KREC) gen segmentinin gerçek zamanlı PZR yöntemiyle değerlendirilerek, KREC kopya sayısını transplant öncesi ve sonrası zamanlarda ve diğer hasta bulguları ile incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda, sağlıklı çocuklardan elde edilen DNA örnekleri ile validasyon yapıldı. KREC kopya sayısı ile birlikte immün sistem mekanizmalarında yeri olan ve transplant olgularında etkisinin olduğu bilinen sitokinlerin akan hücre ölçer yöntemle değerlendirildiği bu çalışmada, sitokinlerin hasta ve kontrol grubu arasında ve KREC değerleri ile karşılaştırılması yapılmıştır. KREC kopya sayısı transplant sonrasında, öncesine göre anlamlı bir fark göstermemekle beraber ($p=0,594$; $p=0,657$), median değerlerinde en fazla 7. günde artış görülmektedir (72642- 126849; 85-170). Hasta grubunda KREC ile CD40L arasında 24. saatte pozitif korelasyon ($p=0,030$) saptanmıştır. Kısıtlı sayıda hasta örneği ile gerçekleştirilen bu çalışma akciğer transplantasyonu hastalarında B lenfosit sayısında artış olduğunu göstermektedir. B hücre kinetiğinin post-transplant dönemde uzun süreli izlenmesi ile prognostik bir algoritma saptanabilmesi mümkündür.

Anahtar Kelimeler : kappa deleting recombination excision circle, B lenfositler, akciğer transplantasyonu, sitokin

ABSTRACT

Akbulut Z. (2017). Tracking B Cell Kinetics in Early Immune Recovery Stage of Lung Transplantation Cases by Monitorizing KREC (Kappa Deleting Recombination Excision Circle) Levels. Yeditepe University, Institute of Health Science, Molecular Medicine, PhD Thesis, Istanbul.

Tracking the immune system progression in lung transplantation is crucial for management of the treatment, and its effect on survival and success of transplantation. In this study, we aimed to evaluate humoral immune system response by measuring KREC gene segment copy numbers in B cells by RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction). We compared them with some clinical patient findings at three time points before and after transplantation. Cytokines that are known to function in immune system mechanisms and affect the transplantation success is measured by flow cytometry with bead based array. Cytokine levels between and control groups; and with KREC levels were compared. Although no significant alteration is observed in KREC levels between pre- and post-operation ($p=0,594$; $p=0,657$), median values indicate that the highest increase rate in KREC levels (72642- 126849; 85-170) are observed on 7th day of transplantation. Positive correlation between KREC and CD40L was shown in patient group on 24 hours post-operation ($p=0,030$). Even though this study was performed with a limited number of patients, it reveals that B lymphocyte numbers are found elevated after lung transplantation; and it is possible to detect a prognostic algorithm by tracking B cell kinetics after post-transplantation period for long term follow up.

Key words: kappa deleting recombination excision circle, B lymphocytes, lung transplantation, cytokine

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer transplantı, kronik akciğer hastalığı olan ve hastalığın en son aşamasına gelmiş hastalar için bir tedavi yöntemidir. Farklı akciğer hastalığı tiplerine sahip hastalarda akciğer transplantasyonu sağ kalım oranını etkilemektedir (39).

Transplant başarısında en önemli engel, alıcı immün sisteminin organı red etmesidir(1). Transplantı yapılan akciğer, solunum yolu ile çevresel antijenlere maruz kalarak doğal immüneyi aktifleştirmektedir. Alveolar makrofajlar, Toll benzeri reseptörler, solunum yolları enfeksiyonları doğal immüneyi tetikleyen etkenlerdir (53). Sadece T hücreler değil, humoral immüneye B hücreler tarafından üretilen antikorlar da transplant yapılan organın reddine neden olmaktadır. Özellikle vericinin lökosit hücrelerinin nakil yolu ile alıcıya transfer olması bunda önemli bir etkindir (53).

Kemik iliğinde üretim ve gelişim gösteren B lenfositler olgun hücre aşamasına gelinceye kadar karakteristik özelliklerini farklı anatomik bölge ve farklı gen düzeyindeki düzenlemelerle kazanmaktadırlar (1). Solunum yolu immün sistem savunmasında yer alan B lenfosit hücreleri, hava yolu parankim ve mukozal yüzey için immunglobulin (Ig) üretirler. Antikor adıda verilen Ig'ler hücre dışı mikroorganizma ve toksinleri yok ederler. Edinsel (kazanılmış) immün yanıtta rol alan B lenfositlerden salgılanan antikorlar, membran reseptörleri olarak hücre yüzeyine taşınırlar veya hücreden salgılanırlar. Antikorlar mikrobiyal antijene toksinleri membrana bağlı reseptörler ile tanıyarak immün yanıtın başlamasına neden olurlar (56).

Bir antikor molekülü iki ağır, iki hafif zincirden oluşmaktadır. Hafif zincirde bir V(variable) ve bir C (constant) bölgesi bulunurken, ağır zincirde bir V, üç ya da dört C bölgesi bulunmaktadır. Ağır zincirin V bölgesinin oluşturulmasında hafif zincirden farklı olarak üç DNA segmenti yer alır. Variable High (VH), Diversity High (DH), Joining High (JH) DNA segmentlerinden oluşarak sürekli değişiklik değiştiren V bölgesi, yüksek değişken bölge olarak isimlendirilmektedir. B lenfositlerin gelişmesi sürecinde V,D ve J genleri, rekombinasyon sinyal sekans (RSS)'ların bulunduğu bölgelerde yer değiştirerek DNA zincirinde yeniden düzenlemeye gitmektedir. Antikorum sabit olan C bölgesi ise 5 farklı Ig sınıfı (IgM,IgG,IgE,IgD,IgA) için 5 farklı gen seti ($\mu,\gamma, \epsilon,\delta, \alpha$) farafından kodlanırlar (5).

Ig'lerin hafif zinciri D gen segmenti içermez. Kappa (κ) ve lamda (λ) olmak üzere iki çeşit olan hafif zincirlerin her biri B hücre klonunun yaşam sürecinde sabit kalır. Ig ağır zincir gen rekombinasyonları tamamlandıktan sonra Ig kappa hafif zincirde $V\kappa$ ile $J\kappa$ segmentleri arasında rekombinasyon meydana gelir (17). B lenfositler bu iki zincir tipinden ancak birini eksprese (ifade) ederler ve insan B lenfositlerin yaklaşık %60'ında κ zinciri bulunurken %40'ında λ zinciri bulunmaktadır (26). Bu rekombinasyon sonucunda silinmeye uğrayan Kappa deleting elementi (Kde), Ig Ck geninin 3' bölgesinde yer almaktadır. Kappa Deleting Rekombination Excision Circle (KREC) olarak bilinen bu yapı, B lenfosit reseptörlerinin gen yeniden düzenlenmeleri sonucunda DNA'dan ayrılan dairesel, ekstra kromozomal bir yapı göstermektedir. B lenfositlerin V(D)J gen yeniden düzenlenmeleri sonucunda $V\kappa - J\kappa$ kodlama kavşağı (coding joint) oluşur. Rekombinasyon sinyal sekans (RSS) intron bölgesi ile Kde elementi arasındaki ardışık yeniden düzenlemeler IG κ lokusunda başkabilirleşmeleri engeller ve bir genom parçası olarak kalır. Dairesel çift iplikçikli DNA yapısında olan KREC ise sinyal parçasını (signal joint) oluşturur (27,28). Her bir immünoglobulin lokusu için diploid genomda iki allel bulunmaktadır. Hücrenin farklı antijen özgüllüğünde iki veya daha fazla reseptör eksprese etmemesi için bu her iki allelin üretken katılımının önlenmesi gerekmektedir. Yeniden düzenlenmeler sonucunda üretken bir birleşim gerçekleşmesi, genellikle hücrede mevcut fazı durdurarak sonraki aşamaya ilerlemeyi sağlayacak sinyalleri meydana getirir. B hücrenin gelişimini tamamlamasında bu üç zincirde gerçekleşen gen yeniden düzenlenmesinin başarılı olması gerekmektedir (21).

B lenfositlerin çok farklı çeşitlilikte antijenlere karşı özgül yanıt oluşturmalarıyla açığa çıkan KREC gen segmenti, immün yetmezliği olan hastalarda erken immün yanıtın göstergesi olarak değerlendirilmektedir (30). Özellikle kök hücre nakillerinden sonra hümmoral immüitenin etkinliği B lenfositlerin gelişimi ile takip edilmektedir. Bu hastalarda yeni üretilen B lenfositlerin daha önceden mevcut B lenfositlerden ayırt edilmesinde, KREC segmentinin moleküler yöntemlerle çalışılması etkili olmaktadır. KREC segmenti, farklılaşmış B hücre atalarının Ig hafif zincir kombinasyonlarının %50'sini oluşturmakta ve sonraki B hücre proliferasyonunda kendilerini eşlememektedirler (30).

Biz çalışmamızda, B lenfosit gelişiminde açığa çıkan ve B hücre kinetiğinin göstergesi olarak kabul edilen KREC segmentinin, akciğer transplantı yapılan

hastalarda ölçülmesini amaçladık. Çalışmamızda, akciğer transplantında erken immün sistemin nasıl işlediğini göstermek ve B lenfosit kinetiğindeki değişiklikler ile transplant hastalarında organ reddinin ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Transplant öncesi ve sonrasında kemik iliğinden B lenfosit çıkışını KREC ölçümü üzerinden, moleküler yöntemlerle analiz etmeyi planladık. Hastaların transplant öncesi, transplant sonrası 24. saat ve 7. gününde alınan kan örnekleri uygun koşullarda saklandı. Ayrıca bu hastaların aynı zaman dilimlerine ait örneklerinden sitokin ölçümleri de analiz edilerek inflamasyon göstergesi olan sitokinlerin immün sistem işleyişi üzerine katkısının da incelenmesi amaçlandı. Hastaların sitokin düzeylerinin sağlıklı kişilerle karşılaştırılması doğrultusunda hastalarla aynı yaş ve cinsiyette olmaları dikkate alınarak sağlıklı, gönüllü kontrol grubundan kan örnekleri alınma işlemine gidildi. Farklı sitokin moleküllerinin hem hasta immün sistem üzerinde etkisi, hem de KREC seviyesi ile ilişkisi olup olmayacağı gösterilmeye çalışıldı.

Bazı Avrupa ülkelerinde yenidoğan tarama testleri arasında yer verilmeye başlanan KREC seviyesinin, lenfopeniyi tespit için güvenilir bulunması ve hastalıkların karakterize edilmesinde kullanılması (36,37), ayrıca pek çok immün sistem hastalığının moleküler analizlerinde ve tedavisinin belirlenmesi için yapılan bilimsel çalışmalarda yer alması, KREC seviyesinin ölçümünün immün cevap göstergesi olarak kabulünü güçlendirmektedir. Biz çalışmamızda immün cevap ölçümünün önemli olduğu organ transplantasyonu, özellikle akciğer transplantasyonu olgularında immün sistemin takibini kolaylaştırıcı olacağını düşünerek, KREC konusuna odaklandık. B lenfosit kinetiğinin moleküler yöntemlerle KREC seviyesi üzerinden gösterilmesinin, organ transplantasyonunda karşılaşılan doku reddi çalışmalarına olası katkısının olacağı ve akciğer transplantasyonu olgularında daha önceden bu konu ile ilgili çalışmalara rastlanılmamış olması, çalışmamızın değerini arttıracığı görüşünü güçlendirmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem Nedir

2.1.1. İmmünite ve İmmün Sistem

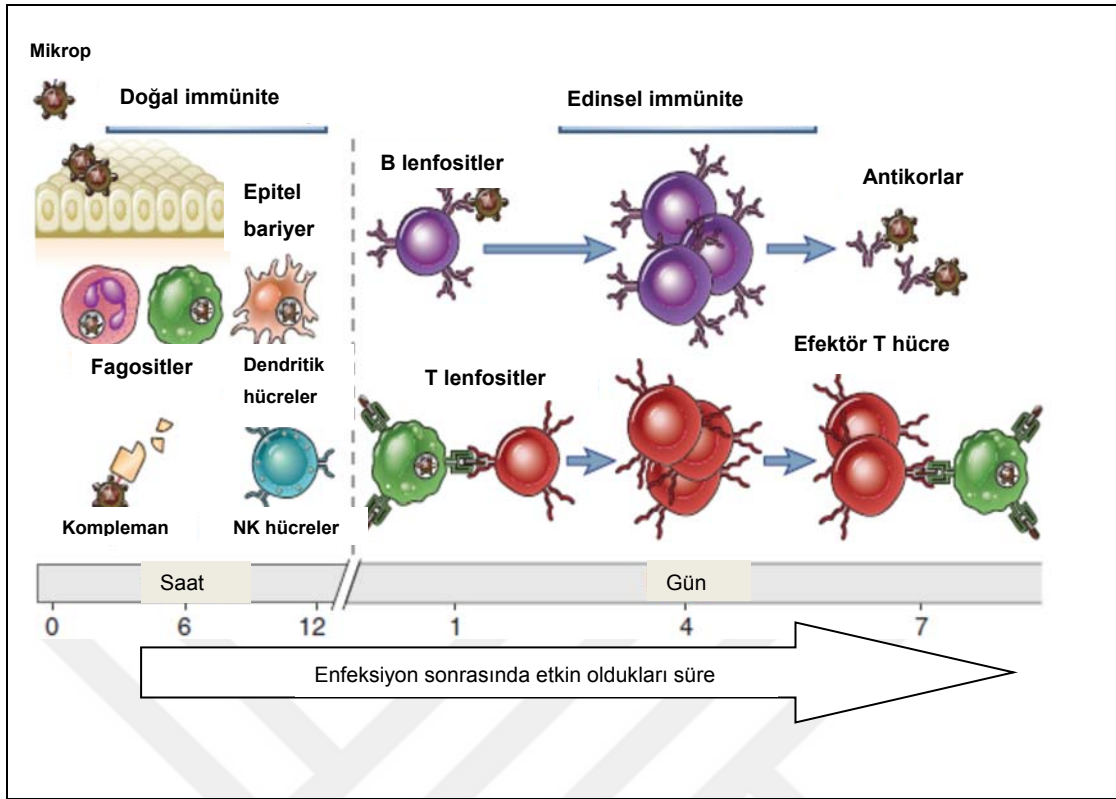
İmmünite hastalıklara karşı gösterilen direnç anlamındadır. Enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç gösteren hücre, doku ve moleküllerin tümü immün sistemi oluşturmaktadır. İmmün sistemdeki hücre ve moleküllerin, enfeksiyonlara yol açan mikroorganizmalara karşı verdikleri tepkiye ise immün cevap denilmektedir (1).

2.1.2. Doğal ve Edinsel İmmünite

İmmün sistemin mikroplara karşı gösterdikleri ilk savunma doğal immün cevap, daha geç gösterdikleri ise edinsel immün cevaptır.

Doğal (doğuştan) immünite mikroplara karşı ilk savunma hattını sağlamakta, mikroplara ve hasar görmüş hücrelerin ürünlerine karşı hücreSEL ve biyokimyasal bazı mekanizmalardan oluşmaktadır. Doğal immünitenin temel elemanları fiziksel ve kimyasal bariyerler, fagositoz yapan hücreler, kompleman sistem gibi kan proteinleri ve hücreler arası iletişimde etkin olan sitokinlerdir (1).

Edinsel ya da kazanılmış immünite ise enfeksiyon ajanlarına maruz kalarak aktifleşen ve belirli mikroplara karşı ard arda maruz kalındığında savunma sağlayabilme özelliği gösteren immün sistemdir. Edinsel immünitenin en temel özelliği, farklı moleküllere karşı özgül cevap vermesi ve aynı mikrop ile karşılaştığında immün cevabın hafıza hücreleri ile daha güçlü olmasını sağlamasıdır. Edinsel immünitenin çok geniş yelpazede mikrobial yapı ve mikrobik olmayan yapıları fark ederek ona göre yanıt oluşturması, bu sistemin özgül bir yapıda olduğunu göstermektedir. Lenfosit hücreleri ve bu hücrelerin ürünleri (antikor gibi) edinsel immüniteyi oluşturmaktadır. Lenfositler mikroorganizmaların ürettiği maddeleri ve enfeksiyona yol açmayan molekülleri tanıyan reseptörler taşırlar. Edinsel immün yanıt ancak, mikroorganizmaların veya onların antijenlerinin doğal immün savunma sistemlerini aşip, lenfositler tarafından tanındıktan ve lenfoid organlara taşındıkları zaman aktif hale geçer (1). Şekil 2.1'de doğal ve edinsel immünite hücreleri ve enfeksiyon sonrasında etki gösterdikleri süre şematize edilmiştir (1).



Şekil 2.1. Doğal ve edinsel immünte hücreleri ve etkin oldukları süre (1). (*Cellular and Molecular Immunology*, 7.baskısından alıntılanmıştır).

Immün cevapta ilk savunma hattını oluşturan doğal immünte, hastalık etkeni bir mikroorganizma ile karşılaştığında, fagozitoz yapan hücrelerin etkinliği saatler içerisinde görülür. İlk 12 saatte konak savunmasında yer alan doğal immünte yerini edinsel immünteye bırakarak immün cevabın devamı sağlanır. Lenfosit hücrelerinin yer aldığı bu safha günler süren bir etkinlik göstermektedir (1).

2.1.2.1. Edinsel İmmünte Çeşitleri

Edinsel immünte, farklı tipte mikroplara ve farklı immün sistem öğelerine karşı savunma sağlamalarına göre hüneral ve hüresel immünte olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Hüneral immüntede B lenfositler, salgıladıkları antikorlar (immünglobulinler) ile hücre dışı mikrop ve toksinleri yok ederler. Antikorlar farklı efektör mekanizmalarını aktive edebilirler. Örneğin, farklı tip antikorlar konak hücreler tarafından mikropların yenilmesini (fagozitoz yapılarak) sağlar, hücrelerden enflamatuar mediatörlerin salınımını başlatır, mukozal organlardan lümene doğru taşınarak mikropların ilgili dokulara yerleşmesini engeller ve plasentayı yenidoğan enfeksiyonlarına karşı korurlar (1).

Hücresel immünite ise, hücre içi savunmada etkindir ve burada T lenfositler yer almaktadır. T lenfositler fagositik veziküller tarafından yutulan mikropları yok etmesi için fagositik hücreleri aktive eder, bazı T lenfositler de enfeksiyona neden olan hücreleri sitoplazmalarında taşıyan tüm konak hücrelerini öldürürler (1).

2.1.2.2.Edinsel Immünitenin Özellikleri

Özgüllük; İmmün sistemin çok fazla sayıdaki farklı antijenleri veya antijen parçasını birbirinden ayırt etme yeteneği vardır. Maruz kalınan bir antijen ile daha sonra karşılaştıklarında artan bir immün cevap göstermeleri ve ilk antijene benzer özellik gösterse dahi başka antijenlere benzer bir cevabın verilmeyişi, immün sistemin özgül olduğunu göstermektedir (1)

Hafıza; İmmün sistem, aynı antijenle ikinci defa karşılaştığında ilk immün cevaba göre daha şiddetli bir savunma mekanizması ile cevap vermektedir. İkincil olarak da bilinen bu immün cevap daha hızlı, daha şiddetli ve antijeni ortadan kaldırma özelliğini gösterir. Antijenle ilk karşılaşmada oluşan uzun ömürlü hafıza (bellek) lenfositler, hücrelerin aynı antijenle ikinci kez karşılaşmasıyla efektör hücre konumuna geçerler (1).

Klonal seçilim; Bir antijene özgü lenfosit hücresi, antijenle karşılaştıktan sonra proliferasyona uğrar. Böylece daha önceden var olan bu özgül lenfosit klonu sayısında artış görülür ve bu hücrelerde o antijene özgü ve o klona ait reseptörler açığa çıkar. Edinsel immünette, antijene özgü hücrelerin artışı, enfekte patojenlere karşı çok hızlı cevap vermeyi sağlamaktadır (1).

Uzmanlaşma; İmmün sistem farklı mikroorganizmalara, farklı ve özel yanıtlar vererek antimikrobiyal savunma mekanizmalarını en yüksekte tutar. Böylelikle hümmoral ve hücrenel immünite farklı tip mikroplara veya enfeksiyonun farklı evrelerindeki aynı tip mikroplara karşı ortaya çıkarak konağı korumuş olurlar (1).

Sınırlama ve hemostaz; Tüm normal immün sistem yanıtı antijenle uyarımdan sonra azalır ve immün sistem dinlenme durumuna geçer. Böylece immün sistem başka bir enfeksiyona karşı yanıt verme durumuna gelebilir (1).

Kendinden olana tepki vermeme; İmmün sistemin en önemli özelliklerinden biri olan öze tolerans gösterme, immün sistemin yabancı antijenleri

tanıyarak immün cevap verirken, konağa ait olan antijenik yapılara karşı immün cevap oluşturmamasıdır (1).

2.1.3. Edinsel İmmünitede Antijen Tanıma

Edinsel immünitede rol oynayan lenfositler, sahip oldukları antijen reseptörleri ile antijenleri tanırlar. Yapı ve sinyal mekanizmaları bakımından benzerlik göstermelerine rağmen T ve B lenfositler farklı yapıda antijenleri tanırlar.

Lenfositlerin sahip oldukları reseptörler, antijen tanımda görev yapan domainlerden (boğum) oluşmaktadırlar. Bu domainler değişken (variable- V) ve korunmuş (constant- C) bölge olmak üzere iki farklı kısımda belirtilmişlerdir. Variable bölgelerde, değişikliklerin daha fazla olduğu bölgeler çok değişken (hypervariable) veya antijeni bağlayan reseptörün parçalarını oluşturdukları için tamamlayıcılığı belirleyen bölgeler şeklinde kısa dizinler bulunur. Antijen reseptör zincirlerinin antijeni tanınması sonrasında, aktivasyon sinyallerini hücre içine gönderme ile görevli değişmez (invariant) membran proteinleri ile temas geçer. Hücrenin sitozol ve nükleosuna iletilen bu sinyaller lenfosit hücrenin bölünmesine, başkalaşması ve ölümüne yol açar. Böylece lenfosit reseptörleri özgül antijen tanıma ve sinyal iletimi işlevlerini farklı polipeptidlerle gerçekleştirmektedirler. Antijen molekülleri lenfosit reseptörlerine bağlandığında reseptör kompleksinin ilişkili sinyal proteinleri bir araya toplanır ve sinyal proteinlerin hücre sitoplazma bölgelerine ilişkin enzimlerle, diğer proteinlerin fosforilasyonu katalizlenir. Fosforilasyon durumu bir takım sinyal mekanizmaların tetiklenmesi ve buna bağlı olarak birçok genin transkripsiyonal aktivasyonuna yol açar. Bunun sonucunda da lenfosit yanıtına aracılık eden çok sayıda proteinin üretilmesi gerçekleşmiş olur (2).

2.2. Hümmoral İmmünite

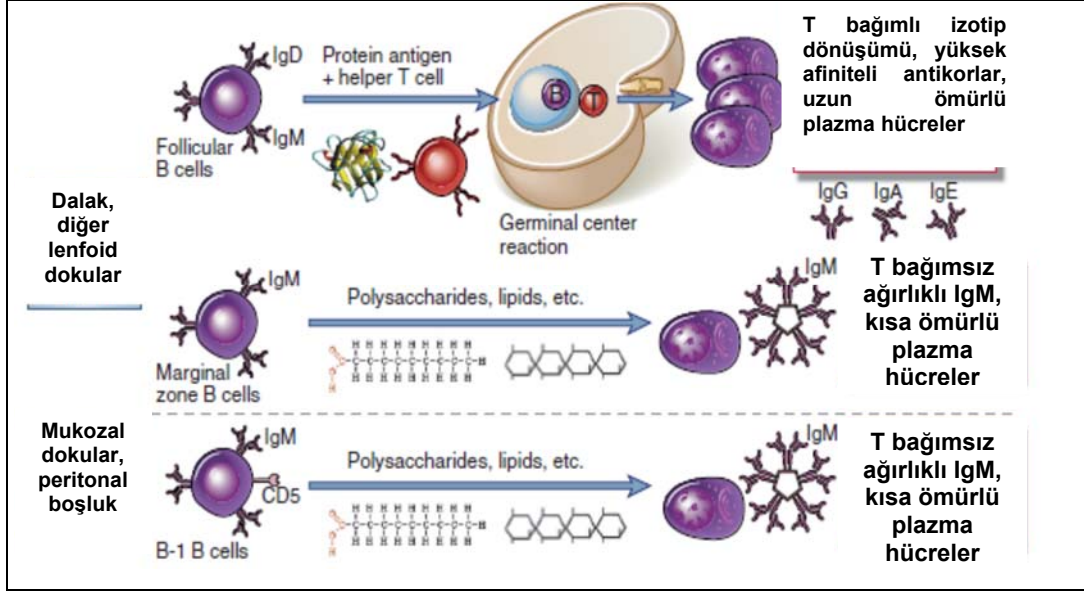
Edinsel immünitenin bir çeşidi olan hümmoral immünite, B lenfositler tarafından üretilen antikorlar ile hücre dışı mikrop ve mikrobiyal toksinleri yok etmektedir. Antikor cevabı tetikleyen iki tip mikrobiyal antijen vardır. Birincisi, B lenfositleri kendi reseptörleri üzerinden aktive eden mikrobiyal orjinli antijenlerdir. Bu antijenler polisakkarid, lipid ve protein olmayan yapıdadırlar. T lenfosit yardımı olmadan antijenlerin B lenfositlerdeki kalıp tanıma reseptörleri aracılığı ile tanınması söz konusudur ki buna T hücre bağımsız antikor oluşumu denilmektedir. İkincisi ise, protein yapısında olan antijenlerdir ve bunların B lenfositler tarafından tanınması ve

yanıt oluşturması için yardımcı T lenfositlere gerek vardır. Bu da hümoral immüitenin T bağımlı antikor oluşum şeklidir (1).

2.2.1. Hümoral İmmüitenin Genel Özellikleri

Hümoral immün cevap, antijenlerin özgül B lenfositler tarafından tanınması ile başlar. Antijen, membranda bulunan IgM ve IgD'lere bağlanır ve hücrelerin aktivasyonu başlar. Böylece aktif olan "naïve" B lenfositler, antijene özgül hücrelere doğru çoğalmaya ve farklılaşarak hafıza B lenfosit ve plazma hücrelerine dönüşürler. Bir B hücresinden bir hafta içinde 5000 antikor salgılayan hücre çoğalır. Bu durum mikroplara karşı hızlıca bölünmeyi gerektirmektedir. Bazı aktive olmuş B lenfositler IgM ve D dışında farklı antikorlar üretirler. Bu işleme ağır zincir izotip dönüşümü denir. Ayrıca hümoral immün cevap, antijenle tekrarlayan karşılaşmalarında afinitesi yüksek antikor üretimi ile gelişmektedir. Ağır zincir izotip dönüşümü ve afinite olgunlaşması, protein yapıdaki antijenlere karşı T lenfosit bağımlı hümoral immün yanıt şeklinde görülmektedir. Bazı aktive olmuş B lenfositlerden dönüşen plazma hücreleri ve bellek hücreleri aylar hatta yıllar boyunca antikor üretebilecek şekilde uzun ömürlü olabilirler. Bu hücreler, herhangi bir zamanda enfekte edici bir mikrop ile karşılaştıklarında anında koruma sağlarlar (1).

B lenfositler farklı antijenlere, farklı alttip hücreleri ile cevap oluştururlar. Örneğin, periferal lenfoid organlarda foliküler B hücreler T lenfositlerle işbirliği yaparak immün cevap oluştururken, dalak veya diğer lenfoid organların marginal bölge B hücreleri kanla bulaşan polisakkarit yapıdaki antijenleri fark ederek immün cevap oluştururlar (1). Farklı tip antikor oluşumunun şematize hali şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Farklı B lenfosit tipleri ile farklı antikor tanıma (1).(*Cellular and Molecular Immunology*, 7.baskısından alıntılanmıştır).

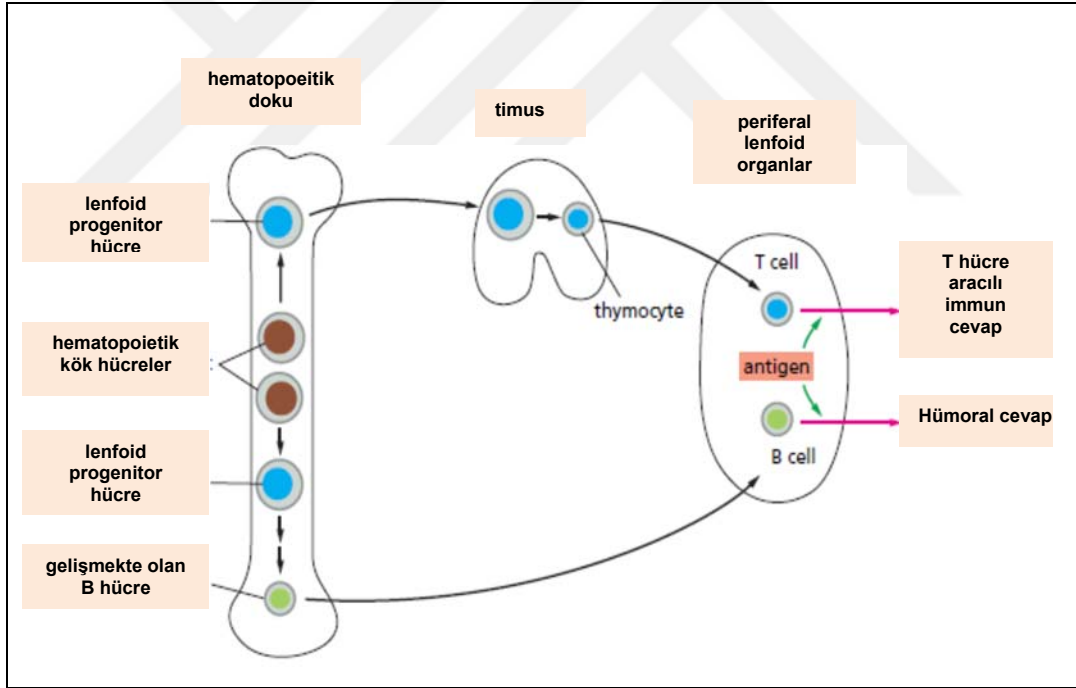
2.3. B Lenfositler

Lenfositlerin keşfi, bu hücrelerin kökenleri ve fonksiyonları üzerine odaklanmayı ve anlamayı amaçlayan çalışmalara neden olmuştur. 1960 ve 70'li yıllarda yapılan çalışmalar, B ve T lenfositlerin antikor üretiminde ve hücre aracılı immün cevaptan sorumlu olan hücreler olduklarını göstermiştir. Özellikle bu dönemlerde yapılmış hayvansal deneyler B lenfositlerin keşfini ve hücre özelliklerini açığa çıkarmıştır (3).

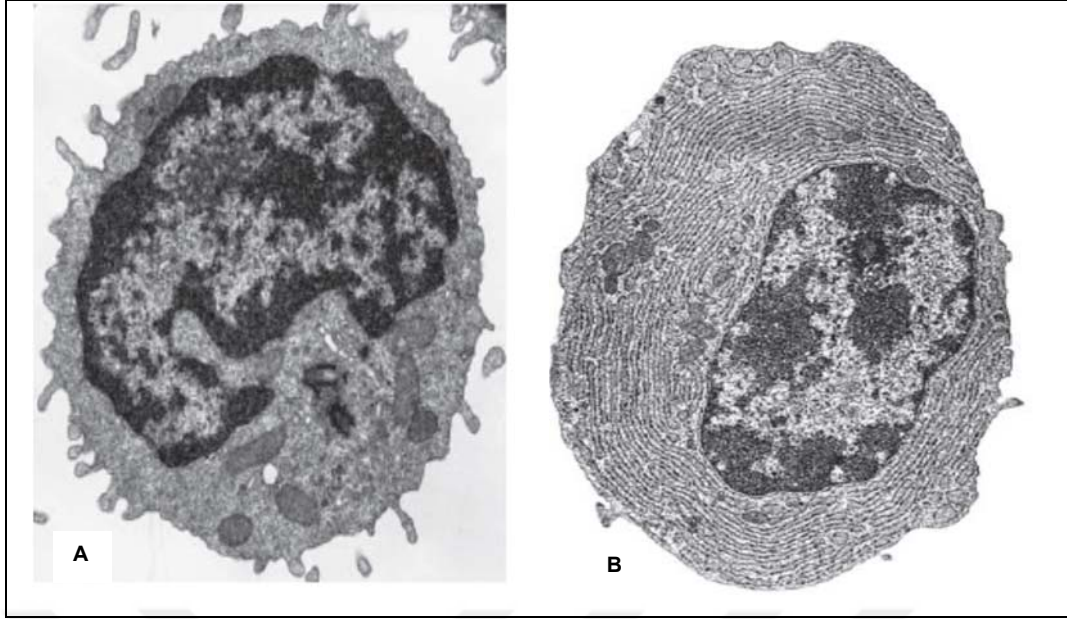
2.3.1. B Lenfosit Gelişimi

Hümmoral immünitede hücre dışı mikroplara karşı antikor üretimi yaparak immün cevabın oluşmasını sağlayan B lenfosit hücreleri kemik iliğinde üretilir. Gelişimi yetişkinlerde yine kemik iliğinde olurken, fetüste ise karaciğerde gerçekleşmektedir. Lenfoid progenitör hücreler, doğrudan kan hücrelerini oluşturan pluripotent hematopoietik kök hücrelerden (HSC) kaynaklanmaktadır (4). Doğumdan sonra, kemik iliğinde üretimi devam eden kök hücrelerin değişimini ve gelişimini buldukları çevrede yer alan pek çok kimyasal molekül sağlamaktadır (5). B lenfositlerin geliştiği kemik iliği ile T lenfositlerin geliştiği timus, merkezi lenfoid organlar olarak bilinir. Pek çok lenfosit, merkezi lenfoid organlarda ölürken, diğerleri olgunlaşarak kan yolu ile periferik lenfoid organlar denilen lenf nodları, dalak, gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve deriye taşınırlar (4). Kemik iliğinde

günde $10-20 \times 10^6$ kadar yeni B hücre üretilir ve bu sayının ancak $1/10$ 'u olgun B hücre olarak perifere geçer. Bunların da ancak yarısı fonksiyonel B hücreye dönüşebilmektedir (6). Ancak dalağa gelen, henüz olgunlaşmamış B lenfositlerin öz antijenlere reaktif olanları elemine edilirler. Şekil 2.3'de B hücre üretimi şematize edilmiştir. Özellikle sistemik lupuz eritromatozis ve romatoid artrit hastalarında bu otoreaktif B hücreler periferde bulunurlar (7). Lenfositler bu periferal lenfoid organlarda, yabancı antijenler ile karşılaşarak aktif hale gelirler (4). Antijen tarafından uyarılan B lenfositler morfolojik olarak farkedilebilir değişiklik gösterirler. Elektron mikroskop görüntüsü eritrositlere göre daha büyük ve sitoplazmaları az olan, küçük görülen B lenfositler (Şekil 2.4.a) antijen ile aktive olduktan sonra çoğalarak olgun efektör hücre olan plazma hücrelerine dönüşürler (4). Antikor üreten olgun plazma hücrelerinde geniş ölçüde granüllü endoplazmik retikulum yer almaktadır (4). Şekil 2.4.b'de plazma hücresi elektron mikroskop görüntüsü yer almaktadır.



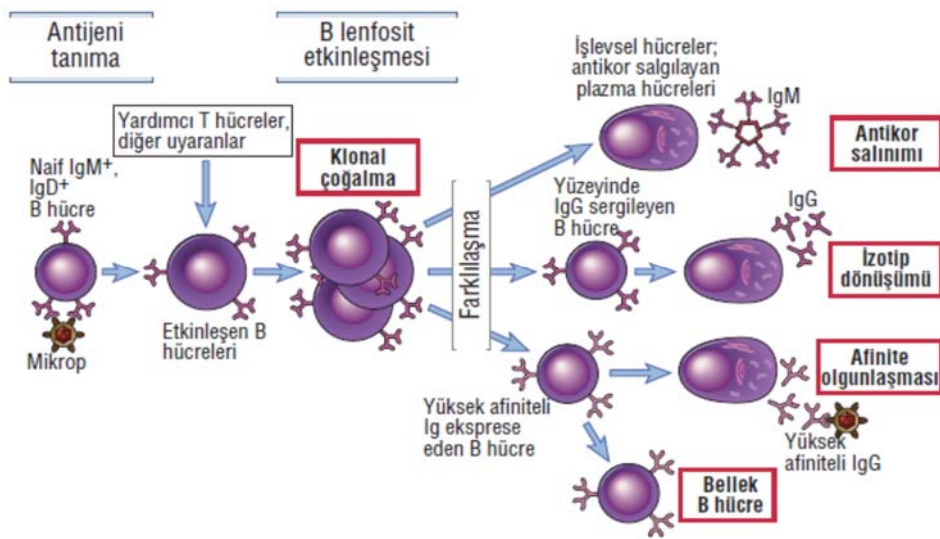
Şekil 2.3. B hücre üretimi (4). (*Molecular Biology of the Cell*, 5.baskısından alıntılanmıştır)



2.4.a. Aktive olmamış B hücresi elektron mikroskop görüntüsü (4)

Şekil 2.4.b. Plazma hücresi elektron mikroskop görüntüsü (4)

Hümmoral immün cevabın temel unsuru olan B lenfositler antijenleri tanıyarak, yardımcı T hücre ve diğer uyarıların da etkisiyle klonal çoğalma, genişleme ve antikor salgılayan etkin hücelere dönüşürler. Etkin hale gelen B hücelerin bazıları plazma hücelerine dönüşürken bazılarında hafıza hücelere dönüşüm gerçekleşmektedir (2). Şekil 2.5’de hümmoral immünitinin gelişimi şematize edilmiştir.



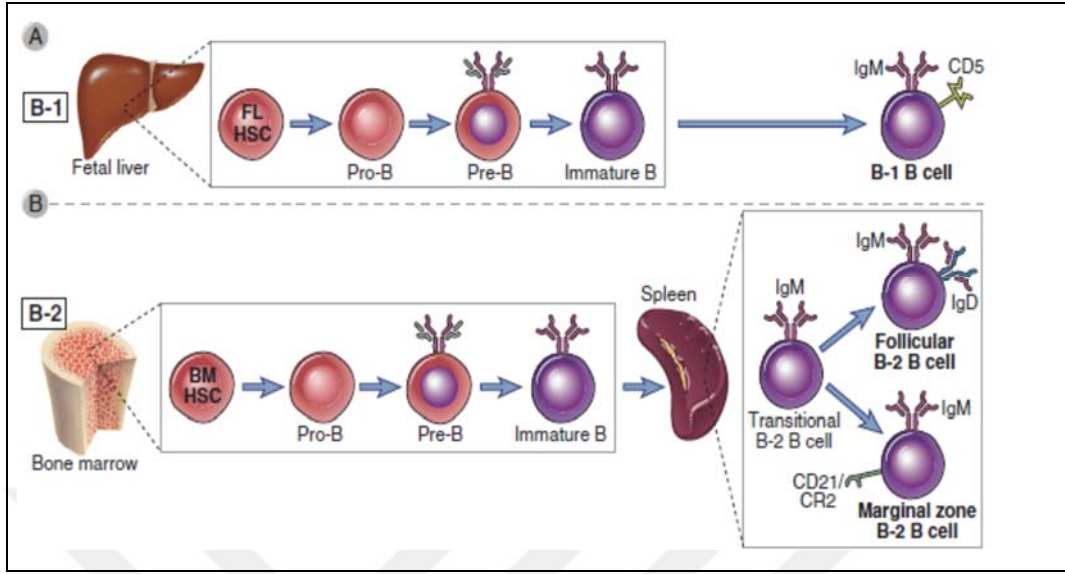
Şekil 2.5. Hümmoral immünitinin evreleri (2).

Antijenle karşılaşarak aktive olan B hücreler, antikor salgılayan plazma hücrelerini oluştururlar. Uzun ömürlü plazma hücreleri hipermutasyon, izotip dönüşümüne uğrayan hücreler olup, lenf nodunun medulla kord kısmında, dalakta red pulp bölgesinde, kemik iliğinde Ig G salgılayan plazma hücreleri olarak ve mukosal lamina bölgede Ig A salgılayan plazma hücreleri olarak bulunmaktadır (8). Plazma hücreleri dışında meydana gelen hafıza B hücreler ise daha çok dalakta marginal zon bölgede, lenf nodların sub-kapsular sinüs bölgesinde, barsak epitel altındaki Peyer plaklarında, tonsillerde ve çok az da kanda bulunurlar (8).

2.3.1.1. Progenitör Hücre Proliferasyonu ve B Hücre Hattı

B Lenfosit hücrelerin köken aldıkları progenitör kök hücre hattı doğumdan önce karaciğerde, doğumdan sonra kemik iliğinde bulunmaktadır (1). Kemik iliğinde bulunan non-lenfoid stromal hücreler, B hücre gelişiminde oldukça etkilidir. Stromal hücrelerden salınan büyüme faktörleri B hücrelerin farklılaşma ve proliferasyonunu sağlar. Lenfoid progenitör hücre ve erken pro-B hücreler kemik iliği stromal hücrelerdeki adezyon moleküllerine bağlanır. Bu adeziv etkileşimler pro-B hücre yüzeyindeki reseptör tyrosine kinase (Kit)'in stromal hücrelerdeki kök hücre faktör (SCF)'e bağlanmasını kuvvetlendirir ve böylece B hücre progenitör hücrelerin proliferasyonu indüklenmiş olur. Stromal hücrelerden salınan integrin proteinlerden vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1), lenfosit hücredeki integrin grubu protein olan very late antigen (VLA) ile etkileşim göstermesi de hücre proliferasyonunda oldukça önemlidir. Ayrıca stromal hücrelerden salgılanan inrerlöklin-7 (IL-7), B hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanarak hücrenin progenitor (pro-B) safhasından prekürsör (pre-B) safhasına geçişini sağlayan oldukça önemli bir sitokindir (9). B hücreleri iki hatta (lineage) ayrılırlar (1). Şekil 2.6'da B lenfosit alt tiplerinin gelişimi yer almaktadır (1). Fetal kaynaklı kök hücreler B-1 tip B lenfositlere yol açarken, kemik iliği kökenli hematopoietik kök hücreler dolaşımdaki B lenfositleri meydana getirirler (4,10). Fetal karaciğer kaynaklı kök hücrelerden oluşan ve farelerde total B hücre havuzunun yaklaşık %5'ini oluşturan B1 tip hücreler epitel, akciğer ve sindirim sistemi ile ilgili lenfoid dokularda bulunur ve hayatın erken dönemlerinde bu fetal kaynaklı hücreler kaybolurlar (1,8). Kemik iliği kökenli hematopietik kök hücrelerden ise B-2 hücreler oluşur. Bu hücreler lenf nodları ve dalakta B folikül hücrelere organize olurlar (1,7). Deneysel çalışmalar hamileliğin 8. gününde az sayıda B hücre progenitörlerinin yol sak'da bulunduğunu

ancak, Ig üretiminin fetal karaciğerde gebeliğin 11. gününde başladığı ve pre-B hücrelerin 13. günde tespit edildiğini göstermektedir (8).

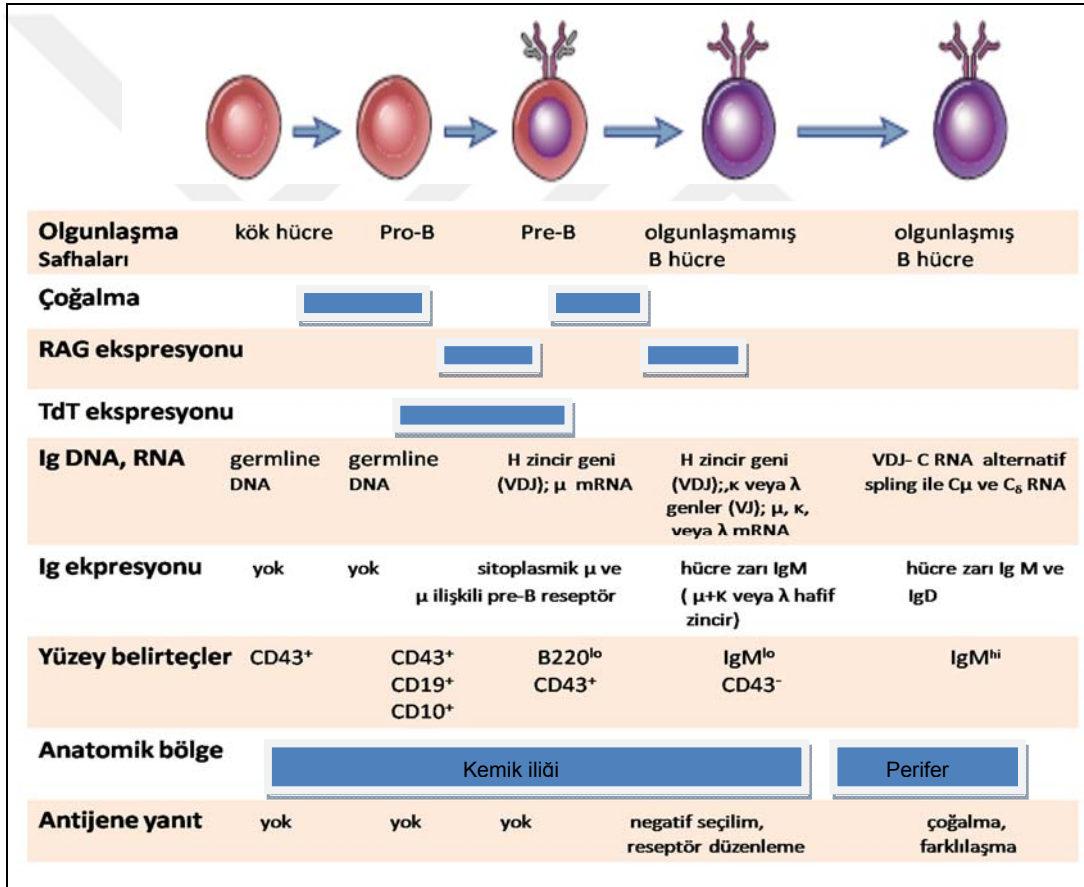


Şekil. 2.6. B lenfosit alt tiplerinin gelişimi (1).

Dalakta B hücreler, geçiş aşamasından marginal bölge B hücresi veya foliküler B hücresini oluşturacak şekilde gelişirler. B hücrelerin öz antijenlere karşı olan afiniteleri, B-2 hücrelerin marginal bölge veya foliküler B hücresine farklılaşma farklılaşmayacağına katkı yapar. Foliküler B hücre alt tip grubunda yer alan olgun hücreler IgD ve hatta IgM üretirler. Bir dizi antijen reseptör zincirlerinin ekspresyonlarının olmasıyla bu safhadaki hücelere olgun B hücreler de denilmektedir. Ayrıca foliküler B hücreler bir lenfoid organdan diğerine göç ettikleri için daha çok dolaşımdaki B hücreler olarak da bilinirler. B-1 alt tip olarak belirtilen B hücreleri ise en iyi kemirgen hayvanlarda tanımlanmışlardır. B hücrelerin erken evrelerinde gelişen bu hücreler sınırlı gen repartuarına sahiptirler ve marginal bölge hücreleri gibi IgM antikor salgırlar. Bu hücreler farelerde hücre yüzeylerinden CD5 belirteci bulundurmalarıyla ayırt edilirken, insanda B-1 benzeri hücreler tanımlanırken, hücre yüzeyinde CD5 belirteci bulunmamaktadır. İnsanlarda CD5, geçiş B hücrelerinde ve bazı aktive B hücre popülasyonunda bulunur (Şekil 2.6) (1). B1 tip hücreler de kendi aralarında ikiye ayrılmakta; B1-a olarak adlandırılmış B lenfositler bakteriyel enfeksiyonlara karşı ürettikleri antikorlar ile doğal immüniteyi sağlarken, B1-b olarak gruplandırılan hücre tipi ise polisakkarit yapıdaki moleküllere ve T lenfosit bağımsız uzun dönemli edinsel imünitenin temelini oluşturan fonksiyon göstermektedir (3,11). B hücrelerin en erken aşamasındaki pro-B

lenfositler Ig üretmezler, ancak hücre yüzeylerinde eksprese ettikleri molekülere (CD19, CD10) göre diğer olgunlaşmamış hücrelerden ayrılabilirler. Rekombinasyon aktivasyon geni (RAG) denilen ve gen yeniden düzenleme mekanizmasında oldukça önemli olan genlerin eksprese edildiği hücreler de pro-B lenfositlerdir (1).

