



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİTOMEGALOVİRÜS SPESİFİK T HÜCRE
YANITININ FLOW SİTOMETRİ
YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hafize KILINÇKAYA DOĞAN

Antalya, 2013



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİTOMEGALOVİRÜS SPESİFİK T HÜCRE YANITININ FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hafize KILINÇKAYA DOĞAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meral GÜLTEKİN

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2013

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2011.04.0103.039 Proje No ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızın ilk aşamasından itibaren fikirleri ile tezime yön veren, Organ Nakli Laboratuvarı'nın kapılarını bana sonuna kadar açan, sadece mesleki anlamda değil hayata dair de kendilerinden çok şey öğrendiğim sayın tez hocam Prof. Dr. Meral GÜLTEKİN'e ve sayın Prof. Dr. Sadi KÖKSOY'a;

Eğitim ve öğrenim sürecimde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, çalışma ortamında aile olduğumuzu hissettiren sayın hocalarım Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. S. Tümer VURAL'a, Prof. Dr. Dilek ÇOLAK'a, Prof. Dr. M. Dilara ÖĞÜNÇ'e, Doç. Dr. Gözde ÖNGÜT'e, Doç. Dr. Derya MUTLU'ya, Doç. Dr. Betil Özhak BAYSAN'a, değerli doktor arkadaşlarıma ve Merkez Laboratuvarı'nda görev yapan mesai arkadaşlarıma;

Çalışmamızın tüm aşamalarında her anlamda yanımda olan, çalışma sürecimi keyifli kılan Uzm. Dr. Esvet MUTLU'ya, Doç. Dr. Emel ŞAHİN'e ve Lab. Tek. Derya DERTSİZ'e;

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta örneklerinin toplanması aşamasındaki yardımlarından dolayı hastanemiz Organ Nakli Ünitesi'nin sayın öğretim üyelerine ve değerli çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde olduğu gibi hayatımın her anında varlıklarıyla bana güç veren, destekleriyle hep yanımda olan başta eşim Serdar DOĞAN, annem, babam ve kardeşlerim olmak üzere mensubu olmaktan gurur duyduğum tüm aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	viii
Çizelgeler Dizini	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sitomegalovirüs	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Sınıflandırma	4
2.1.3. Virüs morfolojisi ve replikasyonu	5
2.1.4. Fiziksel ve kimyasal özellikleri	7
2.1.5. Epidemiyoloji	7
2.1.6. Patogenez	8
2.1.7. İmmünite (Bağışıklık)	10
2.1.7.1. Doğal immün (bağışık) yanıt	11
2.1.7.2. Kazanılmış immün (bağışık) yanıt	12
2.1.7.2.1. Humoral immün (bağışık) yanıt	13
2.1.7.2.2. Hücresel immün (bağışık) yanıt	13
2.1.7.3. CMV'nin immün sistemden kaçış mekanizmaları	20
2.1.7.4. Sitokinler	21
2.1.8. Klinik	23
2.1.8.1. Solid organ alıcılarında CMV enfeksiyonu	23
2.1.8.2. İmmün supresif tedavinin immün sistem üzerine etkileri	24
2.1.9. Tanı yöntemleri	26
2.1.9.1. Hücre kültürleri	26
2.1.9.2. Histopatolojik inceleme	27
2.1.9.3. Serolojik testler	27
2.1.9.4. CMV antijenemi testi	28
2.1.9.5. Moleküler testler	29

2.1.9.6. Hücre içi ATP ölçümü	29
2.1.9.7. İmmünolojik tanı	29
2.1.9.7.1. ELISPOT	30
2.1.9.7.2. Quantiferon	31
2.1.9.7.3. Flow (akış) sitometri	31
3. ARAÇLAR ve YÖNTEM	35
3.1. Olgular ve Kontrol Grubu	35
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Cihaz ve malzemeler	38
3.2.2. Optimizasyon çalışmaları	39
3.2.2.1. Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu	39
3.2.2.2. Dondurulmuş örneklerin çözülmesi	40
3.2.2.3. Mikroskopta PKMNH sayımı	41
3.2.2.4. T hücrelerinde yüzey ve hücre içi sitokin boyama	42
3.2.2.5. CMV spesifik T hücrelerinin akış sitometride saptanması	44
3.2.3. Validasyon çalışmaları	45
3.2.4. İstatistiksel değerlendirmeler	45
4. BULGULAR	47
4.1. Validasyon	47
4.2. Kontrol Grubu ve Hastalar	48
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇLAR	93
7. ÖZET	94
8. ABSTRACT	97
9. KAYNAKLAR	100

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALG	Anti Lenfosit Globulin
APC	Antigen Presenting Cell = Antijen sunan hücre
ATG	Anti Timosit Globulin
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BKV	BK virüs
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
c AMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CD	Cluster of Differentiaton
CFC	Cytokine Flow Cytometry = Sitokin akış hücre ölçer
CMV	Cytomegalovirus = Sitomegalovirüs
CTL	Sitotoksik T lenfosit
Dc	Dendritik hücre
DM	Diyabetes mellitus
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FALS	Forward Angle Light Scatter
FGF	Fibroblast Growth Factor

FITC	Fluorescein isothiocyanate
GIS	Gastrointestinal sistem
GMCSF	Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
HHV	Human Herpes Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HL	Hiperlipidemi
HLA	Human Leukocyte Antigens
HSV	Herpes Simplex Virus
HT	Hipertansiyon
IE	Immediate Early
IFN-γ	İnterferon gamma
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IL	İnterlökin
KBY	Kronik Böbrek Yetmezliği
KC	Karaciğer
LAP	Lenfadenopati
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMF	Mikofenolat Mofetil
NK	Natural Killer = Doğal Öldürücü Hücre
PCR	Polymerase Chain Reaction

PE	Phycoerythrin
PKMNH	Periferik Kan Mononükleer Hücre
PMNL	Polimorfonükleer Lökosit
pp65	65 kilodalton lower matrix phosphoprotein
PRR	Pattern Recognition Receptors=Kalıp Tanıma Reseptörleri
RALS	Right Angle Light Scatter
RNA	Ribonükleik Asit
Roryt	Retinoic acid receptor related orphan gamma T
Rpm	Revolutions per minute
Tc	Sitotoksik T lenfosit
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
Th	T helper lymphocyte = Yardımcı T lenfosit
THR	T Hücre Reseptörü
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	Regulator (düzenleyici) T lenfosit
UV	Ultraviyole
VZV	Varicella Zoster Virus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. İmmün sistem hücrelerinin kökenleri	11
2.2. Doğal ve kazanılmış immün yanıtın bileşenleri	11
2.3. CD4 ⁺ T hücrelerin farklılaşmasında rol alan ana sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve inhibitör transkripsiyon faktörlerinin etkileşimi	18
2.4. CMV'nin doğal ve kazanılmış immünite tarafından kontrolü	20
2.5. CMV hücresel immünite yöntemleri	30
2.6. Akış sitometri genel çalışma prensibi	32
2.7. CMV spesifik hücresel immünite yöntem aşamaları	34
3.1. Falcon tüplerinin etiketlenmesi	43
3.2. Akış sitometri analiz basamakları	44
4.1. Tx hastalarının lenfosit sayıları (bin/ μ l)	54
4.2. Hastaların CMV spesifik CD4 ⁺ IFN- γ , CD8 ⁺ IFN- γ ve CD4 ⁺ +CD8 ⁺ IFN- γ T lenfosit sayıları (/ μ l)	55
4.3. Kontrol ve hastaların CMV spesifik IFN- γ üreten T hücreleri	67
5.1. Negatif (A), test örneği (B) ve pozitif (C) kontroller ile alınan sonuçlar	80
5.2. CMV hücresel immünite araştırma yöntemleri	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Timusta T hücre seçimi	13
2.2. CD4+ T hücrelerin farklılaşmasında rol alan sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve inhibitör transkripsiyon faktörleri	15
3.1. Böbrek nakil alıcılarının klinik özellikleri	36
3.2. Hastaların nakil öncesi CMV IgG titreleri	37
3.3. Kontrol grubunun CMV IgG titreleri	37
4.1. İntra assay validasyon çalışması sonuçları	47
4.2. İnter assay validasyon çalışması sonuçları	47
4.3. Validasyon çalışma sonuçlarının ortalama, standart sapma ve CV değerleri	48
4.4. CMV spesifik hücresel immünite değerleri -kontrol grubu-	49
4.5. Tx hastalarında CMV spesifik hücresel immünite değerleri –0.ay-	50
4.6. Tx hastalarında CMV spesifik hücresel immünite değerleri –1.ay-	51
4.7. Tx hastalarında CMV spesifik hücresel immünite değerleri –3.ay-	52
4.8. Tx hastalarında CMV spesifik hücresel immünite değerleri –6.ay-	53
4.9. İmmün supresyon protokolleri	54
4.10. CMV spesifik hücresel immünite istatistiksel verileri -kontrol grubu-n:20	65
4.11. CMV spesifik hücresel immünite istatistiksel verileri -tx grubu-n:21	66
5.1. Transplantasyon hastalarında CMV spesifik hücresel immünite araştırmaları	81

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Human Herpesvirus 5 (HHV-5) olarak tanımlanan insan Sitomegalovirüs (*Cytomegalovirus*:CMV), *Herpesviridae* ailesinin *Betaherpesvirinae* alt ailesinde *Cytomegalovirus* cinsi içerisinde yer alır (1). Diğer herpesvirüslere benzer olarak primer CMV enfeksiyonu latent enfeksiyonla sonuçlanır. Latent enfeksiyon bölgeleri; endotelyal hücreler, monositler, lenfositler ve çeşitli dokulardır. Bu nedenle CMV, kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu ile bulaşabilir. Organ naklinde donör CMV seropozitif (D+), alıcı seronegatif (R-) ise nakil alan hasta primer CMV enfeksiyonu açısından önemli derecede risk altındadır (2). Özellikle yetişkin organ nakil hastaları -CMV seropozitif olduklarından dolayı- esas olarak CMV reaktivasyonu sorunu ile karşı karşıyadırlar. Latent virüs enfeksiyonları transplantasyon alanında immünsupresif tedavi ile sağlanan başarıyı olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerden birisidir (3). Bu nedenle nakledilen organın reddi hatta hastanın kaybı ile sonlanabilen reaktivasyonun zamanında saptanması son derece önemli ve gereklidir.

CMV enfeksiyonu tanısında kullanılan yöntemler hücre kültürü, histopatolojik inceleme, serolojik testler, moleküler yöntemler, CMV antijenemi testi ve immünolojik testler gibi geniş bir yelpazede yer alır. Histopatolojik inceleme virüsün konak hücre sitoplazmasında ve çekirdeğinde oluşturduğu inklüzyon cisimciklerinin saptanmasına dayalıdır. Özgüllüğü yüksek ancak duyarlılığı düşük olup tanıyı desteklemek için diğer yöntemlerden de faydalanmak gerekir. Hücre kültürü, CMV tanısında altın standart kabul edilse de gerek prosedürün uzun zaman alması gerekse kullanılan hücrelerin ömrünün kısa olması, kandaki lökositlerin bu hücrelere toksik etki göstermesi, donanımlı laboratuvar ve eğitimli eleman gerektirmesi nedenleriyle rutin uygulamada yerini diğer tanı yöntemlerine bırakmıştır (4, 5). ELISA testleri serolojik tanının esas komponentidir. Hızlı, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek testlerdir. Ayrıca düşük fiyata çok sayıda örnek çalışılabilmesi, pratik olması ELISA yönteminin önemli avantajlarından. Ancak reaktivasyonla seyreden viral enfeksiyonların tanısında IgM ve IgG antikorlarının tanısal değeri kısıtlıdır. Organ nakil hastalarında CMV

antikorlarının saptanması, serolojik durumlarının belirlenmesi dışında enfeksiyon hastalığının tanısında yol gösterici değildir (6, 7).

CMV pp65 proteininin immünlöresan yöntemiyle kantitatif ölçümüne dayanan yöntem olan CMV antijenemi testinin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir. Örnek alındıktan sonra dört saat içinde çalışılması gerekliliği önemli bir dezavantaj olarak görülse de özellikle hasta sayısı yoğun organ nakil merkezlerinde eleman alt yapısı sağlandığından yöntem başarı ile uygulanmaktadır (8-10). İmmüsupresif hasta grubunda periferik lökositlerin azlığı CMV antijenemi testinde kantitasyonun izleminde sıkıntı yaratabilmektedir. Nitekim günümüzde solid organ transplant hastalarında CMV enfeksiyonunun belirlenmesinde preemtif tedavi uygulanacak hastaların seçiminde ve tedavinin monitorizasyonunda moleküler yöntemler ile viral yükün saptanması ve kantitasyonu pratik uygulamada yerini almıştır (5, 9, 10).

Konakta enfeksiyon etkeninin hastalık oluşturabilmesi için sadece etkenin virulansı, miktarı vb. özellikler değil, konağın özellikleri de son derece önemlidir. Özellikle immün sistemi baskılanmış olgularda ve latent virüs enfeksiyonlarında konağın etkene yanıtı ya da yanısızlığı klinik tablonun gelişmesinde anahtar rol oynar. Hücresel immünite, özellikle de hafıza CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler birçok viral enfeksiyondan korunmada önemli rol oynar. Kronik CMV enfeksiyonunda bu hücreler enfeksiyonu tamamen ortadan kaldıramasa da önemli komplikasyonların gelişimini engeller (11). T hücre aracılı immün yanıtta CMV'ye spesifik CD4⁺ T lenfositler, CD8⁺ T lenfositler ve $\gamma\delta$ T lenfositler rol almaktadır. CD8⁺ T lenfositler hücresel immünitenin en önemli elemanıdır. CMV spesifik T hücre yanıtının düşük olması replikasyon riskinin arttığını göstermektedir (2). Hücresel bağışıklığın yeniden yapılanması viral hastalık gelişimini önlediğinden virolojik izlem yanında immünolojik izlem de beraberinde yer almalıdır. Organ nakil hastalarında, etkenin özellikleri yanı sıra konak immün yanıtının bilinmesi enfeksiyon hastalığının daha erken saptanmasını, immün supresif tedavinin ve enfeksiyon tedavisinin monitorizasyonunu sağlayacaktır. İmmünolojik yöntemler dediğimizde ELISPOT, Quantiferon ve akış sitometri yöntemlerinden söz ediyoruz. Bu yöntemlerin ana hedefi hastada etkene özel hücresel yanıtın araştırılmasıdır.

Flow (akış) sitometri (hücre ölçer), akan bir sıvının içindeki hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Bu teknik ile ortalama on bin hücrenin yirmi saniyede değerlendirilmesi mümkündür. Ölü ve canlı hücre ayrımının yapılabilmesi, az sayıdaki hedef hücrenin geniş hücre popülasyonu içinde saptanması ve sorting özelliği ile hücre gruplarının ayrıştırılması en önemli avantajlarıdır. Önceleri ağırlıklı olarak hematoloji ve onkolojide malignitelerin, immünolojide primer immün yetmezliklerin tanısında kullanılmış olan bu yöntem ile son yıllarda organ nakil hastalarının etken spesifik hücresel immün yanıtlarının saptanmasının klinik validasyon çalışmaları yapılmaktadır (12, 13). Akış sitometri yöntemi ile hücreleri büyüklük ve granülaritelerine göre birbirinden ayırmanın yanı sıra fonksiyonlarını da ölçmek mümkündür. Sitokin akış sitometri (sitokin flow sitometri:CFC) ile antijen veya mitojen stimülasyonu sonucunda gelişen sitokin yanıtı oluşturan hücreler gösterilebilmekte, sayısal değerleri elde edilebilmektedir (14). Hücre içi (intraselüler) antijenlerin tespiti güçtür. Sitokin yanıtı araştırılırken florokrom boyalı antikorların hücre içine girmesi aşamasında zorluk yaşanmaktadır. Florokrom boya eklenmesinden önce hücreleri bir seri solüsyonda fikse edip morfolojik zarara uğratmadan hücre zarının geçirgenliğinin artırılması gerekir. Sonra eklenen boyalar ile işaretleme yapılır (15).

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nin güçlü yanlarından birisi organ naklinde göstermiş olduğu başarıdır. Bu başarı biz laboratuvar bilim dallarına da organ nakil hastalarında enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve izleminde evrensel-bilimsel yaklaşımları takip etmek sorumluluğunu yüklemektedir. Bu çalışmada, böbrek nakli yapılmış hastalarda etken özel T hücre yanıtının monitorizasyonu-izlemi- planlanarak; CMV'ye karşı gelişen T lenfosit yanıtının sitokin akış sitometri yöntemi ile optimizasyonu amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sitomegalovirüs

2.1.1. Tarihçe

CMV'nin tarihi 1871 yılında Ribbert'le başlamıştır. Ribbert, fetus böbrek dokusunda inklüzyon cisimcikleri içeren geniş hücreler saptamış; ilerleyen çalışmalarında karaciğer ve akciğer dokularında da benzer gözlemleri yapan Ribbert, bu hücrelere “protozoon benzeri hücre” adını vermiştir. Lowenstein, parotis bezinde de aynı hücrelere rastlamış ve bu hücrelerin adı ‘intranükleer inklüzyon içeren sitomegalik hücreler’ olarak belirlenmiştir. Von Glahn ve Pappenheimer, genital herpesli ve herpes zosterli hastalarda inklüzyon cisimciklerini saptadıklarında, bu durumun virüslerden kaynaklanıyor olabileceğini öne sürmüşlerdir. “Cytomegalia” kelimesi ilk kez 1911’de Goodpasture ve Talbert tarafından kullanılmıştır (1). İlerleyen yıllarda 1947 yılında konjenital toksoplasma ön tanısı olan bir hastadan virüs izole edilmiş ve adına “Cytomegalovirus” denilmiştir. 1960’ta CMV’ye ilişkin 3 temel bilgi açıklanmıştır: 1-Viral replikasyon sadece konağın kendi hücrelerinde meydana gelir. 2- CMV benzeri etkenler memelilerden izole edilir. 3- Hastalıklı konakta farklı hücre ve dokuların varlığı sitopatolojik inceleme ile saptanabilir (10).

2.1.2. Sınıflandırma

CMV, *Herpesviridae* ailesinin bir üyesidir. Zarflı, çift iplikli DNA virüsüdür. İnsan herpes virüsü olan sekiz virüs tanımlanmış olup hayvanlar alemini enfekte eden 100’e yakın herpes virüs var olduğu bilinmektedir (16, 17). “*International Committee for Taxonomy of Viruses*” tarafından insan Herpesvirüs 5 (HHV-5) olarak tanımlanmıştır. İnsan Herpesviridae ailesinin içinde ayrıca Herpes Simplex virüs tip 1 (HSV-1) ve 2 (HSV-2), Varicella-Zoster virüs (HHV-3), Epstein-Barr virüs (HHV-4), HHV-6, HHV-7 ve HHV-8 bulunmaktadır (18). Herpesvirüsler farklı tipte hücreleri enfekte etme özellikleriyle 3 alt gruba ayrılmışlardır:

Alfaherpesvirüsler: Epitel hücresi ve fibroblastlarda ürerler. Sitopatik etkileri ön plandadır. Duyu ganglionlarında latent enfeksiyona neden olurlar. HSV-1 ve 2 bu gruptadır (7).

Gammaherpesvirüsler: Lenfotrop virüslerdir. Lenfoblastoid hücrelerde latent kalırlar. EBV ve HHV-8 bu gruptadır (7).

Betaherpesvirüsler: Tükrük bezlerinde yerleşirler. Enfekte ettikleri hücreyi büyütmelelerinden dolayı sitomegalik hücreler olarak adlandırılırlar. Daha az sitopatik etkilidirler. Hücre kültürlerinde geç ürerler. Salgı bezleri, lenforetiküler hücreler ve böbrekte latent kalırlar. Bu grubun üyeleri, CMV, HHV-6 ve HHV-7'dir (18).

2.1.3. Virüs morfolojisi ve replikasyonu

İnsan herpesvirüslerinin en büyüğü ve en geniş genetik içeriğe sahip olan CMV, 120-300 nm çapındadır. Çift zincirli ve yaklaşık 240 kbp büyüklüğünde DNA içeren çekirdeği, 161 kapsomerden oluşan ikozahedral bir kapsidle çevrelenmiştir. En dışında fosfolipidden zengin 179 nm çaplı bir zarf bulunmaktadır. Kapsidle zarf arasında kalan tegüment kısmı 20 adet matriks proteini içermektedir. Bu matriks proteinlerinin görevi tam olarak bilinmemekte olup alt matriks proteini olarak bilinen ve tegüment proteinlerinin içinde en bol bulunan pp 65 (diğer adıyla unique long 83 = UL83), protein kinazların yaptığı fosforilasyonun temel hedefidir. Antijenemi testinde aranan, bu proteindir. pp65 proteini aynı zamanda MHC-1 kısıtlı Tc (sitotoksik T lenfosit) lenfositler için de en önemli hedefidir. Diğer majör tegüment proteinlerinden virion transaktivatör proteini pp71 -üst matriks proteinidir- UL82 geninde yer alır. Herpes kor maturasyon proteini pp150 - geniş matriks proteinidir- UL 32 geninde yer alır. En geniş tegüment proteini UL 48 geninde eksprese edilir. UL99'da bulunan pp28 proteinleridir. Fosfoprotein UL32 (p150), ppUL44 (p52), ppUL80a (p38) ve ppUL57 (p130) immünojeniktir ve serolojik yöntemlerde kullanılırlar .Bunlara ek olarak hücresel ve viral RNA'larca küçük miktarlarda salınan proteinler de vardır (17-21).

Diğer herpes virüsler gibi CMV de konak hücrenin çekirdeğinde replike olmakta, replikasyon sırasında kendi DNA polimerazlarını kullanmaktadır . Viral

DNA'nın kapsid içersine yerleşmesi hücre çekirdeğinde gerçekleşirken viral zarf konak hücre çekirdek zarından kazanılır. Virüsün çoğaldığı hücrenin içersinde enfektif provirüsün oluşması hemen daima değişik derecelerde hücre harabiyeti ile sonuçlanır. Latent enfeksiyonda ise hücre harabiyeti yoktur, genom sirküler yapıdadır ve viral antijenlerin tamamı eksprese edilmez (18, 22, 23, 24).

Viral genom transkripsiyonu ve viral protein sentezi yani replikasyon 48-72 saat sürer ve üç fazda gerçekleşir (25) :

1. En erken dönem: İlk 2 saati kapsar. Çok erken proteinler (alfa) rol alır. İlk aşama virüsün zarf glikoproteinleri ile hücre yüzeyine tutunması ve penetrasyonudur. Diğer herpes virüsler gibi heparan sülfat virüs-hücre ilişkisinin ilk aşamasında rol alır. Ancak tutunmada henüz tam olarak belirlenememiş farklı reseptörlerin de olaya katıldığı düşünülmektedir. Tutunmada beta-2 mikroglobülin molekülü, hücre yüzeyi reseptörleri ile viral glikoproteinler arasında köprü oluşturarak rol alır. Tutunmayı viral zarf ve hücre zarının füzyonu ile gerçekleştiren penetrasyon izler. Kapsid açığa çıkar ve viral DNA'yı çekirdek zarı porlarından çekirdeğe ulaştırır. Çekirdekte konak hücrenin RNA polimeraz II enzimi kullanılarak DNA'nın transkripsiyonu gerçekleşir. İlk aşamada yeni protein sentezine gereksinim duymadan eksprese edilen en erken gen ürünleri sentezlenir. Bu gen ürünleri enfeksiyonun geç dönemine kadar eksprese edilirler ve viral genom üzerinde pozitif ve negatif düzenleyici etkileri vardır. En erken dönem proteinleri sentezlendikten hemen sonra sitoplazmada kümelenirler. Sonuç olarak bu dönem gen transkripsiyonunun regülasyonu ve hedef hücrenin ele geçirilmesi aşamasıdır (23, 24, 26, 27).

2. Erken dönem (geç erken dönem): Yirmidört saatten önce başlar. DNA'nın sentezi ve ayrıca nükleik asit bağlayan proteinlerin de sentezi bu aşamada gerçekleşir. Bu olaylarda pek çok transkripsiyon faktörü ve viral DNA polimeraz rol alır (23, 24, 26, 27).

3. Geç dönem: İlk 24 saatten sonraki dönemdir. Viral genom replikasyonu başladıktan sonra yapısal protein sentezi bu aşamada olur. Bunlardan nükleokapsid proteinleri çekirdekte toplanır ve viral DNA kapsid içine yerleşir. DNA'yı içine alan nükleokapsidler çekirdek zarından zarflarını alarak perinükleer sisternalara tomurcuklanırlar ve sitoplazmik veziküller içinde hücre zarına taşınır,

ekzositoz ile salınırlar. Geç dönem 72 saat sonra en üst düzeye ulaşır (23, 24, 26, 27).

2.1.4. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

CMV labil bir virüstür. UV ışığında 5 dakikada, 56°C'de 30 dakikada, düşük pH (pH<5) ve % 20'lik eter solüsyonu gibi lipid çözücülerinde 2 saatte harap olur. Ayrıca dondurma ve eritme işlemleri gibi fiziksel etkenlerle de inaktive olabilmekte, % 10'luk sodyum hipokloritle CMV'nin enfektivitesi belirgin bir şekilde azalmaktadır. CMV ile enfekte hücrelerin saklanması sıvı azot içinde, % 20 fetal calf serum ve % 10 dimetilsülfoksit ilave edilmiş Eagle besiyeri ya da % 20 dimetilsülfoksit ile desteklenmiş Eagle'ın minimal essential medium'u önerilmektedir (23, 28-30).

2.1.5. Epidemiyoloji

Tüm dünyada yaygın olarak görülen CMV'de bilinen tek enfeksiyon kaynağı insandır. CMV enfeksiyonu endemik olup sosyoekonomik koşullarla CMV seroprevalansı ters orantılıdır. Bu durumda kötü hijyen koşulları yanında toplum içi yakın temas da yüksek risk faktörü olarak gündeme gelmektedir (31). Enfeksiyon prevalansı bu nedenle ülkeler arasında da farklılık gösterir. Avrupa, Avustralya, Kuzey Amerika ülkelerinde düşük, Afrika, Güneydoğu Asya ülkelerinde oldukça yüksekken kimi ülkelerde erişkinlerde yüksek oranda seyrederken kimi ülkelerde enfeksiyon etkeninin kazanımı % 90-100 oranında çocukluk çağında olmaktadır. Çok eşlilik, ilk cinsel ilişki yaşı ve korunma yöntemlerinin kullanılmaması gibi faktörler CMV seroprevalansını etkilemektedir (27). Gelişmiş ülkelerde yenidoğanlarda % 0.5- 2.5, erişkin yaş grubunda ise % 50 oranında rastlanır (10). Gelişmekte olan ülkelerde erişkin yaş grubunun hemen tamamı CMV seropozitifdir (8). Ülkemizde CMV seropozitifliği yüksek orandadır (32,33). Antalya ili için hayatının ilk yılında olan bebeklerdeki CMV seropozitifliği % 93,3 bulunmuş ve yaşla birlikte bu oranın arttığı, 7. yaşta pik yaptığı (% 96,8); CMV enfeksiyonu için kritik yaşların 1. ve 7. yıl olduğu saptanmıştır. Doğurganlık çağındaki kadınlarda seropozitivite oranı % 97,4 bulunmuştur. (32).

CMV vertikal ve horizontal olarak bulaşabilir ve enfeksiyonlar doğumdan önce (konjenital), doğum sırasında (perinatal) veya doğumdan sonra (postnatal) kazanılanlar olarak sınıflandırılabilir (18). CMV, plasenta yolu, cinsel ilişki, kan transfüzyonu, solid organ ve kemik iliği transplantasyonu ve virüsü çıkaran kişi ile yakın ilişki sonucu bulaşabilir. İdrar, anne sütü, gözyaşı, dışkı, vajinal ve servikal sekresyonlar, kan ve semen gibi pek çok vücut sıvısı ile salınması CMV'nin toplumda yaygın olarak görülmesine neden olmakta, bu yolla CMV salınımı sürekli veya tekrarlayan şekillerde görülmektedir. Ayrıca enfeksiyon sonrası virüsün uzun süre etrafa saçılması, primer enfeksiyon sonrasında aylarca hatta yıllarca ekstrakte edilebilmesi de yayılımını kolaylaştırmaktadır (17, 27, 33).

Solid organ nakli yapılan hastalarda CMV önemli bir sorundur. Genellikle ateş ve halsizlikle seyreder. Laboratuvarında nötropeni, trombositopeni, yüksek transaminaz düzeyleri saptanır (10). Böbrek nakil alıcılarıyla yapılan bir çalışmada CMV'nin nakilden sonraki 3 ayda ve daha sonraki zamanlarda ortaya çıktığı, en sık bulgunun ateş yüksekliği olduğu saptanmış; en önemli risk faktörleri ise D+/R- hastalar ve rejeksiyondan koruyucu tedaviler olarak gösterilmiştir (3).

2.1.6. Patogenez

CMV, hücre lizisi yapmanın yanında persistan ve latent enfeksiyonlara neden olur. Bazı hücrelerde proteinlerin yapılarını etkileyip konakta hücre çoğalması gibi fonksiyonları bozarak ki bu durumda litik etkileri daha sınırlı ve konak hücre bazındadır; bazı hücrelerde de fetal CMV enfeksiyonunda görülen merkezi sinir sistemi anomalilerinde olduğu gibi bir takım faktörlerin salınımını etkileyip komşu hücrelerin fonksiyonlarını engelleyerek etki göstermektedir. Virüsün alımından sonra tükrük bezi duktal epitel hücreleri ve fibroblastlar enfekte olmaktadır. Tükrük bezi tutulumu genellikle kroniktir; bebekler ve çocuklarda sıktır, yaşla azalır (31, 34-37).

HSV, VZV gibi diğer herpesvirüsler belirli bölgelerde latent olarak kalırken CMV çok çeşitli bölgelerde latent kalabilir. Latent enfeksiyon sırasında periferik mononükleer hücrelerden ya da kemik iliğinden kaynaklanan mononükleer hücrelerin % 0.004 - % 0.01'inde CMV viral genomu bulunur. Bu genomlar da

her enfekte hücrede 2-13 kopya kadardır (38). Bu latent kalınan hücrelerin hangileri olduğu tam olarak aydınlatılamamışsa da myeloid hücre grubuna bağlı gibi görünmektedirler (39). Genomik hücre DNA'sı monosit/makrofajlar (40), lenfositler ile CD34⁺ kemik iliği hücreleri (41), immatür dendritik hücreler (42) ve endotel hücreleri (43, 44) gibi çeşitli hücre gruplarından izole edilebilir. Bir hücrede CMV genomik DNA'sının bulunması o hücrede mutlaka aktif replikasyon olduğu anlamına gelmez. Aksine replikasyondan çok sağlam virionların fagosite edilmesine bağlıdır. Virüs hücre içine girebilir ama majör IE (immediate early) proteinler transkripsiyonu baskılar ve yeni virüs üretimi engellenir. Bu durum viral replikasyonun nerede gerçekleştiğine bağlıdır. Diferansiye hücreler replikasyona izin verirken diferansiye olmamış hücreler replikasyona izin vermez (45).

Latent enfeksiyon gelişimi ile ilgili olarak üç olası yoldan bahsedilebilir (46):

1. Virüs, hücreye bağlanıp girdikten sonra yeni gen ekspresyonunun olmadığı bir alana gidiyor olabilir.

2. Virüs, hücrede enfeksiyon geliştiriyor ama hemen engellenip latent kalması sağlanıyor olabilir.

3. Virüs hücreye girdikten sonra enfeksiyonla ilgili olmayan ama latent kalmayı sağlayan genler eksprese ediyor olabilir. Deneysel çalışmalarda granülosit-makrofaj progenitör hücrelerdeki latensi ile ilgili genlerin CMV genomunda majör IE promoter alanında yer aldığı gösterilmiştir (47, 48). Bu konuda sağlıklı seropozitif bireylerle de yapılan çalışmalar mevcuttur. Enfekte granülosit-makrofaj progenitör hücrelerde ve enfekte kemik iliği ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) salgılayan hücrelerde UL111.5A geninin bir çeşit viral IL-10'u kodladığı saptanmıştır (49). Genel kanı CMV virüsünün geçici özel bir gen eksprese edip aktif enfeksiyonu durdurduğu ve latent kaldığı yönündedir ve CD14⁺ monositlerinde ve CD34⁺ progenitör hücrelerinde latent kalmak için gereken viral sekanslar belirlenmiştir (46, 50-53).

Virüsün daha önce de belirtildiği gibi monositler, makrofajlar, lökositler, lenfositler, vasküler endotel hücreleri, böbrek epitel hücresi ve tükürük bezi gibi birçok hücre grubunda latent kaldığı düşünülmektedir (54). Böbreklerin uzun

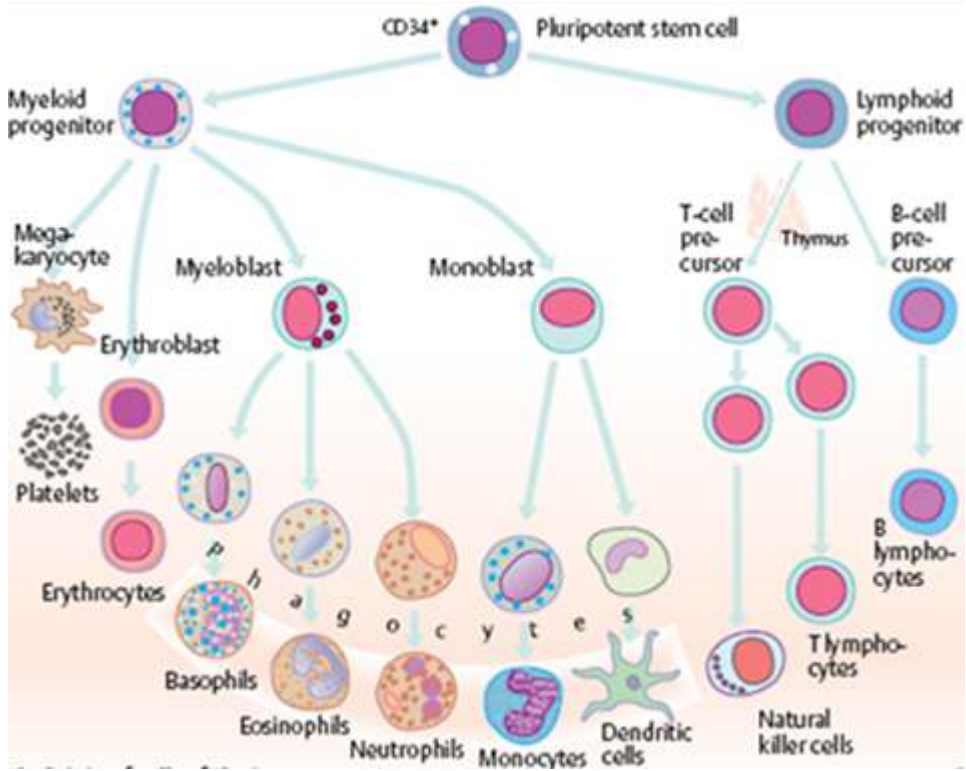
sürekli latent CMV enfeksiyonu, özellikle böbrek transplantasyonu yapılanlarda klinik önem kazanmaktadır (29).

