

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**CANLIDAN BÖBREK NAKLİ YAPILAN
HASTALARDA CXCL 11, CXCL 13, CCL 2 ve CCL 5
GEN EKSPRESYONLARININ ALLOGRAFT
FONKSİYONUYLA OLAN İLİŞKİSİ**

(Uzmanlık Tezi/Yan Dal Uzmanlık Tezi)

Dr. Samed VEREP

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Tzevat TEFİK

İSTANBUL – 2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**CANLIDAN BÖBREK NAKLİ YAPILAN
HASTALARDA CXCL-11, CXCL-13, CCL-2 ve CCL-5
GEN EKSPRESYONLARININ ALLOGRAFT
FONKSİYONUyla OLAN İLİŞKİSİ**

(Uzmanlık Tezi/Yan Dal Uzmanlık Tezi)

Dr. Samed VEREP

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Tzevat TEFİK

İSTANBUL – 2019

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında bana destek veren, hekimlik mesleğinde başarılı olabilmem için gerekli özeni gösteren, iyi bir hekim ve bilim insanı olarak örnek aldığım başta Prof. Dr. İsmet Nane ve Prof. Dr. Taner Koçak, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Faruk Özcan, Cerrahi Bölümler Başkanı Prof. Dr. H. Orhan Zıylan ile tez danışmanım Doç. Dr. Tzevat Tefik olmak üzere tüm öğretim üyelerine ve Op. Dr. Selçuk Erdem'e ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi arkadaşlarıma, eğitim sürem boyunca bir süre de olsa çalışma fırsatı bulduğum ve bilgilerinden istifade etme onuruna erişebildiğim emekli öğretim üyeleri Prof. Dr. Haluk Ander, Prof. Dr. Murat Tunç ve Prof. Dr. Mustafa Akıncı hocalarıma, gerekli ve yeterli olanakları sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz ve tez çalışmamın önemli kısımlarında zaman gözetmeksizin bana yardımcı olan Doç. Dr. Hayriye Şentürk Çiftçi'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, Tıpta Uzmanlık eğitimim süresi boyunca her türlü desteği veren ve her zaman güler yüzleri ile çalışma ortamında bana pozitif enerji veren başta sekreterimiz Muhsine Karapınar, hemşire Neziha Başaran ve Meral Üregen olmak üzere Üroloji Anabilim Dalı bünyesinde çalışan tüm çalışma arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan annem Nazlı ve babam Ramis Verep'e; uzmanlık eğitimim süresi boyunca ağır ve yoğun çalışma programıma rağmen güler yüzünü ve desteğini esirgemeyen, tez yazım sürecinde de yanımda olarak beni destekleyen hayat arkadaşım, sevgili eşim Emel Verep'e özellikle teşekkür ederim.

Son olarak da tezime vermiş oldukları destek nedeniyle İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Dr. Samed VEREP

İstanbul, 2019

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TTU-2019-34314

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
I. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
II. GENEL BİLGİLER.....	6
A. KRONİK BÖBREK HASTALIĞI.....	6
B. SDBY HASTALARINDA RENAL REPLASMAN TEDAVİLERİ.....	7
1. Hemodiyaliz.....	7
2. Periton Diyalizi.....	8
3. Böbrek Nakli.....	8
C. İMMUN YANIT	8
1. Doğal İmmun Yanıt	9
2. Edinsel İmmun Yanıt.....	9
a. Hümorale İmmunite.....	9
b. Hücresele İmmunite.....	9
(1). B Lenfositler	11
(2). T Lenfositler	11
D. BÖBREK NAKLİNDE İMMUNOLOJİK PARAMETRELER	12
1. Kan Grubu Antijenleri	13
2. Doku Grubu Antijenleri.....	13
3. Panel Reaktif Antikor	14

4. Donör Spesifik Antikor	14
5. Cross Match Testleri.....	14
E. ALLOGRAFT REJEKSİYON TİPLERİ	14
1. Hiperakut Rejeksiyon	15
2. Akut Rejeksiyon	15
a. Hücresel Akut Rejeksiyon	15
b. Hümorale (Antikor Aracılı) Akut Rejeksiyon	16
3. Kronik Rejeksiyon.....	16
F. KEMOKİNLER	17
III. HASTALAR VE YÖNTEMLER.....	20
A. Çalışma Populasyonu	20
B. Biyopsi Endikasyonları ve Değerlendirmesi.....	20
C. Hasta grupları	21
D. İmmünosüpresif Protokol.....	21
E. Klinik Sonuçlar	21
F. Örneklerin Toplanması.....	23
1. RNA izolasyonu	23
2. cDNA Sentezi	23
3. Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR Reaksiyonu	25
G. İstatistiksel analiz	25
H. Etik Kurul.....	26
IV. BULGULAR	27
V. TARTIŞMA	36
VI. SONUÇ	41
KAYNAKLAR	42
EKLER.....	49
ÖZGEÇMİŞ ve İLETİŞİM BİLGİLERİ.....	52



KISALTMALAR

AR: Akut rejeksiyon

ASH: Antijen sunan hücreler

AT: Anjiyotensin

ATG: Antitimosit Globulin

ATN: akut tubuler nekroz

BLC: B-lymphocyte-chemoattractant

CDC: Komplemana bağlı sitotoksisite

DH: Dentritik hücreler

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSA: Donör spesifik antikor

EC-MYFNa: Enteric Coated - Mikofenolat Sodyum

ELR: Gluteik asit- Lösin- Arginin

FCXM: Flow sitometriye dayalı cross match

FK: Takrolimus (Fujimycin)

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

GGF: Gecikmiş graft fonksiyonu

HLA: Human leucocyte antigene

HD: Hemodiyaliz

Ig: İmmunglobulin

IFTA: intestisyel fibrozis ve tubuler atrofi

IL: İnterlökin

I-TAC: interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant

KBH: Kronik böbrek hastalığı

kDA: Kilodalton

MDRD: Modification Diet in Renal Disease Study

MHC: Major histocompatibility complex

MIG: monokine induced by gamma interferon

MMF: Mikofenolat Mofetil

NK: Doğal katil (natural killer) hücre

PD: Periton diyalizi

RNA: Ribonükleik asit

SDBY: Son dönem böbrek yetersizliği

SGF: Stabil graft fonksiyonu

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. <i>GFR değerine göre KBH evreleri</i>	7
Tablo 2. Kemokinler ve özellikleri.....	19
Tablo 3. 2013 Banff sınıflamasına göre renal allogreft biyopsi değerlendirilmesi	22
Tablo 4. cDNA sentez kiti içeriği.....	24
Tablo 5. cDNA sentezinde sıcaklık ve reaksiyon süreleri.....	24
Tablo 6. Real-time PCR reaksiyon basamakları.....	25
Tablo 7: Hastaların demografik ve klinik bilgileri.....	28
Tablo 8: Donör demografik ve klinik bilgileri	28
Tablo 9: Hastaların peroperatif ve postoperatif bulguları	29
Tablo 10: Hasta gruplarında demografik verilerin karşılaştırılması	30
Tablo 11: Hasta gruplarının immünolojik ve klinik değerlendirilmesi	30
Tablo 12: Hasta grupları arasında serum kreatinin ve eGFR değerlerinin karşılaştırılması	31
Tablo 13: Multivariable logistic regression analizi rejeksiyon riski için	32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>Hücresel ve Hümorāl İmmunite</i>	10
Şekil 2: CXCL11 idrar gen ekspresyon düzeyinin gruplar arasındaki farkları	33
Şekil 3: CXCL13 idrar gen ekspresyon düzeyinin gruplar arasındaki farkları	34
Şekil 4: CCL2 idrar gen ekspresyon düzeyinin gruplar arasındaki farkları	34
Şekil 5: CCL5 idrar gen ekspresyon düzeyinin gruplar arasındaki farkları	35





ÖZET

CANLIDAN BÖBREK NAKLİ YAPILAN HASTALARDA CXCL 11, CXCL 13, CCL2 ve CCL5 GEN EKSPRESYONLARININ ALLOGRAFT FONKSİYONUyla OLAN İLİŞKİSİ

Giriş ve Amaç: Son dönem böbrek yetersizliği olan hastalar başarılı böbrek nakli sonrası hemodiyaliz ve periton diyalizi gibi diğer renal replasman tedavilerine göre daha uzun yaşam süresine ve daha iyi bir hayat kalitesine sahip olmaktadır. Böbrek nakli sonrası, graft böbreğinin sağlığı serum kreatinin ve idrarda proteinüri varlığı ile değerlendirilmekte olup her iki yöntemde de graft hasar gördükten sonra anlamlı değer değişiklikleri karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada canlıdan böbrek nakli yapılan hastalarda graftta geri dönüşümsüz hasar oluşmasından önce, CXCL11, CXCL13, CCL2 ve CCL5 gen ekspresyonları ile graft fonksiyonu arasındaki ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Hastalar ve Yöntem: Nisan 2013 ile Mart 2019 tarihleri arasında, yaş ortalaması 36 (18 ve 65 arası) olan toplam 91 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalardan preoperatif dönemde ve postoperatif 1. gün, 7. gün, 1. ay ve 3. ayda alınan idrar örneklerinde CXCL11, CXCL13, CCL2 ve CCL5 gen ekspresyonları değerlendirildi.

Bulgular: CXCL11 ve CXCL13 gen ekspresyon düzeyi rejeksiyon gelişen hasta grubunda stabil graft fonksiyonu olan hastalara göre nakil sonrası 1. ve 7. gün ($p<0.001$) ile 1. ayda ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı. CCL2 gen ekspresyon düzeyi ise nakil sonrası 1. ve 7. günlerde rejeksiyon hastalarında daha yüksek düzeyde bulundu ($p<0.05$). CCL5 ekspresyon düzeyi ise, sadece nakil sonrası 7. günde istatistiksel olarak rejeksiyon grubunda yüksek saptandı ($p<0.05$). Ayrıca takiplerinde BK virüs saptanan hastaların nakil sonrası 1. ayda CXCL11 gen ekspresyon düzeyinin stabil graft fonksiyonu olanlara göre yaklaşık olarak 4 kat daha yüksek olduğu saptandı.

Sonuç: Böbrek nakli sonrası allograft fonksiyonu takibi büyük önem taşımaktadır. Çalışmadaki sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde CXCL11, CXCL13, CCL2 ve CCL5 gen ekspresyon düzeylerinin allograft rejeksiyonu ile yakından ilişkili olup, ilerleyen zamanlarda bu kemokinlerin idrar ya da serum protein düzeylerinin allograft rejeksiyonunu öngörmede biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

ABSTRACT

THE RELATIONSHIP BETWEEN CXCL11, CXCL13, CCL2 and CCL5 GEN EXPRESSIONS AND ALLOGRAFT FUNCTION IN PATIENTS UNDERWENT RENAL TRANSPLANTATION

Objectives and aims: Patients with renal transplantation due to end-stage renal disease have a longer life expectancy and better quality of life than other renal replacement therapies such as hemodialysis and peritoneal dialysis. After kidney transplantation, graft function is monitorized with serum creatinine level and existance of proteinuria. However, the levels of both markers increase only after graft damage. The aim of this study was to evaluate the relationship between CXCL 11, CXCL13, CCL2 and CCL5 gene expressions before graft damage occurs in relation to graft function in patients underwent renal transplantation.

Patients and Methods: Between April 2013 and March 2019, a total of 92 patients were included in the study. The mean age of the patients was 36-year-old (min:18, max: 65). CXCL11, CXCL13, CCL2 and CCL5 gene expressions were evaluated in urine samples taken preoperatively and at postoperative 1st day, 7th day, 1st month and 3rd month.

Results: CXCL11 and CXCL13 gene expression levels at the 1st, 7th day ($p < 0.001$) and 1st month ($p < 0.05$) after transplantation were significantly higher in patients who developed rejection compared to patients with stable graft function. CCL2 gene expression level was statistically higher in patients with rejection on the 1st and 7th days after transplantation ($p < 0.05$). The expression level of CCL 5 was higher in the rejection group only on the seventh day after transplantation ($p < 0.05$). In addition one month after the transplantation, we found that CXCL11 gene expression level was approximately 4 times higher in patients who had BK virus in their follow-up.

Conclusion: Follow-up of allograft function after kidney transplantation is a very important issue. When all the findings are evaluated, CXCL11, CXCL13, CCL2 and CCL5 gene expression levels are closely related to allograft rejection and it is thought that urine or serum protein levels of these chemokines can be used as biomarkers in predicting allograft rejection.

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Böbrek nakli son dönem böbrek yetersizliği (SDBY) olan hastalar için en iyi tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir(1, 2). Böbrek nakilli hastalar, diyaliz hastaları ile karşılaştırıldığında daha iyi bir yaşam kalitesine ve daha uzun süreli sağ kalıma sahiptirler(2, 3).

Akut rejeksiyon (AR), transplantasyon sonrası sık görülebilen ve böbrek graft sağkalımı açısından önemli bir komplikasyondur. İmmünsüpresif tedavilerdeki ilerlemeler akut rejeksiyon oranını önemli ölçüde azaltmış olsa da akut rejeksiyon hem tanı hem de tedavi açısından hala bir sorun olmaya devam etmektedir(3).

Günümüzde yaygın olarak böbrek allograft fonksiyonunu izlemek için serumdaki kreatinin seviyesi kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kreatinin seviyesindeki değişiklikler, akut rejeksiyon için duyarlı bir belirteç değildir(3, 4). Klinik olarak stabil olan hastalarda serum kreatinin değerleri normal olsa bile subklinik histolojik rejeksiyon, transplantasyondan bir yıl sonra yapılan protokol böbrek graft biyopsilerinin % 4 - 50'sinde gözlenmektedir(3). Ayrıca, akut tübüler nekroz, kalsinörin inhibitörü toksisitesi ve BK virüs nefropatisi dâhil olmak üzere akut böbrek hasarının farklı etiyolojileri, serum kreatinin düzeylerinde artışa sebep olabileceğinden, yüksek kreatinin değerinin varlığı da akut rejeksiyon için özgül değildir. Akut rejeksiyonun teşhisinde altın standart yaklaşım böbrek allograftının perkütan iğne biyopsisidir. Ancak biyopsinin de kanama, infeksiyon, arteriyovenöz fistül oluşumu ve nadir durumlarda allograft kaybı, hatta ölüm gibi komplikasyon riskleri mevcuttur. Bu sebepten ötürü, böbrek allograftlarında akut rejeksiyon ve böbrek allograft disfonksiyonunun

ayırıcı tanısı için daha duyarlı ve özgül, daha az invaziv olan biyobelirteçlere ihtiyaç vardır(3).

Akut rejeksiyon, renal graft alıcılarında kronik rejeksiyon açısından güçlü bir risk faktörü olmaya devam etmektedir. Doğuştan itibaren oluşan bağışıklık sistemi ve inflamasyon mekanizmaları dâhil olmak üzere birçok mekanizmanın akut rejeksiyon patofizyolojisine dâhil olduğu gösterilmiştir(3).

Akut rejeksiyonun genellikle aktive edilmiş T hücrelerinin aracılık etmesiyle başlatıldığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, bazı allograftlarda aktive edilmiş T hücrelerine ek olarak B hücrelerinin de önemli şekilde infiltrasyonunun olduğu gösterilmiştir. İnflamasyonda rol alan hücrelerden salınan sitokinlerin yara iyileşmesi, iltihaplanma ve antikor üretimi gibi süreçler üzerindeki derin etkisi nedeniyle, solid organ allograft reddinde sitokinlerin rolü son zamanlarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir(5, 6).

Renal allograft akut rejeksiyonundaki histopatolojik değişiklikler; lokal immün hücre infiltrasyonu, vasküler ve interstisyel lezyonları göstermektedir. Özellikle yardımcı T hücrelerinden salınan interlökin (IL) 2, IL-4, IL-5 ve IL-10 inflamasyonun gelişmesinde veya inflamasyonun inhibe edilmesinde rol alarak rejeksiyon mekanizmasında önemli rol oynamaktadırlar. İnterlökinler (IL), hücreler arası iletişim araçlarıdır; ayrıca alloantijen tanıma, savunma veya toleransın immünolojik tepkilerini tetiklemektedirler(7).

İmmün sistem hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve inflamatuvar alana göç etmesinde etkili rol oynayan önemli biyobelirteçlerin bir grubu da kemokinlerdir. Kemokinler hücreler tarafından salgılanan sinyal proteinleri veya küçük sitokinlerdir. Duyarlı hücrelerde yönlendirilmiş kemotaksiyi indükleme yeteneklerinden dolayı kemokin olarak adlandırılmışlardır(8). Bazı kemokinler pro-inflamatuvar olarak kabul edilir ve bağışıklık sisteminin hücrelerini bir infeksiyon bölgesine yerleştirmek için bağışıklık tepkisi sırasında indüklenebilirler. Diğerleri ise homeostatik olarak kabul edilir ve normal doku bakımı veya gelişimi süreçleri sırasında hücrelerin göçünü kontrol etmeye dâhil olmaktadır. Kemokinler dört ana alt aileye ayrılmıştır: CXC, CC, CX3C ve XC(8, 9). Tüm bu proteinler, hedef hücrelerinin yüzeylerinde seçici olarak bulunan kemokin reseptörleri olarak adlandırılan G proteinine bağlı transmembran reseptörleri ile etkileşerek biyolojik etkilerini gösterirler(10, 11).