Kök hücre aşamasından olgun B hücre aşamasına gelinceye kadar hücre gelişiminde bazı karakteristik özellikler farklı anatomik bölgelerde, farklı gen düzeyindeki düzenlemelerle kazanılmakta ve farklı hücre yüzey belirteçleri eksprese ettikleri de bilinmektedir (1). Şekil 2.7'de B hücre olgunlaşması evreleri yer almaktadır.



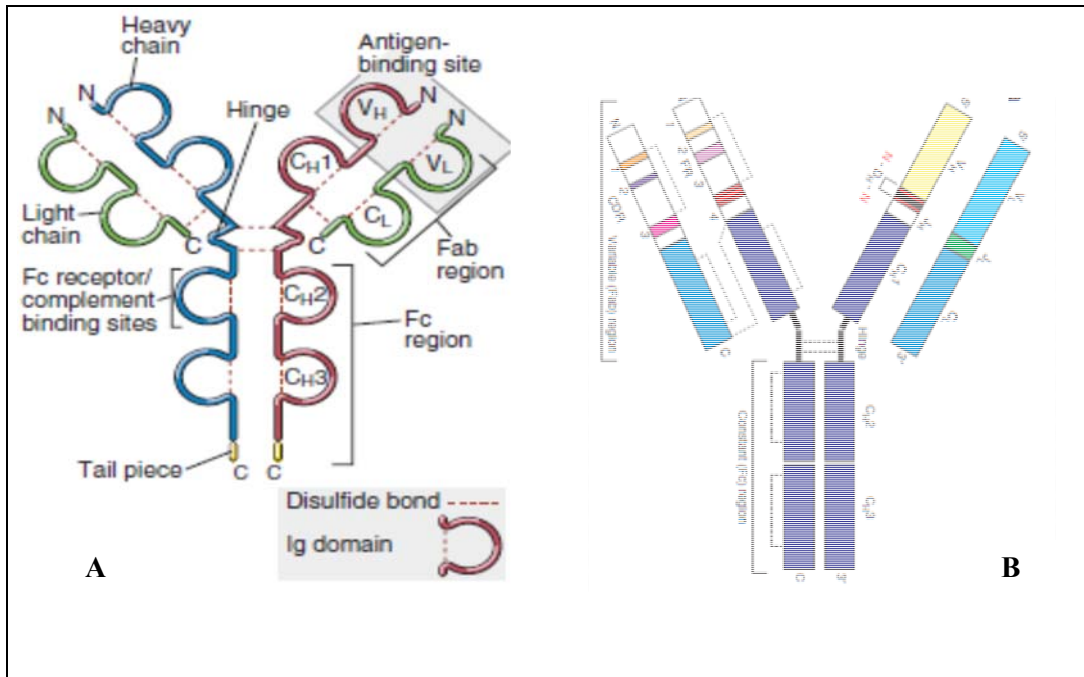
Şekil 2.7. B hücre olgunlaşma safhaları (1) (*Cellular and Molecular Immunology*, 7.baskısından alıntılanmıştır)

Kan ve lenf yolu ile vücudu dolaşan B lenfositler sistemli olarak ikincil lenfoid organlar olan dalak, lenf nodları, bademcikler, Peyyer plakları ve mukozal dokular gibi bölgeleri dolaşırlar. Bu şekilde germinal merkezden diğer dokulara ve oradan tekrar dolaşıma geçen B lenfositlerin işleyişinde çeşitli adezyon molekülleri ve

2.3.2. Antikorlar ve Yapıları

Edinsel immün cevapta rol alan B lenfositlerden salgılanan antikorlar ya membran reseptörleri olarak hücre yüzeyinde taşınırlar ya da salgılanırlar. Immüoglobulinler (Ig) olarak da adlandırılan antikorlar, mikrobiyal antijen ve toksinleri membrana bağlı B lenfosit antijen reseptörleri gibi değişken bölgeleriyle tanınırlar. Bu şekilde membrana bağlı antikorlar ile antijen tanınması immün cevabın başlamasına yol açar ve salgılanan antikorlar da bu yanıtın etkin fazında antijenleri yok ederler (2).

Bir antikor (immüoglobulin) molekülü, iki eş ağır (heavy- H) ve iki hafif (light- L) zincir ve her bir zincir, bir değişken (variable-V), bir sabit (constant-C) bölge içeren dört adet polipeptid zincirinden meydana gelmektedir. Bu dört zincir Y biçiminde bir molekülü oluşturacak şekilde bir araya gelir. Her hafif zincir bir ağır zincirle, her iki ağır zincir ise birbirine disülfid bağları ile bağlıdırlar. Bir hafif zincirde bir V ve bir C bölgesi bulunurken, bir ağır zincirde bir V, üç ya da dört C bölgesi bulunmaktadır (1). Antikor yapısı Şekil 2.9.a ve b' de şematize olarak verilmiştir (1). Tüm antikor molekülleri benzer temel karakteristik yapıda olmalarına rağmen antijen bağlanma bölgelerinde değişkenlikler bulunur. Bu değişkenlik muazzam sayıda antijenlere karşı farklı antikor oluşmasını sağlamaktadır (1).



Şekil 2.9.a. Antikor genel yapısı şematik gösterimi (1) b. IgG antikor yapısı şematik gösterimi (12)

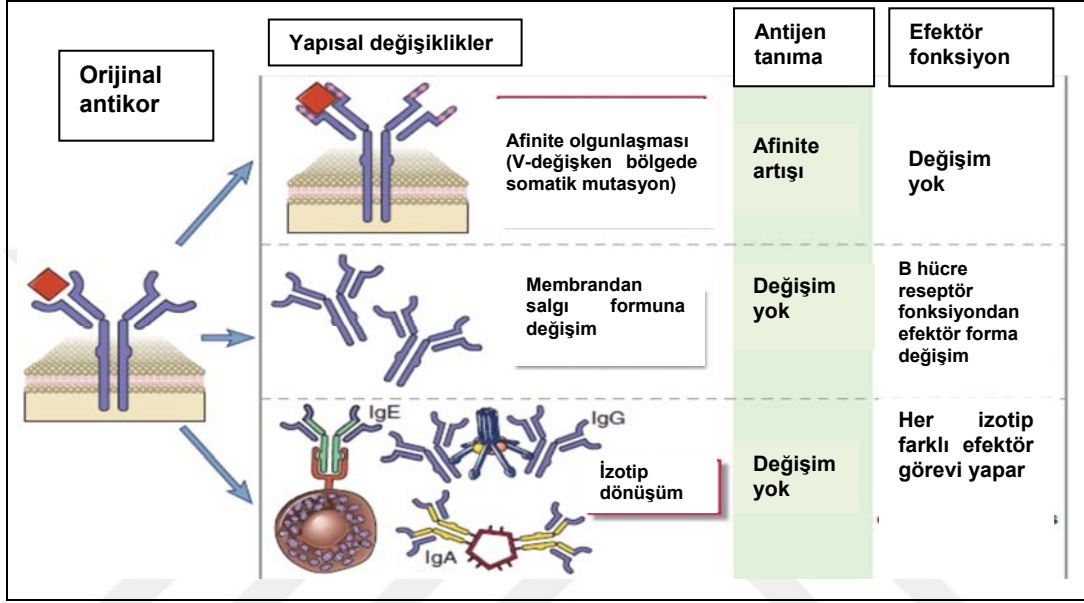
Şekil 2.9.a'da belirtildiği gibi antikorun hem ağır hem de hafif zincirinde yer alan değişken V domaini, antijen tanınma bölgesini oluşturur ve antijen bağlayan parça, Fab (fragment antigen binding) diye adlandırılır. Ağır zincirde yer alan değişmeyen C bölgesi ise efektör işlevine katılan ve Fc (fragment crystalline) denilen parçayı oluşturmaktadır (1). Ağır zincir V domaininde ayrıca Diversity (D) ve Joining (J) gen segmentleri, hafif zincir V domaininde ise J gen segmenti bulunmaktadır. V domaini ayrıca yüksek değişkenlik gösteren tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR) ve framework (FR) bölgelerine ayrılmıştır (Şekil 2.9.b) (12). Antikor yapısındaki ağır zincirin karboksil terminal ucu, antikorun plazma membranına bağlanmasını sağlar (Şekil 2.9.a) (1).

Hücre membranına bağlanmayan hafif zincir ise iki çeşittir. Kappa (κ) ve lambda (λ) olarak adlandırılan zincirlerin C bölgeleri farklıken, işlevleri aynıdır. Ağır zincirin ise, C bölgesi farklı olan beş tipi (μ , λ , γ , ϵ , α) bulunur (1). İnsanlarda farklı tip Ig sınıfı, ağır zincirdeki C bölgesinin beş ayrı gen seti tarafından kodlanmasıyla oluşmaktadır. İki μ (mü) geni IgM'in C bölgesinin kodlanmasıyla, bir δ (delta) geni IgD'nin C bölgesinin kodlanmasıyla, bir ϵ (epsilon) geni IgE'nin C bölgesinin kodlanmasıyla, iki α (alfa) geni IgA'nın C bölgesinin kodlanmasıyla ve dört γ (gamma) geni IgG'nin C bölgesinin kodlanmasıyla ilişkisi bulunmaktadır (13). Bir antikor molekülünde her iki tip hafif zincir her tip ağır zincirle kompleks yapabilir. Hümmoral immün cevap süresince ağır zincir sabit 'C' bölgeleri birbirine dönüşebilir de, 'V' bölgelerinde herhangi bir dönüşüm olmadığından, her bir B lenfosit hücresi klon özgülüğünü korur. Hafif zincirin çeşitleri (kappa ve lambda) her bir B lenfosit hücre klonunun yaşam süresi boyunca sabit kalır (1).

2.3.2.1. Antikorların Ağır Zincir Sınıf (İzotip) Dönüşümü

Hümmoral immün cevabın değişik mikroorganizmalara karşı savunmada en etkin hale getirilmesinde, antikorların yapısında yer alan ağır zincir sınıf (izotop) dönüşümü oldukça önemlidir. Ağır zincir izotip dönüşümü antikorun C bölgesinde gerçekleşmekte, antijenin bağlandığı bölgede yer alan V domaininde bir değişiklik olmamaktadır. Membrana bağlı ve salgılanan antikorlarda izotip dönüşüm mekanizması gerçekleşmektedir (1). Çoğu bakteri ve virüse karşı konak organizma savunmasında bu patojenlerin antikorlar ile kaplanması ve böylece bu organizmaların immün sistemin diğer hücreleri (nötrofil, makrofaj) tarafından tanınarak yok edilmesi sağlanmaktadır. Diğer yandan parazitlerin eozinofil hücre reseptörleri tarafından

tanınması için farklı tip antikorlar yapılır. Sonuç olarak, bütün “naïve” B lenfositler IgM ve IgD izotipinde antijen reseptörleri eksprese etseler dahi, immün sistemin farklı mikroorganizmalara karşı farklı antikor izotipleri oluşturması gerekmektedir (2). Şekil 2.10’da hümmoral immün yanıtta, antikor yapısında meydana gelen değışiklikler şematize edilmiştir.



Şekil 2.10. Hümmoral immün cevap boyunca antikor yapısındaki değışiklikler (1). (*Cellular and Molecular Immunology*, 7.baskısından alıntılanmıştır).

Ağır zincir izotip dönüşümünde Cluster of differentiation 40 (CD40) denilen molekül aracılı sinyal oldukça önemlidir. Yardımcı stimulan protein olan CD40 ile başlatılan bu mekanizmada, B lenfosit hücresinde hangi ağır zincir izotip dönüşümün gerçekleşeceği, sitokin çeşitleri ile belirlenmektedir. Ig ağır zincir izotip dönüşümü gerçekleşmeyen B lenfositler IgM üretirler (1). CD40 sitokin ayrıca yardımcı T hücreler üzerindeki CD40 Liganda bağlanarak B hücrenin aktive olmasında rolü bulunduğundan oldukça önemlidir (14). CD40 ve diğer sitokinler aracılığı ile gelen sinyaller ağır zincir genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır. Bu zincir üzerinde yer alan sabit C bölgesinin aktif hale geçmesiyle C μ 'nün 3' dönüşüm bölgesi ile 5' dönüşüm bölgesi bir araya gelerek yeniden bağlanma yapar ve aradaki DNA dizilimleri silinir. Bu olaya dönüşüm rekombinasyonu (switch recombination) denilmektedir (1). Ağır zincirde her C bölgesinin 2-3 kb yukarı diziliminde yer alan dönüşüm bölgeleri (switch region) mekanizmanın meydana geldiği bölgelerdir.

Yalnız C δ (delta) dönüşüm bölgesi daha geniş olup kısa baz gruplarının çoklu tekrarından oluşmaktadır. İzotip dönüşümde yer alan rekombinazlar bu dönüşüm bölgelerini tanıyarak mekanizmayı gerçekleştirirler (1). B lenfositlerin ağır zincir türünü belirlemede yardımcı T lenfosit hücrelerin ürettiği sitokinler de rol almaktadırlar (2). Ayrıca B lenfositlerin ürettikleri antikor türleri ve özellikleri, immün cevabın oluştuğu dokuya göre de değişmektedir. Örneğin mukozal dokularda (gastrointestinal sistem, solunum yolu sistemi gibi) IgA dönüşümünü yapabilen B lenfositler daha fazladır. Dolayısı ile mukozal dokuların IgA antikorunun üretim yeri olduğu bilinmektedir (1,2).

2.3.2.2. Antikorların Antijen Afinitelerinin Olgunlaşması

Bir antikorun, belli bir antijen ile uzayan veya tekrarlayan karşılaşmasında artış göstermesi o antijene karşı ilginin (afinitenin) olgunlaşması anlamına gelmektedir. Moleküler mekanizması, protein antijene karşı oluşan immün cevabın değişik aşamalarında izole edilmiş monoklonal antikorlar ile tanımlanabilmiştir. Antijene karşı artan afinite o antikorun yapısında yer alan V (değişken) bölgesinde oluşan nokta mutasyonlarına bağlıdır. Yeni V domain bölgesi meydana gelmesi ile B lenfositlerin bazıları antijene, orjinal V domaini taşıyanlardan daha yüksek bir afinite ile bağlanırlar. Daha yüksek afiniteli antikorlar üreten bu hücreler tercihen antijene bağlanır ve daha sonra her birinin antijene maruz kalmasıyla dominat B hücresi haline gelir. Ancak bu afinite olgunlaşması sadece protein yapısında olan antijenlere karşı ve T lenfosit bağımlı olarak gelişen hümmoral immün cevapta görülmektedir (1). Şekil 2.10'da antikor yapısında meydana gelen değişikliklerde afinite olgunlaşması şematize edilmektedir (1).

Afinitite olgunlaşması lenfoid foliküllerin germinal merkezlerinde meydana gelir. Foliküler dendritik hücreler aracılığı ile sunulan antijen tarafından seçilmiş yüksek afiniteye sahip B lenfositlerde, Ig genlerinin somatik hiper mutasyon gerçekleşir. Aktive olmuş B lenfositlerin bazıları lenfoid foliküllere geçerek, germinal merkezleri oluştururlar. Burada hızlıca bölünen genç B lenfositlerin çoğalmaları esnasında Ig genleri nokta mutasyonuna yatkın hale gelebilir. Bu aşamada deaminaz enzimi rol oynamaktadır. Ig gen mutasyon sıklığı diğer genlerin mutasyon hızından çok daha fazla olmaktadır. Bu nedenle somatik hiper mutasyon (SHM) olarak adlandırılan Ig gen mutasyonları, immün cevabı

başlatan antijenlere karşı, çok değişik afinitelerde bağlanabilen Ig moleküllerini içeren B lenfosit hücre klonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (2).

2.3.2.3. B Lenfosit Gelişiminde Pozitif ve Negatif Seçim

Lenfosit hücreleri meydana geldikleri lenfoid organlarda gelişimlerini sürdürürken ve antijen reseptörlerin ifade edilmesi tamamlanırken tam anlamıyla olgun hücre halinde değildirler. Lenfosit hücreleri kendilerine sunulan öz antijenleri tanıyarak çok düşük yanıt verebilirler. Kendinden olana zarar vermeyen hücrelerin seçilimi pozitif seçim olarak bilinmektedir. Potansiyel olarak yararlı lenfosit hücrelerin hayatta kalmasını kolaylaştıran bu süreç, lenfosit alt tiplerini oluşturmaları ile de ilişkilidir. T hücre hattında pozitif seçim kendi öz büyük doku uyumu kompleksini (MHC) tanıyan T lenfositlerin olgunlaşmasını sağlarken, B hücre hattında reseptör ekspresyonunu ve farklı alt tip hücre gruplarının birleştirilmesinin korunmasında yer alan bir süreçtir. Pozitif seçilime uğrayan lenfositler perifer lenfoid dokulara giderek orada yabancı antijenlere karşı immün cevap oluştururlar (1).

Öz antijenlere karşı reaktif olan B hücreler, ya B hücre reseptörlerinin (BHR) yüzey ekspresyonlarını tümü ile yok ederek ya da öze reaktif BHR'nü ikinci bir BHR ekspresyonuna doğru dilüe ederek apoptoza uğramaktan kaçabilir. Böylece öze reaktif antijen miktarları B hücre repertuarının seçiminde önemli bir rol oynayabilir. Aslında ligand konsantrasyonu, nadir özgül hücrelerle karşılaşmayı destekleyerek pozitif seçilme olasılığını artırır. Ancak negatif seçimde durum, antijen miktarı yüksek afiniteli öze reaktif tüm hücreler tarafından karşılanacak kadar yüksek olduğunda başarıya ulaşır (15). Önceki çalışmalar, öze reaktif olan B hücrelerin tolerans indüksiyonuna, eğer çözünmüş öz antijenler belirli bir konsantrasyon altındaysa, ulaşamadıklarını göstermiştir. Yine de B hücre gelişimi ve seçiminde öz antijen miktarının rolü tam olarak tanımlanmamıştır (15).

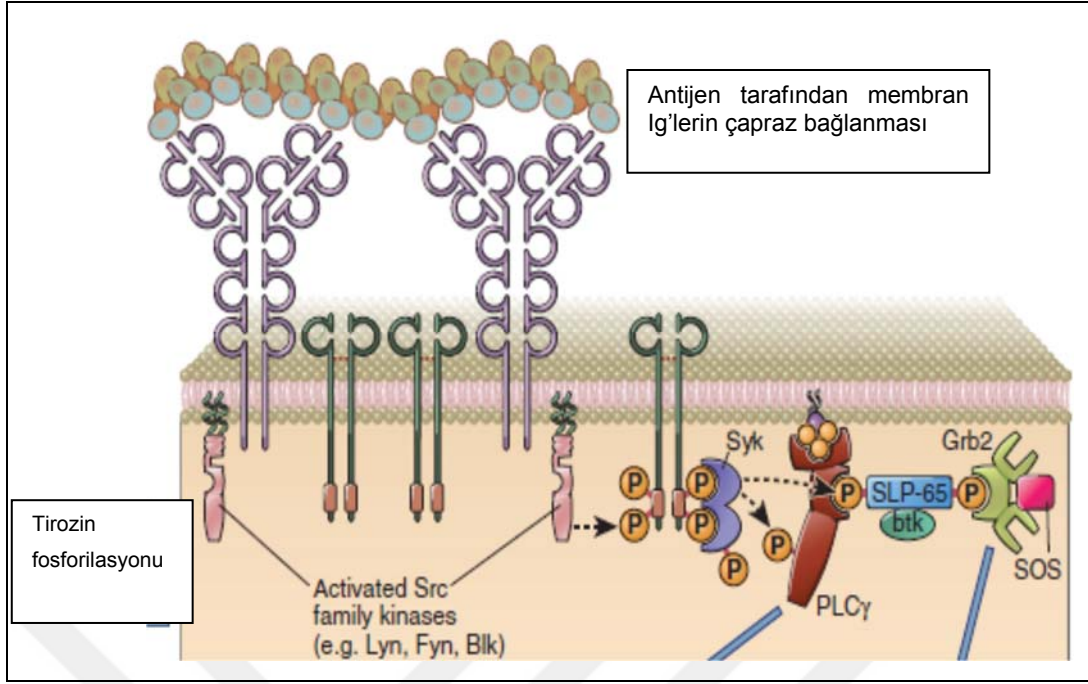
Insan öz antijenlerini kuvvetli tanıyarak immün cevap oluşturan henüz olgunlaşmamış lenfositlerin, olgunlaşmalarını tamamlamadan hücre hattından çıkarılması veya değiştirilme süreci negatif seçim olarak tanımlanmaktadır. Hem T hem B hücreler gelişimleri sırasında antijen reseptör ekspresyonundan sonra negatif seçilime duyarlı olurlar. Olgunlaşmamış lenfositlerin negatif seçilime uğramaları, var olan öz antijenlere tolerans gösterilmesi açısından önemlidir. Bu durum aynı zamanda reseptör düzenlenmesi olarak da bilinmektedir. Eğer bu düzenleme başarısız olursa öze reaktif olan hücreler ölürler (16). Kemik iliğindeki bu yüksek

afinite gösteren öze reaktif antikorların ölmesi merkezi tölörans olarak bilinmektedir. Böylece yeni oluşın immature B hücrelerin %85'den fazlası kemik iliğinde ölür ve perifere geçemez (7). Öz entijenlere güçlü yanıt gösteren olgunlaşmamış B hücreler, daha fazla Ig gen düzenlenmesi yapmak için indüklenebilir ve bu da öze yönelik afiniteden kurtulmalarına neden olabilir. Sonuç olarak lenfosit havuzunda öz antijenlere yanıt vermede yoksun olgun hücreler yer alır (1).

2.3.2.4. B Lenfosit Aktivasyonu ve Antikor Üretimi

Hümmoral immün cevap, değışik lenfoid dokularda yer alan B lenfositlerin antijenleri tanınmasıyla başlar. Bir antijene özgül B lenfositler, membranlarına bağılı Ig reseptörleri sayesinde antijeni doğal hali ile tanırlar. Antijenin tanınması, B hücrelerinin aktivasyonunu başlatan sinyal iletim mekanizmalarını da tetiklemiş olur. Antijen molekülleri, B hücre membranındaki birbirine yakın yerleşim gösteren Ig reseptörlerine bağılandığında, reseptör çapraz bağılanması gerçekleşmiş olur ve böylece sinyaller hücre içine aktarılır. Ancak sinyal moleküllerini antijeni tanıyan reseptörler aktarmazlar. Bu reseptörler hücre membranında yer alan Iga ve Igβ denilen iki proteine zayıf bağı ile bağılanarak B hücre reseptör kompleksini (BHR) oluştururlar. Bu iki proteinin sitoplazma tarafında yer alan domainleri, immünreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifleri taşırlar (ITAM). Bu moleküller immün sistemdeki çoğu aktive edici reseptörün sinyal ileten ünitelerinde de yer almaktadır. ITAM motiflerinde yer alan tirozin molekülleri, BHR kompleksi ile ilişkili kinazlar tarafından fosforilize edilirler (1). Şekil 2.11'de B hücresi sinyal iletiminin şematize edilmiş hali yer almaktadır.

B lenfositler, aktivasyonları için sinyal oluşturan kompleman sisteminin bir proteinine özgül reseptör eksprese ederler. Kompleman sistemde mikroorganizma ile karşılaştıklarında üretilen C3d proteini o mikroorganizmayı kaplar. B lenfositler bu antijenleri C3d'yi tanıyan iki tip kompleman reseptörü (CR2 veya CD21) eksprese ederek tanırlar. CR2 reseptörünün C3d ile bağılanması da B lenfositleri aktive eden sinyalleri tetiklemektedir (1).



Şekil 2.11. B hücresinde sinyal iletiminin şematik gösterimi (1). (*Cellular and Molecular Immunology*, 7.baskısından alıntılanmıştır).

2.4. B Lenfositlerde Antijen Reseptör Gen Yeniden Düzenlenmesi

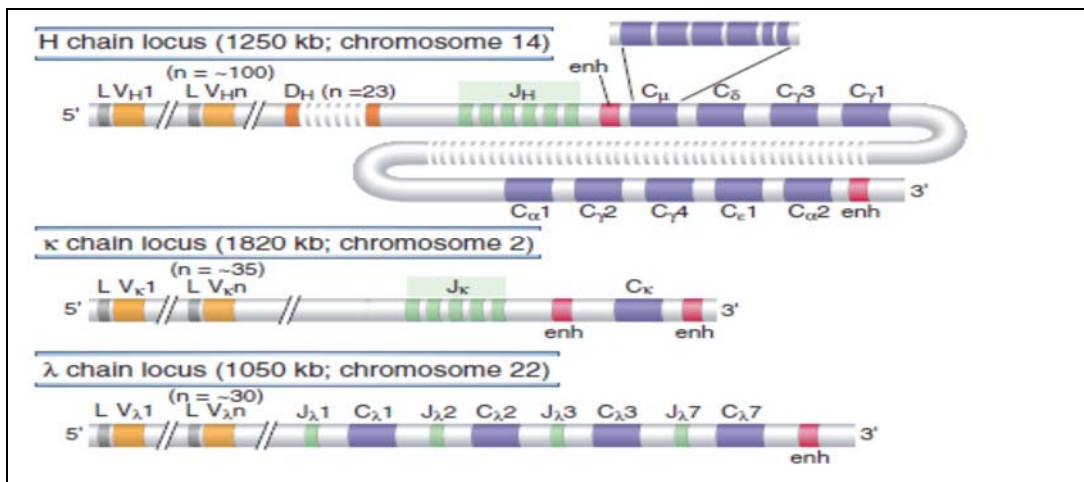
B lenfosit gelişimi, Ig ağır ve hafif zincir genlerinin yeniden düzenlenmesiyle belirlenir. Ig gen yeniden düzenlenmesi pro-B lenfosit hücrelerin ağır zincir lokusunda başlar. Eğer pro-B hücreler üretken bir allel meydana getirirlerse, pre-B lenfosit hücre reseptör kompleksi bir araya gelmektedir. Pre-B hücre reseptör sinyalleri, Ig ağır zincir oluşumuyla, pre-B hücrelerin farklılaşmasını ve klonal artış uyarımını sağlar. Pre-B hücre reseptör uyarılarının aynı zamanda daha fazla Ig ağır zincir yeniden düzenlemelerini önleyerek allelik dışlamaya katkıda buldukları düşünülmektedir. Ig'lerin ağır zincirde değişkenlik gösteren V ekson bölgesi bir kere oluşturulunca, bir ağır (H) zincir üretilir, bu zincir geçici hafif (L) zincir ile bir araya gelir ve pre-B hücre reseptör kompleksini oluşturmak üzere sinyal molekülleri Ig alfa ve beta'yı oluşturur (17). Bu öncül B hücre reseptörü klonal genişleme, hayatta kalım ve pre-B hücrelere doğru farklılaşmayı sağlamaktadır. İki IgH (ağır zincir) allelerinden sadece biri B hücre reseptörüne katılır ki bu durum allel dışlama (allelic exclusion) olarak bilinir. Bu süreç V segmentinden DJ'ye rekombinasyon düzeyinde regüle edilmekte ve her B hücresinin tek bir klonotipik antikor üretmesini sağlamaktadır. B hücresinin monospesifik reseptör üretimi önemlidir; çünkü bu reseptörler B hücre ontolojisi boyunca öze tolerans gösteren B hücrelerin

üretmesini sağlarlar. Halbuki B lenfosit gelişiminin ilerleyen safhalarında allelik dışlama antijene özgü antikor yanıtın etkin olmasını sağlar (17).

Önceleri milyonlarca farklı sayıda antijen reseptörlerin nasıl meydana geldiği sorusu, Ig moleküllerin sınırlı sayıda Deoksiribonükleik Asit (DNA) kodonlarından gelen amino asit sekanslarının analiziyle anlaşılacağı şeklindeydi. Yapılan analizler, benzer izotipte antikorun çok farklı polipeptid zincirinin C terminal ucunda aynı sekansı paylaştığını ama N terminal ucunda immunoglobulinlerin değişken alanları için farklı sekanslar olduğunu göstermiştir. Bu durum 'bir gen- bir polipeptit' hipotezinin aksine görüşler ortaya çıkarmış ve Ig gen yapısının gösterilmesiyle açıklığa kavuşmuştur. Antikor üreten kanser hücresinde yer alan Ig gen yapısının embriyonik doku veya lenfotik olmayan dokulardan farklı olduğu gösterilmiş ve bu farklılığın da DNA segmentlerinin immunoglobulin ağır ve hafif zincirini kodlayan lokus içinde, spesifik olarak birlikte bağlanmasından ileri geldiği belirtilmiştir. Ancak sadece B lenfositlerde görülen bu farklılık diğer doku ve hücrelerde yoktur. Benzer gen yeniden düzenlenmesi T lenfosit gelişiminde T hücre reseptörünün gen lokusunda gerçekleşmektedir (1).

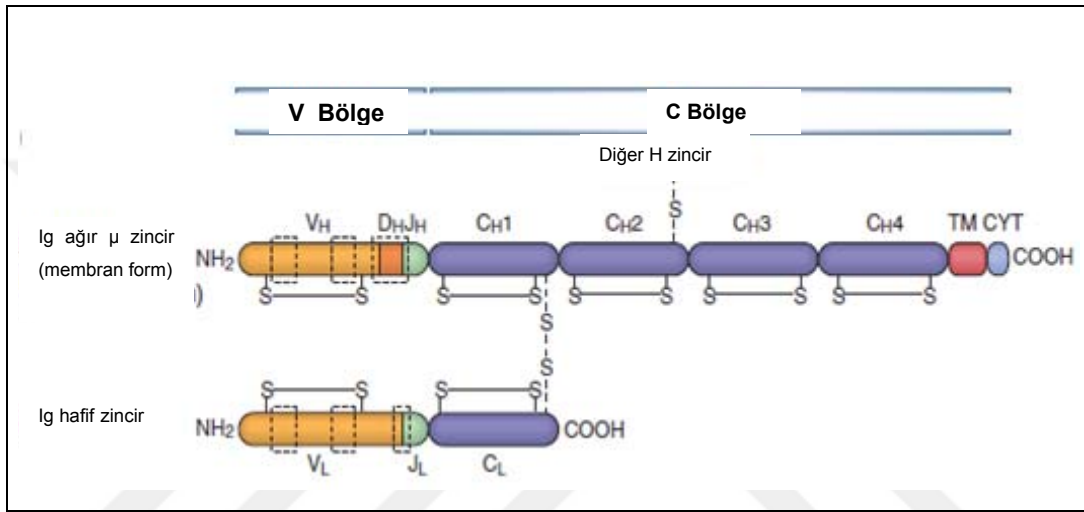
2.4.1. Ig Gen Lokusu Organizasyonu

Ig gen lokusu sırasıyla; Ig ağır zinciri, Ig κ hafif zincir ve Ig λ hafif zincir olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Her lokus farklı bir kromozom üzerindedir (1). Şekil 2.12'de Ig geninin şematize edilmiş germline organizasyonu yer almaktadır. Ağır zincir genleri 14. kromozom üzerinde, hafif zincir κ genleri 2. kromozomda, hafif zincir λ genleri 22. kromozomda yer almaktadır (13).



Şekil 2.12. İnsan Ig gensoy hattı organizasyonu (1)

Ig genleri tüm memelilerde esasen aynı şekilde düzenlenmesine rağmen her gen lokusunda farklı gen segmentlerinin sekans, sayı ve kromozomlarının konumu değişebilir (1). Ig ağır ve hafif zincir domainleri ile antijen reseptör polipeptid zincirleri arasındaki ilişki Şekil 2.13’de gösterilmektedir. Her polipeptidin V ve C bölgeleri farklı gen segmentleriyle kodlanmaktadır. Ağır ve hafif zincirin değişken (V) bölgelerinde yer alan yüksek değişkenlik gösteren bölgeler şekil üzerinde kesik çizgilerle gösterilmiş, Ig μ zinciri üzerinde transmembran (TM) ve sitoplasmik (CYT) domain kodları eksonlar ile ayrılmıştır (1).



Şekil 2.13. Ig zincirlerinde yer alan domainlerin şematik gösterimi (1). (*Cellular and Molecular Immunology, 7.baskısından alıntılanmıştır*)

Her bir Ig nükleotid zincirinin 5' ucunda, yaklaşık 300 baz çiftinden oluşan 'V' gen segmenti bulunmaktadır. V gen segment sayısı Ig zincirinin farklı bölgeleri ve farklı türlerinde oldukça farklılık gösterir. Örneğin insanda, κ hafif zincir lokusunda 35 V geni, λ lokusunda yaklaşık 30 V geni, ağır zincir lokusunda ise 100 fonksiyonel V geni bulunurken, farelerde bu sayılar değişiktir. Her lokus için V gen segmenti DNA zinciri üzerinde geniş aralıklarla yer almaktadır. 5' ucunda yerleşmiş her V segmenti proteine çevrilmiş 20-30 N terminal kalıntıları kodlayan bir baş eksondur (1).

Farklı uzaklıklarda bulunan V genlerine, oldukça yakın aşağı dizilim gösteren J segmentleri bulunur. J segmentleri 30 ile 50 baz çifti arasında değişen uzunlukta ve kodlanmayan sekans bölgeleri ile ayrılmışlardır. V ve J segmentleri arasındaki Ig H lokusunda ilave olarak D segmenti bulunur. V geninde olduğu gibi J ve D genlerinin sayısı farklı Ig'lerde ve farklı türler için değişik olmaktadır. Her Ig lokusu, ayrı gen

yeniden düzenlenmesi ve C bölgesi gen sayısına sahiptir. İnsanda Ig κ hafif zincir lokusunda tek C geni (C κ), λ hafif zincir lokusunda dört fonksiyonel C geni (C λ) vardır. C κ ve C λ genlerinin her biri, hafif zincirin tüm C domainini kodlayan tek bir eksondan oluşur. Ig ağır zincir lokusunda ise dokuz farklı Ig izotipi ve alt tipi kodlayan dokuz C geni (C H) vardır. Her C H geni ise beş veya altı eksondan oluşur. Her Ig ağır zincirinin membran formunun karboksil ucu, sitoplazmik ve transmembran domainleri dahil iki küçük ekson kodlar (Şekil 2.13) (1,13).

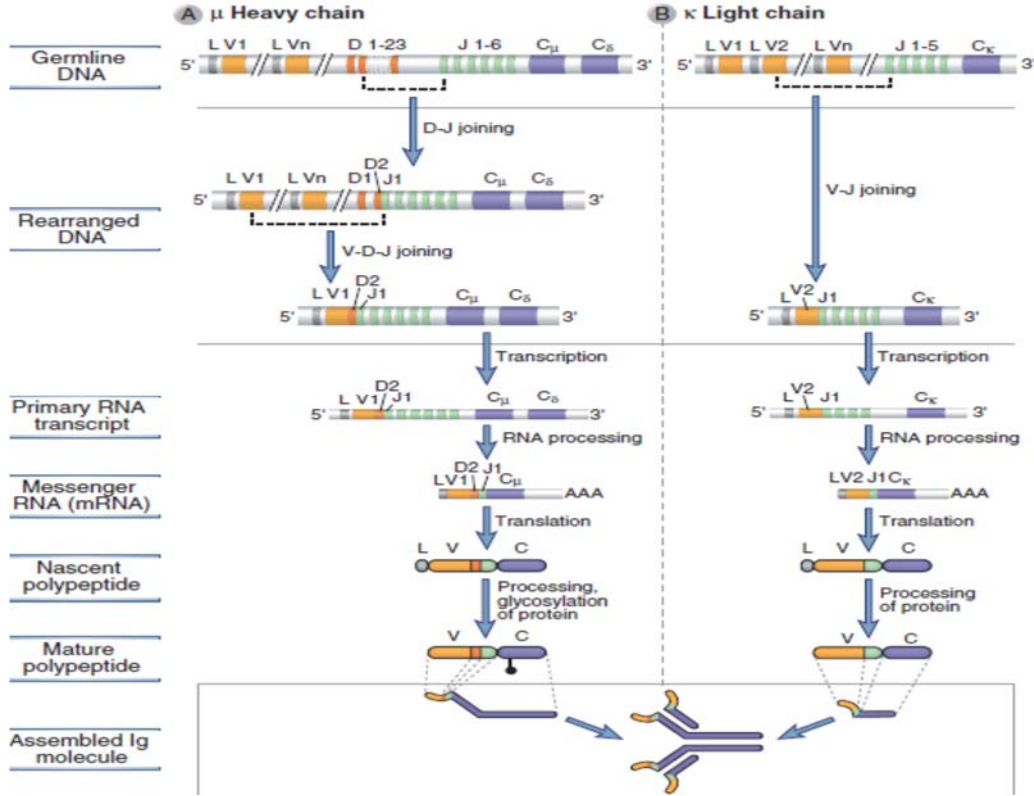
Ig hafif zincirinde (κ , λ), V domaini V ve J gen segmentiyle kodlanır. Ig ağır zincir proteininde V domaini ise V, D ve J gen segmentleriyle kodlanmaktadır. V ve D segmentleri yeniden düzenlenmesi arasında, hem V ve D segmentleri arasındaki hem de D ile J segmenti arasındaki tüm birleşme yeri kalıntıları, Ig H domainleri halinde, tamamlayıcı belirleyici bölge 3 (CDR3) olarak da bilinen üçüncü aşırı değişken bölgeyi meydana getiriler (1).

2.4.2. V(D)J Rekombinasyonu

Farklı B antijen reseptörünü kodlayan genler, lenfositlerin değişkenlik (Variability-V) gösteren bölgesindeki gen segmentlerinin, çeşitlilik (Diversity-D) ve birleştirme (Joining- J) gen segmentlerinin yeniden düzenlenmesiyle oluşturulurlar. Her bir antijen reseptör gen için, aynı kromozom üzerinde V segmentine belirli mesafede yukarı ve aşağı bölge segmentlerin kaynaştırılmasıyla yeniden düzenlenmiş ekson oluşturulur. Rekombinasyon ya da rearanjman denilen bu mekanizmaya V(D)J gen yeniden düzenlenmesi denilmekte (1) ve çeşitli antijen repertuarlarının oluşturulması açısından temel önem taşımaktadır. Ayrıca bu mekanizma sadece lenfositlerde meydana gelen bir mekanizmadır (18).

B lenfosit antijen reseptör fonksiyonel proteinlerin kodlandığı, Ig soy hattı kodları mesajcı Ribonükleik Asite (mRNA) aktarılmaz. Fonksiyonel antijen reseptör genleri sadece B lenfosit gelişiminde, V, D ve J gen segmentlerini rastgele içine alan DNA yeniden düzenlenmesinden sonra meydana gelirler. İlk önce D segmenti J segmentine katılır, daha sonra V segmenti, oluşan bu DJ segmentiyle kaynaşır. Her yeniden düzenlenme ardışık bir sıra izleyerek gerçekleşir. İlk olarak, rekombinasyona aracılık eden enzimlere erişebilir gen segmentleri yapmak için antijen reseptör kromozomun özel bölgesinde kromatin açılmalıdır. Daha sonra seçilmiş iki gen segmenti belirli bir kromozomal mesafe boyunca yan yana getirilir.

Çift sarmallı kırıklar daha sonra bu iki segmentin sonlanma kodlarına tanıtılır, nükleotidler eklenir veya çıkarılır ve son olarak klonal olarak benzersiz ama farklı antijen reseptörleri kodlayan genler etkin olarak transkripsiyon yapabilir (1). Şekil 2.14.a ve b' de Ig ağır ve hafif zincirV(D)J gen yeniden düzenlenme mekanizmaları şematize edilmiştir.

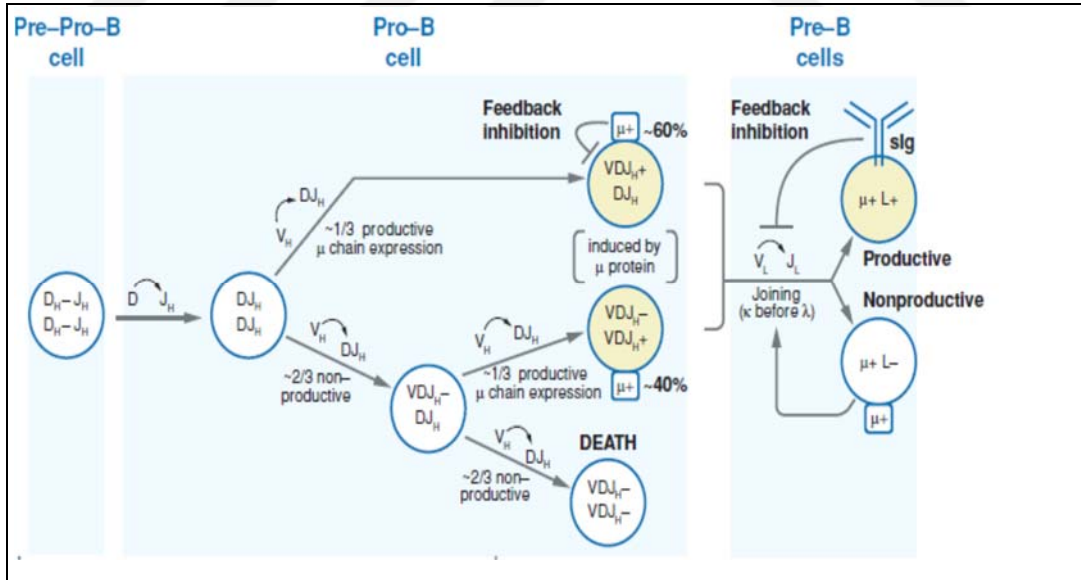


Şekil 2.14.a. Ig μ (mü) ağır zincir oluşumu b. Ig κ (kappa) hafif zincir oluşumu (1)

V(D)J gen yeniden düzenlenmesi yapılmış ekson bölgesinin aşağı bölgesinde bulunan C alanı, J-C soy hattı intron bölgesi ile ayrılmıştır. Bu yeniden düzenlenmiş ekson birincil RNA transkript formunu oluşturmak için transkripsiyona uğrar. Meydana gelen birincil RNA'da yeniden düzenleme gerçekleşmiş VDJ kompleksi ve C μ ekzon bölgesi yer almaktadır (1). C μ nüklear RNA, çoklu adenin nükleotidlerin bulunduğu Poli A kuyruğu olarak isimlendirilen bölgenin aşağı bölgesinden kesilir ve 3' uca eklenir. Daha sonra RNA intron bölgesinin çıkarıldığı, eksonların birleştirildiği splazing işleminden geçer (1). Olgun polipeptid formunu alan Ig ağır zinciri Şekil 2.14.a'da gösterildiği gibi Ig molekülünün Y görünümündeki yapısında yerini alır (1). Ig ağır zincirindeki gen rekombinasyonları tamamlandıktan sonra, hücre pro-B safhasından pre-B safhasına geçmiş olur. Daha sonra hafif zincir oluşumu için Ig hafif zincirin IGK (kappa) lokusunda yer alan V κ ile J κ segmentleri

arasında rekombinasyon meydana gelir (Şekil 2.14.b) (9). Hafif zincir κ gen yeniden düzenlenmesi başarılı olmazsa, hafif zincirin diğer türü olan lambda (λ) zincir gen yeniden düzenlenmesi benzer moleküler safhalardan geçerek $Ig\lambda$ hafif zincir oluşturulur. 22. kromozomun uzun kolunda yer alan $Ig\lambda$ gen lokusunda meydana gelen anomaliler 22q11.2 silinme sendromu adı altında çoklu sistem hastalıkları olarak araştırılmaktadır (19). Bu rekombinasyonlar sonucu oluşan T ve B lenfositlere ait hücre dışı (ekstrasellüler) DNA segmentleri immün sistemi moniterize etmesi açısından önem taşımaktadır (20).

$Ig H$ zincir yeniden düzenlenmesi, V_H 'nın DJ_H 'ya katılmasından önce gerçekleşen D_H segmentinin J_H segmentine katılması, her iki allelde gerçekleşmesi ile düzenlenir. Daha sonrasında V_H segmentinin DJ_H segmentine katılımı her iki allelde gerçekleşmez. Allelik dışlama ile her iki allelde üretken olmayan V_HDJ_H gen düzenlenmesi geçirmiş B hücreler, Ig yüzey reseptör ekprese edemezler ve hayatta kalamazlar. Bu hücrelerin oranı yaklaşık %40'dır. Hayatta kalan ve olgun forma gelen B hücrelerde ise Ig ağır zincir yeniden düzenlenmesi tek allelde gerçekleşmiş hücrelerin oranı yaklaşık %60'dır (21,22). Şekil 2.15'de allelik dışlama ile işlevsel olgun B hücre sağkalım arasındaki ilişki şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil 2.15. V(D)J gen yeniden düzenlenmesi ile allelik dışlama ve işlevsel olgun B hücre sağ kalım arasındaki ilişki (22).

Şekil 2.15'de şematize edildiği gibi, Ig gen lokuslarındaki düzenlemelerin çoğunluğu sadece bir allelden meydana gelir. Ağır zincir D-J yeniden düzenlenmesi her iki allelde gerçekleşir. Daha sonra V segmentinden DJ segmentine doğru

gerçekleşen yeniden düzenlenme ise tek allelde gerçekleşir. Eğer V-DJ arasında çerçeve kayması sonucu dizinin kodlanamaması gibi durum olursa, ikinci allel rekombinasyona girer. Eğer ilk allelde fonksiyonel bir yeniden düzenleme gerçekleşirse Ig ağır zincir rekombinasyonu durur. Burada V-DJ'ye geçişte allellik çıkarma söz konusudur (22). Üretken bir ağır zincir oluşumundan sonra Ig hafif zincir oluşumu için gen yeniden düzenlenmesi gerçekleşmektedir. Öncelikle hafif zincir V_k - J_k gen segmentleri arasında gerçekleşir ve bu durum sadece bir allelde görülür. Eğer ilk denemede fonksiyonel Ig_k hafif zincir oluşmazsa aynı allel üzerinde V_k 'nin üst sırasında yer alan diğer V_k segmenti J_k segmenti ile yeniden düzenlemeye gider. Eğer tüm segmentler denenir ve fonksiyonel olmayan bir Ig_k hafif zincir üretilirse, gen rekombinasyonu bu defa hafif zincirin diğer çeşidi olan lambda (λ) zincir ile gerçekleşir (23). Hafif zincir gen yeniden düzenlenmesi oluşumunda da 60/40 oranı bulunmaktadır. Olgun B hücrelerin yaklaşık %60'ında κ hafif zincir, %40'ında λ hafif zincir görülmektedir (22, 23).

2.4.3. V(D)J Rekombinasyon Mekanizması

V(D)J rekombinasyon mekanizması birbirini takip eden farklı dört aşamadan meydana gelmektedir (1). Bu dört aşama Şekil 2.16'da şematize edilmektedir.

1) Sinapsis: Ig gen lokuslarında kodlama bölgelerinde korunmuş 7 baz çiftinden (bp) oluşmuş heptamer, 9 bp'lik nanomer sekanslar bulunur ve bunlar birbirlerine 12 veya 23bp aralıklarla konumlanmışlardır. Heptamerler genellikle CACAGTG palindromik nükleotidlerinden oluşmakta ve daima kodlama sekansının yanında yer almaktadırlar. Nanomer yapılar da ise AT nükleotidleri çoğunluktadır. V(D)J rekombinasyon mekanizması, zincir üzerinde yer alan bu korunmuş yapıların oluşturduğu rekombinasyon sinyal sekansları (RSS) üzerinden tanınarak başlar (24). Rekombinasyona katılan gen segmentlerinin iki seçilmiş kod segmentleri (D,J veya V-DJ) ve bunların RSS bölgeleri, kromozomun ilmek halini almasıyla bir araya gelirler ve sonraki aşamalar bu adımı takip etmektedir (1). Rekombinasyon, iki gen segmenti arasında bir gen segmentinin yalnızca 12bp'lik ara parçası ve diğer segmentin 23bp'lik ara parçası ile çerçevelenmesi ile başlar. Bu durum 12/23 kuralı olarak bilinmektedir. Rekombinasyon mekanizmasının bu safhasında, RSS bölgelerin bir araya gelmesinde kodlanacak gen sekanslarının aynı düzlem veya ayrı düzlemde olmasından kaynaklı ilmek oluşumunda iki farklı durum gerçekleşir.