CMV'nin latent durumdan reaktif duruma geçmesi CMV patogenezinin en önemli basamağıdır. Reaktivasyon immünsupresyon, enflamasyon, enfeksiyon ya da strese bağlı gelişebilmektedir (55-57). Reaktivasyon mekanizmasında tümör nekroz faktör (TNF- α) anahtar mediatör olarak rol oynamaktadır. CMV latent durumdayken TNF- α , TNF reseptörlerine bağlanır; protein kinaz c aktive olur; CMV çok erken proteinlerinin transkripsiyonu başlar ve virüs replikasyonunu hızlı bir şekilde uyarılmış olur (58-60). Reaktivasyon, ayrıca stres katekolaminleri epinefrin ve norepinefrin ve yüksek cAMP seviyelerinin IE promotor genini aktive etmesiyle de tetiklenir (57). Benzer şekilde çeşitli inflamatuvar durumlara bağlı olarak proinflamatuvar prostaglandinlerin stimülasyonu cAMP yolağı aracılığıyla viral replikasyona sebep olmaktadır (61).

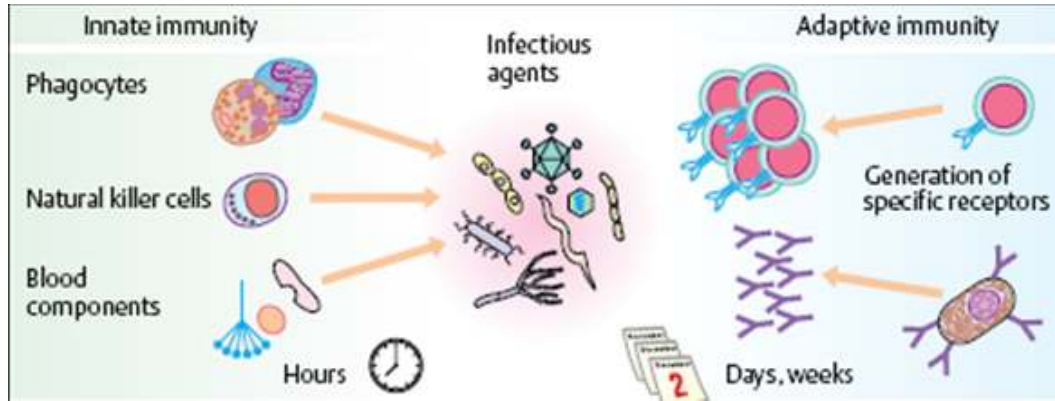
CMV'ye karşı normal konakta özgül immün yanıt koruyucu rol oynar. Bu grupta klinik enfeksiyon nadirdir. CMV genellikle latent kalır ve immün sistemin baskılandığı durumlarda reaktif olur. CMV enfeksiyonundan korunmada hem hücresel hem de humoral bağışık yanıtın belirli -sınırlı- rolleri vardır (62). CMV'ye karşı gelişen bağışık yanıtın belirlenmesi tedavide başarıyı da beraberinde getirecektir.

2.1.7. İmmünite (Bağışıklık)

CMV enfeksiyonunun patogenezinin temelini konak immün yanıtı oluşturmaktadır. İmmün sistem hücreleri kemik iliğinin multipotent kök hücrelerinden kaynaklanır. Kemik iliğinde günde 1.75×10^{11} eritrosit, 7×10^{10} lökosit yapılır. Myeloid kök hücrelerden megakaryositler, eritroblastlar, myeloblastlar ve monoblastlar gelişir. Megakaryositler trombositleri, eritroblastlar eritrositleri, myeloblastlar bazofil, eozinofil ve nötrofilleri ve monoblastlar da monosit ve dendritik hücreleri meydana getirir. İmmün sistemin en önemli hücreleri olan lenfositler ise lenfoid kök hücreden kaynaklanır. Lenfoid kök hücreden T lenfositler, B lenfositler, NK hücreler gelişir (Şekil 2.1). İmmün yanıt, doğal ve kazanılmış immün yanıt bileşenlerinden oluşur (Şekil 2.2.).



Şekil 2.1. İmmün sistem hücrelerinin kökenleri (63).



Şekil 2.2. Doğal ve kazanılmış immün yanıtın bileşenleri (63).

2.1.7.1. Doğal immün (bağışık) yanıt

Etkenle karşılaşınca dakikalar içinde devreye girer. Özgül değildir. Farklı patojenlerdeki ortak olan moleküler yapılara karşı savaşıır. Bu molekülleri PRR (Pattern Recognition Receptors=Kalıp tanıma reseptörleri) ile tanır. PRR,

mikrobiyal bir ajanı ya da hücresele strese neden olan molekülleri tanımak amacıyla immün sistem hücrelerince üretilir. TLR (Toll Like Reseptör)'ler bu gruptadır. Doğal immün yanıt vücut bariyerleri ve hücresele komponentlerden oluşur. Bariyerler arasında deri, gözyaşı, mide asidi sayılabilirken fagositler, kan proteinleri (kompleman gibi), NK hücreler de hücresele komponenti meydana getirir. Doğal immün yanıt CMV'ye karşı koymada önemli rol oynar. Aynı zamanda kazanılmış bağışıklığın da ilk adımı olması nedeniyle önemlidir. CMV, TLR üzerinden sinyal iletimini aktive eder ve doğal immün yanıt hücrelerinden salınan inflamatuvar sitokinler, CD80 ve CD86 gibi ko-stimulatör (eş uyarıcı) moleküllerin salınımına neden olur. Bu maddeler kazanılmış immün yanıtın aktivasyonunda önemlidir (64). Fare modellerinde TLR9 ve TLR3'ün immün savunmada önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (65-67). Virüs hücreye girdiğinde dendritik hücrelerden ve makrofajlardan salınan TNF- α ve β sinyal iletimini başlatır ve NK hücreler aktive olur. Deneysel fare modellerinde NK hücrelerin CMV'nin ortadan kaldırılmasında ve korunmada katkıda bulunduğu gösterilmiştir (68-70). Fare deneylerinde nadir de olsa NK hücrelerin sayısı azaldığında hücrelerin CMV'ye duyarlı hale geldiği gösterilmiştir (71, 72). NK hücrelerin insanlarda CMV'ye olan etkileri henüz derinlemesine bilinmemekle beraber renal transplant hastalarında yapılan araştırmalarda primer ve tekrarlayan enfeksiyonda rolü olduğu, CMV sonrası iyileşmeye katkıda bulunduğu belirtilmiştir (73-75).

2.1.7.2. Kazanılmış immün (bağışık) yanıt

Adaptif (kazanılmış) immünite günler-haftalar içinde devreye girer ve hafıza özelliği vardır. Humoral ve hücresele immün yanıt bileşenlerinden oluşur. Ana hücreler T ve B lenfositlerdir. Birkaç T ya da B lenfosit proliferer olur ve klonal ekspresyonla birçok yavru hücre oluşur. Lenfosit popülasyonu timustan türeyenler (Thymus-derived=T lenfositler), kemik iliği kaynaklılar (Bone-marrow-derived=B lenfositler) ve doğal öldürücü (Natural Killer= NK) hücrelerden oluşur. T lenfositler hücresele immüniteden, B lenfositler ise humoral immün yanıtın sorumludur. İki grup beraberce kazanılmış immün yanıtı oluşturur (62).

2.1.7.2.1. Humoral immün (bağışık) yanıt

CMV enfeksiyonunun yayılımının ve ciddi enfeksiyon gelişiminin önlenmesinde humoral immün yanıtın payı büyüktür (76, 77). CMV spesifik aktörler CMV'den korunma sağlar ve hastalığın yayılmasını ve ciddi enfeksiyon gelişme riskini azaltır. Seropozitif annelerden doğan bebeklerde anneden geçen antikorların CMV'ye karşı koruyucu olması ve seropozitif annelerdeki antikorların fetal enfeksiyonu engellemesi CMV enfeksiyonundan korunmada humoral yanıtın önemli olduğunu göstermektedir (23, 34). Bunun yanında gebelik esnasında primer CMV enfeksiyonu geçiren seronegatif annenin bebeği ve hipogammaglobulinemili hasta gibi immün yetmezlikli hastalar CMV enfeksiyonu için risk altındadır (78).

2.1.7.2.2. Hücresel immün (bağışık) yanıt

T hücre öncülleri kemik iliğindeki ortak lenfoid hematopoetik kök hücrelerden köken alır ve olgunlaşmak üzere timusa göç eder. Timus, T lenfosit gelişimi için olmazsa olmaz bir primer lenfoid organdır. Timosit olarak tanımlanan T hücre öncüllerinden fonksiyonel T lenfositler gelişmesi için stromal hücreler, sitokinler ve kemokinlerle uygun ortam oluşturur. *T cell (hücre) reseptör (TCR : THR) geni* oluşumu ve timosit seçimi antijenleri istisnasız tanıma kapasitesine sahip olan olgun T lenfosit gelişiminde temel basamaklardır. Farklılaşma sürecinde hücrelerin timustaki o farklı çevrede bulunan timik antijen sunan hücrelerdeki antigen presenting cell : APC), peptid-MHC kompleksleriyle, kortikal ve medullar timik epiteliyal hücrelerle ve dendritik hücrelerle temasları ise yardımcı faktörlerdir. Bu aşama sonrasında T lenfositler antijenleri tanıma ve çeşitli yüzey antijenlerin eksprese etme yeteneği kazanırlar (Çizelge 2.1) (79).

Çizelge 2.1. Timusta T hücre seçimi (79).

MHC bağlanması	Oto antijeni tanıma	Sonuç
Zayıf veya eksik	-----	Hücre ölümü
Güçlü	-----	Hücre ölümü
Orta	Evet	Hücre ölümü
Orta	Hayır	Tam maturasyon

T hücre seçimi afinite modeliyle açıklanabilir. Buna göre THR'in, peptid-MHC komplekslerine afiniteleri çok düşükse ya da çok yüksekse o hücreler yok edilir, buna negatif seçim denir. Bu durumu şöyle açıklamak da mümkündür; T hücreler kendileri gibi olan hücreleri tanıyıp reaksiyon geliştiriyorlarsa ya da hiçbir antijeni tanıyamıyorlarsa yok edilirler. Orta afiniteli ve sadece yabancı antijenleri tanıyan hücreler ise $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelere farklılaşma aşamasını tamamlayabilir. Buna ise pozitif seçim adı verilir (80, 81).

Olgunlaşmış $CD4^+$ T lenfositler dalak, lenf nodları ve mukoza ile ilişkili lenfoid dokular (MALT) gibi sekonder lenfoid organlara yayılır. $CD4^+$ T hücreler, $CD8^+$ T hücrelerle beraber T lenfositlerin çok büyük bir kısmını oluştururlar. Olgun T hücreleri ya $CD4$ ya da $CD8$ yüzey antijeni taşır. Kan ve lenfoid dokulardaki olgun T hücrelerin yaklaşık % 65'i $CD4$, %35'i $CD8$ eksprese eder. $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin yüzeylerinde bulunan $CD4$ ve $CD8$ yüzey antijenleri MHC molekülünün non-polimorfik bölgesine bağlanır. TCR kompleksi yoluyla alınan sinyallerle birlikte sinyal iletiminde rol oynar ve böylelikle T hücre aktivasyonu başlatılır. T hücre üzerindeki reseptörler spesifik olarak APC üzerindeki peptid-MHC kompleksini tanıdığı zaman $CD4$ ve $CD8$ yüzey molekülleri MHC ile etkileşime girer. $CD4$, MHC II ile $CD8$ ise MHC I ile selektif olarak bağlanır (79).

$CD4^+$ T hücreler aktive olduktan ve efektör alt gruplarına dönüştükten sonra spesifik sitokinler sekrete etmek suretiyle immün cevap oluşturur. $CD4^+$ T hücrelerin çoğu sitokin üreten yardımcı T hücrelerdir ve hücre dışı mikroorganizmalara karşı immün yanıtta sorumludur (82). $CD4^+$ T hücrelerin doğal immün yanıtı, B hücreleri, sitotoksik T hücreleri hatta immün olmayan hücreleri aktive etmek ya da immün reaksiyonu baskılamak gibi farklı görevleri vardır. $CD4^+$ T hücrelerin T helper 1 (Th1), Th2 dışında Th17, Tfh (follicular helper T cell), Tr1 (regulatory type 1 cells) , Th9 gibi farklı alt tipleri vardır (Çizelge 2.2) (79).

Çizelge 2.2. CD4⁺ T hücrelerin farklılaşmasında rol alan sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve inhibitör transkripsiyon faktörleri (79).

CD4 ⁺ Subset	Cytokines	Transcription factors	Inhibitory transcription factors
Th1	IL12, IFN γ	<u>T bet</u> , STAT1, STAT4, Runx 3, Eomes, Hlx	GATA3
Th2	IL4, IL2	<u>GATA3</u> , STAT6, STAT5, STAT3, Gfi-1, c-Maf, IRF4	T-bet, Runx3
Th17	IL6, IL 21, IL 23, TGF- β	<u>RORγt</u> , STAT3, ROR α , Runx1, Batf, IRF4, AHR	T-bet ⁺ Runx1, Smad3 Runx1 ⁺ FOXP3
Tfh	IL6, IL21	Bcl6, STAT3	
iTreg	TGF- β , IL2	<u>FOXP3</u> , Smad2, Smad3, STAT5, NFAT	
Th9	TGF- β , IL4	IRF4	
Tr1	IL27, IL10	c-Maf, AhR	

Th1: Hücre içi patojenler üzerine etkilidir. IL-12 ve IFN- γ naive T hücrelerden Th1 farklılaşmasını sağlayan ana sitokinlerdir. T-bet ana transkripsiyon faktörü, GATA3 ise ana inhibitör transkripsiyon faktörüdür. IFN- γ , Lenfotoksin α (Lfa) ve IL-2, Th1'in salgıladığı ana sitokinlerdir. IFN- γ , mononükleer fagositlerin ana aktivatörüdür (79). IL-2, sitolitik fenotipe sahip olan CD8⁺ T hücrelerin çoğalmasını teşvik eder (83, 84). NK hücrelerden IFN- γ salınımını da indükler. T hücre büyüme faktörü olarak da bilinir. Ayrıca CD8⁺ hafıza hücrelerinin gelişimini de teşvik eder ve böylece güçlü bir sekonder yanıt sağlanmasına katkıda bulunur (85). Timus kaynaklı olan doğal Treg hücreler yaşamlarını sürdürebilmek ve aktive olabilmek için IL-2'ye ihtiyaç duyar. IL-2, STAT5'i aktive ederek naive hücrelerden FOXP3 salınımını artırır ve supresif özellik kazanmalarını sağlar (86-88). Lfa, TNF ailesinin bir üyesidir. Otoimmün hastalık gelişimi ile ilişkilidir (79).

Th2: Th2 diferansiasyonunda IL-4 ve IL-2 kritik role sahiptir. GATA3, IL-4 tarafından indüklenen STAT6 yoluyla eksprese edilir ve Th2'nin ana transkripsiyon faktörüdür. GATA3 yokluğunda Th2 diferansiasyonu kesintiye uğrar. Th2 lenfositler helmintleri de içeren hücre dışı parazitlere karşı immün yanıtı ve alerji gelişiminden sorumludur. Ana sitokinleri IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10 ve IL-25 ve amphiregulin'dir. Alerjik inflamasyondan özellikle IL-4 sorumludur ve görevi B lenfositlerden IgE salınımını içerir (89).

Th17: IL-6, IL-21, IL-23 ve TGF- β Th17 diferansiasyonunda ana majör sitokinlerdir. ROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T) ise ana transkripsiyon faktörüdür. Th17 lenfositler hücre dışı bakteri ve mantar enfeksiyonlarından sorumludur. Ayrıca otoimmün hastalık oluşumunda da görev alır. Efektör sitokinleri IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22'dir. IL-6, IL-1, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler ve proinflamatuvar kemokinlerin indüksiyonunu yapar ve inflamasyon alanına inflamatuvar hücrelerin kemotaksisini sağlar (90, 91). IL-21, Th17 tarafından üretilen bir sitokin olmasının yanında Th17 oluşumuna katkıda da bulunan bir sitokindir. Aynı zamanda T hücre aktivasyonu, B hücrelerin plazma hücreleri ve hafıza hücrelerine farklılaşması ve NK hücrelerin aktive edilmesi gibi yan görevleri de vardır. IL-22 hem inflamatuvar yanıtta rol alır hem de doku koruyucu özelliği vardır (92, 93).

Treg: iTreg ve nTreg olmak üzere 2 alt türü vardır. iTreg, periferik lenfoid organlarda gelişimini tamamlarken nTreg, timustan olgunlaşmış olarak çıkar. Ana transkripsiyon faktörü FOXP3'tür (94). TGF- β , iTreg hücre oluşumunda kritik sitokindir. FOXP3, CD4⁺CD25⁺ T hücrelerden eksprese edilir ve iTreg soyunun oluşumunda ana faktördür. Treg ve Tr1 lenfositlerin vücudun kendi antijenlerine ve yabancı antijenlere toleransında önemli bir rol oynar. Patojenler ortadan kaldırıldıktan sonra immün cevabı negatif yöne kaydırıp immünpatolojiden korunma sağlar (95, 96). Ana efektör sitokinleri IL-10, TGF- β ve IL-35'tir. IL-10 proinflamatuvar cevabı suprese eden güçlü bir inhibitör sitokindir. TGF- β ile beraber IL-10, IgE üretimini güçlü bir şekilde baskılar ve alerji ve inflamasyonu azaltır (97-100).

Tfh: Lenfoid dokunun folliküler bölgesinde bulunur. Antijen spesifik B hücre yanıtına katkıda bulunur. IL-6 ve IL-21 diferansiasyonun temel sitokinleridir. Transkripsiyon faktörü ise STAT3'tür. Tfh1, Tfh2 ve Tfh10 olmak üzere alt grupları vardır. Tfh1, IFN- γ sekrete ederek IgG2a üretimini; Tfh2 IL-4 ile IgG1 ve IgE ; Tfh10 ise IL-10 ile IgA sekresyonunu teşvik eder (101).

Th9: IL-4 ve TGF- β ile naive T hücrelerden farklılaşır. IRF4 ana transkripsiyon faktörüdür. Bol miktarda IL-9 sekrete eder. Günümüzde alerjik patolojilerin gelişiminden ve özellikle astımdan sorumlu tutulmaktadır (79).

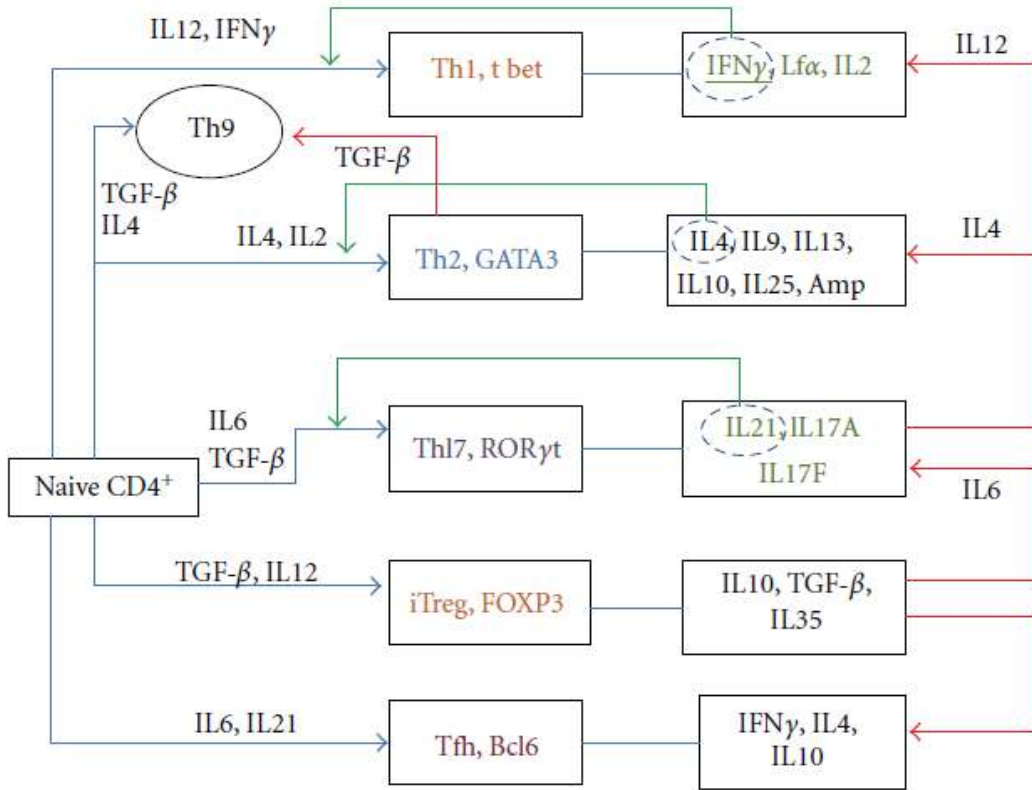
CD8⁺ sınıf I T hücreler sitotoksik T hücrelerdir ve hücre içi mikroorganizmalar ile meydana gelen enfeksiyonların eradikasyonundan sorumludur (102). Enfeksiyonu takiben yaklaşık 6 gün içinde primer sitotoksik yanıt başlar ve enfeksiyon bittikten sonra da sitotoksik T hücreler kaybolur. Enfeksiyon sırasında gelişen hafıza hücreleri ise kaybolmaz (memory T cells). CTL (sitotoksik T lenfosit), virüsün kor, zarf ve non-virion proteinlerine karşı gelişir. Spesifik bir T hücre yanıtı ortaya çıkar. Th lenfositler CTL öncül hücrelerinin oluşumuna katkıda bulunur. CTL'ler MHC1 ile ilişkili antijenlerin oluşturduğu kompleks yapıları tanır çünkü virüsün konak hücrede oluşturduğu antijenik yapılar sadece MHC1'lerle hücre yüzeyinde eksprese edilir. MHC1 molekülleri tüm somatik hücrelerde mevcuttur. CTL'ler perforin ve granzim gibi sitolitik maddeler salgılayarak hedef hücreyi yok eder. IFN- γ en önemli sitokinidir. IFN- γ salgılayarak virüsün diğer hücrelere yayılmasını engeller (103). CMV replikasyonunun önlenmesinde T hücre aracılı immün yanıt esas mekanizmadır. Hücresel immün yetmezliği olan hastalarda CMV enfeksiyonunun ciddi seyirli olması da bunu desteklemektedir. T hücre aracılı immün yanıtta CMV'ye spesifik CD4⁺ T lenfositler, CD8⁺ T lenfositler ve $\gamma\delta$ T lenfositler rol almaktadır.

CD8⁺ T lenfositler hücresel immünitinin en önemli elemanıdır. Fare modellerinde olduğu gibi insanda da CMV enfeksiyonu oluşumu ve gelişimini önlemektedir (70). Bu özellik renal transplant hastalarıyla yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (104, 105). CD8⁺ T hücreler için ana hedefi olan antijenler pUL123 (IE-1), pUL122 (IE-2) ve pUL83 (pp65)'tir.

CMV taşıyan sağlıklı bireylerin periferik kanlarındaki CD8⁺ T hücrelerinin median değeri olarak %10'u, daha yaşlı bireylerde ise %40'tan fazlası CMV spesifiktir (106-108). CMV'nin neden bu kadar immünojenik olduğu ve immün cevabın neden diğer patojen ve antijenlerden daha baskın olduğu henüz anlaşılamamıştır. CMV'nin birçok farklı antijenik yapısı olmasından dolayı CMV spesifik T hücre yanıtı oldukça çeşitlidir. Bu antijenik yapılar, erken ve geç

antijenler olmak üzere yapısal elemanlar ve pp28, pp50, pp150 gH, gB, unique short 2 (US2), US3, US6, US11, US16, US18 gibi immün modülatörlerdir (109-111). CMV spesifik T hücre yanıtında oligoklonal T hücreler birikir ve naive T hücreler bu nedenle azalır (112, 113).

CD4⁺ T hücreler de CD8⁺ T hücreler gibi CMV kontrolünde olmazsa olmazdır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. CD4⁺ T hücrelerin farklılaşmasında rol alan ana sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve inhibitör transkripsiyon faktörlerinin etkileşimi (79).

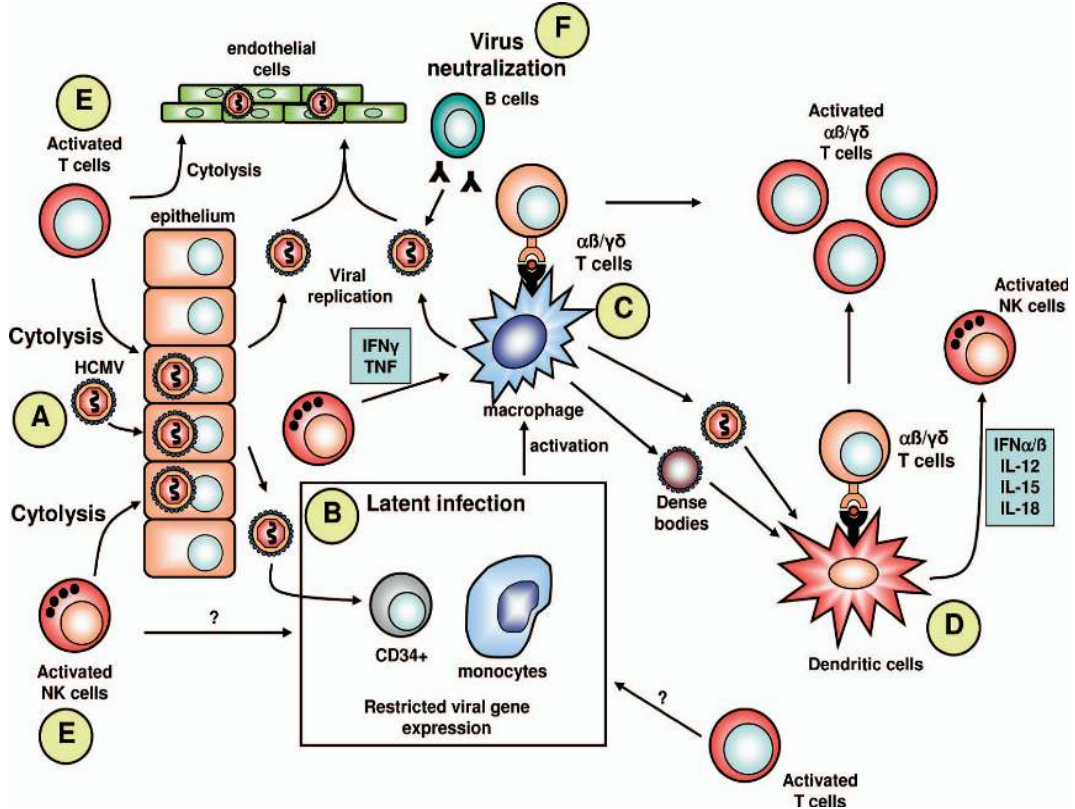
Solid organ transplant hastalarında gösterilmiştir ki CMV spesifik CD4⁺ T hücre yanıtı düşükse enfeksiyöz komplikasyonlar hızlı bir şekilde gerçekleşir (114, 115). Benzer olarak solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda CD8⁺ T hücre yanıtının yanında CD4⁺ T hücre yanıtının önemli olduğu ve CD4⁺ T hücre eksikliğinde uzun dönemde CD8⁺ T hücrelerin CMV'den korunmada yetersiz kaldığı gösterilmiştir (78, 116, 118). Bu özellik benzer şekilde kök hücre nakli

yapılan hastalarla ilgili araştırmalarda da gösterilmiştir (119-121). Ek olarak CD8⁺ T hücre etkinliğinin genişleyebilmesi için de CMV spesifik CD4⁺ T hücrelere gereksinim vardır (122). Elkington ve ark. (123), CD4⁺ T lenfositlerin sitolitik etkilerini göstermişlerdir.

Reglatuvar T hücreler (nTreg)'in CD8⁺ T hücrelerle uyumlu olarak hematopoetik kök hücre nakli hastalarında graft versus host hastalığından korunmada ve immün düzelmeyi sağlamada etkili olduğu gösterilmiştir (124).

Sağlıklı bireylerde kandaki T hücrelerinin % 5'inden azını    T lenfositler oluşturur. Bu hücreler yüzeylerinde ne CD4 ne de CD8 yüzey antijeni bulundurur. Hem fare modellerinde hem de transplantasyon yapılan hastalarda gösterilmiştir ki üç T lenfositler CMV'ye karşı immün yanıtta rol oynamaktadır (125-127).

şekil 2.4'te CMV 'nin doğal ve kazanılmış immün yanıt elemanları ile kontrolü özetlenmiştir. Sağlıklı bireylerde CMV'ye bağlı primer enfeksiyon mukozal epitelde replikasyonla başlar (A). Miyeloid seri elemanları olan monositler ve CD34⁺ hücrelere virüsün yayılmasından sonra virüs o hücrelere latent olarak yerleşir (B). Bu latent kalan hücrelerde viral gen ekspresyonu sınırlıdır ve bu durum efektör hücrelerin virüsün immün partiküllerini tanımasını engeller. Virüsle enfekte olan monositlerin makrofajlara dönüşümüyle ilerleyici enfeksiyon başlar (C). Virüs partikülleri ya da virüs kaynaklı yoğun cisimcikler dendritik hücreler (Dc) gibi antijen sunan hücreler tarafından işlenir ve antijene spesifik T hücrelerinin uyarılması sağlanır (D). Ek olarak toll like reseptörleri (TLR) yolula aktive olan Dc'ler bir takım sitokin ve kemokinler salgılayarak doğal immün yanıtı ( rneğin doğal öldürücü h creleri=NK) aktive ederler (D). virüsle enfekte olan makrofajlar ayrıca direkt olarak antijen spesifik T hücreleri uyarabilir (C). Aktive olan bu T hücreler (CD4⁺, CD8⁺,    T hücreler) ve NK hücreler enfekte hücreleri lizise uğratır ya da IFN-  ve TNF gibi sitokinlerle virüsün replikasyonunu durdurur (E). Kazanılmış immünitenin bir diğer kolu olan ve antijen sunan hücrelerle aktive edilen B hücreler, hücre dışı vir su antikor ilişkili nötralizasyon yoluyla kontrol eder (F) (62).



Şekil 2.4. CMV'nin doğal ve kazanılmış immünite tarafından kontrolü (62).

2.1.7.3. CMV'nin immün sistemden kaçış mekanizmaları

Hücresel bağışıklıkta MHC-I aracılı $CD8^+$ T lenfositler, Natural Killer (NK) hücre aktivitesi ve antikora bağımlı hücresel sitotoksikite etkin rol oynamaktadır. Virüse özgü T lenfosit yanıtlarının iyileşmedeki doğrudan rolü belirlenememişse de konjenital olarak enfekte bebeklerde T lenfosit yanıtının normal olgunluğa gelmesinden sonra virüs salımının durması, HIV ile enfekte olgularda da $CD4^+$ T lenfosit sayısının 50 hücre/mm^3 'ün altına düştüğü dönemlerde CMV enfeksiyonu sıklığında artış görülmesi bu yanıtın önemini göstermektedir. Tüm bu veriler CMV enfeksiyonunun iyileşmesinde en önemli rolü T lenfositlerin üstlendiğini göstermektedir (23, 34).

CMV'nin bağışık yanıttan kaçışının temel mekanizması MHC-1'e bağlı antijen sunumunun inhibisyonudur (128). Başarılı bir immün yanıt MHC-1 ile sitotoksik T hücreler (T_c)'e tanıtılan antijenik peptidlerin oluşumuna bağlıdır. IE

fazında Tc yanıtı 72 kDa'luk IE-1 transkripsiyon faktörü peptidlerine karşıdır (129, 130).

Matriks proteini olan pp65 kinaz aktivitesine sahiptir. Bu özelliğiyle IE proteinlerini fosforiller (131). Bu olay IE peptidlerinin MHC-1 yoluyla sunumunu bloke eder ve böylece IE-1 spesifik Tc yanıtının önüne geçilmiş olur (132). Ek olarak CMV genomunda kodlanan 5 farklı protein (US2, US3, US6, US10, US11) MHC-1 peptid kompleksinin salınımını bloke ederek MHC-1 oluşumunu hızlı bir şekilde düşürür (133-135). MHC-1 yoluyla antijen sunumu CMV hücreleri tarafından engellenir. CMV ayrıca MHC-II aracılı immün yanıt mekanizmasını ve IFN- α sinyal transdüksiyonunu engelleyerek de immün yanıtı korumayı başarır (136, 137, 138).

NK hücreler, hücre yüzeylerindeki aktivatör ve inhibitör reseptörlerle hedef hücreyi tanır ve yok ederler (139). Prensip CMV ile enfekte hücreler NK hücrelerin uyguladığı lizise karşı korunmasızdır. Ancak CMV, geliştirdiği bir takım yöntemlerle NK hücrelerden her zaman olmasa da kaçmayı başarmıştır. İlk yöntemi MHC-1 benzeri moleküllerle NK hücrelere tuzak kurup tanınmayı önlemek (140), diğeri ise NK aktivating reseptör NKp30'un CMV tarafından inhibisyonudur (141). İkinci mekanizmada virüs MHC-I ağır zincir homologu olan bir protein (pUL18) sentezler ve bunun hafif zincire (β 2 mikroglobulin) bağlanması ile olay gerçekleşir. Sonuçta CMV ile enfekte hücreler MHC-I eksprese edemezler. Ayrıca pUL18 β 2 mikroglobulini sekestre ederek MHC-I molekülünün olgunlaşmasını engellerler. Bu da enfekte hücrelerin Tc lenfositler tarafından tanınmasını önler. Bu mekanizma hem immün baskılanmaya neden olur hem de latent enfeksiyona zemin hazırlar (23, 34).

2.1.7.4. Sitokinler

Sitokinler doğal ve kazanılmış immün yanıtta rol oynayan bir protein ailesidir. Genellikle düşük molekül ağırlıklıdır ve tek zincirden oluşur. Hücrede büyüme, aktivasyon, enflamasyon, doku onarımı ve fibrozis gibi önemli süreçleri regüle eder. Aynı sitokin birçok hücre tarafından yapılır ve her bir sitokin başka birçok sitokin üzerinde etkili olur. Antijenik uyarıya yanıt olarak ya da enflamasyon sonucu aktive olan hücreden salınan sitokin hedef hücredeki sitokin

reseptörüne bağlanır ve sinyal iletimi gerçekleşir. Lenfositler ve immün sistemin diğer hücreleri fonksiyonlarını sitokin sentezleyip salgılayarak gösterir (82).

Önemli sitokinler

IL-1: Endojen pirojendir. Makrofajlardan salınır. Th'ları uyarak IL-2 üretmelerini kamçılar.

IL-2: Th₂'nin sitokinidir. Hem Th₂ hem CTL'leri uyarak çoğalmalarını sağlar. IL-4 ile beraber B lenfositleri uyarır.

IL-3: Th'lar tarafından salgılanır. Kök hücre çoğalması ve farklılaşmasına yardımcı olur.

IL-4: Th₂'lerden salınır. B lenfositlerin çoğalmasına ve farklılaşmasına katkıda bulunur. Hangi antikordan ne kadar sentezleneceğini yani izotip çevrimini sağlar. Tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonunda görev alır .

IL-5: Th₂'lerden salınır. Özellikle eozinofiller üzerine etkilidir.

IL-6: Th ve makrofajlardan salgılanır. IgG antikorların yapımını uyarır.

IL-10: Th₂'lerce salınır. IFN- γ üretimini kısıtlar ve böylece Th₁ gelişimini inhibe eder.