CXC kemokinler ise yapılarındaki özel aminoasit dizisinin olup olmamasına göre iki alt gruba ayrılmaktadırlar; Gluteik asit-Lösin-Arginin (ELR)-pozitif ve ELR negatif CXC

kemokinler. ELR pozitif CXC kemokinler özellikle olarak nötrofillerin göçünü indükler ve kan dolaşımını terk ederek, çevre dokuya girmelerini sağlar(12). CXCL13 gibi ELR motifi olmayan kemokinler ise lenfositler için kemoatraktan olma eğilimindedir ve immünitede önemli rol oynamaktadırlar. Bu kemokin, B-1 ve B-2 alt kümelerine ait B hücreleri için seçici olarak kemotaktiktir ve reseptörü olan CXCR5 ile etkileşerek etkilerini ortaya çıkarır. CXCL13 ve reseptörü CXCR5, lenf dokularının folikülleri içindeki B hücrelerinin düzenlenmesini kontrol eder(10).

CXCL11 pro-inflamatuvar rolü olan bir kemokin olup, interferon gama ile indüklenerek T hücrelerinin uyarılmasında görev almaktadır. CXCL 11, viral enfeksiyonlarda, multiple skleroz ve Graves hastalığı gibi inflamatuvar hastalıklarda yükselmekte olup bazı çalışmalarda böbrek nakli sonrası allograft nefropatilerinde önemli rolü olduğu belirtilmiştir(10, 13).

CC kemokinler anjiogenezin dâhil olduğu inflamatuvar süreçlerde oldukça önemli rol oynamaktadırlar. CCL2 doğal bağışıklık ve yardımcı T hücre cevabında önemli rol oynamakta olup; CCL5 ise doğal bağışıklığın yanında sonradan kazanılan bağışıklık sisteminde de anahtar rol almaktadır(14, 15).

Bu çalışmada inflamatuvar süreçte rol oynayan moleküllerden CXCL11, CXCL13, CCL2 ve CCL5 kemokinlerinin kronik böbrek yetersizliği nedeniyle canlıdan renal transplantasyon yapılmış olan hastalardaki gen ekspresyon seviyelerinin akut rejeksiyondaki rolünün araştırılması planlanmış olup aynı zamanda akut rejeksiyon için bu sitokinlerin biyobelirteç olarak kullanımının değerlendirmesi hedeflenmektedir.

II. GENEL BİLGİLER

A. KRONİK BÖBREK HASTALIĞI

Böbreklerin esas fonksiyon gören ünitesi, her böbrekte yaklaşık olarak bir milyon adet bulunan nefronlardır. Böbrekler nitrojenli atık ürünlerin temizlenmesi, sodyum, potasyum ve asit atılımının düzenlenmesi, 1,25-dihidroksivitamin D, eritropoetin ve renin gibi çeşitli hormonların sentezinde görev almaktadırlar(16).

Kronik böbrek hastalığı (KBH), hem böbrek yapısında kalıcı değişikliklere yol açan hem de bireyin sağlığı için etkileri olan bir sendromdur. Böbrek fonksiyon bozukluğu, hastalarda hipertansiyon, vücutta ödem, idrar çıkışında azalma veya idrarın kalitesindeki değişiklikler ve çocuklarda büyüme gecikmesi gibi bulgularla ortaya çıkabilir. KBH tanısı ise en sık serum kreatinin, sistatin C veya kan üre azot seviyeleri ile konulmaktadır. KBH'nın en yaygın patolojik tezahürü, sebep olan hastalığa bakmaksızın, bir tür renal fibrozis gelişmesidir(17).

Dünya genelinde yaklaşık olarak her yıl 1 milyon kişinin 200'ünde SDBY gelişmektedir(18). Kronik böbrek hastalığı (KBH), temelde yatan böbrek hastalığının etyolojisi ne olursa olsun en az 3 ay süren objektif böbrek hasarı ve/veya glomerüler filtrasyon hızının (GFR) 60 ml/dk/1,73 m²'nin altına inmesi durumu olarak tanımlanmaktadır(17). Komplikasyonların patofizyolojisinde temel rol almasından dolayı KBH sınıflamasında GFR değerlerini temel alan bir sınıflandırma oluşturulmuştur(18). Bu

sınıflandırmaya göre KBH'nın SDBY olarak adlandırılan son evresinde GFR değeri dakikada 15 ml'den azdır (Tablo 1.)(18).

Tablo 1. GFR değerine göre KBH evreleri

Evre	Tanım	GFR (ml/dk/1.73 m2)
1	Normal veya artmış GFR ile böbrek hasarı	>90
2	İlımlı GFR düşüşü ile birlikte olan böbrek hasarı	60 - 90
3	Orta derecede GFR düşüşü	30 - 60
4	Ciddi GFR düşüşü	15 - 30
5	Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY)	<15

Türk Nefroloji Derneği 2016 yılı Türk Böbrek Kayıt Sistemi Raporu'na göre pediatrik vakalar dahil olmak üzere Türkiye'de 2016 yılı sonu itibariyle SDBY insidansı bir milyon kişide 140 hasta olarak belirtilmiştir(19).

B. SDBY HASTALARINDA RENAL REPLASMAN TEDAVİLERİ

Son dönem böbrek yetersizliği gelişen hastalarda hemodiyaliz (HD), periton diyalizi (PD) veya böbrek nakli gibi renal replasman tedavileri kullanılmaktadır. Aynı hasta, üç tedavi seçeneğinden de zaman içerisinde yararlanmak durumunda kalabilir(20). Ülkemizde 2016 yılsonu itibariyle SDBY nedeni ile renal replasman tedavisi (RRT) yapılan hastaların dağılımına bakıldığında hastaların %80.3'ünün HD ve %9.1'inin PD hastası olduğu; hastaların %10.6'sına ise böbrek nakli yapıldığı görülmektedir(19).

1. Hemodiyaliz

Hemodiyaliz (HD) ile böbreğin solüt ve sıvı atımı fonksiyonları gerçekleştirilmektedir. Solüt atılımı esas olarak yarı geçirgen bir membran aracılığıyla kan kompartmanından diyaliz kompartmanına difüzyon yöntemiyle geçmesiyle oluşur. Burada çok sayıda temel prensip rol oynamaktadır. Klirens küçük moleküller için daha fazladır. Kan ve diyaliz solüsyonu arasındaki konsantrasyon farkı arttıkça difüzyon o kadar hızlı olmaktadır(21). Hemodiyaliz sürekli tekrarlanması gereken bir tedavi yöntemi olduğu için dolaşım sisteminde kalıcı bir giriş yoluna

ihtiyaç vardır. Bu yol arteriovenöz fistül açılarak, sentetik arteriovenöz graft yerleştirilerek ya da venöz yola perkutan bir katater yerleştirilerek sağlanabilir ve SDBY hastalarında en yaygın kullanılan RRT yöntemidir(21).

2. Periton Diyalizi

Periton diyalizi (PD) dünya genelindeki toplam diyaliz hastalarının %11'ini oluşturmaktadır(22). PD ile atık maddelerin ve sıvının uzaklaştırılması için hastanın kendi periton membranı kullanılmaktadır. Erişkinde uygulanan periton diyalizinde periton kavitesine yerleştirilen bir katater kullanılarak fizyolojik konsantrasyonlarda elektrolit (asit baz dengesini ve elektrolit bozukluklarını düzeltmek üzere) ve değişen konsantrasyonda glukoz içeren solüsyonlar periton içine verilir, belirli bekleme periyotları sonrasında sıvı drene edilir ve işlem tekrarlanır. Solütlerin vücuttan temizlenmesi kan ve periton sıvısı arasında oluşan konsantrasyon farkına bağlı olarak meydana gelir ve difüzyonla gerçekleşir. Diyaliz solüsyonuna artan konsantrasyonlarda glukoz eklenmesiyle osmotik ultrafiltrasyon sağlanır. Glukoz tarafından oluşturulan osmotik basınç etkisiyle ekstraselüler sıvı ve dokulardan periton sıvısına su geçişi meydana gelmektedir(20).

3. Böbrek Nakli

Böbrek nakli, SDBY gelişmiş olan hastalardaki en iyi RRT yöntemidir ve bu hastalar diyaliz hastaları ile karşılaştırıldığında daha iyi yaşam kalitesi ile daha uzun süreli yaşama sahiptirler(1-3). Böbrek nakli başarı oranı kadaverik nakillerde on yıllık %50'nin altında olmasına karşın, canlı vericiden böbrek nakli yapılan hastalarda on yıllık başarı oranı %60'ın üzerindedir(20).

Allograft terimi aynı türün kalıtsal olarak farklı üyeleri arasında nakledilen graftı tanımlar. Alıcıya immunsupresif ilaçlar verilmediğinde süreç genellikle rejeksiyonla sonuçlanmaktadır. Böbrek nakli sonrası başarı için; “İnsan Lökosit Antijeni” (HLA) uyumu, hastada verici HLA'larına karşı oluşmuş antikorların varlığı ve immunsupresif tedavi önemli yer tutmaktadır(20).

C. İMMUN YANIT

İmmun yanıt, doğal ve edinsel immün yanıt olmak üzere iki çeşittir. Doğal immün yanıtta, makrofajlar, nötrofiller, doğal katil (NK) hücreler, toll-like reseptörler ve komplemanlar rol

oynamakta iken; edinsel immun yanıtta özellikle T ve B hücreleri önemli rol oynamaktadırlar(23).

1. Doğal İmmun Yanıt

Doğal immun sistem bireyin bir antijene, o antijenle temas etmeden önce gösterdiği dirençtir. Olaya özgül değildir ve enfeksiyon ajanlarına karşı deri ve müköz zarlar gibi mekanik engelleri, NK hücreleri, nötrofiller, makrofajlar gibi bazı hücreleri, kompleman sistemi ve sitokinleri kapsar. Doğal immun sistem; dış kaynaklı metillenmemiş DNA, virüslere özgü çift iplikli ribonükleik asit (RNA), lipopolisakkaritler gibi bakteriyel duvar proteinleri ve iç kaynaklı ısı şok proteinleri tarafından uyarılır(24). İmmunitenin yapı taşları, konak hücrede bulunmayan, buna karşın farklı mikroorganizmalar üzerinde ortak olarak bulunan yapıları tanır. Doğal immunité aynı etkenle her karşılaşmasında benzer biçimde yanıt oluşturur(24).

2. Edinsel İmmun Yanıt

Edinsel immun yanıt, doğal bağışıklık sistemini aşan etkenlerle karşılaştıktan sonra oluşur ve her temas sonrası daha da güçlenerek gelişir. Edinsel immun yanıtın temelinde lenfositler ve oluşturdıkları antikor gibi yapılar rol oynamaktadır. Edinsel immun sistemin hedefinde özgün yabancı immunojenler ve yabancı proteinlerin epitoplari vardır. Belirgin bir uyaran ya da antijene karşı başlayan olaylardır(24).

İmmun sistemin farklı bileşenlerinin aracılık ettiğı ve farklı mikroorganizma tiplerini ortadan kaldırmak üzere rol oynayan iki çeşit edinsel immun yanıt vardır. Edinsel immunité farklı hücre ve yapıların rol oynadığı hüморal ve hücreşel immuniteden oluşmaktadır(25).

a. Hüморal İmmunité

Hüморal immunitede, B lenfositlerinin salgıladığı antikorlar ile vücuttaki savunmada rol oynanmaktadır. Antikorlar mikrobik antijenleri tanımakta, yabancı antijenlerin enfeksiyon oluşturma özelliğini nötralize etmekte ve ortadan kaldırılmak üzere çeşitli efektör mekanizmalara yönlendirmektedirler. Hüморal immunité hücre dışı antijenler ve bunların toksinlerine karşı geliştirilen ilk savunma mekanizmasıdır. Antikorlar bu mikroorganizmalara bağlanarak, pek çok farklı efektör mekanizmayı harekete geçirebilecek özelliktedir (Şekil 1)(25).

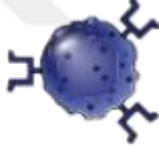
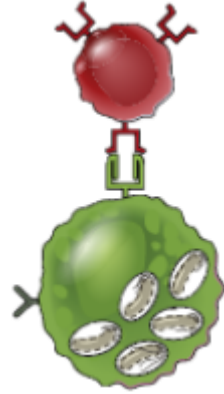
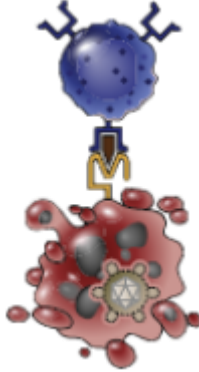
b. Hücreşel İmmunité

T lenfositlerin aracılık ettiğı immun yanıtıdır. Virüsler ve bazı bakteriler gibi hücre içi yabancı antijenler, fagositler ve diğer konak hücrelerin içerisinde yaşamaktadırlar. Bu sebeple dolaşımdaki antikorların bu mikroorganizmalara ulaşması mümkün olmamaktadır. Hücreşel

immunitede T lenfositler ya fagosit edilmiş mikroorganizmaları öldürmek üzere makrofajları aktive eder ya da sitotoksik T lenfositler infekte hücreyi doğrudan öldürmektedir (Şekil 1)(25).

Edinsel immunitenin temel hücreleri lenfositler (T, B ve NK), antijen sunan hücreler (ASH) ve efektör hücrelerdir. Lenfositler yabancı antijenleri özgül olarak tanıyan ve yanıt veren hücrelerdir. Antijenleri tanıma, şekilleri ve işlevlerindeki farklılıklar lenfositlerin alt gruplarını tanımlar(25).

Şekil 1. Hücresel ve Hümöral İmmünite

	Hümöral İmmünite	Hücresel İmmünite	
Mikrop	 Hücre dışı mikroplar	 Makrofaj içerisinde yaşayan mikroplar	 İntraselüler mikrop
Yanıt Hücresi	 B Lenfosit	 Yardımcı T Hücresi	 Sitotoksik T Hücresi
Etki mekanizması	 Antikor salınımı ile	 Makrofaj aktivasyonu ile	 Enfekte hücrenin öldürülmesiyle

Fonksiyon	Enfeksiyon önlenir ve hücre dışı mikrop yok edilir	Fagosite edile mikroplar yok edilir	Enfekte hücre öldürülerek enfeksiyon kalıntıları temizlenir
------------------	--	--	--

(1). B Lenfositler

B lenfositler, kanda dolaşan lenfositlerin yaklaşık olarak %20–30 kadarını oluşturmaktadırlar. B lenfositler, kemik iliğinde hematopoietik kök hücrelerden gelişimlerine başlamakta ve insanda yine burada olgunlaşmalarını tamamlamaktadırlar. Hümmoral immuniteden sorumlu hücreler olup, dolaşıma çıkan B hücreleri olgunlaştıkça antikor yapacakları antijene göre değişmekte ve böylece özel bir antikor üretimi için programlanmış olmaktadır. B hücreleri yüzeylerinde reseptör olarak glikoprotein yapısındaki immunglobulin (Ig) moleküllerini taşırlar. B lenfositlerinin yüzeyinde IgM, IgD ve IgG'nin Fc kısmına karşı reseptörler vardır. Yüzeylerinde Ig moleküllerini taşıyan B hücreleri, antijenik bir uyarı aldıklarında, aktive T hücreleri ve makrofajlardan salınan çoğalma ve farklılaşma faktörlerinin de etkisi altında 12 saat içinde çoğalırlar ve plazma hücrelerine dönüşerek antikor salgırlar(25, 26).

(2). T Lenfositler

T lenfositleri, hücre aracılı immüniteden sorumludur. T lenfositlerin çoğunun antijen reseptörleri, yalnızca antijen sunan hücreler olarak adlandırılan özel hücrelerin yüzeyinde, ana histo-uyumluluk kompleksi (major histocompatibility complex - MHC) molekülleri olarak adlandırılan özel peptit görüntüleme moleküllerine bağlı protein antijenlerinin peptit fragmanlarını tanır. T lenfositleri arasında CD4 + T hücreleri yardımcı T hücreleri (Th) olarak adlandırılır, çünkü B lenfositlerinin antikor üretmelerine ve fagositlerin yutulan mikropları yok etmelerine yardımcı olmalarına yardımcı olurlar. CD8 + T lenfositlerine hücre içi mikropları barındıran hücreleri öldürdükleri için sitotoksik T lenfositleri (cT) denir. Bazı CD4 + T hücreleri, bağışıklık tepkilerini önleme veya sınırlama işlevi gören özel bir alt kümeye aittir ve bunlara düzenleyici T lenfositleri denir(27).

B ve T lenfositler oldukça farklı ve spesifik antijen reseptörleri eksprese ederler ve edinsel immun yanıtların özgüllüğünden ve hafızada tutulmasından sorumludurlar(25, 26). Genel olarak, bir antijene karşı immun yanıtın oluşması, onun T lenfositler tarafından tanınmasıyla başlar. Edinsel bağışıklığın başlaması ve gelişmesi için antijenlerin yakalanması ve özel lenfositlere gösterilmesi gereklidir. Antijenler dinlenme halindeki Th lenfositine; monosit,

makrofaj, dentritik hücreler (DH), glia hücreleri, derinin langerhans hücreleri gibi ASH'ler tarafından sunulurlar(28). Mononükleer fagositler ve foliküler DH'ler de ASH özelliğine sahip hücrelerdir. B hücreleri de özel şartlarda T hücrelerine antijen sunarlar. Bu hücreler dış ortamdan hücre içine giren mikrobik ajanları yakalar ve immun yanıtları başlatmak üzere bu antijenleri naif T hücrelerine sunar(27). Lenfositlerin antijenle aktivasyonu efektör hücreler olarak adlandırılan hücrelerin katılımıyla antijenin ortadan kaldırılmasını sağlar. Aktive olmuş T lenfositler, mononükleer fagositler ve diğer lökositler, immun yanıtların farklı basamaklarında efektör hücreler olarak görev alırlar(27, 28).