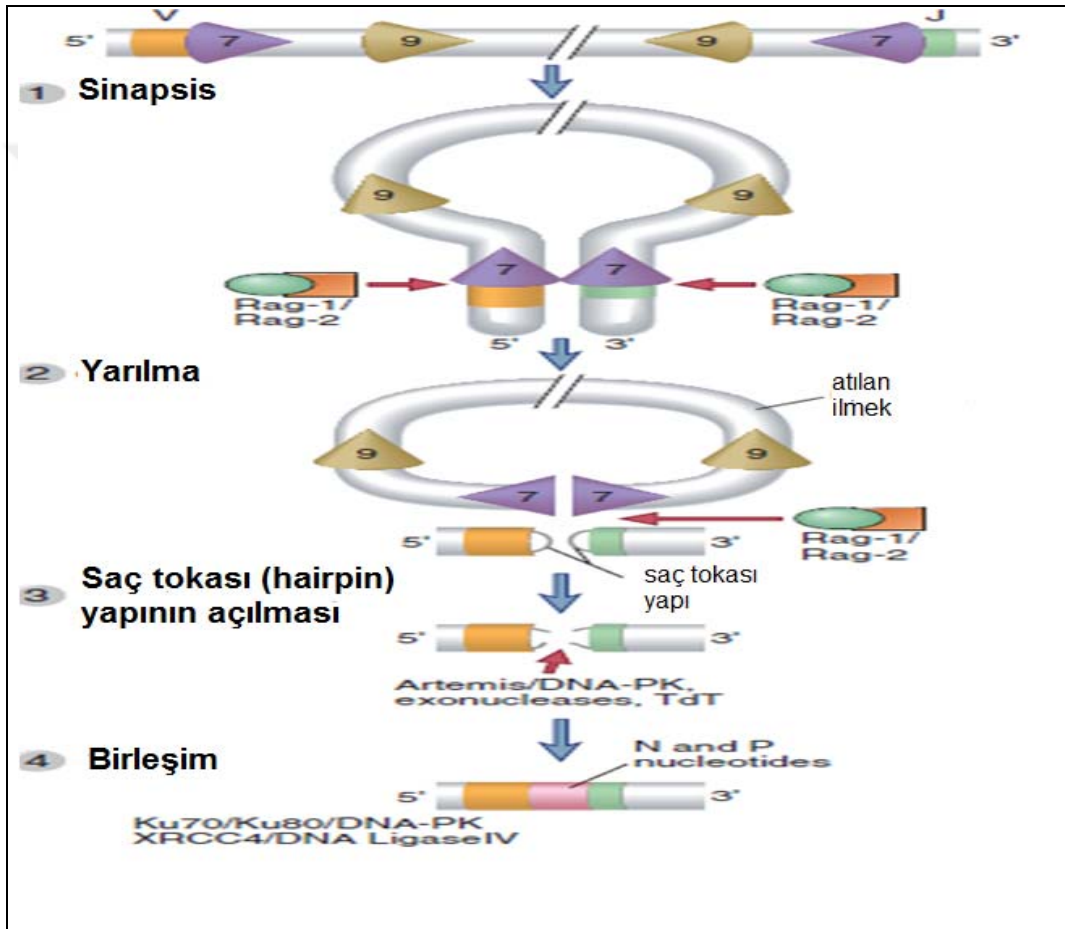
Genellikle Ig hafif zincir κ lokusunda V ve J segmentleri aynı konumdadırlar. İlmek yapı oluşurken RSS bölgeleri bir araya inversiyon yaparak gelirler. Ancak çoğu Ig gen yeniden düzenlenmesi silinme yolu ile oluşur. Burada kodlanacak gen segmentleri ayrı konumlarda oldukları zaman sinapsis safhasında RSS bölgeleri silinerek kromozomdan ayrılırlar (1).

2) Yarılma (Cleavage): çift iplikli kırılmalar RSS kod sekansında enzimatik olarak oluşur. Bu safhada rekombinasyonu aktifleyici gen-1 (RAG-1) ve rekombinasyonu aktifleyici gen-2 (RAG-2) olmak üzere iki enzim çok önemli rol oynar. Bu genler aynı zamanda V(D)J rekombinaz olarak da bilinmektedir. Lenfoid sisteme özel olan bu enzimler sadece B ve T lenfosit gelişiminde eksprese olurlar. RAG-1 heptamer ve kod segmentini tanıyarak onları birleştikleri yerden keser. Ancak RAG-1 enziminin aktif hale geçmesi RAG-2 ile yaptığı kompleks sonucu olur. Bu genler ayrıca sinapsis safhasında segmentlerin bir arada tutulmasını sağlarlar. Bu iki gen, çift zincirli kırılmaları birbirinden ayırır ve hem saç tokası ucu hem de küt ucu bir arada tutar (1). RAG-1 tek iplikte heptamer ve kodlama bölgesi arasında bir çentik açar. Kodlama bölgesinin serbest kalan -OH ucu diğer iplikteki fosfodiester bağına atak yaparak kovalent bir bağ oluşturur. Çift iplikte meydana gelen kırılma sonunda her iki kodlama bölgesinde kapalı saç tokası şeklinde ilmek yapı oluşur. Sinyalin sonu olan ve heptamer ile RSS'in geri kalan kısmı ise küt ucu formunda olur. RAG-1 ve RAG-2 gen proteini üzerinde yapılmış çalışmalarda bu iki gende meydana gelen mutasyonların immün yetmezlik ile ilgili hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir. Dolaşımdaki sayısı değişmeyen ancak aktivasyonu azalmış T lenfositlerin olduğu, B lenfositlerin ise sayıca çok azaldığı veya olmadığı bir immün yetmezlik hastalığı olan Omenn sendromu bu iki gende meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (23).

3) Saç tokası (hairpin) yapının açılarak sürecin sonlanması: bu safha bir dizi baz eklenip çıkması ile modifiye edilir. Hairpin yapı, Artemis denilen enzim yardımıyla tek iplikçikte asimetric şekilde açılır. Enzim, bu yapının kod bölgesinden açılmasını sağlar. Enzim yokluğunda hairpin yapı açılmaz ve lenfositlerin gelişimi olamaz. Hairpin yapıdaki bu asimetric açılmayla meydana gelen kısa zincirin daha uzun zincire tamamlayıcı nükleotidler eklenerek uzatılması gerekir. P (palindromik) nükleotidler denilen bu ilave nükleotidlerden sonra terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile N nükleotidler denilen yaklaşık 20 tane kodlanmamış

nükleotid, kırık DNA ucuna eklenir (1). Böylece V(D)J rekombinasyonu oluşumunda soy hattında kodu olmayan nükleotidlerin eklenmesi gerçekleşmiş olur (1).

4) Birleşim (Joining): kırık kodlama ucu ile sinyal ucu bir araya gelerek çift zincir tamir işlemiyle bağlanırlar. Burada homolog olmayan bir birleşme olur. Bu homolog olmayan birleşimde ubiquitin denilen regulator proteinler yer alırlar. Ku70 ve Ku80 proteinleri kırık uçlara bağlanır ve çift zincirli DNA tamir enzimi olan DNA bağımlı protein kinaz katalitik alt ünitesini destekler. DNA ligaz IV ile kesik uçlar birleştirilir (1).



Şekil 2.16. V(D)J rekombinasyon aşamalarının şematik gösterimi(1). *Cellular and Molecular Immunology*, 7.baskısından alıntılanmıştır)

Antijen reseptör lokus konfirmasyonlarının V(D)J rekombinasyonları ile meydana gelmesi, bu rekombinasyonda yer alan diğer moleküler mekanizmaları açığa çıkarmayı amaçlayan çalışmalara yol açmıştır. Bir araştırmada ele alınan kromatin yapısal proteinin (CTCF), gen rekombinasyonu basamaklarındaki sinapsis aşamasında RSS moleküllerin konumlanmasını kolaylaştırdığı ve CTCF aracılı

oluşan ilmek yapının V(D)J rekombinasyonu düzenleyebildiği gösterilmiştir. CTCF proteini aracılığıyla RSS'lerin cis-düzenleyici elementlerin yakınına konumlandırılması sinapsisi kolaylaştırabilir (25).

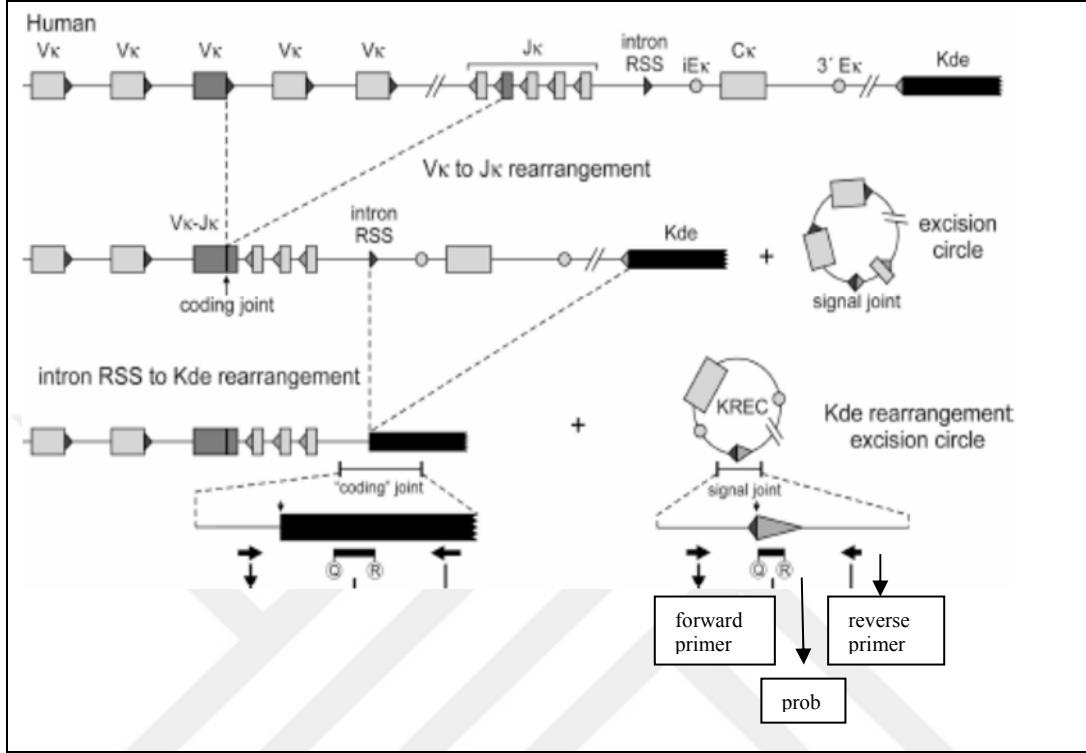
2.5. Kappa Deleting Recombination Excision Circle (KREC)

2.5.1. KREC Oluşum Mekanizması

B lenfosit olgunlaşması sürecinde hücre reseptörünün ağır ve hafif zincirleri genomik yeniden düzenlenmelere uğrayarak, reseptör genlerinin fonksiyonel hale gelmesini sağlarlar. B lenfosit reseptör geninde yer alan ilk ekson bölge, fonksiyonel özellik göstermemektedir. Ancak bu gende yer alan V (değişken), D (çeşitlilik) ve J (birleşim) genlerinin rekombinasyonları ile bu reseptör fonksiyonel özellik kazanmaktadır (26). Ig'lerin hafif zincirin kappa (κ) ve lambda (λ) olmak üzere iki tipi bulunmakla beraber, B lenfositler bu iki tip zincirden ancak birini eksprese ederler. İnsanda B lenfositlerin yaklaşık %60'ı κ zincirini, %40 oranında λ zincirini eksprese etmektedir (27).

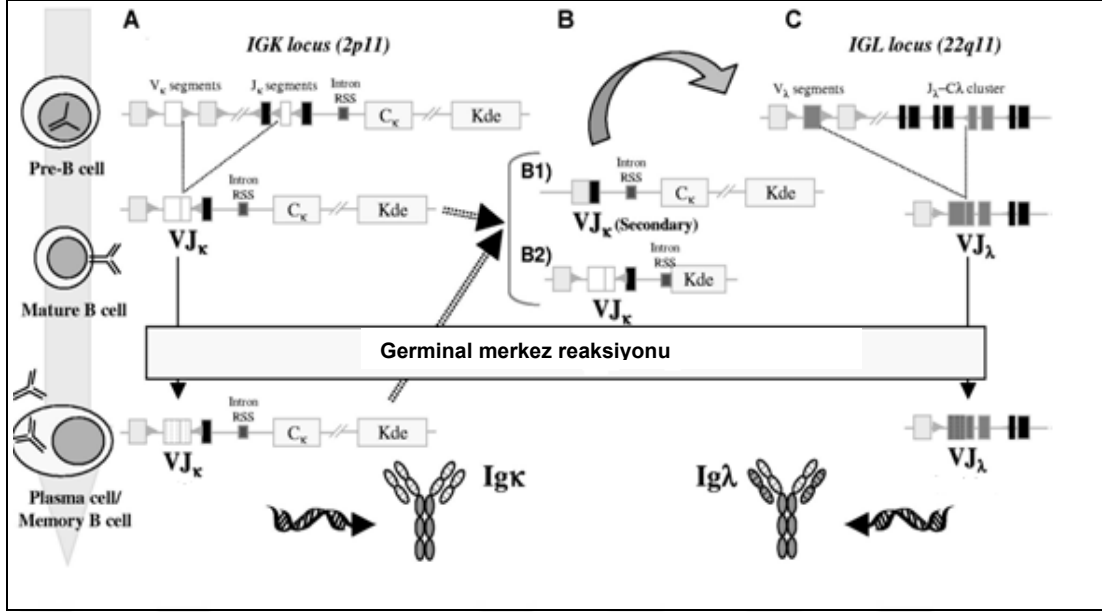
Ig κ hafif zincir genlerinin ekspresyonu, DNA bağlanma proteinlerinin promotor ve enhancer (özgüllük artırıcı) sekansları ile etkileşmesiyle regule edilmektedir (28). Kappa hafif zincir için üç enhancer bulunmaktadır. Biri (KE5') J κ ile C κ genleri arasında intronik bölgede yer alır. Diğer iki enhancer ise C κ geninin 3' ucunda proksimal (KE3'P) ve distal bölgesinde (KE3'D) konumlanmıştır. Bu üç enhancer spesifik transkripsiyon faktörlerine bağlanabilen spesifik nükleotid motif taşırlar. Genellikle sadece bir tip Ig hafif zincir geni eksprese edilir. Kappa genleri fonksiyonel olmadığında diğer tip hafif zincir lambda genleri kodlanmaktadır (28). Ig V κ geni ile Ig J κ genleri arasında oluşan yeniden düzenlenmelerle işlevsel olmayan V κ -J κ ürünü üretirlerse bu lokus, kappa deleting element (Kde)'in yeniden düzenlenmesi ile segmentel bir silinmeye uğrar. Ig C κ genin 3' bölgesinde lokalize olmuş Kde elementi, insan ve farelerde tanımlanmıştır (28). Kde aracılı gen yeniden düzenlenmesi en çok J κ -C κ intron bölgede yer alan RSS bölgesi üzerinden gerçekleşmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar J κ geni ile komşu RSS üzerinden de gen yeniden düzenlenmesi yapılabildiği gösterilmiştir (27). Kappa deleting recombination excision circle (KREC) ise κ hafif zincir gen yeniden düzenlenmeleri sonucunda DNA'dan ayrılarak dairesel yapıda ekstra kromozomal

DNA segmenti olarak sentez edilen bir yapıdır (29). Şekil 2.17’de KREC oluşumunun şematize edilmiş hali bulunmaktadır.



Şekil 2.17. KREC oluşumunun şematik gösterimi(29)

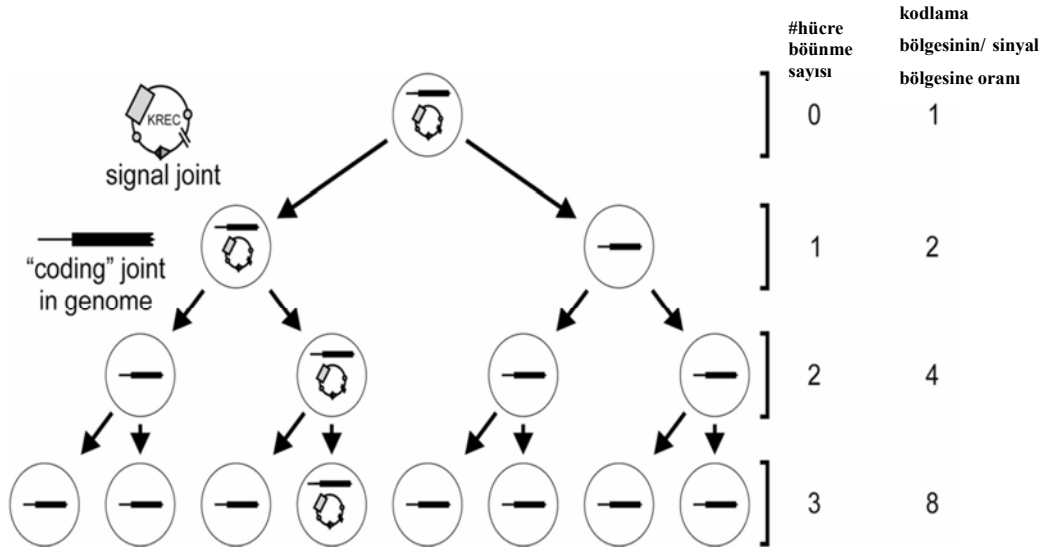
Hücrede, pre B aşamasında IgH zincir gen yeniden düzenlenmeleri tamamlandıktan ve bir mü (μ) ağır zincir üretiminden sonra, IG κ lokusunda hafif zincir üretimi için V κ ve J κ segmentleri arasında yeniden gen düzenlenmesi gerçekleşir. Eğer hücrede bu gen yeniden düzenlenmeleri başarılı bir şekilde tamamlanırsa hücre germinal merkeze girerek somatik hipermutasyona uğrar ve sonuçta Ig κ tipi hafif zincir bulunan hafıza veya plazma hücreleri meydana gelir (Şekil 2.18.a.) (30). Ancak, pre-B safhasındaki hücrede IGK lokusunda gerçekleşen gen yeniden düzenlenmeleri fonksiyonel bir κ zinciri oluşturmazsa hücre germinal merkeze girmeden önce her iki Ig κ allelde ilave gen yeniden düzenlenmesi gerçekleşir. Bu aşamada hücrede eğer ilk 5'V κ ve 3'J κ segmentlerinde başarısız bir düzenlenme olursa ikinci bir VJ κ gen düzenlenmesi oluşur ve fonksiyonel yeni bir hafif zincir meydana getirilir (Şekil 2.18.b) (30).



Şekil 2.18. B hücre gelişimi boyunca Ig κ (kappa) ve Ig λ (lambda) zincirleri oluşumunun şematik gösterimi (30).

Şekil 2.18.c'de görüldüğü gibi alternatif olarak Kde bölgesinin J κ -C κ intron bölgesine yeniden düzenlenme yapması ile C κ ekson ve enhancer bölgelerin silinip çıkarılmasıyla IG κ lokusu işlevsiz hale gelir. Bu tür silinmelere normalde IG λ lokusunun B hücrelerini apoptozdan kurtarmak için yeniden düzenlenmesi eşlik eder. Bu şekilde hayatta kalan hücre germinal merkeze girer ve normal B hücre olgunlaşma süreci devam eder (30). Bu segmentel silinme sonucunda V κ -J κ kodlama parçası (coding joint) olarak genomda stabil kalır. KREC ise sinyal parçası (signal joint) olarak çift iplikli dairesel bir DNA olup, genomdan ayrılarak kararlı bir yapı gösterir. Kde gen yeniden düzenlenmesi genel bir durumdur ve Ig κ tipi hafif zincir taşıyanların %30'unda, Ig λ hafif zincir taşıyan nerdeyse tüm olgun B lenfositlerde gerçekleşir. Ayrıca bu gen yeniden düzenlenmesi antijen özgüllüğünü etkilememektedir (29).

RSS intron-Kde yeniden düzenleme geçirmiş bir B lenfosit hücresi ikiye bölündüğünde oluşan yavru hücrelerin ikisinde genomdaki RSS intron- Kde kodlama parçası bulunurken, sinyal parçası olan epizomal KREC kendini eşlemediğinden, yavru hücrelerden ancak birinde bulunur. Bu durumda KREC, her hücre bölünmesinde iki kat dilue edilerek yeni hücrelere aktarılır (29). Şekil 2.19'da sinyal ve kodlama parçasının yeni hücrelere aktarımı şematize olarak gösterilmektedir.

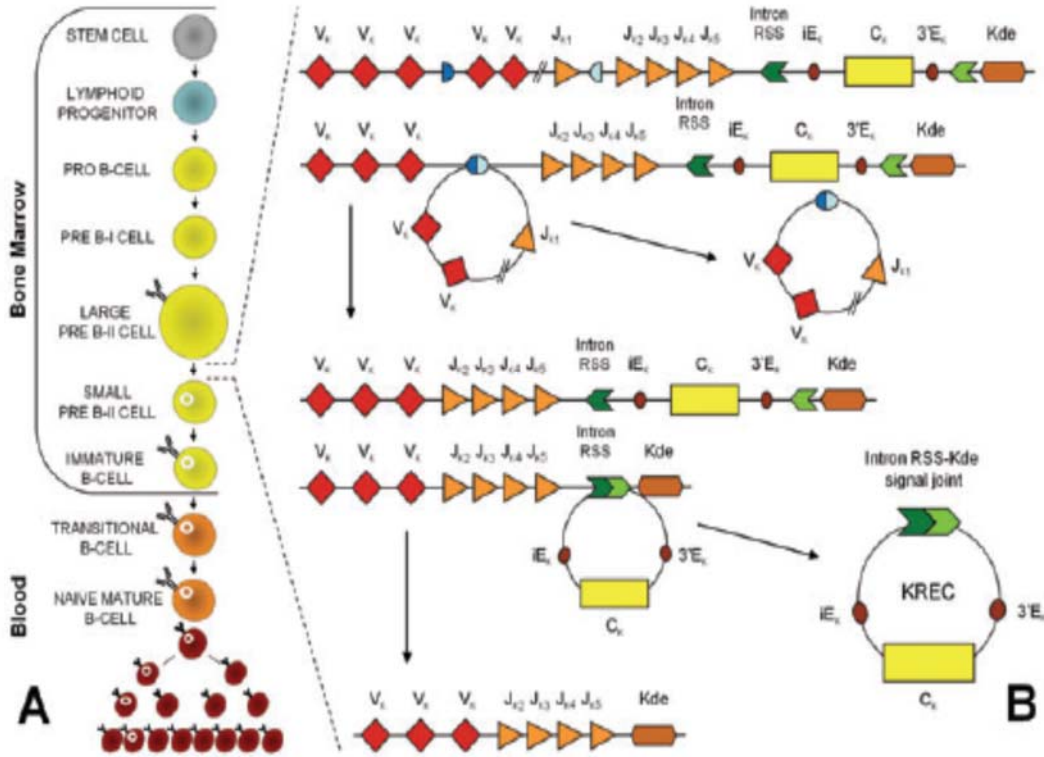


Şekil 2.19. Sinyal ve kodlama parçasının yeni hücelere aktarımının şematik gösterimi (29)

Böylece sinyal parçası ve kodlama parçalarının artmış baz sayısı üzerinden, B lenfosit hücre bölünme sayısı elde edilebilir. Dolayısı ile oluşan KREC segmenti; geçiş tipi B hücrelerin değil, olgun B hücrelerin hemostatik proliferasyonunu göstermektedir (29). Kendini eşleyemeyen ve yeni hücelere dilue olarak aktarılan bu sinyal parçası hücre öldüğü zaman kaybolur (31).

$Ig\kappa^+$ B hücre hattı ile yapılan çalışmada Kde segmentin her iki allelde soy hattında bulunduğu, ancak RSS intron-Kde'nin tek allelde taşındığı gösterilerek, IGK gen allelin her ikisinde de $J\kappa-V\kappa$ gen düzenlenmesinin olduğu ancak birinin çerçeve dışı okuma ile RSS intron-Kde yapısı taşıdığı anlaşılmıştır (29). RSS intron-Kde yeniden düzenlenmesi, pre-B hücrelerde kemik iliğindeyken başlaması, periferdeki B lenfositlerde RAG geni transkripsiyon seviyesinin ve $J\kappa$ gen segmentinde çift iplikçikli kırılmaların düşük olması, reseptör revizyonun kemik iliğinde indüklendiği görüşünü desteklemektedir. Eğer RSS intron-Kde yeniden düzenlenmeleri, periferik B lenfositlerdeki reseptör düzenlenmesinden kaynaklıysa, hücre bölünme sayısı ile hesaplanan KREC ölçümlerinin çok az olması gerekmektedir. RAG ekspresyonu B hücre reseptör sinyali ile inhibe edildiğinden ve RAG geni mRNA düzeyi ve çift iplikli DNA kırıkları periferdeki B lenfosit alt gruplarında kemik iliğine göre daha az olduğundan, KREC kullanarak proliferasyon ölçümünde reseptör revizyon etkisi sınırlı olacaktır (29).

Gelişimi kemik iliğinde başlayan B lenfositlerin sadece %10'u olgunlaşma potansiyeli göstererek kemik iliğinden ayrılır. Perifere çıkan hücreler antijenle karşılarak veya T lenfosit aracılığı ile aktive olmazlarsa bir süre sonra ölürlür. Ancak bir kez aktifleşen B lenfositler proliferasyon göstererek, plazma hücrelerine kadar farklılaşırlar (32). B lenfositlerin gelişim evrelerinin ve KREC meydana gelmesinin şematize edilmiş hali Şekil 2.20'de yer almaktadır.



Şekil 2.20. B hücre farklılaşma basamaklarında KREC oluşumunun şematik gösterimi (32)

2.5.2. KREC Düzeyinin Belirlenmesinin Önemi

B lenfositlerin çok farklı çeşitlilikteki antijenlere karşı immün sistemi korumada göstermiş oldukları özgül yanıt sonucunda meydana gelen KREC düzeyi, özellikle immün yetmezliği olan hastalarda erken immün cevap göstergesi olarak değerlendirilmektedir (33). Tedavi için başvuru kemik iliği kök hücre transplantasyonu sonrasında, uzunca bir süre immün sistemin etkinliği görülmemekte, humoral immünitinin etkinliği B lenfositlerin gelişimi ile takip edilmektedir (33). Nakledilen dokunun yeni konağa uyumunu sağlayacak

uygulamalara başvulması otolog (nakil yapılan hastanın kendi hücreleri) B lenfositlerin uzun süre baskılanmasına neden olmakta ve bu durum uzun süreli Ig replasman tedavisini gerekli kılmaktadır. Kök hücre transplantasyonundan sonra nakledilen dokunun olgun B hücreleri, artık alıcının olgun B hücrelerinden köken olarak devam etmektedir. Nitekim transplant hastalarında farklı B lenfosit kaynağı bulunması, hümorale immünitenin takibini zorlaştırmaktadır. B lenfositlerin yeniden üretilmesinin izlenebilirliği ve yeni üretilen B lenfositlerin mevcut B lenfositlerden ayırt edilebilmesi, kök hücre transplantı yapılmış hastalarda gerekmektedir (34). KREC'ler farklılaşmış B hücre atalarının Ig hafif zincir rekombinasyonlarının %50'sini oluşturmakta ve sonraki B hücre proliferasyonunda kendilerini eşlememektedirler (33,34). Kemik iliğinden B hücre çıkışını göstermede KREC ölçümü moleküler analizlerle yapılabilmektedir. KREC'ler periferdeki olgun ve prolifer olmuş B hürelere seri dilüsyon ile geçerler. B hücre yenilenmesi ile KREC seviyesindeki artış arasında orantı vardır (34). Oldukça kararlı bir yapı gösteren KREC'ler periferde tesbit edilebilir bir sürede kalır ve bu kararlılığını korumaya devam ederler. Genomik kodlama parçası ile sinyal parçası arasındaki oran B lenfosit alt tiplerinin replikasyon durumunu ve B hücre neogenezini yansıtır. (35).

Bazı Avrupa ülkelerinde yenidoğan tarama testleri arasında yer alması için yapılan pilot çalışmalarda KREC sayısının belirlenmesi (36,37), immün yetmezliği bulunan yeni doğanlarda lenfopeniyi belirleyerek hastalıkların karakterize edilmesinde kullanılmaktadır (37). Immün yetmezliğin bir tipi olan adenosine deaminase eksikliği olan çocuk hastalarda (38) ve HIV pozitif olup anti retroviral tedavi gören yetişkenlerde, immün sistemin gelişiminde KREC düzeyi belirleyici olmaktadır. Tedavi öncesi ve sonrasında tespit edilen KREC miktarı immün sistemin yerleşmesinde göstergedir (39).

2.5.3. T Cell Receptor Alpha Constant (TCRAC)

KREC düzeyinin ölçüldüğü çalışmaların hemen hepsinde kantitatif PZR metodunda kontrol gen olarak T Cell Receptor Alpha Constant (TCRAC) kullanılmaktadır (33, 34, 35, 36, 39). T hücre reseptörleri (TCR), Ig sentezinde ve B hücre aracılığıyla MHC bağımlı antijen tanınmasında oldukça önemlidirler. T hücre reseptörlerinin büyük bir kısmı alfa (α) ve beta (β) dimerlerinden oluşurken bir kısım T hücreleri gama (γ) ve delta (δ) zinciri içermektedir (40). T hücre reseptör γ zinciri

α gen lokusunda yer almaktadır. Her TCR gen lokusu V ve J gen segmenti içermektedir. Ayrıca Ig gen lokusunda olduğu gibi β ve δ bölgelerinde D segmenti bulunur. TCR'in α ve γ zincirindeki V domaini, V ve J eksonları ile kodlanırken, β ve δ proteinlerindeki V domaini, V, D ve J gen segmentleri aracılığı ile kodlanırlar. T hücrenin reseptör oluşumu da Ig genlerindeki V(D)J gen yeniden düzenlenmesindeki gibi meydana gelmektedir (1). T reseptör α lokusunun gen yeniden düzenlenmesinden önce δ lokusu DNA rekombinasyonu ile çıkartılır. Bu rekombinasyonlar arasında yer alan ve T hücrelerin %70'inde gerçekleşen δ Rec- ψ Ja rekombinasyonu, kodlama ve sinyal parçalarının oluşmasına yol açar. T hücre bölünmesinde sinyal parçasını taşıyan gen segmenti (TREC) kendini eşlemezken, kodlama parçası kendini eşleyerek yeni oluşan hücrelere aktarılır (26). T hücrelerde gerçekleşen gen yeniden düzenlenme mekanizması Ig oluşumu ile benzerlik göstermektedir. TCRAC her hücrede iki kopyası bulunduğundan yapılan moleküler çalışmalarda elde edilen kantitatif sonuçlar ikiye bölünerek değerlendirilmektedir (33, 34, 25, 38).

2.6. Akciğer Transplantasyonu

İlk kez 1963 yılında Amerika'da gerçekleştirilen akciğer transplantasyonu (41) yarım yüzyıla yaklaşan bir süredir uygulanmaktadır. Transplantasyon, fonksiyonunu yerine getirecek şekilde organ nakletmek anlamında olup, akciğer transplantasyonu dünya çapında 32 binden fazla yapılmış gerçekleştirilmiş ve akciğer hastalıklarının tedavisi için standart bir yöntem olmaya başlamıştır (42). Uluslararası kalp ve akciğer transplantasyon derneği (ISHLT) verilerine göre, yılda yaklaşık 3700 akciğer transplantı gerçekleştirilmektedir (43). Akciğer transplantasyonu, kronik akciğer hastalığı olan ve akciğer hastalığının en son aşamasına gelmiş kişiler için dikkate alınması gereken bir uygulamadır. ISHLT tarafından yayımlanmış rehberlerde, akciğer nakli olmak için değerlendirilmeye alınacak hasta kriterleri ve nakil listesine girmesi gereken hastalara ait özellikler belirtilmektedir (44).

Solid organ transplantasyonunun yıllar önce yapılmaya başlandığı ülkemizde akciğer transplantasyonu daha geç uygulanmaya başlanmıştır. Yasal düzenlemeler ve verici sıkıntısı bu gecikmeye neden olan etkenler arasındadır. İlk pediatrik kalp ve akciğer nakli 1998 yılında İzmir'de, yetişkinde iki taraflı akciğer nakli girişimi ise 2004 yılında yapılmıştır. Ancak ilk başarılı akciğer nakli 2009 yılında İstanbul'da gerçekleştirilmiştir (45,46). 2009 ile 2014 yılları arasında, 4'ü İstanbul, 2'si

Ankara’da bulunan transplant merkezlerinde toplam 105 akciğer transplantı gerçekleştirildiği bildirilmektedir (47).

2.6.1. Akciğer Transplantasyonu Endikasyonları

2.6.1.1. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ)

Akciğer hastalıkları arasında en fazla görülen, maksimum medikal ve cerrahi müdahalelere rağmen ilerleyici özellik gösteren KOAH hastalarında akciğer transplantasyonu gerekli olmaktadır. Hastaların nakil olmalarına karar verilirken, rehberlerde yer aldığı gibi; Body-mass index, airflow Obstruction, Dyspnea, Exercise (BODE-kütle vücut indeksi, hava yolu tıkanma derecesi, solunum güçlüğü, egzersiz kapasitesi) skor sistemi göz önünde bulundurulur (48). α 1-antitripsin eksikliği olan ve olmayan KOAH hastaları dünya çapında akciğer transplantı olanların %40’ını oluşturmaktadır. Klinik seyri genellikle çok uzun olan KOAH’ın ilerlemiş evresinde olanlarında bile, transplant sonrası kısa ve orta vadede sağkalım durumu diğer hastalık tiplerine göre daha iyi sonuç vermektedir. KOAH hastalarının en önemli özelliği yaşam kalitesinde önemli bir azalma görülmesidir. Hastaların 1 yıl içerisinde 3 veya daha fazla alevlenme dönemi geçirmeleri bu hastalarda sağ kalım durumunu etkilemektedir. KOAH ve hiperkapnik solunum yetmezliği olan hastalar, hastane ölümlerinin %10’dan fazlasına sahiptir (44). KOAH hastalarının akciğer transplantasyon listesine dahil olma kriterleri rehberlerde belirtildiği gibi Tablo 2.1’de gösterilmektedir.

Tablo 2.1 KOAH hastalarının transplant listesine alınmaları için gerekli kriterler (42)

Kronik obstrüktif akciğer hastalığında; BODE indeksi 7-10 arasında olmak veya aşağıdakilerden birini gösteriyor olmak
-Akut hiperkapni nedeni ile hastaneye yatış öyküsü olanlar (P_{CO_2} 50 mmHg’yi aşanlar)
-Oksijen terapisine rağmen pulmoner hipertansiyonu veya körpulmonarı veya her ikisi birden olanlar
- * $FEV_1 < \%20$ ve ** $D_{LCO} < \%20$ veya amfizem dağılımı homojen olanlar
<small>*FEV_1= Zorlu ekspirasyonun birinci saniyesinde atılan volum</small>
<small>**D_{LCO}= Karbonmonoksit difüzyon kapasitesi</small>

2.6.1.2. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (IPF)

Akciğer transplantasyonu olan hastalarda sık görülen bir başka akciğer hastalığı da idiyopatik pulmoner fibrozisdir (42). Genellikle orta yaş ve üstü yetişkinlerde görülür. Patogenezinde akciğer alveol epitel hasarına karşı cevapta, fibroproliferatif tamirin düzensizliği yer almaktadır. Fibrotik mimari yapının bozulmasında miyofibroblast ve fibrosis progenitör hücreleri dahil akciğerdeki hücreler sorumludur. Hastalığın mekanizmasında hücrelerin patolojik proliferasyonu yanında sitokin, kemokin, fibrojenik faktörler, koagülasyon faktörler gibi geniş kapsamlı mediatörler de bulunmaktadır. IPF hastaların pek çoğunda genellikle kötüleşen nefes darlığı ve kuru öksürük bulunur. Bazı hastalarda anormal radyolojik bulgular veya solunum fonksiyon bozuklukları görülebilir. IPF hastalarında akciğer transplantasyonu ile 5 yıllık sağ kalım ilişkisi %40-%50 oranındadır. Nakil bekleyen diğer tip akciğer hastalığı olanlar ile karşılaştırıldığında IPF'li hastalarda ölüm oranı daha fazladır (49). Tablo 2.2' de IPF hastalarının transplant listesine alınması için gerekli klinik kriterler rehberlerde belirtildiği şekli ile yer almaktadır.

Tablo 2.2. IPF hastalarının transplant listesine alınmaları için gerekli kriterler (42)

İdiyopatik pulmoner fibrozis hastalarında interstisyel pnömoniye ait histolojik ve radyolojik bulgulara sahip olmak ve aşağıdakilerden birini göstermek
- $DL_{CO} < \%39$
-FCV' de 6 aylık takip boyunca %10 veya daha fazla eksilme
-6 dakika yürüme testinde oksijen saturasyonunda %88'in altında azalma
-Yüksek çözünürlü BT'de bal peteği görünümü (fibrozis skoru >2)
<i>FCV= Zorlu vital kapasite</i>

2.6.1.3. Kistik Fibrozis (KF)

Kistik fibrozis, akciğer fonksiyon kaybı ile karakterize edilen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (50). Bu akciğer hastalığında kronik enfeksiyon ve inflamasyon etkindir. Kistik fibrozisli hastaların solunum yollarında biriken hücre popülasyonunda, nötrofil hücreleri geniş yer tutmaktadır (51). Zorlu soluk verme volum (Forced Expiratory Volume, FEV1) değerinin kriter olduğu kistik fibrozis

hastalarında, bu değerin yüzdesindeki düşüş büyük ölçüde kronik bakteriyel enfeksiyonlar ve inflamatuvar arasındaki etkileşim nedeniyle immün cevabın uyarılmasını göstermektedir. Pek çok bakteri türü, kistik fibrozisli akciğeri etkilemektedir. Bu bakteriler arasında özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, Methicilin'e duyarlı *Staphylococcus aureus*-MSSA ve *Burkholderia* önemli kabul edilmiştir (50). Bu hastaların akciğer nakli olmaları için gerekli kriterler Tablo 2.3'de belirtilmektedir.

Tablo 2.3.Kistik fibrozisli hastaların nakil olma kriterleri (42)

<ul style="list-style-type: none">- FEV1 < %30 olması veya FEV1 > %30 olanların akciğer fonksiyonlarında hızlıca düşüş- Oksijen ihtiyacı artışı- Hiperkapni (kanda karbondioksit artışı)- Pulmoner hipertansiyon

2.6.1.4. Silikozis

Silikozis hastalığı akciğer hastalıkları arasında daha çok iş yeri hastalığı olarak görülen, silika partiküllerinin solunum yolu ile akciğerlere gitmesi sonucu meydana gelen bir hastalıktır. Granülom oluşumu ile kalıcı bir inflamasyon, akciğer fonksiyon kaybına ve dokunun yeniden düzenlenmesine yol açmaktadır. Tüberküloz, KOAH, romatoid artrit, silikozla ilişkili sık görülen komplikasyonlardır. Ayrıca uzun dönem silikaya maruz kalmak akciğer kanserine de neden olmaktadır. Çalışma alanlarında silika tozu solunmasını önlemek için geçmiş yıllarda pek çok çalışmalar yapılmasına rağmen, silikozis dünya çapında gelişmekte olan ülkelerde yüksek prevalansı ile halen halk sağlığı sorunu olarak devam etmektedir (52).

Silikozis patogenezi, silika partiküllerinin akciğer havayollarında mukosilyer savunmayı geçmeleri ve distal bölümlere ulaşmaları başlatmaktadır. İnsan için patojenik partiküller 10µm altında olup, bunlarda bronşlara ve alveollere ulaşmak için gerekli aerodinamik bulunmaktadır. Silikozis fagositik bir döngü ile yönetilmekte ve silika partiküllerin salınması ise epitel hasara, akciğer yeniden düzenlenmesi ve gaz değiş-dokuş alanında azalmaya yol açmaktadır. Silika tarafından indüklenmiş akciğer hasarı beş temel mekanizma ile meydana

gelmektedir. Bunlar direkt sitotoksite, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması, sitokin ve kemokinlerin üretimi, fibrozis ve hücrelerin apoptoz ile ölümüdür (52).

2.6.1.5. Bronşiektazi

Bronşiektazi, bronşların pek çok nedene bağlı olarak, geri dönüşümsüz genişlemesi sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Alt solunum yolu enfeksiyonları, kistik fibrozis, sağ orta lob sendromu, immün yetmezlik, silyer disgenezi sendromu, romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalığı gibi hastalıklar bronşiektaziye yol açmaktadır (53). Bronşiektazi genellikle balgamlı öksürüğe neden olur ve bu semptomlar balgamda potansiyel patojenik organizmaların kültüre edildiği pulmoner alevlenme atağı ile noktalanmaktadır. Prognozu tam olarak tanımlanmamış olan bronşiektazi, solunum tıbbında en çok ihmal edilen hastalık olarak belirtilmiştir (54). Bronşiektazide cerrahi işlem uygulanmasındaki amacın tümör veya vücuda yabancı cisimlerin, fazla hasar görmüş segmentlerin veya lobların çıkarılması gibi durumlar olduğu belirtilmiştir (53). Akciğerde bronşiektazinin dağılımı etyopatogenezine göre değişmektedir. Alerjik bronkopulmoner asperjillozis hastalığında klasik olarak santral bronşiektazi görülürken, diffüz bronşiektazilerde genellikle alt loblar tutulur. Bu durum enfekte sekresyonların yer çekimine bağlı olarak alt loblarda birikmesi ile açıklanmış, sağ orta lob bronşun uzun ve dar olması nedeniyle lenf nodunu büyüten tüberküloz gibi durumlarda lümenin kolayca tıkanacağı belirtilmiştir (55).

2.6.2. Transplant İmmünolojisi ve Solid Organ Transplantasyonu

Teknik anlamda transplantasyon, bir bireyden graft olarak adlandırılan hücre, doku veya organların alınarak genellikle bir bireye nakledilmesidir (1). Ayrıca transplantasyon, böbrek, karaciğer, kalp, akciğer hastalıklarının son aşamasında uygulanan bir tedavidir. Tıbbi bakımdaki ilerlemeler ve immün baskılayıcı ilaçlardaki gelişmeler sayesinde akut redde bağlı ölüm riskinde azalma sağlanmaktadır. Ancak uzun dönem sağ kalımda gerekli stratejilerin geliştirilmesi, transplant hasarına neden olan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını gerektirir. Pratik açıdan bakıldığında ise hasta sonuçlarının iyileştirilmesi, yeni risk değerlendirme ve tedavi stratejilerindeki değişiklikleri yönlendirmek için transplant immunolojisinin anlaşılması önemlidir (56).

Transplantasyon başarısında en önemli engel, nakil yapılmış organın alıcı tarafından reddidir. Bu problem ilk kez deri nakli yapılan bir hastada

değerlendirilmiş ve transplantasyondan sonraki 1-2 haftalık süreçte hastaya nakledilen deride nekroz gelişmiş ve nakil başarısız olmuştur. Transplant kliniğinde immünolojik red en önemli sorunlardan biridir. Lenfosit aktivasyon mekanizması ile ilgili çalışmalar için allojenik moleküllere karşı gelişen immün cevap, yararlı bir model oluşturmaktadır. Immünolojik ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılan immün baskılayıcı ilaçların organ reddi tedavisinde de uygulanması test edilmekte ve etkin sonuçlar alınmaktadır. Bahsedilen bu sebepler transplant immünolojisinin önemini arttırmaktadır (1).

Solid organ transplantasyonu vücut açısından travmatik bir olaydır. Organın cerrahi olarak çıkarılması ve kan damarlarının tahrip olması doğal immün cevabı başlatır. Graft içinde hasar gören endotelyum adezyon molekülleri upregule olarak, aktive olmuş alıcı makrofaj hücrelerin geçişini arttırmaları. Ayrıca sitokin üreten hücrelerde de aktivasyon olmaktadır. Bu durumlar spesifik olmadığı ve genellikle doku kaybına neden olmadığı için doku reddi nedeni olarak kabul edilmezler ancak yine de graft reddi aşamasında muhtemelen önemli rol oynamaktadırlar (57).

2.6.2.1. Akciğer Transplantında Doğal ve Hümorale Immünite

Transplant yapılan akciğer, solunum yolu ile çevresel antijenlere maruz kalarak doğal immüniteyi muhtemelen aktifleştirmektedir. Akciğer nakli sonrası olumsuz sonuçların etkisi ve alloimmün cevabın düzenlenmesi doğal immün cevabın olduğunu göstermektedir. Şiddetli iskemi ve reperfüzyon hasarı kendini hipoksemi ve radyografik akciğer infiltrate gelişme şeklinde göstermektedir. Akciğer transplantasyonu sonrası kısa ve uzun süreli hayatta kalımda iskemi ve reperfüzyon etkisi bulunmaktadır. Doğal ve edinsel immünitede yer alan hücrelerden ekspres edilen reseptörlerden biri olan Toll benzeri reseptörler (TLR), özellikle akciğer transplantasyonunda akciğer endotelyal hücrelerinde, hücre iskeleti yeniden düzenlenmesi ve ödemde rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar TLR ligand seviyelerinin insan akciğerinde reperfüzyonda arttığını doğrulamaktadır. TLR ligand seviyesi nakil olmuş hastalarda doku reddinde önemli olan bronşiolitis obliteran ile korelasyon göstermektedir (58). Doğal immünitede rol oynayan makrofaj hücreleri de akciğer alveolar makrofajlar olarak transplanttaki immün cevabın şekillenmesinde rol oynamaktadır. Akciğer, dış ortama maruz kalan bir organ olduğundan, graft parankim doku, immün ve stromal hücreler bakteri ve virüs gibi solunum yolu patojenleri tarafından etkilenebilir. Solunum yolları enfeksiyonları

kronik doku reddine yol açarak doğal ve edinsel immünite arasındaki yakın bağlantının önemini işaret etmektedir (58,59).

Edinsel immün cevabın bir tipi olan hümorale immün cevabın solid organ transplantasyonunda rolü önemlidir. Hümorale immünitede üretilen antikorlar grafitin reddine neden olmaktadır (58). Akciğer transplantında vericinin önemli miktarda lökosit hücresi grafit ile beraber alıcıya transfer olmaktadır. Bronkoalveolar bölgede oldukça fazla sayıda bulunan lökositlerin nakil öncesi ekstrakorporeal perfüzyon yapılmasına rağmen, akciğer dokusundan uzaklaştırmak mümkün değildir. Transplant sonrası erken dönemlerde verici kaynaklı T ve B lenfosit hücreler dolaşımında bulunmaktadır (60). Hümorale otoimmünite, transplant sonrası doku reddinde görülen bronşiolitis obliteran sendromdaki (BOS) artış ve sağ kalım süresindeki azalma sonucunda MHC antikorların da gösterilmesiyle klinik bulguları desteklenmektedir. Allojenik antikor hedefleri, MHC ve minor doku uyum molekülleridir. Transplantasyonu takiben, T lenfosit bağımlı, vericiye özgü B lenfositlerden plazma hücrelerine dönüşen hücreler tarafından anti-verici antikorların üretilmesiyle gelişirler. Bu antikorlar verici antijenik hedeflerine bağlanarak kompleman sistemini aktiveleştirirler. Antikorların doku reddine katılmaları, vericiye özgü antikorların BOS öncülleri olduğunu gösteren bulgularla ileri sürülmektedir. Ayrıca solunum yolu epitel hücrelerinde fibrojenik büyüme faktörlerin üretimine, proliferatif değişikliklere ve apoptotik hücre ölümüne neden olan anti-human lenfosit antikorlar (HLA) olarak da bilinen MHC moleküllerinin gösterildiği çalışmalar, antikorların doku reddine katıldığını göstermektedir (59).

HLA antikorları akut redde neden olurlar ki, bu hiperakut reddin farklı olarak doğrudan grafit damarlarına karşı sitotoksik bir reaksiyondur. Antikor seviyesi koagülatiyi başlatacak kadar yüksek olmadığında, antikorlar damar endotelyum üzerinde doğrudan etki ederler. Hastalar transplant öncesi ve sonrasında HLA antikorları olup olmasına göre ayrılırlar. Antikorlar, intimal hiperplazi ve nihai damar daralmasına giden kademeli mekanizmayı tetikler. Buna cevap olarak da yaralanmanın kronik yavaş süreci ve düz kas hücreleri tarafından tamir söz konusudur ve endotelyum konakçı hücreler tarafından kaplanmış hale geldiğinde bir reaksiyon oluşmaktadır. Endotelyal hücreler in vitro koşullarda antikorun optimal konsantrasyonu ile muamele edildiğinde antikora ve allografta karşı dirençli hale gelirler. Bununla birlikte grafit antijenlerinin, onlara karşı oluşan antikorların

varlığında endotelyumdan yeniden eksprese edilmesi yeni bir hasar döngüsüne neden olmaktadır (61).