IL-12: Dendritik hücrelerden ve aktive olmuş makrofajlardan salınır. Th₁ yapımını uyarır. Th₂'yi inhibe eder. IFN- γ yapımını da indükler.

IL-13: Th₂'lerden salınır. IgE'yi artırmadan havayolu aşırı duyarlılığına katkıda bulunur.

IL-15: T lenfosit farklılaşmasını sağlar. IFN- γ ve TNF- α salınımı indükler. NK hücrelerinin toksik etkilerini uyarır.

IL-18: IL-12 ile beraber IFN- γ 'yı uyarır.

TGF- β (transforming growth factor beta): Bu maddeyi birçok farklı hücre sentezleyebilir. T lenfositleri, makrofajların, B lenfositlerin, nötrofil ve NK hücrelerin fonksiyonunu durdurur.

İnterferonlar: Viral mRNA'ların çevrimini inhibe eder ve hücre içi virüslerle savaşır. α , β ve γ olmak üzere 3 çeşidi vardır. α ve β interferon doğal immün yanıtta rol alırken, γ interferon T lenfositler tarafından üretilir.

IFN- α : Lökositlerce salgılanır. NK hücreleri uyarır. Antiviral etkinliği nedeniyle viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılır.

IFN- β : Fibroblastlardan salınır. Antiviral özelliği IFN- α gibidir.

IFN- γ : Th₁ ve NK hücrelerden en çok salınır. Makrofajların, NK hücrelerin ve nötrofillerin fagosit yapmalarını teşvik eder. Aynı zaman da MHC I ve II sentezini de artırarak antijen sunumunu güçlendirir (142, 143).

2.1.8. Klinik

Sitomegalovirüs, asemptomatik enfeksiyona neden olabileceği gibi hafiften şiddetliye kadar değişebilen klinik tablolara yol açan semptomatik enfeksiyonla da kendini gösterebilir. Ayrıca bakteri, mantar gibi fırsatçı patojenler de CMV hastalığına eşlik edebilir.

Toplumsal tüm kesimlerinde enfeksiyona neden olabilmektedir. Yenidoğanlarda konjenital CMV enfeksiyonu, erişkinlerde CMV enfeksiyonu ve immün yetmezlikli hastalarda CMV enfeksiyonu şeklinde kendini gösterir.

2.1.8.1. Solid organ alıcılarında CMV enfeksiyonu

Kronik böbrek yetmezliği ve nihayetinde son dönem böbrek yetmezliği gelişen hastaların tek yaşam şansları organ nakli ya da diyaliz tedavisidir. Böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda yaşamsal fonksiyonlar yerine geldiği gibi, diyaliz ile karşılaştırıldığında psikolojik, sosyal, fiziksel zorlukların da ortadan kalkması avantajları vardır. Hastalar iş, özel ve sosyal yaşamlarına daha başarılı bir şekilde uyum sağlarlar. Ancak immün supresif tedavi ile amaçlandığı şekilde organın reddi önlenirken bu kez de özellikle latent enfeksiyonların reaktivasyon sorunu ile karşılaşabiliriz. Solid organ transplantasyonu sonrası dönemde en fazla sorun yaratan enfeksiyon etkenlerinden birisi CMV'dir. Böbrek nakli alıcılarında CMV enfeksiyonu görülme riski ortalama %60'tır. Risk immün supresif tedavinin yoğun olduğu ilk üç ayda en yüksektir. Ateş, kırgınlık, döküntü, artralji gibi semptomlar, yüksek transaminaz düzeyleri, nötropeni ve trombositopeni gibi bulgular görülür. Hastalarda pnömoni, hepatit, retinit, pankreatit, GIS lezyonları, myokardit, ensefalit ve periferik nöropati de görülebilir. Viremi böbrek rejeksiyonu ve kronik allograft nefropatisine yol açabilir. Trombotik mikroanjiyopatiye ve demiyelinizan polinöropatiye de yol açabilmektedir. CMV, transplant renal arter stenozu ve yeni diyabet gelişimi için bağımsız bir risk

faktörüdür. Organ nakli alıcılarında CMV tanısı zamanında doğru konmaz ve tedavi edilmezse yüksek bir oranda hasta kaybedilir (144-150). Klinik yelpaze hastanın serolojik durumuna göre değişkenlik gösterir. Seronegatif alıcıya (R)(-) /seropozitif vericiden (D)(+) organ nakli yapıldığında alıcıda primer CMV enfeksiyonu gelişir. Böyle bir serolojik durumda seronegatif alıcılara riski azaltmak için filtre edilmiş kan kullanılmalıdır (151). Seropozitif alıcıda ise CMV reenfeksiyon şeklinde gelişir.

Transplantasyon sonrası dönemde CMV ve diğer viral enfeksiyonların önlenmesi için anti viral tedavi stratejileri uygulanmaktadır (152-153). Organ Nakli Merkezi'mizin protokolü de altı ay süre ile valgansiklovir / valasiklovir uygulaması şeklindedir. Bazı merkezlerde ise antiviral tedavilerin yüksek maliyeti ve olası komplikasyonları nedeni ile preemtif tedavi uygulanmaktadır. Bu yaklaşımın laboratuvar maliyeti yüksektir. Tedavi süresince CMV varlığı 1-2 haftada bir test edilmelidir (156). Solid organ alıcılarında "CMV hastalığı vardır" diyebilmek için D+/R+ ve D-/R+ olduğu durumlarda antijenemi testinde 2×10^5 hücrede 400 ya da üzerinde pp65 (+) hücre varlığı anlamlı kabul edilir (156). Preemtif tedaviye başlama sınırı ise pp65 (+) 100 hücre varlığıdır. Alıcının seronegatif olduğu durumlarda ise CMV hastalığı için ≥ 2 değeri ya da haftada 2 defa 1 pp65(+) PBL/ 2×10^5 görülmesi yüksek riski ifade eder. Preemtif tedavinin belirlenmesinde solid organ nakil hastalarında tek başına antijenemi testi yeterli değildir, viral yük çalışılmalıdır (146). Bizim merkezimizde solid organ alıcıları viral DNA kantitatif test ile izlenmektedir.

2.1.8.2.İmmün supresif tedavinin immün sistem üzerine etkileri

Organ nakillerinde immün supresif tedavi ile T hücre aktivasyonunu önlemek, sitokinlerin yapımına ya da sitokin-reseptör ilişkisiyle aktivasyon ve klonizasyona mani olmak, endotel hücre aktivasyonu ve antijen ekspresyonunu önlemek amaçlanmaktadır.

Kortikosteroidler, IL-2 üretimini baskılayarak T hücre proliferasyonunu; ayrıca IL-1 ve IL-6 gen indüksiyonunu ve monositlerin inflamasyon alanına göçünü engeller (157). Antiinflamatuvar özellikleriyle antijen prezentasyonunu

inhibe eder. Prostoglandin yapımına negatif etki yaparak TNF-alfa ve IFN-gama'nın makrofaj ve transplante edilen greft üzerine etkilerinin çoğunu geri çevirir (158).

Azatioprin (AZA), DNA ve RNA sentezini önleyen pürin sentez inhibitörüdür. IL-2 üzerinden etkisi olmadığından kalsinörin inhibitörleri ile kullanılabilir (157).

Mikofenolik Asit (MFA), ikinci kuşak selektif bir de-novo pürin sentez inhibitorü olan **Mikofenolat Mofetil (MMF)**'in aktif formudur. Lenfosit işlevi ve proliferasyonu için gerekli olan pürin metabolizmasında, guanozin monofosfat sentezinin hızını inhibe ederek etki gösterir (159). MMF invitro olarak T ve B hücre proliferasyonunu bloke eder, antikor oluşumunu engeller ve sitotoksik T hücre oluşumunu inhibe eder (160).

Kalsinörin İnhibitörleri, gen transkripsiyonunu inhibe ederek IL-2 sentezini bloke eder. İmmünsupresif etkileri sitoplazmik reseptör proteinleri ile birleşerek kompleks bir yapı oluşturmaları ile oluşur. Siklosporin A sitoplazmik reseptörü Siklofilin, Takrolimus da Takrolimus-Binding Protein ile birleşerek kalsinörini inhibe eder. Kalsinörin aktive T hücrelerinin nükleer faktörü gibi regülatör proteinleri defosforile eder. Böylece bu proteinlerin nükleer membran geçişi kolaylaşır. Kalsinörinin inhibe edilmesiyle, T hücrelerini aktive eden sitokin genlerinin ekspresyonu bozulurak IL-2, IL-4, IFN- γ ve TNF- α vb. sitokinlerin kalsinörin inhibisyonu ile üretimi ve lenfosit proliferasyonu azalmış olur (161).

mTOR İnhibitörleri, aktive T hücrelerinin çoğalmasını düzenleyen, hücre içi sinyal iletim yolunun blokajı ile hücre çoğalması ve migrasyonunu önleyici kapasiteye sahip immünsupresan ilaçlardır (162). Sirolimus, onkogeneze ve immün yanıtta hücre bölünmesine aracılık eden, transdüksiyon sinyallerini uyarıcı, büyüme faktörünü engelleyerek etkisini gösteren, güçlü bir m-TOR inhibitörüdür. TOR sitozolik bir enzimdir; T ve B lenfositlerinin çoğalması ve antikor

üretiminde önemli role sahiptir. Sirolimus, FK bağlayıcı proteine ve daha sonra bu kompleks mTOR proteinine bağlanarak mTOR aktivasyonunu engeller. Bunun sonucunda IL-2 etkisi ile oluşacak T hücre çoğalması önlenir. Sirolimus, lenfosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını baskılar. Hem kalsiyum bağımlı, hem de kalsiyum bağımlı olmayan metabolik yolları inhibe eder ve T hücre proliferasyonunu tetikleyen sitokin sinyallerini bloke eder. mTOR inhibitörü grubundan bir diğer immünsupresif olan Everolimus etkinliğini T hücre siklusunda G1'den S fazına geçişin ilerlemesini önleyerek T hücre aktivitesini bloke ederek gösterir. İmmünsupresif etkisine ek olarak, doku tamiri için gerekli olan fibroblast büyüme faktör (FGF)'ü inhibe eder (163-165).

Poliklonal Antikorlar; antilenfosit globulin (ALG) ve antitimosit globulin (ATG), dolaşımdaki lenfositlere bağlanarak hücrenin lizisine yol açar. Ayrıca T hücre reseptörlerini maskeleyerek lenfosit fonksiyonlarını önler (157).

Monoklonal Antikorlar grubunda yeralan Muronomab-CD3, T lenfosit yüzeyindeki CD3 reseptörüne karşı geliştirilmiş monoklonal antikordur. OKT3, CD3'e bağlanarak T hücrelerinin tüm fonksiyonlarını bozar. Basiliximab ve Daklizumab, CD25'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlardır. IL-2 reseptörlerini taşıyan aktif T lenfositlerin üzerindeki CD25 reseptörüne, spesifik olarak yüksek afinite ile bağlanırlar. Böylece T hücre proliferasyonu için sinyal ödevini gören, IL-2'nin bağlanmasını engellerler (157).

2.1.9. Tanı yöntemleri

2.1.9.1. Hücre kültürleri

CMV enfeksiyonu tanısında altın standart olarak kabul edilir (8, 157). CMV'nin en iyi ürediği hücreler insan embriyosu akciğer fibroblastlarıdır. Sitopatik etkinin görülebilmesi için ortalama 21 gün (1-4 hafta) gibi uzun bir süre geçmesi gerekmektedir (8). Bu yöntemin inokülasyon aşaması santrifüjle güçlendirildiğinde ve replikasyon esnasında en erken gen ekspresyonu flöresan işaretli monoklonal antikorlar kullanılarak saptandığında testin özgüllüğü % 100'e ulaşır. Bu yöntem 'shell vial' yöntemidir ve duyarlılıkta değişiklik olmadan çok

kısa sürede (24-48 saat içinde) viral replikasyon gösterilebilir (10). Hücre kültüründe kullanılan hücrelerin ömrünün kısa olması, kandaki lökositlerin bu hücrelere toksik etki göstermesi, donanımlı laboratuvar ve eğitimli eleman gerektirmesi nedenleriyle hücre kültürlerinin rutin laboratuvarlarda kullanımı sınırlıdır (4, 5).

2.1.9.2. Histopatolojik inceleme

Dokularda ve idrar sedimentinde lokalize CMV enfeksiyonunun tanımlanmasında kullanılır. Hematoksilen-Eozin Papanicolau boyaları kullanılarak intranükleer bazofilik inklüzyonlar (baykuş gözü) içeren büyük hücreler (sitomegalik hücreler) bazen de eozinofilik sitoplazmik inklüzyonlar görülebilir. Hızlı ve kolay bir yöntemdir. Özgüllüğü yüksek ancak duyarlılığı düşüktür. Duyarlılığın artırılması için immünohistokimyasal yöntemler ve insitu hibridizasyon yöntemleri kullanılabilir (4, 5). Ayrıca serolojik olarak da tanının desteklenmesi gerekir, çünkü morfolojik değişiklik olmadan da CMV dokuları enfekte edebilir. Tipik sitomegalik hücrelerin görülmemesi CMV enfeksiyonunu dışlamaz (30).

2.1.9.3. Serolojik testler

Serolojik tanıda, lateks aglütinasyon testi, immün capture testi, kompleman fiksasyon testi, indirekt hemagglütinasyon testi gibi serolojik yöntemler; esas olarak ELISA temelli testler kullanılır. Serumda CMV'ye özgül IgG ve IgM antikorlarının varlığı araştırılır. Hızlı, özgül ve duyarlı, düşük fiyata çok sayıda test çalışılabilmesi ELISA yönteminin önemli avantajlarından. Ancak klinik değeri sınırlıdır. Hastanın bağışık durumunu saptamada ve antikor titre takibinde kullanılmaktadır. Kompleks viral lizatlar kullanıldığı için diğer herpesvirüslerle çapraz reaksiyon oluşabilmesi, otoantikor pozitifliği olan hastalarda yalancı pozitiflik verebilmesi dezavantajlarıdır. İmmünkompetan konakta primer enfeksiyonda önce CMV-IgM, ardından IgG pozitifleşir. Reaktivasyon ve sekonder enfeksiyonda ise CMV-IgG miktarında artış gözlenir. İmmün yetmezlikli hastada akut enfeksiyonda primer enfeksiyon esnasında bazen saptanamaması bazen de uzun bir süre sonra bile pozitif kalması nedeniyle IgM

taininin pek değeri yoktur, testin duyarlılığı düşüktür. CMV IgG testi, geçirilmiş enfeksiyon taininde, doğurganlık çağındaki kadınların ve nakil hastalarının enfeksiyona duyarlı olup olmadıklarını saptamada, epidemiyolojik çalışmalarda, serokonversiyon takibinde, avidite testlerinde kullanılır (6, 166).

Akut CMV tanısında CMV IgM pozitifliği veya iki farklı serum örneğinde CMV IgG titresinin dört kat artışı kullanılır. Bazı durumlarda spesifik CMV-IgG ve IgM birlikte pozitif saptanabilmektedir. Enfeksiyonun primer veya sekonder ayrımını yapmak için CMV IgG avidite testi kullanılır. Avidite olgunlaşması normal konakta altı ayı bulur. Primer enfeksiyonun ilk 3 ayında avidite düşük olup, son üç ayda ve sonrasında ve sekonder enfeksiyonlarda immüitenin olgunlaşmasına bağlı olarak yüksek aviditeli antikorlar saptanır. İmmün yetmezlikli hastada bu süreç daha uzundur. Bu test sıklıkla gebelerdeki primer enfeksiyonun saptanmasında kullanılır (167).

2.1.9.4. CMV antijenemi testi

Periferik kan polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve bronkoalveolar lavaj, beyin omurilik sıvısı (BOS) (28, 30) gibi örneklerde CMV'nin geç proteinlerinden olan pp65'in immünflöresan yöntemiyle kantitatif ölçümüne dayanan bir yöntemdir (9). Aynı zamanda bir alt matriks proteini olan pp65 aktif replikasyonun göstergesidir. Duyarlılığı hücre kültüründen daha yüksektir, enfeksiyonu daha erken dönemde saptar (10). Özgüllüğünün de yüksek olması, standardizasyonu tam ve aynı günde sonuç verebilmesi diğer olumlu özellikleridir. En önemli dezavantajlarından biri örnek alındıktan sonra en fazla dört saat içinde çalışılması gerekliliğidir (7, 8) çünkü çoğu örnek 24 saatten uzun süre pozitif kalsa bile antijen sayısında düşüş gözlenmiştir (7). Bir diğer dezavantajı ise lökopenik olgularda yetersiz kalmasıdır (7, 8) ve organ nakli hastalarındaki yüksek antijenemi düzeyi hastalık gelişimi göstergesidir (1). Ayrıca CMV hastalığı riski taşıyan hastaların rutin izleminde yarar sağlayabilmektedir (7).

2.1.9.5. Moleküler testler

CMV tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction=PCR) hem hızlı hem de yüksek duyarlılıkta bir test olması nedeniyle CMV enfeksiyonu tanısında rutin laboratuarlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemde kan, idrar, BOS, BAL, amnion sıvısı gibi örneklerde CMV DNA varlığı araştırılmaktadır. CMV enfeksiyonunun özelliklerinden dolayı -latent olması ve genellikle reaktivasyonlarla seyretmesi- CMV DNA'nın kantitasyonu yapılmalıdır. Viral yük miktarı nakil hastalarında, HIV pozitif olgularda, CMV hastalığının belirlenmesinde, preemtif tedavi verilecek olguların seçilmesinde ve tedavi monitörizasyonunda kullanılır. İmmün supresif tedavi alan transplant hastalarında CMV viral yük her zaman enfeksiyon ile orantılı olmayabilir (168-169). Çünkü virüse immünolojik yanıt kişisel farklılıklar gösterir ve böyle durumlarda hastanın immün yanıtının saptanması tanı ve tedavi izleminde hasta özelinde yaklaşımı sağlayacaktır (78).

2.1.9.6. Hücre içi ATP ölçümü

Bu yöntem lenfosit stimülasyonunun ardından manyetik seperasyon yoluyla ayrılan CD4⁺ T hücrelerin parçalanması sonucu açığa çıkan hücre içi ATP'nin luminometride ölçümü esasına dayanır. Transplant hastalarında enfeksiyon ya da akut rejeksiyon için tanısız değildir. Sadece enfeksiyon/rejeksiyon riskini belirlemede kullanılması önerilmektedir (170).

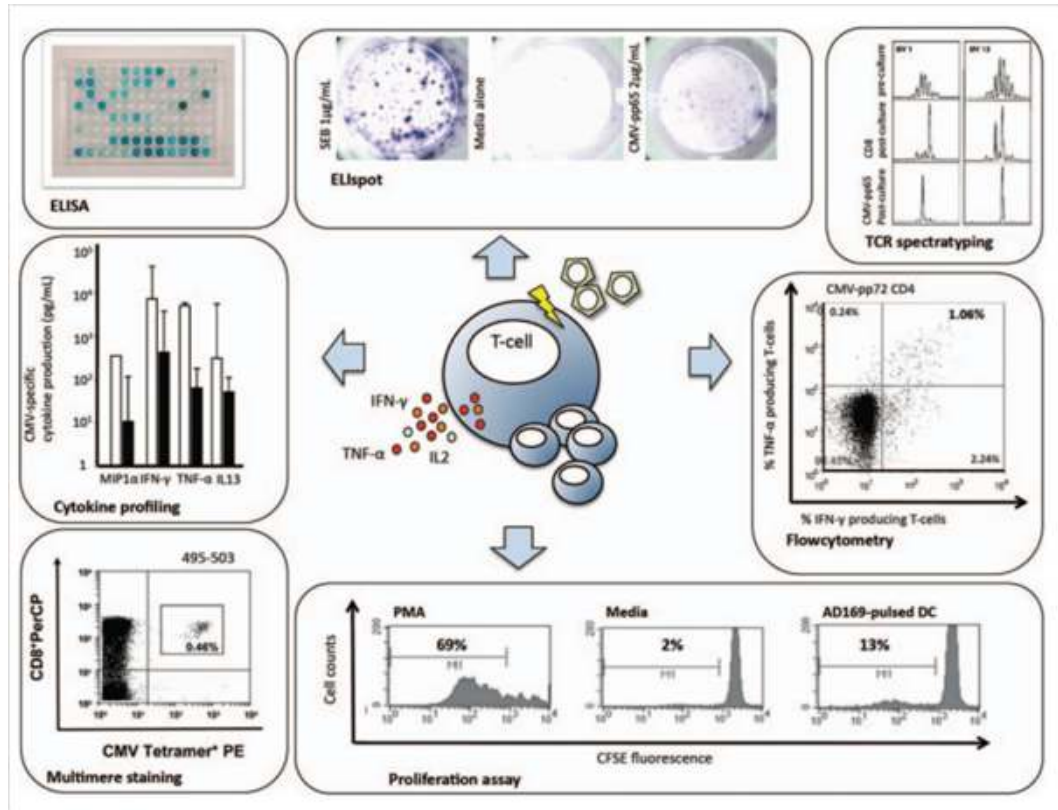
2.1.9.7. İmmünolojik tanı

Özellikle latent viral enfeksiyonların kontrolünde temel mekanizma kazanılmış-ölgül hücrel bağışık yanıttır. CMV enfeksiyonunda da klinik yelpazenin belirlenmesinde kazanılmış ölgül hücrel immün yanıt en önemli faktördür. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda hücrel bağışıklığın yeniden yapılanması viral hastalık gelişimini önlediğinden virolojik izlem yanında immünolojik izlem de rutinde yer almalıdır. CMV enfeksiyonu kontrolünde CD4⁺, CD8⁺ ve $\gamma\delta$ T lenfositler rol alır. T hücrelerin tanımlanması ve/veya fonksiyon ve ölgüllüklerinin belirlenmesini sağlayan T hücre bazlı immünolojik yöntemler

(akış sitometri, ELISPOT, Quantiferon) geliştirilmiştir (Şekil 2.5) (62, 78, 171, 172).

2.1.9.7.1. ELISPOT

ELISPOT (enzyme-linked immüno spot assay) yönteminde, IFN- γ sentezleyen özgül T hücreleri araştırılır. Mononükleer hücreler sentetik peptid veya antijen lizatlarla uyarılır, antihuman IFN- γ ile kaplanır ve ELISA esaslarına uygun olarak çalışılıp özgül spot oluşturan IFN- γ sentezleyen T hücreleri sayılır. Sonuç “Spot Forming Colonies” (SFC) / 100.000 mononükleer hücre olarak verilir (62, 171).



2.1.9.7.2. Quantiferon

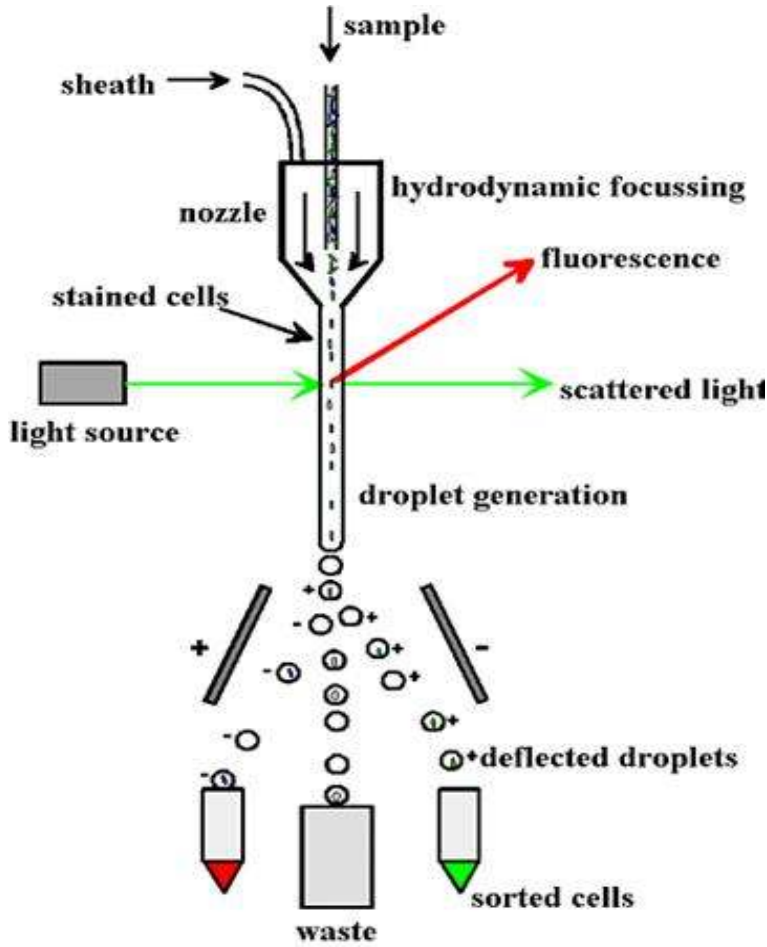
Tam kan, CMV'yi uyaran peptid epitoplarına maruz bırakılarak T hücreler uyarılır ve sentezlenen IFN- γ ELISA yöntemiyle ölçülür. Kantitatif sonuç verilir. IFN- γ CMV spesifik T hücrelerin fonksiyonlarını belirten bir sitokindir ve CMV hastalığının gelişme riskini belirlemede kullanılır. CMV peptidleri HLA sınıf 1 haplotipleri içeren CD8⁺ T lenfositleri hedef alınarak hazırlanmıştır. Üretilen peptidler toplumun büyük çoğunluğunu kapsayacak şekilde hazırlanmıştır (62, 171, 172).

2.1.9.7.3. Flow (akış) sitometri

Akış sitometri, hücresel yanıt araştırmalarında en çok kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntemin prototip çalışmaları 1924'te Andrew Moldovan tarafından başlatılmıştır. Hareket halinde olan bir akışkanın içinden geçirilen hücre veya partiküllerin özelliklerinin ölçülmesi esasına dayanır. Hücreler lazer ışığının önünden geçerken ışık çeşitli dalga boylarında kırılır ve hücrelerin verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyaller hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özelliklerine ve hücreye bağlanan çeşitli florokromlara göre farklılık gösterir. Bu yöntemle hücre ya da partikülün immünofenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (173).

Akış sitometrinin bileşenleri; akışkanlar, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevrimcilerdir (Şekil 2.6).

Akışkan sıvı içinde çözdürülen hücreler cihaza verilir. Optik kısım lazer ışığı yayar ve ışını birkaç hücre çapının oluşturduğu demet üzerine odaklar. Lazer kaynağından çıkan ışık demeti tüp içinden geçen hücreler / partiküller tarafından farklı dalga boylarında kesilir. Kırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan flöresan ışığı bir araya getirilip optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılıp analog sinyallere dönüştürülür (82, 174, 175).



Şekil 2.6. Akış sitometri genel çalışma prensibi (173).

Bundan sonraki son aşama fotodedektörlerle algılanan parametrelerin histogramlara yansıtılmasıdır. Akış sitometride dört adet fotodedektör kullanılır: Forward Angle Light Scatter = FALS: önden saçılımı gösterir, Right Angle Light Scatter = RALS: yandan saçılımı gösterir, yeşil (green) flöresan ve kırmızı (orange) flöresan. FALS hücre boyutunu, RALS ise iç yapıyı yani granülariteyi gösterir. FALS/RALS histogramı ile süspansiyon içindeki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılabilir. Multiparametrik analizde iki veya daha fazla renkli immünflöresan kullanılır. Bunlar genellikle yeşil flöresan veren FITC (fluorescein isothiocyanate) ve kırmızı flöresan veren PE (phycoerythrin)'dir. Bu sayede örneğin $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositler gibi farklı parametreler kolay ve doğru bir şekilde aynı anda değerlendirilebilir. FALS/RALS histogramında hücre popülasyonu seçilirken gate (kapı) alma yöntemleri kullanılır. Gate ile popülasyon monitörde kutucuk, oval ya da poligonal şekilde işaretlenir (82).

Peptid-MHC I tetramerleriyle T hücreleri akış sitometride doğrudan saptanır. Sitokin Akış Sitometri (CFC) yönteminde ise mononükleer hücreler sentetik CMV peptid epitopları ile uyarılır ve hücre içi sitokin boyaması ile sitokin sentezleyen CMV spesifik T lenfositler fonksiyonlarının son aşaması olan sitokin sentez aşamasında gösterilebilir. Bu amaca yönelik olarak CFC’de antisitokin antikorlar ve aktivasyon markerları kullanılır. Spesifik antijenler kullanıldığında bu yöntemle çok nadir saptanabilen antijen spesifik T hücrelerin varlığı ve yoğunluğu belirlenebilir (67, 176).

CFC’de ilk adım, *ex vivo* aktivasyon aşamasıdır. Yaklaşık 6 saat süren protein ya da peptid antijenlerle ya da mitojenlerle gerçekleştirilen kısa bir dönemdir. Bu süre sonunda hücreler genellikle EDTA ile muamele edilir ve hücre aktivasyonu durdurulur. Daha sonra fiksasyon ve ardından permeabilizasyon işlemleri gerçekleştirilir. Hücreler genellikle formaldehit bazlı buffer ile fiks edilir. Permeabilizasyon işlemi için ise deterjan bazlı buffer kullanılır. En son olarak flöresan bazlı boyalarla boyamanın ardından elde edilen hücreler akış sitometri cihazında sayılır (172, 176-179).

İntraselüler antijenleri saptamak için permeabilizasyon işlemi yapmak uzun yıllardan beri yapılagelen bir yöntem olmasına rağmen sitokinler gibi sekrete edilen moleküller için bu yöntem henüz 14-15 yıllık bir geçmişe sahiptir. Sitokin salınımını engelleyen monensin ve brefeldin A gibi moleküller kullanılarak hücre içi sitokin sayımı yapılabilmektedir (179-183). Bu moleküller golgi yapısını etkileyerek yeni sentezlenmiş olan sitokinlerin hücre dışına verilmesini engeller. Bu yöntemle periferik kan mononükleer hücrelerdeki (PKMNH) ya da tam kandaki antijen spesifik T hücrelerin kantitasyonu yapılabilir. Ayrıca viral, bakteriyel, otoimmün antijenler, tümör antijenleri ve mitojenlere karşı yanıt saptanabilir (177, 184, 185).

Permeabilizasyon gerektirmeyen sitokin ölçüm yöntemleri de geliştirilmiştir. Bu yöntemler canlı hücreleri saptamayı sağlar. Çok duyarlı boyama teknikleriyle hücre yüzeyine sunulan IFN- γ ve IL-10 gibi belli başlı sitokinleri boyama yöntemi bunlardan biridir (184). Bir diğeri ise keçilerin immunizasyonu ile elde edilen hücre yüzey antijenlerine karşı oluşmuş antikorları

kullanarak hücre yüzeyindeki sitokinleri yakalayıp flöresan boyalarla saptama yöntemidir (185).

Şekil 2.7’de CMV spesifik hücresel immünite araştırılmasında yöntem aşamaları özetlenmiştir. Hücre stimülasyonu direkt olarak örnekten (tam kan) yapılmıştır.



Şekil 2.7. CMV spesifik hücresel immünite yöntem aşamaları (178).

3. ARAÇLAR ve YÖNTEM

3.1. Olgular ve Kontrol Grubu

Çalışmamızda, CMV seropozitif (CMV IgG antikoru pozitif) erişkin, böbrek nakil hastalarında transplantasyon öncesi ve sonrası CMV spesifik hücresel immün yanıtlarının sitokin akış sitometri yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Hücresel immün yanıt parametreleri olarak CMV spesifik IFN γ üreten CD4⁺ T lenfosit, CD8⁺ T lenfosit ve total T lenfosit sayıları çalışılmıştır.

Aralık 2012- Ağustos 2013 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli Merkezi tarafından canlı vericiden böbrek nakli planlanan yirmi bir hastadan böbrek nakli öncesi (0.ay) ve nakil sonrası 1., 3. ve 6. aylarda toplam dörder kez örnek alınması planlanmıştır. Prospektif araştırma sürecinde on iki hastanın planlanan tüm örnekleri alınmış ancak dokuz hastanın transplantasyon sonrası 6.ay örneklerini almak için projemizin süresi yeterli olamamıştır. Hastaların (n:21; 7 K, 14 E) yaş grubu 18-66 olup yaş ortalaması $34,5 \pm 9,9$ 'dur. Kontrol grubu olarak Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli Merkezi'nde böbrek nakli planlanan hastaların sağlıklı, CMV seropozitif vericilerinden (n:20; 10 E, 10 K) örnek alınmıştır. Kontrol grubunun yaş ortalaması $44,5 \pm 11,7$ (24-66 Y)'dir.

Hastaların klinik özellikleri Çizelge 3.1.'de belirtilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında, CMV seropozitif sağlıklı kişi, CMV seropozitif hasta (transplantasyon öncesi ve sonrası), transplantasyon sonrası klinik ve laboratuvar bulguları ile tanı konmuş CMV enfeksiyon hastasından alınan örnekler kullanılmıştır. Testin validasyonunda intra ve inter assay çalışmalar, CMV seropozitif sağlıklı iki gönüllüden alınan örnekler ile yapılmıştır.

Yöntemin optimizasyon ve validasyon çalışmaları uzun bir süreç (Eylül 2012- Mayıs 2013) aldı. Bu nedenle söz konusu zaman diliminde aldığımız örneklerden PKMNH izolasyonu yaptık ve dondurduk. Validasyon çalışması ardından örnekleri stoktan çıkarıp çözündürerek araştırmamızı tamamladık.

Çalışmamızın etik kurul onayı Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı tarafından 03.01.2012/10 tarih ve no'su ile verilmiştir. Hastalara kan almadan önce araştırmanın amacı anlatılmış ve yazılı onam alınmıştır.

Çizelge 3.1. Böbrek nakil alıcılarının klinik özellikleri.

Değişkenler	n
Etyoloji	
KBY*	14
Polikistik böbrek	2
Nefrotik sendrom	1
Kronik pyelonefrit	1
Vezikoüretal reflü	1
Nörojenik mesane	1
IgA nefropatisi	1
Ek sistemik hastalık	
HT**	12
DM Tip2***	2
HL****	1
HT+DM Tip2+HL	1
HT+DM Tip2+Tirotoksikoz	1
Ek viral hastalık	
BKV*****	2
Hepatit B	1
İmmün supresyon protokolü	
Takrolimus+MMF+Steroid	17
Siklosporin+MMF+Steroid	2
mTOR inhibitörü+MMF+Steroid	2
Monoklonal antikor ile indüksiyon	
Uygulanan	4
Uygulanmayan	17
Antiviral profilaksi	
Valgansiklovir	4
Valasiklovir	17

*KBY: Kronik böbrek yetmezliği, **HT: Hipertansiyon, ***DM Tip2: İnsülin bağımlı olmayan diyabetes mellitus, ****HL: Hiperlipidemi, *****BKV: BK virüs, MMF: Mikofenolat mofetil

Hastalarda nakil öncesi dönemde ve kontrol grubunda Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi tarafından saptanmış olan olan CMV IgG antikor titreleri (IMMULITE CMV IgG, Malvern, USA) Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Hastaların -nakil öncesi- CMV IgG titreleri -n:21-.

Hasta no	CMV IgG (aU/ml)	Hasta no	CMV IgG (aU/ml)	Hasta no	CMV IgG (aU/ml)
H3	18.4	H15	10.9	H29	24.4
H4	18.3	H17	11.1	H31	32.3
H9	12.0	H20	16.0	H32	14.2
H10	20.7	H21	6.72	H34	10.4
H11	15.7	H22	24.1	H37	16.2
H12	24.3	H26	12.3	H38	15.5
H14	8.84	H27	6.17	H39	11.5

Çizelge 3.3. Kontrol grubunun CMV IgG titreleri -n:20-.