Hem B hem de T lenfositler, kemik iliğinde ortak bir öncüden köken alırlar. B hücre gelişimi kemik iliğinde devam ederken, T hücre öncüleri timusa göç eder ve olgunlaşır(28). Olgunlaşmadan sonra, B ve T hücreleri kemik iliği ve timusu terk edip dolaşıma katılır ve periferik lenfoid organlara yerleşirler(27, 28). İmmun sistem dokuları T ve B lenfositlerin olgunlaştığı ve antijene yanıt verebilecek hale geldiği kemik iliği ve timusdan oluşan primer lenfoid organlar (üretken, merkezi lenfoid organlar) ile naif lenfositlerin antijenle karşılaştığı lenf nodu ve dalak gibi periferik lenfoid organlardan (sekonder lenfoid organlar) oluşur. B ve T hücre olgunlaşması, antijen reseptör gen segmentlerinin somatik rekombinasyonunu ve B hücre öncülerinde Ig moleküllerinin, T hücre öncülerinde ise hücre reseptörü (THR) moleküllerinin ekspresyonunu içerir. B ve T hücrelerinin antijen reseptörleri sınırlı sayıdaki gen segmentinin somatik rekombinasyonu ile oluşan genler tarafından kodlanır(28).

D. BÖBREK NAKLİNDE İMMUNOLOJİK PARAMETRELER

Yaklaşık altmış sene önce Boston'da ilk defa yapılan tek yumurta ikizleri arasındaki böbrek naklinde rejeksiyon olmadığı gösterilmiştir. Ancak tek yumurta ikizi haricindeki tüm nakil operasyonlarında, nakledilen organ alıcı immun sistemi tarafından tanınmakta ve tedavi uygulanmazsa alıcı immun sistemi allograftı tahrip etmeye yönelik davranmaktadır(29).

Böbrek naklinde alıcı-verici arasındaki immünolojik farklılıklar nakil başarısının önündeki en önemli engellerdir. Nakil başarısını sağlayabilmek için nakil öncesinde kan grubu antijenleri, Doku Grubu Antijenleri (HLA), Panel Reaktif Antikor (PRA), Donör Spesifik Antikor (DSA), Cross-match testleri (Kompleman bağımlı sitotoksikite (CDC) ve Flow Sitometrik Cross Match (FCXM)) yapılmaktadır(30).

1. Kan Grubu Antijenleri

ABO kan grubu antijenleri sadece eritrositler üzerinde değil damar endotel hücrelerinin üzerinde de eksprese olmaktadır. ABO uyumsuz nakillerde, A ve/veya B antikorlarının varlığı hemaglutinasyona yol açmakta ve hiperakut rejeksiyon gerçekleşmesine sebep olmaktadır. Bu yüzden organ nakillerinde alıcı-verici arasındaki ABO uyumu kan transfüzyonlarındaki kadar fazla önem teşkil etmektedir. Ancak Rh faktörü ve diğer eritrosit antijenleri endotelyumda eksprese olmadığından ABO uyumu kadar önemli değildir(31).

2. Doku Grubu Antijenleri

Major Doku Uyumu Kompleksi (MHC) olarak adlandırılan transplant antijenleri ya da başka deyişle MHC glikoproteinlerinin genleri 6. Kromozomun kısa kolunda lokalizedir(23, 29). İnsanda, MHC molekülleri İnsan Lokosit Antijeni (HLA) olarak adlandırılmıştır. Bu antijenlerin, tam kan transfüzyonu sonrası ve gebelik esnasında, alloantikorların ortaya çıkmasına neden olduğu anlaşılmıştır. Uzun yıllar alıcı ve verici arasındaki antijen ve antikora dayalı doku uyum testlerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Graft reddi ise bu antijenleri kodlayan genlerin çok yapıli olmalarından kaynaklanmaktadır(23, 29).

MHC molekülleri Sınıf I ve Sınıf II moleküllerinden oluşmaktadır. Sınıf I molekülleri (HLA-A, B, C) tüm çekirdekli hücrelerde eksprese olur ve genelde endojen kaynaklı küçük antijenlere karşı CD8+ sitotoksik T hücrelerine (Tc) sunulur. Sınıf II molekülleri ise (HLA-DR, DQ, DP), CD4+ T hücrelerine, ekstraselüler kaynaklı proteinleri sunarlar. Her bireyde CD4+ T ve CD8+ T hücreleri, sadece bireyin HLA molekülleri tarafından sunulan peptidleri tanımak üzere farklılaşmıştır. Allojenik HLA moleküllerinin tanınması güçlü bir T hücre reaksiyonunun ortaya çıkmasına sebep olur(23, 32).

Nakillerde alıcı-verici arasındaki HLA uyumsuzluğu kronik rejeksiyon ve greft kaybının başlıca sebeplerinden biridir. Özellikle böbrek naklinde HLA-A, B, DR lokuslarının tiplendirmesi yapılmaktadır(32, 33). Böbrek nakillerinde, uzun dönem greft sağ kalımı için HLA uyumu çok önemlidir. Böbrek nakli için HLA uyumunu sıralamaya koymak gerekirse en önemli dokunun HLA-DR daha sonra HLA-B ve HLA-A şeklinde olduğu gösterilmiştir. Bu parametrelerdeki gelişmeler günümüzde böbrek allograft sağ kalımını arttırsa da allograft rejeksiyonu nakil sonrası immun yanıtların bir sonucu olarak oluşur(23, 30).

3. Panel Reaktif Antikor

Panel Reaktif Antikorlar (PRA); gebelik, kan transfüzyonu ve geçirilmiş nakillerle oluşan ve vericinin antijenlerine karşı alıcıda oluşmuş antikorlara verilen genel addır. Sensitizasyon gelişmesi olarak tanımlanan PRA'nın oranının belirlenmesi böbrek nakli öncesi bakılması gereken önemli bir parametredir. Nakil olacak hastanın yüksek oranda PRA'ya sahip olması, böbrek nakli şansını düşüren ve hastanın uzun süre böbrek bekleme listesinde kalmasına sebep olan bir durumdur(30).

4. Donör Spesifik Antikor

Donör Spesifik Antikorlar (DSA); alıcının serumunda vericinin antijenlerine karşı daha önceden oluşmuş anti-HLA antikorların varlığını göstermektedir. Nakil öncesinde daha önceden oluşmuş DSA'nın saptanması, antikor aracılı hiperakut rejeksiyonu öngörmek için gereklidir(23, 30).

5. Cross Match Testleri

Cross-match, DSA belirlemek için kullanılan en temel immünolojik testtir. Vericinin lenfositleriyle alıcının serumu arasında bir reaksiyon olup oluşmadığının gözlendiği önemli bir parametredir. Cross-match testi, “kompleman bağımlı sitotoksite” (CDC) ve “flow-sitometrik cross match” (FCXM) olarak adlandırılan iki farklı yöntemle yapılmaktadır(34). FCXM, CDC'ye göre daha hassas bulguların elde edildiği bir testtir. T ve B lenfositlerin ayrılarak sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorlarının belirlenmesinde kullanılan FCXM testinin değerlendirilmesi, nakil sonrası rejeksiyon riskini azaltmaktadır(23, 30).

E. ALLOGRAFT REJEKSİYON TİPLERİ

Farmakolojik alandaki gelişmelerle birlikte böbrek nakli sonrası rejeksiyon oranları geçmişe oranla ciddi oranda azalmıştır. Bununla birlikte nakil sonrası rejeksiyon, nakilli hastalarda hala önemli bir sorun olarak yer almaya devam etmektedir(3). Kabaca rejeksiyon evrelerine bakıldığında; allograft, alıcı vücuduna girdiği andan itibaren alıcı T hücrelerine antijen sunmaya başlamakta, T lenfositleri antijenle aktive olup rejeksiyon sürecini başlatmaktadırlar(29, 35). Nakil sonrası rejeksiyon; hiperakut, akut ve kronik rejeksiyon olmak üzere kabaca üç kısma ayrılabilir(36).

1. Hiperakut Rejeksiyon

Hiperakut rejeksiyon, hastada daha önceden oluşmuş antikorların verici endotelial hücrelerine bağlanması aracılığı ile gerçekleşen bir olaydır. Hasta kan damarlarının graft damarlarına (renal arter ve renal venine) anastomozundan sonra dakikalar içerisinde oluşur(37). Hiperakut rejeksiyon, nakledilen doku damarlarında hızlı trombotik oklüzyon ve iskemik nekrozla karakterizedir. Hiperakut rejeksiyonun sebeplerinden önemlileri ABO uyumsuzluğu ve alıcı serumundaki yüksek titredeki DSA'dır(37, 38). Hiperakut rejeksiyonda verici böbrek endotelinde, anastomoz yapılır yapılmaz gelişen ve önlenemeyen hasar ve buna bağlı intravasküler tromboz gelişmekte ve allograft nekroza gitmektedir(38). Eğer alıcıdaki antikor titresi düşük seviyedeysen hiperakut rejeksiyon ilk 24 saat ile birkaç gün arasında gelişebilir. Bu duruma da akselere akut rejeksiyon (ve ya gecikmiş hiperakut rejeksiyon) denilmektedir(38). Günümüzde yapılan DSA ve CDC testi ile hiperakut rejeksiyon gelişmesi önlenmektedir(37, 38).

2. Akut Rejeksiyon

Akut rejeksiyon (AR), genellikle nakil sonraki birkaç gün veya ilk haftadan sonra başlayan T hücreleri, makrofajlar ve antikorlarla yönlendirilen vasküler bir olay ve parankimal bir yaralanmadır. Genellikle nakil sonrası ilk haftada başlar ve ilk üç ay akut rejeksiyon açısından en riskli zamandır. Sonraki dönemde çıkan akut rejeksiyonlar geç akut rejeksiyon olarak adlandırılır ve hem tedaviye olan yanıtları hem de prognoza olan etkisi daha kötüdür. İki farklı immunopatolojik mekanizma akut rejeksiyonu hücresel ve humoral akut rejeksiyon olarak iki alt gruba ayırır(37, 39).

a. Hücresel Akut Rejeksiyon

Antijen sunan hücreler (ASH) tarafından alıcıdaki T lenfositlerin uyarılması ve verici alloantijenlerinin sunulmasıyla gerçekleşen hücre aracılı rejeksiyon, rejeksiyonun en genel formudur. Greftin içindeki olgunlaşmamış dendritik hücreler, transplant organından alıcının dokularına verici antijenlerini taşır. Alıcının ASH'leri de grafta doğru giden bu sirkülasyona katılır. ASH'ler alıcıdaki T hücrelerini aktive ederler ve aktive T hücreleri alt gruplarına farklılaşarak immün atak sonucu grafta zarar verirler(40-42).

Makrofaj, dendritik hücreler ve B hücreleri, yüzeyindeki HLA molekülleri ve immünoglobulinleri kullanarak antijen sunma fonksiyonu göstererek T hücre aktivasyonuna

neden olurlar. Bunun dışında epitelyal ve endotelyal hücreler de antijen sunarak T hücre aktivasyonunu sağlarlar(41, 43).

Hücre aracılı akut rejeksiyon tedavi edildiğinde inflamasyon mediatörlerinin infiltrasyonu hızlıca azalırken, ödem, tübüler inflamasyon ve hücre defekti bir süre daha kalabilir. Subklinik rejeksiyon ise hiçbir klinik belirti göstermeksizin başarılı tedaviden sonra hücre aracılı akut rejeksiyonun morfolojik halidir(3).

b. Hümorale (Antikor Aracılı) Akut Rejeksiyon

Antikor aracılı rejeksiyon, transplantasyon sonrası günler içinde hatta haftalar içinde ortaya çıkmaktadır. Temel olarak inflamasyona sekonder graft hasarıyla sonuçlanmaktadır(40, 44). Alıcıdaki antikorların ana hedefi, vericideki peritübüler ve glomerüler kapillerin endotelyumlarının üzerinde beliren HLA antijenleridir. Aynı zamanda anjiotensin II tip I (AT1) reseptör antikorları, kortikosteroid dirençli hipertansiyonlu alıcılarda vasküler rejeksiyondan sorumlu olsa da patolojik rolü açıklanmamıştır(40, 45). Endotelyal hücre yıkımı çeşitli moleküllerin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu moleküller, platelet agregasyonunu, sitokin ve kemokinlerin aktivitelerini ve salınmalarını başlatan von Willebrand faktör ve P-selektin molekülleridir. Sitokinlerden IL-1a, IL-8 ve kemokinlerden CCL2 (C-C motif ligand 2), glomerüllerde lökosit birikimiyle glomerüler hasara, peritubuler kapillerin genişlemesine ve kemoatraklardan C3a ve C5a salınımına neden olur(40, 46). C4d, klasik kompleman yolağı belirteçdir, sıklıkla peritübüler kılcak damarlarda bulunur ve antikor aracılı rejeksiyonla ilişkili kompleman aktivasyonu için belirteçdir(46). C5b, membran atak kompleksini (C5b-C9) tetikleyerek lokalize olduğu bölgede endotelyal nekrozis ve apoptoza neden olur(46). Erken tanı, tedaviye potansiyel zarar vereceği bilinen antikorların transplantasyon öncesi tespiti, antikor aracılı rejeksiyona doğru giden graftın sağ kalımı açısından önemlidir(40, 47).

3. Kronik Rejeksiyon

Kronik rejeksiyon, uzun dönemdeki graft fonksiyon bozuklukları için kullanılan genel bir tanımdır. Kronik allograft nefropatisi terimi kronik rejeksiyon yerine tercih edilen bir terimdir. Kronik rejeksiyon, uzun dönemde oluşan normal organ yapısının kaybı ve fibrozis ile karakterizedir. Arterler, tübüller, interstisyum ve glomerüllerde kronik değişiklikler meydana gelir. Kronik değişikliklerin çoğu immunolojik aracılı olan ya da olmayan kronik organ hasarının farklı şekillerinden kaynaklanabilir. İmmunolojik nedenler arasında HLA uyumu, geçirilmiş akut rejeksiyon atakları, PRA düzeyi, DSA varlığı, sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu ve yetersiz immunosupresyon yer alır. İmmunolojik olmayan faktörler, nakil

zamanındaki iskemik hasar, hipertansiyon, hiperlipidemi, proteinüri, ilaç toksisitesi, nefroskleroz, kısmi obstrüksiyon, reflü ve kronik enfeksiyon, hasta ve verici yaşı, ırk, cinsiyet, grafttaki nefron sayısı sayılabilir(48-50). Histopatolojik olarak, interstisyel infiltrasyon ve fibrozis, tübüler atrofi, glomerüloskleroz, bazal membranda membranoproliferatif glomerülo nefrite benzer çift kontur görünümü, damar duvarında kalınlaşma ve lümende daralma gözlenmektedir(50). Genelde böbrek nakli sonrası üçüncü aydan sonra gelişmektedir ve böbrek fonksiyonundaki progresif azalma ile tesbit edilmektedir(40).

F. KEMOKİNLER

Kemokinler; kemotaksi, lökosit degranülasyonu, hematopoez ve anjiyogenez dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer alan küçük, yüksek oranda korunmuş proteinlerin (8 ile 12 kDa arası) bir ailesidir(51). Kemokinler aslında kemotaktik sitokinler olup hem normal şartlarda hem de enflamasyon anında lökosit trafiğinde kritik rol oynayan küçük proteinlerdir(52, 53). Kemokinler immün uyaran sırasında hücrelerden cevap olarak üretilen küçük proteinler olup, lökositlerin hücre membranındaki G proteinine bağlı reseptörlerine bağlanarak onları aktive ederler. Böylelikle aktive olan lökositler damar duvarına yapışmakta, morfolojik değişikliğe uğramakta ve kemokin yoğunluğu boyunca inflamasyon veya yaralanma alanına doğru göçleri gerçekleşmektedir(54).

İnsan genomunda yaklaşık elli farklı kemokin kodlandığı bilinmektedir. Kemokinler genellikle dört korunmuş sistein kalıntısının ilk ikisinin sıralı konumlandırmasına dayalı olarak “CXC ve CC” diye iki büyük gruba ve “CX3C ve XC” diye iki küçük gruba ayrılmaktadır(53, 54). Kemokinler, alt aile sınıflandırmalarına göre, CCL, CXCL, CX3CL veya XCL gibi bir ek almaktadırlar. Buradaki “L” bir reseptöre karşılık bir ligand anlamına gelmektedir. Ardından bir tanımlayıcı numaradan oluşan sistematik isimlerle tanımlanır(54, 55).

Dizi sınıflandırmasına ek olarak, kemokinler biyolojik rollerine göre proinflamatuvar ve dengeleyici (homeostatik) kemokinler olarak da kategorize edilmektedirler. Enflamatuvar kemokinler, enflamatuvar koşullar altında düzenlenmiş olanlardır ve temel olarak lökositlerin iltihaplı dokulara alınmasında rol oynamaktadırlar. Bunların arasında, birinci sistein kalıntısından hemen önce bir ELR (Glutamatik asit – Lösin - Arginin) motifine sahip olan CXC kemokinler, özellikle nötrofillerin göçünü indüklemektedir. Böylece nötrofillerin kan dolaşımını terk etmek ve çevre dokuya girmelerini sağlarlar. Bunun yanında da muhtemelen kemokin reseptörleri CXCR1 ve CXCR2 aracılığıyla anjiyogenik özelliklerinin de olduğu

düşünülmektedir. Oysa CXCL4, CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 ve CXCL13 gibi ELR motifi olmayalar ise anjiyostatik kemokinler olup lenfositler için güçlü bir kemoatraktan olma eğilimindedirler(10, 12, 56).