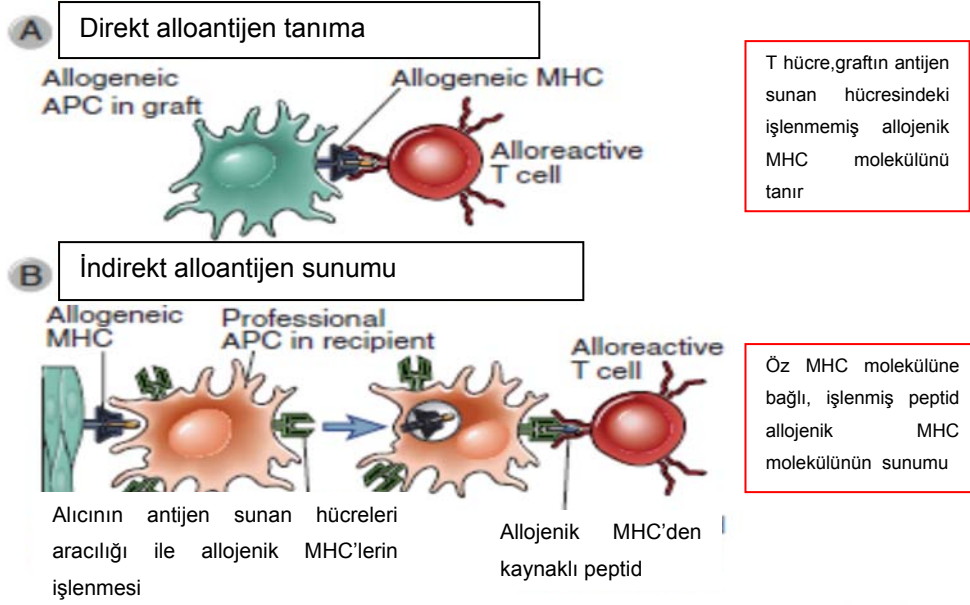
Akciğer transplantasyonunda öz antijene hüморal cevabın oluşması da söz konusudur. Bronşiolitis obliteran sendromun gelişmesinde kollejen ve tubiline karşı oluşan otoantikörlerin yer aldığı klinik öncesi modeller gösterilmiştir. Normal hücre fonksiyonunda rol alan ve hücre iskelet yapısını sağlayan kollajen tipi K- α 1 tubilin, kronik solunum yolu epitelini yaralanması veya belirli koşullarda hücre yüzeyi ekspresyonu sonucunda açığa çıkabilir. Bu proteine karşı oluşan antikör anti-K- α 1T ise havayolu epitel hücrelerine bağlanarak bazı transkripsiyon faktörlerin ekspresyonuna neden olur. Klinikte bu otoantikörlerin transplantasyonu takiben oluşması sağ kalımı etkileyen BOS'un gelişimi ile korelasyon göstermektedir (59).

2.6.2.2. Alloantijenlerin Tanınması

Transplant immünolojisinde aynı türe mensup genetiği farklı iki birey arasında nakli yapılan organa allojenik graft (allograft), bu graftın yabancı olarak tanınmasına neden olan moleküllere de alloantijen denilmektedir. Alloantijenlere karşı tepki veren lenfosit ve antikörler ise alloreaktif olarak tanımlanmaktadır (1).

Transplant yapılmış bir hücrenin öz veya yabancı olarak tanınması, bir türün farklı bireyleri arasında farklılık gösteren ve doku uygunluk genleri olarak isimlendirilmiş polimorfik genler aracılığı ile olmaktadır. Büyük doku uygunluk (MHC) molekülleri hemen hemen tüm dokularda ifade edilir ve tek yumurta ikizleri hariç, bireyler arası doku transplantında graft reddinin hedefidir. Transplant yapılan dokunun MHC molekülleri, alıcı bireyin immün sistem hücresi olan T lenfositleri tarafından tanınır. T lenfositler, vericinin antijen sunan hücreleri (APC) tarafından sunulan allojenik MHC molekülüne bağlanarak (direkt tanıma) veya alıcının kendi APC'leri tarafından işlenen allojenik MHC moleküllerini tanır (indirekt tanıma) (1). Şekil 2.19'da direk ve indirekt allojen tanıma şematize edilmiştir.

İndirekt tanımda CD4⁺ T hücreler MHC II grubu alloantijenlere yanıt verirken, CD8⁺ T hücreler MHC I grubu alloantijenlere yanıt vermektedir. Alıcının antijen sunan hücreleri zamanla vericinin organından dışarı çıkarak verici antijen sunan hücrelerin yerine geçerler ve bu sebeple indirekt alloantijen tanıma, transplant yapılmış organ içinde baskın bir efektör yol olabilir (56).



Şekil 2.21. Alloantijenlerin direkt ve indirekt tanınmasının şematik gösterimi (1).
(*Cellular and Molecular Immunology*,7. baskısından alıntılanmıştır)

Organların çoğunda dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler bulunmaktadır. Bu organların allojenik alıcıya nakli, verici MHC molekülünü bulunduran APC'lerin yanı sıra eş uyarınlarını da sağlar. Vericiye ait APC'ler bölgesel lenf nodlarına göç ederek işleme uğramamış MHC moleküllerini, alıcının T hücrelerine sunarlar. Alıcıya ait dendritik hücreler de graft içine göç ederek graft alloantijenlerini algılar ve bunları drene lenf nodlarına geri taşıyabilirler. "Naïve" lenfositler normalde lenf düğümü yolu ile bu alloantijenlerle karşılaşılırsa proliferasyon olarak efektör hücrelere farklılaşırlar. Bu duruma alloantijenlere karşı duyarlaşma denmektedir. Efektör T hücreler graft içine geri döner ve doku reddine aracılık ederler (1).

2.6.3. Transplant ve B Lenfositler

Solunum yolu, antijenlerle hava aracılığı ile ilk temas eden bölgedir. Solunum yolu epitel hücreleri, patojen antijenler ve partikül maddeler de dahil olmak üzere potansiyel zararlı alerjenlere karşı ilk savunma hattını sağlarlar. Bu savunma hattı içerisinde yer alan B lenfositler hava yolunun hem parankim hem de mukozal yüzeyi için immünoglobülin üretirler. Hava yolu B hücreleri, IgA ve IgM polimerik formlarını üretirler. Bu polimerik Ig'ler hava yolu lümeninde salgısal bir bileşen ihtiva ederler. Mukozal bazal yüzeyde veya glandular epitelde IgA ve IgM'nin bağlandığı polimerik Ig reseptörünün aktivasyonu ile bu salgısal bileşen ilave edilmiş

olur ve epitel hücreler arasında Ig taşınır. IgA eksikliği olan kişilerde, solunum yolları bağıışıklığı, IgM üretiminden dolayı nispeten bulunmaktadır. Polimerik Ig reseptör yokluğu bu hastalarda mukozal yüzeylerde antikorların salgılanmasının azlığı ile solunum yolu enfeksiyonlarında çok büyük artışa sebep olur. IgA'nın sağlıklı solunum yollarında en bol bulunan ve akciğer savunmasında en önemli immünoglobülin olduğu düşünülmektedir. Diğer immünoglobülinler de (IgM, IgE, IgG, IgD) akciğer sağlığı ve hastalığına katılırlar. Immünoglobülinlerin üreticileri olan B ve plazma hücreleri edinsel immünitenin önemli bir kısmını oluştururlar. Bu hücrelerin salgıladıkları antikorlar, makrofaj, nötrofil, eozinofil, bazofil ve mast hücrelerinin de dahil olduğu diğer hücre yüzeylerinde bulunan reseptörlere bağlanırlar (62). Akciğer transplantasyonu sonrası ilk yıl içinde enfeksiyon görülen hastalarda periferik “naïve” B hücrelerde artış görülmektedir. Mutlak B hücre alt grup sayılarında bir farklılık bulunmazken, IgD⁺CD38⁺⁺ aktif “naïve” B hücrelerde nakil sonrası ilk ay içinde belirgin bir artış görülürken, bununla beraber düşük seviyede CD27-IgD⁻ (çift negatif) B hücre popülasyonu da görülmektedir (63).

Organ transplantlarında allografta karşı immün cevap hücrel ve humoral olarak ikiye ayrılır. Antikor üretimi ve komplemen aktivasyonu ile karakterize edilen humoral cevapta doku reddi gelişebilir. Tüm solid organ transplantlarında ve hematopoitik kök hücre transplantlarında zayıf hayatta kalım ile transplant öncesi vericiye özgü antikorlar veya de-novo transplant sonrası antikor üretiminin varlığı korelasyon göstermiştir. Transplant yapılan alıcıda HLA antikorlarının varlığı sadece kısa dönemli değil, kronik doku reddinde de etkilidir. Olgun B lenfositlerin sadece antikor salgılayan hücreler olarak değil, önceden somatik hiper mutasyon geçiren ve daha yüksek afinite ile antikor sağlayan, T lenfositler ile etkileşime giren antijen sunan hücreler olarak da rolleri bulunmaktadır. Bu antikorlar direk akut humoral reddi etkinleştirebilir ve alloreaktif T lenfosit aktivasyonunu geliştirerek akut hücrel reddi de uyandırabilir. Ayrıca alloreaktif bellek B hücrelerin ve alloantikorların toleranslarının kırılması anti-CD154 (CD40L) uygulanan modellerde başarılı olmuştur. Bununla birlikte tolerans gösteren modellerde B lenfositlerin zit işlevleri de gösterilmiştir. Alloantijen varlığında vericiye özgü humoral toleransı teşvik etmek için, monoklonal antikor ile B lenfositlerin tüketilmesi önerilmektedir (64).

Transplantasyona cevapta üretilen allospesifik antikorlar B lenfositler tarafından üretilmekte ve bu antikorlar alloimmünite ve doku uygunluğu için de en iyi gösterge olmaktadır. Antikorların transplanttaki etkisi, organı besleyen kan damarların kökenlerine büyük ölçüde bağlıdır. Organ transplantında vericiye ait kan damarları, vericiye özgü antikorlar tarafından direk hedef alınır. Yabancı kan damarlarına antikorların bağlanması hiperakut, akut, antikor aracılı akut ve kronik reddi meydana getirir. Ancak transfer edilen hücre veya dokular, alıcının kan damarları ile beslenir. İnflamasyon olmaksızın, kan damarları vericiye özgü antikorların hedefi olmayıp, antikorların grafta erişimini engeller. Böbrek, kalp gibi büyük organların transplantasyonunda büyük miktarlarda anti-verici antikorlar absorbe edilir ve bu yolla hemen hemen bütün antikorlar perfüzyon süresince temizlenebilir ve graft zarar görmemiş olur. Böylece organ çıkarılmasını veya ciddi graft yaralanmasını takiben antikorların kandaki seviyesi dramatik olarak artar (65). Organ transplantından sonra, en yüksek afiniteye sahip antikorlar daha düşük afinite gösteren antikora göre daha fazla absorbe edilecektir. Ayrıca graftta MHC sınıf I moleküller MHC sınıf II' ye göre daha fazla ifade edilir. Bundan dolayı MHC sınıf I antikorları MHC sınıf II'ye göre daha fazla absorbe edilir (65).

Antikorlar T lenfositlere antijen sunumunu arttırmaları. Antikor bağlanması antijeni konsantre edebilir ve antijen sunum sitelerine direk yönlendirebilir. IgM, antijeni kanda yakalar, dalağa taşır ve marginal bölgelerinde tutar. Marginal bölge B hücre reseptörleri, antijeni yakalar ve lenfoid foliküllerde yerleşik foliküler dendritik hücrelere götürürler. Antijen sunumunun kolaylaştırılması için ayrıca Ig doğrudan hücrel immunitiyi uyarabilir. Vericiye özgü antikor bulunan, transplant yapılmış hastalarda hücrel red, antikor aracılı hümoral redde göre daha fazla görülmektedir (65).

2.7. Akciğer Transplantasyonu ve Sitokinler

2.7.1. Sitokin Nedir?

Sitokinler, immün hücrelerden salgılanan, hücreler arası iletişimde yer alan glikoprotein veya çözülmüş proteinlerdir. İmmün cevabın oluşması sırasında üretilirler ve depolanmazlar. Üretildikleri ve etkiledikleri hücre tipine göre pleotropik (bir sitokin birden fazla etki göstermesi) ya da redundant (birçok sitokin aynı etki göstermesi) karakterde olabilirler. Hücrede pek çok görevi bulunan sitokinlerin en

önemli görevi, konak hücreyi patojenlere karşı savunmak ve inflamasyon cevabını düzenlenmesidir. Sitokinler hücreler arası sinyal iletimi ve etkilerini, hedef hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak gerçekleştirirler (66). Biyolojik etki oluşturabilmek için çok küçük miktarlarda sitokin yeterlidir. Birçok sitokin reseptörünün ekspresyonu özel sinyaller tarafından gerçekleşir. Sitokine verilen hücresel yanıtların çoğu yeni mRNA ve protein sentezini gerektirmektedir (67).

2.7.2. Sitokinlerin İmmün Cevapta Rolü ve Önemi

Sitokinlerin, immün hücrelerin aktivitesi, farklılaşma, çoğalma ve hayatta kalmalarına etkileri bulunmaktadır. Sitokinler ayrıca, immün cevapta rol oynayan inflamasyonu başlatan ve inflamasyonu durdurucu özelliklerdeki sitokinlerin üretimi ve regülasyonunda da etkilidirler (68). Sitokinler, konak sistemin bir savunma mekanizması olan ateş, viral enfeksiyonlara karşı direnç, beyaz kan hücrelerin artışı, akut faz proteinlerin sentezi, inflamasyon hücrelerin göçü ve kanser hücrelerin ölümü gibi pek çok bağışıklık sistem mekanizmalarında etkilidirler. Hastalık sürecinde çözülmüş protein yapısındaki sitokinlerin immün hücrelerden üretimi ve bunların üretilmelerinin hastalık göstergesi olması bir paradigma olarak kabul edilir (69). Salgılanan sitokinler, hedef hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere bağlanır ve daha sonra kendilerine özgü etkilerini gösterirler. Hedef hücrenin sitokine cevabı, protein sentezine kadar devam eden moleküler mekanizmaların meydana gelmesi ve sonuçta immün yanıtın oluşmasına neden olur (70).

Lökositlerden salgılanan ve bu hücrelerin fonksiyonlarında etkili bir sitokin grubu olan interlökinler oldukça önemlidir. Interlökinler (IL) de kendi aralarında numaralandırılarak sınıflandırılmıştır. Sitokinler köken aldıkları hücre ve biyolojik fonksiyonlarına göre genel olarak dört grupta yer almaktadırlar. Viral enfeksiyonlara karşı sentezlenen interferonlar (IFN), Tümör Nekroz Faktör (TNF), lökositlerin göçü ile ilgili olan kemokinler ve büyüme faktörleri bu dört grup içerisinde yer almaktadır (68).

İmmün sistemde pek çok fonksiyona sahip olan sitokinlerden çalışma içinde analiz edilmiş olanlar hakkında kısaca bilgi verecek olursak:

Interlökin 6 (IL-6): IL-6, monosit, makrofaj, eosinofil, hepatosit, glial gibi pek çok hücreden sentez edilen bir sitokindir (68). Ayrıca travma, yanık, doku hasarı, inflamasyona karşı immün cevapta yer alan hücrelerden de salgılanmaktadır. Patojenle ilişkili moleküler paternlerin (PAMPs) makrofajlar yüzeyinde bulunan Toll benzeri reseptörlere (TLR) bağlanması sonucunda da IL-6 salgılanmaktadır. Bu sitokin bazı aktive olmuş T lenfositler aracılığıyla sentezlendiği gibi, akut faz immün cevabın ve ateşin oluşmasında da rolü bulunmaktadır. Ayrıca B hücrelerin farklılaşmasını etkileyerek nötrofillerin hareketine neden olur (70). IL-6, hedef hücreyi membrana bağlı reseptör aracılığı ile stimule eder. Ligandın reseptöre bağlanması sonrasında meydana gelen bir dizi sinyal iletimi, hedef genlerin aktifleşmesine neden olan transkripsiyon faktörlerin harekete geçmesini sağlamaktadır. Immün hücrelerden salgılanan IL-6, hedef hücrede bulunan reseptör proteine bağlanma dışında, reseptör kompleksinin çözünmüş formuna da bağlanır. Sinyal transferi (trans-signaling) olarak isimlendirilen bu süreç IL-6'nın pro-inflamasyon etki göstermesinden sorumludur. Klasik sinyal denilen, ligandın membran reseptörüne bağlanma süreci ise, IL-6'nın anti-inflamasyon etki göstermesiyle ilişkilendirilir. IL-6'nın doğal immüniteden edinsel immüniteye geçiş süresince esas role sahip olduğunu gösteren pek çok gösterge bulunmaktadır. Akut inflamasyonun karakteristik özelliği olan nötrofil hücrelerin inflamasyon bölgesine geçişi, endotelial hücrelerin mikrobik ajanlarla aktif hale gelişi, IL-6 ile diğer kemokin moleküllerin üretimi sonucunda oluşmaktadır (71).

Interlökin 8 (IL-8): IL-8, kemokin olarak gruplandırılmış, lökosit hücrelerin göç etmesi potansiyelindeki düşük moleküler ağırlıktaki sitokindir. IL-8, monosit, lenfosit, granulosit, fibroblast, endotel hücre, bronşial epitel hücre gibi pek çok hücreden salgılanır (66). Proinflamatuvar sitokin grubunda yer alan IL-8, sinyali hücreye iki reseptör üzerinden iletmektedir (CXCR1, CXCR2). Temel biyolojik işlevi nötrofil göçü ve degranulasyonudur. Lökosit göçünde yeri olan bu sitokinin anjiyogenezi stimule ettiği de bilinmektedir (72).

“Monocyte Chemoattractant Protein” 1(MCP-1): MCP-1, monosit, bazofil, T hücreler, olgunlaşmamış dendritik hücreler için aktiveleştirici faktördür. MCP-1 dokuların pek çoğunda ve in vitro ortamlardaki hücrelerden üretilir ve bazı proinflamatuvar moleküller tarafından üretiminin artırıcı etkisi olur (66). Kemokin

grubunda yer alan MCP-1 CCL2 olarak da isimlendirilmektedir. Bu molekül monositlerin kandan dokuya geçişini sağlayarak makrofaja farklılaşmasına neden olmaktadır (70). İnsanda pek çok doku ve organda eksprese edilen MCP-1, akciğerde makrofajların bulunduğu endotel, bronşial epitel ve düz kas hücrelerde de eksprese edilmektedir. Makrofaj infiltrasyonu ile karakterize olan pulmoner fibrozis, sarcoidosis gibi hastalıklarda MCP-1 ekspresyonunda artış olmaktadır (73).

“Tissue Plasminogen Activator” (t-PA): Serin proteinaz ailesinin bir üyesi olan t-PA vasküler endotel hücreler aracılığı ile eksprese olur ve pıhtılaşma mekanizmasında yeri olan, aktif formda olmayan plasminojenin, aktif formdaki plasmine dönüşmesinde fonksiyonu vardır. Bu molekül ayrıca hem fetal hem de yetişkin akciğerinde oldukça yüksek oranda eksprese edilir (74).

“Soluble Cluster of Differentiation 40 Ligand” (sCD40L): Tümör Nekrozis Faktör (TNF) ailesinin bir üyesi olan, glikoprotein yapıdaki CD40L ekspresyonu, T hücre aktivasyonundan sonra indüklenir ve erken T lenfositlerin bir göstergesi olarak yer almaktadır. CD40 ise makrofaj, B hücreler ve dendritik hücrelerden eksprese olur. CD40-CD40L arasındaki etkileşim sağlıklı immün sistemde çok fonksiyonlu bir rol oynamaktadır. Örneğin, endotel hücrelerde aktive olmuş T hücreler aracılığı ile CD40 bağlanması CD40L ekspresyonuna neden olur ki bu da lökosit marjinasyonundaki adesyon moleküllerin ekspresyonunun artışına yol açmaktadır. Antijen sunan hücrelerin CD40-CD40L etkileşimiyle aktive olması, inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve nitrik oksitini üretimini indükler (75).

“Soluble P-selektin” (sP-selektin): Bir adezyon molekülü olan selektin ailesine dahil molekül olup, aktive olmuş trombosit ve endotel hücrelerden eksprese edilmektedir. Bu sitokin vasküler yaralanmada, inflamasyonda, lökosit hücrelerin bu bölgede toplanmasını sağlamaktadır. P-selektin molekülün çözünmüş formu olan sP-selektin hastalıklarda artış göstermekte ve vasküler hastalık riski için potansiyel olarak klinik bir belirteç olarak kullanılmaktadır (76). Trombosit ve endotelial hücrelerin aktivasyonu altında hücre yüzeyinden hızlıca salgılanan P-selektin, lökositlerin endotelyum üzerinde yuvarlanarak birikmesine aracılık eder. P-selektin'i açığa çıkaran dolaşımdaki degranüle olmuş trombositler, çözünmüş plazma proteini olan sP-selektini üretirler. P-selektin molekülünün tromboz oluşumunda önemli rolü

olduğu, anti P-selektin antikorunun tromboz mekanizmasını bozduğunun gösterilmesiyle belirtilmektedir (77).

2.7.3. Akciğer Transplantında Sitokinlerin Önemi

Sitokinler etkilerini hücre yüzeyinde zaten mevcut olan düşük yoğunluktaki reseptörler ile ya da yeni oluşturulan reseptörlerle etkileşime girerek gösterirler. Pulmonar hemostazın korunmasında reseptör ekspresyonunun düzenlenmesi, sitokin üretimi kadar önemlidir. Bu sitokin ağı akciğerin normal fizyolojik aktivitesi ve hastalıklara bağlı tehditleri kontrol etmede bir denge sağlayacak şekilde hareket etmektedir. Akciğer çok çeşitli enfeksiyon ajanlarına ve solunum gazları değişimi boyunca, zehirli gaz ve partüküllere maruz kalmasından dolayı, iyi regule olan ya da sıkı denetlenen immünolojik ve inflamatuvar süreçlere özellikle bağımlıdır. Akciğer bu zararlı ajanlara karşı kendini, sitokin düzenlenmesiyle oluşan konak savunma mekanizması ile korumaktadır. Sitokinler akciğerde bağışıklık ve inflamatuvar yanıtın her ikisinin de başlamasını düzenlenmektedirler (78).

Akciğer transplantı sonrası görülen allograft fonksiyon bozukluğu patogenezinde, reseptör-kemokin rolü bulunmaktadır. Bu patogenezinde en belirleyici olan nakil yapılmış akciğer dokusuna lökositlerin sızmasıdır. Güçlü immün baskılayıcı tedbirlere rağmen, akciğer doku fonksiyon kaybının erken evresinden, en son aşamasına kadarki süreçte, immün cevap oluşmasından akciğer fibroz dokunun bozulmasına doğru geçişte lökositlerin hücum etme yeteneği oldukça önemlidir. Bu mononükleer hücrelerin sürekli olarak ortaya çıkmasında, hücre dışı matriks elemanları ile parankimal hücreler, endotelyum, infiltre olmuş lökositler arasındaki hücreler arası iletişim gerekmede ve bütün bu olaylar da adezyon molekülleri, sitokin ve kemokinlerin üretimi aracılığı ile gerçekleşmektedir. Kemokinler spesifik hücre yüzey reseptör ekspresyonu sayesinde, seçici farklı lökositlerin lokal aktivasyonuna, endotelyum boyunca göç etmesine ve vasküler bölmelerin ötesinde kemotaktik geçişine aracılık edebilmektedir. Allograft infeksiyonları, sitokin-kemokin ekspresyonunun artışıyla, anormal allo-otoimmun cevabı uyarmaktadır ki bu da BOS gelişimine katkı yapmaktadır. Akciğer transplantında, enfeksiyonların etkisi yanında, allograftta alloantijen T hücrelerin ve diğer efektör lökositlerin yönlendirilmesi gibi önemli rol oynayan sitokinler de doku reddine neden olmaktadır (79).

Bütün bu bilgiler ışığında çalışmamız; akciğer transplantı yapılan hastalarda dokunun kabul edilmesi sürecinde rolü olan B lenfositlerin kinetiğinin izlenmesine yardımcı bir yöntemin, standardize edilmesi ve validasyonunu yapmak ve böylece uygulanan tedavi rejimlerinin takibine katkı sağlaması amacı ile gerçekleştirildi.

AMAÇ: KREC ve sitokin ölçümü ile akciğer transplantasyonu sonrası iyileşimin takibi.

HEDEF:

- Güvenilir ve doğru bir şekilde KREC kantifikasyonu için yöntemin validasyonu ve verifikasyonu,
- Tekrarlanabilir hasta sonuçlarının elde edilmesi,
- Ulaşılan sonuçlar ile hastalara ait diğer verilerin karşılaştırılması, istatistiksel analiz,
- Çalışmanın rapor haline getirilmesi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Tüm çalışma örnekleri, Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Cerrahisi Birimi'ne başvuran ve akciğer nakli olmuş bireylerden oluşturulmuştur. Hasta grubumuzda, akciğer transplantasyonu endikasyonlarına sahip, primer akciğer hastalıkları farklı olantoplam 11 kişi yer almaktadır. Transplant sonrası erken immün düzeylerini üç farklı zaman dilimine ait ölçümü yapılmış KREC (Kappa Deleting Recombination Excision Circle) seviyesi ile belirlemek için; bu hastaların transplant öncesinde, nakil sonrası 24. saatte ve transplant sonrası 7. günde 2 adet steril EDTA'lı tüplere alınan toplam 33 tane hasta örneği çalışmaya alınmıştır. Hastalara ait KREC kinetiğinin karşılaştırılması için gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon yönteminde standart kör hazırlamak için 6 ay- 3 yaş arası sağlıklı çocukların rutin laboratuvar tetkikleri için vermiş oldukları (ebeveynlerden rutin test çalışması için onam formları alınmış) ve standart numune saklama süresi (3 gün) dolduktan sonra imhaya ayrılan ve bu süre zarfında +4°C' de bekletilmiş EDTA'lı kan örnekleri çalışmaya alınmıştır.

Ayrıca çalışma grubundaki hastaların, üç farklı zaman dilimine ait kan örneklerinden sitokin çalışması yapılmıştır. Sitokin sonuçlarını karşılaştırmak amaçlı kontrol grubu ise; sağlıklı gönüllü 10 kişiden alınan 2 adet EDTA'lı kan örneklerinden oluşturulmuştur. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubundaki her bireyden, çalışma ile ilgili bilgilendirme yapıldıktan sonra onam formları alınmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz (*Amresco Life Science-N605-500G*), Amonyum asetat (*Merck-1011161000*), Amonyum klorür (*Merck-1011450500*), Betaine PCR solusyon (*Sigma-B0300-1VL*), Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) (*Sigma-WXBB7595V*), Dimetil sülfoksit (DMSO) (*Thermo Scientific-PI85190*), DNA Marker (*Invitrogen-1786311*), DreamTaq PCR Master Mix (*Thermo Scientific-K1071*), Etidium Bromide (*Fisher Scientific-BP1302-10*), Etilendiamintetraasetat (EDTA) (*Sigma-03609*), Etil alkol (%99, *Alkomed*), Fetal Bovine Serum (FBS) (*Gibco-123456*), Ficoll (*Sigma-10771*), Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)

(Sigma- SLBN6919V), İsoopropanol (Sigma Aldrich-24216), Jel Yükleme Tamponu (Blue Juice Buffer) (Invitrogen Life Technologies-1551155), Kloroform (Sigma Aldrich-24216), Penisilin-streptomisin (Capricon Scientific-CP15-1395), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Proteinaz K (Stratagene 300-141), RNA Later (Ambion-Am7021), Roswell Park Memorial Institute medyum (RPMI1640) (Gibco-11-875-119), Sodyum bikarbonat (Sigma-55761), Sodyum klorür (NaCl) (Merck-1064040500), Sodyum dodesil sülfat (Sigma L-5750), Sodyum sitrat (Sigma,6132-04-3), TaqMan polimeraz Master mix (Applied Biosystems-1603257), 5X Tris-Borate-Etilendiamintetraasetat (TBE) Tampon (5 Prime-151027697), TE Tampon (Qiagen), Tris (MERCK-1.08219.0100), Trizol (Ambion-5596-026), Voluven (Fresenius-900c007),

3.3. Kullanılan Gereçler

Air flow laminar kabin (ESCO class II Type A2), akan hücre ölçer (Beckman Coulter-FC 500), Buzdolabı (+4°C)(Arçelik), Derin dondurucu (-80°C) (ESCO, Lexicon), Elektroforez güç kaynağı (BioRAD), Elektroforez sistemi (BioRADPowerPac Basic, BioRad mini sub cell GT), Hassas terazi (Denver Instrument), Isıtıcı manyetik karıştırıcı (IKA RH basic-2), Kuru ısıtıcı (Bioer HB202), Masa üstü santrifüj (Hitachi himac CTGEL), Mikrodalga fırın (Arçelik), Mikrosantrifüj (Spectrafuge Labnet 24D), pHmetre (inolab terminal 740), Pipet takımı (Thermo), PZR cihazı (Applied Biosystems Life Technology, Thermal cycler), Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen life technologies), Gerçek zamanlı PZR cihazı (Applied Biosystems Step One Plus), Soğutucu dolap (-20°C) (Arçelik), Spektrofotometre (Epoc Biotek), Su banyosu (Memmert), UV Görüntüleme cihazı (Benchtop UV Trans illuminator UVP), Vorteks karıştırıcı (IKA MS 3basic)

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8.74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat, 200 µl 0.5 M Etilen diaminetetraasetat (EDTA)'ın tartımı yapılarak erlen içine konuldu. 900 mL distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelerde 120°C'de 15

dakika otoklavlandı ve +4°C’de saklandı. RNA Later ile saklanmış tam kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.2. Lökosit Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer- WBL)

25 mL 4M NaCl ve 50 mL 0.5M Etilendiaminasetat (EDTA) balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı. RNA Later ile saklanmış tam kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl)

233.6 gram NaCl tartıldı ve erlene alındı. Üzerine 800 mL steril distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı ile iyici çözüldürüldü. Balon jojeye aktarılan çözelti 1 litreye tamamlandı. 120 °C’ de 15 dakika otoklav edilerek steril edildi. RNA Later ile saklanmış tam kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.4. 9M Amonyum Asetat (C₂H₇NO₂)

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mL distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve distile su ile 100 mL’ye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edildi ve +4°C’de saklandı. DNA Later ile saklanmış tam kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.5. %10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

10 gram Sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 mL steril distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldürüldü ve pH’sı 7.2’ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edildi ve oda ısısında saklandı. RNA Later ile saklanmış tam kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.6. %8’lik Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) buffer

8 gram Dodecyltrimethylammonium bromide, 100nM Tris için 1.21 gram Tris tartıldı, 1.2 M Sodyum klorür için 7.01gram sodyum klorür tartıldı ve 50mM EDTA için 1.86 gram EDTA tartıldı ve tüm bu kimyasallar bir behere alındı. Üzerine 100 mL steril distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldürüldü. pH 8’e ayarlandı. Oda ısısında saklandı. RNA Later ile saklanmış tam kan örneklerinden

ve lize edilerek dondurulmuş lökosit hücre örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.7. %5'lik Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) buffer

5 gram Hexadecyltrimethylammonium bromide, 7.01 gram sodyum klorür (400mM) tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 100 mL steril distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü. Oda ısısında saklandı. RNA Later ile saklanmış tam kan örneklerinden ve lize edilerek dondurulmuş lökosit hücre örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.8. 0,1M Sodyum sitrat (%10 Etanol içinde)

2.941 gram sodyum sitrat tartıldı. Üzerine 90 mL steril distile su ilave edildi ve 10 mL %100'lük etil alkol ilave edilerek çözündürüldü. Oda ısısında saklandı. Lize edilerek dondurulmuş lökosit hücre örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.9. %75'lik Etanol

37.5 mL etanol üzerine 12.5 mL steril distile su ilave edilerek toplamda 50mL olacak şekilde %75'lik etanol hazırlandı. Ağzı sıkıca kapatılarak oda ısısında saklandı. DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.1.10. 1,2M Sodyum Klorür

7.01 gram NaCl tartıldı ve erlene alındı. Üzerine 100 mL steril distile su konuldu. RNA Later ile saklanmış tam kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

3.4.2. Agaroz Jel Elektrofrezde Kullanılan Çözeltiler

3.4.2.1. %4'lük Agaroz

Çalışmada ilgili genlerin baz çifti (bp) sayılarına göre 10-400bp arasındaki örnekleri ayırt etmek için gerekli olan %4'lük agaroz hazırlanmasına gidildi. Bunun için 2 gram agaroz tartıldı. Üzerine 50 mL 1X TBE buffer ilave edildi. Mikrodalga fırında agaroz çözdürüldü. Jel elektrofrez işleminde kullanıldı.

3.4.2.2. 1X Tris-Borat-Etilendiamintetraasetat (TBE)

5X olarak hazır ticari TBE tampon 5 defa seyreltilmek için mezür içine 10mL alındı ve üzerine 40 mL steril distile su ilave edilerek toplamda 50 mL hacim

olacak şekilde hazırlandı. Oda ısısında saklandı. Jel elektroforez işlemi için agaroz çözüdüürmede kullanıldı.

3.4.3. Örneklerin Dondurularak Saklanması Kullanılan Çözeltiler

3.4.3.1. %10 FBS'li Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) Medyumu

10 mL Fetal Bovine Serum (56°C'lik su banyosunda 60 dakika bekletilerek inaktive edilmiş), 1 mL penisilin-streptomisin behere alındı. Üzerine 89 mL RPMI 1640 ilave edildi. Hazırlanan çözelti 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edildi ve +4°C' de saklandı. Örneklerin dondurulmasında besiyeri amaçlı kullanıldı.

3.4.3.2. Lizat Solüsyonu

4.13 gram Amonyum klorür tartıldı. 0.42 gram Sodyum bikarbonat tartıldı. 0.0185 gram Etilendiamintetraasetat tartıldı. Bu üç kimyasal madde beher içine konuldu. Üzerine 500 mL distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüdüürüldü ve pH'sı 7.2' ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edildi ve her kullanımdan önce pH kontrolü yapılmak kaydı ile +4°C'de saklandı. Örneklerin dondurulması işleminde, eritrosit hücrelerinin uzaklaştırılması için kullanıldı.

3.4.3.3. %10 Voluven ve %5 Dimetil sülfoksit (DMSO)'li RPMI Medyumu

10 mL Voluven, 5 mL DMSO behere alındı. Üzerine 85 mL RPMI 1640 medyum ilave edildi. +4°C' de saklandı. Örneklerin dondurulması işleminde kullanıldı.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Hasta Örneklerinin Saklanması

Hasta grubuna ait yukarıda belirtilen zaman dilimlerinde alınan 2 adet EDTA'lı kan tüplerinden bir tanesi homojenize edildikten sonra 500 µL'lik kriyo tüplerine konuldu. Üzerine 1500 µL RNA Later ilave edilerek pipetaj yapıldı, 1 gece +4°C'de bekletildikten sonra, -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. İkinci kan tüpü 2000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki plazma kısmı kriyo tüplerine konularak -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı. Tüpte kalan hücre kısmı 50cc'lik steril falkonlara alındı ve üzerine 1/20 oranında lizateklendi. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 100g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet kısmı 2 mL tampon sıvısı ile karıştırılarak 300g'de 5

dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre kısmına 3 mL %10 FBS'li RPMI medyum ilave edilerek pipetlendi. Daha sonra üzerine 3 mL %10 Voluven, %5 DMSO'lu RPMI medyumdan ilave edilerek hızlı bir şekilde kriyo tüplere dağıtılarak -80°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.5.2. Dondurulmuş Hücrelerin Çözündürülmesi

Yukarıda belirtildiği şekilde dondurularak saklanmış lize edilen lökosit hücreleri, DNA izolasyon yönteminde kullanılması için, dondurma işleminde kullanılan solusyonlardan uzaklaştırılması işlemine gidildi. Derin dondurucudan çıkarılan örnekleroda ısısında çözündükten sonra, 15 cc'lik steril falkonlara alındı ve üzerine 1:5 oranında olacak şekilde RPMI medyum eklendi. 1000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan pellet, mililitrede 1×10^6 hücre olacak şekilde tampon sıvısı ile resüspanse edildi.

3.5.3. RNA Later ile Saklanmış Tam Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

3.5.3.1. Tuz Çöktürme Yöntemi ile DNA İzolasyonu

500 µL kan ile 1500 µL RNA Later karıştırılarak -80°C'de saklanmış sadece bir hastanın tek zaman dilimine ait kan örneğinin çözündürülmüş bir alikodu ile gerçek zamanlı-PZR'da standart olarak kullanılacak EDTA'lı tüpe alınmış perifer kan örneklerin 2mL'si ayrı ayrı falkon tüplere alındı. Üzerine 1:3 oranında (6mL) eritrosit parçalama solüsyonu eklenip karıştırılarak, +4°C'de hemoliz olması için 15 dakika bekletildi. Süre sonunda örnekler 300g'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellet homojenize edilerek üzerine tekrar ilk kan hacminin 2 katı olacak şekilde (4 mL) eritrosit parçalama solüsyonu eklendi. +4°C' de 15 dakika bekletildikten sonra 300g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süspanse olan pellet üzerine 10 mL lökosit parçalama solüsyonu, 75 µL proteinaz K ve 50 µL %10'luk Sodyum dodesil sülfat eklenerek 56°C'lik su banyosunda bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her 1mL örnek başına 0.37 mL olacak şekilde 9 M'lık amonyum asetat çözeltisi eklendi ve yavaşça karıştırıldı. +4°C'de, 3000g'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası DNA içeren üst faz steril bir falkona alındı. Üzerine iki katı hacminde %99'luk etanol eklendi. İplikçik görünümünü alan DNA pipet yardımı ile steril ependorf içine alındı. Üzerine 500µL %70'lik etanol eklenerek karıştırıldı ve 20.000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alkol dikkatlice dökülerek ortamdan tamamen alkolün uzaklaşması için 56°C' de ependorf

tüplerin kapakları açık şekilde 25 dakika bekletildi. Daha sonra elde edilen DNA örneklerin üzerlerine, düzey ve miktar tayini için 100 µL TE tamponu (ticari) eklendi.

3.5.3.2 Ticari Kitler ile DNA İzolasyonu

RNA Later ile dondurularak saklanmış kan örneklerinden uygun kalitede DNA izolasyonu Qiagen QIAamp DNA mini kit ticari kiti ile yapıldı. Çözündürülmüş hasta kan örneklerinden kit prosedürüne uygun bir şekilde DNA izolasyonu yapıldı. Bunun için 200 µL kan örneğinden yaklaşık 6 µg DNA eldesi beklenecek izolasyongerçekleştirildi. Bu marka kit ile elde edilen ancak uygun düzey ve miktarda DNA belirlenemeyen hasta örnekleri farklı markalarda (GeneAll Exgene Blood SV Blood DNA izolasyon kiti, 5 Prime ArchivePure DNA Blood) ticari kitler ile test prosedürlerine uygun şekilde izolasyon yapıldı. RNA Later ile dondurulmuş tam kan örnekleri ile yapılan DNA izolasyonunda en uygun düzey ve miktarda DNA eldesi ticari kitler ile yapılan çalışmalarda elde edildi (Tablo 3.1).

3.5.3.3. DTAB-CTAB Buffer ile DNA İzolasyonu

Çalışmada, RNA Later ile dondurularak saklanmış kan örnekleri ve lize edilerek ayrılarak saklanmış lökosit hücre örneklerinden uygun saflık düzeyi ve miktarda DNA belirlenemeyenler, DTAB-CTAB solüsyonları kullanılarak yeniden izolasyon işlemi yapıldı. Bu yöntemde kullanılan DTAB-CTAB solüsyonları yukarıda tanımlandığı şekilde hazırlandı.

Bu yöntem için gerekli olan 300 µL kan örneği üzerine 400 µL DTAB solüsyonu eklendi ve 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüpe 500 µL kloroform eklenerek tüpün kapağı hemen kapatılarak 5 dakika elde kuvvetlice çalkalandı. 25.000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 100µL CTAB solüsyonu ile 900 µL steril distile su eklenerek hafifçe karıştırıldı ve -20°C'de 10 dakika bekletildi. Daha sonra 15.000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırıldı. Pellet kısmı 200 µL 1.2M sodyum klorür ile resüspanse edildi. Daha sonra 300 µL %100'lük soğuk etanol (-20°C'de muhafaza edilen) eklenerek hafifçe çalkalandı. 10.000g'de 5 dakika santrifüj edildi ve sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Pellet 700 µL %70'lik etanol ile karıştırılarak 15.000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası DNA'dan etanolün uzaklaştırılması için tüpün kapağı açık şekilde 20 dakika

bekletildi. Elde edilen DNA örnekleri üzerine 100 µL TE tampon eklenerek saflık ve miktar tayini yapıldı.

3.5.3.4. Robot ile DNA İzolasyonu

Dondurularak saklanmış kan örneklerinden DNA izolasyonu yukarıda belirtilmiş yöntemlerle başarılı olunmayan örnekler, Zinexts MagPurix cihazında hazır kit (MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Bu işlem için 400 µL kan örneği ile elüsyon tamponundan 150 µL kullanılarak kite özel tüpler içinde cihaza yüklendi. 40 dakikalık cihaz faaliyeti sonucunda 50 µL izole DNA elde edildi.

3.5.4. Tam Kandan Lize Edilerek Ayrıştırılan Dondurulmuş Lökosit Hücrelerinden DNA İzolasyonu

RNA Later solüsyonu ile muamele edilerek saklanmış tam kan örneklerinden yukarıda belirtilen yöntemler denenerek yeterli kalite ve miktarda DNA elde edilmeyen hastalar için tam kan örneği dışında lize edilerek dondurulmuş lökosit hücrelerinden DNA izolasyonu yapıldı.

3.5.4.1. DTAB-CTAB Buffer ile DNA İzolasyonu

Hastalara ait %10 volüven ve %5 DMSO'lu RPMI 1460 içerisinde dondurularak saklanmış lize edilmiş lökosit hücre örnekleri yukarıda belirtilen yöntemlere göre çözündürüldü. Çözünmüş örneklerden DNA izolasyonu DTAB-CTAB solüsyonları ile yukarıda belirtilen metod basamakları takip edilerek yapıldı.

3.5.4.2. Trizol ile DNA İzolasyonu

%10 volüven ve %5 DMSO'lu RPMI 1460 içerisinde dondurularak saklanmış lize edilmiş hücreler, yukarıda belirtildiği çözündürme prosedürüne göre çözündürülerek DNA izolasyonu yapıldı.

Hücrelerin üzerine 1 mL Trizol eklenerek oda ısısında ve karanlıkta 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüplere 200 µL kloroform eklenerek 15 saniye vorteks ile karıştırıldı. Oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 24.000g'de 15 dakika soğuk odada (+4°C) santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte üstte yer alan ve RNA içeren faz uzaklaştırıldı. Daha sonra örnek üzerine 300 µL %100 etanol pipetlendi ve çok düşük devirde vortekslendi, oda ısısında 3 dakika bekletildi. Daha sonra 24.000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası

ortamdaki etanol uzaklaştırıldı ve pellet kısım 1 mL 0.1M sodyum sitrat ile süspansedildi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyon süresince tüpler periyodik zamanlarda (3 dakika ara ile) düşük devirde vortekslendi. Inkübasyon sonrasında 24.000g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz uzaklaştırılarak 1 mL 0.1M sodyum sitrat ile örnek ikinci defa süspansedildi ve bir önceki adımda belirtilen işlemlerden geçirildi. İkinci santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılarak örnek üzerine 1 mL %75'lik etanol ilave edildi. Oda ısısında 15 dakika periyodik olarak vortekslenmek suretiyle inkübe edildi. Daha sonra 24.000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ortamdaki etanolün uçurulması için örnekler kapağı açık bir şekilde 20 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra 100 µL steril distile su ilave edilerek izole edilen DNA'ların düzey ve miktar tayini yapıldı. Dondurulmuş lökosit hücre örneklerinden en uygun kalitede DNA, Trizol yöntemi ile elde edildi (Tablo3.1).

Tablo 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan örnek türleri ve uygulanan metodlar

Uygulanan yöntemler	Örnek türleri	
	RNA Later ile muamele edilmiş ve dondurulmuş tam kan	Lize edilmiş ve dondurulmuş lökosit hücresi
Tuz çöktürme yöntemi ile DNA izolasyonu (manuel)	√	–
DTAB-CTAB ile DNA izolasyonu (manuel)	√	√
Ticari kitler ile DNA izolasyonu (manuel)	√	–
Trizol ile DNA izolasyonu (manuel)	–	√
Robot ile DNA izolasyonu (yarı otomatik)	√	–

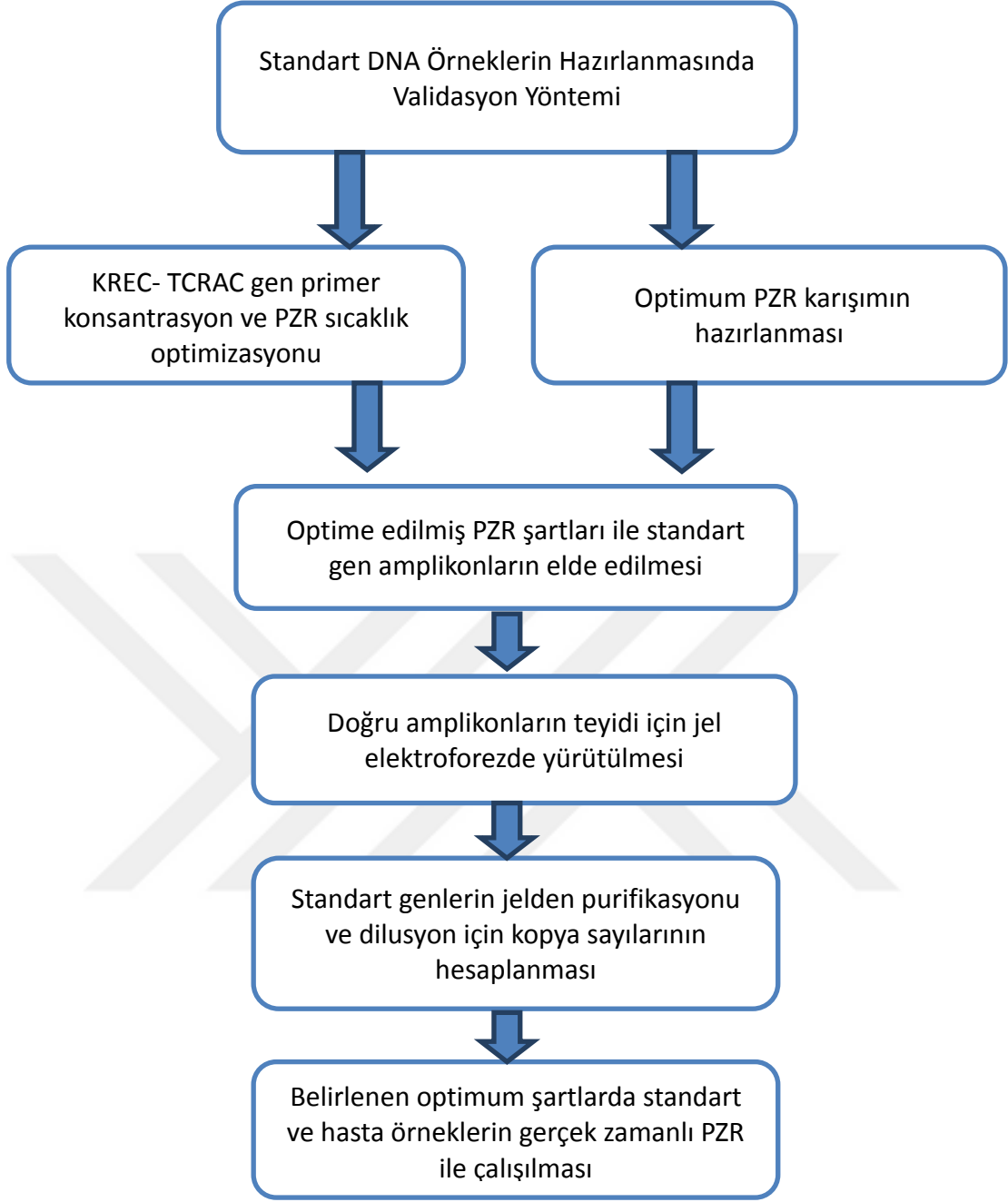
(√) yöntem uygulandı (–) yöntem uygulanmadı

3.5.5. Elde Edilen DNA'nın Düzey ve Kalitesinin Tayini

Farklı yöntemler ile elde edilen hasta DNA örneklerinin düzey ve kalitesinin tayini için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik yoğunluk (OD) ölçümleri yapıldı. Örnekler hangi sulandırma tamponu ile hazırlandı ise spektrofotometrede kör olarak aynı tampon kullanıldı. DNA örneklerinin saflığı Epoc BioTek spektrofotometrede ölçüldü. D_{260}/OD_{280} oranı cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmış şekilde belirlendi. DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1.8'dir. Çalışmamızda, bu oran 1.7 ile 1.9 aralığında çıkmış olan DNA örnekleri seçilmiştir. Elde edilen DNA'ların ortalama konsantrasyonu 31,9 ng/ μ L olarak bulunmuştur.