No	CMV IgG (aU/ml)	No	CMV IgG (aU/ml)	No	CMV IgG (aU/ml)	No	CMV IgG (aU/ml)
V4	14,9	V13	19,1	V22	11,8	V32	10,9
V9	13,6	V14	21,4	V26	7,41	V34	9,47
V10	10,4	V15	11,9	V27	2,63	V37	11,4
V11	14	V17	17,8	V29	8,19	V38	15,1
V12	11,6	V20	16,4	V31	4,98	V39	16,4

3.2. Yöntem

Yöntemimizin ana basamakları, tam kandan periferik kan mononükleer hücre (PKMNH) izolasyonu ardından lenfositlerin CMV peptidleri ile *ex vivo* olarak uyarılması ve CMV spesifik IFN- γ üreten T lenfositlerinin yüzey antijenleri ve hücre içi sitokin boyama sonucunda akış sitometride fonksiyonel ayırım yaparak sayılmasıdır. Hücrel immünite çalışmaları henüz standardize değildir. Klinik validasyonları tamamlanmamıştır. Bu nedenle biz önce

optimizasyon çalışmaları, ardından validasyon ve nihayetinde hasta örneklerini çalıştık.

‘Klinik olgularda CMV hücrel immünite’, bizim bilgilerimize göre daha önce yurdumuzda çalışılmamıştır. Bu nedenle cihaz ve malzemeleri de tüm ayrıntıları ile yazmayı uygun gördük.

Örnekler : Yeşil kapaklı Na heparinli tüplere 5 ml venöz kan örneği alınmıştır.

3.2.1. Cihaz ve malzemeler

- Steril Falkon tüpü -15 ml-
- Steril Falkon tüpü -50 ml-
- PCR tüpü -200 µl-
- Steril Plastik pastör pipeti
- Steril PBS (phosphate buffered saline) , (ArgeneNE,Verniolle, France)
- Fikol (Sigma Histopaque-1077, St.Louis, USA)
- NF 800 santrifüj (Nüve A.Ş. Ankara, Türkiye, r=9,5mm)
- 37° C % 5-10 CO₂’li etüv
- Neubauer lamı (0,0025 mm² , Marinfeld, Germany)
- Kriyovial - 2 ml,- (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)
- Tripan mavisi (Sigma Trypan blue solution %0,4, St. Louis, USA)
- RPMI (Invitrogen, GIBCO RPMI 1640+L-Glutamin, New York, USA)
- FBS (: Fetal Bovine Serum), (PAA, Pasching, Austria)
- DMSO (: dimethyl sulphoxide) (SIGMA, Germany)
- Gentamisin 160 mg ampul
- Na-Pyruvate (Invitrogen, GIBCO Sodium Pyruvate, New York, USA)
- Penisilin-Streptomisin 10 000 U / ml
- CMV peptid (GenID Gmbh, Germany)
- Pokeweed (GenID Gmbh, Germany)
- Golgi stoper (BD Golgi Plug, USA)
- CD28/CD49d (BD FastImmüne, USA)
- FACS Lysing solüsyon (BD,USA.Cat. No. 349202)

- FACS permeabilizing solution 2 (BD,USA.Cat. No. 340973)
- IFN- γ /CD69/CD4/CD3 (BD FastImmüne, USA. Cat. No:337184)
- IFN- γ /CD69/CD8/CD3 (BD FastImmüne, USA. Cat. No:346048)
- Flow sitometri cihazı (BD FACSCanto II)
- CellWASH (BD, USA. Cat. No: 349524)
- Paraformaldehit (SIGMA, Paraform-Aldehyde, St.Louis,USA.)

Paraformaldehit toz halinde bulunmaktadır. 100 mL PBS içinde 2 gr şekilde çözdürülür (% 2) ve +4°C’de bekletilir (soğuk kullanılmalıdır). Kullanımda son konsantrasyon % 1 olmalıdır.

3.2.2. Optimizasyon çalışmaları

Literatürde yöntem açıklamalarında bazı aşamalarda farklılıklar vardır (2, 104, 118, 178, 187-198). Biz yöntem optimizasyonunda aşağıdaki parametreleri değerlendirdik.

- Tam kandan izole edilen PKMNH dondurup saklayabilir, sonra çalışabilir miyiz?
- Lenfositleri stimülasyon öncesi mediumda inkübe edelim mi?
- Mediumda bekleme süresi ne olmalı? 2 saat?
- CMV peptid kokteyl miktarı ne olmalı? 25 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l?
- Stimulasyon süresi ne olmalı? 6 saat ya da 8 saat?
- Yıkama solüsyonu ne olmalı? Cell wash? Facs permeabilization solüsyon 2?
- Ko stimülatör hangisi olmalı ? Concanavalin A? Pokeweed ?
- Transport inhibitör (golgi plug :Brefeldin A) dilüsyonu ne olmalı?

Söz konusu değişkenleri ayrı ayrı çalışıp, yöntemi aşağıda ayrıntıları verdiğimiz şekilde optimize ettik.

3.2.2.1. Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu

Hücrel immünite araştırmalarında, EDTA’lı tüp fonksiyonel yöntemler için uygun olmadığından Na heparinli tüp kullanılır. Heparinli tüplere alınan tam

kan örneklerinden PKMNH izolasyonu biyogüvenlik kabini içerisinde, steril koşullarda kan alınması takip eden 4 saat içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler, bu süre içerisinde oda ısısında olmalıdır.

1. Her heparinli tüp için 3 adet 15 ml'lik falkon tüpü etiketlendi.
2. Heparinli tüp on iki kez yavaşça alt-üst edildi ve falkon tüpüne aktarıldı.
3. Üzerine kan hacminin yarısı kadar (2.5-3 ml) steril PBS eklendi.
4. Başka bir falkon tüpe 4 ml fikal solüsyonu eklendi. Kan-PBS karışımı birkaç kez alt-üst edildikten sonra fikalün üzerine tabakalandırıldı.
5. 1800 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.
6. Fikalün üzerindeki bulutsu tabaka (1.5-2 ml) plastik pastör pipeti ile toplanarak başka bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 12 ml çizgisine kadar PBS eklendi.
7. 2500 rpm'de 10 dk çevrildi.
8. Santrifüj sonrası dipte görülen pelletin üzerindeki süpernatant dökülerek falkon tüpü kalın peçete tabakasının üzerine ters kapatıldı.
9. Dipte kalan pellet 1000 µl soğuk stok mediumu ile süspanse edildi ve kriyoviallere aktarıldı.

Stok medium (stok besiyeri)

% 1 L Glutaminli RPMI 1640	% 69
Steril -ısı ile inaktive edilmiş- FBS	% 20
DMSO	% 10
Gentamisin	% 1

10. Kriyovialler dondurma kabına konarak -80°C'de saklandı. Ertesi gün kriyovialler dondurucudan alınarak sıvı azot tankına yerleştirildi. Örneklerin dondurulmasındaki amaç; örneklerin biriktirilip topluca çalışılmasıydı.

3.2.2.2.Dondurulmuş örneklerin çözülmesi

Öncelikle çözündürme ve hücreleri canlandırma aşamalarında kullanılacak olan solüsyonlar hazırlandı. Bu aşamalarda thawing (çözündürme) medium ve assay medium kullanıldı.

Thawing medium (çözdürme solüsyonu)

% 1 L Glutaminli RPMI 1640	% 88
Steril -ısı ile inaktive edilmiş- FBS	% 10
Na -Pyruvate	% 1
Penisilin-Streptomisin	%1

Assay medium (çalışma besiyeri)

% 1 L Glutaminli RPMI 1640	% 90
Steril -ısı ile inaktive edilmiş- FBS	% 10

Bu solüsyonlar su banyosunda 37°C’de tutuldu. İleriki aşamalarda kullanılacak olan CMV peptid ve pozitif kontrol olarak kullanılacak olan Pokeweed buz kabının içine alınarak çözünmeye bırakıldı. Her örnek için 2 tane 15ml’lik falkon kullanıldı.

1. Azot tankından çıkarılan örnekler hemen 37°C’deki su banyosuna alındı.
2. Kriyoviallerde bulunan örnek 1 ml thawing medium ile çözdürüldü. Bu işlem 1-2 dakika içerisinde ve çok nazik yapılmalıdır çünkü DMSO’ya maruz kalmış olan hücreler çok kırılgandır. Amaç hücre kaybı yaşanmamasıdır. Ardından 8 ml thawing medium bulunan falkona aktarıldı.
3. Bu karışım 37°C etüvde 2 saat dinlendirildi.
4. İki saat sonunda 1200 rpm’de 7 dk çevrildi.
5. Süpernatant döküldü ve pellet 1 ml çözdürme mediumu ile tekrar çözdürüldü. Üzerine 9 ml çözdürme mediumu eklenerek yine 1200 rpm’de 7 dk çevrildi ve süpernatant döküldü.
6. 1 ml assay medium ile hücreler çözüldü.

3.2.2.3. Mikroskopta PKMNH sayımı

Assay medium (1 ml) ile süspanse edilen pellette hücre sayımı yapıldı.

1. 10 µl % 0.4’lük tripan mavisi ile hücrelerin bulunduğu solüsyondan 10 µl alınarak PCR tüpü içinde karıştırıldı ve 4 dk beklendi.
2. Karışımdan 10 µl alınarak Neubauer lamına kondu.

3. Her 16 küçük kareli toplam 4 alan sayıldı. Renksiz hücreler canlı, mavi hücreler ölü olarak değerlendirildi. Canlı hücreler ölü hücrelerin %90'ı ve daha fazlası ise işleme devam edildi.

4. Sayılan hücreler 4'e bölündü ve ' $n \times 10^4 \times 2$ ' formülü ile ml'deki hücre

sayısı hesaplandı.

5. Bizim çalışmamızda 50 μ l'de 3×10^5 hücre olması gerekiyordu. Bu

amaçla ;

' 3×10^5 hücre , 50 μ l'de bulunuyorsa $n \times 10^4 \times 2$ hücre kaç μ l'de bulunur'

denklemleri ile hücrelerimizi hangi hacimde çözmemiz gerektiği hesaplandı.

6. Daha önce 1ml'de çözdüğümüz hücrelerin üzerine 4 ml daha assay medium

eklendi ve 2500 rpm'de 10 dk çevrildi. Süpernatant döküldü. Pellet denklemi

sonunda çıkan hacimde assay medium ile süspansiyon edildi.

3.2.2.4. T hücrelerinde yüzey ve hücre içi sitokin boyama

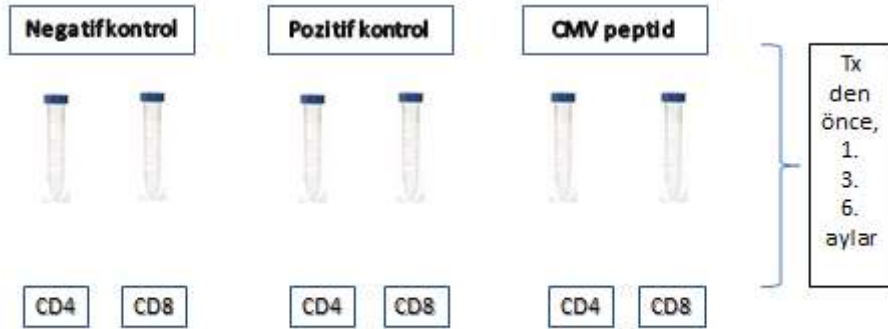
Her örnek için 15 ml'lik falkon tüpleri etiketlendi (Şekil 3.1). Her bir hasta ve kontrol örneği için altı adet tüp işaretlendi. Dolayısıyla ile örneğin $CD4^+$ lenfosit sayımı için test tüpü ve internal kontrol olarak bir pozitif bir negatif kontrol tüpü çalışıldı.

Her hastanın transplantasyon öncesi, transplantasyon sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. ay kanları aynı gün çalışıldı.

Kontrol grubunda her örnek için birer tane CD4 ve CD8 pozitif kontrol, birer tane CD4 ve CD8 negatif kontrol, birer tane CD4 ve CD8 CMV peptid tüpleri etiketlendi.

1. Uyarılmamış tüplere (negatif kontrol), hücre içeren solüsyondan 50 µl ve 100 µl assay medium kondu.
2. Pozitif kontrol (Pokeweed) tüplerine 50 µl hücre içeren solüsyondan ve 100 µl pokeweed ve inkübasyonun 2. saati dolunca 1.5 µl golgi stoper (1 ml’de 1 µl olacak şekilde) kondu.
3. CMV Peptid tüplerine, 50’şer µl hücre içeren solüsyondan ve 100’er µl CMV peptid, 1’er µl CD28/CD49d ve inkübasyonun 2. saati dolunca 1.5 µl golgi stopper kondu.

Tüpler hazırlandıktan sonra 37°C’lik etüve kaldırıldı. Tüplerin kapakları gevşek olacak şekilde 8 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası aşamalarda biyogüvenlik kabini dışına çıkılmasında sakınca olmadığı için boyama aşaması güvenlik kabini dışında yapıldı.



Şekil 3.1. Falcon tüplerinin etiketlenmesi.

Boyama basamakları

1. İnkübe olan hücreler 1500 rpm’de 7 dk çevrildi.

Süpernatant dökülüp 500 µl 1x FACS Lysing solüsyon eklendi ve 10 dk oda ısısında bekletildi. (Süpernatant döküldükten sonra her defasında tüp kurutma kağıdının üzerine ters kapatılarak fazla sıvının da dökülmesi sağlandı).

2. 10 dk sonunda üstüne 500 µl 1x permeabilizing solution 2 eklenip 2000 rpm'de 7 dk çevrildi. Bu işlem 2. defa tekrarlandı.

3. Süpernatant dökülüp pellet 500 µl 1x permeabilizing solution 2 ile süspanse edildi ve 10 dk oda ısısında bekletildi.

4. 10 dk sonunda 2500 rpm'de 10 dk çevrildi.

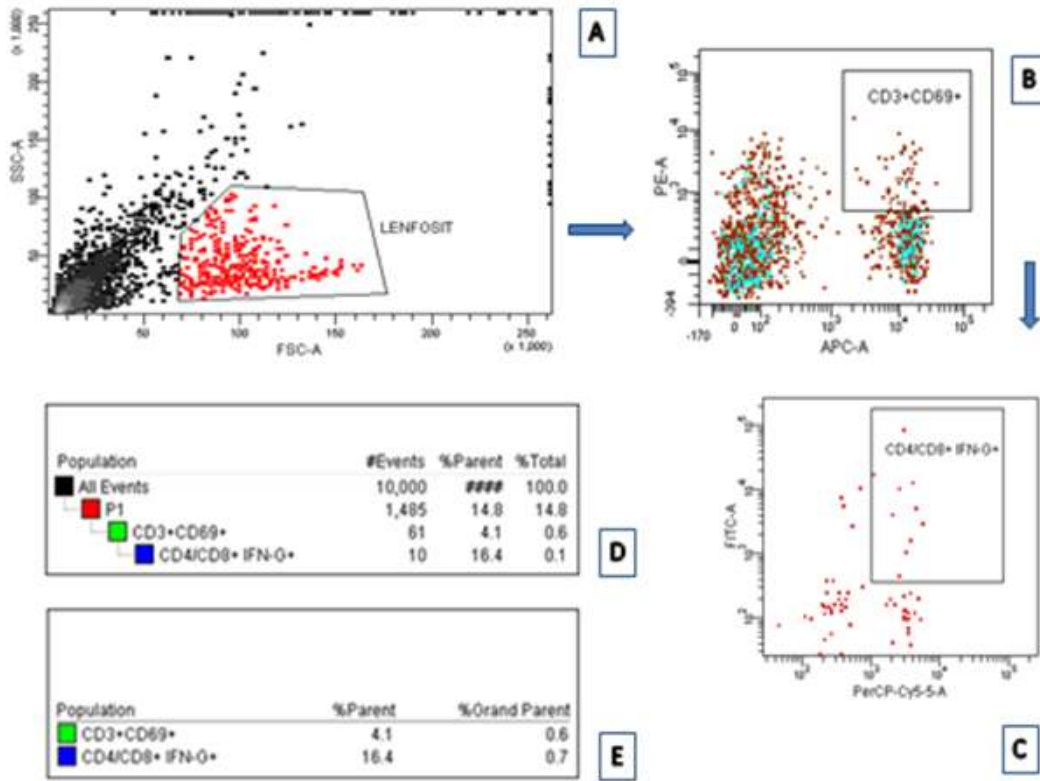
5. Süpernatant döküldükten sonra 100 µl 1x permeabilizing solution 2 ile pellet süspanse edildi. Her tüpe 20'şer µl IFN-γ/CD69/CD4/CD3 veya IFN-γ/CD69/CD8/CD3 antikorları eklendi. Oda ısısında karanlık ortamda 30 dk bekletildi.

6. 30 dk sonunda üstüne 500 µl cellWASH eklenip 2500 rpm'de 10 dk çevrildi. Süpernatant döküldü. Pellet 500 µl cellwash ile süspanse edilip flow sitometri cihazında analiz edildi. Ertesi gün analiz edilecekse 500 µl cellwash ile çözdürülen hücrelerin üzerine aynı hacimde % 2'lik paraformaldehit eklenip +4°C'de karanlık ortamda saklandı.

3.2.2.5. CMV spesifik T hücrelerinin akış sitometride saptanması

Akış sitometri cihazında, toplam lenfositler içindeki aktive olmuş CD3⁺CD69⁺ T lenfositlere ve onların içindeki CD4⁺/CD8⁺IFN-γ T lenfositlere kapı alındı. % parent (% p) ve % grand parent (% gp) değerleri bulundu.

Örneğin; CD4⁺/CD8⁺IFN-γ T lenfositler için % p CD3⁺CD69⁺ T lenfositler içindeki CD4⁺/CD8⁺IFN-γ T lenfosit oranını; CD4⁺/CD8⁺IFN-γ T lenfositler için % gp ise toplam lenfositler içindeki CD4⁺/CD8⁺IFN-γ T lenfosit oranını gösterir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Akış sitometri analiz basamakları.

A) Hücreler okutulurken FSC-A (Forward Scatter=Forward Angle Side Scatter=FALS) ve SSC-A (Side Scatter=Right Angle Side Scatter=RALS) özelliklerine göre lenfositler üzerine kapı alındı.

B) CD3 ve CD69 eksprese eden T hücreleri üzerine ikinci bir kapı alındı.

C) Aktive olmuş T hücreleri CD4⁺ (veya CD8⁺) IFN-γ hücreler üzerine kapı alındı.

D) Başlangıçtan son aşamaya kadar alınan kapıları ve hücrelerin analizini gösterir.

E) % p ve % gp değerlendirildi.

Daha sonra % gp değerlerini kullanarak sayısal veriye ulaştık. Hastadan eş zamanlı olarak çalışılmış olan hemogram testinde ölçülen lenfosit sayısı ile oranlayarak

$$\text{“ (CD4}^+\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma\text{ T lenfosit \% gp değeri) } \times \text{ (Lenfosit sayısı) } / \text{ 100 ”}$$

formülüyle

$$\text{‘ CD4}^+\text{+CD8}^+\text{IFN-}\gamma\text{ T lenfosit sayısı } / \mu\text{l ‘}$$

değerlerini hesapladık.

3.2.3. Validasyon çalışmaları

İntra-assay (gün içi) ve inter-assay (günler arası) kesinlik değerlerini saptamayı amaçladık. Her iki validasyon çalışması için beşer örnek çalışmayı planladığımızdan yeterli lenfosit sayısına ulaşabilmek için sağlıklı, CMV seropozitif 32Y iki gönüllüden ikişer adet 5 cc tam kan örneği aldık. Gün içi kesinlik değeri için beş ‘replikatif’ örneği aynı gün tüm aşamaları aynı zamanda; günler arası kesinlik değeri için ise beş replikatif örneği arka arkaya beş ayrı günde çalıştık (199-201).

3.2.4. İstatiksel değerlendirmeler

İstatistikler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Ababilim Dalı tarafından yapılmıştır. Kontrol grubundan ve hasta grubundan (nakil öncesinde, nakilden sonraki 1.ay, 3.ay ve 6.aylarda) alınan tam kan örneklerinde *ex vivo* stimülasyon sonucu elde edilen CMV spesifik IFN γ sekrete eden CD4⁺, CD8⁺ ve toplam T lenfosit sayıları ana değişken olarak kabul edilmiştir. Yapılan istatistikler, değerlerin bu değişkenlerle karşılaştırılması temeline dayanmaktadır.

Veriler PASW 18 (SPSS/IBM, Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edildi. Örneklemi tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama (mean), standart sapma (SS), ortanca (median) gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Parametrik test varsayımlarının sağlandığı durumlarda bağımsız iki grup ortalamalarının farkı “Student t testi”, bağımlı iki grup ortalamalarının farkı “iki eş arası fark testi”, ikiden fazla grup arası fark ise “varyans analizi” ile araştırıldı. Parametrik test varsayımlarının sağlanmadığı durumlarda ise bu testlerin parametrik olmayan alternatifleri, “Mann-Whitney U”, “Wilcoxon işaretli sıra” ve “Kruskall Wallis” testleri kullanıldı. Ayrıca sürekli değişkenler arasındaki ilişki durumu da Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak analiz edildi. Kategorik veriler ise “ki-kare anlamlılık testi” ile incelendi.

Analizlerde farklılıkların belirlenmesi için % 95 anlamlılık düzeyi (ya da $\alpha=0.05$ hata payı) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Validasyon

Çalışmamızda uyguladığımız intra assay ve inter assay validasyon testlerinin sonuçları sırasıyla çizelge 4.1. ve çizelge 4.2.'de; istatistiksel değerleri Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. İntra-assay validasyon çalışması sonuçları.

Örnek no	Lenfosit bin / μ l	CD4 ⁺ IFN- γ Tlenfosit / μ l	CD8 ⁺ IFN- γ Tlenfosit / μ l	CD4 ⁺ +CD8 ⁺ IFN- γ Tlenfosit / μ l
intra1	1,95	7,8	5,75	13,55
intra2	1,95	7,8	5,75	13,55
intra3	1,95	7,8	5,75	13,55
intra4	1,95	9,75	5,75	15,5
intra5	1,95	7,8	7,8	15,6

Çizelge 4.2. İnter-assay validasyon çalışması sonuçları.

Örnek no	Lenfosit bin / µl	CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ Tlenfosit / µl	CD8 ⁺ IFN-γ ⁺ Tlenfosit / µl	CD4 ⁺ +CD8 ⁺ IFN-γ ⁺ Tlenfosit / µl
İnter1	2,19	6,57	6,57	13,14
İnter2	2,18	8,72	6,54	15,26
İnter3	2,23	8,92	6,69	15,61
İnter4	2,25	9	6,75	15,75
İnter5	2,27	9,08	4,54	13,62

Çizelge 4.3. Validasyon çalışma sonuçlarının ortalama, standart sapma ve CV değerleri.

Test		Lenfosit bin/ µl	CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ T lenfosit / µl	CD8 ⁺ IFN-γ ⁺ T lenfosit / µl	CD4 ⁺ +CD8 ⁺ IFN-γ ⁺ T lenfosit / µl
İnter assay	Ortalama (±SS*)	1,95 (0)	8,19 (0,87)	6,16 (0,92)	14,35 (1,1)
	CV**	0	10,65	14,88	7,64
İnter assay	Ortalama (±SS)	2,22 0,38	8,46 (1,06)	6,22 (0,94)	14,68 (1,21)
	CV	1,73	12,58	1,21	8,23

*SS : standart sapma **CV : varyasyon katsayısı

4.2. Kontrol Grubu ve Hastalar

Kontrol grubunun lenfosit sayıları, CMV spesifik IFN- γ üreten CD4⁺, CD8⁺ ve CD4⁺ CD8⁺ T lenfosit sayısı ve yüzde değerleri Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. CMV spesifik hücresel immünite değerleri –kontrol grubu-.

No n:20	Lenfosit bin/ μ l	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ T hc. %	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T hc. %	CD4 ⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T hc. %	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ T hc./ μ l	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T hc./ μ l	CD4 ⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T hc. / μ l
V4	0,88	0,7	0,4	1,1	6,16	3,52	9,68
V9	1,14	0,1	0,3	0,4	1,14	3,42	4,56
V10	2,47	0,6	0,2	0,8	14,82	4,94	19,76
V11	1,66	0,3	0,2	0,5	4,98	3,32	8,3
V12	2,15	0,3	0,1	0,4	6,45	2,15	8,6
V13	1,08	0,2	0,1	0,3	2,16	1,08	3,24
V14	1,56	0,3	0,1	0,4	4,68	1,56	6,24
V15	2,31	0,4	0,3	0,7	9,24	6,93	16,17
V17	2,84	1,6	0,6	2,2	45,44	17,04	62,48

V20	1,57	1	1,3	2,3	15,7	20,41	36,11
V22	1,21	0,3	0,4	0,7	3,63	4,84	8,47
V26	1,56	0,4	0,1	0,5	6,24	1,56	7,8
V27	1,04	0,6	0	0,6	6,24	0	6,24
V29	2,84	0,4	0,1	0,5	11,36	2,84	14,2
V31	1,54	0,1	0,1	0,2	1,54	1,54	3,08
V32	1,33	0,4	0,1	0,5	5,32	1,33	6,65
V34	1,98	0,6	0,1	0,7	11,88	1,98	13,86
V37	1,98	0,5	0,2	0,7	9,9	3,96	13,86
V38	1,9	0,4	0,3	0,7	7,6	5,7	13,3
V39	1,17	0,2	0,2	0,4	2,34	2,3	4,68

Çizelge 4.5., 4.6., 4.7. ve 4.8.'de böbrek transplantasyon (tx) hastalarının nakil öncesi, nakil sonrası 1.ay, 3.ay ve 6.ay lenfosit sayıları, CMV spesifik IFN- γ üreten CD4⁺, CD8⁺ ve CD4⁺+CD8⁺ T lenfosit sayısı ve yüzde değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Tx hastalarında CMV spesifik hücresel immünite değerleri -0.ay-.

No	Lenfosit bin/ μ l	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ T hc. %	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ T hc. %	CD4 ⁺ + CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc./ μ l	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc./ μ l	CD4 ⁺ + CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. / μ l
n:21							
H3	1,46	0,2	0,2	0,4	2,92	2,92	5,84
H4	0,59	7	0,5	7,5	41,3	2,95	44,25
H9	1,08	0,2	0,2	0,4	2,16	2,16	4,32
H10	1,44	0	0,4	0,4	0	5,76	5,76
H11	2,25	0,2	0,3	0,5	4,5	6,75	11,25
H12	0,81	0,5	0,1	0,6	4,05	0,81	4,86
H14	1,85	0,9	0,3	1,2	16,65	5,55	22,2
H15	1,21	0,3	0,7	1	3,63	8,47	12,1

H17	1,59	0,2	0	0,2	3,18	0	3,18
H20	2,41	1,4	0,8	2,2	33,74	19,28	53,02
H21	0,93	0,6	0,3	0,9	5,58	2,79	8,37
H22	1,35	0,4	0	0,4	5,4	0	5,4
H26	1,54	0,1	0,1	0,2	1,54	1,54	3,08
H27	0,52	0,1	0,1	0,2	0,52	0,52	1,04
H29	1,64	0,1	0	0,1	1,64	0	1,64
H31	1,56	0,2	0,1	0,3	3,12	1,56	4,68
H32	2,05	0,2	0,1	0,3	4,1	2,05	6,15
H34	0,41	0,2	0	0,2	0,82	0	0,82
H37	2,03	0,1	0,1	0,2	2,03	2,03	4,06
H38	1,56	0,3	0,2	0,5	4,68	3,12	7,8
H39	1,96	1,6	0,3	1,9	31,36	5,88	37,24

Çizelge 4.6. Tx hastalarında CMV spesifik hücresel immünite değerleri -1.ay-.

No n:21	Lenfosit bin/ μ l	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc.%	CD4 ⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc./ μ l	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc/ μ l	CD4 ⁺ CD8 ⁺ IFN- γ Thc. / μ l
H3	4,43	0,1	0,1	0,2	4,43	4,43	8,86
H4	1,31	0,7	0,2	0,9	9,17	2,62	11,79
H9	1,8	1,2	0	1,2	21,6	0	21,6
H10	3,15	1,4	0,3	1,7	44,1	9,45	53,55
H11	4,21	0,4	0,1	0,5	16,84	4,21	21,05
H12	2,07	0,7	0,2	0,9	14,49	4,14	18,63
H14	2,74	0,9	0,2	1,1	24,66	5,48	30,14
H15	2,92	0,4	0,4	0,8	11,68	11,68	23,36
H17	2,85	0,2	0,1	0,3	5,7	2,85	8,55
H20	3,13	1,1	0,6	1,7	34,43	18,78	53,21

H21	1,82	0,7	0,2	0,9	12,74	3,64	16,38
H22	4,09	0,1	0,1	0,2	4,09	4,09	8,18
H26	2,41	0,2	0,1	0,3	4,82	2,41	7,23
H27	1,58	0,2	0,1	0,3	3,16	1,58	4,74
H29	0,11	0,1	0,1	0,2	0,11	0,11	0,22
H31	3,21	0,1	0,1	0,2	3,21	3,21	6,42
H32	2,81	0,2	0,1	0,3	5,62	2,81	8,43
H34	1,57	0,3	0,3	0,6	4,71	4,71	9,42
H37	5,09	0,1	0,1	0,2	5,09	5,09	10,18
H38	3,89	0,1	0,1	0,2	3,89	3,89	7,78
H39	2,67	0,2	0,4	0,6	5,34	10,68	16,02

Çizelge 4.7. Tx hastalarında CMV spesifik hücresel immünite değerleri -3.ay-.

No n:21	Lenfosit bin/ μ l	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD4 ⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc./ μ l	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc./ μ l	CD4 ⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc./ μ l
H3	3,14	0,1	0,1	0,2	3,14	3,14	6,28
H4	1,26	0,6	0,2	0,8	7,56	2,52	10,08
H9	1	0,6	0,1	0,7	6	1	7
H10	2,21	1,5	0,3	1,8	33,15	6,63	39,78
H11	3,4	0,5	0,2	0,7	17	6,8	23,8
H12	1,71	0,6	0,2	0,8	10,26	3,42	13,68
H14	2,39	0,8	0,1	0,9	19,12	2,39	21,51
H15	2,52	0,3	0,4	0,7	7,56	10,08	17,64
H17	2,36	0,4	0,3	0,7	9,44	7,08	16,52

H20	2,66	1	0,7	1,7	26,6	18,62	45,22
H21	1,41	0,5	0,4	0,9	7,05	5,64	12,69
H22	2,79	0,2	0,1	0,3	5,58	2,79	8,37
H26	2,04	0,1	0,1	0,2	2,04	2,04	4,08
H27	0,94	0	0	0	0	0	0
H29	3,36	0,1	0,1	0,2	3,65	3,65	7,3
H31	2,84	0	0	0	0	0	0
H32	1,73	0,1	0,1	0,2	1,73	1,73	3,46
H34	1,44	0	0,2	0,2	0	2,88	2,88
H37	3,65	0,1	0	0,1	3,65	0	3,65
H38	2,72	0,1	0,1	0,2	2,72	2,72	5,44
H39	2,26	0,1	1	1,1	2,26	22,6	24,86

Çizelge 4.8. Tx hastalarında CMV spesifik hücresel immünite değerleri -6.ay-.

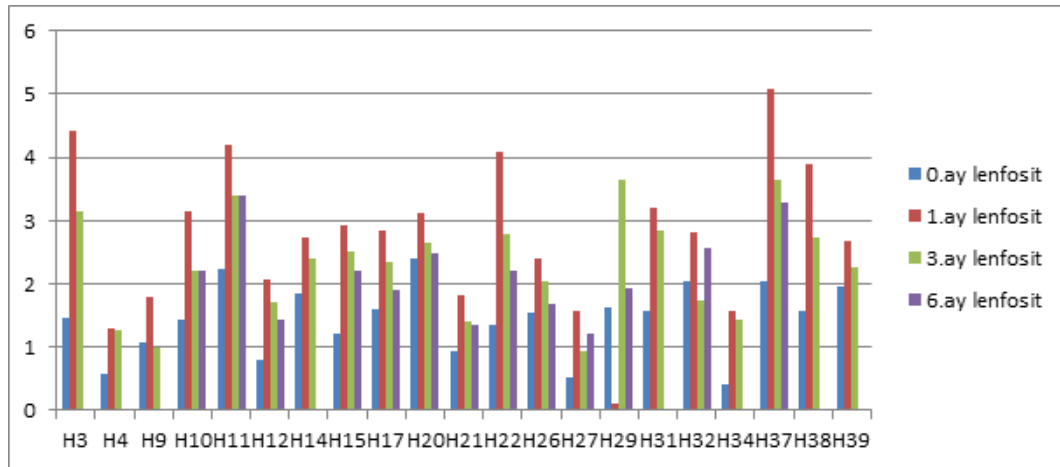
No n:12	Lenfosit bin/ μ l	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD4 ⁺⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. %	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc./ μ l	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc./ μ l	CD4 ⁺⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Thc. / μ l
H10	2,22	0,5	0,1	0,6	11,1	2,22	13,32
H11	3,4	0,3	0,1	0,4	10,2	3,4	13,6
H12	1,44	0,9	0,4	1,3	12,96	5,76	18,72
H17	1,9	0,5	0,4	0,9	9,5	7,6	17,1
H20	2,48	2,4	0,7	3,1	59,52	17,36	76,88
H21	1,34	0,8	0,3	1,1	10,72	4,02	14,74
H22	2,2	0	0,8	0,8	0	17,6	17,6
H26	1,68	0,9	0,3	1,2	15,12	5,04	20,16

H27	1,22	0,4	0,5	0,9	4,88	6,1	10,98
H29	1,92	0,1	0,1	0,2	1,92	1,92	3,84
H32	2,56	0,1	0,1	0,2	2,56	2,56	5,12
H37	3,28	0,2	0,1	0,3	6,56	3,28	9,84

Hasta grubunun lenfosit sayılarının aylara göre dağılımı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Hastanın 3.ay μ l'deki lenfosit sayısı 1. aydan anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Paired samples test $p=0,0047$).