Homeostatik kemokinler, yapısal olarak lenfoid veya diğer organlarda eksprese edilenlerdir ve normal olarak homeostatik göçte çeşitli hücrelerin (lenfositler dahil) toplanmasına aracılık ederler. Bazı kemokinler ise, iki türlü de fonksiyon gösterdiklerinden çift fonksiyonlu kemokinler olarak adlandırılır(54, 56).

CXCL11 pro-inflamatuvar rolü olan bir kemokin olup, interferon gama ile indüklenerek T hücrelerinin uyarılmasında görev almaktadır(57). CXCL 11, viral enfeksiyonlarda, multiple skleroz ve Graves hastalığı gibi inflamatuvar hastalıklarda yükselmekte olup bazı çalışmalarda böbrek nakli sonrası allograft nefropatilerinde önemli rolü olduğu belirtilmiştir(10, 13).

CXCL13 ise lenfositler için kemoatraktan olma eğilimindedir ve immünitede önemli rol oynamaktadırlar. Bu kemokin, B-1 ve B-2 alt kümelerine ait B hücreleri için seçici olarak kemotaktiktir ve reseptörü olan CXCR5 ile etkileşerek etkilerini ortaya çıkarır. CXCL13 ve reseptörü CXCR5, lenf dokularının folikülleri içindeki B hücrelerinin düzenlenmesini kontrol eder(10).

CC kemokinler anjiogenezin dâhil olduğu inflamatuvar süreçlerde oldukça önemli rol oynamaktadırlar. CCL2 doğal bağışıklık ve yardımcı T hücre cevabında önemli rol oynamakta olup; CCL5 ise doğal bağışıklığın yanında sonradan kazanılan bağışıklık sisteminde de anahtar rol almaktadır(14, 15). CCL2, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) olarak da bilinmektedir. Adından da anlaşılacağı üzere monositlerin aktive olmasını ve endotel hücreleri arasından inflame alana göç etmesini indüklemektedir. Bunun yanında T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin de aktive olmalarını sağlamaktadırlar. Ayrıca anjiogeneizde ve ateroskleroz patofizyolojisinde de rol aldığı gösterilmiştir(58).

CCL5, üç kemokin reseptörüne (CCR1, CCR3 ve CCR5) birden etki eden ve çok sayıda hücrede yüksek oranda indüklenebilir olan, çok yönlü kemokinlerden biridir. Hem trombosit granüllerinde hem de bellek veya efektör CD8 + T hücrelerinin sitoplazmik granüllerinde bol miktarda depolanır(56). Bu pro-enflamatuvar kemokin, lökositleri iltihaplanma bölgelerine çekmek için hem endotel hücreleri hem de aktive edilmiş lökositler tarafından salgılanır. Hücre göçüne ek olarak, CCL5'in protein tirozin kinazlar yoluyla genelleştirilmiş T hücresi aktivasyonuna neden olma kabiliyeti ve apoptozun indüklenmesi için önemli olduğu bilinmektedir(59).

Tablo 2. *Kemokinler ve özellikleri*

Kemokinler	ELR motifi	Biyolojik Rol	Diğer İsim	Hedef Hücre
CCL2	-	İnflamatuar	MCP-1	Monosit, T hücreleri, Bazofil, NK hücresi, Progenitör hücreler
CCL5	-	İnflamatuar	RANTES	T hücreleri, Eozinofil, Bazofil, NK hücresi, Dendritik hücreler
CXCL11	Yok	İnflamatuar	I-TAC	T hücreleri
CXCL13	Yok	Dengeleyici	BLC	B hücreleri

III. HASTALAR VE YÖNTEMLER

A. Çalışma Populasyonu

Bu çalışmada Nisan 2013 ve Mart 2019 tarihleri arasında canlı vericiden böbrek nakli operasyonu yapılan hastalar değerlendirilmiştir. Yaş aralığı 18 ile 65 arasında olan toplam 91 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmanın protokolü, iyi tıbbi ve laboratuvar uygulamalarına ve Helsinki'nin Biyomedikal Araştırmalar Deklarasyonu'nun tavsiyelerine uygundur.

Hastaların preoperatif dönemde RRT alıp almadığı ve eğer aldıysa hangi RRT çeşidi olduğu kaydedildi. Ayrıca nakil sonrası 1. gün, 7. gün, 1. ay ve 3. aydaki kreatinin değeri, GFR değeri, ilaç (takrolimus) düzeyi ayrıca kayıt altına alındı. Klinik olarak biyopsi planlanan hastalar rutin dışı olarak yeniden değerlendirildi. İdrar yolu enfeksiyonu ve ilaç toksisitesi durumları da ayrıca kayıt altına alındı. Rejeksiyon hastaları Banff 97 sınıflandırma ve güncellemelerine göre sınıflandırıldı(60, 61).

B. Biyopsi Endikasyonları ve Değerlendirmesi

Akut allograft reddinin klinik şüphesini uyandıran serum kreatinin düzeyinin bazal serum kreatinin düzeyinden 1.5 kat ve üzerinde artış olması, ve / veya de novo persistan proteinüri (> 1 g / 24 saat) oluşması biyopsi için endikasyon olarak kararlaştırıldı. Biyopsiler aynı nefropatolog tarafından değerlendirildi. Böbrek biyopsisi, hematoksilen / eozin, periyodik asit Schiff (PAS), periyodik asit metenamin gümüşü (PAMS) ve trikrom boyaları ile boyandıktan sonra ışık mikroskopisi altında incelendi. Donmuş doku üzerinde IgG, IgM, IgA, C3, C1q, kappa, lambda ve fibrinojene konjuge antikorlarla immünofloresan boyama da

yapıldı. Biyopsilerin ışık mikroskopik özellikleri tüm biyopsilerdeki Banff kriterleri ile skorlandı.

Parafine gömülü doku blokları üzerindeki C4d boyama (anti-C4d antikoru, poliklonal; Cell Marque, Lahey, Hollanda) ayrıca otomatik boyama sistemi ile immünohistokimya kullanılarak (Ventana Bench Mark XT, IHC / ISH otomatik boyama platformları, Roche diagnostics Ltd., Rotkreuz, İsviçre) yapıldı. Peritübüler kılcal damarlardaki doğrusal ve çevresel boyama, son Banff puanlama sistemine (C4d> 0) göre pozitif olarak kabul edildi. Son patolojik tanı için Banff 2013 tanı kategorileri ve ilgili kriterler kullanıldı (Tablo 3).

C. Hasta grupları

Tüm hastalar allograft fonksiyonuna göre ve eldeki klinik ve gerekirse yapılan allograft biyopsisine dayanan bir tanı kategorisine göre akut rejeksiyon olanlar veya allograft disfonksiyonuna yol açan diğer sebepler (BK enfeksiyonu, kalsinörin inhibitör toksisitesi veya izole interstisyel fibroz ve tübüler atrofi gibi) olarak kategorilere ayrıldı. Tüm hastalar greft fonksiyonlarına göre “stabil greft fonksiyonu” (rejeksiyon olmayan) ve “rejeksiyon” olarak sınıflandırıldı.

D. İmmünosüpresif Protokol

Çalışmaya dahil edilen böbrek nakli alıcılarının immünosüpresif tedavisi, bir kalsinörin inhibitörü (takrolimus) ile mikofenolat mofetil (MMF) veya mikofenolat sodyum (MNa) ve prednizolon (Pred) kombinasyonundan oluşmaktaydı. Akut hücresel rejeksiyon epizotları, üç gün boyunca günlük yüksek dozda intravenöz metilprednizolon (500 mg) ile tedavi edildi; refrakter olgularda, 10 ile 14 gün süresince ATG (antitimosit globülin) (2 mg / kg / gün)) tedavisi verildi.

E. Klinik Sonuçlar

Çalışmanın birincil sonuçlanma noktası, böbrek nakli alıcılarında izlem sırasında biyopsi ile kanıtlanmış akut rejeksiyon oluşmasıydı.

Hastaların demografik özellikleri, ameliyat süreleri, soğuk ve sıcak iskemi süresi analiz edildi. Serum kreatinin (sCr) düzeyleri ve tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR), nakil öncesi ve nakilden sonraki 1. günde, 7. günde, 1. ayda ve 3. ayda değerlendirildi. eGFR, MDRD (the Modification Diet in Renal Disease Study) formülü kullanarak hesaplandı. Ameliyat öncesi ve sonrası immünolojik veriler (HLA yanlılığı sayısı ve post-transplant HLA antikor durumu) değerlendirildi. Akut ret atakları ve nakilden sonraki altı ay içerisinde greft kaybı da kaydedildi.

Tablo 3. 2013 Banff sınıflamasına göre renal allogreft biyopsi değerlendirilmesi

1- Normal
2- Antikor-aracılı rejeksiyon - Akut antikor-aracılı rejeksiyon Grade I: ATN benzeri C4d+, minimal inflamasyon Grade II: Kapiller zedelenme ve/veya tromboz, C4d+ Grade III: Transmural arteritis ve/veya arteriyel fibrinoid değişiklik ve damarlarda lenfositik infiltrasyonla medial düz kas nekrozu, C4d+ - Kronik aktif antikor-aracılı rejeksiyon Glomerüler double kontur ve/veya peritübüler kapiller bazal membranında tabakalanma ve/veya interstisyel fibrozis/tübüler atrofi ve/veya arterlerde fibröz intimal kalınlaşma, C4d+
3- Border-line değişiklikler: Şüpheli akut T-hücreli aracılı rejeksiyon: İntimal arterit bulguları olmadan hafif tübülit
4- T-hücre aracılı rejeksiyon - Akut T-hücre aracılı rejeksiyon • Grade IA: Anlamli interstisyel infiltrasyon (>%25 parankimal etkilenme) ve orta derecede tübülitis • Grade IB: Anlamli interstisyel infiltrasyon (>%25 parankimal etkilenme) ve belirgin derecede tübülitis • Grade IIA: Hafif-orta intimal arterit • Grade IIB: Lümen alanın >%25' ini tutan belirgin intimal arterit • Grade III: Transmural arterit ve/ veya fibrinoid değişiklik ve düz kas hücrelerinde nekroz (eşlik eden lenfositik inflamasyon) - Kronik aktif T-hücre aracılı rejeksiyon - Kronik allogreft arteriopati (arteriyal fibrozis, fibroziste mononükleer hücre infiltrasyonu, yeni intima formasyonu)
5- Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis, spesifik etyoloji olmadan - Grade I (hafif): Hafif derecede interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi (kortikal alanın <%25)

- Grade II (orta): Orta derecede interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi (kortikal alanın %26-50)
- Grade III (şiddetli): Şiddetli derecede interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi (kortikal alanın> %50)

6- Diğerleri: Akut ve kronik rejeksiyonu düşündürmeyen bulgular.

F. Örneklerin Toplanması

Toplam 91 hastadan idrar örnekleri nakil öncesinde ve nakil sonrası 1. günde, 7. günde, 1. ayda, 3. ayda ve varsa rejeksiyon sırasında toplandı. Alınan idrarlardan RNA elde etmek amacı ile ‘Jena Bioscience – Total RNA Purification Kit’ kullanıldı.

1. RNA izolasyonu

100 µl idrar örneği mikrosintifüj tüplerine aktarıldı. Örneklerin üzerine 2-Mercaptoethanol eklenmiş olarak 500 µl Lizis Tamponu eklendi ve 10 saniye süre ile vortex yapılarak karıştırıldı. Tüpler 10000xg’de 10 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen süpernatant yeni tüplere aktarıldı. Aynı bir alanda spin kolonlar toplama tüplerine yerleştirildi ve kolonlar üzerine 100 ul aktivasyon buffer eklendi. 10000xg’de 30 saniye santrifüj yapıldıktan sonra toplama tüpündeki sıvı atıldı. (kolon aktivasyonu). İlk santrifüjde yeni tüplere aktarılan süpernatant üzerine 300ul izopropanol eklendi ve vortexlendi. Karışım aktive edilen spin kolonlara yüklendi ve 10000xg’de 30 saniye santrifüj yapıldı alt sıvı atıldı. Kolon üzerine 700ul ilk yıkama buffer’ı eklendi ve 10000xg’de 30 saniye santrifüj yapıldı alt sıvı atıldı. Sonrasında 700ul ikinci yıkama buffer’ı eklendi ve 10000xg’de 30 saniye santrifüj yapıldı alt sıvı atıldı. Kolonlarda kalan etanolden tamamen uzaklaştırmak için bir şey eklenmeden 10000xg’de 2 dk santrifüj yapıldı ve kolonlar çıkarılarak yeni toplama tüplerine aktarıldı. Kolon filtresi üzerine 40 ul Elution Buffer eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında inkube edildi. İnkubasyondan sonra 10000xg’de 1 dk santrifüj yapıldı ve çözünen RNA’ların dibe inmesi sağlandı. Kolonlar atılarak tüpler -20’de saklandı.

2. cDNA Sentezi

Hastalardan izole edilen RNA eldesinden sonra diğer işlem olan komplementer DNA (cDNA) elde edildi. cDNA elde etmek amacıyla hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience

firmasının (Alman menşeli Cat no: PCR511) Script cDNA sentez kiti (Tablo 4.) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları 300ng/μL olacak şekilde eşitlendi. Toplam hacim 20 μL olacak şekilde reaksiyon örnek başına Tablo 4’te olduğu gibi gerçekleştirildi.

Tablo 4. cDNA sentez kiti içeriği

Reaktifler	Hacimleri (μL)
RNase free su	10,5
Script RT buffer	4
dNTP mix	0,5
Oligo dT Primer	0,5
DTT	1
RNase Inhibitor	0,5
RT Enzyme	0,5
RNA ürün	2

Hazırlanan reaksiyon karışımı pipetaj yapıldıktan sonra kuyucuklara dağıtıldı ve ardından RNA ürünleri dağıtıldı. Daha sonra 96 well plate içine konulan standart ve örnek karışımları Biorad CFX Connect cihazına konularak reaksiyon Tablo 5’de gösterildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edile ürün -20 °C’de saklandı.

Tablo 5. cDNA sentezinde sıcaklık ve reaksiyon süreleri

Sıcaklık	Süre
50°C	60 dakika
42°C	10 dakika
72°C	10 dakika

CXCL11, CXCL13, CCL2 ve CCL5 genlerinin renal transplantasyon yapılmış olan hastalardaki gen ekspresyon seviyelerinin rejeksiyondaki rolü olabileceği düşünüldüğünden, bu genlerin olası ekspresyon değişimleri için gen ifade analizleri yapıldı.

3. Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR Reaksiyonu

cDNA eldesinden sonra diğer işlem olan Gerçek Zamanlı kantitatif PCR (qPCR) işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının (Alman menşeli Cat no: PCR 360) qPCR ProbesMaster kiti kullanılarak Real-Time PCR gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Bunun için 1 µl Taqman probe, 7 µl PCR grade su, 10 µl qPCR ProbesMaster ve 2 µl cDNA içeren reaksiyon karışımı hazırlandı. Daha sonra 96 well plate içine konulan standart ve örnek karışımları Biorad CFX Connect cihazına konularak reaksiyon Tablo 6'daki gibi gerçekleştirildi. Cihaz protokolünde okuma, bağlanma ve uzama basamağının sonuna eklendi.

Tablo 6. Real-time PCR reaksiyon basamakları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon ve Polimeraz Aktivasyon	95°C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95°C	15 saniye	{ 40 döngü
Bağlanma ve Uzama	60°C	1 dakika	

Gerçek zamanlı kantitatif PCR ile karşılaştırmalı ölçümler SYBR Green kullanılarak elde edilmiştir ve referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

Ekspresyon analizi amacıyla uygulanan qPCR'de her bir örnek için triplike çalışma gerçekleştirildi. PCR verimi 2 olarak belirlendi.

G. İstatistiksel analiz

Ekspresyon verilerinin istatistiksel analizi CXCL11, CXCL13, CCL2 ve CCL5 gen ekspresyon düzeyleri GAPDH referans geni kullanılarak araştırıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{Hasta} - Ct_{Referans})}$ yöntemi ile hesaplandı(62). İstatistiksel analizler için SPSS 21.0 yazılımı kullanıldı. Hasta örneklerin karşılaştırmalı mRNA düzeylerini incelemek için Mann-Whitney U testi uygulandı. Mann-Whitney U testi, iki farklı grup örneği karşılaştırmak için kullanılan, parametrik olmayan bir testtir.

Demografik verilerin analizi için öncelikle sayısal değerlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı test edildi ve rejeksiyonlu hasta grubu ile rejeksiyonsuz hasta grubu arasında ki karşılaştırmalar için parametrik testlerden student t testi kullanıldı. Kategorik veriler için ki kare ve fisher's exact test kullanıldı.

H. Etik Kurul

Çalışma protokolü, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakóltesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 29.03.2019 tarih ve 06 sayılı toplantısında görüşölmüş ve etik yönden uygun bulunmuş olup tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.



IV. BULGULAR

Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda canlı böbrek vericisinden böbrek nakli yapılan 91 hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların ortalama yaşı 35 (en düşük: 18, en yüksek: 65) olarak saptandı. Çalışmadaki hastaların 53'ü erkek iken 38'i kadın hastaydı. Hastalar nakil sonrası en az üç ay süre ile takipte kalmış olup ortalama takip süresi 46.8 aydı.

Hastaların 12 tanesinde daha önceden böbrek nakli öyküsü olup 79 hasta primer böbrek nakilliydi. Ayrıca böbrek nakilli hastalar renal replasman açısından değerlendirildiğinde 39 hastaya böbrek nakli öncesi diğer renal replasman tedavilerinden herhangi birisi yapılmamış, hastalar preemtif olarak ameliyata hazırlandı. RRT alan hastaların dağılımına bakıldığında ise 46 hasta böbrek nakli öncesinde hemodiyaliz programına alınmış, 4 hastaya periton diyalizi uygulanmış, 2 hastaya ise nakil öncesi belli bir dönem periton diyalizi uygulandıktan sonra nakil zamanına kadar hemodiyaliz programına alınmıştır.