3.5.6. Validasyon Yöntemi

Bu çalışmada, doğrudan DNA kantifikasyonu ile ilgili değişkenliğin ortadan kaldırılması için bir standart eğri oluşturmak ve bilinen bir değer üzerinden bilinmeyen bulmak amacı ile standart DNA hazırlanması gerekti. Çalışmamızda plasmid DNA kullanılmadığından standart kör hazırlamak için 6 ay-3 yaş arası sağlıklı çocukların laboratuvar tetkikleri için vermiş oldukları ve standart numune saklama süresi (3 gün) dolduktan sonra imhaya ayrılan ve bu süre zarfında +4°C' de bekletilmiş EDTA'lı kan örnekleri çalışmaya alınmıştır (rutin test çalışması için ebeveynlerden alınmış onam formları bulunmaktadır). Bu DNA örnekleri QIAamp DNA mini kit ticari kiti ile izole edildi. Gerçek zamanlı PZR aşamasına geçmeden önce hasta örneklerinin kantifikasyonunun değerlendirilmesinde gerekli olan bu standart DNA'ların validasyon planlamasına gidilerek optimum şartlar belirlendi. Bu süreçte izlenen basamaklar Şekil 3.1' de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Validasyon yöntemi iş akış şeması

3.6. KREC Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Yöntemi ile Çoğaltılması

3.6.1. PZR Yöntemi

PZR yöntemi, moleküler biyolojide tek veya çok az sayıdaki DNA'nın belirli bölgelerini binlerce, milyonlarca kopya çoğaltan bilimsel bir tekniktir. Bu yöntemde DNA kaynağı nispeten kalitesiz olsa bile, istenilen belirli bölgeler dakikalar içinde çoğaltılabilir. PZR hızlı, basit ve ucuz olma özellikleri nedeniyle moleküler biyolojide en yaygın kullanılan tekniklerden biri haline gelmiştir. Denatürasyon

(çözülme), annealing (bağlanma) ve extension (uzama) şeklindeki üç temel basamaktan oluşan bu yöntemde öncelikle çift sarmal yapıdaki kaynak DNA'nın açılarak, hedeflenen bölgenin ulaşılır hale gelmesi gerekmektedir. Denatürasyon denilen bu basamakta yüksek ısı (90- 97°C) ile çift sarmal yapı açılmaktadır. Daha sonra sıcaklığın daha düşük (50- 60°C) olduğu annealing basamağında, ortamdaki primerler tek zincirli iplik ile yeniden birleşirler ve sonuçta orjinal DNA kopyalanmaya başlamış olur. Bu aşamada polimeraz enzimi rol almaktadır. Üçüncü aşama olan extension basamağında ise ısıya dayanıklı polimeraz enzimi (Taq polimeraz) ile primerler hedef zincir boyunca uzatılarak, hedef materyal iki katına çıkarılmış olur. Bu adım enzimin çalışma sıcaklığı olan 72 °C'de gerçekleşmektedir. Bu üç basamağın ard arda tekrarlanmasıyla PZR yönteminde 1 döngü tamamlanmış olur. Döngü sayı arttıkça hedef DNA bölgesinin sayısı da katlanarak artış göstermektedir (80).

3.6.2. KREC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için Kullanılan Primer Dizileri

KREC gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslar arası yayınlarda doğrulanmış primerlerdir (33,34,39).

Forward primer: 5'-TCC CTT AGT GGC ATT ATT TGT ATC ACT-3'

Reverse primer: 5'-AGG AGC CAG CTC TTA CCC TAG AGT-3',

Liyofilize 10.000 pmol içeren primerler 500 µL 1xTE veya steril su ile sulandırılarak 20µM stok solüsyonu olarak saklandı.

3.6.3. KREC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için Hazırlanan PZR Karışımının Optimizasyonu

Çalışmamızda ilk aşama olarak; KREC gen bölgesinin çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımı için uluslararası yayınlarda yer alan öneriler dikkate alındı. Buna göre hastalara ait Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) sonuçlarının karşılaştırılacağı standart eğri hazırlamada kullanılmak üzere, yukarıda bahsedildiği gibi çocuk kanlarından izole edilmiş DNA örneklerinin geleneksel PZR ile çoğaltılma işlemine gidildi. Optimizasyon çalışmasında, KREC geninin jel elektroforezde doğru yerde bant görünümüne ulaşmak için; primer konsantrasyonu 0,5 µL ve 0,9 µL olacak şekilde iki ayrı hacimde PZR karışımı ile deneme yapıldı ve KREC gen primer hacmi **0,9 µL** ile optimize edildi. Validasyon sürecinde, jel

elektroforezde oluşan primer dimerleri gidermek, PZR özgülüğünü arttırmak için bir enhancer olan Betain kullanımına gittik. Ayrıca PZR tamponu olarak Dream Taq master mix kullanıldı. PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı. Toplam reaksiyon hacimi 25 µL ve tek reaksiyon üzerinden olacak şekilde, Tablo 3.2'deki bileşenler hazırlandı.

Tablo 3.2.KREC gen bölgesinin çoğaltılması için PZR'da yapılan denemeler

	<u>I.deneme</u>	<u>II.deneme</u>
Reverse primer	0,5 µL	0,9 µL
Forward primer	0,5 µL	0,9 µL
Dream Taq Master Mix	12,5 µL	12,5 µL
Betaine	3 µL	3 µL
Steril su	3,5 µL	2,7µL
DNA	5 µL	5 µL

3.6.4. KREC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için PZR Koşullarının Optimizasyonu

KREC gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimizasyonu için 58, 60, 61 ve 62°C olmak üzere dört farklı PZR termal sıcaklığı denendi. Bu farklı sıcaklıklarda çoğaltılan KREC geni PZR ürünü jel elektroforezde yürütüldüğünde doğru yerde bant görünümü gösteren en iyi annealing sıcaklığı **58 °C** olarak optimize edildi (Tablo 3.3).

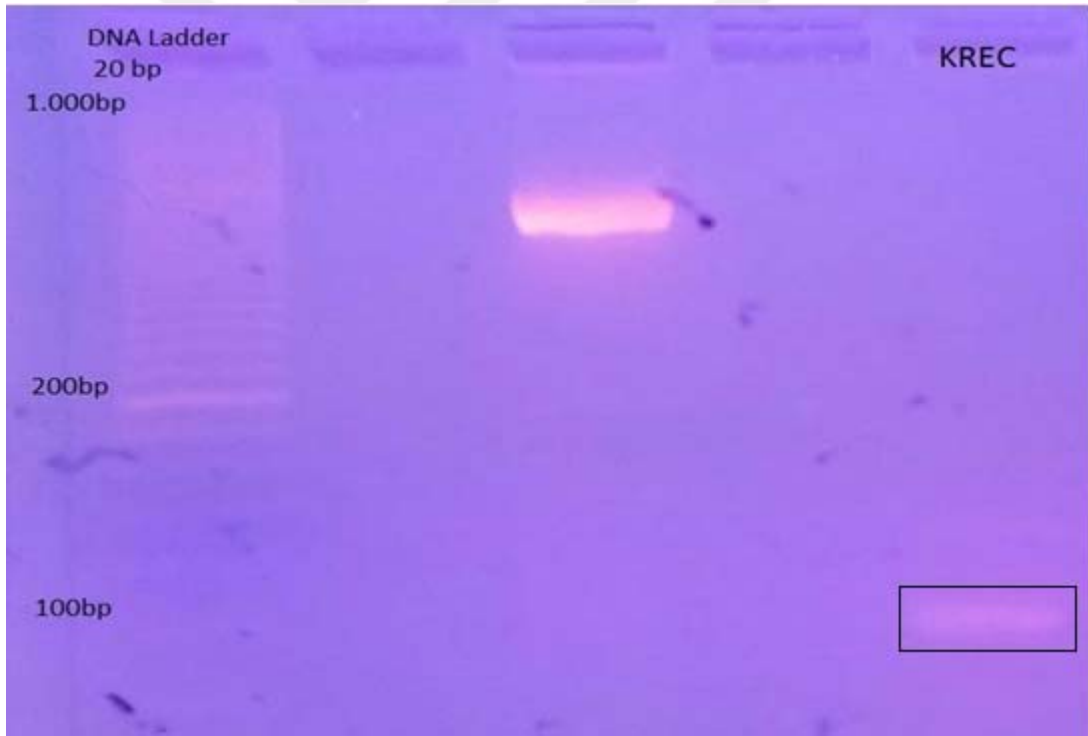
Tablo 3.3. KREC gen bölgesinin çoğaltılması için PZR reaksiyonu termal profil şartları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Pre-denatürasyon	95 °C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	45 döngü
Primer bağlanması	58 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Final uzama	72 °C	10 dakika	1 döngü

3.6.5. KREC PZR Ürünlerinin Kontrolü

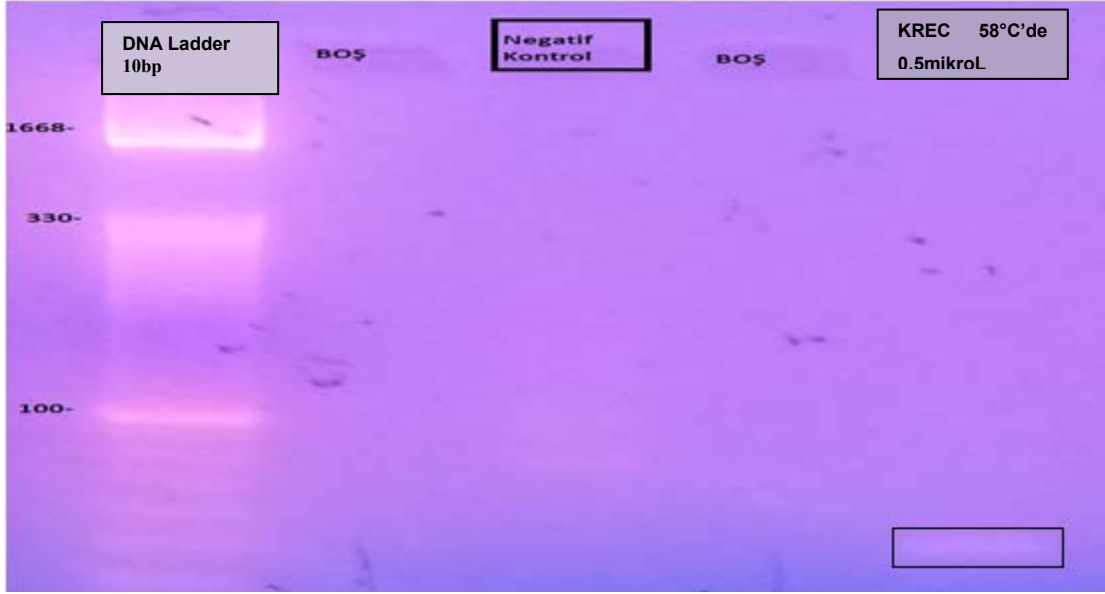
KREC gen bölgesinin çoğaltılması için kurulan PZR şartlarında ürünlerin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacı ile PZR tüpünden alınan 8 μ L örnek, 2 μ L yükleme tamponu ile karıştırılarak 100 volt, 400 Amper ve 60 dakika şartlarında elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, UV ışık altına konularak PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı çekildi.

PZR reaksiyonu sonucunda KREC geni için çoğalma bölgesinde 90bp'lik bir ürün elde edilmesi beklendi ve jele yüklenen DNA marker ile ürünlerin doğru yerde olup olmadığı kontrol edildi. 58°C'lik annealing sıcaklığı ve 0,9 μ L primer hacimde çoğaltılan standart KREC geni jel elektroforezde yürütülmüş ve genin uygun yerde çıktığı belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarına ait jel görüntüleri Şekil 3.2.a-e arasında gösterildiği gibidir.



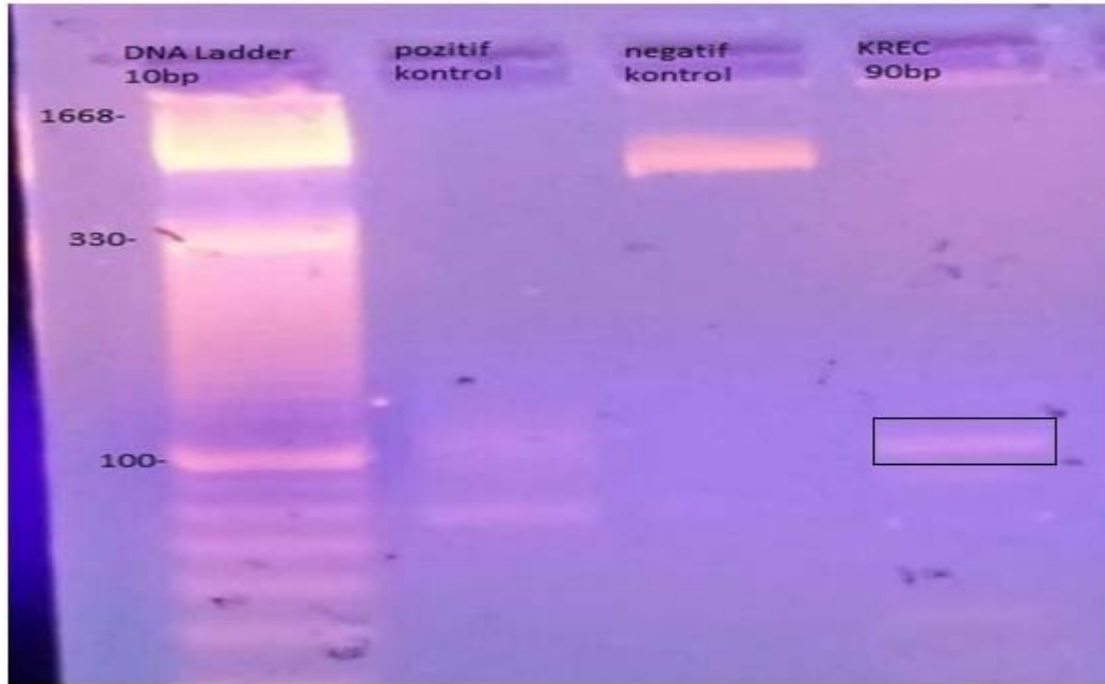
Şekil 3.2.a. 58°C annealing sıcaklığında ve 0,9 μ L primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü

KREC geni (90bp) jelde uygun bant görünümünü 58°C sıcaklığı ve 0,9 μ L primer hacminde vermiştir.



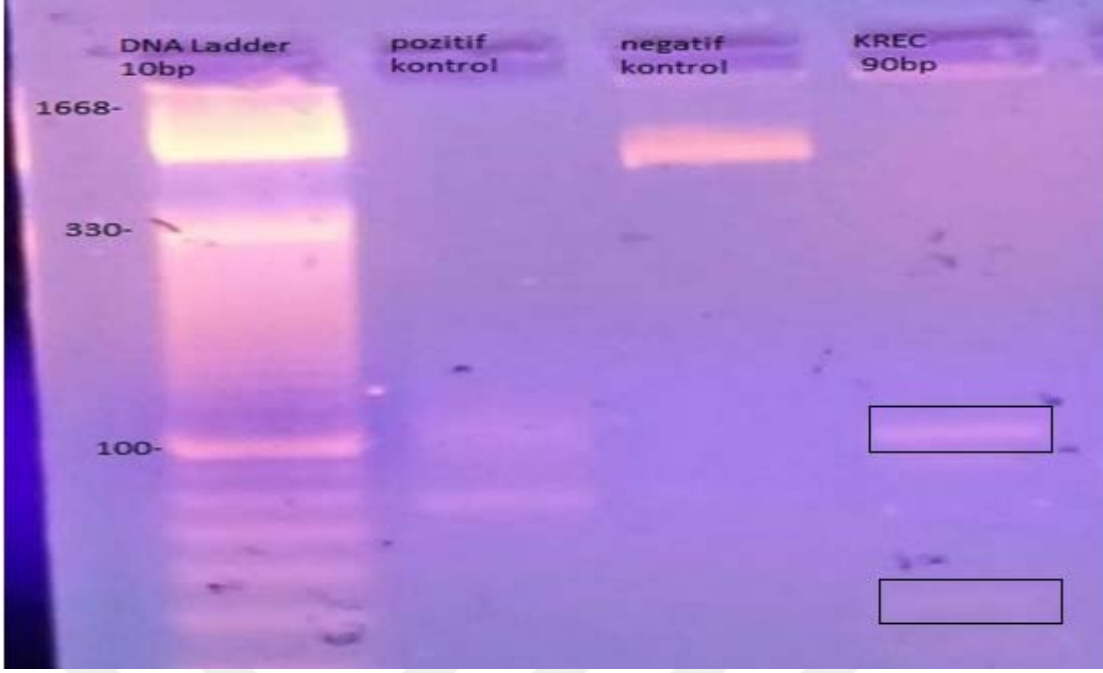
Şekil 3.2.b. 58°C annealing sıcaklığında ve 0,5 µL primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü

KREC geni (90bp), 0,5 µL primer hacminde ve 58°C sıcaklığında jelde doğru yerde tespit edilmemiştir.



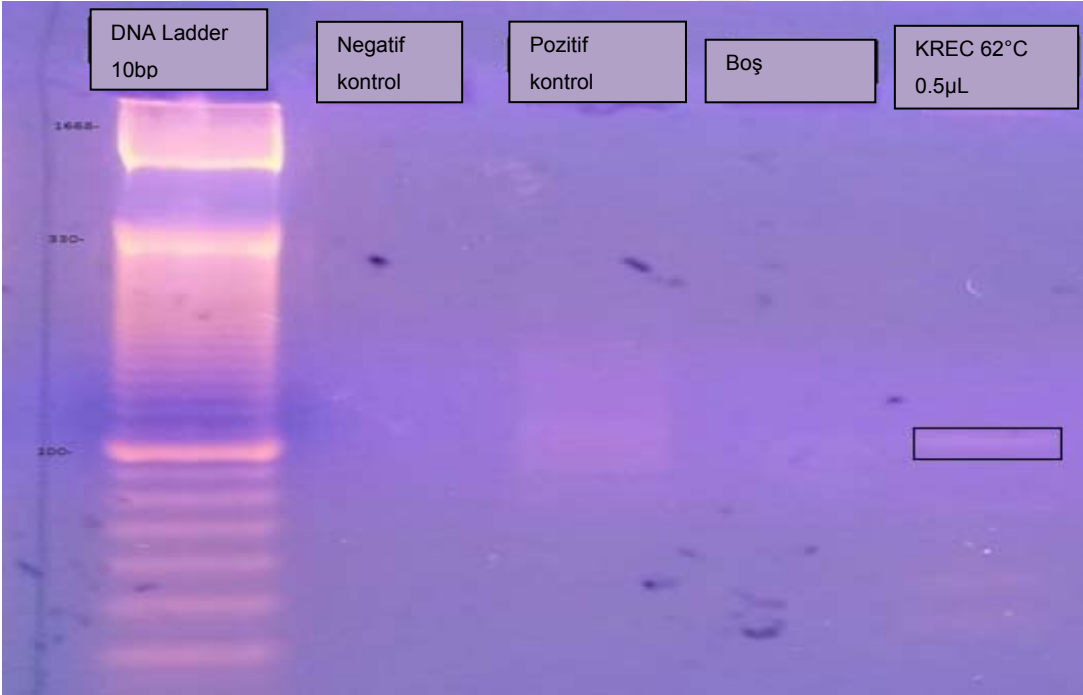
Şekil 3.2.c. 60°C annealing sıcaklığında ve 0,9 µL primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü

KREC geni (90bp), 60°C sıcaklığında ve 0,9 µL primer haciminde jelde uygun yerde tespit edilmemiştir.



Şekil 3.2.d. 61°C annealing sıcaklığında ve 0,5 µL primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jel elektroforez görüntüsü

KREC geni (90bp), 61°C sıcaklığında ve 0,5 µL primer hacminde jelde uygun yerde tespit edilmemiş ayrıca primer dimer görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 3.2.e. 62°C annealing sıcaklığında ve 0,5 µL primer ile PZR'da çoğaltılan KREC geni jelelektroforez görüntüsü

KREC geni (90bp), 62°C sıcaklığında ve 0,5 µL primer hacminde jelde uygun yerde tespit edilmemiştir.

3.6.6. PZR'da çoğaltılan KREC DNA'sının Jelden Pürifikasyonu

KREC geni primerleri için optimum konsantrasyon ve optimum PZR sıcaklık şartları belirlendikten sonra gerçek zamanlı PZR'da standart eğri oluşturmak ve hasta sonuçları ile karşılaştırmada kullanılacak standart DNA'ların, elektroforez sistemde doğru yerde tespit edilenleri jelden kesilerek purifikasyon işlemine gidildi. Bu aşamada DNA örnekleri, QIAquick Gel Extraction (Qiagen) ticari kiti kullanılarak ürün protokolünde belirtilen aşamalara uygun şekilde jelden purifiye edildi.

3.6.7. Jelden Pürifiye Edilen KREC Geninin Kopya Sayısının Hesaplanması

Gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR)'da kullanılacak standart DNA'nın elektroforezden sonra jelden pürifikasyonu yapıldı ve elde edilen bu DNA'nın düzey miktarı ve konsantrasyonu daha hassas olması nedeni ile Qubit florometrik cihaz ile yapıldı. Bunun için ticari olarak Qubit dsDNA BR Assay Kit (molecular probes life technologies-Q32850) kit kullanıldı. Kit prosedürüne uygun olarak yapılan işlemler sonucunda DNA konsantrasyonu (ng/μL) bulundu. PZR'da standart KREC geni olarak kullanılacak örneğin DNA kopya sayısı hesaplaması referans makalelerde belirtilmiş formül üzerinden yapılmıştır. Bu hesaplama işlemi <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> adresi üzerinden yapılmıştır.

$$\text{DNA Kopya Sayısı: } \frac{\text{DNA miktarı (ng)} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Baz çifti sayısı} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Yukarıda belirtilen formülde KREC baz çifti 90 olarak ve Qubit ölçüm sonucu çıkan DNA konsantrasyon miktarı formülde yerine konularak standart DNA kopya sayısı bulundu. DNA kopya sayısı üzerinden GZ-PZR aşamasında seri dilüsyonlar yapılarak standart eğri oluşturuldu.

3.7. TCRAC Gen Bölgesinin PZR Yöntemii le oğaltılması

3.7.1. TCRAC Gen Bölgesinin oğaltılması için Kullanılan Primer Dizileri

TCRAC gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslar arası yayınlarda doğrulanmış primerlerdir (33,34,39).

Forward primer: 5'-TGG CCT AAC CCT GAT CCT CTT-3'

Reverse primer: 5'-GGA TTT AGA GTC TCT CAG CTG GTA CAC-3',

Liyofilize 10.000 pmol içeren primerler 500 µL 1xTE veya steril su ile sulandırılarak 20µM stok solüsyonu olarak saklandı.

3.7.2. TCRAC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için Hazırlanan PZR Karışımının Optimizasyonu

GZ-PZR sonuçlarının karşılaştırılacağı standart eğri hazırlamada kullanılmak üzere, yukarıda bahsedildiği gibi çocuk kanlarından izole edilmiş DNA örnekleri TCRAC gen primerleri ile geleneksel PZR'da çoğaltıldı. Optimizasyon çalışmasında TCRAC geninin jel elektroforezde en doğru yerde bant göstermesi için bu gen primerleri 0.5 µL ve 0.9 µL olacak şekilde iki ayrı hacimde deneme yapıldı. TCRAC gen primer hacmi **0.9 µL** ile optimize edilerek diğer çalışmalar bu konsantrasyon ile devam edildi. PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Toplam reaksiyon hacimi 25 µL ve tek reaksiyon üzerinden olacak şekilde, Tablo 3.4'deki bileşenler hazırlandı.

Tablo 3.4. TCRAC gen bölgesinin çoğaltılması için PZR'da yapılan denemeler

	<u>I.deneme</u>	<u>II.deneme</u>
forward primer	0,5 µL	0,9 µL
reverse primer	0,5 µL	0,9 µL
Dream Taq Master Mix	12,5 µL	12,5 µL
Betaine	3 µL	3 µL
Steril su	3,5 µL	2,7 µL
DNA	5 µL	5 µL

3.7.3. TCRAC Gen Bölgesinin Çoğaltılması için PZR Koşullarının Optimizasyonu

TCRAC gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan reverse ve forward primerler için annealing derecesi 60 ve 62 °C olmak üzere iki farklı PZR termal

sıcaklığı denendi. Jel elektroforezde en doğru yerde bant görünümü verdiği için TCRAC geni annealing sıcaklığı **62 °C**'de optimize edildi (Tablo 3.5).

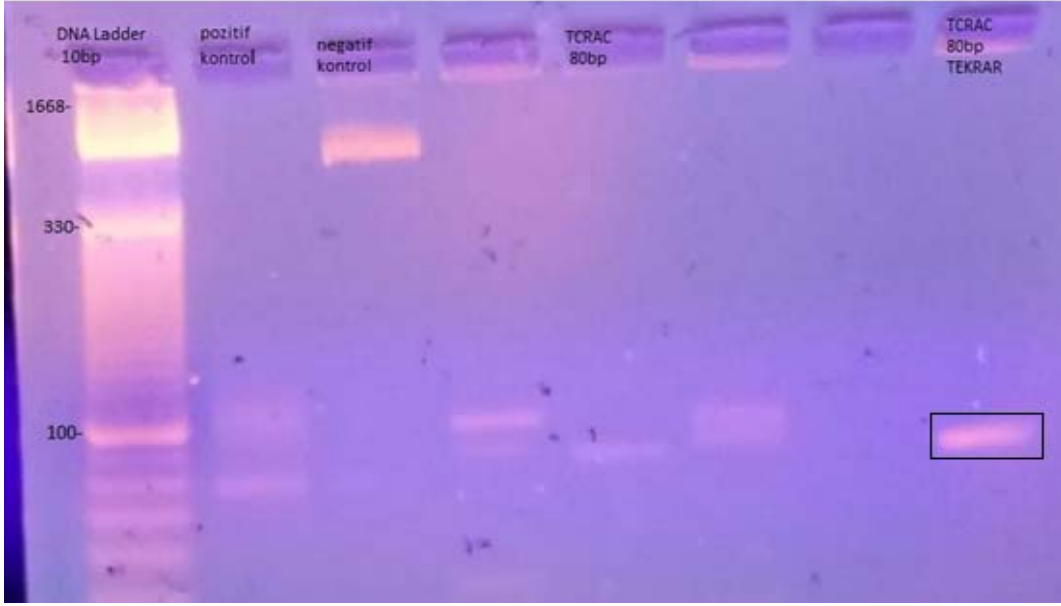
Tablo 3.5. TCRAC gen bölgesinin çoğaltılması için PZR reaksiyonu termal profil şartları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Predenatürasyon	95 °C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	45 döngü
Primer bağlanması	62 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Final uzama	72 °C	10 dakika	1 döngü

3.7.4. TCRAC PCR Ürünlerinin Kontrolü

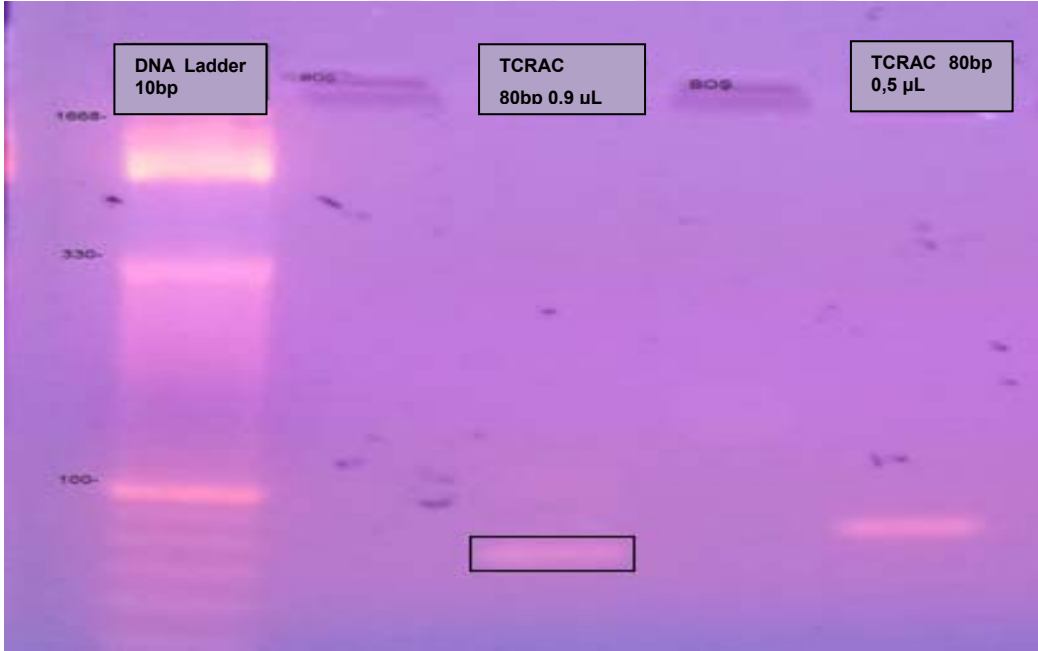
TCRAC gen bölgesinin çoğaltılması için kurulan PZR şartlarında ürünlerin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla PZR tüpünden alınan 8 µL örnek, 2 µL yükleme tamponu ile karıştırılarak 100 volt, 400 Amper ve 60 dakikalık şartlarda olacak şekilde elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında konularak PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı çekildi.

PZR reaksiyonu sonucunda TCRAC geni için çoğalma bölgesinde 80bp'lik bir ürün elde edilmesi beklendi ve jele yüklenen DNA marker ile ürünlerin doğru yerde olup olmadığı kontrol edildi. Şekil 3.3.a ve Şekil 3.3.b'de TCRAC geni optimizasyon çalışmalarına ait jel elektroforez görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 3.3.a. 60°C annealing sıcaklığında ve 0,9 µL primer ile PZR’da çoğaltılan TCRAC geni jel elektroforez görüntüsü

TCRAC geni (80bp), 60 °C sıcaklığında ve 0,9 µL primer hacimde jelde uygun yerde tespit edilmemiştir.



Şekil 3.3.b. 62°C annealing sıcaklığında, 0,5 µL ve 0,9 µL primer ile PZR’ da çoğaltılan TCRAC geni jel elektroforez görüntüsü

TCRAC geni (80bp), 62 °C sıcaklığında 0,5 µL primer hacimde jelde uygun yerde tespit edilmemiş, 0,9 µL primer hacimde uygun yerde tespit edilmiştir.

3.7.5. PZR’da Çoğaltılan TCRAC DNA’sının Jelden Pürifikasyonu

TCRAC geni primerleri için optimum konsantrasyon ve optimum PZR sıcaklık şartları belirlendikten sonra gerçek zamanlı PZR’da standart eğri

oluşturmada ve hasta sonuçları ile karşılaştırmada kullanılacak standart DNA'ların elektroforez sistemde doğru yerde tespit edilenlerin jelden kesilerek purifikasyonu işlemine gidildi. Bu aşamada DNA örnekleri QIAquick Gel Extraction (Qiagen) ticari kiti kullanılarak, ürün protokolünde belirtilen aşamalara uygun şekilde jelden purifiye edildi.

3.7.6. Jelden Pürifiye Edilen KREC Geninin Kopya Sayısının Hesaplanması

Standart TCRAC geni olarak GZ-PZR' da kullanılacak DNA'nın elektroforezden sonra jelden purifikasyonu yapıldı ve elde edilen bu DNA'nın düzey miktarı ve konsantrasyonu daha hassas olması nedeni ile Qubit florometrik cihaz ile yapıldı. Bunun için ticari olarak Qubit dsDNA BR Assay Kit (Molecular Probes Life Technologies-Q32850) kit kullanıldı. Kit prosedürüne uygun şekilde DNA konsantrasyonu (ng/μL) bulundu. GZ-PZR'da standart TCRAC geni olarak kullanılacak örneğin DNA kopya sayısı hesaplanması, referans makalelerde belirtilmiş formül üzerinden yapılmıştır. Bu hesaplama işlemi <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> adresi üzerinden yapılmıştır.

$$\text{DNA Kopya Sayısı: } \frac{\text{DNA miktarı (ng)} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Baz çifti sayısı} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Yukarıda belirtilen formülde TCRAC baz çifti 80 olarak ve Qubit ölçüm sonucu çıkan DNA konsantrasyonu miktarı formülde yerine konularak standart DNA kopya sayısı bulundu. DNA kopya sayısı üzerinden GZ-PZR aşamasında seri dilüsyonlar yapılarak standart eğri oluşturuldu.

3.8. Standart DNA Örneklerinin Dilüsyonu

Gerçek zamanlı PZR'da KREC ve TCRAC genleri için absolut kantifikasyon yapabilmek için aynı plakta standartlarının kopya sayısına bağlı olarak farklı sayıda dilüsyon ile reaksiyon kuruldu ve standart eğri oluşturuldu. Standart eğri kullanılarak hastalardaki KREC, TCRAC kopya sayıları belirlendi.

Jel elektroforez sonrası Qubit sistemle konsantrasyon ölçümleri yapılan ve yukarıda belirtilen formülde yerine konularak DNA kopya sayısı hesaplanan standart DNA'lar GZ-PZR öncesi seri dilüsyon yapıldı. Bu aşamada kopya sayısı 10^{11}

çıkanlar 1/10.000, kopya sayısı 10^{10} çıkan örnekler ise 1/1.000 oranında dilue edilerek 10^7 şeklinde başlangıç standardı hazırlandı. Daha sonra bu standart tüpten 1/10 şeklinde seri dilüsyon yapılarak 10^1 konsantrasyona kadar seyreltildi. GZ-PZR aşamasında 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^1 e kadar olan 4 farklı konsantrasyondaki DNA örneği çalışmaya alındı.

3.9. KREC ve TCRAC için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile geleneksel PZR ile çoğaltılmış KREC ve TCRAC genlerinin hasta DNA'larında da aynı gen bölgelerinin çoğaltılması ve eş zamanlı olarak moniterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu işlem için hem KREC hem de TCRAC gen bölgelerine özel primer dizileri ve problar kullanıldı. Applied Biosystems StepOne Plus Instrument cihazında TaqMan master kit (Applied Biosystems) kullanılarak işlem gerçekleştirildi. Projede kullanılan primer ve probların dizaynı BLAST analizi ile <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> yazılımı üzerinden doğrulandı.

3.9.1. KREC Geni için Kullanılan Primer ve Prob Dizileri

Primerler

forward primer: 5'-TCC CTT AGT GGC ATT ATT TGT ATC ACT-3'

reverse primer: 5'-AGG AGC CAG CTC TTA CCC TAG AGT-3'

Prob dizisi

Taqman probe: 5'-VIC-TCT GCA CGG GCA GCA GGT TGG-TAMRA-3'

3.9.2. TCRAC Geni için Kullanılan Primer ve Prob Dizileri

Primer dizileri

forward primer: 5'-TGG CCT AAC CCT GAT CCT CTT-3'

reverse primer: 5'-GGA TTT AGA GTC TCT CAG CTG GTA CAC-3'

Prob dizisi

Taqman probe: 5'-FAM-TCC CAC AGA TAT CCA GAA CCC TGA CCC-TAMRA-3'

3.9.3. KREC için GZ-PZR Protokolü

PZR plağı, ilk iki kuyucukta negatif kontrol, daha sonra sıra ile dilue edilerek seyreltilmiş (10^7 , 10^5 , 10^3 ve 10^1) standart DNA örnekleri ve hastalara ait DNA örnekleri olacak şekilde dizayn edildi. Plakta her kuyucuğa hazırlanan PZR karışımı 18 μ L pipetlendi ve daha sonra sırayla 2 μ L DNA örnekleri (negatif kuyucuklara steril su) pipetlendi. Hazırlanan PZR karışımının hacmi toplamda her kuyucukta 18 μ L olacak şekilde; çalışılacak örnekler paralel kuyucuklara pipetlenmek üzere, iki negatif kuyucuğu ve pipetleme hatasına karşılık bir fazla olacak şekilde toplam reaksiyon sayısı belirlenerek aşağıda belirtilen bileşenlerin her biri, bulunan bu toplam reaksiyon sayısı ile çarpılarak karışım hazırlandı. Final konsantrasyonda reaksiyon hacmi hesapları 900nM primer ve 250nM prob olacak şekilde hesaplanarak hazırlandı (26,33). PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

GZ-PZR karışımı tek reaksiyon üzerinden;

Forward primer (20 μ M)	0.9 μ L
Reverse primer (20 μ M)	0.9 μ L
Prob (5 μ M)	1 μ L
Betaine	3 μ L
Steril su	2,2 μ L
TaqMan Master Mix	10 μ L

Kuyucuklara pipetlenmiş 18 μ L karışım üzerine 2 μ L DNA örnekleri pipetlendikten sonra Applied Biosystem cihazında amplifikasyon gerçekleştirildi.

GZ-PZR Koşulları

Predenatürasyon	95 °C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	45 döngü
Primer bağlanması	58 °C	30 saniye	
Uzama	2 °C	1 dakika	
Final uzama	72 °C	10 dakika	1 döngü

3.9.4. TCRAC için GZ-PZR Protokolü

TCRAC primerleri de yukarıda belirtildiği gibi çoğaltılarak kopya sayısı hesaplanan standart DNA örneklerinin seri dilusyonları ve hastalara ait DNA örnekleri ile birlikte GZ-PZR'da çalışıldı. Çalışılacak toplam reaksiyon sayısı (yukarıda belirtildiği gibi) hesaplandı ve reaksiyon hacmi hesapları 900nM primer ve 250nM prob olacak şekilde hazırlandı (26,33).

GZ-PZR karışımı tek reaksiyon üzerinden

Forward primer (20 μ M)	0,9 μ L
Reverse primer (20 μ M)	0,9 μ L
Prob (5 μ M)	1 μ L
Betaine	3 μ L
Steril su	2,2 μ L
TaqMan Master Mix	10 μ L

Kuyucuklara pipetlenmiş 18 μ L mix üzerine 2 μ L DNA örnekleri pipetlenerek Applied Biosystem cihazında amplifikasyon gerçekleştirildi. Negatif kuyucuklara steril su konuldu.

GZ-PZR Koşulları

Predenatürasyon	95 °C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	45 döngü
Primer bağlanması	62 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Final uzama	72 °C	10 dakika	1 döngü

Yapılan tüm bu optimizasyon çalışmaları Tablo 3.6' de gösterilmektedir.

Tablo 3.6. KREC ve TCRAC genleri için PZR’da yapılan optimizasyon çalışmalarının bir arada gösterilmesi

	KREC		TCRAC	
	Primer hacmi	PCR annealing sıcaklığı	Primer hacmi	PCR annealing sıcaklığı
Denenen	0,5- 0,9 µL	58C°, 60C°,61C°, 62C°	0,5- 0,9 µL	61C°, 62C°
Kabul Edilen	0,9 µL	58C°	0,9 µL	62C°

3.10. Sonuçların Sayısal Değerlendirmesi

GZ-PZR sonuçları absolut kantitatif olarak analiz edilmiştir. TCRAC ve KREC standart DNA’ların 4 farklı dilüsyonu ile reaksiyon kurularak oluşturulan standart eğri ile hastaların kopya sayıları belirlendi. 10⁶ periferel kan mononükleer hücre (PBMC) başına düşen KREC sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (33,34,39).

$$\text{KREC sayısı} = \frac{\text{mean of KREC quantity} \times 10^6}{\text{mean of TCRAC quantity}/2}$$

Bu formülde yer aldığı gibi TCRAC quantity mean değeri ikiye bölünür çünkü her hücrede TCRAC gen kopyasından 2 tane vardır. KREC geni ise 1 kopya olarak bulunmaktadır. Bulunan bu değer aşağıdaki formülde kullanılarak 1 mL kanda kombine lenfosit ve monosit sayıları ile KREC kopya sayısı hesap edildi (33,34,39).

$$\text{KREC kopya sayısı} = \text{Kandaki KREC sayısı} \times (\text{1ml kandaki lenfosit mutlak değer} + \text{monosit mutlak değer})$$

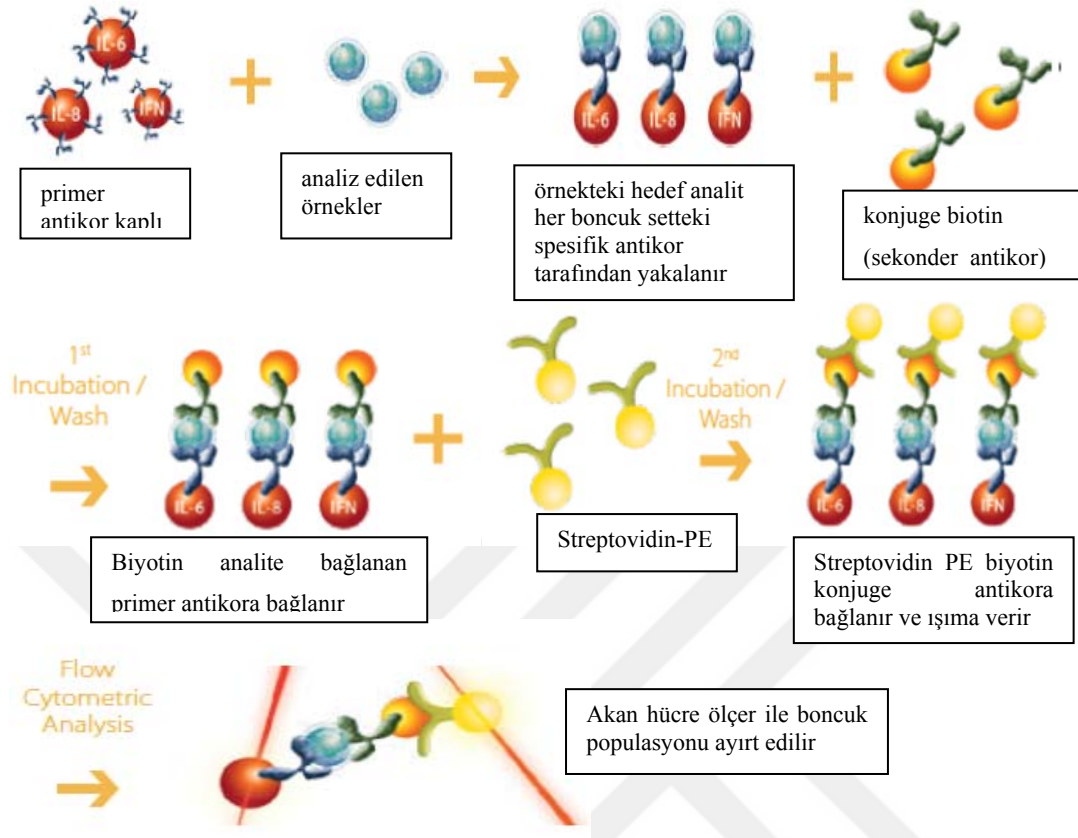
Uluslar arası çalışmalarda GZ-PZR sonuçlarının yorumlanmasında; standart eğri hazırlamada kullandıkları plasmid DNA üzerinden gidilerek kantitatif PZR için

10^{-8} ng plasmid DNA'ya karşılık KREC kopya sayısı 10 olarak sınırlandırılmıştır (33). KREC kopya sayısı yukarıda bahsedildiği gibi hesaplanan standart örnek, 10^7 - 10^1 arasında seri dilüsyon ile seyreltilmiştir. Hasta sonuçları değerlendirilirken standart eğri oranı -3.55 ile -3.30 arasında çıkanlar, %91-%100 arasında PZR etkinliğine karşılık geldiği kabul edilerek, korelasyon katsayısı (R^2) 0.998'den büyük çıkan sonuçlar değerlendirilmeye alındı (33).

3.11. Sitokin Analizi

Çalışmamızda akciğer transplantasyonu olan hasta grubunda, erken immün yanıtın göstergesi olan sitokin ölçümleri, sağlıklı kontrol grubu ile birlikte çalışıldı. Bu çalışmada hasta grubunun; transplant öncesi, transplant sonrası 24. saat ve 7. gün plazma örnekleri ile kontrol grubunun tek zamanlı plazma örnekleri aynı anda akan hücre ölçer (Beckman Coulter, FC500) floresan mikrobüncük temelli yöntem ile çalışıldı. Sitokin analizinde hasta grubunda yer alan 11 hastanın üç zaman dilimine ait plazma örnekleri sağlıklı bir şekilde elde edilemediğinden hasta sayısı 9 olarak belirlenerek çalışmaya devam edildi.

Akan hücre ölçer yöntemi floresan işaretli hücrelerin sıvı sistem içinde analizini gerçekleştiren bir tekniktir. Bu yöntemde sitokinlerin analizi büncükla kaplı antikor tayinine dayanır. Çoklu büncük populasyonları farklı seviyede ve boyutta floresans yoğunluğu ile ayrılabilir. Çalıştığımız örnekte mevcut analit, floresan büncüğe bağlı primer antikorla bağlanır. O analite özgü sekonder (biyotinle işaretli) antikor ise primer antikora bağlı analitle bağlanır. Ortama eklenen Streptavidin PE, biyotin ile konjuge sekonder antikora bağlanarak floresan ışımaya verir (81). Şekil 3.4'de akan hücre ölçer ile sitokin ölçümü aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Akan hücre ölçer ile sitokin ölçümü prosedürü şematik gösterimi (82)

Sitokin analizinde eBioscience BMSFFS/1.0 (Bender MedSystems, USA) ticari kit kullanılarak; soluble CD40 ligand (sCD40L), soluble platelet selectin (sP-selectin), monocyte chemoattractant protein (MCP-1), tissue-type plasminogen activator (t-PA), interleukin 6 (IL-6) ve interleukin 8 (IL-8) sitokinleri analiz edildi. Sonuçların analizinde Flow Cytomix Pro1.0 software sistem kullanıldı.

3.11.1. Sitokin Kiti Çözeltilerinin Hazırlanması

A-Assay Buffer: Stok assay buffer solüsyonu kristalize ise ısınması beklendi. 50 ml (10x) Assay buffer distile su ile 450 ml'ye tamamlandı, 1x Assay buffer haline getirildi, hafifçe karıştırıldı. 2-8 °C'de saklandı.

B- Standart Proteinin Hazırlanması (Top Standart): Liyofilize standartlar (her bir sitokin için ayrı ve kit içerisinde hazır bulunan) kit prosedüründe belirtildiği şekilde distile su ile çözündürüldü. Girdap oluşturacak şekilde vorteks ile karıştırıldı.

Pipetlemeden önce 10-30 dakika bekletildi ve kullanımdan önce mikrosantrifüj ile birkaç dakika santrifüj edildi.

C- Standart Karışımın Hazırlanması: Yukarıda belirtildiği gibi çözündürülmüş her bir standart (6 adet) tüpten 10 µL alınarak temiz bir tüpe konuldu. Üzerine yukarıda belirtilen assay buffer ile 200 µL'ye tamamlandı.

D- Standartların Seri Dilüsyonu: 6 temiz tüp alınarak her birine 100 µL assay buffer pipetlendi. Birinci tüpe yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan standart karışımdan 50 µL pipetlendi. Birinci tüpteki bu karışımdan 50 µL alınarak ikinci tüpe pipetlendi ve bu şekilde son tüpe kadar seri dilüsyon yapıldı.