3.ay ile 6.ay periferik kan lenfosit sayısı arasında anlamlı fark bulunmamıştır. ($p=0,191$)



Şekil 4.1. Tx hastalarının lenfosit sayıları (bin/ μ l)

Hastalarımıza, Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli Merkezi'miz tarafından uygulanan immün supresyon protokolleri Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. İmmün supresyon protokolleri

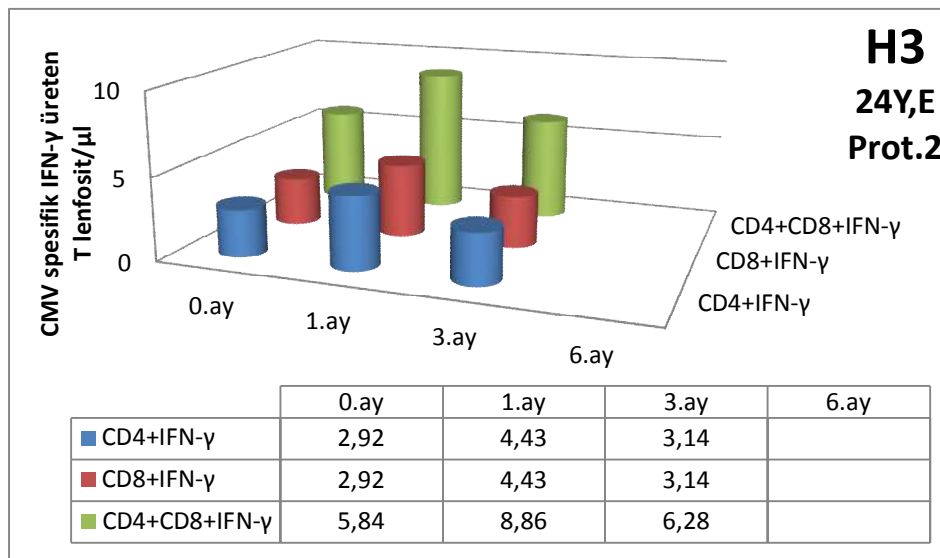
İmmün supresyon protokolü	İlaçlar	n
------------------------------	---------	---

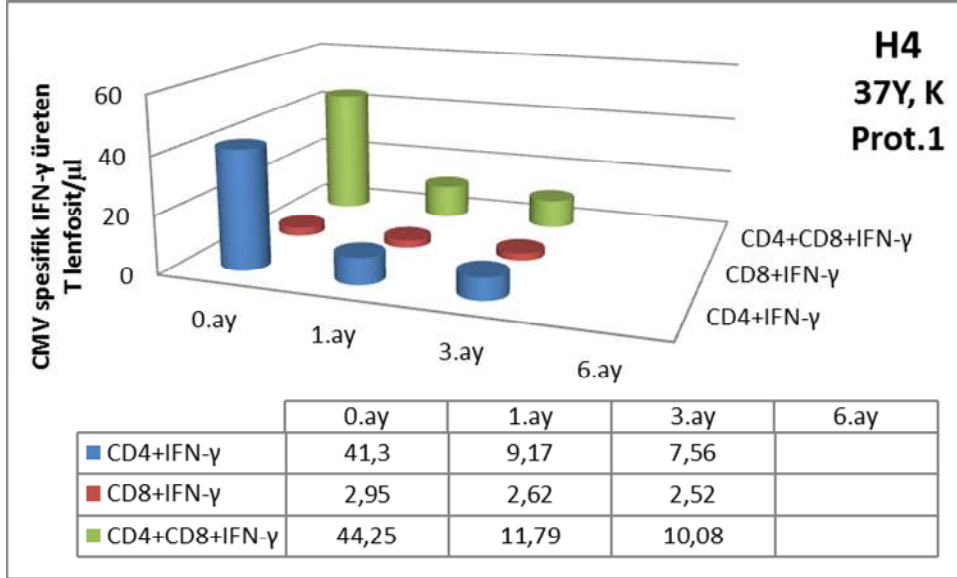
Protokol 1	Takrolimus +MMF +Steroid	17
Protokol 2	Siklosporin +MMF+ Steroid	2
Protokol 3	mTOR inhibitörü +MMF +Steroid	2

İmmün supresyon tedavisinin yanında endikasyon doğduğu durumlarda hastalara indüksiyon tedavisi de uygulanmaktadır. Bu amaçla nakilden 2 saat önce ve nakilden sonraki 4. saatte Basiliximab kullanılmaktadır. Çalışmamızda 4 hastaya indüksiyon tedavisi uygulanmıştır. 17 hasta indüksiyon tedavisi almamıştır.

Hastaların CMV spesifik $CD4^+$ IFN- γ , $CD8^+$ IFN- γ ve $CD4^+$ + $CD8^+$ IFN- γ T lenfosit sayılarının 0, 1, 3 ve 6. aylardaki değerleri Şekil 4.2.'de her bir hasta için ayrı ayrı grafikler olarak gösterilmiştir. Hasta numaraları, cinsiyet ve yaş özellikleri, uygulanan immün supresyon protokolleri ve indüksiyon tedavileri sağ üst köşede yer almaktadır.

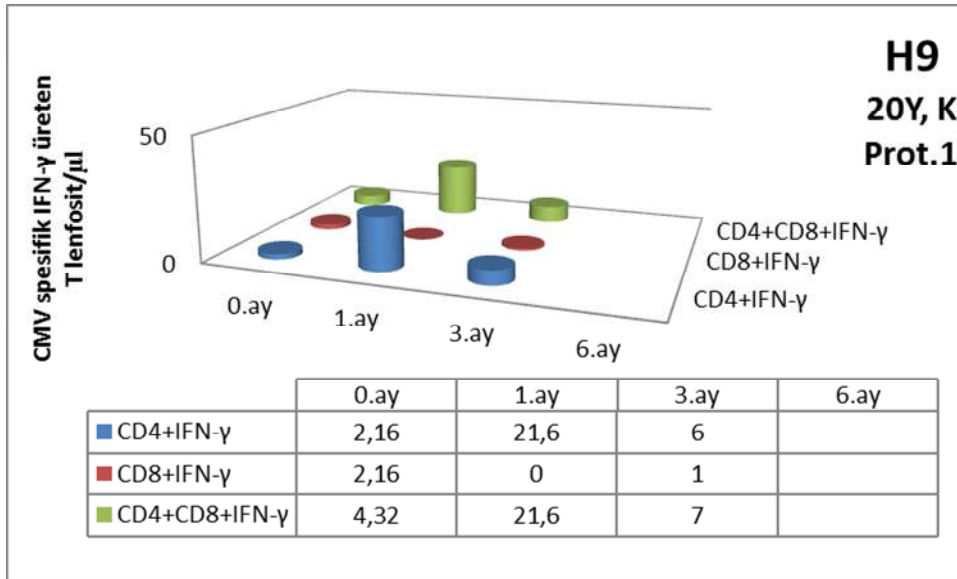
Hastalarımızın izleminde CMV hastalığı gelişen olgu olmamıştır. Bir hastamızda (H27) düşük düzeyde viremi (CMV DNA<150 kopya/ml) saptanmıştır.

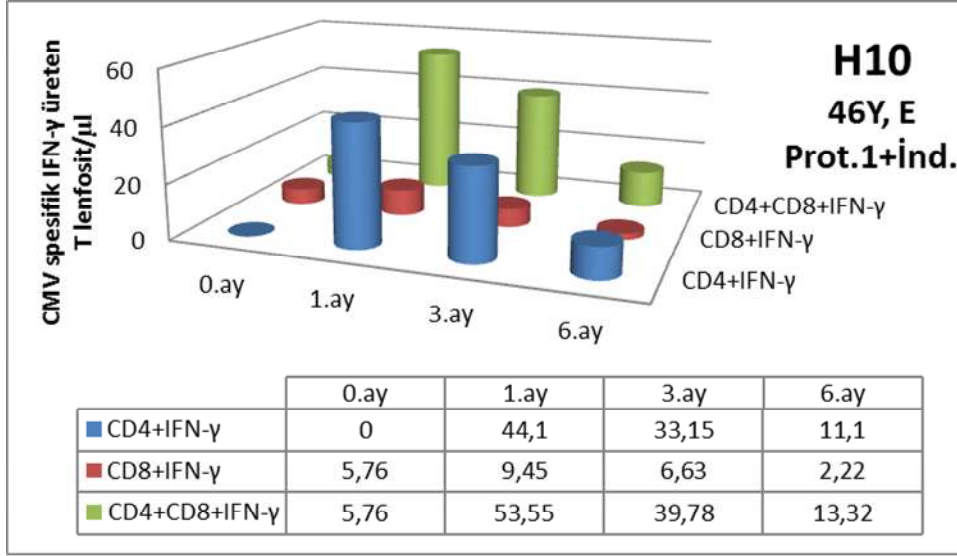




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

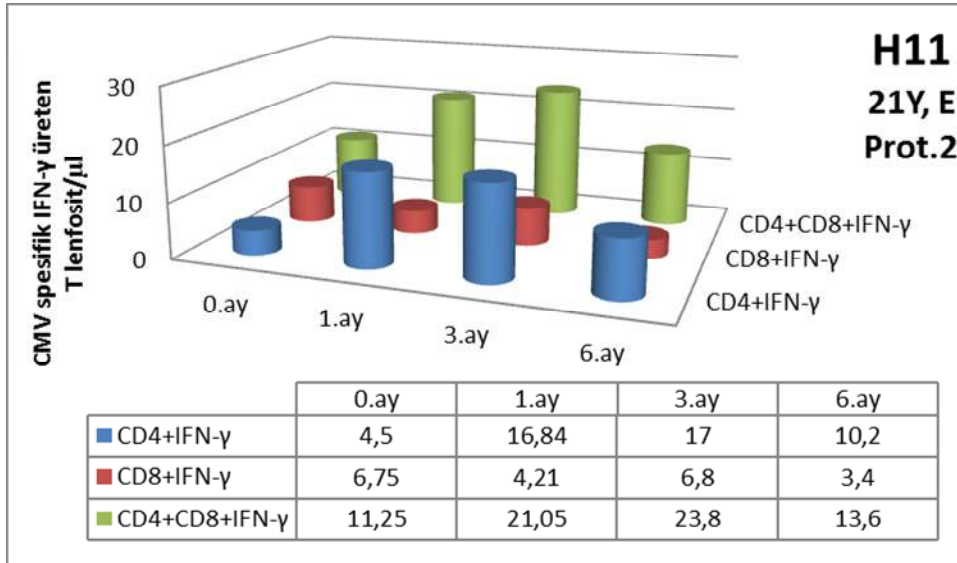
Şekil 4.2. Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

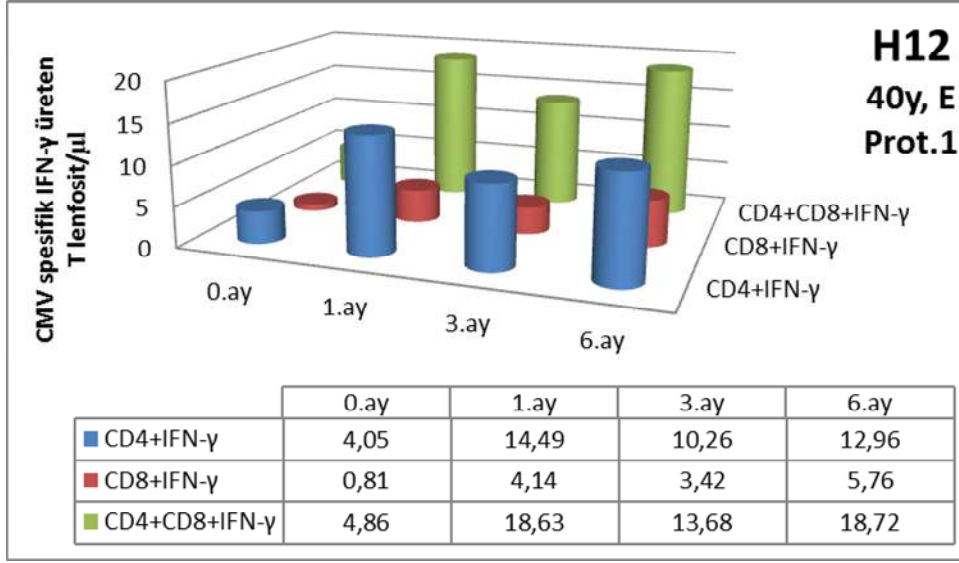




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

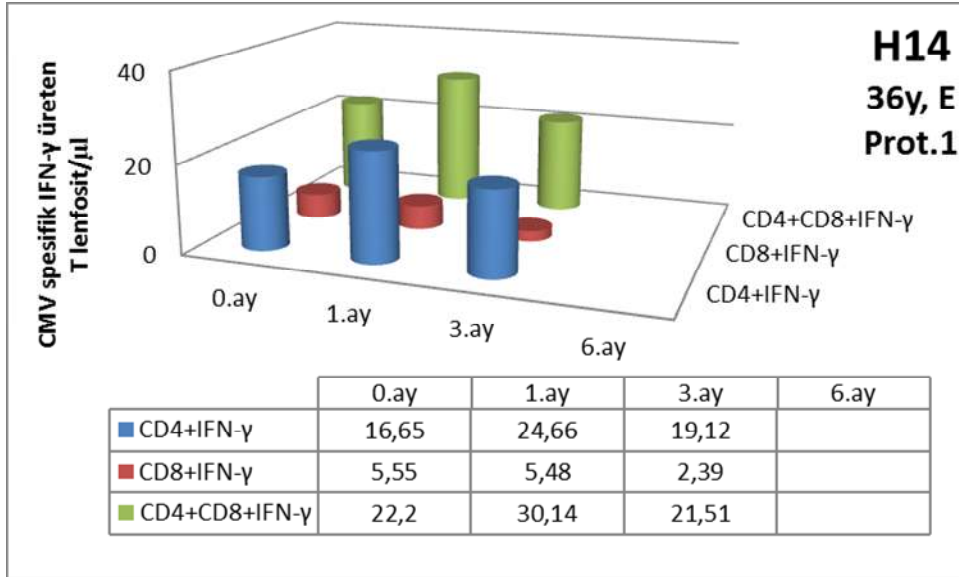
Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

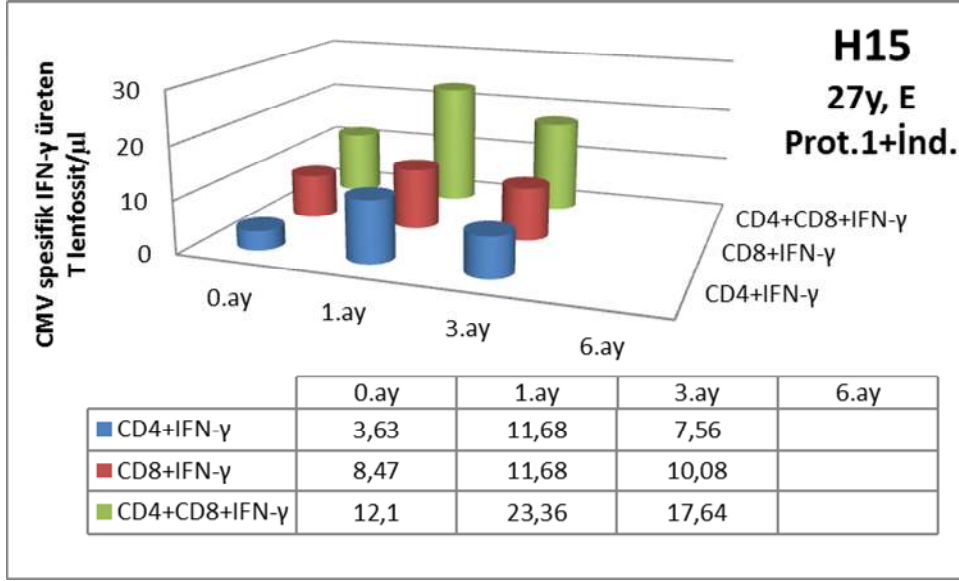




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

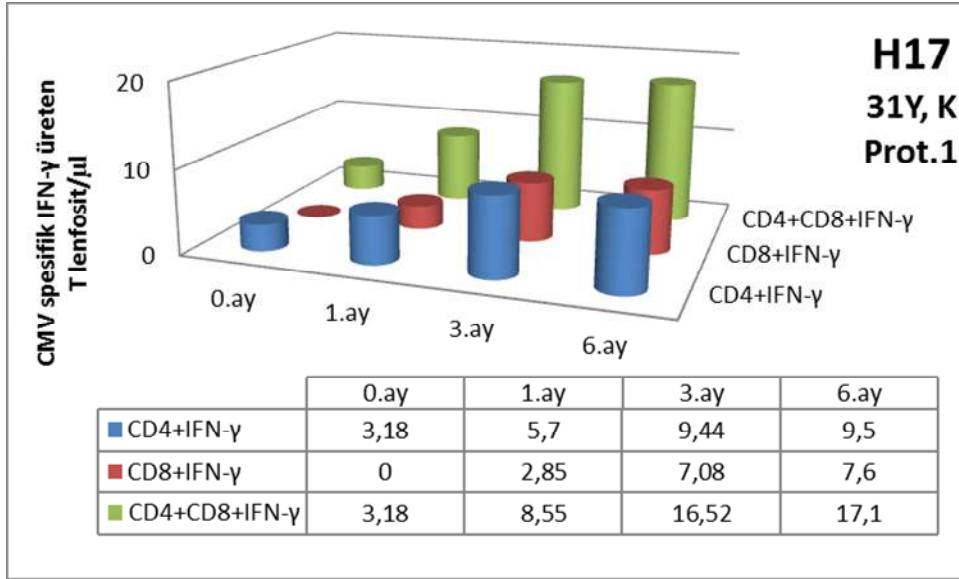
Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

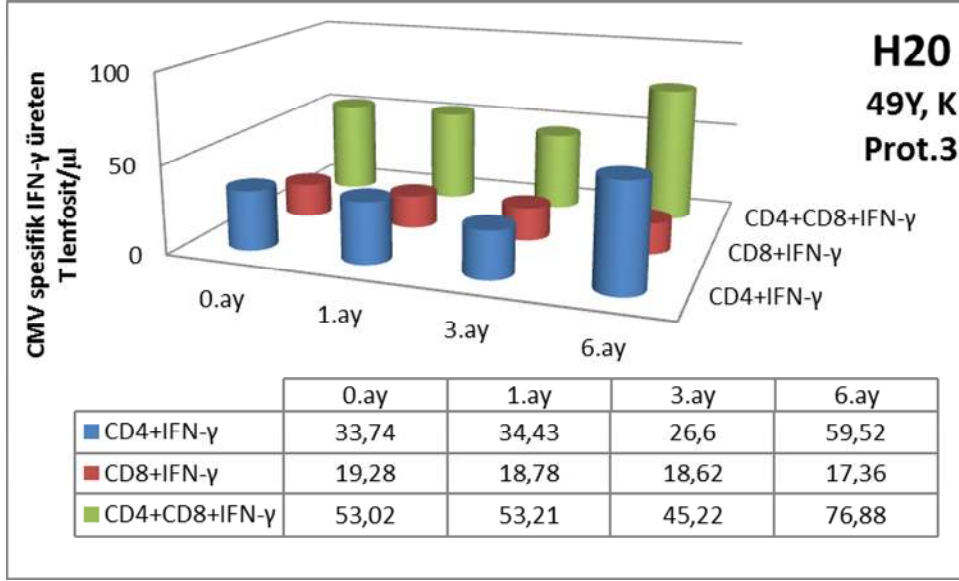




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

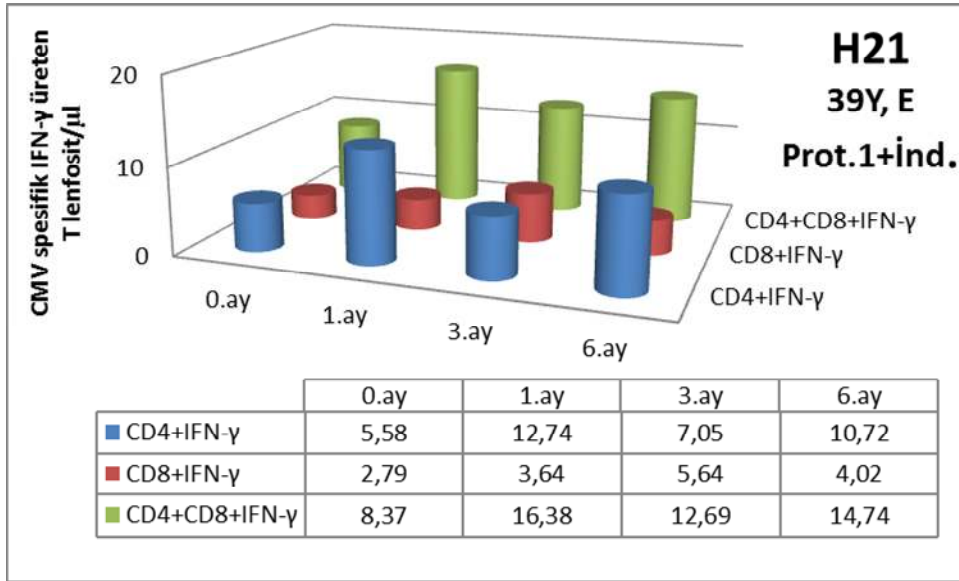
Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

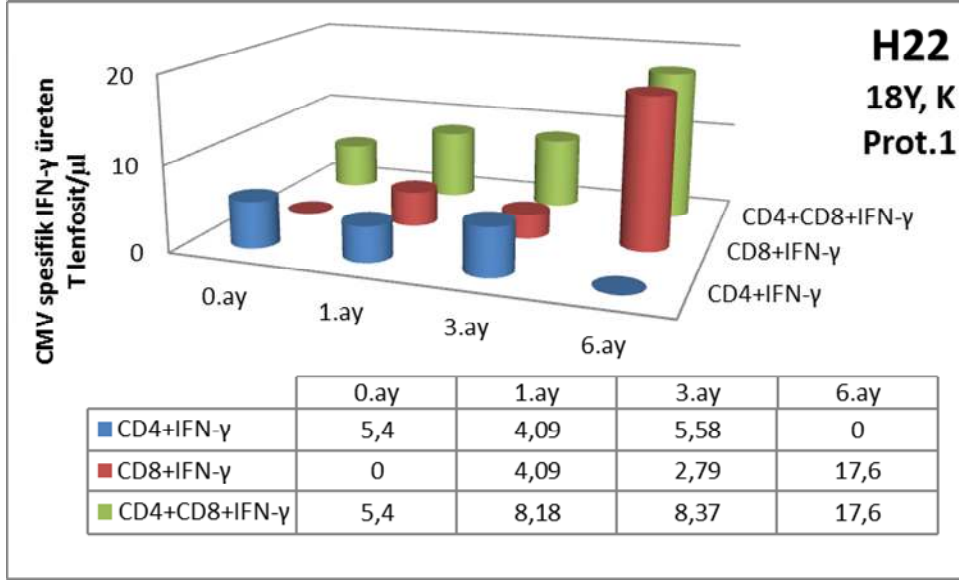




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

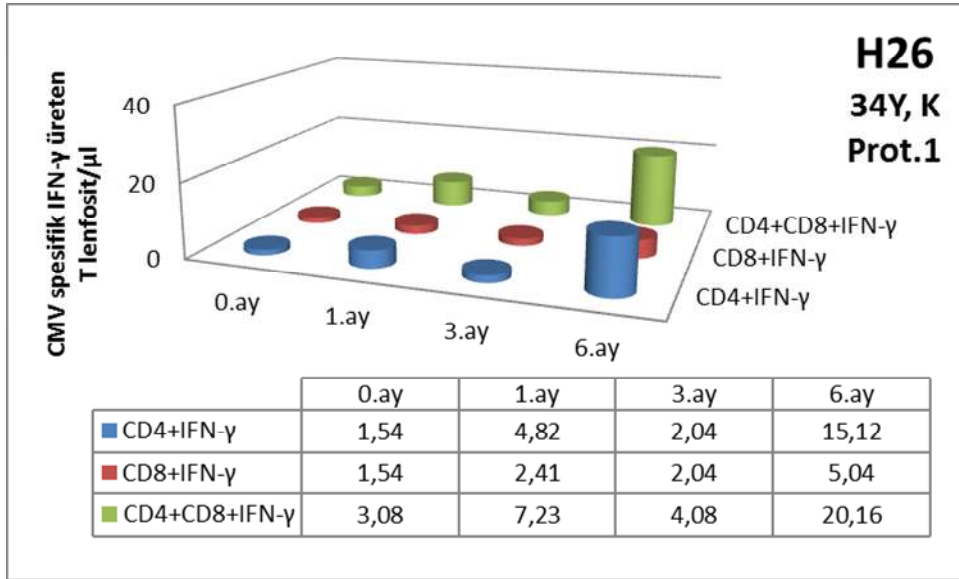
Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

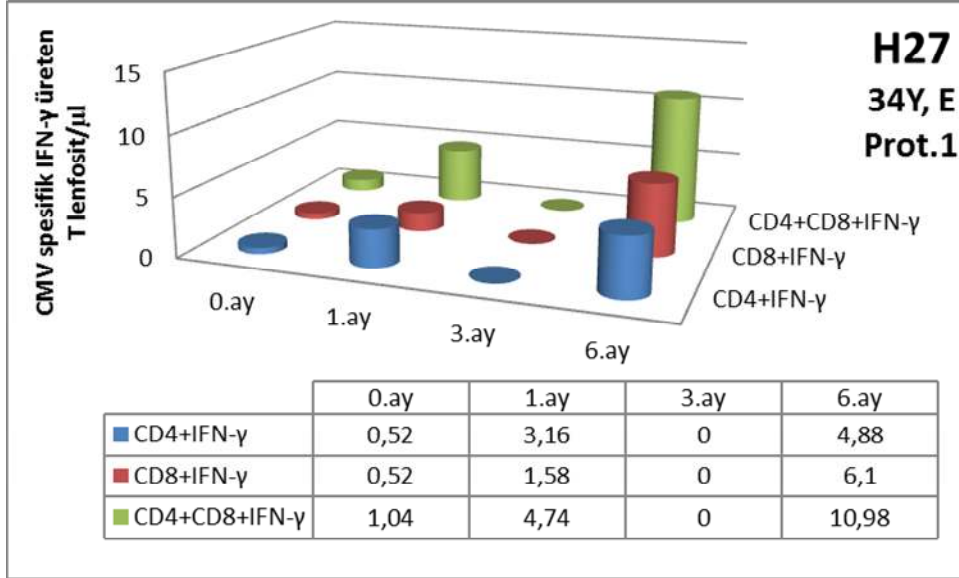




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

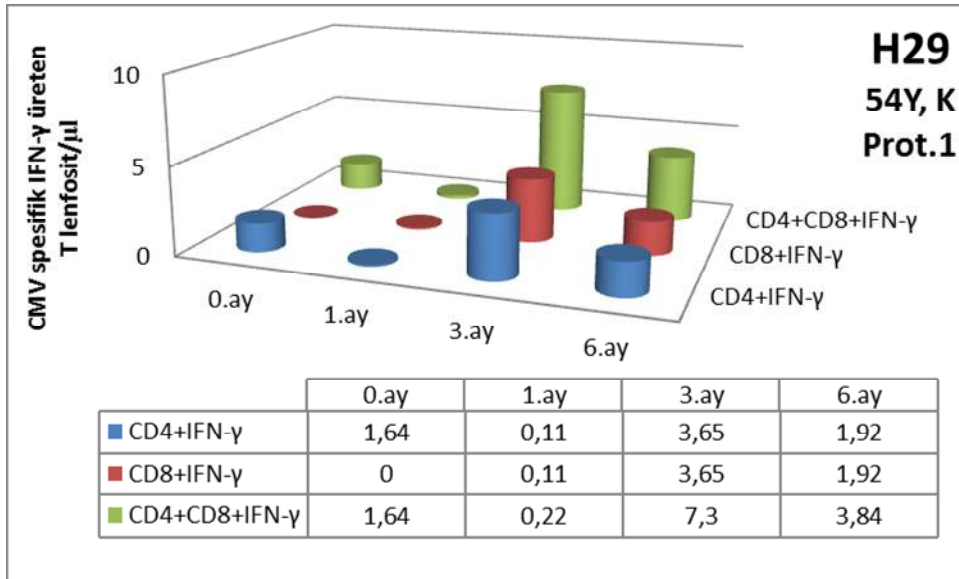
Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

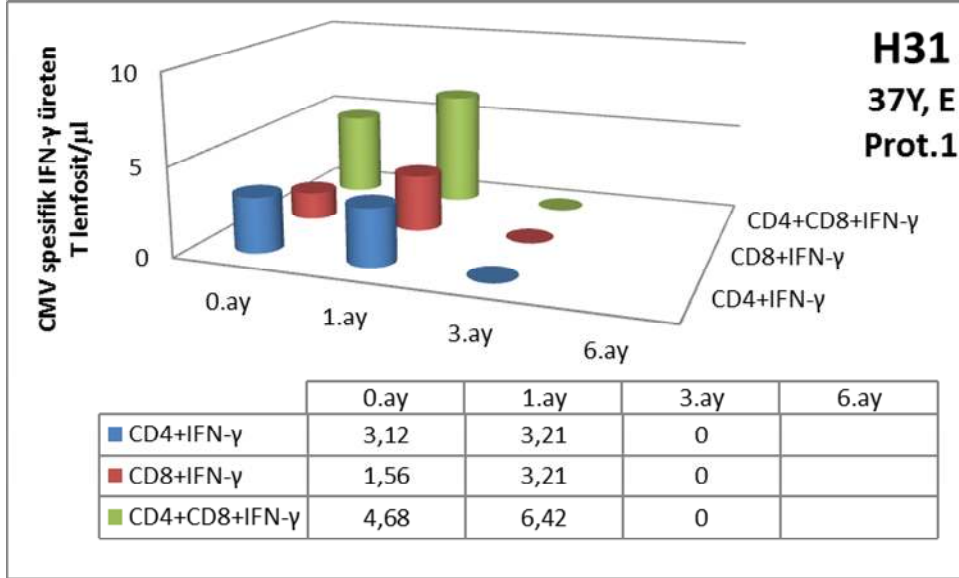




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

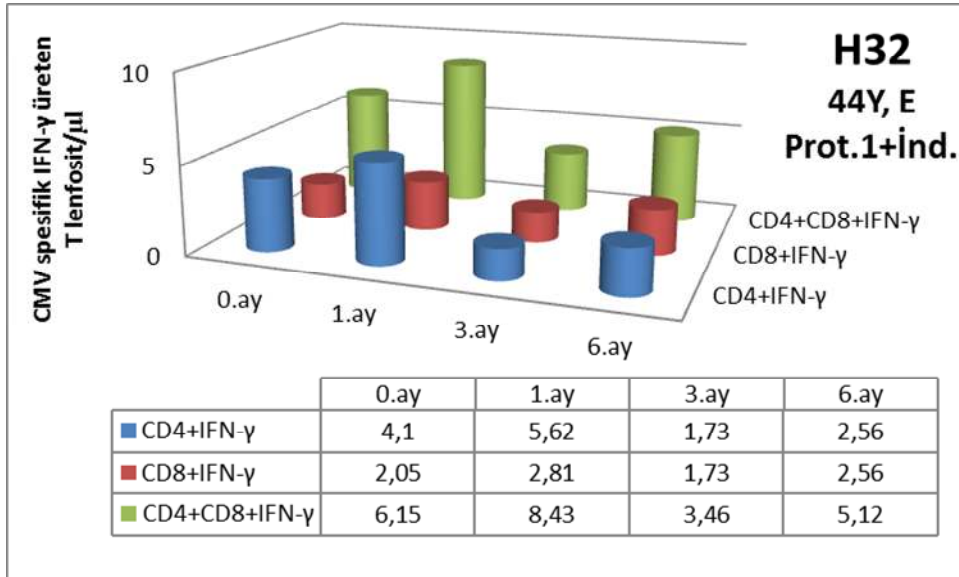
Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

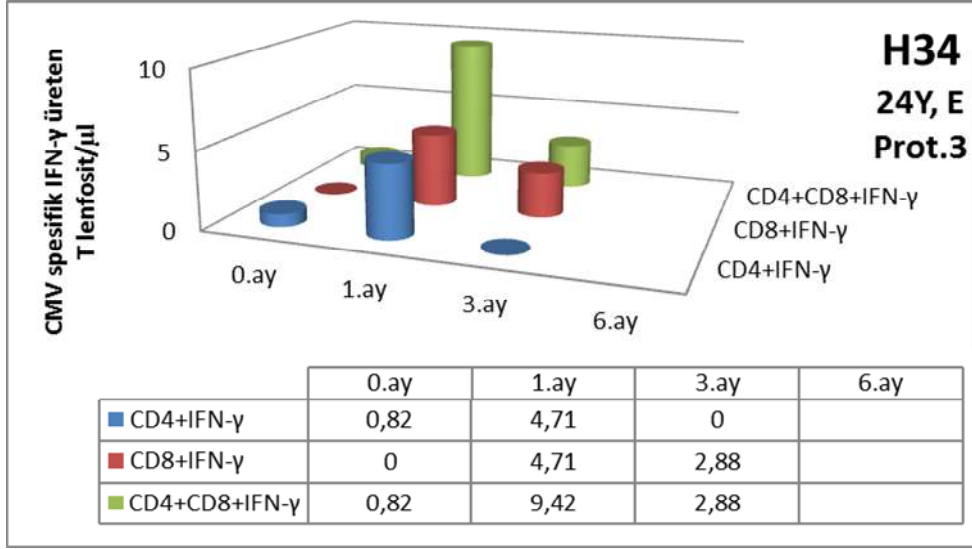




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

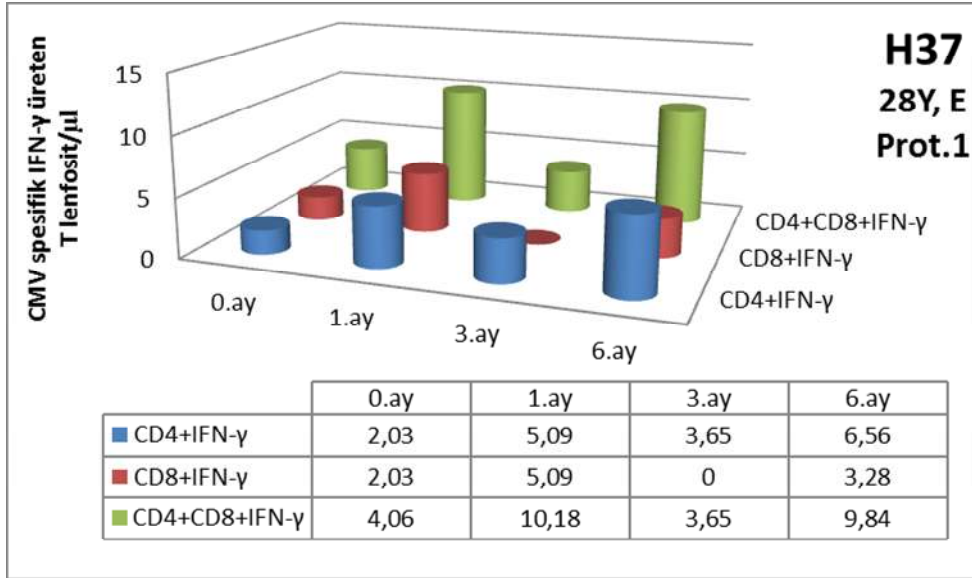
Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

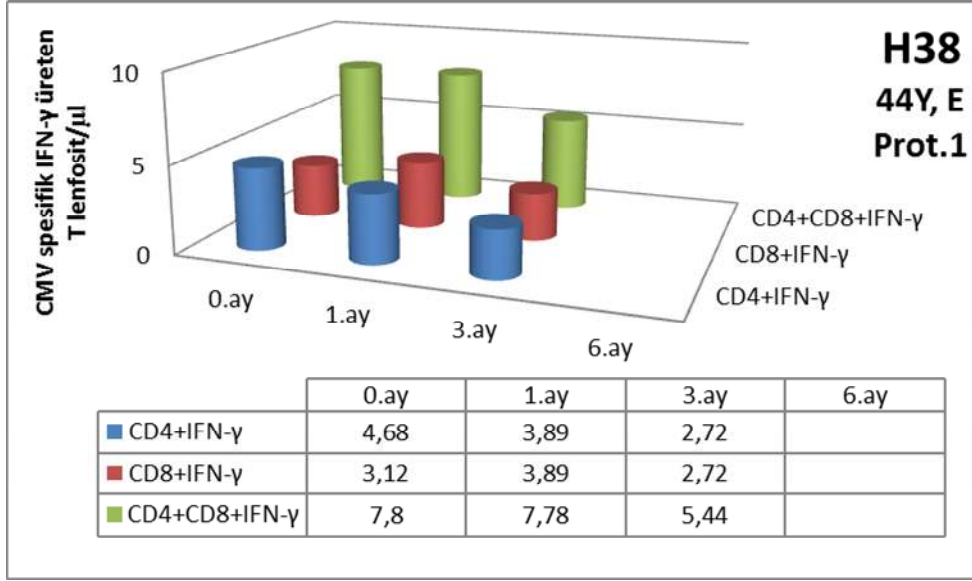




Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

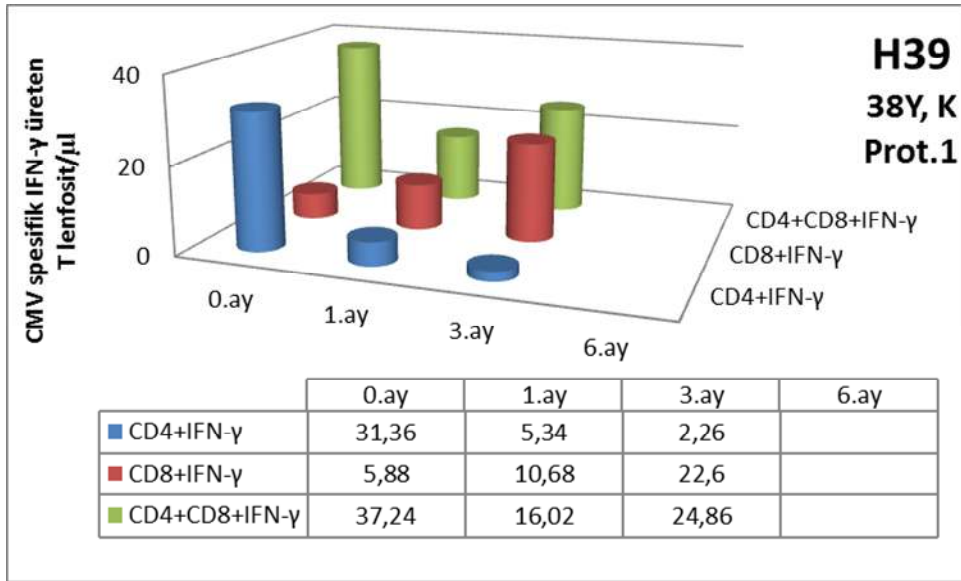
Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)





Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)



Prot.1:Protokol 1, Prot.2:Protokol 2, Prot.3:Protokol 3 (İçerik için Çizelge 4.2.6.).
+İnd.:İndüksiyon tedavisi alan hastalar.