Böbrek nakli olan hastaların vericileri incelendiğinde, 38 verici erkek ve 53 verici ise kadındı. Vericilerin ortalama yaşı 49'du ve ortalama eGFR değeri 116'dı. Hastaların ve donörlerin demografik ve klinik bilgileri Tablo 7 ve Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7: Hastaların demografik ve klinik bilgileri

Parametreler	Hasta (n=91)
Yaş ± SS	36.34 ±12.94
Kilo, kg	66.39±12.82
VKİ (ortalama ± SD)	25.6±2.6
Cinsiyet (n)	
Erkek	53 (%58.2)
Kadın	38 (%41.8)
Takip Süresi ortalama (SD) ay	46.84 ±23.98
Nakil öncesi RRT (n)	
Preemptif	39
HD	46
PD	4
HD+PD	2
Primer Böbrek Hastalığı (n) (%)	
Kronik glomerulonefrit n (%)	32 (%35.2)
IgA Nefropatisi, n (%)	15 (%16.5)
Vezikoüreteral Reflü, n (%)	10 (%10.9)
Diyabetik Nefropati, n (%)	7 (%7.7)
Hipertansiyon, n (%)	6 (%6.6)
MPGN, n (%)	5 (%5.5)
Diğer n (%)	16 (%17.6)
Preoperatif İndüksiyon (n)	
Yok	65
Basiliximab	18
ATG	8

Tablo 8: Donör demografik ve klinik bilgileri

Parametreler	Donör (n=91)
Yaş (ortanca)	49 (27-78)
VKİ (ortalama)	27.8±4.1
Cinsiyet (n)	
Erkek	38
Kadın	53
Preop eGFR (ortalama)	116±26.9

Böbrek nakli yapılan hastalara ait ortalama hastanede kalma süresi, allografta ait sıcak ve soğuk iskemi süreleri, nakil sonrası biyopsi durumları, postoperatif takip dönemindeki klinik durumları Tablo 9’da gösterilmektedir.

Tablo 9: Hastaların peroperatif ve postoperatif bulguları

Parametreler	Değer
Soğuk iskemi süresi (dk)	61±19.8
Sıcak iskemi zamanı, dak	4.79±3.46
Hastanede kalma süresi	16.93±11.48
Toplam rejeksiyon	20 (%22.0)
Biyopsi	14 (%15.4)
Klinik rejeksiyon	14 (%15.4)
T hücre aracılı rejeksiyon	4 (%4.4)
Antikor aracılı rejeksiyon	2 (%2.2)
Kronik rejeksiyon	1 (%1.1)
Biyopsi kanıtlı rejeksiyon	10 (%50.0)
Akut Tubüler Nekroz	3 (%3.3)
İlaç toksisitesi	10 (%11.0)
Bk virus	10 (%11.0)
CMV	3 (%3.3)

Çalışmaya alınan hastaların takibinde 20 hastada klinik ya da biyopsi ile doğrulanmış olarak rejeksiyon gelişti. Takip süresi boyunca graft disfonksiyonu saptanması nedeni ile toplam 14 hastaya allograft biyopsisi yapıldı. Biyopsi yapılan 4 hastada akut T hücre ilişkili rejeksiyon, 2 hastada antikor aracılı rejeksiyon, 3 hastada şüpheli borderline değişiklikler, 3 hastada İgA nefropati nüksü, 1 hastada ilaç toksisitesi ve 1 hastada da akut tubuler nekroz saptanmıştır. Postoperatif takip süresi boyunca toplamda 20 hasta klinik olarak rejeksiyon düşünülmesi veya biyopsi ile kanıtlanmış rejeksiyon saptanması sebebi ile yükleme dozunda (pulse) steroid tedavisi ya da ATG tedavisi aldı. Rejeksiyon gelişen hastaların 5'i kadın, 13'ü erkek hastaydı.

Takip süresi boyunca stabil graft fonksiyonu olan ve rejeksiyon gelişen hastalar arasında yaş, cinsiyet oranı, kilo, sıcak ve soğuk iskemi süreleri ile hastanede kalış süreleri arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 10). Ayrıca iki hasta grubu arasında preoperatif anti-HLA antikor pozitifliği veya negatifliği, nakil sonrası anti-HLA pozitifliği veya negatifliği, HLA

uyumsuzluğu açısından da istatistiksel fark saptanmadı. Hastaların nakil süresince almış oldukları immunsupresif tedaviler açısından da her iki grupta farklılık saptanmadı (Tablo 11).

Tablo 10: Hasta gruplarında demografik verilerin karşılaştırılması

Parametreler	Rejeksiyonlu hasta grubu (n=20)	Rejeksiyonsuz hasta grubu (n=71)	p
Yaş ± SS	35.85 ±12.89	38.05 ±13.29	0.507
Kadın/Erkek (n) (%)	7 (%35.0)/13 (%65.0)	31 (%43.7)/40 (%56.3)	0.488
Takip süresi ortalama (SD), ay	50.75 ±23.42	45.74 ±24.19	0.413
Kilo, (kg)	64.55 ±13.69	66.94 ±12.61	0.468
İlk/İkinci nakil (n) (%)	15 (%75.0)/5 (%25.0)	64 (%90.1)/7 (%9.9)	0.077
Soğuk iskemi zamanı, (dak)	53.45±23.44	61.15±20.64	0.609
Sıcak iskemi zamanı, (dak)	5.15±3.60	4.69±3.44	0.161
Hastanede kalma süresi (gün)	20.37±11.09	16.00±11.49	0.143

Tablo 11: Hasta gruplarının immünolojik ve klinik değerlendirilmesi

Parametreler	Rejeksiyonlu hasta grubu (n=20)	Rejeksiyonsuz hasta grubu (n=71)	p
Nakil öncesi anti HLA antikor Negatif/Pozitif	15(%75.0)/5 (%25.0)	56 (%78.9)/15 (%21.1)	0.864
HLA mismatch	2.28±0.46	2.35±0.52	0.212
Nakil sonrası anti HLA antikor Negatif/Pozitif	12(%60.0)/8 (%40.0)	54 (%76.0)/17 (%24.0)	0.101
FK+MMF+Pred	14 (%70)	50 (%70.4)	0.843
FK+EC-MYFNa+Pred	6 (%30)	21 (%29.6)	

FK: takrolimus, MMF: mikofenolat mofetil, EC-MYFNa: enterik kaplı mikofenolat sodyum, Pred: prednol

Rejeksiyon gelişen hastalar ile stabil böbrek fonksiyonu olan hastalar değerlendirildiğinde preoperatif dönemdeki ve postoperatif ilk gündeki serum kreatinin değerleri arasında istatistiksel fark yokken, postoperatif 7. gündeki ($p=0.041$) ve rejeksiyon zamanındaki ($p=0.001$) serum kreatinin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. eGFR değeri de benzer şekilde postoperatif 7. günde rejeksiyon grubunda istatistiksel olarak daha düşük saptandı ($p=0.03$ ve $p=0.001$) (Tablo 12).

Tablo 12: Hasta grupları arasında serum kreatinin ve eGFR değerlerinin karşılaştırılması

Parametre	Zaman	Rejeksiyonsuz hasta (n:71)	Rejeksiyonlu hasta (n:20)	p
Kreatinine (mg/dL)	Nakil öncesi	7.20±1.73	6.78±1.49	0.461
	1. gün	2.04±1.21	2.54±1.57	0.136
	7. gün	1.14±0.37	2.13±1.95	0.041*
	1. ay	1.25±0.35	1.85±0.65	0.089
	3. ay	1.30±0.16	1.29±0.34	0.854
Ortalama 21 (IQR 5-90)	Rejeksiyon zamanında	1.22±0.23	3.92±1.27	0.001*
	Tedavi sonrası	1.12±0.13	1.41±0.22	0.147
Parametre	Zaman	Rejeksiyonsuz hasta (n:71)	Rejeksiyonlu hasta (n:20)	p
eGFR (ml/min)	Nakil öncesi	8.89±1.27	8.41±1.33	0.54
	1. gün	49.34±2.17	45.56±2.34	0.09
	7. gün	77.07±4.41	68.24±5.32	0.03*
	1. ay	78.27±0.39	76.04±4.38	0.62
	3. ay	88.34±6.28	86.22±5.39	0.43
Ortalama 21 (IQR 5-90)	Rejeksiyon zamanında	81.12±4.79	58.37±6.52	0.001*
	Tedavi sonrası	89.22±7.33	85.87±7.31	0.106

Rejeksiyon açısından risk faktörleri açısından yaş, cinsiyet, sıcak ve soğuk iskemi, anti-HLA durumu, immüsupresif tedavi rejimi çok değişkenli analizde değerlendirildiğinde stabil graft fonksiyonu olanlar ile rejeksiyon saptanan hastalar arasında parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 13).

Tablo 13: Multivariable logistic regression analizi rejeksiyon riski için

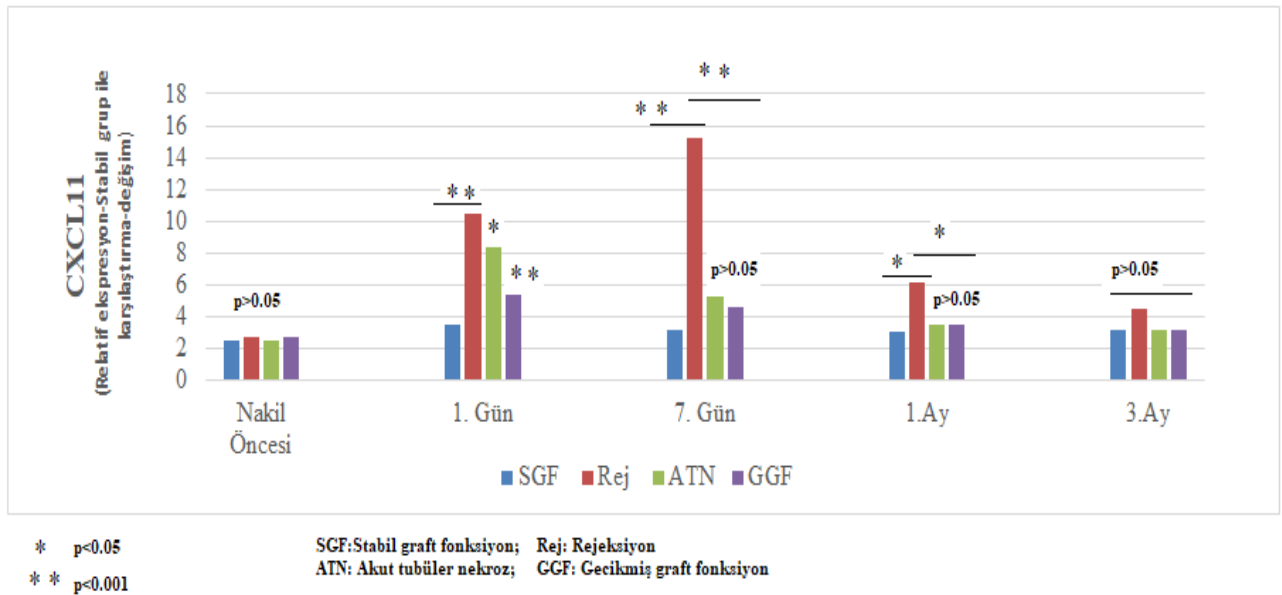
Parametreler	OR	Güven Aralığı	p değeri
Yaş	1.32	1.89-3.22	0.511
Cinsiyet	1.27	0.48-3.22	0.345
Soğuk iskemi	0.61	1.64-3.87	0.347
Sıcak iskemi	0.46	2.32-4.14	0.531
anti-HLA antibody	1.28	1.99-6.11	0.247
HLA mismatch	1.04	0.51-2.27	0.104
Immüsupresif tedavi	0.73	0.37-2.29	0.377

Hastaların operasyon öncesinde idrar numunelerinde bakılan CXCL11 gen ekspresyonunun, stabil allograft fonksiyonu (SGF) ile nakil sonrası allograft rejeksiyonu gelişen veya diğer sebeplerle allograft disfonksiyonu (ATN, Gecimiş graft fonksiyonu) gelişen hastalarda benzer olduğu ($p>0.05$) görüldü. Buna karşın rejeksiyon grubunda postoperatif birinci ve yedinci günde CXCL11 gen ekspresyonunun sırasıyla yaklaşık 4 kat ve 5.2 kat daha yüksek olduğu ve stabil böbrek fonksiyonu olan hastalar ile karşılaştırıldığında yüksek derecede istatistiksel anlamlı olduğu saptandı ($p<0.001$) (Şekil 2). Postoperatif birinci ayda ise iki grup arasındaki farkın daha az olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde rejeksiyon grubunda ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğu ($p<0.05$) ancak üçüncü ay gen ekspresyon düzeyinin iki grup arasında benzer olduğu saptandı. Ayrıca akut tubuler nekroz düşünülen veya gecikmiş graft fonksiyonu olan hastalarda postoperatif birinci günde gen ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu ($p<0.05$) ve ATN hastalarında 1. Gündeki CXCL11 ekspresyonunda SGF grubuna göre 3.5 kat artış tesbit edildi. Ancak nakil

sonrası yedinci gün ve sonrasında ATN ve Gecikmiş graft fonksiyonu (GGF) olanlar ile SGF hastaları arasında anlamlı fark saptanmadı.

Takiplerinde ilaç toksisitesi gelişen, idrar veya kanda CMV ve BK virüs pozitif saptanan hasta grubu ile stabil hasta grubunu karşılaştırdığımız zaman tüm kemokin grupları arasında sadece CXCL11 ekspresyonunun BK virüs hasta grubunda 1. ayda 4 kat olarak artmış olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0.05$). Diğer zamanlarda ve kemokinlerde bu gruplarda stabil hasta grubuna göre ekspresyonda artma gözlenmedi ($p>0.05$).

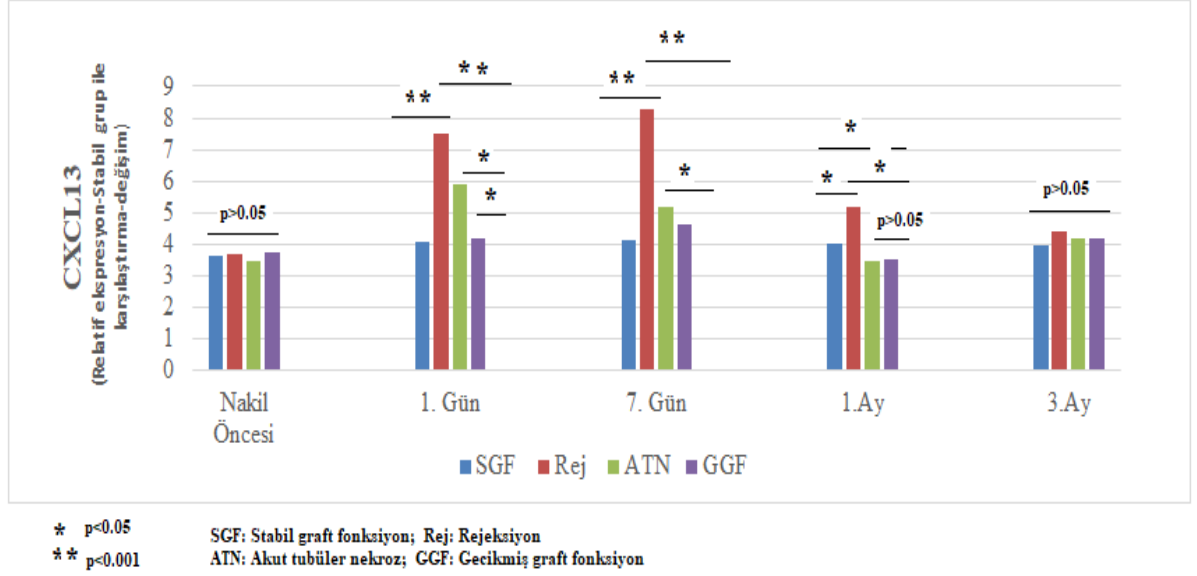
Şekil 2: CXCL11 idrar gen ekspresyon düzeyinin gruplar arasındaki farkları



İdrar örneğinde gen ekspresyon düzeyi araştırılan CXCL13 kemokini değerlendirildiğinde, CXCL11 ile benzer olacak şekilde nakil öncesinde tüm gruplarda gen ekspresyon düzeyinin benzer seviyede olduğu görüldü ($p>0.05$). Nakil sonrası 1. ve 7. günde rejeksiyon grubunda CXCL13 gen ekspresyon düzeyinin stabil böbrek fonksiyonu olan hastalar, akut tubuler nekrozu olan ve gecikmiş graft fonksiyonu olan hastalara göre yüksek istatistiksel oranda arttığı saptandı. Stabil graft fonksiyonu olan hastalara göre rejeksiyon grubunda CXCL13 gen ekspresyon düzeyi nakil sonrası 1. ve 7. günde sırasıyla 3.5 kat ve 4 kat daha yüksek olduğu saptandı. Nakil sonrası birinci ayda ise rejeksiyon hastalarındaki CXCL13 gen ekspresyonu düzeyinin, diğer hasta grupları ile arasındaki farkın daha az olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde rejeksiyon grubunda daha yüksek olduğu ($p<0.05$); ancak üçüncü ay gen ekspresyon düzeyinin tüm hasta grupları arasında benzer olduğu saptandı

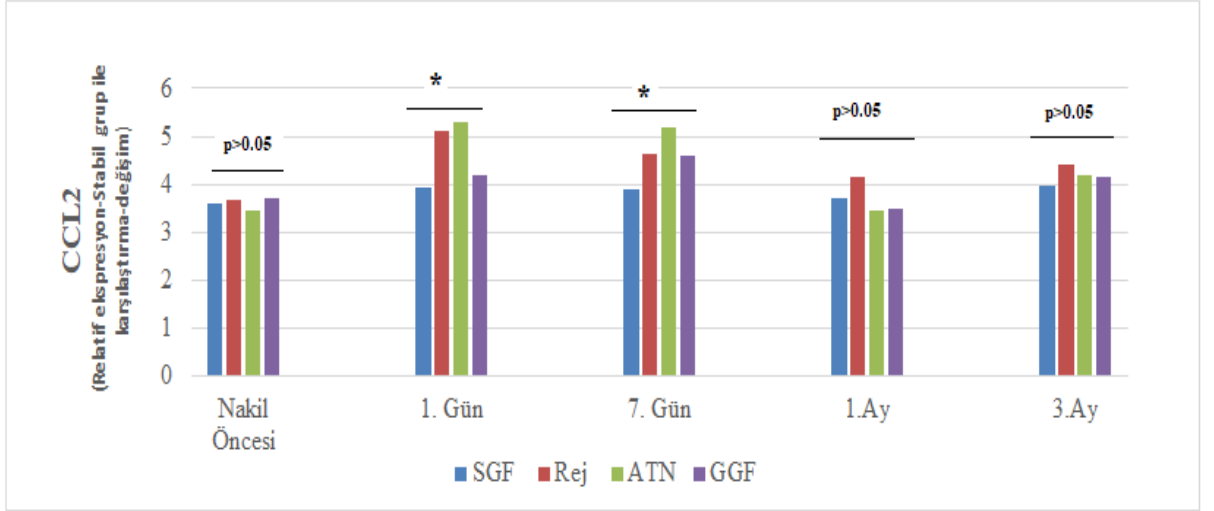
(Şekil 3). ATN hastalarında ise 1. gündeki ekspresyon düzeyi SGF grubuna göre 2 kat daha yüksek olduğu tesbit edildi. Rejeksiyon gelişen hastalardaki artış ATN grubundan 1.5 kat daha fazlaydı.