E- Boncuk Karışımının Hazırlanması: Her örnek sayısı için 25 µL gerekmektedir. Çalışılacak örnek sayısı, standartlar ve kör tüpü de ilave edilerek toplam test sayısı hesaplanarak, toplam hacim 96 test sayısı üzerinden totalde yaklaşık 3000 µl olacak şekilde hesaplandı. Kit içeriğinde hazır bulunan boncuklar pipetlenmeden önce vortekslendi. Her bir boncuk şişesinden 150 µL alınarak temiz bir tüpe konuldu. Üzerine Reagent Dilution Buffer (kit içerisinde yer alan) ilave edilerek toplam hacim 3000 µL'ye tamamlandı. 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek tüpte 50 µL kalacak şekilde üstteki faz atıldı. Daha sonra tüpe 2950 µL Reagent Dilution Buffer (kit içerisinde yer alan) ilave edilerek boncuk karışımı hazırlandı.

F- Konjuge Karışımın Hazırlanması: Her test tüpü için 50 µL gerektiğinden toplam test tüpü sayısı kadar hesap yapılarak toplam hacim 6000 µL olarak belirlendi. Her spesifik konjugattan 300 µL alınarak bir tüpe konuldu ve üzerine Reagent Diluent Buffer ile toplam hacim 6000 µL' ye kadar tamamlandı.

G- Streptovidin PE Solüsyonu Hazırlanması: Toplam test sayısı üzerinden 176 µL Streptovidin PE (kit içeriğinde yer alan) üzerine 5324 µL assay buffer ilave edilerek toplam hacim 5500 µL olacak şekilde solüsyon hazırlandı. Bu solüsyon kullanıma yakın bir sürede taze hazırlandı.

3.11.2. Sitokin Analizi Test Protokolü ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Yukarıda belirtildiği üzere hazırlanan solüsyonlar ile sitokin test protokolü kit prosedürüne uygun şekilde akan hücre ölçer cihazda (Beckman Coulter-FC500) çalışıldı. Analiz öncesi yukarıda bahsedilen set up boncuklar ile standardizasyon yapıldı. Standart dilüsyon tüpleri çalışıldıktan sonra ulaşılan X Mean değerler ile

standart eğri oluşturuldu. Hasta ve kontrol örneklerindeki sitokin sonuçları, ulaşılan bu standart değerlere göre orantı kurularak hesaplandı.

3.12. Araştırmada Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizleri için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır. Veriler değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile, tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, Frekans) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında Wilcoxon Signed Ranks test, parametreler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Spearman's Rho korelasyon analizi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma grubumuzda akciğer transplantı yapılan 11 hasta bulunmaktadır. Sitokin çalışmasında kontrol grubu 9 sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Tablo 4.1’de hasta grubu ve kontrol grubuna ait bilgiler gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait bilgiler

	HASTA n=11	KONTROL n=10
<u>Örnek sayısı</u>		
Kadın(%)/ Erkek(%)	3 (%27,3) /8 (%72,7)	3 (%33,33) /7 (%66,67)
<u>Yaş ortalamaları (yıl)</u>		
(x±SD)	42,36 ± 12,36	42,22 ± 10,81
<u>Sigara</u>		
İçen	3 (%27,27)	6 (%60)
İçmeyen	8 (%72,73)	4 (%40)
<u>Diabetik</u>		
Olan	4 (%36,36)	Yok
Olmayan	7 (%63,64)	10
<u>Primer Tanıları</u>		
KOAH	4	Sağlıklı donör
IPF	3	
KF	1	
Bronşiektazi	2	
Slikozis	1	
<u>FEV1 %</u>		
50<	8	Sağlıklı donör
50>	3	

n: örnek sayısı

Tablo 4.2’de hastaların transplant yapılmadan önce (pre-op), transplant yapıldıktan sonraki 24.saatte ve 7. gündeki kan parametrelerinin ortalama değerleri ve bunların zamanlar arasındaki karşılaştırmaları bir arada görülmektedir. Buna göre hastaların 24. saatteki lökosit (WBC) değerleri ortalaması transplant öncesi değerine göre anlamlı bir artış göstermektedir ($p < 0.05$). 24. saatteki WBC ortalaması 7. güne göre anlamlı olarak yüksek bulunmaktadır ($p < 0.05$). Eritrosit (RBC) değerlerinin zamanlara göre değerlendirilmesinde; transplant öncesi değerlerine göre 24. saat ortalamalarında anlamlı bir düşüş görülmektedir ($p < 0.05$). Transplant öncesi

değerlere göre 7. gün eritrosit ortalamalarında da anlamlı bir düşüş görülmekte ($p<0.05$), ancak 24. saate göre 7. gün eritrosit ortalamalarında anlamlı bir değişim görülmemektedir. Hemoglobin (Hgb) ortalamalarında ise transplant öncesi değerine göre 24. saat ve 7. saatteki hemoglobin ortalamalarında anlamlı olarak düşüş görülmektedir ($p<0.05$). 24. saatteki hemoglobin ortalamasına göre 7. günde anlamlı bir değişiklik bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Nötrofil yüzde (%) değer ortalamaları ve zaman dilimleri arasındaki karşılaştırmada; transplant öncesi nötrofil yüzde ortalama değerine göre 24. saatte anlamlı olarak artmaktadır ($p<0.005$). Aynı şekilde 7. gün değerlerinde transplant öncesi değerlerine göre anlamlı bir artış bulunmakta ($p<0.05$), 24. saate göre 7.gün nötrofil yüzde değerlerinde ise anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Nötrofil mutlak değer ortalamaları ise; transplant öncesi değerine göre 24.saat ve 7. günde anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$). 24. saat ile 7. gün nötrofil mutlak değer ortalamalarında anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0.05$). Nötrofil mutlak değer sonuçları ile nötrofil yüzde değerleri, zaman dilimleri arasındaki farklılıkların aynı yönlü olduğu görülmektedir.

Monosit yüzde (%) değer ortalamaları ve zamanlar arasındaki değişimlerinde; transplant öncesi değerlerine göre 24. saat monosit yüzde değerlerinde anlamlı bir düşüş görülmektedir ($p<0.05$). 7. gün monosit yüzde değerleri ile transplant öncesi değerleri arasında ve 24. saat ile 7. gün monosit yüzde değerleri arasında anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$). Monosit mutlak değer ortalamalarında ise her üç zaman dilimi açısından anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$).

Lenfosit yüzde (%) değer ortalamalarının zamanlar arasında karşılaştırmasında; transplant öncesi lenfosit yüzdelerine göre 24. saatteki değerlerde anlamlı bir düşüş görülmektedir ($p<0.05$). 24. saate göre 7. günde lenfosit yüzdelerinde anlamlı bir artış görülmektedir ($p<0.05$). Lenfosit mutlak değerlerinde ise, transplant öncesi sonuçlarına göre 24.saat lenfosit mutlak değerlerinde anlamlı bir düşüş görülmektedir ($p<0.05$). Transplant öncesi lenfosit mutlak değerleri ile 7. gün lenfosit mutlak değerleri arasında ve 24. saat ile 7. gün lenfosit mutlak değerleri arasında anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$).

Trombosit (PLT) değerlerinin ortalamalarında ise transplant öncesi değerlere göre 24.saat trombosit ortalamasında anlamlı bir düşüş bulunmaktadır ($p<0.05$). 24.

saat trombosit değerlerine göre 7. gün trombosit değerlerinde de anlamlı bir düşüş bulunmaktadır ($p<0.05$).

Kan parametrelerinin tümü genel olarak değerlendirilecek olduğunda, hasta grubunda lökosit, eritrosit, hemoglobin, nötrofil (yüzde ve mutlak değer), monosit (yüzde), lenfosit ve trombosit değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır.



Tablo 4.2. Hasta grubunda üç zaman dilimine ait kan parametrelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Lökosit ($10^3/\mu\text{L}$)	Eritrosit ($10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Nötrofil (%)	Nötrofil (# $\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	Monosit (%)	Monosit (# $\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	Lenfosit (%)	Lenfosit (# $\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	Trombosit ($10^3/\mu\text{L}$)
[Ort±SS (medyan)]										
Preop	10,14±3,74 (9,4)	4,85±1,05 (4,8)	13,15±2,2 (13)	70,29±10,67 (69)	6,67±3,33 (5,8)	6,78±2,46 (7,1)	0,8±0,49 (0,7)	19,81±8,62 (18,7)	2,05±1,11 (1,6)	233,45±87,44 (239)
24.saat	22,15±11,89 (21,9)	3,77±0,99 (3,3)	10,57±1,67 (9,8)	94,92±2,71 (95,9)	17,67±11,75 (14,4)	2,75±1,67 (1,8)	0,63±0,5 (0,5)	2,21±1,65 (1,5)	0,41±0,19 (0,5)	176,27±89,4 (173)
7.gün	12,55±4,84 (13,1)	3,54±0,59 (3,4)	9,35±2,2 (9,7)	94,68±3,7 (94,6)	12,49±7,03 (10,4)	4,27±3,08 (3,4)	0,49±0,28 (0,5)	13,21±22,46 (3,3)	1,08±1,55 (0,5)	89±38 (78)
Preop-24.saat	0,008*	0,006*	0,016*	0,003*	0,008*	0,004*	0,683**	0,003*	0,004*	0,049*
Preop- 7.gün	0,100	0,003*	0,006*	0,003	0,021*	0,075	0,108**	0,248	0,154	0,003*
24.saat-7.gün	0,026*	0,350	0,109	0,790	0,114	0,230	0,609**	0,041*	0,233	0,004*

Wilcoxon Sign test

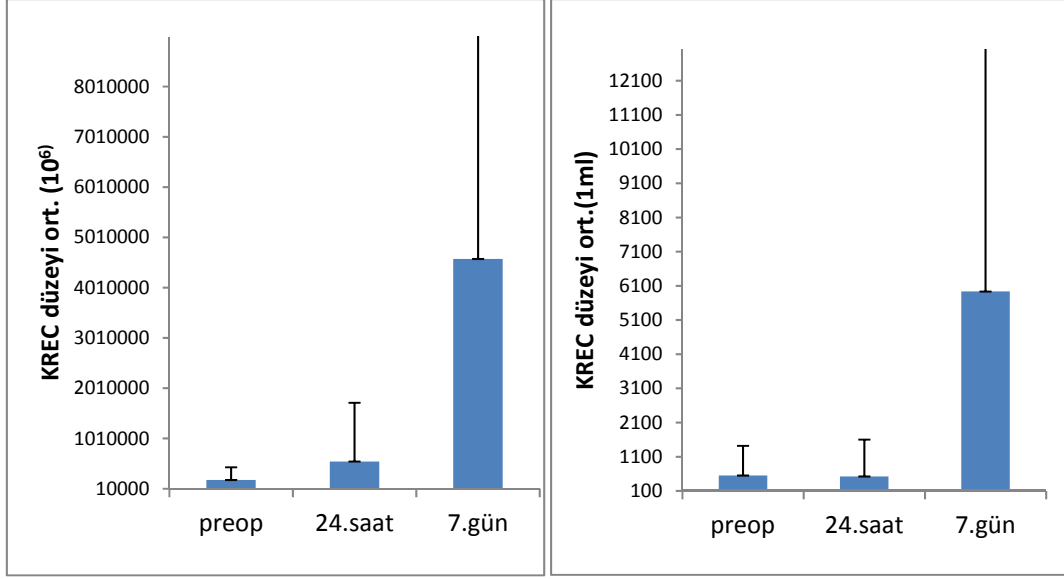
* $p < 0.05$ ** $p > 0.05$

Hasta grubunda GZ-PZR yöntem ile elde edilen 10^6 PBMC başına düşen KREC sayısı ve 1 mL kandaki KREC kopya sayılarının değerlendirilmesi yapılmıştır. Tablo 4.3'de preop, 24. saat ve 7. günlerdeki KREC değerlerinin ortalamaları ve üç zaman dilimindeki karşılaştırma sonuçları görülmektedir. Bu sonuçlara göre, hasta grubunda 10^6 hücre başına düşen KREC düzey ortalamalarında 24. saat transplant öncesine göre, 7. gün ortalaması da 24. saate göre artış göstermektedir. Ancak üç zaman dilimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.1). 1ml kandaki KREC değerlerinin ortalamasında ise transplant öncesi ve 24. saat arasında bir fark görülmemekle beraber 7. gün sonuçları transplant öncesi ve 24. saate göre sayısal olarak artış göstermektedir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 4.3. Hasta grubunda üç farklı zaman dilimindeki KREC seviyelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

	KREC (10^6 PBMC) Ort±SS (medyan)	KREC (1ml kandaki) Ort±SS (medyan)
Preop	183494,55 ± 253084,42 (72642,9)	551,63 ± 867,63 (182)
24.saat	550152,39 ± 1168919,86 (41050,1)	523,28 ± 1078,72 (85,4)
7.gün	4578884,38 ± 13504003,09 (126849,8)	5932,6 ± 12170,7 (170,2)
Preop-24.saat p	0,594	0,657
Preop-7.gün p	0,374	0,424
24.saat-7.gün p	0,286	0,075

Wilcoxon Sign test



Şekil 4.1. Üç zaman diliminde KREC düzeyleri ortalamalarındaki değişimi gösteren grafik

Çalışmamızda hasta grubunda elde edilen üç zaman dilimine ait KREC düzeyleri yine bu zaman dilimlerindeki kan sayım sonuçları ile birlikte değerlendirilerek aralarındaki korelasyon analiz edildi. Tablo 4.4’de hasta grubunda transplant öncesi KREC düzeyleri ile kan parametreleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre transplant öncesi 10^6 hücre başına hesaplanan KREC düzeyi ve 1ml kandaki KREC düzeyi ile aynı zamandaki kan parametreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4.4. Hasta grubunda transplant öncesi KREC düzeyleri ve KREC kopya sayısı ile kan parametreleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi

pre-op pre-op		KREC düzeyi (10 ⁶ hücre başına)	KREC kopya sayısı (1ml kanda)
Lökosit	r	-0,050	-0,023
	p	0,884	0,947
Eritrosit	r	-0,118	-0,018
	p	0,729	0,958
Hemoglobin	r	-0,264	-0,173
	p	0,433	0,612
Nötrofil (%)	r	-0,4	-0,445
	p	0,22	0,17
Nötrofil (#)	r	0,109	0,082
	p	0,75	0,811
Monosit (%)	r	0,273	0,309
	p	0,417	0,355
Monosit (#)	r	0,028	0,079
	p	0,935	0,817
Lenfosit (%)	r	0,309	0,364
	p	0,355	0,272
Lenfosit (#)	r	0,275	0,349
	p	0,413	0,293
Trombosit	r	0,223	0,182
	p	0,509	0,592

Spearman's Rho korelasyon analizi

Hasta grubunda 24.saatteki KREC düzeyi ve KREC kopya sayısının kan parametreleri ile arasındaki korelasyon sonucu Tablo 4.5’de görülmektedir. Buna göre KREC düzeyi ile Hemoglobin değerleri arasında pozitif yönlü, %61.2 oranında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (p<0.05). KREC kopya sayısı ile lökosit düzeyleri

arasında pozitif yönlü, %61.8 oranında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ($p<0.05$). Ancak 24. saat KREC düzeyi ve KREC kopya sayıları ile diğer kan parametreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.

Tablo 4.5. Hasta grubunda 24. saat zaman dilimine ait KREC düzeyleri ve KREC kopya sayısı ile kan parametreleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi

24.saat 24.saat		KREC düzeyi (10^6 hücre başına)	KREC kopya sayısı (1ml kanda)
Lökosit	r	0,582	0,618
	p	0,060	0,043*
Eritrosit	r	0,391	0,273
	p	0,235	0,417
Hemoglobin	r	0,612	0,475
	p	0,045*	0,140
Nötrofil (%)	r	0,096	-0,082
	p	0,780	0,811
Nötrofil (#)	r	0,382	0,491
	p	0,247	0,125
Monosit (%)	r	-0,005	0,178
	p	0,989	0,601
Monosit (#)	r	0,124	0,297
	p	0,717	0,374
Lenfosit (%)	r	0,055	0,227
	p	0,873	0,502
Lenfosit (#)	r	0,265	0,456
	p	0,431	0,159
Trombosit	r	-0,418	-0,255
	p	0,201	0,450

Spearman's Rho korelasyon analizi

Hasta grubunda 7. gündeki KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı ile kan parametreleri arasındaki korelasyon analizi Tablo 4.6'da görülmektedir. Buna göre KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı ile kan parametreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4.6. Hasta grubunda 7. gün zaman dilimine ait KREC düzeyleri ve KREC kopya sayısı ile kan parametreleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi

7. gün 7. gün		KREC düzeyi (10^6 hücre başına)	KREC kopya sayısı (1ml kanda)
Lökosit	r	0,064	-0,345
	p	0,853	0,298
Eritrosit	r	0,373	0,6
	p	0,259	0,051
Hemoglobin	r	0,327	0,518
	p	0,326	0,102
Nötrofil (%)	r	-0,023	-0,096
	p	0,947	0,78
Nötrofil (#)	r	0,018	-0,3
	p	0,958	0,37
Monosit (%)	r	-0,132	0,141
	p	0,699	0,679
Monosit (#)	r	-0,064	-0,009
	p	0,852	0,979
Lenfosit (%)	r	-0,196	0,15
	p	0,564	0,659
Lenfosit (#)	r	-0,144	-0,209
	p	0,673	0,538
Trombosit	r	0,182	0,382
	p	0,593	0,247

Spearman's Rho korelasyon analizi

Hasta grubunda yer alan toplam 11 hastanın yaşlarına göre üç zaman dilimine ait KREC düzeyi arasında bir ilişki olup olmadığı analiz edilmiş olup, sonuçlar Tablo 4.7’de görülmektedir. Hastalar yaş limitine göre 45 yaş altı ve 45 yaş üstü olarak iki gruba ayrılarak analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre, yaşı 45 altı ve üstü olan olgular arasında transplant öncesi KREC düzeyi ortalamaları açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$). 24. saat diliminde KREC düzeyi ortalamaları ile 45 yaş altı ve üstü olgular arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$). Hasta grubunda 7.gündeki KREC düzeyi ortalamaları 45 yaş altı olgularda, 45 üstü olan olgulara göre anlamlı bir yükseklik göstermektedir ($p<0.05$). Ayrıca yaş limitlerine göre üç zaman dilimi kendi arasında analiz edildiğinde, KREC düzey ortalamaları 45 yaş altı ve 45 yaş üstü olgularda zamanlar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4.7. Hasta grubunda yaş limitine göre üç zaman dilimine ait KREC düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi

KREC düzeyi (10^6 hücre başına)	<45 yaş Ort±SS (medyan)	>45 yaş Ort±SS (medyan)	¹ p
Pre-op	226567,33±322615,94 (43633,7)	131807,23±54614,49 (78848,2)	1,000
24.saat	966045,1±1508302,51(216447,1)	51081,13±37726,13 (41050,1)	0,584
7.gün	8363637,25±18080315,21 (1124960)	37180,94±51304,93 (11934,8)	0,011*
Pre-op-24.saat ² p	0,345	0,500	
Pre-op-7.gün ² p	0,116	0,345	
24.saat-7.gün ² p	0,249	0,500	

¹Mann Whitney U test ²Wilcoxon Sign test * $p<0.05$

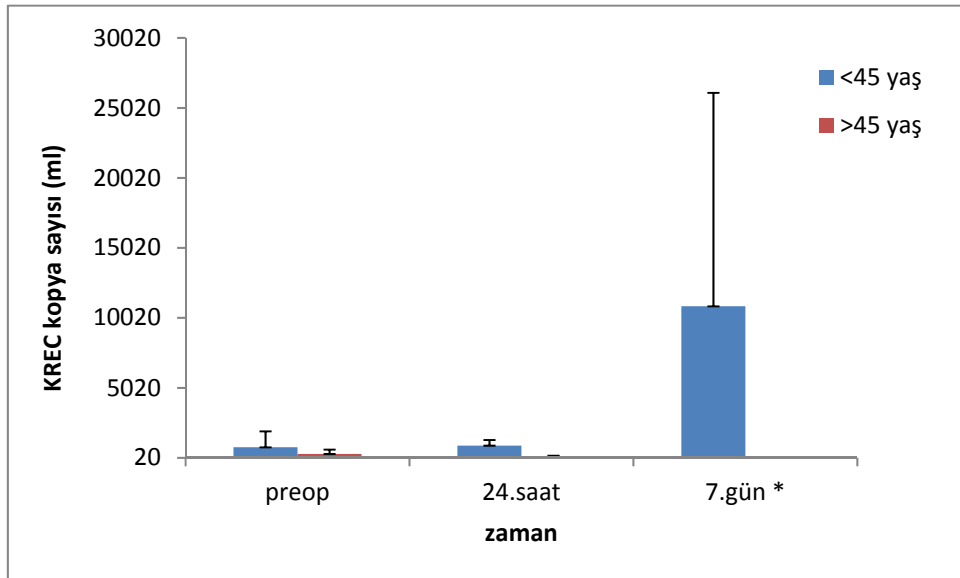
Tablo 4.8’de ise hasta grubunda 45 yaş altı ve üstü olgularda üç zaman dilimine ait KREC kopya sayısı ortalamaları arasındaki korelasyon analizi görülmektedir. Buna göre 45 yaş altı ve 45 yaş üstü olgularda hem transplant öncesi hem de 24. saat dilimindeki KREC kopya sayısı ortalamaları açısından anlamlı bir

farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Ancak 7. gün KREC kopya sayısı ortalaması 45 yaş altı olgularda, 45 yaş üstü olgulara göre anlamlı olarak yükseklik göstermektedir ($p<0.05$) (Şekil 4.2). Ayrıca yaş limitlerine göre üç zaman dilimi kendi arasında analiz edildiğinde, KREC kopya sayısı ortalamaları 45 yaş altı ve 45 yaş üstü olgularda, 24. saate göre 7. gün sonuçları anlamlı olarak artış göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 4.8. Hasta grubunda yaş limitine göre üç zaman dilimine ait KREC kopya sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi

KREC kopya sayısı	<45 yaş	>45 yaş	¹ p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Pre-op	67,61±1141,46 (137,1)	292,46±315,18 (205)	0,855
24.saat	888,44±403,25 (100,7)	85,09±87,69 (85,4)	0,715
7.gün	10844,37±15249,91 (5186,1)	38,47±34,24 (32,9)	0,006*
Pre-op-24.saat ²p	0,753	0,345	
Pre-op-7.gün ²p	0,116	0,138	
24.saat-7.gün ²p	0,028*	0,138	

¹Mann Whitney U test ²Wilcoxon Sign test * $p<0.05$



Şekil 4.2. Yaşa göre KREC kopya sayıları (ml) korelasyonunu gösteren grafik

Hasta grubunda KREC düzeyleri ve kopya sayısında cinsiyete göre bir farklılık olup olmadığı analiz edildi. Buna göre KREC düzeyleri ortalamaları açısından kadınlar ve erkekler arasında üç zaman diliminde anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Tablo 4.9’da cinsiyete göre üç zaman dilimi açısından KREC düzeyleri ortalamaları korelasyon analizi görülmektedir. Üç zaman dilimi kendi arasında analiz edildiğinde ise cinsiyete göre KREC düzeyleri ortalamalarında anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$).

Tablo 4.9. Cinsiyete göre hasta grubunun üç zaman diliminde KREC düzeyleri ortalamalarının istatistiksel değerlendirilmesi

KREC düzeyi	Kadın Ort±SS (medyan)	Erkek Ort±SS (medyan)	¹ p
Pre-op	307851,5±254607,23 (381290)	136860,7 ± 252721,16 (43633,7)	0,221
24.saat	551682,8±851749,79 (102088,2)	549578,48±1320863,97 (31362,5)	0,414
7.gün	864000,58±1384813,11 (126849,8)	5971965,81±15869193,37 (123279,8)	0,838
Pre-op-24.saat ² p	0,593	0,889	
Pre-op-7.gün ² p	0,593	0,573	
24.saat-7.gün ² p	0,245	0,484	

¹Mann Whitney U test ²Wilcoxon Sign test * $p<0.05$

Tablo 4.10’da cinsiyete göre KREC kopya sayıları ortalamaları ve üç zaman dilimi arasında karşılaştırma sonuçları görülmektedir. Buna göre, kadınlar ve erkekler arasında transplant öncesi, 24. saat ve 7. gün KREC kopya sayısı ortalamaları açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$). Her üç zaman dilimine ait sonuçlar kadınlarda kendi aralarında karşılaştırıldığında, KREC kopya sayısı ortalamalarında anlamlı bir değişim bulunmamaktadır. Erkeklerde her üç zaman diliminde KREC kopya sayısı ortalamaları değerlendirildiğinde anlamlı bir değişim bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4.10. Cinsiyete göre hasta grubunun üç zaman diliminde KREC kopya sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi

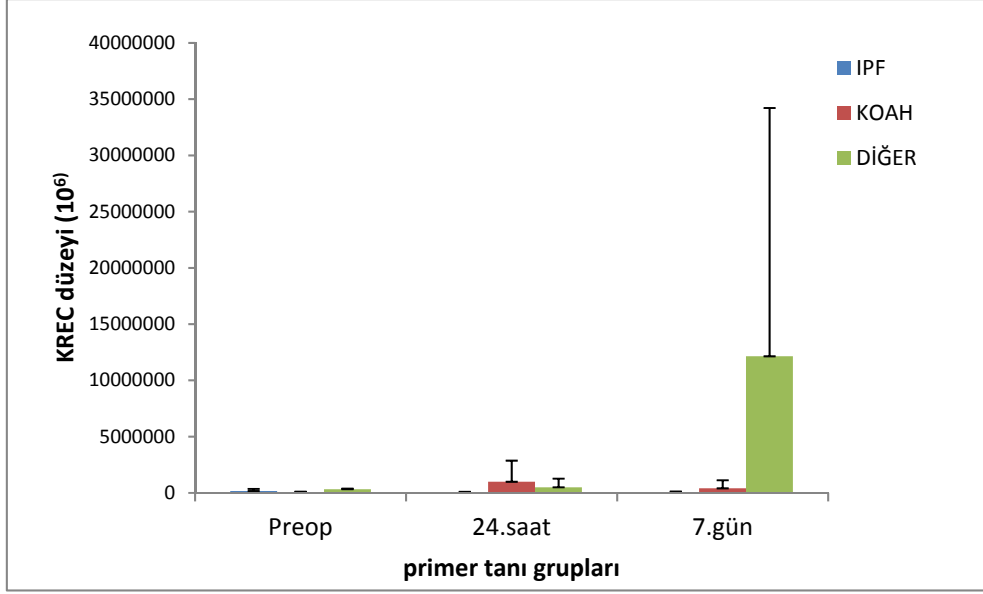
KREC kopya sayısı	Kadın Ort±SS (medyan)	Erkek Ort±SS (medyan)	¹ p
Pre-op	814,91±731,1 (800,7)	452,91±939,06 (137,1)	0,307
24.saat	638,6±914,99 (224,6)	480,04±1189,67 (61,1)	0,540
7.gün	850,58±1395,75 (88,8)	7838,35±13994,02 (469,5)	0,414
Pre-op-24.saat ² p	1,000	0,575	
Pre-op-7.gün ² p	1,000	0,401	
24.saat-7.gün ² p	1,000	0,069	

¹Mann Whitney U test

²Wilcoxon Sign test

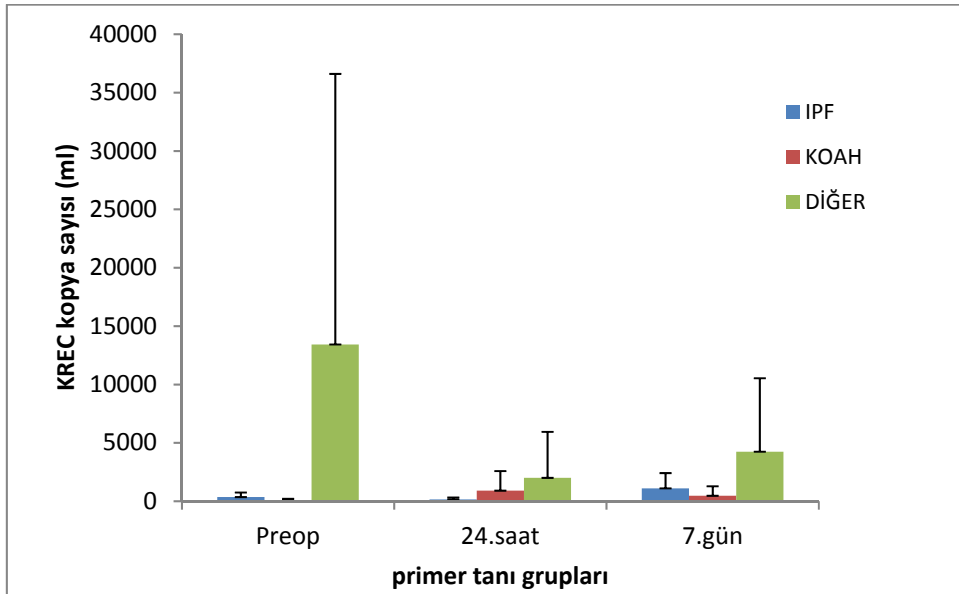
*p<0.05

Hasta grubumuz akciğer transplantı olmuş farklı primer tanısı almış olgulardan meydana gelmektedir. Olgular IPF, KOAH ve diğer olacak şekilde 3 grupta toplanmıştır. Şekil 4.3’de primer tanıya göre KREC düzeyi ve KREC kopya sayıları arasında ilişki olup olmadığı grafik ile gösterilmiştir. Buna göre, tanı grupları arasında transplant öncesinde, transplant sonrası 24. saat ve 7.günde KREC düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0.05). IPF primer tanısı almış olgularda KREC düzeylerinde üç zaman diliminde anlamlı bir değişim bulunmamaktadır (p>0.05). KOAH tanısı almış olgu grubunda her üç zaman dilimi arasında KREC düzeyleri ortalamalarında anlamlı bir değişim bulunmamaktadır (p>0.05). Diğer primer tanılara sahip olguların yer aldığı grupta da her üç zaman dilimi arasında KREC düzeyleri ortalamalarında anlamlı bir değişim bulunmamaktadır (p>0.05).



Şekil 4.3. Primer tanı gruplarına göre üç zaman dilimindeki KREC düzeylerinin grafiği

Şekil 4.4’de primer tanıya göre olguların üç zaman dilimine ait KREC kopya sayısı ortalamalarının değerlendirilmesi grafik ile belirtilmektedir. Buna göre, olguların aldıkları primer tanı grupları arasında transplant öncesi, transplant sonrası 24. saat ve 7. gün KREC kopya sayısı ortalamaları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Üç zaman dilimine ait sonuçlar kendi aralarında değerlendirildiğinde hastalık grupları arasında KREC kopya sayısı ortalamaları açısından anlamlı bir değişim bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4.4.Primer tanı gruplarına göre üç zaman dilimindeki KREC kopya sayısı grafiği

Akciğer transplantı olan hastalarda primer hastalıkların seyrinde klinik takip için kullanılan ve transplant listesine alınma kriterleri arasında yer alan FEV1 yüzde değeri çalışma grubumuzda değerlendirmeye alındı. FEV1 yüzde değerleri 50 altı ve 50 üstü şeklinde iki grupta toplandı. Tablo 4.11’de FEV1 limitine göre olguların üç zaman dilimindeki KREC düzeyleri ortalamaları ve zaman dilimleri arasındaki karşılaştırmaları görülmektedir. Buna göre FEV1 yüzde değeri 50’nin altında ve üstünde olan olgular arasında üç zaman diliminde KREC düzeyleri ortalamaları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). FEV1 değeri 50’nin altında olan olgularda üç zaman diliminin kendi arasında karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir değişim bulunmamaktadır ($p>0.05$). FEV1 değeri 50’nin üstünde olan olgularda da üç zaman diliminin kendi aralarındaki karşılaştırılmasında anlamlı bir değişim bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4.11. Hasta grubunda FEV1 değerleri ile üç zaman dilimine ait KREC düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi

KREC düzeyi	<u>FEV1 Limiti (%)</u>		¹ p
	<50 Ort±SS (medyan)	>50 Ort±SS (medyan)	
Pre-op	31860,28±200202,52 (46736,4)	226966,46±218246,49 (226966,5)	0,505
24.saat	349739,81±599456,96 (59343,4)	20304,4 ± 1938,15 (20304,4)	0,505
7.gün	7988309,62±18267001,66 (111031,2)	30550,32±37988,06 (30550,3)	0,317
Pre-op-24.saat ² p	0,345	0,180	
Pre-op-7.gün ² p	0,249	0,180	
24.saat-7.gün ² p	0,249	0,655	

¹Mann Whitney U test ²Wilcoxon Sign test * $p<0.05$

Tablo 4.12’de hasta olgularda FEV1 limiti ile KREC kopya sayısı ortalamalarının ve üç zaman diliminin kendi arasındaki karşılaştırılması görülmektedir. Bu sonuçlara göre, FEV1 limiti 50’nin altında ve üstünde olan

olgularda her üç zaman diliminde KREC kopya sayısı ortalamaları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). FEV1 değeri 50'nin altında olan olgularda KREC kopya sayısı ortalamaları üç zaman diliminde karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik bulunmamaktadır ($p>0.05$). FEV1 değeri 50'nin üstünde olan olgularda da KREC kopya sayısı ortalamaları üç zaman diliminde karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4.12. Hasta grubunda FEV1 değerleri ile üç zaman dilimine ait KREC kopya sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi

KREC kopya sayıları	<u>FEV1 Limiti (%)</u>		¹ p
	<50 Ort±SS (medyan)	>50 Ort±SS (medyan)	
Pre-op	371,09±594,94 (148,6)	491,36±437,49 (491,4)	0,505
24.saat	344,32±660,29 (89,9)	20,32±23,38 (20,3)	0,182
7.gün	2716,82±5401,36 (111,9)	20094,74±28416,16 (200094,7)	1,000
Pre-op-24.saat	² p 0,917	0,180	
Pre-op-7.gün	² p 0,463	0,655	
24.saat-7.gün	² p 0,249	0,655	

¹Mann Whitney U test ²Wilcoxon Sign test * $p<0.05$

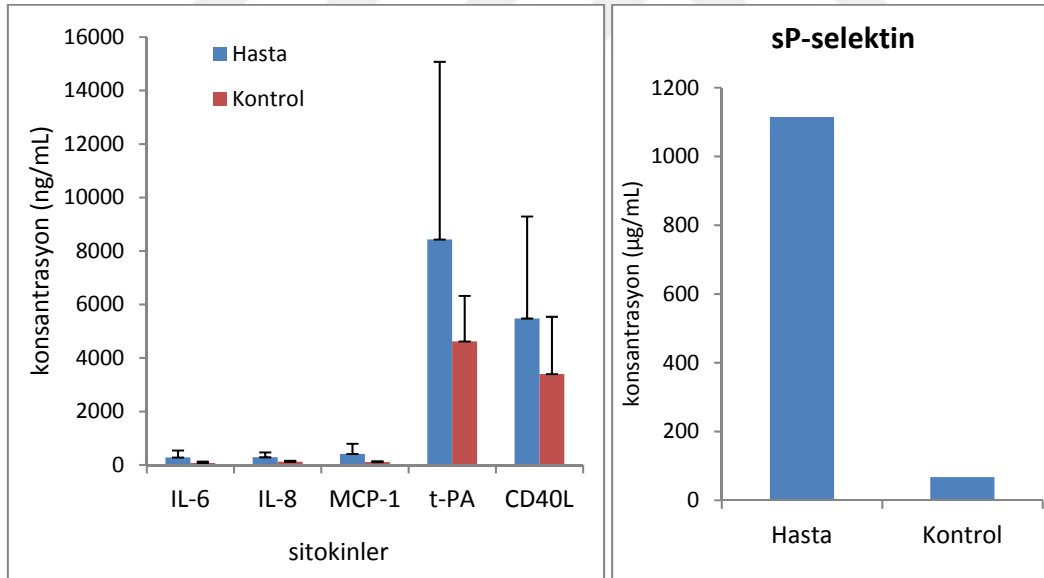
Hasta grubunda yer alan üç zamanlı plazma örnekleri ile kontrol grubunda tek zamanlı alınmış plazma örneklerinden sitokin analiz sonucunda; kontrol grubu sonuçları, hasta grubu transplant öncesine ait sonuçlar ile değerlendirmeye alınmıştır. Tablo 4.13'de hasta grubu preop ve kontrol grubu arasında sitokin parametrelerin istatistiksel değerlendirilmesi görülmektedir. Buna göre hasta grubunda IL-6 ortalaması kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0.027$). IL-8 ortalaması hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0.011$). Yine hasta grubunda MCP-1 ortalaması ($p=0.006$) ve sP-selektin ortalaması ($p=0.018$) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Diğer sitokin düzeylerinde her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.5).

Tablo 4.13.Hasta ve kontrol gruplar arasında sitokin parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Sitokinler	HASTA	KONTROL	p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
IL-6	278,69±262,44 (135,4)	73,48±54,46 (89,4)	0,027*
IL-8	287,36±182 (179,3)	118,99±36,75 (115,6)	0,011*
MCP-1	409,74±383,2 (384,7)	105,62±30,83 (100,4)	0,006*
t-PA	8429,39±6643,53 (5917,5)	4618,16±1703,96 (4081,5)	0,094
CD40L	5476,4±3813,38 (5352,5)	3396,68±2143,76 (3034,5)	0,191
sP-selektin	1114,77±3097,25 (87,5)	67,41±12,81 (68,7)	0,018*

Mann Whitney U test

* $p < 0.05$



Şekil 4.5.Sitokin ortalamalarının hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırma grafiği

Hasta grubunda sitokin parametreleri transplant öncesi kan örnekleri dışında 24. saat ve 7. gün örneklerinden de analiz edildiğinden elde edilen sonuçlar bu zaman dilimlerine ait KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı ortalamaları ile birlikte değerlendirilmiştir. Tablo 4.14’de hasta grubunda preop KREC düzeyi ve KREC

kopya sayısının sitokin parametreleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi görülmektedir. Buna göre hasta grubunda transplant öncesindeki sitokin parametreleri ile KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4.14. Hasta grubunda preop zaman diliminde KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı ile sitokin parametreleri arasındaki korelasyonun istatistiksel değerlendirilmesi

Pre-op	Pre-op	KREC düzeyi (10^6 hücre başına)	KREC kopya sayısı (1ml kanda)
IL- 6	r	0,033	0,267
	p	0,932	0,488
IL-8	r	0,600	0,183
	p	0,088	0,637
MCP-1	r	0,083	0,500
	p	0,831	0,170
tPA	r	0,117	0,467
	p	0,765	0,205
CD40L	r	-0,383	-0,017
	p	0,308	0,966
sP-selektin	r	-0,183	0,033
	p	0,637	0,932

Spearman's Rho korelasyon analizi $p>0.05$

Tablo 4.15'de hasta grubunda 24. saatteki KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı ile sitokin parametreleri arasındaki ilişki değerlendirilmektedir. Buna göre 24. saatteki KREC düzeyi ile CD40L arasında pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon vardır ($p=0.030$). 24. saatteki diğer sitokin parametreleri ile KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.15. Hasta grubunda 24. saatte KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı ile sitokin parametreleri arasındaki korelasyonun istatistiksel değerlendirilmesi

24.saat	24.saat	KREC düzeyi (10 ⁶ hücre başına)	KREC kopya sayısı (1ml kanda)
IL- 6	r	-0,100	-0,117
	p	0,798	0,765
IL-8	r	0,183	0,017
	p	0,637	0,966
MCP-1	r	0	-0,200
	p	1,000	0,606
tPA	r	0,200	0,167
	p	0,606	0,668
CD40L	r	0,717	0,567
	p	0,030*	0,112
sP-selektin	r	-0,150	-0,283
	p	0,700	0,460

Spearman's Rho korelasyon analizi * $p < 0.05$

Tablo 4.16'da hasta grubunda 7.gündeki KREC düzeyi ve KREC kopya sayısı ile sitokin parametreleri arasındaki korelasyon analizi görülmektedir. Bu sonuçlara göre 7. gündeki KREC düzeyleri ve KREC kopya sayıları ile sitokin parametreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Tablo 4.16. Hasta grubunda 7.günde KREC düzey ve KREC kopya sayısı ile sitokin parametreleri arasındaki korelasyonun istatistiksel değerlendirilmesi

7.gün 7.gün		KREC düzeyi (10 ⁶ hücre başına)	KREC kopya sayısı (1ml kanda)
IL- 6	r	0,100	0,383
	p	0,798	0,308
IL-8	r	0,483	0,533
	p	0,187	0,139
MCP-1	r	0	0,333
	p	1,000	0,381
tPA	r	-0,117	-0,217
	p	0,765	0,576
CD40L	r	0,233	0,050
	p	0,546	0,898
sP-selektin	r	-0,033	-0,050
	p	0,932	0,898

Spearman's Rho korelasyon analizi $p>0.05$

Sitokin analizlerinin sonucunda özet olarak; sadece CD40L 24. saat değerleri ile KREC düzeyi 24. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye ulaşılmıştır.

Sitokinlerin her biri, üç zaman dilimi arasında gösterdikleri değişimler istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Tablo 4.17'de IL-8 ve MCP-1 ortalamalarının üç zaman dilimindeki değerlendirilmesi görülmektedir. Buna göre, IL-8 transplant öncesi ortalama değerine göre 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş ($p:0.049$), 24. saate göre 7. gün IL-8 ortalamalarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir ($p:0.021$). MCP-1 ortalamasında ise 24. saate göre 7. gün ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir ($p:0.008$). MCP-1 ortalamalarında transplant öncesi ve 7. gün arasında anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$)

Tablo 4.17. Hasta grubunda IL-8 ve MCP-1 ortalamalarının üç zaman dilimine göre istatistiksel değerlendirilmesi

	IL-8	MCP-1
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)
Pre-op	287,36±182(179,3)	409,74±383,2 (384,7)
24.saat	36,01±93,83 (121,6)	314,64±224,28 (194,1)
7.gün	242,1±157,3 (156,3)	457,1±284,09 (468)
Pre-op-24.saat	0,049*	0,214
Pre-op-7.gün	0,441	0,515
24.saat-7.gün	0,021*	0,008*

Wilcoxon Sign test * $p<0.05$

Tablo 4.18’de CD40L ve sP-selektin ortalamalarının üç zaman dilimindeki sonuçları gösterilmektedir. Buna göre, hasta grubunda CD40L parametresi 24. saate göre 7. gün ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir ($p:0.008$), diğer zaman dilimlerinde anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$). sP-selektin ortalamalarında 24. saate göre 7. gün sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir ($p:0.021$). Diğer zaman dilimlerinde anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$).

Tablo 4.18. Hasta grubunda CD40L ve sP-selektin ortalamalarının üç zaman dilimine göre istatistiksel değerlendirilmesi

	CD40L	sP-selektin
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)
Pre-op	5476,4 ± 3813,38 (5352,5)	1114,77±3097,25 (87,5)
24.saat	3441,95±2563,22 (2248,3)	67,83±10,52 (64,3)
7.gün	7059,87±3086,43 (7406,6)	83,87±13,06 (82,1)
Pre-op-24.saat	0,173	0,066
Pre-op-7.gün	0,260	0,594
24.saat-7.gün	0,008*	0,021*

Wilcoxon Sign test * $p<0.05$

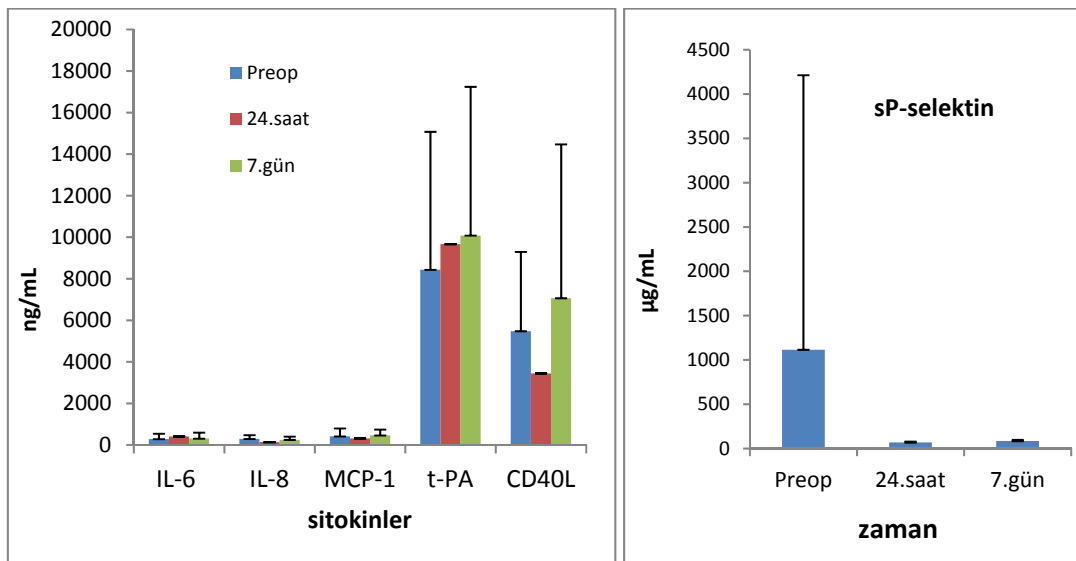
Tablo 4.19’da IL-6 ve t-PA sitokinlerinin üç zaman dilimindeki sonuçları gösterilmektedir. Buna göre IL-6 sitokin üç zaman dilimindeki ortalamalarında zamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$). t-PA sitokininin üç zaman dilimindeki ortalamalarında zamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemektedir ($p>0.05$).

Sitokinlerin üç zaman diliminde gösterdikleri değişim Şekil 4.6’da görülmektedir.