Şekil 4.2. (Devam) Hastaların CMV spesifik CD4⁺ IFN-γ, CD8⁺ IFN-γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN-γ T lenfosit sayıları (/ μl)

CMV spesifik IFN- γ salınımı yapan CD4⁺ ve CD8⁺ ve CD4⁺+CD8⁺ T lenfosit sayılarının (/ μ l) ortalama (mean) ve ortanca (median) değerleri kontrol grubu için Çizelge 4.10.'da, hasta grubu için Çizelge 4.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. CMV spesifik hücresel immünite istatistiksel verileri -kontrol grubu- n:20

CMV spesifik T (/ μ l)	Ortalama ($\pm$ SS*)	Ortanca (en düşük;en yüksek)
CD4 ⁺ IFN- γ	8,84 (9,56)	6,24 (1,14 ; 45,44)
CD8 ⁺ IFN- γ	4,52 (5,17)	3,08 (0 ; 2041)
CD4 ⁺ +CD8 ⁺ IFN- γ	13,36 (13,77)	8,53 (3,08 ; 62,48)

*SS : standart sapma

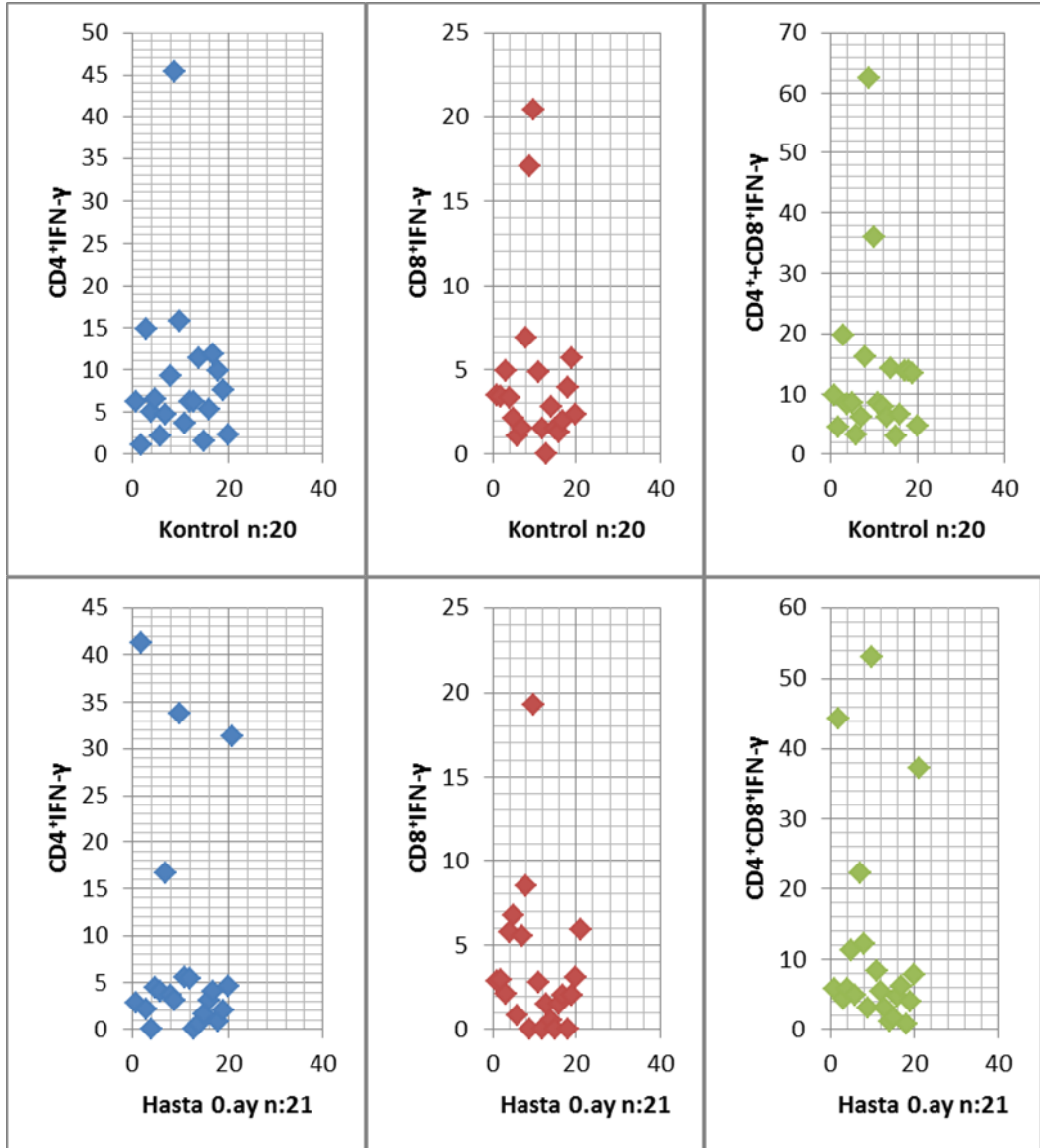
Çizelge 4.11. CMV spesifik hücresel immünite istatistiksel verileri -tx grubu- n:21*

CMV spesifik T / μ l	Ortalama ($\pm$ SS**)	Ortanca (en düşük;en yüksek)
0.ay CD4+IFN- γ	8,23 (11,98)	3,63 (0 ; 41,3)
0.ay CD8+IFN- γ	3,53 (4,35)	2,16 (0 ; 19,28)
0.ay CD4++CD8+IFN- γ	11,76 (14,8)	5,76 (0,82 ; 53,02)
1.ay CD4+IFN- γ	11,42 (11,35)	5,62 (0,11 ; 44,1)
1.ay CD8+IFN- γ	5,04 (4,34)	4,09 (0 ; 18,8)
1.ay CD4++CD8+IFN- γ	16,46 (14,21)	10,18 (0,22 ; 53,5)
3.ay CD4+IFN- γ	8 (8,9)	5,58 (0 ; 33,2)
3.ay CD8+IFN- γ	5 (5,8)	2,88 (0 ; 22,6)
3.ay CD4++CD8+IFN- γ	13,1 (12,3)	8,37 (0 ; 45,2)
6*.ay CD4+IFN- γ	12,1 (15,7)	9,85 (0 ; 59,5)

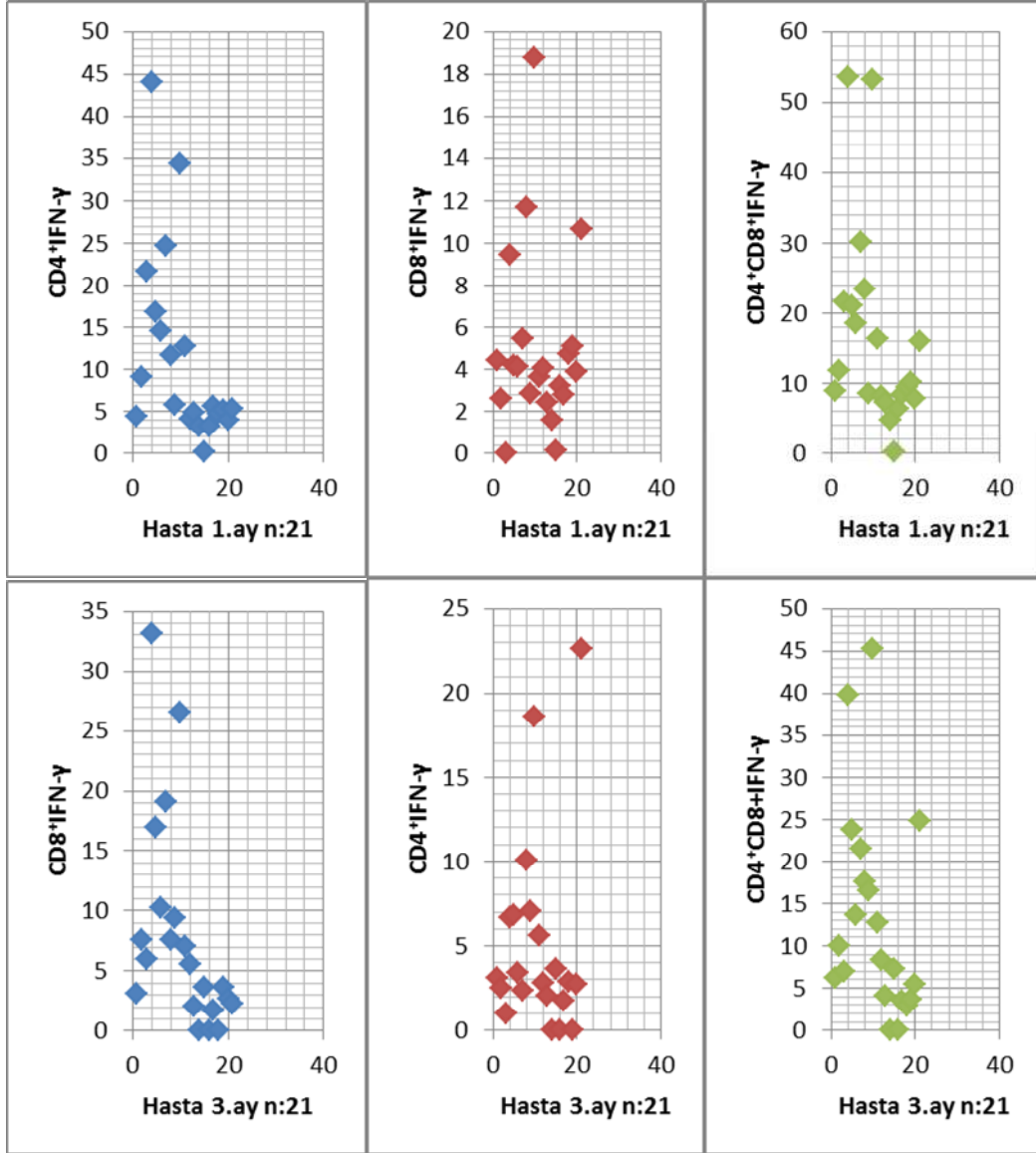
6*.ay CD8+IFN- γ	6,4 (5,4)	4,53 (0 ; 17,6)
6*.ay CD4++CD8+IFN- γ	12,3 (17)	14,17 (3,8 ; 76,9)

* Post tx 6.ayda 12 hastanın örneği çalışılabilmektedir. **SS:standart sapma

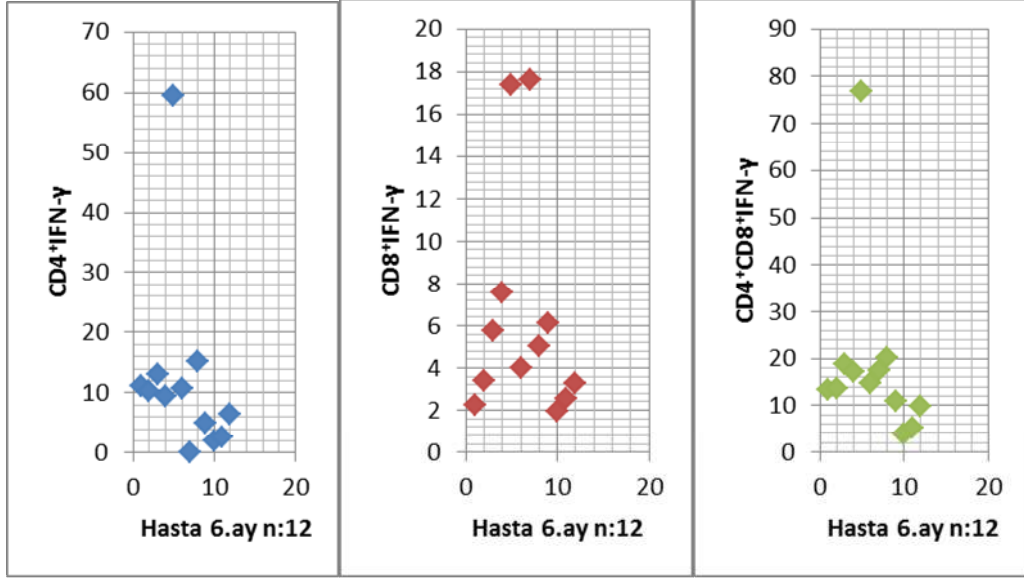
Kontrol grubunun ve hastaların nakil öncesi, nakil sonrası 1 ,3 , 6.aylarda CMV spesifik CD4⁺IFN- γ , CD8⁺IFN- γ , CD4⁺+CD8⁺IFN- γ T lenfositlerinin dağılımı Şekil 4.3.'te grafikler olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Kontrol ve hastaların CMV spesifik IFN- γ üreten T hücreleri



Şekil 4.3. (Devam) Kontrol ve hastaların CMV spesifik IFN- γ üreten T hücreleri



Şekil 4.3. (Devam) Kontrol ve hastaların CMV spesifik IFN- γ üreten T hücreleri

Kontrol grubu ile hastaların nakil öncesi periferik kan lenfosit sayıları, CD4⁺IFN- γ , CD8⁺IFN- γ ve CD4⁺CD8⁺IFN- γ T lenfosit değerleri arasındaki ilişki Mann-Whitney U testi ile araştırıldı. Hiçbir grup arasında anlamlı fark saptanmadı. p değerleri aşağıda verilmiştir.

Kontrol grubunun ve hastaların 0.ay lenfosit sayıları arasında anlamlı fark saptanmadı (Mann-Whitney U testi p=0,139).

Kontrol grubu ile hastaların 0.ay CD4⁺IFN- γ T lenfosit sayıları arasında anlamlı fark saptanmadı (Mann-Whitney U testi p=0,057).

Kontrol grubu ile hastaların 0.ay CD8⁺IFN- γ T lenfosit sayıları arasında anlamlı fark saptanmadı (Mann-Whitney U testi p=0,266).

Kontrol grubu ile hastaların 0.ay CD4⁺CD8⁺IFN- γ T lenfosit sayıları arasında anlamlı fark saptanmadı (Mann-Whitney U testi p=0,088).

Hastaların CMV spesifik IFN- γ sentezleyen T lenfosit sayıları arasındaki ilişki non parametrik testlerden Wilcoxon Signed testi ile değerlendirildi.

3.ay CD4⁺IFN- γ T lenfosit sayısının 1.ay CD4⁺IFN- γ T lenfosit sayısından daha düşük olduğu görüldü (Wilcoxon Signed testi p=0,003).

3.ay CD4⁺CD8⁺IFN- γ T lenfosit sayısının 1.ay CD4⁺CD8⁺IFN- γ değerinden anlamlı olarak düşük olduğu görüldü (Wilcoxon Signed testi p=0,039).

3.ay CD4⁺IFN- γ T lenfosit sayısı ile 6.ay CD4⁺IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı fark saptanmadı (Wilcoxon Signed testi p=0,295)

1.ay C8⁺IFN- γ ile 3.ay CD8⁺IFN- γ T lenfosit arasında anlamlı fark bulunmadı (Wilcoxon Signed testi p=0,375).

3.ay C8⁺IFN- γ ile 6.ay CD8⁺IFN- γ T lenfosit arasında anlamlı fark bulunmadı (Wilcoxon Signed testi p=0,218).

3.ay CD4⁺+CD8⁺IFN- γ ile 6.ay CD4⁺+CD8⁺IFN- γ T lenfosit arasında anlamlı fark bulunmadı (Wilcoxon Signed testi p=0,351).

Hasta grubumuz CMV seropozitif bireylerden oluşmaktadır. CMV IgG antikor titrelerinin IFN- γ ⁺ T lenfositler üzerine etkisi olup olmadığını görebilmek için Korelasyon testi uygulandı. Gruplar arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Nakil öncesi CMV IgG antikor titreleri ile CD4⁺ IFN- γ T lenfositler arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (Korelasyon testi p=0,84).

Nakil öncesi CMV IgG antikor titreleri ile CD8⁺ IFN- γ T lenfositler arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (Korelasyon testi p=0,66).

Nakil öncesi CMV IgG antikor titreleri ile CD4⁺ +CD8⁺ IFN- γ T lenfositler arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (Korelasyon testi p=0,902).

İmmün supresyon protokollerinin periferik kandaki lenfosit sayıları, CD4⁺ IFN- γ , CD8⁺ IFN- γ ve CD4⁺+ CD8⁺IFN- γ T lenfosit sayıları ile arasındaki ilişki nonparametrik testlerden Kruskal Wallis testi ile araştırıldı. Anlamlı fark bulunamadı.

İmmün supresyon protokolleri ile 0.ayda periferik kandaki lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,628).

İmmün supresyon protokolleri ile 0.ay CD4⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,85).

İmmün supresyon protokolleri ile 0.ay CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=881).

İmmün supresyon protokolleri ile 0.ay CD4⁺+ CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,177).

İmmün supresyon protokolleri ile 1.ayda periferik kandaki lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,177).

İmmün supresyon protokolleri ile 1.ay CD4⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,822).

İmmün supresyon protokolleri ile 1.ay CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,181).

İmmün supresyon protokolleri ile 1.ay CD4⁺ CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,568).

İmmün supresyon protokolleri ile 3.ayda periferik kandaki lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,196).

İmmün supresyon protokolleri ile 3.ay CD4⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,89).

İmmün supresyon protokolleri ile 3.ay CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,353).

İmmün supresyon protokolleri ile 3.ay CD4⁺ CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,854).

İmmün supresyon protokolleri ile 6.ayda periferik kandaki lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,177).

İmmün supresyon protokolleri ile 6.ay CD4⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,85).

İmmün supresyon protokolleri ile 6.ay CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,881).

İmmün supresyon protokolleri ile 6.ay CD4⁺ CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Kruskal Wallis p=0,866).

Hastalara uygulanan indüksiyon tedavisinin CMV spesifik IFN- γ üreten T lenfosit sayıları üzerinde etkisi olup olmadığının analizi için nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi çalışıldı. Grupların hiçbirinde anlamlı ilişki saptanmadı.

İndüksiyon tedavisi ile 0.ay periferik kan lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi p=0,72).

İndüksiyon tedavisi ile 0.ay CD4⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi p=0,858).

İndüksiyon tedavisi ile 0.ay CD8⁺ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi p=0,178).

İndüksiyon tedavisi ile 0.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,72$).

İndüksiyon tedavisi ile 1.ay periferik kan lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,929$).

İndüksiyon tedavisi ile 1.ay $CD4^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,128$).

İndüksiyon tedavisi ile 1.ay $CD8^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,42$).

İndüksiyon tedavisi ile 1.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,152$).

İndüksiyon tedavisi ile 3.ay periferik kan lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,324$).

İndüksiyon tedavisi ile 3.ay $CD4^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,446$).

İndüksiyon tedavisi ile 3.ay $CD8^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,324$).

İndüksiyon tedavisi ile 3.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,42$).

İndüksiyon tedavisi ile 6.ay periferik kan lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,817$).

İndüksiyon tedavisi ile 6.ay $CD4^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,42$).

İndüksiyon tedavisi ile 6.ay $CD8^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,926$).

İndüksiyon tedavisi ile 6.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U testi $p=0,852$).

CMV spesifik IFN- γ üretimi ile hastaların yaşları arasındaki ilişkiyi saptamak için korelasyon testi yapıldı. Anlamlı ilişki bulunamadı.

Hastaların yaşları ile 0.ay $CD4^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,82$).

Hastaların yaşları ile 0.ay $CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,64$).

Hastaların yaşları ile 0.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,68$).

Hastaların yaşları ile 1.ay $CD4^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,737$).

Hastaların yaşları ile 1.ay $CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,9$).

Hastaların yaşları ile 1.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,987$).

Hastaların yaşları ile 3.ay $CD4^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,58$).

Hastaların yaşları ile 3.ay $CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,391$).

Hastaların yaşları ile 3.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,375$).

Hastaların yaşları ile 6.ay $CD4^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,096$).

Hastaların yaşları ile 6.ay $CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,832$).

Hastaların yaşları ile 6.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Korelasyon testi $p=0,517$).

CMV spesifik IFN- γ üretimi ile hastaların cinsiyetleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

Hastaların cinsiyetleri ile 0.ay $CD4^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,63$).

Hastaların cinsiyetleri ile 0.ay $CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,39$).

Hastaların cinsiyetleri ile 0.ay $CD4^+ + CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,73$).

Hastaların cinsiyetleri ile 1.ay $CD4^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=1$).

Hastaların cinsiyetleri ile 1.ay $CD8^+$ IFN- γ^+ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,052$).

Hastaların cinsiyetleri ile 1.ay $CD4^+ + CD8^+ IFN-\gamma^+$ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,502$).

Hastaların cinsiyetleri ile 3.ay $CD4^+ IFN-\gamma^+$ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,411$).

Hastaların cinsiyetleri ile 3.ay $CD8^+ IFN-\gamma^+$ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,823$).

Hastaların cinsiyetleri ile 3.ay $CD4^+ + CD8^+ IFN-\gamma^+$ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,601$).

Hastaların cinsiyetleri ile 6.ay $CD4^+ IFN-\gamma^+$ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,608$).

Hastaların cinsiyetleri ile 6.ay $CD8^+ IFN-\gamma^+$ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,14$).

Hastaların cinsiyetleri ile 6.ay $CD4^+ + CD8^+ IFN-\gamma^+$ T lenfosit sayısı arasında anlamlı ilişki görülmedi (Mann Whitney U testi $p=0,14$).

5. TARTIŞMA

Konak mikroorganizma karşılaşmasında, enfeksiyondan hafif ya da ciddi seyirli enfeksiyon hastalığına hatta konağın kaybına kadar gidebilen sürecin sonucunu, mikroorganizmanın özellikleri, virülansı, patojenitesi kadar kişinin bağışık yanıtı da belirlemektedir. Özellikle immün supresif hasta grubunda hastanın bağışık yanıt mekanizmaları ön plandadır. Normal konakta hastalığa neden olmayan mikroorganizmanın bağışık yanıtı baskılanmış olanlarda enfeksiyon hastalığına neden olmasının temel nedeni de hastanın etkene karşı savaşılabile yeteneğinin azalmış olmasıdır (102, 103).

Organ nakli, tıp biliminin büyük başarı sağladığı alanlardan birisidir. Gerek cerrahi alanda olan ilerlemeler gerekse yeni kuvvetli immün supresif ilaçların kullanım alanına girmesi ile transplantasyon tıbbında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. İmmün supresif tedavi, hastanın kendisine ‘yabancı’ doku ya da organı reddetmesini önlerken beraberinde özellikle latent enfeksiyonların reaktivasyonu riskini de getirmektedir. Bu nedenle ki klinikte organ nakil hastalarının laboratuvar izleminde daha duyarlı yöntemler ile normal konaklardan farklı izlem algoritmaları oluşturulmuştur. Son yıllarda özellikle moleküler tanı yöntemi alanında sağlanan ivme, bu grup hastanın enfeksiyon hastalıkları açısından başarılı bir şekilde izlemini sağlamış ve klinik laboratuvarlar hasta yaşam süresinin artmasında önemli katkılarda bulunmuştur (1, 3, 4, 5, 8, 9, 10). Laboratuvar tıbbı, etkene yönelik tanı testlerinde önemli gelişmeler sağlarken son yirmi yılda transplant hastalarında hücrel immüniteye yönelik araştırmalar da yoğunluk kazanmıştır. Çünkü bu grup hastada özellikle latent virüs enfeksiyonlarının kontrolünde, klinik yelpazenin belirlenmesinde esas mekanizma kazanılmış-özgün (spesifik) hücrel bağışık yanıtıdır (124, 187, 188, 193).

Bağışıklık sisteminde sorunu olmayan, sağlıklı bireylerde genellikle asemptomatik seyreden CMV, nadiren ateş, miyalji, farenjit, servikal LAP, hafif-orta derecede hepatit, splenomegali bulguları ile enfeksiyöz mononükleoz benzeri tabloya neden olabilir. İdrar ve solunum sekresyonları ile hem horizontal hem de vertikal bulaş sonucunda genel olarak çocukluk yaş grubunda kazanılan primer CMV enfeksiyonu, ikinci ivmesini cinsel yolla bulaş sonucunda genç

yetişkinlerde yapar. Latent virüsler ‘misafirlik’ kavramını bilmez. CMV primer enfeksiyon sonrası konağı terk etmez, çeşitli hücre ve dokularda “sessiz-sedasız” yaşamını sürdürür. Organ nakli gibi immün sistemin baskılandığı durumlarda, CMV reaktif olur, çoğalmaya başlar ve hastalık tablosu gelişebilir (57-61, 70, 73). CMV replikasyonunun immünolojik kontrolünde NK hücreleri, B hücresi, makrofajlar gibi çok sayıda hücre yer almaktadır. Ancak başrol $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerine aittir (2, 187, 188, 194, 195, 202). CMV viral yük her zaman hastalık ile doğrusal bir ilişki göstermeyebilir. CMV DNA saptanamayan bazı hastalarda da CMV hastalığı gelişebilmektedir. Bunun açıklaması konağın immün yanıtında saklıdır (169). Transplantasyon hasta grubunda, CMV hastalığının gelişiminde, CMV spesifik T hücre immünitesi bağımsız bir risk faktörüdür (203, 204).

CMV enfeksiyonuna özel hücresel yanıtın ölçümü için T-hücre bazı yöntemler geliştirilmiştir. Burada amaçlanan, etkene özel aktive olmuş T hücrelerinin tanımlanması ve/veya fonksiyonlarının belirlenmesidir. Lenfositlerin *ex vivo* olarak virüs antijenleri ile uyarılması sonucunda aktive olan T lenfositlerinin ve fonksiyonlarının belirlenmesinde çeşitli metodolojik yaklaşımlar vardır (62, 171, 172). Biz bu araştırmamızda, böbrek nakli yapılan hastalarımızda CMV spesifik immün yanıt parametrelerini belirlemeyi amaçladık. Söz konusu parametreler olarak, CMV peptidleri ile lenfositlerin stimülasyonu ardından viral aktivasyonun en duyarlı belirteçlerinden olan IFN- γ üreten $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfosit gruplarını çalıştık. Yöntem olarak sitokin akış sitometri ile çalıştık. Hücresel immünite testleri araştırma laboratuvarlarından henüz klinik laboratuvarlara geçiş yapamamıştır. Laboratuvar ve klinik validasyonları tamamlanmamıştır. Kaynak tarama sonuçlarımıza göre, yurdumuzda klinik örneklerde CMV hücresel immünite araştırması daha önce yapılmamıştır.

Hücresel immünite akış sitometri araştırmaları, kompleks ve dinamik yöntemlerdir. Çok az sayıda hücrenin aktivasyon ürününü saptayabiliyor olmamız testin duyarlılığını artırmaktadır. *Ex vivo* lenfosit stimülasyonu, hücre yüzeyi ekspresyonu, aktivasyon belirteçleri, hücre içi boyama ya da fonksiyonel yöntemlerin ayrı ayrı tüm aşamalarında henüz standardize olmamış farklı yaklaşımlar vardır. Hasta örnekleri alındığında direkt olarak tam kandan stimülasyon yapılabileceği gibi, tam kandan PKMNH izole edilerek stimülasyon

yapılabilir ya da PKMNH dondurulup saklanabilir (186, 191, 193, 198, 199). Motta ve ark. (178), tam kandan direkt olarak stimülasyonunun testin uygulanmasında daha pratik olduğunu vurgulamaktadırlar. Biz optimizasyon çalışmalarında direkt tam kan stimülasyonu ya da PHMNH izolasyonu ardından hemen çalışmanın, örnekleri dondurup saklayıp daha sonra çözündürme ardından çalışılmasına üstünlüğü olmadığını gördük. Tam kan örneğinin 4 saat içerisinde işleme konması ve testin diğer optimizasyon araştırmalarını da tamamlamamız gerektiğinden, prospektif olan araştırmamızda bu süreç içerisinde elde ettiğimiz örnekleri dondurduk ve validasyon çalışmalarını tamamladıktan sonra çalıştık.

Lenfositlerin *ex vivo* stimülasyonunda, tek peptid, purifiye polipeptid, peptid havuzu ya da virüs ile enfekte hücre lizatı kullanılmaktadır. Peptidin amino asit sekans özellikleri ve uzunluğu, immün yanıt şekli üzerine etkilidir. İmmünodominant peptid, T hücrelerini stimüle etme yeteneğinde epitoplara içermelidir. Tek peptid kullanımı durumunda, bazı HLA tipleri devre dışı kalabilir ve test sonucunda lenfosit aktivasyonu sağlanamayabilir. Viral lizat kullanımında testin duyarlılığı, çok sayıda CMV protein ekspresyonu nedeni ile artacaktır ancak lizat enfekte fibroblastlardan hazırlandığından standardizasyon sorunu vardır (178, 190, 196). Bu nedenle, hücresel immünite çalışırken lenfosit stimülasyon amacıyla ne kullanıldığının tanımlanması uygun olacaktır. Biz, araştırmamızda peptid kokteyli (peptid mix) ile çalıştık.

Test protokolünde yer alan ‘transport inhibitör’ kullanımının amacı, stimülasyon sonucu aktive olan T lenfositlerinden sitokinlerin hücre dışına salınımını önlemektir. Bunun için monensin, brefeldin A kullanılmaktadır (178, 179, 180, 181, 197). Araştırmamızda kullandığımız Golgi plug, brefeldin A içermektedir.

Yöntemimizde, sitokin sentez eden hücrelerin saptanması amacı ile Anti-Hu-IFN- γ /CD69/CD4/CD3 ve IFN γ /CD69/CD8/CD3 (BD FastImmune) kullandık. Bu kitte yer alan CD69, tip II Lectin membran reseptörüdür. Transmembranal yerleşimlidir. T, B ve NK hücre yüzeylerinde bulunur. Hücreler dinlenme halindeyken bu molekül çok az eksprese edilirken hücre aktive olduğunda ekspresyonu birden artar. Akış sitometride hücre aktivasyon belirteci özelliği nedeni ile kullanılmaktadır (11, 14, 186).

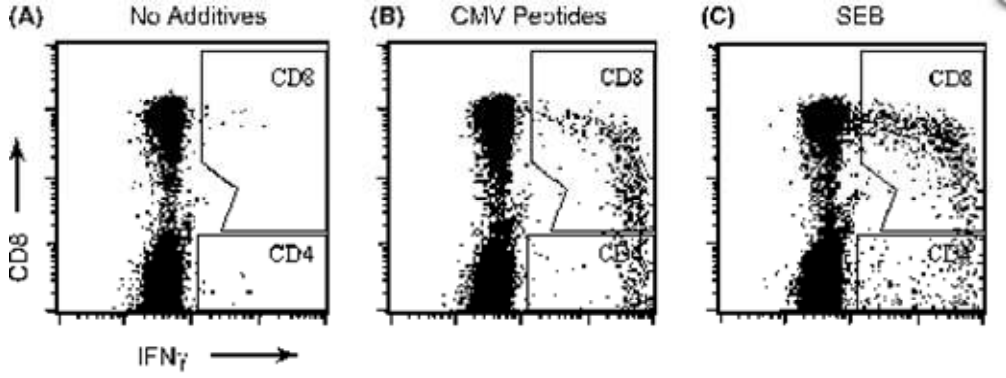
Yöntemde belirttiğimiz diğer değişkenleri de çalıştıktan sonra, testin validasyon çalışmalarına başladık. Bu aşamalar; literatür taraması, reaktiflerin seçimi (antikor, fiksatif, permeabilize ve lize edici solüsyon seçimleri vb.), örnek toplama kriterlerinin belirlenmesi ile testin uygulanabilirliğinin saptanmasıdır. Metod validasyonu ile ilgili parametreleri belirledik. Genel anlamda metod validasyonu parametreleri; kararlılık (stability), özgünlük (specificity), seçicilik (selectivity), kesinlik (precision), tekrarlanabilirlik (repeatability), ara-tekrarlanabilirlik (intermediate repeatability), tekrar üretilebilirlik (reproducibility), doğruluk (accuracy), doğrusallık (linearity), ölçüm aralığı (assay range), tayin limiti (limit of detection), ölçüm limiti (limit of quantitation) ve sağlamlık (robustness) olarak tanımlanabilir. Her yöntemin özel doğası gereği validasyon çalışmasının saymış olduğumuz tüm bu parametreleri karşılaması mümkün değildir. Nitekim hücresel immünite testlerinin validasyonunda tüm parametreler değerlendirilmemektedir. Örneğin, testimizin validasyonunda sonuçların gerçek değere yakınlığını gösteren analitik bir işlem olan “doğruluk” parametresini ifade edemedik. Çünkü doğruluk, yöntemde elde edilmiş olan test sonuçlarının gerçek analit değerine yakınlığıdır ve doğruluk çalışması yeni metod ile daha önce doğruluk çalışmaları yapılan altın standart bir yöntemin karşılaştırılması yapılarak veya sertifikalı referans madde kullanılarak yapılabilir. Hücresel immünite yöntemlerinin validasyonunda precision (kesinlik) parametresi öne çıkmaktadır. Kesinlik, aynı şartlarda ve aynı yöntemle elde edilen sonuçların, birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini, diğer bir deyişle ölçümlerin tekrarlanabilirliğini göstermek için kullanılır. Konvansiyonel immünolojik yöntemlere göre çok daha kompleks olan, çok aşamaları olan ve az karşılaşılan antijenlere karşı T hücre yanıtını bile saptayabilen söz konusu yöntemlerin duyarlılığı çok yüksektir. Bu nedenle bu yöntemler ile güvenilir veri elde etmek için tekrarlanabilirliği iyi olmalıdır (186, 199, 200, 201). $CD4^{+}IFN-\gamma$ T, $CD8^{+}IFN-\gamma$ T ve $CD4^{+}+CD8^{+}IFN-\gamma$ T lenfosit sayılarını saptayacağımız testin validasyonu için intra-assay (gün içi) ve inter-assay (günler arası) çalışmalar yaptık. Testlerimizin CV değerleri; intra-assay testte sırası ile % 10,65, % 14,88 ve % 7,64; İnter-assay testte % 12,58, % 1,21 ve % 8,23’tür (Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.). Değerler olması gerektiği gibi % 15’ten daha düşüktür ve bu değerler

testimizin ‘tekrarlanabilir’liğini göstermektedir. Testimizin tekrarlanabilir olduğunu saptadıktan sonra klinik örnekleri çalışmaya başladık.