Şekil 3: CXCL13 idrar gen ekspresyon düzeyinin gruplar arasındaki farkları



CCL2 kemokinlerin gen ekspresyonu değerlendirildiğinde ise CXCL11 ve CXCL13 kemokinlere benzer şekilde nakil öncesinde gen ekspresyon düzeyi arasında gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı. Nakil sonrası birinci ve yedinci günlerde ise rejeksiyon hastalarında, akut tubüler nekroz ve gecikmiş graft fonksiyonu olan hastalarda stabil allograft fonksiyonu olanlara göre gen ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak yüksek saptandı ($p<0.01$). nakil sonrası 1. Günde CCL2 ekspresyonunun rejeksiyon grubunda SGF grubuna göre 1.5 kat daha fazla olduğu izlendi. Ancak nakil sonrası birinci ay ve üçüncü ay gruplar arasında gen ekspresyon düzeyi açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 4). ATN grubunda da SGF grubuna göre 1.5 kat daha fazla ekspresyon izlendi. Rejeksiyon ve ATN'li grup ile GGF'li grup arasında da 1.2 lik bir artmış anlamlı fark mevcuttu.

Şekil 4: CCL2 idrar gen ekspresyon düzeyinin gruplar arasındaki farkları

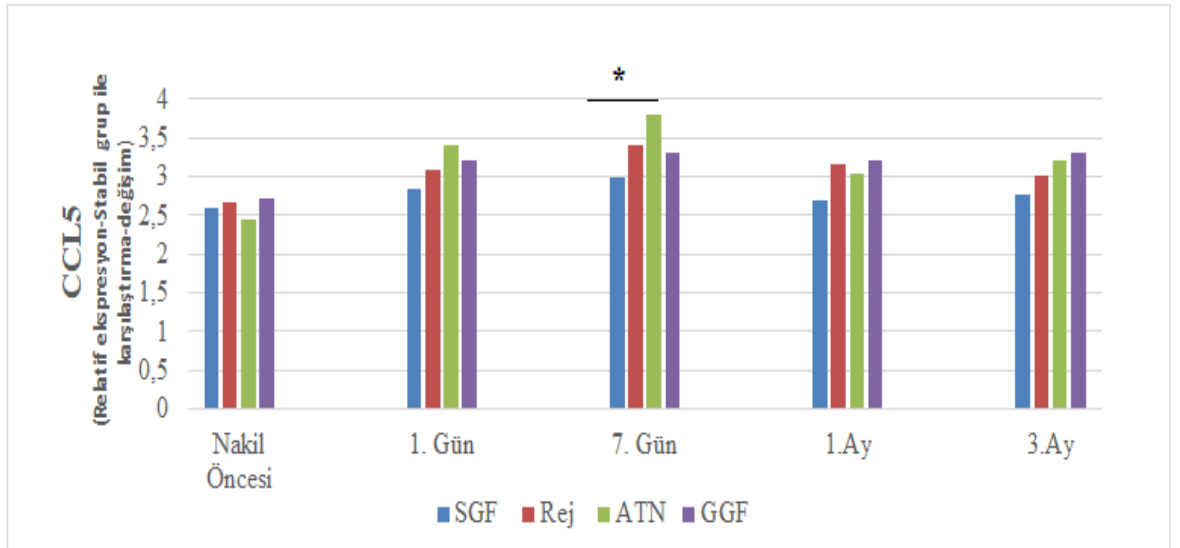


* $p < 0.05$

SGF: Stabil graft fonksiyon; Rej: Rejeksiyon
ATN: Akut tübüler nekroz; GGF: Gecikmiş graft fonksiyon

CCL5 gen ekspresyon düzeyine bakıldığında da tüm gruplar arasında nakil öncesi dönemde ve nakil sonrası 1. günde gen ekspresyon düzeyi arasında istatistiksel farkın olmadığı saptandı ($p > 0.05$). Yalnızca nakil sonrası 7. günde rejeksiyon gelişen hasta grubu ile akut tübüler nekroz saptanan hastalarda diğer gruplara göre gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel anlamlı artış gözlemlendi ($p < 0.05$). Diğer kemokinlerden farklı olarak gen ekspresyon düzeyindeki artış nakil sonrası 7. günde ATN gelişen hastalarda oransal olarak daha yüksek düzeyde saptandı.

Şekil 5: CCL5 idrar gen ekspresyon düzeyinin gruplar arasındaki farkları



* $p < 0.05$

SGF: Stabil graft fonksiyon; Rej: Rejeksiyon
ATN: Akut tübüler nekroz; GGF: Gecikmiş graft fonksiyon

V. TARTIŞMA

Böbrek nakli son dönem böbrek yetersizliği olan hastalarda, yaşam kalitesini yükselten bir replasman tedavisidir. Böbrek nakli yapıldıktan sonra nakil olan böbrek; iskemi reperfüzyon hasarı, akut ve kronik rejeksiyon, enfeksiyonlar ve hastada böbrek yetersizliğine sebep olan primer böbrek hastalığının tekrarı gibi çeşitli patolojik süreçlerle hasar görebilmektedir. Ek olarak, standart immünosüpresif tedavinin bir parçası olan kalsinörin inhibitörlerinin (takrolimus ve siklosporin gibi) kullanılması da böbrek hasarına sebep olabilmektedir(63).

Böbrek graftının durumunu izlemek için genellikle kullanılan iki belirteç, serum kreatinin değeri ve proteinürüdür. Serum kreatinin değeri, glomerüler filtrasyon hızının (GFR) bir ölçüsü olarak kullanılır ve proteinüri de glomerüler filtrasyon bariyerinde yapısal hasarı göstermektedir(63). Graftın durumunun global göstergeleri olarak pratik olmasına rağmen, serum kreatininin değerindeki ve proteinürideki artışlar genellikle nakilli böbrek hasarı gördükten sonra görülmektedir. Bununla birlikte, bu parametreler altta yatan farklı patolojiler arasında ayırım yapılmasına izin verememektedir. Böbrek graft hasarının ciddiyetini ve nedenini değerlendiren geleneksel “altın standart” yöntem ise böbrek biyopsisi yapılarak histopatolojik incelemenin yapılmasıdır. Bununla birlikte, böbrek grefti biyopsisi alınması ciddi komplikasyon riskleri olabilen olan invaziv bir işlemdir(3, 64). Ek olarak, fokal birkaç alandan alınan biyopsi örneği ile böbrek graft patolojisinin niteliği, böbrek biyopsisinin tanısal değeri için sınırlayıcı bir faktördür. Böbrek biyopsisinin yukarıda belirtilen

sınırlamaları nedeniyle, erken evrede invaziv olmayan bir şekilde çeşitli graft patolojisi tipleri hakkında bilgi sağlayabilen kanda veya idrarda yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi önemlidir.

Bu çalışmada SDBY nedeni ile canlı vericiden böbrek nakli yapılan hastaların idrardaki CXCL11, CXCL13, CCL2 ve CCL5 gen ekspresyon seviyelerinin allograft fonksiyonu ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir.

Kemokinlerle ilgili daha önce yapılan çalışmalarda idrardaki CXCL9 ve CXCL10 seviyelerindeki yükselmenin allograft rejeksiyonu ile korele olduğu ve rejeksiyon gelişen hastalardaki erken dönemdeki CXCL9 ve CXCL10 seviyelerinin rejeksiyon gelişmeyen hastalara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir(65).

İnterferon γ (IFN- γ)- CXCR3 ve ligandı arasındaki döngü inflamasyonda önemli olup vücutta yabancı antijenlere karşı inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunda anahtar bir rol oynamaktadır(66). Ayrıca IFN- γ , CXCR3 ve ligandı arasındaki ilişki T hücre bağımlı akut rejeksiyon açısından da önemlidir. CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) ve interferon ile indüklenen T hücre kemoatraktanı olan CXCL11 (I-TAC), CXCR3 reseptörünün spesifik ligandlarıdır(66).

Protokol biyopsileri ile yapılan çalışmada da AR saptanan hastalarda CXCL11 ligandı ekspresyonunun stabil böbrek fonksiyonu olanlara göre 7.2 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir(67). Yine 138 allograft biyopsisi ile yapılan çalışmada interstisyel rejeksiyon ve vasküler rejeksiyon saptanan hastalarda immünohistokimya boyamada CXCR3 reseptörünün patoloji saptanmayan biyopsilere göre daha fazla yer kapladığı görülmüş olup, CXCR3 ligandları olan CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 üriner düzeylerinin akut allograft rejeksiyonunu predikte etmede önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir(68). Ayrıca Huang H. ve ark. tarafından yapılan ve 32'sinde T hücre bağımlı akut rejeksiyon gelişen toplam 70 hastanın değerlendirildiği çalışmada, akut rejeksiyonu olan hastalarda serum I-TAC, MIG ve IP-10 düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı belirtilmiştir(69). Biyopsi ile kanıtlanmış allograft disfonksiyonu olan 73 hasta ve stabil böbrek fonksiyonu olan 26 hasta ile yapılan diğer bir çalışmada ise idrar CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 düzeylerinin AR, akut tubuler hasar ve BK virüs nefropatisi olan hastalarda istatistiksel olarak yüksek saptandığı ve bu üçlü testin kronik rejeksiyon hastaları ile stabil böbrek fonksiyonu olan hastaların idrarında ya hiç saptanmadığı ya da oldukça düşük düzeyde olduğu belirtilmiştir(70).

Bizim çalışmamızda ise idrardaki CXCL11 gen ekspresyonu düzeyi nakil öncesi dönemde tüm gruplar arasında benzer düzeyde saptandı. Bununla birlikte takiplerinde rejeksiyon gelişen hastalarda nakil sonrası ilk günde ve 7. günde CXCL11 gen ekspresyon seviyesi stabil böbrek fonksiyonu olan hastalara göre sırasıyla yaklaşık olarak 4 kat ve 5.2 kat yüksek olarak saptandı ($p<0.001$). Nakil sonrası birinci ayda da oran azalsa da gruplar arasında gen ekspresyon düzeyi farkı rejeksiyon grubunda daha yüksek olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı şekilde devam etti ($p<0.05$).

Böbrek nakli yapılan ve ilk bir yıl içerisinde AR gelişen hastaların yaklaşık %90'ında rejeksiyon tipi, T hücre aracılı rejeksiyondur. Bununla birlikte graft içinde biriken B hücrelerinin T hücre aracılı rejeksiyonda önemli olduğu ve prognozu kötü etkilediği bilinmektedir(71). CXCL13 kemokini, bir başka adıyla lenfoid organların özellikle de B hücre kemoatraktan kemokini CXCR5 reseptörü ile etkileşerek B hücrelerinin sekonder lenfoid organlara göçünü etkilemektedir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda akut rejeksiyonu olan ve biyopside B hücre kümeleri olan böbreklerde CXCL13 regülasyon sayısının 27 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca akut graft rejeksiyonunda B hücrelerinin böbreğe yerleşmesinde CXCL13 ve reseptörü olan CXCR5'in sorumlu olduğu ifade edilmiştir(72). Böbrek nakli yapılmış ve stabil böbrek fonksiyonu olan 14 hasta, akut rejeksiyonlu 32 hasta ve akut tubuler nekrozu olan 5 hastanın dahil edildiği çalışmada kanda periferik mononükleer hücrelerdeki CXCL10 ve CXCL13 gen ekspresyonu seviyesi araştırılmış olup, tedaviye dirençli AR hastalarında CXCL13 düzeyinin 3 kat ve tedaviye duyarlı AR hastalarında ise yaklaşık 10 kat artış olduğu belirtilmiştir(73). Bundan farklı olarak 146 renal nakilli hastanın değerlendirildiği bir başka çalışmada idrar CXCL13 düzeyi araştırılmış, stabil graft fonksiyonu olan hastalarda idrar CXCL13/kreatinin oranının akut tubuler nekroz ($p=0.001$), kronik rejeksiyon ($p=0.01$) ve AR ($p<0.001$) gelişen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu belirtilmiştir(74). Böbrek nakilli 62 hastanın değerlendirildiği başka bir çalışmada CXCL13 ekspresyonunun AR hastalarında yaklaşık 10 kat fazla olduğu, mRNA ekspresyonunun ise eğri altında kalan alanın 0.89 olduğu ve AR tanısında özgüllük ve duyarlılığın yüksek olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca serum CXCL13 protein düzeyinin de AR hastalarında 2.2 kat daha fazla olduğu da vurgulanmıştır(75).

Bu çalışmada da hastaların idrarında bakılan CXCL13 gen ekspresyon düzeyi değerlendirilmiş olup nakil öncesi hasta grupları arasında gen ekspresyon düzeyi açısından farklılık saptanmadı. Nakil sonrası ile rejeksiyon gelişen hastaların birinci ve yedinci

günlerinde alınan idrar örneklerinden bakılan CXCL13 gen ekspresyon düzeyinin stabil graft fonksiyonu olan hastalara göre sırasıyla yaklaşık birinci gün 3 kat ve nakil sonrası 7. gün 4 kat daha yüksek olduğu ve gruplar arasındaki farkın yüksek istatistiksel oranda anlamlı olduğu görüldü ($p<0.001$).

Kemokin C-C ailesinin bir üyesi olan CCL2 kemokini aynı zamanda monosit kemoatraktan protein (MCP-1) olarak da tanımlanmaktadır. Renal iskemi, ve inflamatuvar hastalıklarda ekspresyonunun arttığı bilinmekte olup, özellikle monositlerin üzerindeki CCR2 reseptörüne bağlanarak, monositlerin inflamasyon alanına çekilmesinde rol oynadığı gösterilmiştir(76). Raza ve arkadaşları, 300 böbrek nakilli hasta ve 109 sağlıklı kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada biyopsi ile kanıtlanmış rejeksiyonu olan hastalarda üriner CCL2 düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığını bulmuşlardır ($p<0.001$). Ayrıca sağlıklı kontrol grubunda ise CCL2 düzeyinin saptanamayacak düzeyde düşük olduğunu belirtmişlerdir. CCL2 düzeyinin 198 pg/ml olarak baz aldıklarında ise rejeksiyonu predikte edebilme duyarlılığının %87, özgüllüğünün ise %62 olduğunu; bu bulgularla CCL 2 düzeyinin rejeksiyonu öngörmeye potansiyel bir biyobelirteç olabileceği vurgulanmıştır(77). Hint-Minkowski ve arkadaşları ise ilk 6 yılda graft kaybı, graft fonksiyonunda azalma veya rejeksiyon gelişen böbrek nakilli hastalarda, ilk altı ayda bakılan üriner CCL2/kreatinin oranının ortanca değerinin 38.6ng/mmol olduğunu, stabil böbrek fonksiyonu olanlarda ise oranın 25.9ng/mmol olduğunu; iki hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0.009$) olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca idrar CCL2/kreatinin değeri <70 ng/mmol olan hastalarda 5 yıllık olaysız sağkalımın %88 oranında olduğu, çok değişkenli analizde ise yüksek CCL2/kreatinin değerinin böbrek fonksiyonunda bozulmayı (graft kaybı, gecikmiş rejeksiyon, GFR azalması) öngörmeye bağımsız risk faktörü olduğu vurgulanmıştır(78). Bir başka çalışmada ise böbrek nakilli hastalarda artmış idrar CCL2 değerinin şiddetli interstisyel fibrozis ve tubuler atrofi (IFTA) ile ilişkili olduğu ve idrar CCL2 düzeyinin ITFA öngörmeye bağımsız risk faktörü olduğu belirtilmiştir(79).