Tablo 4.19. Hasta grubunda IL-6 ve t-PA ortalamalarının üç zaman dilimine göre istatistiksel değerlendirilmesi

	IL-6		t-PA	
		Ort±SS (medyan)		Ort±SS (medyan)
Pre-op		278,69±262,44 (135,4)		8429,39±6643,53 (5917,5)
24.saat		406,2 ± 402,14 (189,6)		9662,78±6808,88 (6782,9)
7.gün		302,34±291,85 (147,8)		10075,95±7160,44 (6970,1)
Pre-op-24.saat	p	0,441		0,767
Pre-op-7.gün	p	0,767		0,594
24.saat-7.gün	p	0,953		0,515

Wilcoxon Sign test $p<0.05$



Şekil 4.6. Sitokinlerin zamanlara göre değişim grafiği

Tablo 4.20. Hasta grubu ve farklı dilüsyonlardaki standart DNA'ların KREC gen bölgesine yönelik GZ-PZR rapor örneği

Results Table

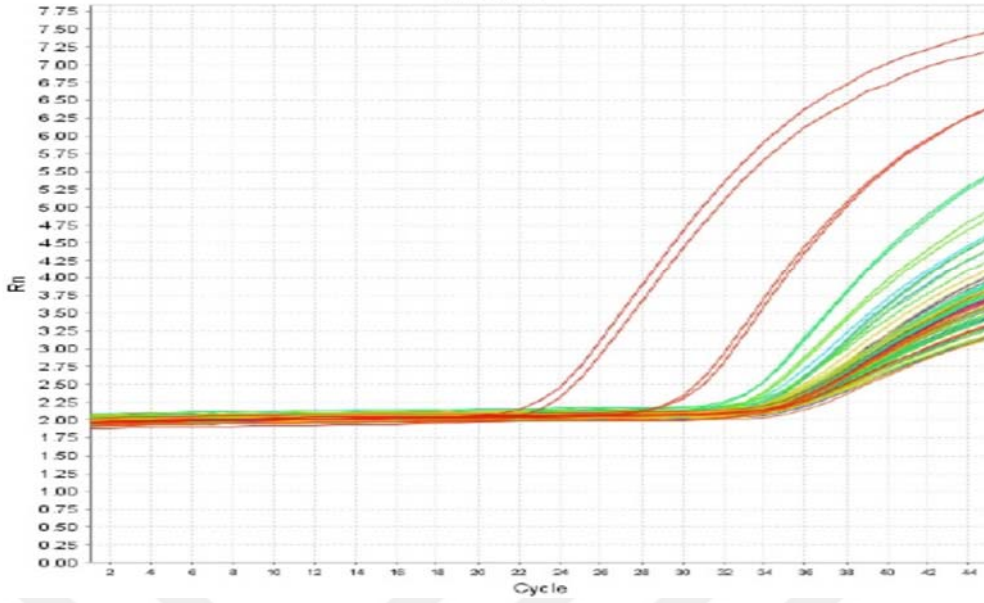
Well	Sample	Target	Task	Quantity	Ct
A1		KREC	NTC		35.6689
A2		KREC	NTC		35.0701
A3		KREC	STANDARD	10000000	22.3637
A4		KREC	STANDARD	10000000	22.6281
A5		KREC	STANDARD	100000	29.3628
A6		KREC	STANDARD	100000	28.9448
A7		KREC	STANDARD	1000	34.9549
A8		KREC	STANDARD	1000	34.948
A9		KREC	STANDARD	10	34.9036
A10		KREC	STANDARD	10	35.2624
A11	H9-1	KREC	UNKNOWN	23.804	36.1346
A12	H9-1	KREC	UNKNOWN	38.1708	35.6879
B1	H9-2	KREC	UNKNOWN	56.2779	35.3207
B2	H9-2	KREC	UNKNOWN	71.4236	35.0953
B3	H9-3	KREC	UNKNOWN	28.0024	35.981
B4	H9-3	KREC	UNKNOWN	79.1591	34.9981
B5	H10-1	KREC	UNKNOWN	95.3182	34.8224
B6	H10-1	KREC	UNKNOWN	175.7226	34.2438
B7	H10-2	KREC	UNKNOWN	123.2279	34.5794
B8	H10-2	KREC	UNKNOWN	97.7277	34.7987
B9	H10-3	KREC	UNKNOWN	38.0545	35.6908
B10	H10-3	KREC	UNKNOWN	179.8519	34.2218
B11	H11-1	KREC	UNKNOWN	41.2334	35.6149
B12	H11-1	KREC	UNKNOWN	34.328	35.7883
C1	H11-2	KREC	UNKNOWN	44.1378	35.5506
C2	H11-2	KREC	UNKNOWN	28.6731	35.9586
C3	H11-3	KREC	UNKNOWN	42.8249	35.5791
C4	H11-3	KREC	UNKNOWN	50.3326	35.4263
C5	H12-1	KREC	UNKNOWN	674.7385	32.9712
C6	H12-1	KREC	UNKNOWN	688.8719	32.9516

Results Summary

Sample	Target	Quantity (Mean)	Quantity (Std Dev)	Ct (Mean)	Ct (Std Dev)
H10-1	KREC	135.52	56.85	34.53	0.41
H10-2	KREC	110.48	18.03	34.69	0.16
H10-3	KREC	108.95	100.27	34.96	1.04
H11-1	KREC	37.78	4.88	35.70	0.12
H11-2	KREC	36.41	10.94	35.75	0.29
H11-3	KREC	46.58	5.31	35.50	0.11
H12-1	KREC	681.81	9.99	32.96	0.01
H12-2	KREC	204.43	57.41	34.12	0.27
H12-3	KREC	177.62	98.77	34.31	0.56
H13-1	KREC	53.78	24.29	35.41	0.44
H13-2	KREC	85.24	7.64	34.93	0.08
H13-3	KREC	1176.43	203.68	32.45	0.16
H15-1	KREC	44.59	5.67	35.54	0.12
H15-2	KREC	43.87	23.14	35.63	0.52
H15-3	KREC	65.98	23.50	35.20	0.34
H16-1	KREC	83.06	4.69	34.95	0.05
H16-2	KREC	238.16	179.25	34.11	0.79
H16-3	KREC	106.55	43.94	34.76	0.40
H17-1	KREC	32.74	8.54	35.85	0.25
H17-2	KREC	70.02	12.89	35.12	0.18
H17-3	KREC	41.22	18.28	35.66	0.43
H19-1	KREC	275.71	41.57	33.82	0.14
H19-2	KREC	49.10	21.03	35.50	0.42
H19-3	KREC	33.31	0.68	35.82	0.02

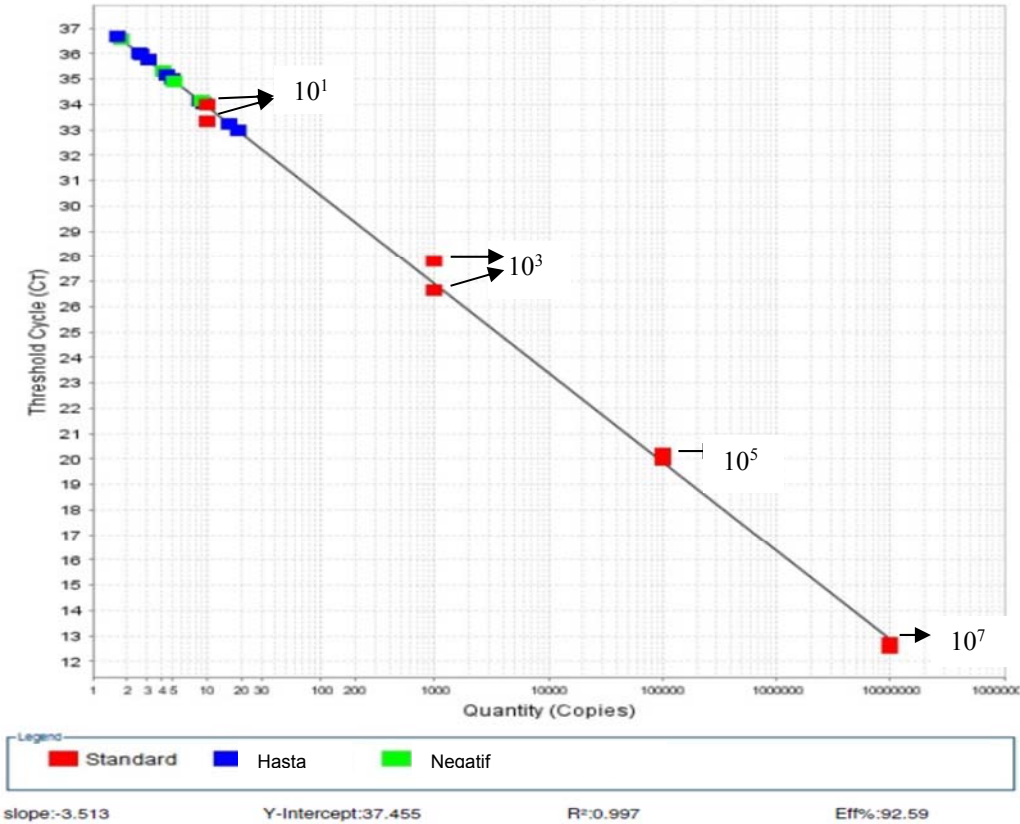
Şekil 4.7. KREC düzeyi hesaplanmasında kullanılan Quantity Mean değerlerinin yer aldığı GZ-PZR rapor örneği

Amplification Plot (Rn vs. Cycle)
KREC



Şekil 4.8. KREC gen bölgesine yönelik hazırlanmış standart DNA amplikasyonunu gösteren grafik örneği

Standard Curve (Target: KREC)



Şekil 4.9. KREC gen bölgesine yönelik hazırlanmış standart kör eğrisi grafik örneği

Tablo 4.21. Hasta grubu ve farklı dilüsyonlardaki standart DNA'ların TCRAC gen bölgesine yönelik GZ-PZR rapor örneği

Results Table

Well	Sample	Target	Task	Quantity	Cr
A1		TCRAC	NTC		38.6385
A2		TCRAC	NTC		37.6912
A3		TCRAC	STANDARD	10000000	17.6151
A4		TCRAC	STANDARD	10000000	17.7411
A5		TCRAC	STANDARD	100000	24.5914
A6		TCRAC	STANDARD	100000	25.0133
A7		TCRAC	STANDARD	1000	32.999
A8		TCRAC	STANDARD	1000	32.9573
A9		TCRAC	STANDARD	10	38.9789
A10		TCRAC	STANDARD	10	39.2525
A11	TCRAC H20-1	TCRAC	UNKNOWN	1118.5944	32.0916
A12	TCRAC H20-1	TCRAC	UNKNOWN	179.2261	34.974
B1	TCRAC H20-2	TCRAC	UNKNOWN	195.6206	34.8362
B2	TCRAC H20-2	TCRAC	UNKNOWN	254.6144	34.4213
B3	TCRAC H20-3	TCRAC	UNKNOWN	148.6979	35.2679
B4	TCRAC H20-3	TCRAC	UNKNOWN	55.7721	36.8115
B5	TCRAC H22-1	TCRAC	UNKNOWN	68495.0547	25.6151
B6	TCRAC H22-1	TCRAC	UNKNOWN	104622.3906	24.9481
B7	TCRAC H22-2	TCRAC	UNKNOWN	3192.062	30.441
B8	TCRAC H22-2	TCRAC	UNKNOWN	2042.0746	31.1442
B9	TCRAC H22-3	TCRAC	UNKNOWN	24061.1543	27.2616
B10	TCRAC H22-3	TCRAC	UNKNOWN	27045.8965	27.0775

Experiment Results Report

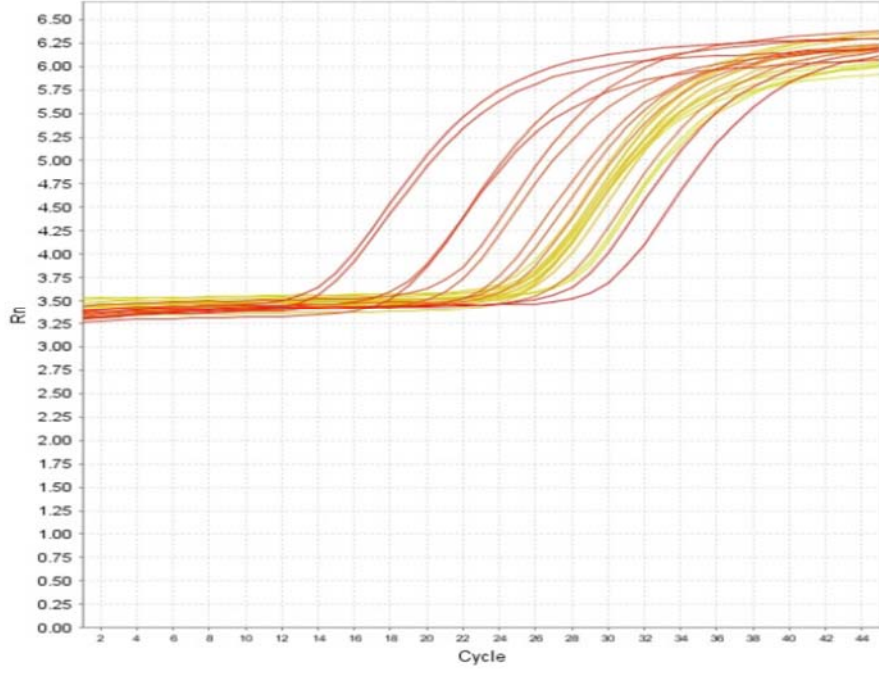
Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

Results Summary

Sample	Target	Quantity (Mean)	Quantity (Std Dev)	Cr (Mean)	Cr (Std Dev)
TCRAC H20-1	TCRAC	648.91	664.23	33.53	2.04
TCRAC H20-2	TCRAC	225.12	41.71	34.63	0.29
TCRAC H20-3	TCRAC	102.24	65.71	36.04	1.09
TCRAC H22-1	TCRAC	86553.72	25552.96	25.28	0.47
TCRAC H22-2	TCRAC	2617.07	813.16	30.79	0.50
TCRAC H22-3	TCRAC	25553.53	2110.53	27.17	0.13

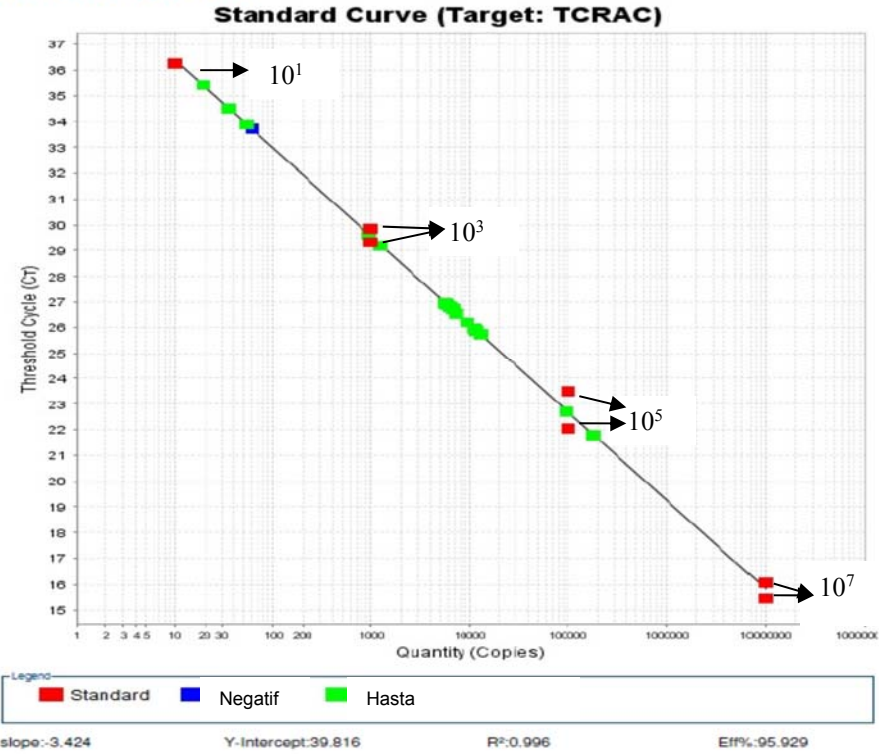
Şekil 4.10. TCRAC düzeyi hesaplanmasında kullanılan Quantity Mean değerlerini gösteren GZ-PZR rapor örneği

Amplification Plot (Rn vs. Cycle)
TRAC

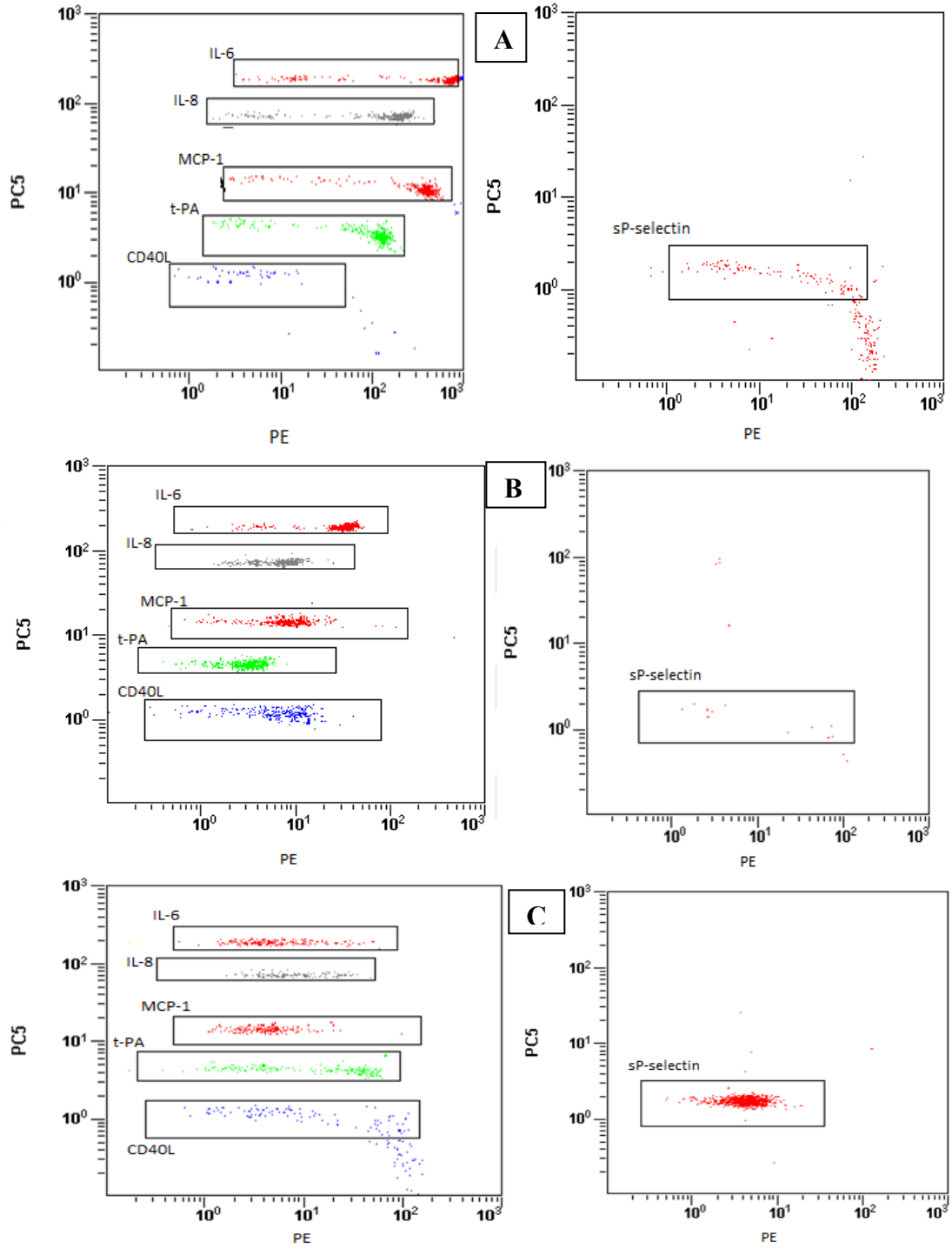


Şekil 4.11. TCRAC gen bölgesine yönelik hazırlanmış standart DNA amplikasyonunu gösteren grafik örneği

Standard Curves



Şekil 4.12. TCRAC gen bölgesine yönelik hazırlanmış standart kör eğrisi grafik örneği



Şekil 4.13. Akan hücre ölçer yöntem ile analiz edilmiş sitokine ait **a.** pozitif kontrol sonucu **b.** Negatif kontrol sonucu **c.** Hasta sonuç örneği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer transplantı, kronik akciğer hastalığı olan ve hastalığın en son aşamasına gelmiş hastalar için uygulanan bir tedavi yöntemidir. Ülkemizde 2009 ile 2014 yılları arasında, 4'ü İstanbul 2'si Ankara'da bulunan transplant merkezlerinde toplam 105 akciğer transplantı gerçekleştirilmiştir (47). Akciğer hastalıkları arasında en çok görülen ve transplant gerekliliği gösteren hastalıkların başında Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAHA) gelmektedir. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (IPF), Kistik Fibrozis, Bronşiektazi, Silikozis akciğer transplantı gerektiren diğer primer hastalıklar arasında yer almaktadır (48).

Transplantasyon başarısında en önemli engel organın alıcı tarafından red edilmesidir. Transplant kliniğinde immünolojik red ise en önemli sorunlardan biridir (1). Hümorale immünitede üretilen antikorlar grafitin reddine neden olmaktadır. B lenfosit yanıtı ile üretilen antikorlar, transplantasyonun immüniteyi tetiklediğinin açık bir kanıtıdır. Transplantasyona cevapta üretilen allospesifik antikorlar, B lenfositler tarafından üretilmekte ve bu antikorlar alloimmünite ve doku uygunluğu içinde en iyi gösterge olmaktadır. Antikorların transplanttaki etkisi, organı besleyen kan damarların kökenlerine büyük ölçüde bağlıdır. Organ transplantında vericiye ait kan damarları, vericiye özgü meydana gelen antikorlar tarafından direkt hedef alınır (65). B lenfositlerin antijen reseptörleri oluşturması ve hücrenin olgun B hücre olabilmesi için gerekli gen düzenlemeleri sonucunda oluşan KREC gen segmenti analizi günümüzde B hücre kinetiğinin izlenebilmesi açısından önem kazanmaktadır. Yeni üretilen B lenfositlerin ölçülmesinde KREC bir belirteç olarak kullanılmaktadır. KREC'ler farklılaşmış B hücre atalarının Ig hafif zincir rekombinasyonlarının %50'sini oluşturmakta ve sonraki B hücre proliferasyonunda kendilerini eşlememektedirler (33). İmmün yetmezliğin bir tipi olan adenosine deaminase eksikliği olan çocuk hastalarda (38) ve HIV pozitif olup anti retroviral tedavi gören yetişkenlerde immün cevabın gelişiminde KREC düzeyi belirleyici olmaktadır (39). Tedavi öncesi ve sonrasında tespit edilen KREC miktarı immün sistemin yerleşmesinde göstergedir (39). Bazı Avrupa ülkelerinde yeni doğan tarama testi olarak pilot çalışmalarda KREC sayısının belirlenmesi (36,37), immün yetmezliği bulunan yeni doğanlarda lenfopeniyi belirleyerek hastalıkların karakterize edilmesinde kullanılmaktadır (37).

Bizim çalışmamızda akciğer transplantasyonu yapılmış, transplant sonrası immün sistem takibinin önemli olduğu hastalarda, erken immün cevapta B hücre kinetiği, KREC düzeyi ile incelenmiştir. Daha önce akciğer transplantasyonu ile B hücre kinetiğinin takibi için, KREC analizi yapılmış bir çalışmaya araştırmalarımızda rastlanılmamış olması çalışmamızdan elde edilen verilerin önemini arttıracığını düşündürmektedir.

Daha çok immün yetmezlik hastalarının takibinde başvuru KREC analizi ile ilgili çalışmaların çoğunda hastaların uzun süreli takiplerinin yapıldığı görülmüştür. Farklı tipte immün yetmezlik hastalığı bulunan ve hematopoietik kök hücre (HSC) transplantı olan 10 çocuk hasta ile yapılan bir çalışmada, hastalar 12-79 ay arasında takip edilmiştir. KREC düzeyi gerçek zamanlı PZR ile analiz edilen çalışmada immün yetmezlik hastalık tipleri ile KREC düzeyleri arasında farklılıklar bulunmuştur. Transplant sonrası immün yetmezliğin çoğu tipinde bir kaç ay sonra T ve B hücre tespit edilirken, primer immünyetmezlik (PD) grubunda yer alan hastalarda immün hücreler 75 ay sonra gösterilmiştir (33). HSC transplantı gerçekleştirilmiş 15 yetişkin hasta ile yapılan bir başka çalışmada ise hastalar, transplant sonrası 15-180. günlerine kadar takip edilmiş, kan örneklerinde KREC analizi yapılmıştır. Bu hastalarda B hücre alt tip paneli eş zamanlı olarak akan hücre ölçer ile çalışılmış, transplant öncesi mililitre kandaki KREC kopya sayısı, sağlıklı kontrole göre çok düşük bulunmuş, transplant sonrası 60. günde artmaya başlamış ve 180. günde nakil öncesinin 5 katına kadar çıkmıştır (34). Bu iki çalışmada da TCRAC kontrol gen olarak değerlendirilmiş ve plasmid DNA tekniği kullanılarak standart gen örnekleri hazırlanmıştır (33, 34). Bizim çalışmamızda KREC analizi transplant öncesinde, transplant sonrası 24. saat ve 7. günde kan örnekleri ile çalışılmıştır. Sonuçlar bu zaman dilimleri arasında karşılaştırılmış ve KREC düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemesine rağmen (Tablo 4.3) ortalama değerlerde sayısal bir farklılık bulunmuştur (Şekil 4.1). KREC düzeyinde (10^6 hücre başına) transplant öncesindeki değere göre, transplant sonrası 24. saat ve 7. günde artış bulunmuştur. Mililitre kandaki KREC düzeyinde transplant öncesi ve 24. saatler arasında bir fark görülmemiş ancak 7. gün sonuçlarında artış belirlenmiştir. Transplant hastalarına uygulanan immün sistemi baskılayıcı tedavilerin B hücre üretimi üzerinde etkisi olduğu (83) göz önünde bulundurulduğunda transplant hastalarında erken immün cevabın

gösterilmesinde KREC analizinin daha uzun süreli takiplerle yapılması gerektiği düşünülmektedir.

RAG-2 eksikliğine bağlı ağır kombin immün yetmezliği olan çocuk hastalar, doku uygunluğu bulunmayan verici kök hücre transplantasyonuna tabi tutulmuş ve sonrasında erken B hücre kinetiği takibinde KREC analizi yapılmıştır (35). Bu çalışmada hastalar transplant sonrası 6 ay takip edilmiş ve tespit edilebilir B hücrelerin çoğunun sinyal parçası taşıdığı, bunun da B hücre neogenezini destekler yönde olduğu belirtilmiştir (35). Böylece transplant sonrasında uzun süren intravenöz Ig tedavilerin daha kısa sürelerle çekilebilmesi ve kişiye özgü koruyucu tedavilerin gelişimi mümkün olabilmektedir (35). Akciğer transplantasyonu gerçekleştikten sonra hastalara yoğun immün sistemi baskılayıcı rejimler ve uzun süreli immunoglobulin replasman tedaviler uygulandığından, KREC düzeyi analizinin bu hastalar için oldukça önemli bir gelişme olabileceği düşünülmektedir.

B lenfositlerin antijen bağımsız ilk gelişme gösterdikleri yer kemik iliğidir. Yaşla beraber pro-B hücrelerin pre-B'ye geçişinde azalma olmakta ve bu durum immunoglobulin ağır zincirinde V-DJ gen rekombinasyonundaki azalma ile ilişkilendirilmektedir. B hücre gelişiminde yer alan gen yeniden düzenlenme mekanizmasında rolü bulunan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon ve ekspresyonlarında azalma görülmektedir. Bu durum farelerle yapılan çalışmalarda öncül Ig hafif zincir ekspresyonundaki azalmayı açıklamaktadır. Yaşla birlikte yağ dokusunun genişlemesine ilaveten kemik iliği stromal hücre fonksiyonları ve onarımında büyüme hormonlarının etkisinin olması, hormon konsantrasyonundaki azalma stromal hücrelerin adipositlere dönüşümüne neden olabilmektedir (84). İmmün sistem daha yaşlı kişilerde daha az etkindir. Enfeksiyon ve aşılarmaya karşı cevabın yaşlılarda azaldığı bilinmektedir. Farklı B tip hücrelerin yaşla değiştiği gösterilmekte, IgM hafıza hücreleri olan CD27⁺IgD⁺ hücreler yaşlılarda azalmaktadır (85). İmmün yetmezliği bulunan 37 yetişkin hasta ve 78 yetişkin sağlıklı grup ile yapılmış bir çalışmada, KREC düzeyi (kopya sayısı/10⁶) ile monosit ve lenfosit değerlerinin dahil olduğu KREC kopya sayısı (ml) gerçek zamanlı PZR yöntemle analiz edilmiş, KREC median değerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu, cinsiyete ve yaşa göre değişmediği belirtilmiştir. Ancak kontrol grubunda cinsiyete göre bir farklılık olmamakla beraber, KREC seviyesinin yaş arttıkça sabit olduğu belirtilmiştir (86). Yaşlı bireylerde humoral immün cevap daha kısadır ve Ig üretimi düşük titrede

ve düşük afinite göstermeleri nedeniyle daha az üretkendir. Ancak Ig izotip sınıf dönüşüm yetenekleri vardır. IgM salgılama yaşlılarda artmış ve gen yeniden düzenleme mekanizmasına katılan Ig zincir V bölge genleri gençlerden farklılık göstermektedir (84). Bizim çalışmamızda da cinsiyetlere göre bir fark bulunmayışı bu çalışma ile benzer yöndedir (Tablo 4.9. ve Tablo 4.10.). Hasta grubumuzda 45 yaş altı kişilerin 7. gündeki KREC düzeyleri (10^6) ve kopya sayısı (ml) ortalamalarının 45 yaş üstü kişilere göre yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Yaşla birlikte B hücreleri etkileyen kostimulatör moleküllerin azalması, B hücre reseptörlerine gelen sinyallerde defektler ve germinal merkez yapılanması için gerekli yardımcı T hücrelerin fonksiyonlarındaki azalma, B hücrelerin yüksek afiniteli antikör cevapta azalma göstermesine neden olmaktadır. (84). Bu durum kemik iliğinde yaşla beraber immature B hücre bölünmesinde ve perifere geçişte bir düşüş olmamasına rağmen pre-B hücre sayısında azalma görülmesi ile açıklanabilir.

Akan hücre ölçerle B hücre alt tip analizi ile eş zamanlı KREC düzeylerinin de analiz edildiği bir çalışmada, $CD19^+IgD^+CD27^-CD38^{high}$ olan hücreler geçiş B hücreleri, $IgD^+CD27^-CD38^{int}$ olanlar naïve B, $CD27^+$ olanlar da bellek B hücreler olarak sınıflandırılan bir çalışmada, 15 yetişkin hematolojik hastalığı bulunan kişiler, HSC transplant sonrasında 15, 30, 60, 90 ve 180. günlerde kan örnekleri alınarak B lenfosit alt tipleri ile KREC düzeyleri karşılaştırılmıştır (34). Hastalarda transplant sonrası genel olarak B hücrelerde artış gösterilirken, bellek B hücreler 30. günde, geçiş B hücreler 60. günde, naïve B hücreler 120. güne kadar nakil öncesi değerlerin altında tespit edilmiştir. Ancak transplant öncesi ml'deki KREC düzeyi sağlıklı kontrole göre çok düşük bulunan bu hastalarda, transplant sonrası KREC düzeyi 60. günde artmaya başlamış ve 180. günde nakil öncesinin 5 katına kadar çıktığı gösterilmiştir. KREC' deki bu yenilenme, hem naïve hem de geçiş B hücrelerin yenilenmesi ile korelasyon gösterirken bellek B'lerde bu korelasyon bulunmamaktadır (34). Bu durum, B hücrelerin bellek hücrelere farklılaşması esnasında birkaç hücre bölünmesi geçirmesi gerektiğinden, KREC havuzundaki bu sayının az olmasının beklenen bir durum olduğu şeklinde açıklanmıştır (34). Farklı tip immün yetmezliği olan çocuk hastalarda akan hücre analiz sonuçları ve moleküler yöntemle elde edilen KREC düzeylerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada, B hücre yüzey belirteci olan ve BHR ile ilişkili koreseptör olarak bilinen CD19 sonuçlarına göre lenfositlerin düşme eğiliminde olduğu, KREC düzeylerine göre ise yeni B hücrelerin üretiminin stabil ve hafif artış

gösterdiği belirtilmektedir (87,33). 2003-2014 yılları arasında immün yetmezlik tanısı almış toplam 246 hasta ve 40 sağlıklı kontrol grubunda yapılan bir başka çalışmada ise, lenfosit alt tipleri KREC düzeyleri ile karşılaştırıldığında, hem naïve B hücre (CD19+CD27⁻) sayısı hem de hafıza hücre (CD19+CD27⁺) sayısı ile pozitif bir korelasyon belirlenmiştir (88).

Bu veriler KREC düzeyinin takip edilmesiyle kemik iliğinden dolaşıma geçen B hücrelerin takibinin yapılabileceği ve KREC sonuçlarının, lenfosit alt tiplerinin sayısından daha faydalı olabileceğini göstermektedir (33,34). Bizim çalışmamızda ayrıca B hücre alt tiplerinin analizi yapılmamıştır. Ancak daha önce yapılmış çalışmalarda ulaşılan sonuçlar KREC düzeyinin B hücre kinetiğinin takibi için yeterli olabileceğini göstermektedir (33,34).

Hümorale ve hücresele immün cevaptaki defektlere bağlı olarak, kemik iliği, lenf nodları, dalak gibi organlarda Ig ağır zincir mutasyonlarının neden olduğu ve B lenfositlerin birikimi ile karakterize edilen kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarda immünitinin sürdürülebilmesi için yeni türetilmiş T ve B lenfositlerin kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır (31). KREC birden fazla bölünme geçirmiş hücrelerde bulunamayacağı için normal ve lösemik popülasyonu ayırımına gidilmeden, hiç tedavi görmemiş erken dönemdeki hasta ve kontrol grubundan oluşturulmuş bir çalışmada 10⁶ PBMC başına düşen KREC sayısının hasta grubunda kontrole göre düşük bulunmasının, lösemik hücrelerin genişlemesiyle, normal B hücrelerdeki azalma ile ilgili olduğu, mililitre kandaki KREC sayısında belirlenen düşüşün de yeni üretilen B hücrelerin kontrole göre gerçek bir düşüş olduğunun kanıtı olarak değerlendirilmiştir. KLL hastalarındaki lenfosit hücrelerindeki artış oranı ile KREC seviyeleri karşılaştırıldığında bir korelasyon bulunmamıştır (31). Bizim çalışmamızda hasta grubunda lenfosit sayısı 24. saatte preopa göre anlamlı düşüş göstermesine rağmen (Tablo 4.2), KREC düzeyleri ile arasında bir korelasyon gösterilmemektedir. Bu sonuçların, sadece akciğer transplantasyonu olan hastaların lenfositlerindeki değişikliğe bağlı olmayıp, bireyler arasında farklılık gösteren KREC düzeyleri (Tablo 4.3 ve Şekil 4.1) ile de bağlantısı olabileceği (31) fikrini güçlendirmektedir.

KOAH patogeneğinde nötrofil hücreleri büyük bir rol oynamakta ve perifer kanda nötrofil seviyesininin pulmoner tutulum ile ilişkili olarak arttığı bilinmektedir. Yine de diğer lökosit grupların periferik kan hücre sayıları ile akciğer hastalıkları, alerji, hava yolu tıkanıklarının belirteçleri arasındaki ilişki tam olarak net değildir (89).

Bu amaçla perifer kandaki lökosit hücrelerin KOAH semptomları, akciğer fonksiyonları üzerine yapılmış bir çalışmada nötrofil sayılarının kronik solunum yolları semptomlarının ortaya çıkışı ve FEV1 değerinin azalması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (89). Bizim çalışmamızda, nötrofil değerlerinde zamanlar arasında artış görülmesi, akciğer hastalıklarda pulmoner tutulum ile ilgili olabileceği gibi akciğer fibroz dokunun bozulmasından dolayı kemokinlerin artışı ile de ilişkili olabilmektedir. Kan parametreleri ile KREC düzeyleri arasında yalnızca 24. saat KREC düzeyi ile lökosit hücreleri ve hemoglobin arasında bir ilişki saptanmıştır. Bu bulgu aktif inflamasyonun olduğunu göstermektedir. Lökosit hücrelerinin en fazla artışının 24. saatte görülmesi ve 24. saat KREC kopya sayısındaki artış ile pozitif yönlü ilişkisi, inflamasyon varlığını açıklamaktadır.

FEV1 pulmoner fonksiyonlardaki azalmayı yansıtan ve bu nedenle akciğer hastalıkların takibinde önemli bir belirteçtir. Akut rejeksiyon tipik olarak FEV1 değerinde düşme ile karakterize edilmektedir. Halsizlik, ateş, öksürük, lökosit artışı, gastrointestinal şikayetler de görülmektedir. Bununla birlikte doku reddi FEV1 değerinde önemli düşüş olmadan da ortaya çıkabilir (90). Transplant yapılmış hastalarda hayatta kalmanın en önemli göstergesi olarak kabul edilen FEV1 değeri %25 üstünde olanlardan ancak %11'inin en az 1 yıl daha ömrünü sürdüreceği tahmin edilmiştir. Bizim çalışmamızda transplant öncesine ait FEV1 değeri %50 altı ve üstü olarak iki gruba ayrılarak değerlendirilmekte ve KREC düzeyleri ile aralarında anlamlı bir korelasyon bulunmamaktadır. Bu durum, hastaların transplant sonrası 7.güne kadar izlenmesi ve B hücre etkinliğinin gösterilmesi için daha uzun süre takiplerinin yapılması ve ayrıca transplant sonrası dönemlerdeki FEV1 değerlerini de kapsayacak ileri çalışmaların gerekli olabileceğini düşündürmektedir.

Proinflamatuvar sitokinlerin artışının primer akciğer redde etkisi olabileceğini araştıran bir çalışmada, IL-6 ve IL-8 seviyelerinin özellikle pulmoner fonksiyonlar ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (91). IL-6 genel olarak inflamatuvar belirteci, IL-8 nötrofil göçünde etkili kemokindir. Uzun süren iskemilerde, buna bağlı olarak reperfüzyon hasarı görülmektedir. Ve bu çalışmada da özellikle IL-6'da görülen artışın primer graft disfonksiyon ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (91). Restriktif allograft disfonksiyon grubuna dahil hastalarda özellikle IL-6'nın mediatör olduğu belirten bir başka çalışma, bu sitokinin transplanttaki önemini göstermektedir (92). Çalışmamızda IL-6 seviyesi hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmasına

rağmen, hasta grubunda zamanlar arasında istatistiksel olarak bir fark göstermemektedir. Ancak IL-6 bu üç zaman diliminde en yüksek seviyeyi 24. saatte göstermiştir. Akciğer transplantasyonu iskemi ve reperfüzyon etkisinin görüldüğü cerrahi bir süreç olduğu için bu durumun da inflamasyonu tetiklemesi beklenilmektedir. Ancak bizim çalışmamızda iskemi reperfüzyon zamanları ve sitokinler arası ilişki bakılmamıştır. Çalışmamızda analiz edilen transplant öncesi hasta IL-8 seviyesi, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermektedir. Bu artış, hasta ve kontrol grubu arasındaki anlamlı farkı göstermesi yanında, transplant öncesi hastaların klinik seyri, inflamasyona bağlı immün sistem aktivasyonu, uygulanan tedaviler gibi bir çok faktöre bağlı olabilir.

Bir kemokin olan MCP-1'in seviyesinin de nötrofilik BOS ve restriktif allograft sendrom olan hasta gruplarında diğer kronik red gösteren hastalara göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. Hastaların bronkoalevolar lavaj sıvı örneklerinden lökosit hücre analizi yapıldığında nötrofil hücrelerindeki artışın dikkat çektiği belirtilmektedir (92). Akut rejeksiyonda antijen bağımlı immün cevap ve sitokinlerin araştırıldığı böbrek transplantasyonu olgularında, MCP-1 seviyesi yüksek bulunmuş ve bunun organ reddi için hassas bir belirteç olabileceği belirtilmiştir (93). Bizim çalışmamızda MCP-1 sonuçlarında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır. Hem IL-8 hem MCP-1 sonuçları hasta grubunda 7.günde anlamlı artış göstermiştir. Bu durum organ transplantına bağlı epitel hücrelerde meydana gelebilecek hasar nedeniyle artan nötrofil hücrelerin hasarlı bölgeye kemokinlerin göçünü arttırması ile açıklanabilir. Bu durum hasta grubunda nötrofil değerlerinde preopa göre 24. saat ve 7. günde artışla uyum göstermektedir.

Kemokinlerle benzer şekilde, adezyon molekülü olan selektinler de enfeksiyon bölgesine lökosit hücrelerin göç etmesinde rol almaktadırlar. Özellikle kan nötrofil hücrelerin hasar bulunan endotele zayıf şekilde bağlanarak yuvarlanmasını sağlayarak enfeksiyon bölgesine hücrenin hareketini kolaylaştırmaktadırlar (1). P-selektin, vasküler yaralanmada, inflamasyonda, lökosit hücrelerin bu bölgede toplanmasını sağlamakta, çözülmüş formu olan sP-selektin de hastalıklarda artış göstermektedir (76). Bu konuda daha önce yapılan çalışmada artmış sP-selektin seviyesinin lökositin endotele yapışmasını tetikleyerek vasküler hastalıkların erken ilerlemesinde etkisi olacağı belirtilmiştir (76). Bizim çalışmamızda, sP-selektin seviyesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunması (p:0.018) diğer kemokinlerle uyum

göstermektedir. Ayrıca transplant sonrası 7. günde görülen artışın (p:0.021) diğer proinflamatuvar sitokin IL-6 ve kemokin IL-8 ile benzerlik göstermesi, akciğer transplantı olan hastalarda sitokin parametrelerin takibinin hastada gelişecek olası inflamasyon ve enfeksiyonlara karşı tedavi planmasında önemli olduğunu göstermektedir.

Akciğer transplantı diğer solid organ transplantlarına göre daha fazla immün cevabın oluşmasına neden olmaktadır (94). Özellikle immün sistem üzerinde tetikleyici etkisi olan CD40-CD40L etkileşimini durdurucu deneysel çalışmalar, organ transplantı sonrası immün sistemin durumunu göstermesi açısından önemlidir. Akciğer transplantı öncesi ve sırasında CD40-CD40L etkileşiminin bloke edilerek akciğer akut reddini iyileştirici etkisini gösteren hayvan deneyli çalışmada, immün sistemi baskılayıcı bir uygulamaya tabii tutulmayan farelerde akciğer transplantından 7 gün sonra akut doku reddi geliştiği gösterilmiş, transplant öncesi uygulanan CD40-CD40L etkileşiminin bloke edildiği grupta doku reddine neden olan CD8⁺ sitotoksik özellikteki T lenfositlerin oranının azaldığı belirlenmiştir (94). T hücre aktivasyonu sonucunda hücrelerin yüzeyinde ifade edilen CD40L mRNA ekspresyonu 1-2 saat sonra pik yapmaktadır. CD40L proteini ise tamamiyle hücre yüzeyinde eksprese edilmesi 4-6 saat arasında görülmektedir (75). Germinal merkezde T bağımlı antijene yanıtta CD40-CD40L etkileşimi, B hücre gelişimi, ağır zincir izotip dönüşümü için gerekmektedir. CD40 ve B hücre reseptör sinyallerinin Ig genetik yapısında meydana gelen DNA kırıklarının tamir mekanizmasında etkisi vardır. Bu bilgiler ışığında CD40L ve CD19 eksikliği bulunan hastaların B hücre moleküler analizinin amaçlandığı bir çalışmada ağır zincir izotip transkriplerin daha az somatik mutasyon taşıdıkları, tüm hafıza B hücrelerin sayısının azaldığı belirtilmektedir (95). Pek çok hastalığın patojenitesinde rol oynadığı bilinmekte olan CD40-CD40L etkileşiminin farmakolojik düzenlemeleri bazı durumlarda umut verici sonuçlar göstermektedir (75). Siklosporin, CD40L gen transkripsiyonunda etkili ikincil mesajcı molekül olan calcineurin sinyal yolağını inhibe eden güçlü bir inhibitördür. Hayvan transplant modeli çalışmalarda CD40L karşıtı monoklonal antikor, immün sistem baskılayıcı tedavilerde kullanılmakta, primatlarda anti-CD40L monoklonal antikorların, allograft transplant reddinde gecikmeye neden olduğu bilinmektedir (75). Akciğer transplantı olmuş 7 hasta ve toraktomi yapılmış 10 hasta ile yapılan bir çalışmada CD40L seviyesinin akciğer transplantı olmuş grupta diğer gruba göre yüksek olduğu ve en fazla

yüksekliğin transplant sonrası 6. saatte görüldüğü belirtilmiştir (96). Ayrıca aynı çalışmada transplant sonrasında yüksek CD40L düzeylerinin transplant sonrasındaki 1. ve 2. günde görülen trombosit sayısındaki azalma ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (96). Bizim çalışmamızda, hasta grubunda transplant sonrası zamanlarda trombosit sayısında düşüş görülmesi bu araştırma ile benzerlik göstermekte, CD40L seviyesinde ise 7. günde artış bulunmaktadır. CD40L ve CD40 arasındaki etkileşim sadece bağışıklık hücresi koaktivasyonuna değil trombosit yığılmasına da katkıda bulunabileceğinden, bu etkileşimin muhtemel akciğer iskemi ve reperfüzyonu için önemli (96) olması, çalışmamızda trombosit ve CD40L arasında ilişki olabileceğini desteklemektedir. Ancak iki parametre arasında istatistiksel bir analiz yapılmamıştır.

Bizim çalışmamızda, hasta grubu CD40L sonucu 7. günde 24. saate göre anlamlı bir yükseklik göstermektedir (p:0.008). Ayrıca transplant sonrası 24. saat KREC düzeyi (10^6 hücre başına) ile CD40L arasında pozitif yönlü, %71.7 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (p:0.030). B hücre kinetiğinin göstergesi olan KREC düzeyi ile pozitif yönlü bir ilişki göstermesi, germinal merkezde CD40 sinyali ile başatılan ağır zincir izotip dönüşümü gerçekleşmiş B hücrelerin varlığını destekler yöndedir.

Akut akciğer hasarında pıhtılaşma kaskadı ile inflamatuvar süreç arasındaki etkileşime dayanarak yapılan bir çalışmada, plasminojen aktivatör (PA) inhibitörünün azaltılması yolu ile artmış fibrinolizin akciğer iskemi reperfüzyon hasarını zayıflattığı gösterilmiştir (97). Akciğer hasarında t-PA potansiyel rolünü araştırmak amaçlı hayvan modellenli bir çalışmada, t-PA inaktive edilmiş fareler kullanılmış, t-PA inhibasyonun akciğer transplantasyonu sonrası iskemi reperfüzyon hasarına karşı terapötik bir hedef olacağına dair bulgulara ulaşılmıştır. t-PA'nın azaltılmasının, akciğer mikrovasküler geçirgenliğini, hava yolu direncini ve pulmoner arter basıncını önemli ölçüde azaltması bu görüşü destekleyen bulgulardır (74). Bizim çalışmamızda hasta grubu ile kontrol grubu t-PA sonuçları karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hastaların ameliyat öncesi zamanına ait olan bu sonucun, kontrol grubu ile fark göstermeyişi (p:0.094), henüz cerrahi bir işlem gerçekleşmediği için pıhtılaşma mekanizması ile ilgili t-PA'da bir değişiklik olmaması ile açıklanabilir. Hasta grubunda üç zaman diliminde t-PA sonuçları karşılaştırıldığında ise zamanlar arasında da anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Bu

durumun organ trasnplantı gibi büyük cerrahi işlemlerde kanamayı azaltıcı tedavi uygulamalarıyla ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Akciğer transplantasyonu sonrasında başarılı sonuçlar immün baskılayıcı tedavilerin ana dayanağı olmaktadır. Uzun süreli hayatta kalımı sağlamak için, enfeksiyon ile doku reddi arasında hassas dengeyi sağlamak ve bu nedenle en uygun immün baskılayıcı tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Transplant alıcıları Epstein-Barr Virus (EBV) enfeksiyonu, transplant sonrası lenfoproliferatif bozukluk gibi riskler taşımaları yanında, deri kanseri gibi kanser türlerine karşı riskleri de artmış durumdadır. Tüm endikasyonlara yönelik immün baskılayıcı tedavilere karşı, bu hastalar fırsatçı enfeksiyonlara yatkınlık göstermektedirler (83). Bizim çalışmamızda hastalarda immün baskılayıcı tedavide kullanılan tacrolimus, antikor üretimini azaltmakta, özellikle T lenfositlerin fonksiyonu ile ilgili IL-2 üzerinde etkisi bulunmaktadır. Bir başka immün baskılayıcı ajan olarak mikofenolat motetil kullanılmıştır. Bu ilacın da T ve B lenfositler üzerinde sitotoksik etkisi oldukça fazladır(83). Ayrıca graft reddini geciktirmede CD40L intibitörü olarak kullanılan siklosporinin (75) transplant sonrası uygulanan tedavi planlamasında yer alması klinik çalışmalarda oldukça etkili olacaktır. Akciğer transplantasyonu hakkında yapılan çalışmalar sınırlı olmakla beraber, bu hastaların farklı hastalık tiplerine sahip olmaları, farklı fenotip hastalara özgü bireysel tedavilerin gerekli olduğunu göstermektedir. Nakledilen organın alloreaktivitesine ilişkin devam eden araştırmalar, yenilikçi terapiler ve yeni ilaçlar, yeni moleküler hedefleri belirleyebilir. Kişiye özel terapilerde sitokin düzeylerin takibi de tedaviye yön vermede oldukça önemlidir (83).

Son yıllarda immün yetmezlik hastalıkları araştırmada ve özellikle hematopoitik kök hücre transplantasyonu sonrası immün sistemin gelişimini gösterebilmek ve izlemek amacıyla başvuru KREC analizi, B hücre kinetiğinde önemli bir araç olmaktadır. Diğer solid organ transplantasyonu olgularına göre sağ kalım oranı düşük olduğu göz önünde alındığında, akciğer transplantasyonu gibi bir alanda immün sistemin takibinin ne denli önemli olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızda hastalara uygulanan tedavi tipleri ile B hücre gelişimini gösteren KREC düzeyleri arasında bir ilişki çalışılmamıştır. Bu nedenle daha geniş bir hasta grubu ile yapılacak kapsamlı analizlerin daha anlamlı olabileceği aşikardır.