Testlerin internal kontrolünde, pozitif kontrol (mitojen ile stimülasyon) ve negatif kontrol (stimüle edilmemiş örnek) kullanıldı. T lenfosit aktivasyonu çalışmalarında, stimülatör olarak phytohemagglutinin, Conconoalin A, Staphylococcus Enterotoksin B ya da Pokeweed kullanılmaktadır (72, 114, 174, 175, 176, 177). Bizim kullandığımız Pokeweed, *Phytolacca americana* bitkisinden elde edilen bir mitojendir.

Mitojen kullandığımız pozitif kontrol tüpündeki örnekte lenfosit stimülasyonu olmaz ise bu pre-analitik süreçte hatadan kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca hastada yoğun immün supresyon sonucu çok düşük lenfosit olasılığı da bir etken olabilir. Bu durum hücresel immünite yönteminin antijen çeşitliliği ve özgüllüğü ile de ilişkili olabilir. Kumar ve ark. (188) 108 transplantasyon hastasının CMV immünite değerlerini Quantiferon yöntemi ile araştırdıklarında, % 30’unda mitojen stimülasyonuna yanıt alamadıklarını belirtmişlerdir. Bunun nedeni, Quantiferon CMV testinde kullanılan peptid kombinasyonunu ile yaygın olmayan HLA tipinde olan hastalardan yanıt alınamamasıdır (172). Bizim çalışmamızda mitojene yanıt alamadığımız örnek olmadı. Dolayısı ile CD4⁺IFN- γ T ya da CD8⁺IFN- γ T saptayamadığımız örnekleri ‘pre-analitik’ bir hata olarak değerlendirmedik.

Negatif kontrol örneği ile yöntemin özellikle boyama ve yıkama aşamalarının kalite kontrolü yapılmaktadır. Negatif kontrol örneğinde saptanacak yalancı pozitifliğin nedeni, spesifik olmayan boyanmalardır. Bu durumda test tekrar çalışılmalıdır (Şekil 5.1.) (186).



Şekil 5.1. Negatif (A), test örneği (B) ve pozitif (C) kontroller ile alınan sonuçlar (104).

CMV spesifik CD4⁺T ve CD8⁺T hücrelerinin multifonksiyonel yanıtı, viral enfeksiyonun etkin kontrolü anlamına gelir. IFN- γ sıklıkla CD8⁺ T lenfositler, CD4⁺T lenfositlerin alt grupları olan Th₁ ve Th₀ ve NK hücrelerin aktivasyonları ile üretilir. IFN- γ , antitümör ve antiviral aktiviteli multifonksiyonel immünomodulatördür. İmmün ve enflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde görev alan bir sitokindir. Ayrıca monositlerin farklılaşmasında ve fonksiyonlarında da görev alır. Dolayısı ile CD4⁺IFN- γ T ve CD8⁺IFN- γ T hücreleri hücrel bağışık yanıtın fonksiyonel imzalarıdır (178).

Araştırmamızın temel amacı CMV hücrel immünitenin sitokin akış sitometri ile ölçüm yöntemini optimize ve valide etmek olduğundan, primer enfeksiyonu geçirip hafıza hücreleri mevcut olanlarda çalışmayı planladık. Bu nedenle optimizasyon ve validasyon çalışmalarını CMV IgG (+) (CMV seropozitif) olduğunu bildiğimiz örnekler ile gerçekleştirdik. Hasta grubumuz ve vericilerimizin tümü CMV Ig G (+) idi (:D+/R+). Seropozitif bireylerde CMV antijenlerine *ex vivo* yanıt bakıldığında, lenfosit proliferasyonunun olması beklenen bir bulgudur. CMV antikor titresi ile hücrel immün yanıt sayısal değerleri arasında anlamlı ilişki saptamadık (Çizelge 3.2. ve 3.3.) (Alıcılar için sırasıyla p=0,084, p=0,066, p=0,902. Vericilerimizin tümü için p>0,05).

CMV ile daha önceden karşılaşmış olan kontrol grubunun ve alıcıların nakil öncesi CMV spesifik CD4⁺IFN- γ T, CD8⁺IFN- γ ve CD4⁺+CD8⁺IFN- γ ⁺ T lenfosit sayı değerleri karşılaştırıldığında fark olmadığını belirledik (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5.). Hücrel bağışık yanıt elemanlarının CMV spesifik IFN- γ yanıtlarında cinsiyet ve yaş faktörünün bir etken olup olmadığını incelediğimizde,

gerek kontrol gerekse hasta grubunda bir fark olmadığını saptadık (Bulgular 4.2. bölümde verilmiştir).

Viral enfeksiyonların erken ve geç dönem bağışık yanıtında hafıza T hücrelerinin önemi uzun yıllardır bilinmektedir. Quinnan ve ark. (205), 1980'li yılların başında CMV spesifik sitotoksik T hücre yanıtı ile CMV enfeksiyonundan korunma arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Seropozitif alıcılarda CMV enfeksiyonu geçirme riski, seronegatiflere göre daha azdır. Özellikle transplantasyon sonrası profilaksi uygulayan merkezlerde CMV enfeksiyonu sorunu çok azalmıştır. Ancak bu grup hasta için geç CMV enfeksiyonu sorunu ve ilaç yan etkileri göz önünde bulundurulması gereken noktalardır. Harvala ve ark. (192), geniş bir seride (2006-2009 yılları arasında 224 böbrek, 204 KC nakil hastası), transplantasyon sonrası ilk birinci yıl içerisinde CMV hastalığı gelişmesi ile mortalite ilişkisini değerlendirmişlerdir. Böbrek ve KC nakil hastalarının serolojileri: % 23 ve % 28' i D+/R+; % 19 ve % 26' sı D-/R+; diğerleri D-/R- olup sadece seronegatif alıcılara profilaksi (ilk 100 gün valgansiklovir) uygulanmıştır. Seropozitif alıcılar preemptif yaklaşım ile izlenmiştir. CMV enfeksiyonu gelişen seropozitif böbrek transplant alıcılarında mortalite oranı (% 30), CMV enfeksiyonu geçirmeyenlere göre (% 2.6) anlamlı derecede ($p=0.0245$) yüksek bulunmuştur. Karaciğer transplantasyonu yapılan ve CMV enfeksiyonu geçiren hastaların da % 42.8' i kaybedilmiştir. Diğer taraftan, 'CMV immün yanıt suş spesifiktir ve o suşa karşı gelişmiş CMV bağışık yanıt farklı suşlara karşı koruyucu olmayabilir' bilgisi ile seropozitif hastaları değerlendirilirken reaktivasyon yanı sıra, reenfeksiyon riski de dikkate alınmalıdır. Dolayısı ile özellikle seropozitif -profilaksi uygulanmayan- hastaların etkene yönelik testler yanı sıra immün yanıtlarının dikkatle izlenmesi; geleneksel tanı yöntemlerine ek yeni 'bio marker' ların klinik uygulamaya girmesi önerilmektedir. CMV immünite testlerinin uygulanması aşağıdaki sorulara yanıt bulmamızda yardımcı olacaktır (172).

1- Transplantasyon sonrası anti viral profilaksi alan hastalarda geç dönem CMV enfeksiyonu riski nedir?

2- Düşük düzeyde viremisi olan hastalarda vireminin kendiliğinden düzelmesi ya da hastalık gelişme riski nedir?

3- CMV hastalığı tedavisi tamamlandıktan sonra tekrarlayan viremi riski nedir?

Transplantasyon hastalarında CMV spesifik hücresel immünite araştırmaları Çizelge 5.1.'de özet olarak verilmiştir (2, 78, 104, 114, 115, 118, 187, 188, 189, 191, 202, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213).

Çizelge 5.1. Transplantasyon hastalarında CMV spesifik hücresel immünite araştırmaları

Kaynak (Yayın yılına göre sıralanmıştır)	Hasta (n) CMV serolojisi	Çalışma protokolü	Yöntem	Bulgular
Gratama ve ark. 2001 (202)	Kök hücre tx n:27 D+/R+ n:5 D+ / R- n:13 D- /R- n:9	Post tx bir yıl süre ile	Tetramer akış sitometri	CD8 ⁺ T 10 hücre/ µl Anlamlı
Sester M ve ark. 2001 (114)	Böbrek tx n:76 R + %100	Pre-tx, post tx 2,6,12.aylar	Viral lizat ile stim./ CFC	CD4 ⁺ T hücre sayısı CMV viral yük ile ters orantılı
Özdemir ve ark. 2002 (210)	Kök hücre tx n:87	Tx sonrası ilk 3 ay	HLA peptid tetramer CFC	CMV reaktivasyonu kontrolünde CD8 ⁺ yanıtı anlamlı

Çizelge 5.1. (Devam) Transplantasyon hastalarında CMV spesifik hücresel immünite araştırmaları

Kaynak (Yayın yılına göre sıralanmıştır)	Hasta (n) CMV serolojisi	Çalışma protokolü	Yöntem	Bulgular
Bunde ve ark. 2005 (189)	Kalp ve KC tx n:27 R + %100	Post tx 2 yıl haftalık,aylık izlem	Pp65 ve IE-1 ile stim. CFC	Post tx 2.haftada IE- 1 spesifik CD8 ⁺ T yanıtı anlamlı
Sester U ve ark. 2005 (115)	Solid organ tx n:96 R + %100	Post tx 6.ay	Viral lizat ile stim. CFC	Düşük düzey CMV sp. CD4 ⁺ T, viremi ile orantılı En düşük T hücre yanıtı AC tx lerde
Radha ve ark. 2005 (104)	Böbrek tx n:33 D+/R+ % 73 D+ / R-% 9 D- /R- %18	Post tx herhangi bir zaman	Pp65 ve IE-1 ile stim. CFC	CD8 ⁺ T yanıtı serolojik durumla ilişkili
Gerna ve ark. 2006 (118)	Solid organ tx n:38 R+ %100	Post op 6.aya kadar aylık,sonra 9.ve 12.ay	CMV infekte immatür dendritik hc. ile stim. CFC	Viremiden korunmada belirleyici cut off: 0.4 hücre /µl
Egli ve ark. 2008 (2)	Böbrek tx n:23 D+/R+ % 66 D+ / R-% 34	Post op 4.aya kadar 2 haftada bir,sonra6 aya kadar aylık	Viral lizat, pp65,pp72 ile stim. CFC	Viremili hastalarda pp65 CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ yanıt daha az,CD ⁴ >%0.03 iseanlamlı

Çizelge 5.1. (Devam). Transplantasyon hastalarında CMV spesifik hücresel immünite araştırmaları

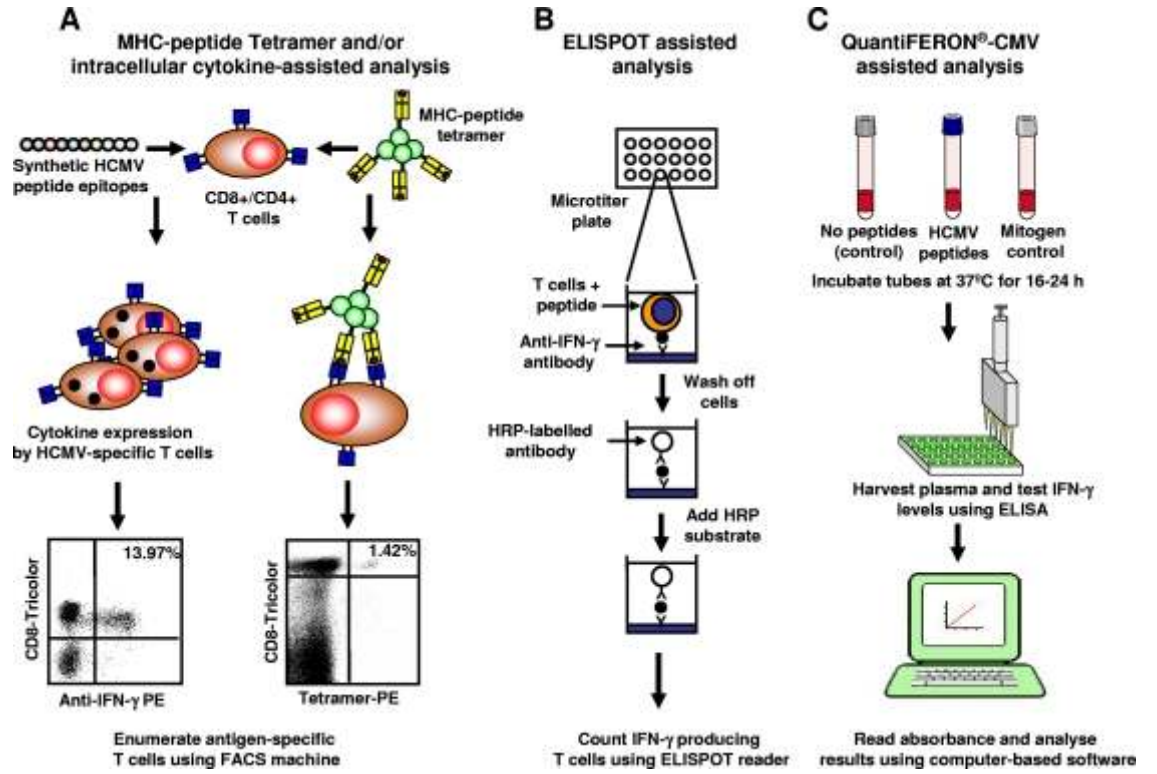
Kaynak (Yayın yılına göre sıralanmıştır)	Hasta (n) CMV serolojisi	Çalışma protokolü	Yöntem	Bulgular
Kumar ve ark. 2009 (188)	Solid organ tx n:108 D+/R+ % 68 D+ / R-% 32	Proflaksi tamamlandıktan sonra 4 ay ayda bir	Quantiferon	Saptanabilir IFN- γ yanıtı olanlarınCMV enf.riski az
Eid ve ark. 2010 (191)	Böbrek n:44 D+/R+ % 68 D+ / R-% 32	İlk 3 ay 2 haftada bir, sonra 4-6.ve 12.ay	Viral lizat, p65 ve IE-1 ile stim. CFC	R+ lerde 1 viremi, R - lerdeCD4 ⁺ ve CD8 ⁺ yanıt anlamli değil
Sund ve ark. 2010 (187)	Böbrek n: 17 R+%(100	Post op 1 yıl aylık izlem	Pp65 HLA peptid tetramer	2.ay: CD4 ⁺ IFN γ oranı viremi kontrolünde anlamli
Lee ve ark. 2011 (213)	Böbrek tx n:40 HLA-A2 HLA-A24	A*02NLV A*24QYD ile boyama	HLA peptid tetramer	A*02NLV pentamer İle izlem daha iyi Ama CMV riski tanımlanamadı
Gerna ve ark. 2011 (78)	Solid organ tx n:134 D+/R+ % 87 D+ / R-% 13	Post tx 6.aya kadar aylık,sonra 9 ve 12.ayda	CMV enfekte immatür dendritik hc. ile stim. CFC	CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ hücre sayısı 0.4 / μ l fazla ise CMV hastalığına karşı koruyucu

Çizelge 5.1. (Devam). Transplantasyon hastalarında CMV spesifik hücrel immünite araştırmaları

Kaynak (Yayın yılına göre sıralanmıştır)	Hasta (n) CMV serolojisi	Çalışma protokolü	Yöntem	Bulgular
Abate ve ark. 2012 (206)	Kalp tx n:48 R+%100	Post tx 100.gün	Pp65 ile stim. ELISPOT	SFU < 50 /200 00 hücre anlamlı
Lisboa ve ark. 2012 (207)	Solid organ tx n: 37 D+/R+ % 87 D+ / R-% 13	Viremi başlangıcında	Quantiferon	Pozitif sonucu olanlarda viremi spontan düzeldi
Patel ve ark. 2012 (208)	SOT n: 9 D+/R+ % 60 D+ / R-% 10 D- / R- %30	Post tx 1,3,6.aylar	Pp65 ile stim. CMV spesifik IFN- γ	Hasta sayısı çok az,çocukluk yaş grubunda değerli bio marker
Gratama ve ark 2012 (209)	Kİ n:83 R+%100	İlk 28-100 gün 2 haftada bir Sonra 2-4 haftada bir,1 yıl	Tetramer akış sitometri	CD8 ⁺ T 7 hücre/ μ l az ise CMV enf. riski
Cantisan ve ark. 2013(211)	AC ve böbrek tx n:55 44 ü R+		ELISPOT	Pretx IFN- γ <0.2 IU / ml olanlarda CMV reaktivasyon riski 10 kez fazla
Shabir ve ark. 2013(212)	SOT n: 569	Retrospektif değerlendirme	Tetramer akış sitometri	CD8 ⁺ T yanıtı D-/R+ D+/R+ gruplarda farklı

Hücresel yanıtın araştırılmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri, peptid-MHC sınıf 1 tetramerleri ile CMV spesifik CD8⁺ T lenfositlerinin akış sitometride saptandığı tetramer bazlı flow sitometri yöntemidir. Bu tekniğin temeli, antijene özgün T lenfositlerinin, MHC-peptid kompleksi-tetramerik molekül ile doğrudan boyanmasıdır. Gratama ve ark (202), 2001 yılında kök hücre alıcılarında tetramer CD8⁺ T hücre sayısının 10 hücre/μl üzerinde olması durumunda CMV hastalığına karşı koruyucu hücresel immüniteden söz edilebileceğini bildirmiştir. Aynı merkez 2010 yılında yayınladığı araştırmada (209), 83 kök hücre alıcısında transplantasyon sonrası CMV spesifik CD8⁺ T lenfosit yanıtını bir yıl izlediklerini ve post transplant ilk 65 gün içerisinde CMV spesifik CD8⁺ T lenfosit sayısının 7 hücre/μl'den az olması durumunda, bu değerin CMV ile ilişkili komplikasyon gelişmesini belirlediğini yayınlamıştır. Hücresel immünitenin daha geç geliştiği grupta, hücresel immünitesi gelişmiş hastalara göre CMV enfeksiyonu gelişme riski 2.6 kez, CMV hastalığı gelişme riski 6.4 kez, fatal komplikasyon gelişme riski ise 2.4 kez daha fazla bulunmuştur.

Tetramer bazlı akış sitometri, HLA spesifiktir ve kullanılan MHC peptid-tetramer paneli yanıtı belirlemede yeterli olmayabilir. Nitekim, Lee ve ark (213), MHC spesifik tetramer flow sitometri yöntemi ile saptanan CD8⁺ T lenfosit yanıtının transplantasyon hastalarında CMV enfeksiyonu riskini belirlemede yeterli olmadığını belirtmişlerdir. Sitokin akış sitometri metodolojisinde, T lenfositleri, fonksiyonlarının son aşamasında -sitokin sentez aşaması-gösterildiğinden daha duyarlı ve özgüldür. Mononükleer hücreler sentetik CMV peptid epitopları ya da viral lizat ile uyarıldıktan sonra sitokin sentezleyen CMV spesifik T lenfositleri hücre içi sitokin boyaması ile gösterilir ve sayısal değer olarak ifade edilir (Şekil 5.1 ve Şekil 3.2.). Özdemir ve ark. (210) tetramer ve sitokin akış sitometri yöntemlerini karşılaştırdıklarında, CMV hücresel bağışık yanıtın değerlendirilmesinde CFC yöntemini üstün bulmuşlardır.



Şekil 5.2. CMV hücresel immünite araştırma yöntemleri (62).

Biz araştırmamızda hücre içi sitokin boyama yöntemini kullandık. Bu yöntemin de hücre aktivasyonu aşamalarında farklılıklar vardır. İmmünite araştırmalarında *ex vivo* olarak, olabildiğince *in vivo* koşullara yakın ortam oluşturmak amaçlanır. Bu amaçla Lozza ve ark. (214) tarafından geliştirilen teknikte, endoteliotropik ve dendrotropik CMV VR1814 suşu ile oluşturulan immatür dendritik hücre enfeksiyonu ardından enfekte hücreler ile lenfosit kültürü sonrası sitokin sentezleyen CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri saptanmaktadır. Bu şekilde T lenfositlerinin *ex vivo* olarak uyarılması, *in vivo* koşullara daha yakın olarak gerçekleştirilmektedir.

Bunde ve ark. (189), standart aminoasitlere ek olarak CMV IE-1 ve pp65 proteinlerini içeren peptid karışımlarını karşılaştırmışlar ve transplantasyon sonrası ilk bir ay içerisinde herhangi bir zamanda IE-1 spesifik IFN-γ⁺CD8⁺ T hücresi % 0.4 üzeri ise CMV hastalığı gelişmediğini saptamışlardır. CMV hastalığından korunmada IE-1 spesifik CD8⁺ T hücre yanıtının izlenmesinin değerli olduğunu vurgulamışlardır. Diğer araştırmalarda ise pp-65 spesifik T

hücre yanıtızlığının -daha az olmasının- CMV hastalığı gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (114, 115, 117, 204).

Hastalarımızın total lenfosit sayıları 3.ayda anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p=0,0047$). 3. ve 6. ay değerleri arasında fark gözlenmedi ($p=0,191$). Yoğun immün supresyonun beklenen bu etkisi, CMV spesifik hücresel immün yanıt üzerine nasıldı (Çizelge 4.5-4.8)? $CD4^+IFN-\gamma$ T lenfositler için yapılan analizde; 3.ay değerinin 1.aydan düşük olduğu ($p=0,003$), 3.ay ile 6.ay arasında fark olmadığı ($p=0,434$) saptandı. $CD4^++CD8^+$ $IFN-\gamma$ açısından değerlendirdiğimizde de 3.ay değerinin 1.aydan daha düşük olduğunu gördük ($p=0,039$). Dolayısı ile immün supresyon, hasta grubumuzun 3. ayda CMV spesifik $CD4^+IFN-\gamma$ T lenfosit ve buna bağılı olarak da $CD4^++CD8^+$ $IFN-\gamma$ T lenfosit sayılarında azalmaya neden olmuştur. “İmmün supresyon protokollerinin farklılıkları hücresel immünite üzerine etkili midir?” sorusuna yanıt aradığımızda (Çizelge 4.9. ve Şekil 4.2.) farklı protokollerin CMV immünitesi üzerinde bir farka neden olmadığını saptadık (tüm değişkenler için $p>0,05$).

Bizim çalışma grubumuzda tüm hastalara profilaksi uygulanmıştı. Synder ve ark. (215) profilaksi uygulanmayan ve valgansiklovir profilaksisi alan akciğer nakil hastalarında pp65 ve IE-1 CMV peptidleri kullanarak her iki grupta CMV spesifik sitokin üretimini araştırdıklarında, sitokin sentez eden $CD8^+$ T hücre popülasyonunda fark saptamamışlardır. Dört hastamız indüksiyon tedavisi almıştı. İndüksiyon tedavisi alan ve almayan hastalarımızın CMV hücresel immünite değerlerinde bir fark saptamadık (Şekil 4.2.)

Bir hastamızda (H27) (Şekil 4.2.), 6. ayda düşük CMV DNA pozitifliği (<150 kopya/ml) saptandı. Klinik yakınma ve bulgular mevcut değildi. Hücresel immünite değerlerine baktığımızda 3. ayda CMV $CD4^+$ T ve $CD8^+$ T yanıtının olmadığı, buna karşın 6. ayda söz konusu değerlerin önceki aylardan daha yüksek olduğu dikkat çekici idi. Hastamızın anti viral profaksi alması yanı sıra, hücresel immün yanıtının düşük olduğu dönemde reaktivasyon olduğu ve hafıza hücrelerinin yanıtı sonucunda CMV replikasyonunun sınırlı kaldığı yorumunu yapıyoruz. Chierrgin ve ark. (216), asemptomatik CMV viremi olan hastaların $CD4^+$ T lenfosit yanıtının semptomatik hastalara göre daha iyi olduğunu, transplantasyon sonrası 6. ayda $CD4^+$ T yanıtının CMV replikasyonundan

korunmada önemli olduğunu vurgulamışlardır. Radha ve ark. (104), seropozitif böbrek transplantasyon hastalarında CMV enfeksiyonu geliştiğinde CD8⁺ T lenfosit yanıtını sağlıklı kontrolden daha iyi olduğunu bulmuşlar ve bunun açıklamasını ‘seropozitif hastaların viral replikasyonu önlemeye çalışmaları’ olarak yapmışlardır. Sağlıklı kontrolden ise CMV spesifik CD4⁺ T lenfosit daha fazla bulunmuştur. İzledikleri 3 seropozitif CMV hastası (yeterli immün yanıt mevcut) tedaviye yanıt vermiş ve viremi bir hafta içerisinde düzelmiştir.

Viral hücresel yanıtı prospektif olarak izleminin amacı alıcılarda CMV hastalığı gelişmeden hemen önce, bu konuda alarm verecek cut off: eşik değerini belirlemektir. Gerna ve ark. (78), eşik değer olarak hem CD4⁺ hem CD8⁺ T lenfositleri için 0.4 T hücre / μ l değerini belirlemişlerdir. Gratama ve ark. (202), kök hücre alıcılarını izlediklerinde CMV spesifik CD8⁺T lenfosit sayısı 0.2-1 x 10⁷ üzeri ise hastaların CMV geçirmediğini saptayarak 1 x 10⁷ ve üzerinde CMV’ye özgül CD8⁺T lenfosit varlığının CMV hastalığına karşı koruyucu olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim düşük viremi saptanan olgumuzun 3. ayda hücresel yanıtının olmaması, reaktivasyon riskinin belirteci olabilir. Profilakside olması replikasyonu önlemiştir. Öte yandan hafıza T hücre yanıtının iyi olması da (6. ay değerleri) replikasyon ve enfeksiyon hastalığının gelişimini önleyen diğer faktördür. D+/R- hasta grubunun tersine bu grup hastalarda (R+) immünolojik hafıza mevcuttur. CMV spesifik hafıza hücrelerinin yoğun immün supresyon sürecinde yeniden yapılanması ya da yapılamaması CMV reaktivasyonun başlamasının belirtecidir (2, 78). Bunde ve ark. (189), solid organ transplant hastalarında CMV IE-1 spesifik CD8⁺ T hücre sayısının % 0.4’ün üzerinde olmasının CMV enfeksiyonundan korunmada eşik değer olduğunu bildirmişlerdir. Dikkatten kaçmaması gereken bir nokta da seropozitif hasta grubunda CMV enfeksiyonu vericinin de seropozitif olduğu durumlarda (D+/R+) reaktivasyon yanı sıra reenfeksiyon şeklinde de seyredebileceğinden CMV hücresel immünite araştırmalarında her bir serolojik durum farklılığının ayrı ayrı araştırılması gerekliliğidir (212).

Transplantasyon grubunda anti viral tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde hücresel immünite izlemi yol gösterici olacaktır. Tedaviye yanıtsızlığın nedeni

anti viral direnç olabileceği gibi hücrel immün yanıtın başarılı bir şekilde yeniden yapılanamaması da olabilir. Nitekim, Radha ve ark. (104), CMV enfeksiyonu gelişen seronegatif üç hastayı tedavi ettiklerinde iki hastada tedaviye hızla yanıt almışlar ancak bir hastada tedaviye yanıtızsızlık söz konusu olunca gansiklovir direnci araştırmışlar ve *UL97 gen* mutasyonu saptamışlardır. Hücrel immün yanıt parametreleri değerlendirildiğinde tedaviye yanıt alınan iki hastada $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfosit yanıtının iyi olduğunu, buna karşın üçüncü hastalarında $CD8^+$ T lenfosit yanıtının olmadığını saptamışlardır. Bu durumda tedavi de anti viralden özgül CMV IgG tedavisine değişmiş ve klinik iyileşme sağlanmıştır. Dolayısı ile hücrel immünitenin izlemi tedavinin yönlendirilmesini de sağlayacaktır.

Hücrel immünite araştırmalarında kullanılan bir diğer yöntem olan ELISPOT yönteminde (Şekil 5.2.), IFN- γ sentez eden özgül T hücreleri araştırılmaktadır. Bizim yöntemimize benzer şekilde, hasta lenfositleri *ex vivo* uyarılmakta, antihuman IFN- γ ile kaplandıktan sonra ELISA esasları çerçevesinde çalışılarak özgül spot oluşturan IFN- γ sentezleyen T hücre sayısı, belli sayıda (genellikle 200.000) mononükleer hücrede ‘spot forming colonies’ (SFC) olarak verilmektedir (171, 172). Sitokin akış sitometride proliferen olan hücrelerin görünümü yanı sıra T hücrelerinin fenotiplemesi yapılması, ELISPOT’a göre avantaj sağlamaktadır (210, 217).

Abate ve ark. (206), seropozitif ve seronegatif, profilaksi ya da preemptif tedavi uygulanan solid organ alıcısını transplant öncesi ve 30., 60., 90., 180., 360. günlerde CMV viral yük ile birlikte ELISPOT testi ile izlemişlerdir. Transplantasyonun birinci yılında CMV spesifik T hücre yanıtını ortalama ‘171 SFC/200.000 lenfosit’ bulurken bu sayının transplant öncesi ‘326 SFC/200.000 lenfosit’ olduğunu dolayısı ile antiviral T hücre yanıtının transplantasyon öncesi düzeye gelebilmesi için bir yıldan fazla zamana gereksinim olduğunu vurgulamışlardır. Seronegatif alıcılarda ise profilaksi sürecinde T hücre yanıtı saptanamamıştır. Bir başka araştırmada, transplantasyon öncesi CMV spesifik IFN- γ saptanamayan hastaların yarısında CMV replikasyonu gelişirken IFN- γ düzeyi 0.2 IU/ml üzerinde olan hastaların sadece % 13.3’ünde CMV replikasyonu saptanmıştır (211).

Quantiferon testinde de tüm kan, CMV stimule eden peptid epitopları ile muamele edilerek T lenfositleri uyarılır ve bu kez sentez edilen IFN- γ ELISA metodolojisi ile kantite edilir (171, 207, 211) (Şekil 5.2.). Kumar ve ark.(188), solid organ transplant hastalarını post-transplant 0, 1, 2, 3. aylarda CMV hücrel immünite açısından Quantiferon-CMV testi ile izlemişler ve saptanabilir interferon-gama (cut-off: 0.1 IU / ml) yanıtı olan hastaların % 5.3'ünde CMV hastalığı geliştiğini, bu oranın interferon-gama saptanamayan grupta % 22.9 olduğunu belirtmişlerdir.

Akış sitometrinin duyarlılık özelliği, çok farklı antijenlere karşı oluşturulabilen hücrel yanıtın saptanmasına olanak sağlamaktadır. CMV aşısı çalışmalarında CMV glikoprotein B'ye karşı CD4⁺ T hücre yanıtı akış sitometri yöntemi ile araştırılmaktadır (218). Dolayısı ile laboratuvarımızda bu yöntem ile çalışıyor olmamız ve eğitim alan kişi sayısının artması bizlerin diğer alanlarda da araştırma yapabilmemize olanak sağlayacaktır.

Akış sitometri viral enfeksiyonların tanısında henüz klinik laboratuvarlarda yerini almamıştır. Yöntemin ayrı ayrı tüm transplantasyon gruplarında, farklı serolojik profillerde ve yaşlarda geniş seriler halinde klinik validasyon çalışmaları yapılmalıdır (208). Yöntemin maliyet hesabında, transplantasyon hastasının tümünden değerlendirmesi göz önünde bulundurulmalıdır. Preemptif strateji uygulayan merkezlerde, hücrel immünitenin izlemi sonucunda, viral yük test sayısı azalacak; profilaksi uygulayan merkezlerde ise anti viral profilaksi maliyeti ve ilaç yan etkileri azalacaktır. Profilaksi uygulanan hastalar için profilaksi bitiminden bir yıla kadar ayda bir immünolojik değerlendirme önerilmektedir. CMV hücrel immün yanıt testlerinin CMV hastalığı tedavi sonrası riski belirlemede de yeri vardır. Antiviral tedavi bitiminde ve sonra üç ayda bir izlem önerilmektedir. Hücrel yanıt çalışıldığında anlamlı-yeterli T hücre yanıtı alınamıyor ise sekonder profilaksi uygulanmalı ve dikkatle izlenmelidir. Yeterli hücrel yanıt saptandı ise tedavi zamanında sonlandırılmakta ve yoğun bir şekilde hücrel immünite izlemine devam edilmesine gerek kalmamaktadır (172).

Profilaksi ve preemptif tedaviler CMV enfeksiyonundan korunmada en önemli köşe taşlarıdır. CMV immünolojik izlem, enfeksiyon için tanısal bir test

olmayıp transplantasyon sonrası CMV enfeksiyon gelişimini öngörmede kullanılacak bir yöntemdir. Unutulmamalıdır ki immünolojik izlem, viral yük testinin yerine geçen tanısal bir test değildir. Viremi ve hastalık riski altındaki hastaları belirlemek amacıyla çalışılır. Bu alanda araştırmaların artması, preemptif yaklaşım protokolleri ve profilaktik tedavi sürelerinin yeniden gözden geçirilmesini sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR

- Sitokin akış sitometri yöntemi ile CMV spesifik CD4⁺IFN- γ T ve CD8⁺IFN- γ T lenfosit testlerinin optimizasyon ve validasyon çalışmalarını tamamladık.
- Kontrol ve hasta grubunda (0.ay) aktivasyon sonrası ölçülen CMV IFN- γ spesifik T lenfosit sayıları bakımından anlamlı fark yoktur.
- Kontrol ve hasta grubu (0.ay) arasında nakil öncesi CMV IgG değerleri bakımından anlamlı fark yoktur.
- Hastaların izleminde, 3.ay CD4⁺IFN- γ T lenfosit sayısının 1.ay CD4⁺IFN- γ T lenfosit sayısından daha düşük olduğunu saptadık.
- Hastaların izleminde, 3.ay CD4⁺+CD8⁺IFN- γ T lenfosit sayısının 1.ay CD4⁺+CD8⁺IFN- γ T lenfosit sayısından daha düşük olduğunu saptadık.
- İmmüsupresyon protokolleri ile periferik kandaki lenfosit sayıları, CD4⁺ IFN- γ , CD8⁺ IFN- γ ve CD4⁺+ CD8⁺IFN- γ T lenfosit sayıları arasında anlamlı ilişki saptanmadı.
- Hastalara uygulanan indüksiyon tedavisinin CMV spesifik IFN- γ üreten T lenfosit sayıları üzerinde etkisi olmadığı görüldü.
- CMV spesifik IFN- γ üretimi ile hastaların yaşları arasında ilişki saptanmadı.
- CMV spesifik IFN- γ üretimi ile hastaların cinsiyetleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

7. ÖZET

SİTOMEGALOVİRÜS SPESİFİK T HÜCRE YANITININ FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU

Human Herpesvirus 5 (HHV-5) olarak tanımlanan insan Sitomegalovirüs (*Cytomegalovirus*:CMV), *Herpesviridae* ailesinin *Betaherpesvirinae* alt ailesinde *Cytomegalovirus* cinsi içerisinde yer alır. CMV, primer enfeksiyondan sonra endotelial hücreler, lökositler ve çeşitli dokularda latent enfeksiyonlara neden olur. Organ naklinde verici CMV seropozitif (D+), alıcı seronegatif (R-) ise nakil alan hastalarda primer CMV enfeksiyonu; CMV seropozitif alıcılarda ise CMV reaktivasyonu ve reenfeksiyon gelişme riski yüksektir. Latent virüs enfeksiyonları transplantasyon alanında immün supresif tedavi ile sağlanan başarıyı olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerdendir. Bu nedenle nakledilen organın reddi hatta hastanın kaybı ile sonlanabilen CMV enfeksiyon hastalığının zamanında saptanması son derece önemli ve gereklidir.