Bizim çalışmamızda ise takiplerinde rejeksiyon gelişen ya da ATN saptanan hastalarda idrar CCL2 gen ekspresyonunun nakil sonrası 1. ve 7. günlerde stabil graft fonksiyonu olan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). Ayrıca rejeksiyon hastaları ve ATN hastalarında nakil sonrası 1. günde SGF hastalarına göre 1.5 kat artış olduğu görüldü.

Normal T hücresi aktivasyonunu düzenlemek amacı ile salgılanan ve eksprese edilen ligand olan CCL5 (RANTES) özellikle hafıza T hücreleri, eozinofil ve monositler için kemotaktiktir. CCL5'in immun sistemdeki önemli rolünden dolayı özellikle hücrel rejeksiyonda önemli olduğu düşünülmüştür. Pattison ve arkadaşları, ilk defa 1994 yılında böbrek allograft biyopsilerinde hücrel rejeksiyon olan 20 hastanın 17'sinde CCL5 mRNA ve CCL5 proteinini saptamışlardır(80). Böbrek nakli sonrası rejeksiyon sürecindeki öneminin değerlendirilmesi amacı ile protokol biyopsilerinin gerçekleştirildiği 23 böbrek nakilli hastanın dahil edildiği başka bir çalışmada ise, böbrek biyopsilerindeki immünohistokimyasal boyamada CCL5 RNA ekspresyonunun akut rejeksiyon gelişen hastalarda sağlıklı allograft fonksiyonu olan hastalara göre 5.7 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir ($p=0.007$)(67). Ayrıca Lo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da böbrek allograft biyopsilerinde CCR5 ve CCL5'in sadece akut hücrel rejeksiyonda istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek saptandığı ($p=0.037$ ve $p=0.007$) belirtilmiş, kalsinörin toksisitesi gibi allograft disfonksiyonu olan durumlarda anlamlı artışın olmadığı vurgulanmıştır(81).

CCL5 idrar gen ekspresyon düzeyinin bakıldığı çalışmamızda rejeksiyon gelişen hasta grubu ile ATN gelişen hastalarda stabil graft fonksiyonu olan hastalara kıyasla yalnızca nakil sonrası 7. günde gen ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı saptandı ($p<0.05$). Diğer günlerde alınan örneklerde çalışılan CCL5 gen ekspresyon düzeyinin ise tüm gruplar arasında benzer oranda olduğu görüldü.

Akut rejeksiyonun erken teşhisi ve seçici immünsüpresif ajanlarla tedavisi, uzun dönem graft sonuçları için oldukça önemlidir. Nakil sonrası böbrek allograftının fonksiyonunun ve immün monitörizasyonunun takibi için yeni ve invaziv olmayan biyobelirteçlerin geliştirilmesinin, fayda risk oranlarını optimize edebilmek ve daha bireyselleştirilmiş tedavi seçenekleri için temel olmaya aday olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada rejeksiyon grubundaki hasta sayısının nisbeten az olması çalışmanın önemli kısıtlamasıdır. Çalışmanın sadece canlı vericiden böbrek nakli hastalarında yapılması ve kadaverik böbrek nakli yapılan hastaların çalışmaya dahil edilmemesi de çalışmanın kısıtlamalarındandır. Ayrıca çalışma örneği sadece idrar numunesinde yapılmış olup, serum değerleri de çalışılması ve idrar ve serum değerlerinin karşılaştırılması çalışmayı daha anlamlı yapabilirdi. Çalışmanın diğer kısıtlamaları protokol biyopsileri ile alakalı verilerin yetersiz olması ve takip süresinin kısa olmasıdır.

VI. SONUÇ

Böbrek nakli sonrasında allograft fonksiyonunun takibi oldukça önemlidir. Serum kreatinin değeri veya idrarda proteinüri varlığı ile takip protokolünde genellikle böbrek hasar gördükten sonra kreatinin düzeyinde ya da idrar protein düzeyinde değişiklik gözlenmektedir. Bu yüzden allograft fonksiyonu ile korele ve rejeksiyonu öngörmede yardımcı biyobelirteçlere ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle idrar numunesinde bakılan CXCL11, CXCL13, CCL2 ve CCL5 gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi sonucu, idrardaki CXCL11, CXCL13 ve CCL2 gen ekspresyonlarının rejeksiyon gelişen hastalarda nakil sonrası birinci ve yedinci günlerde sağlıklı graft fonksiyonu olanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. CXCL11 ve CXCL13 gen ekspresyon düzeylerinin nakil sonrası 1. ayda da rejeksiyon grubunda stabil graft fonksiyonu olan hastalardan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca nakil öncesi alınan idrar örneklerinde tüm gruplar arasında gen ekspresyon düzeyi arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak CXCL11, CXCL13 ve CCL2 gen ekspresyonlarının allograft rejeksiyonunu öngörmede önemli olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar önceki literatür verileri ile değerlendirildiğinde, bu kemokinlerin böbrek allograft rejeksiyonu ile yakından ilişkili olduğu görülmektedir. Ayrıca bu kemokinlerin idrar düzeylerinin nakil sonrası erken dönemde çalışılması ile allograft rejeksiyonu hakkında erken dönemde fikir sahibi olunabileceği, bu sayede yüksek rejeksiyon riski olan hastaların tedavilerinin kişiselleştirilebileceği düşünülebilir.

Ayrıca ilerleyen zamanlarda gen ekspresyonları dışında kemokinlerin idrar veya serum protein düzeylerinin de daha pratik olarak hesaplanması ile birlikte rejeksiyon düşünülen hastalarda biyopsi öncesi erken dönemde invaziv olmayan yöntemlerle tanı olabileceği düşünülebilir, ancak daha yüksek hasta sayısı ile daha uzun takip süreli yapılacak olan prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. T. Kocak, İ. Nane, H. Ander, O. Ziylan, T. Oktar and C. Ozsoy, "Urological and Surgical Complications in 362 Consecutive Living Related Donor Kidney Transplantations," *Urol. Int.* 2004; 72(3):252-256
2. L. Jacquemont, J.-P. Soulillou and N. Degauque, "Blood biomarkers of kidney transplant rejection, an endless search?," *Expert Rev Mol Diagn.* 2015; 17(7): 687-697
3. V. Nissaisorakarn, J. R. Lee and M. Lubetzky, "Urine biomarkers informative of human kidney allograft rejection and tolerance.," *Hum Immunol.* 2018; 79(5):343-355
4. M. Staniszewska, V. Dziedziejko, E. Kwiatkowska, M. Tkacz, K. Puchałowicz, K. Safranow, et al. "Plasma concentration of urokinase plasminogen activator receptor is a marker of kidney allograft function," *Ir J Med Sci.* 2018; 187(4):1083–1087
5. O. M. Steinmetz, U. Panzer, U. Kneissler, S. Harendza, M. Lipp, U. Helmchen and R. A. Stahl, "BCA-1/CXCL13 expression is associated with CXCR5-positive B-cell cluster formation in acute renal transplant rejection," *Kidney Int.* 2005; 67(4):1616–1621,
6. C. Youying, M. Minmin, W. Qin, Z. Juan, J. Yucheng, W. Wenhan, et al. "CXCL10 and CXCL13 Expression were Highly Up-regulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Acute Rejection and Poor Response to Anti-Rejection Therapy," *J Clin Immunol.* 2011; 31(3):414–418
7. J. Zhang, Z. Wang, Z. Xu, Z. Han, J. Tao, P. Lu, et al. "The Potential Role of IL-33 in Renal Transplant Recipients with Chronic Allograft Dysfunction.," *Ann Transplant.* ,2016; 21:611-618
8. A. Ridiandries, J. T. M. Tan and C. A. Bursill, "The Role of Chemokines in Wound Healing," *Int J Mol Sci.* 2018; 19(10): 3217
9. C. E. Hughes, R. J. B. Nibbs, "A guide to chemokines and their receptors," *The FEBS J.* 2018; 285(16):2944–2971
10. Y. Le, Y. Zhou, P. Iribarren and J. M. Wang, "Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease," *Cel Mol Immunol.* 2004; 1(2) 95-104
11. C. Murdoch and A. Finn, "Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases," *Blood*,2000; 95:3032-3043
12. J. Choi, C. Selmi, P. Leung, T. P. Kenny, T. Roskams and M. E. Gershwin, "Chemokine and chemokine receptors in autoimmunity: the case of primary biliary cholangitis," *Expert Rev Clin Immunol.*, 2016; 12(6):661-662

13. A. Kariminik, S. Dabiri and R. Yaghobi, "Polyomavirus BK Induces Inflammation via Up-regulation of CXCL10 at Translation Levels in Renal Transplant Patients with Nephropathy," *Inflammation*, 2016; 39(4):1514-1519
14. B. Coll, C. Alonso-Villaverde and J. Joven, "Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: Is there room for an additional biomarker?," *Clin Chim Acta*. 2007; 383:21-29.
15. H. Elmoselhi, H. Mansell, M. Soliman and A. Shoker, "Circulating chemokine ligand levels before and after successful kidney transplantation," *J Inflamm*. 2016; 13(32)
16. Q. Al-Awqati ve J. Barasch, "Structure And Function Of The Kidneys," *Goldman-Cecil Medicine*, Philadelphia, Elsevier, 2016, pp. 737-740.
17. P. Romagnani, G. Remuzzi, R. Glassock, A. Levin, K. J. Jager, M. Tonelli, Z. Massy, C. Wanner and H. Anders, "Chronic kidney disease," *Nat Rev Dis Primers*, 2017; 3:17088.
18. A. S. Levey and J. Coresh, "Chronic kidney disease," *Lancet*, 2012; 379(9811):165-180.
19. G. Süleymanlar, K. Ateş ve N. Seyahi, Türkiye 2016 Yılı Ulusal Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Kayıt Sistemi Raporu, Ankara: Türk Nefroloji Derneği Yayınları, 2017.
20. D. Cohen and A. M. Valeri, "Treatment Of Irreversible Renal Failure," *Goldman-Cecil Medicine*, Philadelphia, Elsevier, 2016; 841-847.
21. J. Himmelfarb and T. A. Ikizler, "Hemodialysis," *N Eng J Med*. 2010; 363(19):1833-1845
22. P. K. T. Li, K. M. Chow, M. W. V. Luijtgarden, D. W. Johnson, K. J. Jager, R. Mehrotra, et al. "Changes in the worldwide epidemiology of peritoneal dialysis.," *Nat Rev Nephrol.*, 2017; 13(2):90-103
23. D. Kumbala and R. Zhang, "Essential concept of transplant immunology for clinical practice," *World J Transplant*. 2013; 3(4):113-118
24. H. Rabb, "The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: Implication of the kidney," *Kidney Int.*, 2002; 61:1935–1946
25. A. K. Abbas, A. H. Lichtman and S. Pillai, "Introduction to the Immune System," *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 5. ed., Canada, Elsevier, 2016, pp. 1-25.
26. D. M. Francis, L. J. Dumble, L. Bowes, G. J. Clunie and I. M. Macdonald, "Adverse influence of recipient lymphoid resistance to in vitro immunosuppression on the outcome of kidney transplants.," *Transplantation*, 1988; 46(6):853-856
27. A. K. Abbas, A. H. Lichtman and S. Pillai, "Antigen Capture and Presentation," in *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 5. ed., Canada, Elsevier, 2016, pp. 55-78.

28. E. Ben-Akiva, R. A. Meyer, D. R. Wilson and J. J. Green, "Surface Engineering for Lymphocyte Programming," *Adv Drug Deliv Rev.*, 2017; 15(114):102-115
29. O. W. Hakenberg, "Renal Transplant," in *Blandy's Urology*, 3. ed., Oxford, Wiley-Blackwell, 2019, pp. 127-144.
30. F. O. Savran, "Transplantasyon İmmünolojisi," *Transplantasyon Nefrolojisi: Pratik Uygulama Önerileri*, Ankara, Buluş, 2016, pp. 27-36.
31. R. A. Montgomery, "Renal Transplantation Across HLA and ABO Antibody Barriers: Integrating Paired Donation into Desensitization Protocols," *Ame J Transplant.* 2010; 10: 449-457
32. F. G. Lakkis and M. H. Sayegh, "Memory T Cells: A Hurdle to Immunologic Tolerance," *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(9): 2402-2410
33. C. S. M. Kramer, D. L. Roelen, S. Heidt and F. H. J. Claas, "Defining the immunogenicity and antigenicity of HLA epitopes is crucial for optimal epitope matching in clinical renal transplantation," *HLA*, 2017; 90(1): 5-16
34. D. S. Warren, A. A. Zachary, C. J. Sonnenday, K. E. King, M. Cooper, L. E. Ratner, R. et al. "Successful Renal Transplantation across Simultaneous ABO Incompatible and Positive Crossmatch Barriers," *Am J Transplant.* 2004; 4(4):561-568
35. W. E. Braun, "Renal transplantation: Basic concepts and evolution of therapy," *J Clin Apher.* 2003; 18(3):141-152
36. K. Solez, R. B. Colvin, L. C. Racusen, M. Haas, B. Sis, M. Mengel, et al. "Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions.," *Am J Transplant.* 2008; 8(4):753-760.
37. N. K. Mehra and A. K. Baranwal, "Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ," *Int J Immunogenet.* 2016; 43(6):351-368.
38. R. Zhang, "Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients," *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018; 13(1):182-192.
39. A. A. J. Vaillant and B. M. Fitzgerald, "Acute Transplantation Rejection," StatPearls Publishing, Treasure Island, 2019.
40. B. J. Nankivell and S. I. Alexander, "Rejection of the Kidney Allograft," *New Eng J Med.* 2010; 363(15):1451-1462.
41. M. Yılmaz, "Akut Hücresel Rejeksiyon ve Tedavisi," *Transplantasyon Nefrolojisi: Pratik Uygulama Önerileri*, Ankara, Buluş, 2016, pp. 65-72.
42. S. J. Knechtle and S. Pastan, "Early Course of the Patient with a Kidney Transplant," *Kidney Transplantation - Principles and Practice*, China, Saunders, 2013, pp. 204-215.

43. J. Trowsdale and P. Parham, "Mini-review: Defense strategies and immunity-related genes," *Eur J Immunol.* 2004; 34(1):7-17.
44. P. I. Terasaki, "Humoral Theory of Transplantation," *Am J Transplant.* 2003; 3(6):665-673.
45. D. Dragun, D. N. Müller, J. H. Bräsen, L. Fritsche, M. Nieminen-Kelhä, R. Dechend, et al. "Angiotensin II Type 1–Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection," *New Eng J Med.* 2005; 352(6):558-569.
46. R. B. Colvin, "Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis," *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(4):1046-1056.
47. H. Feucht and M. Mihatsch, "Diagnostic value of C4d in renal biopsies.," *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005; 14(6):592-598.
48. S. Mauiyyedi, M. Crespo, A. B. Collins, E. E. Schneeberger, M. A. Pascual, S. L. Saidman, et al. "Acute Humoral Rejection in Kidney Transplantation: II. Morphology, Immunopathology, and Pathologic Classification," *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(3):779-787
49. A. Bickerstaff, R. Pelletier, J.-J. Wang, G. Nadasdy, N. DiPaola, C. Orosz, et al. "An Experimental Model of Acute Humoral Rejection of Renal Allografts Associated with Concomitant Cellular Rejection," *Am J Pathol.* 2008; 173(2):347–357.
50. W. E. Braun, N. G. Yadlapalli, "The spectrum of long-term renal transplantation: Outcomes, complications, and clinical studies," *Transplant Rev.* 2002; 16(1):22-50.
51. M. C. Miller and K. H. Mayo, "Chemokines from a Structural Perspective," *Int J Mol Sci.* 2017; 18(10):2088.
52. S. Ball and M. J. Dallman, "Immunology of Graft Rejection," in *Kidney Transplantation: Principles and Practice*, Elsevier, 2014, pp. 10-38.
53. S. Mélik-Parsadaniantz and W. Rostène, "Chemokines and neuromodulation," *J Neuroimmunol.* 2008; 198:62-68
54. M. J. Stone, J. A. Hayward, C. Huang, Z. E. Huma and J. Sanchez, "Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network," *Int J Mol Sci.* 2017; 18(2):342.
55. A. Zlotnik and O. Yoshie, "Chemokines: A new classification system and their role in immunity," *Immunity*, 2000; 12(2):121-127.
56. A. Zlotnik and O. Yoshie, "The Chemokine Superfamily Revisited," *Immunity*, 2012; 36(5):705-716.
57. T. Loos, A. Mortier, M. Gouwy, I. Ronsse, W. Put, J.-P. Lenaerts, et al. "Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring

posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation.," *Blood*, 2008; 112(7):2648-2656.

58. E. Melgarejo, M. Á. Medina, F. Sánchez-Jiménez and J. L. Urdiales, "Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes," *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41(5):998-1001.

59. X. Wang, C. Watson, J. S. Sharp, T. M. Handel and J. H. Prestegard, "Oligomeric Structure of the Chemokine CCL5/RANTES from NMR, MS, and SAXS Data," *Structure*, 2011; 19(8): 1138-1148.

60. L. C. Racusen, K. Solez, R. B. Colvin, S. M. Bonsib, M. C. Castro, T. Cavallo, et al. "The Banff 97 working classification of renal allograft pathology.," *Kidney Int*. 1999; 55(2):713-723.

61. C. Roufosse, N. Simmonds, M. C. Groningen, M. Haas, K. Henriksen, C. Horsfield, et al. "A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology," *Transplantation*, 2018; 102(11):1795–1814.

62. T. D. Schmittgen, K. J. Livak, "Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method," *Nat Protoc*. 2008; 3(6):1101-1108.