Sonuç olarak:

- **Bu çalışmada KREC analizi validasyonu yapılmıştır.**
- Moleküler yöntem analizinde standart örneklerin hazırlanması ve hasta sonuçları ile değerlendirilmesinde optimizasyon sağlanmıştır.
- **Hastaların KREC düzeyleri üç zaman dilimi arasında karşılaştırıldığında;**
- Hem 10^6 PBMC hücre başına bulunan KREC düzeyleri, hem de 1ml kandaki KREC düzeyleri ortalamaları sayısal olarak yüksek bulunmuştur.
- **Hastaların KREC düzeyi ile yaş, cinsiyet, primer hastalıkları ve kan parametreleri arasındaki ilişki karşılaştırıldığında;**
- 45 yaşın altındaki hastalarda KREC düzeyleri 7. günde anlamlı artış göstermiştir.
- Kadın ve erkek hastalar arasında KREC düzeylerinde bir farklılık bulunmamaktadır.
- Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), İdiopatik pulmoner fibrozis (IPF), Kistik fibrozis, Bronşiektazis ve Silikozis tanıları almış hastalar arasında üç zaman dilimindeki KREC düzeyleri açısından bir farklılık bulunmamaktadır.
- 24. saat lökosit sayısı ve hemogloblin düzeyi ile KREC düzeyleri arasında pozitif yönlü anlamlı bir ilişki bulunmaktadır.
- **Hasta ve kontrol grubu sitokin seviyeleri karşılaştırıldığında;**
- IL-6, IL-8, MCP-1, sP-selektin seviyelerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu,
- CD40L ve t-PA seviyelerinde anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.
- **Hasta grubunda üç zaman dilimine ait sitokin seviyeleri karşılaştırıldığında;**
- IL-8 seviyesinin transplant öncesine göre 24. saatte düştüğü, 24. saate göre 7. günde artış gösterdiği,
- MCP-1, CD40L ve sP-selektin seviyelerinin 24. saate göre 7. günde artış gösterdiği,

- IL-6 ve t-PA seviyelerinin zamanlar arasında bir farklılık göstermediği belirlenmiştir.
- **Hasta grubunda üç zaman diliminde KREC düzeyleri ve sitokin seviyeleri karşılaştırıldığında;**
 - CD40L ve KREC düzeyi (10^6 PBMC başına) arasında 24. saatte pozitif yönlü ve anlamlı bir ilişki belirlenmiştir.
- **Özetle;** Akciğer transplantasyonunda immün yanıtın takibinde KREC ölçümü, hümmoral immün yanıtın doğrudan ölçümünü sağlayabilir. Daha kapsamlı araştırmalardan elde edilecek sonuçlar; prognoz, graft reddi ile ilgili önlemlerin alınması konularında yönlendirici olacaktır.



KAYNAKLAR

- 1) Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. USA: Elsevier; 2012.
- 2) Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S. *Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System*. 4th ed. Temel İmmunoloji İmmun Sistemin İşlevleri ve Bozuklukları.; Güneş Tıp Kitapevleri: Ankara; 2015.
- 3) LeBien WT, Tedder FT. Blymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 2008;112:1570-1580
- 4) Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of THE CELL*. 5th ed.2008
- 5) Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*, 2013;131:959-71.
- 6) Andres B, S´anchez-Archidona RA, Cortegano I, et al. *B Cell Strategies of Ag Recognition in a Stratified Immune System*, in *Mathematical Models and Immune Cell Biology*, Molina Paris C, Lythe G. Springer: 2011.259-275.
- 7) Melchers F. Checkpoints that control B cell development. *The Journal of Clinical Investigation* [serial online] 2015, 25(6):2203–2210. Erişim 25.05.2016, <http://www.jci.org/articles/view/78083>
- 8) Dorshkind K and Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nature*, 2007;7:213-219.
- 9) Janeway Jr AC, Travers P, Walport M, Shlomchik JM. *Immunobiology*, 5th ed. Erişim 01.06.2016, <http://www.mta.ca/pshl/docs/janewayimmunobiology8.pdf>
- 10) Naradikian SM, Scholz LJ, Oropallo AM, Cancro PM. *Understanding B Cell Biology. Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases*, Bosch X, Ramos-Casals M., Khamashta A.M. Springer: Basel. 2014; 11-35.
- 11) Browning LJ. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nature Reviews*, 2006; 5:564- 576.
- 12) Georgiou G, Ippolito CG, Beausang J, et al. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nature Biotechnology*, 2014;32(2):157-168.

- 13) Lüleyap HÜ. *MOLEKÜLER GENETİĞİN ESASLARI*. Türkiye: Nobel Kitapevi; 2008.
- 14) Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S. *Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System*. 1st ed. Temel İmmunoloji İmmun Sistemin İşlevleri ve Bozuklukları. İstanbul Tıp Kitapevi: İstanbul; 2007.
- 15) Gaudin E, Hao Y, Rosado MM, et al. Positive Selection of B Cells Expressing Low Densities of Self-reactive BCRs. *J. Exp. Med.* 2004;199(6):843-85.
- 16) Sandel CP and Monroe GJ. Negative Selection of Immature B Cells by Receptor Editing or Deletion Is Determined by Site of Antigen Encounter. *Immunity*, 1999;10:289-299.
- 17) Lutz J, Heideman RM, Roth E, et al. Pro-B cells sense productive immunoglobulin heavy chain rearrangement irrespective of polypeptide production. *PNAS*, 2011; 108 (26):10644-10649.
- 18) Roth BD. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiol Spectrum*, 2014;2(6):1-11. Erişim 30.11.2016, <http://www.asmscience.org>
- 19) Dar N, Gothelf D, Korn D, et al. Thymic and bone marrow output in individuals with 22q11.2 deletion syndrome. *Pediatric RESEARCH*, 2015; 77 (4):579-585.
- 20) van Zelm CM, van der Burg M, Langerak WA and van Dongen MJJ. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *frontiers in IMMUNOLOGY*, 2011; 2(12):1-9.
- 21) Johnson K, Chaumeil J, Skok AJ. Epigenetic regulation of V(D)J recombination. *Essays Biochem*, 2010; 48:221-243.
- 22) Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, and Alt WF. Mechanism and Control of V(D)J Recombination at the Immunoglobulin Heavy Chain Locus. *Annu. Rev. Immuno*, 2006; 24:541-570.
- 23) Sadofsky JM. The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Research*, 2001;28(7):1399-1409.
- 24) Bassing HC, Swat W, and Alt WF. The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination. *Cell*, 2002;109:45-55.

- 25) Shih Y-H and Krangel SM. Chromatin Architecture, CCCTC-Binding Factor, and V(D)J Recombination: Managing Long-Distance Relationships at Antigen Receptor Loci. *The Journal of Immunology*, 2013;190:4915-4921.
- 26) Serana F, Chiarini F, Zanotti C, et al. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Trans Med*, 2013;11(119):1-11.
- 27) Bräuninger A, Goossens T, Rajewsky K and Küppers R. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur. J. Immunol*, 2001;31:3631-3637.
- 28) Dasa S, Nikolaidis N and Nei M. Genomic organization and evolution of immunoglobulin kappa gene enhancers and kappa deleting element in mammals. *Mol Immunol*.2009;46(15):3171-3177.
- 29) van Zelm CM, Szczepanski T, van der Burg M and van Dongen MJJ. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med*. 2007;204(3):645-655.
- 30) Gonzalez D, van der Burg M, Garcia-Sanz R, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 2007;110: 3112-312.
- 31) Motta M, Chiarini M, Ghidini C, et al. Quantification of newly produced B and T lymphocytes in untreated chronic lymphocytic leukemia patients. *J Transl Med*, 2010; 8: 1-7.
- 32) Chiarini M, Zanotti C, Serana F, et al. T-cell receptor and K-deleting recombination excision circles in newborn screening of T- and B-cell defects: review of the literature and future challenges. *Journal of Public Health Research*, 2013;2(e3):9-16.
- 33) Sottini A, Ghidini C, Zanotti C, et al. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patient with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clin Immunol*, 2010; 136:217-227.
- 34) Mensen A, Ochs C, Stroux A, et al. Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Transl Med*, 2013;11(188):1-9.

- 35) Lev A, Simon JA, Bareket M, Bielorai B, Hutt D, Amariglio N, et al. The Kinetics of Early T and B cell Immune Recovery after Bone Marrow Transplantation in RAG-2-Deficient SCID Patients. *PLoS ONE* [serial online] 2012; 7:1-12. Erişim 03.05.2016, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030494>.
- 36) Barbaro M, Ohlsson A, Borte S, et al. Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency Diseases in Sweden-a 2-Year Pilot TREC and KREC Screening Study. *J Clin Immunol*, 2017; 37(1):51-60.
- 37) Olbricha P, Felipea B, Delgado-Pecellin C, et al. A first pilot study on the neonatal screening of primary immunodeficiencies in Spain: TRECS and KRECS identify severe T- and B-cell lymphopaenia. *An Pediatr (Barc)*, 2014; 81(5): 310-317.
- 38) Serana F, Sottini A, Chiarini M, et al. The Different Extent of B and T Cell Immune Reconstitution after Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Enzyme Replacement Therapies in SCID Patients with Adenosine Deaminase Deficiency. *J Immunol*, 2010.;5:1-10.
- 39) Quiros-Roldan E, Serana F, Chiarini M, et al. Effects of combined antiretroviral therapy on B- and T-cell release from production sites in long-term treated HIV-1⁺ patients. *J Transl Med*, 2012;10(94):1-11.
- 40) Li R, Xue C, Li C, et al. TRAC Variants Associate with IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2009;20:1359-1367.
- 41) Hardy DJ, Webb RW, Dalton DM and Walker RG. Lung Homotransplantation in Man. *JAMA*, 1963;186(12)
- 42) Kotloff MR, and Thabut G, Lung Transplantation. *Am J Resp Crit Care*, 2011;184:159–171.
- 43) Hirche OT, Knoop C, Hebestreit H, et al. Practical Guidelines: Lung Transplantation in Patients with Cystic Fibrosis. *Pulmonary Medicine*, 2014. 2014:1-22.
- 44) Weill D, Benden C, Corris AP, et al. A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014- An update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transpl*. 2015; 34(1):1-15.

- 45) Dabak G, Senbaklavacı O. History of Lung Transplantation. *Turk Thorac J.* 2016; 17:71-75.
- 46) Kutlu CA, Süreyyapaşa Akciğer Transplantasyonu Çalışma Grubu. A single lung transplantation for silicosis: the first successful lung transplantation case in Turkey. *Turk Gogus Kalp Dama.* 2011;19(3):455-462.
- 47) Arcasoy MS and Dickinson WR. Crossing the Bridge of Eastern and Western Cultures: Lung Transplantation in Turkey. Erişim 03.01.2017, <http://www.ishlt.org/ContentDocuments/2015MayLinks>
- 48) Fuller J, Fisher JA. An update on lung transplantation. *Breathe*, 2013;9(3):189-200.
- 49) Ryu HJ, Moua T, Daniels EC. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evolving Concepts. *Mayo Clin Proc.* 2014; 89(8):1130-1142.
- 50) Adler RF, Liou GT. The Dynamics of Disease Progression in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE*, 2016; 11(6): 1-17.
- 51) Laval J, Ralhan A and Hartl D. Neutrophils in cystic fibrosis. *Biol.Chem.* 2016; 397(6):485-496.
- 52) Lopes-Pacheco M, Bandeira E and Morales MM. Cell-Based Therapy for Silicosis. *Stem Cells International*, 2016; Hindawi Publishing Corporation: 1-9.
- 53) Barker FA. Bronchiectasis. *The New England Journal of Medicine*, 2002;346(18):1383-1393.
- 54) O'Donnell AE. Bronchiectasis. *Chest*, 2008; 134: 815-823.
- 55) Cinel LZ. Bronşiektazinin Etyopatogenezi. Journal of Clinical and Analytical Medicine Erişim:14.04.2015, <http://www.jcam.com.tr/files/KATD-1897.pdf>.
- 56) Heeger SP and Dinavahi R. Transplant Immunology for Non-Immunologist. *Mt Sinai J Med.* 2012; 79: 376-387.
- 57) Mak WT and Saunders, EM. *Primerto the Immune Response Academic Cell Update*. Toronto, Canada: Elsevier; 2011.
- 58) Kreisel D and Goldstein RD. Innate immunity and organ transplantation: focus on lung transplantation. *Transplant Int.* 2013;26: 2-10.
- 59) Gracon ASA and Wilkes SD. Lung transplantation: Chronic allograft dysfunction and establishing immune tolerance. *Hum Immunol.* 2014;75(8): 887-894.

- 60) Tschernig T, Boeke K, Steinhoff G, Wonigeit K, Pabst R, and Westermann J. The Lung as a Source and a Target Organ for T- and B-lymphocytes. *Am J Resp Cell Mol.* 1997;17:414-421.
- 61) Terasaki IP and Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:541-545.
- 62) Kato A, Hulse EK, Tan BK, and Schleimer PR. B lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 131(4):933-957.
- 63) Segundo SD, Ballesteros MA, Mons R, et al. Study of B-Cell Subpopulations in Lung Transplant Recipients with Posttransplant Infection. *Transplant P,* 2012;44:2676-78.
- 64) Segundo SD, Lopez-Hoyos M, and Arias M. Regulatory B-Cell in Transplantaion. *Antibodies.* 2013;2:587-597.
- 65) Cascalho IM, Chen JB, Kain M, and Platt LJ. The Paradoxical Functions of B Cells and Antibodies in Transplantation. *J Immunol.*2013;190:875-879.
- 66) Fitzgerald, A.K, O'Neill, A.J.L., Gearing J.H.A., Callard, E.R. *The cytokine Factsbook.* 2nd ed. Academic Press; London:2001.
- 67) Guner I, Ozmen D, Bayındır O. Sitokinler- Cytokines. *Kafkas J Med Sci.*1997;17:65-74.
- 68) de Oliveira CMB, Sakata RK, TSA, Issy MA, Gerola RL, Salomao R. Cytokines and Pain. *Rev Bras Anesthesiol.*2011;61:255-265.
- 69) Dinarello AC. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37:34-45.
- 70) Khan MM. Role of Cytokines. Immunopharmacology, UK: Springer,2008.
- 71) Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.*2011;1813:878-888.
- 72) Middleton RK, Bown MJ, Lloyd GM, Jones JL, London NJ, Sayers RD. Characterisation of Interleukin-8 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression within the Abdominal Aortic Aneurysm and their Association with Mural Inflammation. *Eur J Vasc Endovasc.* 2009;37:46-55.
- 73) de Boer IW, Sont KJ, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken HJ and Hiemstra SP. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol.* 2000;190:619-626.

- 74) Zhao Y, Sharma KA, LaPar JD, et al. Depletion of tissue plasminogen activator attenuates lung ischemia-reperfusion injury via inhibition of neutrophil extravasation. *Am J Physiol-Lung C*.2011;300:718-729.
- 75) Daoussis D, Andonopoulos PA, and Liossis CNK. Targeting CD40L: a Promising Therapeutic Approach. *Clin Diagn Lab Immunol*.2004;11(4):635-641.
- 76) Woollard JK, Suhartoyo A, Harris EE, et al. Pathophysiological Levels of Soluble P-Selectin Mediate Adhesion of Leukocytes to the Endothelium Through Mac-1 Activation. *Circ Res*.2008;103:1128-1138.
- 77) Holmes AV, Wallacea JMW, Gilmore WS, McFaulb P, Alexander HD. Soluble P-selectin levels during normal pregnancy:a longitudinal study. *an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2002;109:997-1002.
- 78) Toews GB. Cytokines and the Lung. *Eur Respir J*.2001;34:3-17.
- 79) Nakajima T, Palchevsky V, Perkins LD, Belperio AJ, Finn WP. Lung transplantation: infection, inflammation, and the microbiome. *Semin Immunopathol*, 2011;33:135-156.
- 80) Joshi M, Desphande JD. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2010;1(5):81-97.
- 81) Macey GM. *Principles of Flow Cytometry*, in *Flow Cytometry: Principles and Applications*, Marion G. Macey. Humana Press: Totowa, New Jersey.2007.1-15.
- 82) Immunoassay Product Guide, eBioscience. Erişim 22.06.2016, <https://www.ebioscience.com/media/pdf/literature/immunoassay-product-guide.pdf>
- 83) Bhorade MS and Stern E. Immunosuppression for Lung Transplantation. *Proc Am Thorac Soc*, 2009;6:47-53.
- 84) Linton JB and Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature Immunology*, 2004;5(2):133-139
- 85) Martin V, Wu YC, Kipling D and Dunn-Walters D. Ageing of the B-cell repertoire. *Phil. Trans. R. Soc. B*, Erişim 29.11.2016, <http://rstb.royalsocietypublishing.org>
- 86) Serana F, Airo P, Chiarini M, et al. Thymic and Bone Marrow Output in Patients with Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2011;31:540-549.

- 87) Carsetti R. The Development of B Cells in the Bone Marrow is Controlled by the Balance Between Cell-autonomous Mechanisms and Signals from the Microenvironment. *J Exp Med*, 2000;191(1):5-8.
- 88) Lee IW, Huang LJ, Lin JS, et al. Applying T-cell receptor excision circle and immunoglobulin κ - deleting recombination excision circles to patients with primary immunodeficiency diseases. *Ann Med*, 2014;46(7):555-565.
- 89) Lewis AS, Pavord DI, Stringer RJ, et al. The Relation Between Peripheral Blood Leukocyte Counts and Respiratory Symptoms, Atopy, Lung Function, and Airway Responsiveness in Adults. *Chest*, 2001;119:105-114.
- 90) Spahr EJ, Love BR, Francois M, Radford K, Meyer CK. Lung transplantation for cystic fibrosis: Current concepts and one center's experience. *J Cyst Fibros*, 2007;6:334-350.
- 91) Mathur A, Baz M, Staples D, et al. Cytokine Profile After Lung Transplantation: Correlation With Allograft Injury. *Ann Thorac Surg*, 2006;81:1844-50.
- 92) Verleden ES, Ruttens D, Vos R, et al. Differential Cytokine, Chemokine and Growth Factor Expression in Phenotypes of Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Transplantation*, 2015;99:86-93.
- 93) Dubiński B, Boratyńska M, Kopeć W, et al. Activated cells in urine and monocyte chemotactic peptide-1 (MCP-1) -Sensitive rejection markers in renal graft recipients. *Transpl Immunol*, 2008;18:203-207.
- 94) Okazaki M, Sugimoto S, Lai J, et al. Costimulatory Blockade-Mediated Lung Allograft Acceptance is Abrogated by Overexpression of Bcl-2 in the Recipient. *Transplantation Proceedings*, 2009;41:385-387.
- 95) van Zelm CM, Bartol WJS, Driessen JG, et al. Human CD19 and CD40L deficiencies impair antibody selection and differentially affect somatic hypermutation. *J Allergy Clin Immunol*, 2014;134: 135-44.
- 96) Sternberg ID, Shimbo D, Kawut SM, et al. Platelet activation in the postoperative period after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008;135:679-84.
- 97) Lau LC, Zhao Y, Kim J, et al. Enhanced Fibrinolysis Protects Against Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009;137(5):1241-48.

HAM VERİLER

HASTA BİLGİLERİ

HASTA NO	YAŞ	CİNSİYET	HASTALIK TANISI	EK HASTALIK	BMI	FEV1%	SIGARA KULLANIMI
HASTA 9	57	K	IPF	DM	28	62	YOK
HASTA 10	39	E	IPF	DM	30	78	YOK
HASTA 11	36	E	Bronşiektazi	YOK	26	32	YOK
HASTA 12	49	E	KOAH	YOK	25	23	30 YIL
HASTA 13	41	E	Slikozis	YOK	25	27	YOK
HASTA 15	32	E	Bronşiektazi	YOK	22	-	YOK
HASTA 16	53	K	IPF	YOK	26	-	YOK
HASTA 17	51	E	KOAH	YOK	21	13	30 YIL
HASTA 19	59	E	IPF	TBC	24	44	YOK
HASTA 20	23	K	KF	TBC	14	25	YOK
HASTA 22	59	E	KOAH	TBC	22	26	16 YIL

HASTA DNA KANTİFİKASYON SONUÇLARI			
HASTA NO		260/280nm	ng/µL
H9	pre-op	1,7	15,59
H9	24.saat	1,84	21,61
H9	7.gün	1,9	21,91
H10	pre-op	1,88	10,14
H10	24.saat	1,85	25,43
H10	7.gün	1,82	15,74
H11	pre-op	1,76	13,29
H11	24.saat	1,85	15,5
H11	7.gün	1,8	12,02
H12	pre-op	1,83	10,4
H12	24.saat	1,92	68
H12	7.gün	1,95	17,48
H13	pre-op	1,8	21,16
H13	24.saat	1,91	18,68
H13	7.gün	1,87	14,49
H15	pre-op	1,89	7,8
H15	24.saat	1,81	18,5
H15	7.gün	1,86	4,99
H16	pre-op	1,88	10,46
H16	24.saat	1,91	18,15
H16	7.gün	1,89	15,37
H17	pre-op	1,83	15,6
H17	24.saat	1,92	11,8
H17	7.gün	1,85	8,94
H19	pre-op	1,81	8,06
H19	24.saat	1,8	42,07
H19	7.gün	1,72	9,16
H20	pre-op	1,95	10,36
H20	24.saat	1,7	10
H20	7.gün	1,78	6,8
H22	pre-op	1,81	50,9
H22	24.saat	1,73	19,2
H22	7.gün	1,8	25

KREC ve TCRAC STANDART DNA KANTİFİKASYON SONUÇLARI

KREC STANDART DNA KONSANTRASYONU ng/ μ L		KREC DNA KOPYA SAYISI	
ST1	28,05	ST1	2,88747x10 ¹¹
ST2	24,57	ST2	2,52924x10 ¹¹
ST3	30,53	ST3	3,14276x10 ¹¹
ST4	29,94	ST4	3,08203x10 ¹¹
TCRAC STANDART DNA KONSANTRASYONU ng/ μ L		TCRAC DNA KOPYA SAYISI	
ST1	28	ST1	3,24262x10 ¹¹
ST2	20,76	ST2	2,40417x10 ¹¹
ST3	25,72	ST3	2,97857x10 ¹¹
ST4	27,47	ST4	3,18124x10 ¹¹

HASTALARIN ZAMANLARA AİT KREC SONUÇLARI

HASTA	KREC DÜZEYİ (10 ⁶)	KREC KOPYA SAYISI (1ml)
HASTA 9 PREOP	381290,036	800,71
HASTA 9 24.SAAT	18933,922	3,7867
HASTA 9 7.GÜN	3688,703	1,475
HASTA 10 PREOP	72642,888	182
HASTA 10 24.SAAT	21674,876	36,8472
HASTA 10 7.GÜN	57411,934	40188
HASTA 11 PREOP	14624,486	92,134
HASTA 11 24.SAAT	411219,408	164,487
HASTA 11 7.GÜN	45223880,6	13567,164
HASTA 12 PREOP	78848,217	205,005
HASTA 12 24.SAAT	41050,118	94,415
HASTA 12 7.GÜN	11934,806	15,515
HASTA 13 PREOP	5719,418	10,866
HASTA 13 24.SAAT	18809,639	16,928
HASTA 13 7.GÜN	189147,666	170,232
HASTA 15 PREOP	744904,777	2756,147
HASTA 15 24.SAAT	9080,54	3,632
HASTA 15 7.GÜN	698792,628	768,671
HASTA 16 PREOP	24596,388	91,006
HASTA 16 24.SAAT	102088,195	224,594
HASTA 16 7.GÜN	126849,805	88,794
HASTA 17 PREOP	174023,273	365,448
HASTA 17 24.SAAT	15696,684	17,266
HASTA 17 7.GÜN	32914,654	32,914
HASTA 19 PREOP	3844,297	11,532
HASTA 19 24.SAAT	3801459,854	3421,313
HASTA 19 7.GÜN	1551127,425	7910,7
HASTA 20 PREOP	517668,089	1553,004
HASTA 20 24.SAAT	1534026,297	1687,428
HASTA 20 7.GÜN	2461463,223	2461,463
HASTA 22 PREOP	278,226	0,111
HASTA 22 24.SAAT	77636,737	85,4
HASTA 22 7.GÜN	10516,75	53,635

HASTA GRUBUNA AİT KAN PARAMETRELERİ

HASTA no ve zamanlar	Lökosit (10 ³ /μL)	Eritrosit (10 ⁶ /μL)	Hgb (g/dL)	Nötrofil (%)	Monosit (%)	Lenfosit (%)	Nötrofil (#)	Monosit (#)	Lenfosit (#)	Trombosit (10 ³ /μL)
HASTA 9 PREOP	6,6	5,45	16,1	65,4	7,1	24,2	4,3	0,5	1,6	207
HASTA 9 24.SAAT	1,8	3,38	9,8	97,9	1	0,8	1,8	0,1	0,1	38
HASTA 9 7.GÜN	16,2	3,5	9,9	97,2	0,7	2,1	15,8	0,1	0,3	35
HASTA 10 PREOP	8,7	7,45	16,6	66,5	10,3	18,7	5,8	0,9	1,6	279
HASTA 10 24.SAAT	23,7	6,09	12	92,5	6,3	1,2	21	1,4	0,3	169
HASTA 10 7.GÜN	7,3	4,68	11,1	89,3	6	4,5	6,5	0,4	0,3	254
HASTA 11 PREOP	18,4	5,19	13,4	69,4	5,9	22,9	12,3	2,1	4,2	235
HASTA 11 24.SAAT	35,5	4,6	13,5	96,7	2,4	0,9	14,4	0,1	0,3	71
HASTA 11 7.GÜN	7,5	3,38	9,7	94,6	2,2	1,8	7,2	0,2	0,1	109
HASTA 12 PREOP	13,4	4,5	12,9	76,7	7,3	11,8	10,3	1	1,6	305
HASTA 12 24.SAAT	42,3	3,09	9,1	96,9	1,7	1,4	41	1,7	0,6	100
HASTA 12 7.GÜN	19,9	3,23	9,6	93,8	3,4	2,8	18,6	0,7	0,6	318
HASTA 13 PREOP	9,4	4,63	12,8	79,9	7	12,7	7,3	0,7	1,2	245
HASTA 13 24.SAAT	11	3,11	8,9	91,7	4,4	3,9	10,1	0,5	0,4	77
HASTA 13 7.GÜN	9,8	3,04	3,8	94,5	2,7	2,9	9,2	0,3	0,3	209
HASTA 15 PREOP	8,7	4,97	13	54,7	4,8	38,2	4,8	0,4	3,3	395
HASTA 15 24.SAAT	21,9	3,28	9,1	97,1	1,5	0,6	21,2	0,3	0,1	69
HASTA 15 7.GÜN	13,9	4,51	12,6	91,4	4,6	3,9	12,7	0,6	0,5	309
HASTA 16 PREOP	13	3,5	10,5	66	5,2	23	8,4	0,7	3	279
HASTA 16 24.SAAT	21,2	3,16	8,9	94,1	3,2	2,6	12,3	0,7	0,5	92
HASTA 16 7.GÜN	14,4	3,22	9	96,4	0,3	3,3	12,8	0,2	0,5	102
HASTA 17 PREOP	7,6	3,92	11,3	69	8,9	18,6	5,2	0,7	1,4	125
HASTA 17 24.SAAT	9,8	3,05	9,4	89,3	4,6	6,1	8,7	0,5	0,6	88
HASTA 17 7.GÜN	8,9	2,88	8,1	89,2	6,6	4,2	8	0,6	0,4	176
HASTA 19 PREOP	9,5	5,1	14,6	59,2	7,7	24,5	0,6	0,7	2,3	239
HASTA 19 24.SAAT	24,1	4,4	12,2	95,9	1,8	2,3	27,7	0,4	0,5	144
HASTA 19 7.GÜN	13,1	3,79	10,4	100	9,1	58,6	30	0,9	4,2	173
HASTA 20 PREOP	11,3	3,88	9,4	72,1	9,1	18,5	9,8	0,9	2,1	188
HASTA 20 24.SAAT	33,2	4,38	12,1	96,7	1,8	1,5	30	0,6	0,5	78
HASTA 20 7.GÜN	20,1	3,68	10	95,1	2,3	2,6	10,4	0,5	0,5	138
HASTA 22 PREOP	4,9	4,81	14,1	94,3	1,3	4,8	4,6	0,2	0,2	71
HASTA 22 24.SAAT	19,2	2,93	11,3	95,3	1,6	3	6,2	0,6	0,6	53
HASTA 22.7.GÜN	7	3	8,7	100	9,1	58,6	6,2	0,9	4,2	116

KONTROL GRUBU BİLGİLERİ

KONTROL NO	YAŞ	CİNSİYET	HASTALIK ÖYKÜSÜ	SİGARA KULLANIMI
KONTROL 1	57	K	YOK	YOK
KONTROL 2	39	E	YOK	VAR
KONTROL 3	35	E	YOK	VAR
KONTROL 4	45	E	YOK	VAR
KONTROL 5	43	E	YOK	VAR
KONTROL 6	31	E	YOK	VAR
KONTROL 7	55	K	YOK	YOK
KONTROL 8	27	E	YOK	YOK
KONTROL 9	25	K	YOK	VAR
KONTROL10	54	E	YOK	YOK

KONTROL GRUBU KAN SAYIMI SONUÇLARI

KONTROL	Lökosit (10 ³ /μl)	Eritrosit (10 ⁶ /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Nötrofil (%)	Monosit (%)	Lenfosit (%)	Nötrofil (#)	Monosit (#)	Lenfosit (#)	Trombosit (10 ³ /μL)
KONTROL 1	5.7	4.82	14.0	56.7	4.8	38.5	3.2	0.3	2.2	221
KONTROL 2	10.0	5.04	16.5	61.3	5.3	33.4	6.2	0.5	3.3	365
KONTROL 3	9.7	5.42	14.7	66.6	13.3	20.1	6.5	1.3	1.9	327
KONTROL 4	7.3	4.26	11.1	69.7	9.0	21.3	5.0	0.7	1.6	246
KONTROL 5	8.6	4.96	15.1	62.7	8.3	29.0	5.4	0.7	2.5	271
KONTROL 6	6.9	5.12	14.1	57.5	10.0	32.5	4.0	0.7	2.2	263
KONTROL 7	6.4	4.22	12.8	47.3	9.2	43.5	3.0	0.6	2.8	311
KONTROL 8	6.8	4.51	14.4	37.6	24.1	38.3	2.6	1.6	2.6	178
KONTROL 9	7.0	4.77	13.8	52.4	13.9	33.7	3.6	1.0	2.4	198
KONTROL 10	5.2	4.93	15.2	51.5	7.6	40.9	2.7	0.4	2.1	237

HASTA GRUBU SİTOKİN SONUÇLARI

HASTALAR	SİTOKİNLER					
	IL-6 (ng/mL)	IL-8 (ng/mL)	MCP-1 (ng/mL)	t-PA (ng/mL)	CD40L (ng/mL)	P-selectin (µg/mL)
H10/preop	69,29	599,4	79,65	5192,46	4799,48	87,52
H10/24.saat	96,94	130,73	110,49	4724,67	624,13	61,93
H10/7.gün	147,84	183,29	169,8	7999,19	5609,27	73,27
H11/preop	80,58	137,47	103,07	5145,68	6,03	79,28
H11/24.saat	513,49	358,9	271,98	6782,94	7070,84	58,3
H11/7.gün	584,99	486,55	468	17024,47	7426,35	100,45
H12/preop	810,32	449,55	392,04	7578,18	3,005	93,38
H12/24.saat	444,16	119,14	183,03	20979,28	2212,56	79,25
H12/7.gün	141,07	142,86	204,59	20753,29	10270,49	83,92
H13/preop	127,52	161,7	384,69	1807,9	9954,48	69,32
H13/24.saat	91,41	121,56	350,38	15254,23	6320,3	82,49
H13/7.gün	541,66	468,05	509,65	1448,21	12561,6	98,89
H15/preop	135,42	333	406,74	18531,07	4127,94	49,08
H15/24.saat	1263,15	161,72	595,41	2301,31	1980,6	75,3
H15/7.gün	87,57	136,12	751,84	4256,88	5253,75	65,49
H16/preop	153,48	179,25	257,27	6478,88	5352,5	96,14
H16/24.saat	162,51	76,68	194,06	13973,63	2283,93	57,82
H16/7.gün	119,62	100,4	543,96	19811,67	2686,14	76,26
H17/preop	124,14	150,94	201,41	4233,49	6814,07	9374
H17/24.saat	189,6	15,74	167,59	4677,89	1304,34	54,71
H17/7.gün	65,23	120,48	236,69	5519,91	7406,6	100,09
H20/preop	480,99	475,45	507,2	5917,53	7406,6	80,45
H20/24.saat	99,42	142,86	186,95	2783,33	6932,58	64,29
H20/7.gün	151,22	384,8	224,93	6970,06	8315,15	74,35
H22/preop	526,49	99,46	1355,6	20979,28	10823,52	103,8
H22/24.saat	795,15	96,76	771,83	15487,75	2248,25	76,38
H22/7.gün	881,82	156,33	1004,43	6899,89	4009,44	82,13

KONTROL GRUBU SİTOKİN SONUÇLARI

KONTROL	IL-6 (ng/mL)	IL-8 (ng/mL)	MCP-1 (ng/mL)	t-PA (ng/mL)	CD40L (ng/mL)	P-selectin (µg/mL)
KONTROL 1	0	80,32	116,15	2993,85	1127,69	40,71
KONTROL 2	74,82	119	103,07	4677,89	1802,16	74,28
KONTROL 3	96,49	109,43	64,81	4069,76	1061,67	74,04
KONTROL 4	112,74	132,21	123,57	3811,6	2355,31	84,28
KONTROL 5	142,2	173,85	179,11	4093,15	6024,04	67,16
KONTROL 6	92,76	127,63	92,92	7484,63	4424,21	79,25
KONTROL 7	0	77,49	102,68	2257,07	3752,7	70,23
KONTROL 8	0	77,22	78,09	7087,01	2141,19	52,08
KONTROL 9	129,78	180,59	98,19	5917,53	7564,61	66,56
KONTROL 10	85,99	112,13	97,61	3789,09	3713,2	65,47

FORMLAR

HASTA ARAŞTIRMA FORMU

Tarih:

FORM NO:

KAYIT NO:

YAŞ:

CİNSİYET:

TRANSPLANTASYON TARİHİ:

PRİMER TANI:

ÖZ GEÇMİŐİ:

Ek hastalıkları:

Sigara tüketimi (süre, miktar):

İlaç kullanımı:

Kütle vücut indeksi:

FEV1:

FCV:

Diğer:

ETİK KURUL KARARI-1



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

Sayı : 37068608-6100-15-1113
Konu: Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başvurusu hk.

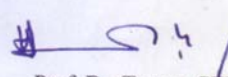
10 / 09 / 2015

İlgili Makama (Sayın Zeynep Akbulut)

Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji AD' da görevli, Doç. Dr. Gülderen Yanıkkaya Demirel'in sorumlu olduğu "Akciğer transplantasyonu olgularında erken immün iyileşme döneminde B hücre kinetiğinin KREC (kappa deleting recombination excision circle) düzeyi ile izlenmesi" isimli araştırma projesine ait Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KAEK) Başvuru Dosyası (1099 Kayıt Numaralı KAEK Başvuru Dosyası), Yeditepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 02.09.2015 tarihli toplantısında incelenmiştir.

Kurul tarafından yapılan inceleme sonucu, yukarıdaki isimi belirtilen çalışmanın yapılmasının etik ve bilimsel açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir (KAEK Karar No: 531).

Bilginizi ve gereğini saygılarımla arz ederim.

 / 10079 / 7/10.

Prof. Dr. Turgay ÇELİK
Yeditepe Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ETİK KURUL KARARI-2

Evrak Tarihi ve Sayısı: 10/07/2015-6100



T.C. Sağlık Bakanlığı
Tıbbi Genetik Hizmetleri
İstanbul Anadolu Güney Kamu Hastaneleri Birliği



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu
İstanbul İli Anadolu Güney Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Sayı : 53838792-800-
Konu: Dilekçeniz Hk.

SN:DOÇ.DR. CEMAL ASIM KUTLU
GÖĞÜS CERRAHİSİ EĞİTİM GÖREVLİSİ

İlgi: 01/07/2015 tarihli dilekçeniz.

Hastanemiz yöneticiliğine vermiş olduğunuz "Akciğer transplantasyonu olgularında erken immün iyileşme döneminde B hücre kinetiğinin KREC (Kappa deleting recombination excision circle) düzeyi ile izlenmesi" başlıklı çalışmanız konulu dilekçeniz incelenmiş olup, Etik Kurul kararı almak ve hastanemize bir örneğini verilmesi kaydıyla hastanemizde yapmanız hastane yöneticiliği tarafından uygun bulunmuştur.
Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Uzm. Dr. Bilgehan Hamit İŞİKOĞLU
Hastane Yöneticisi V.

Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas,
Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Yaz İşleri Birimi
Birim Sorumlusu
Seade KANBİR
Güvenli Elektronik İmza ile Aynı
10-07-2015

ETİK KURUL KARARI-3



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

Sayı : 37068608-6100-15-1220
Konu: Klinik Araştırmalar
Etik kurul Başvurusu hk.

05/05/2016

İlgili Makama (Zeynep Akbulut)

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Doç. Dr. Gülderen Yanıkkaya Demirel'in koordinatör olduğu "**Akciğer Transplantasyonu Olgularında Graft Başarısının Erken İmmun Dönemdeki Serum Sitokin Seviyeleri ile İlişkisi**" isimli araştırma projesine ait Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KAEK) Başvuru Dosyası (1212 kayıt Numaralı KAEK Başvuru Dosyası), Yeditepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 04.05.2016 tarihli toplantıda incelenmiştir.

Kurul tarafından yapılan inceleme sonucu, yukarıdaki isimi belirtilen çalışmanın yapılmasının etik ve bilimsel açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir (KAEK Karar No: 618).

Prof. Dr. Turgay ÇELİK
Yeditepe Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zeynep	Soyadı	Akbulut
Doğ.Yeri	Erzincan	Doğ.Tar.	01.02.1975
Uyruğu	TC	TC Kim No	10760191702
Email	zeynep.akblt@gmail.com	Tel	05358281017

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
Yük.Lis.	Gazi Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü	2001
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	1998
Lise	Küçükyağlı Kadir Has Lisesi	1993

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi-İstanbul	2005-2013
2.	Biyolog	Kızılay Zeynep Kamil Kan Merkezi- İstanbul	2002-2005
3.	Biyolog	Özel Onko Onkoloji Merkezi- Ankara	1998-2001

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Orta	Orta	Orta		IELTS- 2013 genel ort.5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2013)	65	60	65
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	orta
Excel	orta
Powerpoint	orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

C.Sahin, O.Albayrak, T.F.Akdeniz, **Z.Akbulut**, G.Yanikkaya Demirel, F.Aricioğlu. Agmatine Reverses Sub-Chronic Stress-induced Nollike Receptor Protein 3 (NLRP3) Activation and Cytokine Response in Rats. *Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology*, Apr.2016, DOI:10.1111/bcpt.12604

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

Gökhan Terzioğlu, Fatma Tuba Akdeniz, **Zeynep Akbulut**, Özlem Türksoy, Gülderen Yanikkaya Demirel. Pyruvate supplementation and plasma treated culture surfaces increase the number of immature thymic epithelial cells and their stemness ability in human thymic cell culture. **Poster: 3rd International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, April 27-30, 2016.**

Akdeniz T.F., **Akbulut Z.**, Vayvada V., Terzioğlu G., Aru B., Baktemur E., Yeğinsu A., Kutlu C.A., Suakar Ö., Demirel Yanikkaya G. Effects of Sample Storing Conditions on DNA Isolation. **Poster: 3rd International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress, April 27-30, 2016.**

Zeynep Akbulut, Fatma Tuba Akdeniz, Özgür Albayrak, Gökhan Terzioğlu, Başak Aru, Gülderen Yanikkaya Demirel. Monocyte subsets have different potential for phagocytosis. **Poster: 4th European Congress of Immunology- Vienna Austria, September 6-9, 2015.**

Altay Burak Dalan, **Zeynep Akbulut**, Tuba Akdeniz, Emre Murat Altinkılıç, Hakan Sarı, Hasan Aydın, Seda Güleç Yılmaz, Hande Atasoy, Melisa Kantar, Elif Kök, Ceren Öztunç, Turgay İsbir. Gestasyonel Diyabet Hastalarında LDL Alt Gruplarının Değerlendirilmesi. **Poster: Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği Uluslararası Katılımlı Kongre&Lab Expo- İzmir,16-20 Eylül 2014.**

Z. Akbulut, F.T. Akdeniz, H. Sari, H. Aydın, B. Dalan, D. Sit, H. Atasoy, G. Yanikkaya Demirel, T. Isbir. Low level inflammatory immune response in gestastional diabetes mellitus patients.**Poster: IFCC Uluslararası Klinik Biyokimya ve Laboratuar Tıbbı Kongresi – Istanbul, 22-26 June 2014.**

F.T. Akdeniz, **Z. Akbulut**, H. Sari, H. Aydın, B. Dalan, D. Sit, S. Gulec Yılmaz, T. Isbir, G. Yanikkaya Demirel. Effects of obesity parameters on gestational diabetes in human. **Poster: IFCC Uluslararası Klinik Biyokimya ve Laboratuar Tıbbı Kongresi – Istanbul, 22-26 June 2014.**

Sonmezoglu M, **Akbulut Z.** Indirect antiglobulin test positivity in A RhD (-), C(+) pregnant woman and outcome. **Poster:32nd International Congress of the International Society of Blood Transfusion in joint cooperation with the 10th Congress of AMMTAC, 2012.**

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Gökhan Terzioğlu, Fatma Tuba Akdeniz, **Zeynep Akbulut**, Başak Aru, Gülderen Yanikkaya Demirel.Kortikal ve Medullar Timik Epitelyal Hücrelerin Akan Hücre Ölçerde Tanımlanması İçin Yeni Bir Panel Oluşturulması. (**Poster Birincilik Ödülü**) **23. Ulusal İmmunoloji Kongresi, 27-30 Nisan 2015.**

Gökhan Terzioğlu, Ceren Şahin, Gökhan Ünal, Fatma Tuba Akdeniz, **Zeynep Akbulut**, Başak Aru, Gülderen Yanikkaya Demirel, Feyza Arıcıoğlu.Sıçan Subkronik Stres Modelinde, Beyinde Hipokampal ve Prefrontal Korteks Bölgelerinde, Stres Etkisi ile

İnflamazom ilişkili Genlerin Ekspresyonunda Değişiklikler. Poster:23. Ulusal İmmunoloji Kongresi , 27-30 Nisan 2015.
F.T.Akdeniz, Z.Akbulut ,H.Sarı,H.Aydın,B.Dalan,D.Şit,S.Güleç Yılmaz, T.İsbir,G.Y.Demirel.İnsan gebelik diyabetine obesite parametrelerinin etkisi. Poster:23. Ulusal İmmunoloji Kongresi , 27-30 Nisan 2015.
Zeynep Akbulut , Fatma Tuba Akdeniz, Özgür Albayrak, Gökhan Terzioğlu, Başak Aru, Gülderen Yanıkkaya Demirel. Monosit Alt Gruplarının Fagositoz Potansiyelinde Farklılıklar. Poster:23. Ulusal İmmunoloji Kongresi , 27-30 Nisan 2015.
Özgür Albayrak, Fatma Tuba Akdeniz, Zeynep Akbulut , Gökhan Terzioğlu, Zehra Eren, Gülderen Yanıkkaya Demirel. B-Aktin geni yüksek oranda fibrin içeren dokuların gerçek zamanlı- polimeraz zincir reaksiyonu testlerinde referans olarak kullanılmalı mı?. Poster;22.Ulusal İmmunoloji Kongresi , 2013.
Özgür Albayrak, Fatma Tuba Akdeniz, Zeynep Akbulut , Gökhan Terzioğlu, Zehra Eren, Gülderen Yanıkkaya Demirel. Kan ve hücre süspansiyonu örneklerinden RNA eldesi için kullanılan kitlerle düşük fibrinli doku örneklerinden RNA izolasyonu. Poster;22.Ulusal İmmunoloji Kongresi , 2013.
F.Tuba Akdeniz, Zeynep Akbulut , Gülderen Yanıkkaya Demirel, İmmünfiksasyon yöntemi ile oligoklonal band analizinin revalidasyon ve optimizasyonu. Poster;22.Ulusal İmmunoloji Kongresi , 2013.
F.Tuba Akdeniz, Zeynep Akbulut , Gülderen Yanıkkaya Demirel, S.Sami Kartı, Akan hücre ölçerle sitokin ölçümlerinde manuel yöntemle kantitatif değerlerin elde edilmesi. Poster;22.Ulusal İmmunoloji Kongresi , 2013.
Sönmezoğlu M., Aşkın B.,Şafak A.,Karadavut N., Akbulut Z. , Yağmur A.; İstanbul'da kan bağışçılarında kan grup dağılımı, Poster:II.Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi ,2007.
Sönmezoğlu M., Akbulut Z. ,Yağmur A.,Fındıklı N., Kan bağışçı sorgulamalarının seroloji test sonuçlarına etkisi. Poster; II.Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi ,2007.

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikaları/Ödülleri)

Haydarpaşa Numune Hast. Genel Cerrahi Birimi- Yeditepe Üniv. Hast. Hematoloji Kök Hücre Lab. YARDIMCI ARAŞTIRMACI : Rat serum örneklerinde nonmanyetik boncuk yöntemi ile akan hücre ölçerde sitokin tayini- 2015
Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp ABD- Yeditepe Üniv.Hastanesi Hematoloji Kök Hücre Lab. PROJE YÜRÜTÜCÜLÜĞÜ : Gebelik diyabeti tanısı almış hasta serumlarında ateroskleroz ile ilgili sitokin parametrelerin akan hücre ölçer yöntemle araştırılması- 2014
Marmara Üniv. Eczacılık Fak.- Yeditepe Üniv. Hastanesi Hematoloji Kök Hücre Lab. YARDIMCI ARAŞTIRMACI :Rat hippocampus, prefrontal cortex ve serum örneklerinde nonmanyetik boncuk yöntemi ile akan hücre ölçerde sitokin tayini- 2014
Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp ABD- Yeditepe Üniv.Hastanesi Hematoloji Kök Hücre Lab. YARDIMCI ARAŞTIRMACI : Gebelik diyabeti tanısı almış hasta serumlarında obezite ile ilgili sitokin parametrelerin akan hücre ölçer yöntemle araştırılması- 2014

European and Mediterranean League against Thrombotic Diseases, 24th Biennial International Congress on Thrombosis. Katılım Sertifikası- İstanbul, 2-4 Mayıs 2016
Ankara Üniv.Tıp Fak.- Türk İmmunoloji Derneği- ISAC (International Society for Advancement of Cytometry), 5th. Turkish- US Cytometry Workshop. Katılım Sertifikası ve Laboratuvar Uygulamaları Görevlisi. Ankara,Ekim 2015.
Türk İmmunoloji Derneği, 23. Ulusal İmmunoloji Kongresi. Katılımcı Sertifikası. Antalya,26-30 Nisan 2015.
The European Union's Seventh Programme No [602587]- The 1st ThymiStem Consortium meeting. Çalışma Raporu Sözlü Sunum. Madrid, 2-3 Mart 2015.
IFCC WorldLab–22nd International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine- Katılım Sertifikası. İstanbul, 22-26 Haziran 2014.
İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü- 6. DETAE Günleri, Katılımcı Sertifikası. İstanbul, 24-25 Kasım 2014.
Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, Hastane Transfüzyon Komitesi Sekreterliği. İstanbul, 2009-2013.
Yeditepe Üniv.Tıp Fak.- Türk İmmunoloji Derneği- ISAC (International Society for Advancement of Cytometry)- 4th. Turkish- US Cytometry Workshop. Katılımcı Sertifikası ve Laboratuvar Uygulamaları Görevlisi. İstanbul, 20-23 Kasım 2013.
İstanbul Üniversitesi DETAE İmmunoloji Anabilim Dalı, 19. Uygulamalı Flow Sitometri Kursu. Kurs Yeterlilik Sertifikası. İstanbul, 3-7 Haziran 2013. Türk İmmunoloji Derneği, 22. Ulusal İmmunoloji Kongresi, Katılımcı Sertifikası. İzmir, 27-30 Nisan 2013.
Türkiye Kan Merkezleri ve Transfüzyon Derneği, 4.Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi, (Bilimsel Program) Katılımcı Sertifikası. Antalya, 12-18 Aralık 2012
Türkiye Kan Merkezleri ve Transfüzyon Derneği, 2.Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi, (Temel Kurs Programı) Katılımcı Sertifikası. Antalya, 15-19 Kasım 2007.
Biyologlar Derneği- Avrupa Komisyonu İşbirliği- Biyologların Mesleki Gelişim Projesi, Mikrobiyoloji Eğitimcileri Eğitimi Programı. Eğitimci Sertifikası. Ankara, Ağustos- Ekim 2005.
Sağlık Bakanlığı Kan Bankacılığı Uygulamaları Yeterlilik Kursu, Marmara Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi. Kurs Yeterlilik Sertifikası. İstanbul, Kasım 2004-Ocak 2005.
Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Programı, Öğretmenlik Meslek Dersleri Sertifikası. Ankara, 1996-1998.