63. M. Vrie, J. K. Deegens, M. Eikmans, J. Vlag and L. B. Hilbrands, "Urinary MicroRNA as Biomarker in Renal Transplantation," *Am J Transplant*. 2017; 17(5):1160-1166.

64. S. M. Korbet, "Nephrology and the Percutaneous Renal Biopsy: A Procedure in Jeopardy of Being Lost Along the Way," *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; 7(10):1545-1547

65. H. S. Ciftci, T. Tefik, M. K. Savran, E. Demir, Y. Caliskan, Y. D. Ogret, et al. "Urinary CXCL9 and CXCL10 Levels and Acute Renal Graft Rejection," *Int J Organ Transplant Med*. 2019; 10(2):53-63.

66. S. Dabiri, A. Kariminik ve D. Kennedy, "The role of CXCR3 and its ligands in renal transplant outcome," *Eur Cytokine Net*. 2016; 27(2):34-40.

67. U. Panzer, R. Reinking, O. Steinmetz, G. Zahner, U. Sudbeck, S. Fehr, et al. "CXCR3 and CCR5 Positive T-Cell Recruitment in Acute Human Renal Allograft Rejection," *Transplantation*, 2004; 78(9):1341-1350.

68. U. Hoffmann, S. Segerer, P. Rümmele, B. Krüger, M. Pietrzyk, F. Hofstädter, et al. "Expression of the chemokine receptor CXCR3 in human renal allografts—a prospective study," *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21(5):1373-1381.

69. H. Huang, X. Xu, C. Yao, M. Cai, Y. Qian, X. Wang and B. Shi, "Serum levels of CXCR3 ligands predict T cell-mediated acute rejection after kidney transplantation," *Mol Med Rep*. 2013; 9:45-50.

70. H. Hu, B. D. Aizenstein, A. Puchalski, J. A. Burmania, M. M. Hamawy ve S. J. Knechtle, "Elevation of CXCR3-Binding Chemokines in Urine Indicates Acute Renal-Allograft Dysfunction," *Am J Transplant*. 2004; 4(3):432-437.
71. L. Schiffer, F. Wiehler, J. H. Bräsen, W. Gwinner, R. Greite, K. Kreimann, et al. "Chemokine CXCL13 as a New Systemic Biomarker for B-Cell Involvement in Acute T Cell-Mediated Kidney Allograft Rejection," *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20(10):2552.
72. O. M. Steinmetz, R. A. Stahl and U. Panzer, "Chemokines and B cells in renal inflammation and allograft rejection," *Frontiers in Bioscience*, 2009; 1(1):13-22.
73. Y. Mao, M. Wang, Q. Zhou, J. Jin, Y. Wang, W. Peng, et al. "CXCL10 and CXCL13 Expression were highly up-regulated in peripheral blood mononuclear cells in acute rejection and poor response to anti-rejection therapy.," *J Clin Immunol*. 2011; 31(3):414-418.
74. D. Chen, J. Zhang, W. Peng, C. Weng and J. Chen, "Urinary C-X-C motif chemokine 13 is a noninvasive biomarker of antibody-mediated renal allograft rejection," *Mol Med Rep*. 2018; 18(2):2399-2406.
75. Y. Mao, H. Yang, M. Wang, W. Peng, Q. He, Z. Shou, et al. "Feasibility of diagnosing renal allograft dysfunction by oligonucleotide array: Gene expression profile correlates with histopathology," *Transplant Immunol*. 2011; 24(3):172-180.
76. J. C. Rice, J. S. Spence, D. L. Yetman and R. L. Safirstein, "Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney." *Ren Fail*. 2002; 24(6):703-723.
77. A. Raza, S. Firasat, S. Khaliq, A. R. Khan, S. Mahmood, T. Aziz, et al. "Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) Levels and Its Association with Renal Allograft Rejection," *Immunol Invest*. 2017; 46(3):251-263.
78. P. Hirt-Minkowski, D. Rush, A. Gao, H. Hopfer, C. Wiebe, P. Nickerson, et al. "Six-Month Urinary CCL2 and CXCL10 Levels Predict Long-term Renal Allograft Outcome," *Transplantation*, 2016; 100(9):1988–1996.
79. J. Ho, D. N. Rush, I. W. Gibson, M. Karpinski, L. Storsley, J. Bestland, et al. "Early Urinary CCL2 is Associated With the Later Development of Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in Renal Allografts," *Transplantation*, 2010; 90(4):394-400.
80. J. Pattison, P. J. Nelson, P. Huie, I. von Leutichau, G. Farshid, R. K. Sibley et al. "RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney," *The LANCET*, 1994; 343(8891):209-211.

81. D. J. Lo, T. A. Weaver, D. E. Kleiner, R. B. Mannon, L. M. Jacobson, B. N. Becker, et al. "Chemokines and their Receptors in Human Renal Allotransplantation," *Transplantation*, 2011; 91(1):70-77.



EKLER

Ek-1 Etik Kurul Karar Formu



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 471

Konu: Doç. Dr. Tzevat TEFİK hk.

Tarih : 01.04.2019

**Sayın Doç. Dr. Tzevat TEFİK
Üroloji**

İlgi : Üroloji Anabilim Dalının 15/03/2019 gün ve 55889 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Dr. Samed VEREP' in yürüteceği 2019/452 dosya numaralı "Canlıdan Böbrek Transplantasyonu Yapılan Hastalarda CXCL-11, CXCL-13, CCL-2 ve CCL-5 Gen Ekspresyonlarının Allograft Fonksiyonuyla Olan İlişkisi" başlıklı çalışma kurulumuzun 29/03/2019 tarih ve 06 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Canlıdan Böbrek Transplantasyonu Yapılan Hastalarda CXCL-11, CXCL-13, CCL-2 ve CCL-5 Gen Ekspresyonlarının Allograft Fonksiyonuyla Olan İlişkisi"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Tzevat TEFİK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Üroloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Canlıdan Böbrek Transplantasyonu Yapılan Hastalarda CXCL-11, CXCL-13, CCL-2 ve CCL-5 Gen Ekspresyonlarının Allograft Fonksiyonuyla Olan İlişkisi"		
------------------------------	---	--	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	15.03.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	
	KARAR BİLGİLERİ	Karar No:06	Tarih: 29/03/2019	
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Tzevat TEFİK' in sorumluluğunda ve Dr. Samed VEREP' in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI			19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	TOPLANTIYA KATILMADI

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığının izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

ÖZGEÇMİŞ ve İLETİŞİM BİLGİLERİ

Kişisel Bilgiler

Adı	Samed	Soyadı	Verep
Doğum Yeri	Pendik	Doğum Tarihi	18.12.1989
Uyruğu	T.C	T.C. Kimlik No	26906640058
E-mail	samedverep@hotmail.com	Tel No	05356364665

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Tıpta Uzmanlık	İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilin Dalı	2019
Lisans	İstanbul Tıp Fakültesi	2013
Lise	Özel Sakarya Işık Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Tıpta Uzmanlık Öğrencisi	İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji AD	2013-2019
2. Pratisyen Hekim	T.C Sağlık Bakanlığı Yenikent Devlet Hastanesi	2013

Yabancı Dil	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	Diğer Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	67.5	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Ulusal ve Uluslararası Yayınlar

1. Tefik T, Ciftci HS, Kocak T, Sanli O, Ander H, Ziyilan O, Oktar T, **Verep S**, Caliskan Y, Turkmen A, Oguz FS, Nane I., “Effect of Donor Nephrectomy Technique on Recipient Lymphatic Drainage.” Transplant Proc. 2015 Jun;47(5)
2. Erdem S, Boyuk A, Tefik T, Yucel B, Naghiyev R, Ozsoy M, **Verep S**, Sanli O., “Warm Ischemia-Related Postoperative Renal Dysfunction in Elective Laparoscopic Partial Nephrectomy Recovers During Intermediate-Term Follow-Up.” J Endourol. 2015 Sep;29(9):1083-90.
3. **Verep S.**, Kadioğlu A., “Sünnetin Cinsel sağlık ve Penis Kanseri Üzerine Etkileri.” Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Dergisi (2018), Cilt 11, ss 33-35

Kitap Bölümü

1. Verep S., Şanlı M.Ö., "Yaşlı ve Kırılgan Hastalarda Başlıca Ürolojik Kansellere Yaklaşım", Türkiye Klinikleri Geriatri - Özel Konular, Saka B., Ed., Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, ss.84-91, 2018
2. Verep S., Kadioğlu A., "Sexual Consequences of Testicular Cancer", in: Cancer, Intimacy and Sexuality, Reisman Y., Gianotten W, Eds., Springer International Publishers , Switzerland, pp.145-149, 2017

Ulusal ve Uluslararası Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer alan Bildiriler

1. Erdem S., Verep S., Yitgin Y., Aydın B. , Kartal M.G., Tunacı A., et al., "Does it matter who perform multiparametric magnetic resonance imaging directed cognitive prostate biopsy to detect prostate cancer? The comparison of urologists and radiologists", 36th World Congress of Endourology, Paris, FRANSA, 20-23 Eylül 2018, pp.5-5
2. Erdem S., Verep S., Yitgin Y., Aydın B. , Tunacı A., Ander A.H., et al., "The concordance between prostate cancer core sites in cognitive systematic biopsy and the localization of suspicious lesions at multiparametric prostate magnetic resonance imaging: A preliminary report", 36th World Congress of Endourology, Paris, FRANSA, 20-23 Eylül 2018, pp.-.
3. Sanli O., Böyük A., Yagci M., Erdem S., Degirmenci E., Aydın B. , et al., "Comparison of female and male patients for oncological parameters and survival outcomes in muscle

- invasive bladder cancer", 8th Euroasian Urooncology Association Congress, Tbilisi, GURCISTAN, 28 Haziran - 1 Temmuz 2018, pp..-.
4. Ozmez A., Tefik T., Şentürk Çiftçi H. , Aydın B. , Verep S., Erdem S., et al., "Analysis of the costs on the waiting list for percutaneous treatment of kidney stones", 36th World Congress of Endourology, Paris, FRANSA, 20-23 Eylül 2018, pp..-.
 5. Yitgin Y., Verep S., Yagci M., Erdem S., Tunacı A., Özcan F., "Incidence of High Risk Prostate Cancer in Prostate Biopsies According to PIRADSV2 Classification ", Symposium on robotics and New Technologies in Prostate Cancer, İSTANBUL, TÜRKİYE, 12-13 Nisan 2018, pp..-.
 6. Erdem S., Büyük A., Verep S., Tefik T., Nane İ., Özcan F., et al., "Increased Warm Ischemia Time Associated Postoperative Renal Functional Loss After Laparoscopic Partial Nephrectomy In Patients With Contralateral Functioning Kidney Is Regained During Intermediate Term Follow-Up", European Association of Urology Congress 2018, Kopenhag, DANIMARKA, 16-20 Mart 2018, pp..-.
 7. Erdem S., Verep S., Yitgin Y., Tefik T., Ozluk Y., Sanli O., et al., "The pathological upgrading and upstaging after radical prostatectomy in low risk prostate cancer patients who are eligible for active surveillance: How safe is it to depend on bioptic pathology?", Symposium on robotics and New Technologies in Prostate Cancer, İSTANBUL, TÜRKİYE, 12-13 Nisan 2018, pp..-.
 8. Erdem S., Verep S., Pazır Y., Tefik T., Tunç H.M., Özcan F., et al., "Increased fibrinogen and d-dimer levels are associated with adverse tumor characteristics and decreased survival in renal cell carcinoma: The 2nd report with extended patient number and follow-up", 113rd American Urological Association Annual Meeting, San Francisco, ABD, 18-21 Mayıs 2018, pp..-.
 9. Erdem S., Tefik T., Verep S., Ozluk Y., Kiliçaslan I., Tunç H.M., et al., "The factors associated with Gleason upgrading at radical prostatectomy: A perspective from the single institutional assessment of biopsy and final pathology", 113rd American Urological Association Annual Meeting, San Francisco, ABD, 18-21 Mayıs 2018, pp..-.
 10. Verep S., Tefik T., Degirmenci E., Erdem S., Koçak T., Nane İ., et al., "Clinical implication of stone culture on postoperative SIRS and concordance to pre- and postoperative urine culture after percutaneous nephrolithotomy.", 36th World Congress of Endourology, Paris, FRANSA, 20-23 Eylül 2018, pp..-.

11. Tefik T., Buttice S., Somani B., Ander A.H., Erdem S., Verep S., et al., "Measurement of ureteral access sheath force insertion: in vivo study in 6 patients", 36th World Congress of Endourology, Paris, FRANSA, 20-23 Eylül 2018, pp.-.
12. Verep S., Tefik T., Erdem S., Sanli O., Koçak T., Özcan F., et al., "Comparison of patient reported outcomes in SWL, FURS and PCNL using validated Wisconsin Stone Quality of Life Questionnaire", 36th World Congress of Endourology, Paris, FRANSA, 20-23 Eylül 2018, pp.-.
13. Erdem S., Verep S., Tefik T., Ander A.H., Nane İ., Özcan F., et al., "The Oncological Outcomes of Laparoscopic Partial Nephrectomy: Single center 10 year experience", 8th Euroasian Urooncology Association Congress, Tbilisi, GURCISTAN, 28 Haziran - 1 Temmuz 2018, pp.-.
14. Erdem S., Özcan F., Yitgin Y., Verep S., Aydın B. , Tunacı A., et al., "The relationship between PIRADSV2 scores and the incidence of prostate cancer in cognitive prostate biopsies", 36th World Congress of Endourology, Paris, FRANSA, 20-23 Eylül 2018, pp.5-5
15. Erdem S., Büyük A., Tefik T., Verep S., Özcan F., Nane İ., et al., "Elektif laparoskopik parsiyel nefrektomide uzamış sıcak iskemi süresine bağlı operasyon sonrası gelişen renal disfonksiyon orta dönem takiplerde düzelmektedir: Sınırlı sıcak iskemi uygulanan vakalarla karşılaştırmalı bir çalışma", 12. Ulusal Endoüroloji Kongresi, NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 12-15 Nisan 2017, ss.58-58
16. Erdem S., Büyük A., Verep S., Tefik T., Akinci H.M., Özcan F., et al., "Laparoskopik parsiyel nefrektomi yapılan fonksiyonel karşı böbrekli hastalarda uzamış sıcak iskemi süresi ile ilişkili operasyon sonrası renal fonksiyon kaybı orta dönem takiplerde geri kazanılmaktadır", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZHEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
17. Erdem S., Verep S., Büyük A., Tefik T., Akinci H.M., Özcan F., et al., "Kontralateral fonksiyonel böbrekli hastalarda laparoskopik parsiyel nefrektomi sonrası aşırı uzamış sıcak iske miyle ilişkili renal fonksiyon kaybı orta dönem takiplerde geri kazanılmaktadır:Sınırlı sıcak iskemi vakalarıyla karşılaştırmalı bir çalışma", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZHEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
18. Erdem S., Verep S., Tefik T., Özlük M.Y., Kilicarslan I., Şanlı M.Ö., et al., "Radikal prostatektomi sonrası WHO/ISUP grade grup yükselmesine hangi klinik ve histopatolojik bulgular eşlik etmektedir?", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZHEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x

19. Erdem S., Büyük A., Verep S., Tefik T., Nane İ., Özcan F., et al., "Laparoskopik Parsiyel Nefrektomi Onkolojik Sonuçları: Tek merkeze ait 10 yıllık tecrübe - The Oncological Outcomes of Laparoscopic Partial Nephrectomy", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
20. Erdem S., Verep S., Tefik T., Şanlı M.Ö., Özcan F., Nane İ., et al., "Von Hippel-Lindau Sendromu'nda Böbrek Tümörlerinin Yönetimi", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
21. Erdem S., Verep S., Pazır Y., Tefik T., Özcan F., Tunc M., et al., "Artmış fibrinojen ve d-dimer değerleri böbrek hücreli karsinomda kötü tümör özellikleri ve azalmış sağkalımla ilişkilidir: Genişletilmiş hasta sayısı ve takip süresi ile 2.rapor", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
22. Erdem S., Büyük A., Gasimov K., Yitgin Y., Verep S., Tefik T., et al., "Radikal sistektomi yapılmış yetişkin ve yaşlı mesane kanserli hastalar arasında onkolojik parametrelerin ve sağkalım bulgularının karşılaştırılması", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
23. Erdem S., Büyük A., Yitgin Y., Gasimov K., Verep S., Tefik T., et al., "Mesane kanseri hastalarında radikal sistektomi öncesi hipoalbuminemi kanser spesifik ve genel sağkalım ile ilişkilidir; cerrahi komplikasyonlarla ilişkisi yoktur ", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
24. Erdem S., Büyük A., Verep S., Yitgin Y., Gasimov K., Tefik T., et al., "Kasa invaze olmayan mesane kanserli hastalarda radikal sistektomi sonrası düşük evreli ve organa sınırlı hastalık görülmesi sağkalımda etkili midir? Kasa invaze mesane kanserli hastalarla yapılan karşılaştırmalı bir çalışma ", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
25. Erdem S., Verep S., Tefik T., Kilicarslan I., Koçak T., Akinci H.M., et al., "Aktif izleme uygun olup erken radikal prostatektomi yapılan hastalarda patolojik sonuçların retrospektif değerlendirilmesi", 26. Ulusal Üroloji Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 12-15 Ekim 2017, ss.x-x
26. Verep S., "Laparoskopik Donör Nefrektominin Böbrek Nakli Gerçekleştirilmiş Alıcı Lenfatik Drenajı Üzerindeki Etkisi", 23. Ulusal Üroloji Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 16-19 Ekim 2014, ss.259-259