CMV enfeksiyonu tanısında hücre kültürü, histopatolojik inceleme, serolojik testler, moleküler yöntemler, CMV antijenemi testi ve immünolojik testler gibi geniş bir yelpazeye yayılan testler kullanılmaktadır. Hücre kültürü, CMV tanısında altın standart kabul edilse de günümüzde yerini daha hızlı sonuç veren daha az emek ve iş gücü gerektiren testlere bırakmıştır. Nitekim günümüzde solid organ transplant hastalarında CMV enfeksiyonunun belirlenmesinde preemptif tedavi uygulanacak hastaların seçiminde ve tedavinin izleminde moleküler yöntemler ile viral yükün saptanması ve kantitasyonu pratik uygulamada yerini almıştır.

Özellikle immün sistemi baskılanmış olgularda ve latent virüs enfeksiyonlarında konağın etkene yanıtı ya da yanıtızsızlığı klinik tablonun belirlenmesinde anahtar rol oynar. Viral enfeksiyonlardan korunmada özellikle hücresel bağışıklık yanıtının önemi büyüktür ve hafıza CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositler hücresel immünitenin fonksiyonel imzalarıdır. Organ nakil hastalarında, etkenin özellikleri yanı sıra konak immün yanıtının bilinmesi, enfeksiyon hastalığının daha erken saptanmasını, immün supresif tedavinin ve

enfeksiyon tedavisinin monitörizasyonunu sağlayacaktır. Hücresel anti-viral immünite en yaygın olarak ELISPOT, Quantiferon ve akış sitometri yöntemleri ile çalışılmaktadır. Araştırmamızda kullandığımız sitokin akış sitometri yöntemi ile hücreleri büyüklük ve granülaritelerine göre birbirinden ayırmanın yanı sıra fonksiyonlarını da ölçmek mümkündür.

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nin güçlü yanlarından birisi organ naklinde göstermiş olduğu başarıdır. Bu başarı biz laboratuvar bilim dallarına da organ nakil hastalarında enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve izleminde evrensel-bilimsel yaklaşımları takip etmek sorumluluğunu yüklemektedir. Biz de sorumluluğumuzun bilinci ile laboratuvarımızda organ nakil hastalarında virüs spesifik hücresel yanıt araştırmalarına başlamış bulunuyoruz. Araştırmamızda, böbrek nakli yapılmış hastalarda CMV'ye spesifik T hücre yanıtını sitokin akış sitometri yöntemi ile optimizasyon ve validasyonunu ve ardından klinik olguların hücresel immün yanıtlarının monitörizasyonunu planladık.

Bu amaçla Aralık 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli Merkezi tarafından canlı vericiden böbrek nakli planlanan, yaşları 18-66 yıl arası değişen yirmi bir (7 K=kadın, 14 E=erkek) hastadan böbrek nakli öncesi (0.ay) ve nakil sonrası 1., 3. ve 6. aylarda toplam dörder kez örnek aldık. Prospektif araştırma sürecinde on iki hastanın planlanan tüm örnekleri alınmış ancak dokuz hastanın transplantasyon sonrası 6.ay örneklerini almak için projemizin süresi yeterli olamamıştır. Kontrol grubu olarak böbrek nakli planlanan hastaların sağlıklı, CMV seropozitif vericilerinden (24-66 yıl, 10 E ,10 K) örnek alınmıştır.

Çalışmamızın optimizasyon ve validasyon testlerinin tamamlanmasının ardından hastalarımızın ve kontrol grubumuzun testlerini çalıştık. Yöntemimizin ana basamakları, tam kandan periferik kan mononükleer hücre (PKMNH) izolasyonu, dondurulup saklanması, çözülmesi, ardından lenfositlerin CMV peptidleri ile *ex vivo* olarak uyarılması ve CMV spesifik IFN- γ üreten T lenfositlerinin yüzey antijenleri ve hücre içi sitokin boyama sonucunda akış sitometride fonksiyonel ayırım yaparak sayılmasıdır. Elde edilen ana bulgular IFN- γ üreten CMV spesifik CD4⁺, CD8⁺ ve toplam (CD4⁺+CD8⁺) T lenfosit yüzdeleridir. Hastanın periferik kanlarındaki lenfosit sayılarıyla bu değerler

oranlanarak periferel kanlarında bulunan CMV spesifik IFN- γ üreten T lenfosit sayısı hesaplanmıştır ve değerlendirmeler bu sayılar üzerinden yapılmıştır.

Tüm hastalar ve kontrol grubu için yapılan testler tamamlandıktan sonra elde edilen bulgular değerlendirildiğinde nakilden sonraki 3.ayda ölçülen periferel kan lenfositlerinin 1.ay değerlerinden anlamlı oranda düşük olduğu görülmüştür. CMV spesifik CD4⁺ 1.aydan da 3.aya (p=0,003) doğru anlamlı oranda azalma gösterdiği; diğer gruplar arasında anlamlı fark olmadığı saptanmıştır. CMV spesifik CD4⁺ +CD8⁺ T lenfosit 3.ay değerinin 1.aya göre anlamlı oranda (p=0,039) azaldığı belirlenmiştir.

Hastaların nakil öncesinde test edilen CMV IgG değerlerinin, yaşlarının, cinsiyetlerinin, hastalara uygulanan immün supresyon ve indüksiyon tedavilerinin IFN- γ salınımı yapan CMV spesifik T lenfositler üzerinde anlamlı etkilerinin olmadığı görülmüştür. 6.ay örneğinde düşük düzeyde viremi saptanan olgumuzun 3. ayında CMV hücresel immün yanıtının olmadığı, 6 ayda ise yüksek düzeyde CMV spesifik IFN- γ salınımının mevcut olduğu izlenmiştir.

Sonuç olarak biz bu çalışma ile hastanemizde ve Türkiye’de ilk defa uygulanan, flow sitometrik yöntem ile böbrek nakli hastalarında CMV spesifik T hücre kantitasyonu yaptık. Optimizasyon ve validasyon çalışmalarımız sonucunda gördük ki altı aylık dondurulma süresinde virüs spesifik T hücre yanıtı kantitasyonu olumsuz etkilenmemektedir. Bu çalışma sadece solid organ transplantasyonu değil kemik iliği transplantasyonu alanında da yapılacak olan daha geniş kapsamlı çalışmalara öncü olacaktır.

Anahtar sözcükler: CMV spesifik T lenfosit, Flow sitometri, IFN- γ , Solid organ transplantasyonu, Validasyon.

8. ABSTRACT

OPTIMIZATION OF CYTOMEGALOVIRUS SPECIFIC T CELL RESPONSE VIA FLOW CYTOMETRY

Human Herpesvirus 5 (HHV-5) which is defined as the human *Cytomegalovirus* (CMV) is located in *Herpesviridae* family of the *Betaherpesvirinae* genus of the *Cytomegalovirus* species. After the primary infection, CMV causes latent infections in endothelial cells, leukocytes and various tissues. In organ transplantation, if donor is CMV seropositive (D+) and the recipient is seronegative (R-), the risk of the primary CMV infection is high in transplant patients and the risk of CMV reactivation and re-infection is high in CMV-seropositive recipients. Latent virus infections are the most important factors that adversely affect the success which is provided by immunosuppressive therapy in transplant. For this reason, timely detection of CMV infection disease which causes the loss of the transplanted organ rejection and even patients is extremely important and required.

The cell culture, histopathological examination, serological tests, molecular methods, CMV antigenemia test and immunological tests are used in a wide range in the diagnosis of CMV infection. Although cell culture that is considered the gold standard in the diagnosis of CMV gave place to more rapid and less labor-intensive tests. Thus in the present day, detection of viral load and quantity with molecular methods has taken place in determination of CMV infection in solid organ transplant patients, the selection of patients to be applied in determining the preemptive treatment and follow-up of the treatment.

Especially in immunosuppressive patients and latent virus infections, the presence of host response or absence of host response play a key role in determining the clinical condition. The cellular immune response has especially a great function in the prevention of viral infections, and memory CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes are the functional signatures of cellular immunity. In organ transplant patients, the properties of the agent as well as the characteristic of host immune response will provide early detection of infectious disease, monitoring of

immunosuppressive therapy and the treatment of the infection. Cellular immunity tests are studied by ELISPOT, Quantiferon and flow cytometry methods. It is possible to evaluate the cells according to size and granularity as well as measure functions by cytokine flow cytometry method which is used in our study.

One of the strengths of the Mediterranean University Hospital is the success in organ transplantation. This success also gives a responsibility to the laboratory sciences to follow universal-scientific approach in the diagnosis and follow-up of infectious diseases in organ transplant patients. With a sense of responsibility, we have begun viral-specific cellular response research in organ transplant patients in our laboratory. In our study, we have planned the optimization and validation of CMV-specific T-cell response in renal transplant patients with cytokine flow cytometry method and then planned the monitoring of cellular immune responses of clinical cases.

To this end, totally for four times we have taken samples before kidney transplantation (0. month), and post-transplant 1st , 3rd and 6th months from twenty-one patients between the ages of 18 and 66 years whom were planned by Mediterranean University Organ Transplantation Center for live-donor kidney transplantation between dates December 2012 - August 2013. During prospective research process all planned samples were collected from twelve patients but we were unable to collect post-transplant 6. months samples from nine patients since. As a control group, healthy CMV-seropositive kidney donors (24 to 66 years, 10 males, 10 females) were used.

After completing the optimization and validation process we have studied the tests of patient and control groups.

The main stages of our procedure are, isolation of peripheral blood mononuclear cells from whole blood (PBMC), freezing and storing the samples, thawing samples, *ex vivo* stimulation of lymphocytes with CMV peptides and counting by flow cytometry after functional separation as a result of CMV-specific IFN- γ -producing T cell surface antigens and intracellular cytokine staining. Main findings obtained from the flow cytometry is IFN- γ -producing CMV-specific CD4⁺, CD8⁺ and total (CD4⁺ + CD8⁺) T-lymphocyte percentages. These values and the patient's peripheral blood lymphocyte numbers

were proportioned and so CMV-specific IFN- γ -producing T-lymphocyte number was calculated in peripheral blood and evaluations were made via these numbers.

According to obtained findings after completing all tests for patient and control groups, we showed that post-transplant 3rd month peripheral blood lymphocyte values were significantly lower than post-transplant 1st month peripheral blood lymphocyte values. CMV-specific CD4⁺ lymphocytes were significantly decreased ($p=0,003$) in post-transplant 3rd month compared to post-transplant 1st month, and no significant difference was observed between other groups. Third month CMV-specific CD4⁺+CD8⁺ T lymphocytes were significantly decreased ($p=0,039$) compared to 1st month value.

Patients' CMV IgG values before transplantation, age, gender, immunosuppressive and induction therapies administered to patients did not have any significant effect on IFN- γ secreting CMV-specific T-lymphocytes. We observed that the one case whom had low level of viremia in the 6th month sample had no cellular immune response to CMV and had high level of CMV-specific IFN- γ secretion in six months.

In conclusion, with this study, the first time in our hospital and Turkey, we quantitated CMV specific T cells in kidney transplant patients through cytokine Flow cytometry. Our optimisation and validation experiments showed that freezing and storing samples up to six months does not have any quantitative effect on the virus specific T cells. The results of this study will lead to more comprehensive studies in not only solid organ but also in bone marrow transplantation patients.

Key words: CMV specific T lymphocyte, Flow cytometry, IFN- γ , Solid tissue transplantation, Validation.

9. KAYNAKLAR

1. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol* 2008;196(2):65-73.
2. Egli A, Binet I, Binggeli S, Jäger C, Dumoulin A, Schaub S, et al. Cytomegalovirüs-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med* 2008;9;6:29.
3. Cordero E, Casasola C, Ecarma R, Danguilan R. Cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: incidence, clinical profile and risk factors. *Transplant Proc* 2012;44(3):694-700.
4. Çolak D, Mutlu D. Herpesvirüsler. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (editörler), *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji kitabında*. Ankara: Güneş Kitabevi 2004:113-144.
5. Çolak D. Betaherpesvirüs enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı. *Antiviral Tedavi Serisi*, 2007.
6. Greijer AE, Van de Crommert JMG, Stevens SJC, Middeldorp JM. Molecular fine-spesifity analysis of antibody response to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays. *J Clin Microbiol* 1999;37:179-188.
7. Çelik DG. Ateroskleroz gelişiminde cytomegalovirüs (CMV)'nin rolü ve cytomegalovirüs gen 5 (cig 5)/viperin ekspresyonunun saptanması. Yüksek lisans tez çalışması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2012.
8. Çolak D. Cytomegalovirus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı. *KLİMİK* 2007 XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Sayfa 257-260.
9. Çolak D, Ögünç D. Sitomegalovirüs enfeksiyonlarında tanı yöntemleri. *Flora*1999; 4:82-89.
10. Yılmaz T. Cytomegalovirüs viral yükünün monitorizasyonunda pp65 antijenemi ve PCR ile kantitatif CMV DNA tayininin karşılaştırılması. Yüksek lisans tez çalışması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2011.
11. Özdemir H, Artaç H. Akım sitometri ve temel özellikleri. *Selçuk Pediatri* 2013;1(1):12-51.
12. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from stanford. *Clin Chem* 2002; 48:809–817.
13. Arpacı E, Beşışık SK. Hematopoetik kök hücre nakli ve sitomegalovirüs enfeksiyonu: değişen klinik, tanı ve tedavi. *İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 70(2):051-055.

14. Maecker HT, Maino VC. Analyzing T-cell responses to cytomegalovirus by cytokine flow cytometry. *Hum Immunol* 2004;65(5):493-9.
15. Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2007; 5(2):75-82.
16. Streblow DN, Nelson JA. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol* 2003;11(7):293-5.
17. Günhan C: Cytomegalovirüs enfeksiyonları. In: Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M(eds): *İnfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 2002;1190-7.
18. Hodinka RL. Human Cytomegalovirüs In: Murray PR , Baron EJ , Pfaller MA Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH, (eds). *Manual of Clinical Mikrobiyoloji* (9th ed). American Society for Microbiology, Washington D.C; 2007;1549-1563.
19. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 2004;78:10960–10966.
20. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S(eds). Herpesvirüsler. In: Çolak D, Mutlu D(eds). *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Güneş Kitabevi, Ankara; 2004.p.113-144.
21. Mocarski, E. S., Jr., T. Shank, and R. F. Pass. Cytomegaloviruses, In: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed. vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; 2007.p.2701–2772.
22. Söyletir G: Herpes virüslerin Genel Özellikleri. In: Topçu WA, Doğanay M(eds), *İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 2002.p.1174-1176.
23. Bilgiç A .Özacar T. İnsan Sitomegalovirüs. Ustaçelebi S (ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* .Güneş Kitabevi, Ankara; 1999.p.835-843.
24. Mocarsky ES. Cytomegalovirüs and their replication. In: Fields BN ,Knipe DM,Howley PM (eds). *Fields Virology* ,Lippincott-Roven Publishers, Philadelphia; 1996.p.2447-92.
25. Stinski MF. Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol* 1978;26:686–701.
26. Ustaçelebi S. CMV'un Özellikleri ve Epidemiyolojisi. 1.Ulusal CMV Sempozyumu Tanı ve Tedavi Yaklaşımları: Sorunlar ve Çözümleri, Antalya 2001; 9-18.
27. Başustaoglu A. İnsan Herpesvirüsleri. In: Mutlu E, Baysan BÖ, Çolak D. (eds), *Tıbbi Mikrobiyoloji*,6. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara; 2010.p.517-540.
28. Girifiths PD, Emery VC: Cytomegalovirüs. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG(eds): *Clinical Virology*. ASM, Washington DC; 2002.p.433-63.

29. Serter D. Virüs, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları. Nobel Matbaacılık; 1997.p.141-145.
30. Crumpacker CS: Cytomegalovirüs. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell,Douglas and Bennett's. Principles and Practise of Infectious Diseases. 5th, Churchill Livingstone Philadephia; 2000.p.1586-99.
31. Ustaçelebi Ş. İnsan Sitomegalovirüsü. In: Bilgiç A, Özacar T. (eds), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara; 1999.p.835-841.
32. Ataman S, Çolak D, Günseren F, Çolak T, Aktekin MR, Gültekin M. Investigation of cytomegalovirus seroepidemiology in Antalya with a population-based cross-sectional study and review of related data in Turkey. Mikrobiyol Bul 2007;41:545-55.
33. Toppare M, Öztürk O, Kitapçı F, Şenses D, Kaya S, Dilmen U. Türkiye’de 4-12 yaş grubu çocuklarda ELISA methodu ile Sitomegalovirüs antikorlarının araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni 1994;28:166-9.
34. Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus.In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields Virology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 1996.p.2493-2523.
35. Murphy PM. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. Nat Immunol 2001;2:116-22.
36. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T lymphocytes response to cytomegalovirüs after human allogenic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirüs infection and disease. Blood 1991;78:1373-80.
37. Kılınç A. Klinik örneklerden izole edilen cytomegalovirüs (CMV) suşlarının genotiplerinin araştırılması. Tıpta uzmanlık tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 2010.
38. Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. J Virol 1999;73:4806–4812.
39. Sinclair J, Sissons P.Latency and reactivation of human cytomegalovirüs. J Gen Virol 2006;87:1753–1769.
40. Soderberg C, Larsson S, Bergstedt-Lindqvist S, Moller E. Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. J Virol 1993;67:3166–3175.
41. Mendelson M, Monard S, Sissons P, Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. J Gen Virol 1996;77:3099–3102.
42. Senechal B, Boruchov AM, Reagan JL, Hart DN, Young JW. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. Blood 2004;103:4207–4215.

43. Grefte AM, van der Giessen W, van Son TH. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 1993;167:270–277.
44. Sinzger C, Grefte CA, Plachter B, Gouw As, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 1995;76:741–750.
45. Sissons JG, Bain M, Wills MR. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect* 2002;44:73–77.
46. Maecker HT, Maino VC. Analyzing T-cell responses to cytomegalovirus by cytokine flow cytometry. *Hum Immunol* 2004;65(5):493-9.
47. Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11879–11883.
48. Kondo K, Mocarski ES. Cytomegalovirus latency and latency specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scand J Infect Dis Suppl* 1995;99:63–67.
49. Jenkins C, Abendroth A, Slobedman B. A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J Virol* 2004;78:1440–1447.
50. Bego M, Maciejewski J, Khaiboullina S, Pari G, St. Jeor S. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J Virol* 2005;79:11022–11034.
51. Cantrell SR, Bresnahan WA. Interaction between the human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) and hDaxx regulates immediate-early gene expression and viral replication. *J Virol* 2005;79:7792–7802.
52. Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16255–16260.
53. Goodrum F, Reeves M, Sinclair J, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote latent infection in vitro. *Blood* 2007;110:937–945.
54. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Cytomegalovirüs. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2008.p.1679-1689.
55. Kutza AS, Muhl E, Hackstein H, Kirchner H, Bein G. High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis* 1998;26:1076–1082.
56. Mutimer DJ, Shaw J, O'Donnell K, Elias E. Enhanced (cytomegalovirus) viral replication after transplantation for fulminant hepatic failure. *Liver Transpl Surg* 1997;3:506–512.

57. Prosch S, Wendt CE, Reinke P, Priemer C, Oppert M, Kruger DH, et al. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 2000; 272:357–365.
58. Fietze E, Prosch S, Reinke P, Stein J, Docke WD, Staffa G, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* 1994;58:675–680.
59. Prosch S, Staak K, Stein J, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, Kruger DH. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappaB. *Virology* 1995;208:197–206.
60. Stein J, Volk DH, Liebenthal C, Kruger DH, Prosch S. Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J Gen Virol* 1993;74:2333–2338.
61. Kline JN, Hunninghake GM, He B, Monick MM, Hunninghake GW. Synergistic activation of the human cytomegalovirus major immediate early promoter by prostaglandin E2 and cytokines. *Exp Lung Res* 1998;24:3–14.
62. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1):76-98.
63. Burmester GR, Pezzutto A. Fundamental principles. In: *Color Atlas of Immunology*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany; 2003.p.3.
64. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by Toll like receptors. *J Virol* 2004;78:7867–7873.
65. Delale T, Paquin A, Asselin-Paturel C, Dalod M, Brizard G, Bates EE, et al. MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J Immunol* 2005; 175:6723–6732.
66. Hokeness-Antonelli KL, Crane MJ, Dragoi AM, Chu WM, Salazar-Mather TP. IFN- α -mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2007;178:6176–6183.
67. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3516–3521.
68. Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HR, Beckman DL, Blattenberger EA, et al. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 2001;292:934–937.
69. Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 1985;161:40–52.

70. Polic B, Hengel H, Krmpotic A, Trgovcich J, Pavic I, Luccaroni P, et al. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 1998;188:1047–1054.
71. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Wallace CR, Gibbons AE, Smart YC, Burton RC, Shellam GR. The effect of the *Cmv-1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol* 1992;149:581–589.
72. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A, La Vista AB, Shellam GR. *Cmv-1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med* 1990;171:1469–1483.
73. Venema H, van den Berg AP, van Zanten C, van Son WJ, van der Giessen M, The TH. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1994;42:188–192.
74. Hadaya K, De Rham C, Bandelier C, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, et al. Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:2674-2683.
75. Sternm H, Elsässer H, Hönger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008;8:1312-1317.
76. Boppana SB, Britt WJ. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 1995;171:1115–1121.
77. Jonjic S, Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* 1994;178:1713–1717.
78. Gerna G, Lilleri D, Furione M, Baldanti F. Management of human cytomegalovirus infection in transplantation: validation of virologic cut-offs for preemptive therapy and immunological cut-offs for protection. *New Microbiol* 2011;34(3):229-54.
79. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:925135.
80. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009;9(12):833–844.
81. Daniels MA, Teixeira E, Gill J. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 2006;444(7120):724–729.

82. Aktaş E. Lökosit yüzey molekülleri. In: Deniz G, Yılmaz MT, Yıllar G, editors. Flow sitometri ve tıpta kullanımı. İstanbul: Bilmedya Grup; 2004.p.31-42.
83. Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17(5):349–366.
84. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 2005;115(6):1616–1626.
85. Williams MA, Tynnik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* 2006;441(7095):890–893.
86. Wuest TY, Willette-Brown J, Durum SK, Hurwitz AA. The influence of IL-2 family cytokines on clinical and developmental immunology activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2008;84(4):973–980.
87. Chiang EY, Kolumam GA, Yu X. Targeted depletion of lymphotoxin- α -expressing T H 1 and T H 17 cells inhibits autoimmune disease. *Nat Med* 2009;15(7):766–773.
88. Suen WE, Bergman CM, Hjelmstrom P, Ruddle NH. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1997;185(8):1233–1240.
89. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 2006;16(1):3–10.
90. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells. *Cell* 2006;126(6):1121–1133.
91. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(2):155–174.
92. Korn T, Bettelli E, Gao W. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T H17 cells. *Nature* 2007;448(7152):484–487.
93. Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005;5(9):688–698.
94. Chen W, Jin W, Hardegen N. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;197(12):1875–1886.
95. Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The family of IL-10-secreting CD4⁺ T cells. *Adv Immunol* 2010;105:99–130.

96. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R et al. Foxp3+CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8–27.
97. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008;179(9):5771–5777.
98. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011;29:71–109.
99. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;189(7):995–1004.
100. Jutel M, Akdis C. T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy* 2008;94:158–176.
101. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T Cells: lineage and location. *Immunity* 2009;30(3):324–335.
102. Kansu E. Viral immünolojiye genel bakış. *ANKEM Derg* 2007;21(ek):67-70.
103. Roitt IM, Delves PJ, Ilıman MN, Yıldız M. Roitt's Temel İmmünoloji. 11.baskı. İstanbul: Atlas Kitapçılık; 2008.p.34.
104. Radha R, Jordan S, Puliya D, Bunnapradist S, Petrosyan A, Amet N, Toyoda M. Cellular immune responses to cytomegalovirüs in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005;5:110–117.
105. Reusser P, Cathomas G, Attenhofer R, Tamm M, Thiel G. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virüs load. *J Infect Dis* 1999; 180:247–253.
106. Crough T, Burrows JM, Fazou C, Walker S, Davenport MP, Khanna R. Contemporaneous fluctuations in T cell responses to persistent herpes virus infections. *Eur J Immunol* 2005;35:139–149.
107. Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N, et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* 2000;74:8140–8150.
108. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol* 2004;173:7481–7489.
109. Elkington RS, Walker T, Crough M, Menzies J, Tellam M. Ex vivo profiling of CD8⁺T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* 2003;77:5226–5240.

110. Manley TJ, Luy L, Jones T, Boeckh M, Mutimer H, Riddell SR. Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8⁺ cytotoxic T-cell response in natural infection. *Blood* 2004; 104:1075–1082.
111. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005;202:673–685.
112. Day EK, Carmichael AJ, ten Berge IJ, Waller EC, Sissons JG, Wills MR. Rapid CD8⁺ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J Immunol* 2007;179:3203–3213.
113. Price DA, Brenchley JM, Ruff LE, Betts MR, Hill BJ, Roederer M, et al. Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8⁺ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J Exp Med* 2005;202:1349–1361.
114. Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-lantzsch N, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 2001;71:1287-1294.
115. Sester U, Gärtner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wössner R, Kindermann I, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and longterm susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 2005;5:1483-1489.
116. Reusser P, Cathomas G, Attenhofer R, Tamm M, Thiel G. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J Infect Dis* 1999;179:247-253.
117. Sester M, Sester U, Gärtner BC, Girndt M, Meyerhans A, Köhler H. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2577-2584.
118. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2006;6:2356–2364.
119. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, De La Cámara R, Garcia-Noblejas A, et al. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *J Med Virol* 2010;82:1208-1215.
120. Hebart H, Dagnik S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M, et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- γ enzyme-linked immunospot

- assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99:3830-3837.
121. Li CR, Greenberg PD, Gilbertm J, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994;83:1971-1979.
 122. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002;99:3916-3922.
 123. Elkington R, Shoukry NH, Walker S, Crough T, Fazou C, Kaur A, et al. Cross-reactive recognition of human and primate cytomegalovirus sequences by human CD4 cytotoxic T lymphocytes specific for glycoprotein B and H. *Eur J Immunol* 2004;34:3216-3226.
 124. Pastore D, Delia M, Mestice A, Perrone T, Carluccio P, Gaudio F, et al. Recovery of CMV-specific CD8+ T cells and Tregs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:550-557.
 125. Ninomiya T, Takimoto H, Matsuzaki G, Hamano S, Yoshida H, Yoshikai Y, et al. Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology* 2000;99:187-194.
 126. Lafarge X, Merville P, Cazinn C, Bergé F, Potaux L, Moreau JF, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 2001;184:533-541.
 127. Knight A, Madrigal AJ, Grace S, Sivakumaran J, Kottaridis P, Mackinnon S, et al. The role of Vδ2-negative γδ T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2010;116:2164-2172.
 128. Basta S, Bennink JR. A survival game of hide and seek: cytomegaloviruses and MHC class I antigen presentation pathways. *Viral Immunol* 2003;16:231-242.
 129. Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and crosspresentation. *Immunol Rev* 2005;207:145-157.
 130. Groothuis TA, Griekspoor AC, Neijssen JJ, Herberts CA, Neefjes JJ. MHC class I alleles and their exploration of the antigenprocessing machinery. *Immunol Rev* 2005;207:60-76.
 131. Gilbert MJ, Riddell SR, Li CR, Greenberg PD. Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major

- immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J Virol* 1993;67:3461–3469.
132. Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 1996;383:720–722.
 133. Ahn K A, Gruhler B, Galocha TR, Jones EJ, Wiertz HL, Ploegh PA, Peterson Y. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 1997;6:613–621.
 134. Furman MH, Dey N, Tortorella D, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* 2002;76:11743–11746.
 135. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996;84:769–779.
 136. Tomazin R, Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, et al. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat Med* 1999;5:1039–1043.
 137. Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman JW, Sedmak DD. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* 1998;186:675–683.
 138. Miller DM, Zhang Y, Rahill BM, Waldman WJ, Sedmak DD. Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J Immunol* 1999;161:6107–6113.
 139. Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevas CN. Natural killer lymphocytes: biology, development and function. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:17–186.
 140. Mocarski ES Jr. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol* 2002;10:332–339.
 141. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R. et al. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 2005;6:515–523.
 142. Deniz G. Flow sitometri yöntemiyle hücre içi sitokin tayini ve NK aktivitesi ölçümü. In: Deniz G, Yılmaz MT, Yıllar G, editors. *Flow sitometri ve tıpta kullanımı*. İstanbul: Bilmedya Grup; 2004.p.43-53.
 143. *Cellular and Molecular Immunology, 7th Edition* from Abul Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, Elsevier; p.56-86.
 144. McDevitt LM. Etiology and impact of cytomegalovirüs disease on solid organ transplant recipients. *Am J Health Syst Pharm* 2006;63(5):3-9.

145. Kute VB, Vanikar AV, Shah PR, Gumber MR, Patel HV, Godara SM, et al. Post-renal transplant cytomegalovirus infection: study of risk factors. *Transplant Proc* 2012;44:706-9.
146. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, et al. Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010; 89(7):779-95.
147. De Keyzer K, Van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. Human cytomegalovirus and kidney transplantation: a clinician's update. *Am J Kidney Dis* 2011;58(1):118-26.
148. Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(4):848-55.
149. Legendre C, Pascual M. Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: late-onset disease and indirect consequences. *Clin Infect Dis* 2008;46(5):732-40.
150. De Keyzer K, Van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. De novo thrombotic microangiopathy induced by cytomegalovirus infection leading to renal allograft loss. *Am J Nephrol* 2010;32(5):491-6.
151. Emery VC, Asher K, Sanjuan Cde J. Importance of the cytomegalovirus seropositive recipient as a contributor to disease burden after solid organ transplantation. *J Clin Virol* 2012;54(2):125-9.
152. Nashan B, Gaston R, Emery V, Säemann MD, Mueller NJ, Couzi L, et al. Review of cytomegalovirus infection findings with mammalian target of rapamycin inhibitor-based immunosuppressive therapy in de novo renal transplant recipients. *Transplantation* 2012;93(11):1075-85.
153. Kosmadakis G, Daikos GL, Pavlopoulou ID, Gobou A, Kostakis A, Tzanatou-Exarchou H, Boletis JN. Infectious complications in the first year post renal transplantation. *Transplant Proc* 2013;45(4):1579-83.
154. Sayın CB. Preemptif alan ve almayan renal transplant alıcılarının transplantasyon sonrası beş yıllık takipleri. Nefroloji uzmanlık tezi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı, İstanbul, 2009.
155. Couzi L, Helou S, Bachelet T, Moreau K, Martin S, Morel D, et al. High incidence of anticytomegalovirus drug resistance among D+R- kidney transplant recipients receiving preemptive therapy. *Am J Transplant* 2012;12(1):202-9.
156. Grossi P, Minoli L, Percivalle E, Irish W, Vigano M, Gerna G. Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. *Transplantation* 1995;59(6):847-51.
157. Tang IY, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Immunosuppressive strategies to improve outcomes of kidney transplantation. *Semin Nephrol* 2007;27(4):377-92.

158. Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P, et al. Interleukin-2-receptor blockage with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N Engl J Med* 1998;338:159-5.
159. Land W, Vincenti F. Toxicity-sparing protocols using mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Transplantation* 2005;80(2):221-34.
160. Srinivas TR, Kaplan B, Schold JD, Meier-Kriesche HU. The impact of mycophenolate mofetil on long-term outcomes in kidney transplantation. *Transplantation* 2005;80(2):211-20.
161. Nashan B. Is acute rejection the key predictor for long-term outcomes after renal transplantation when comparing calcineurin inhibitors? *Transplant Rev (Orlando)* 2009;23(1):47-52.
162. Franco-Esteve A, Tordera D, De la Sen ML, Jiménez L, Mas P, Muñoz C, Olivares J. mTOR inhibitor monotherapy. A good treatment choice in renal transplantation? *Nefrologia* 2012;32(5):631-8.
163. Kasiske BL, Nashan B, Del Carmen Rial M, Raffaele P, Russ G, Campistol J, et al. A prospective, multinational pharmacoepidemiological study of clinical conversion to sirolimus immunosuppression after renal transplantation. *J Transplant* 2012;2012:107180.
164. Augustine JJ, Bodziak KA, Hricik DE. Use of sirolimus in solid organ transplantation. *Drugs* 2007;67(3):369-91.
165. Sanchez-Fructoso AJ. Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinic trials. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(6):807-19.
166. Landini MP, Mach M. Searching for human cytomegalovirus: is it useful? When and how. *Scand J Infect Dis* 1995;99:18-23.
167. Grangeot-Keros L, Cointe D. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. *J Clin Virol* 2001;21:213-221.
168. Hernando S, Folguez L, Lumbreras C, San Juan R, Maldonado S, Prieto C et al. Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplant Proc* 2005;37:4094–4096.
169. Humar A, Paya C, Pescovitz MD, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, et al. Clinical utility of cytomegalovirus viral load testing for predicting CMV disease in D+/R- solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4:644–649.
170. Rodrigo E, López-Hoyos M, Corral M, Fábrega E, Fernández-Fresnedo G, San Segundo D, et al. ImmuKnow as a diagnostic tool for predicting infection and acute rejection in adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Liver Transpl* 2012;18(10):1245-53.
171. Gültekin M. İmmünolojik izlem. *ANKEM Derg* 2013;27(Ek2):157-159.

172. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* 2012;55(12):1678-1689.
173. Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol* 1999;29:4053–4059.
174. Bilgiç Gazioğlu S. Flow sitometrinin tarihçesi, çalışma metodolojisi. In: Deniz G, Yılmaz MT, Yıllar G, editors. *Flow sitometri ve tıpta kullanımı*. İstanbul: Bilmedya Grup; 2004.p.1-11.
175. Maecker HT. Cytokine flow cytometry. In: Hawley TS, Hawley RG editors. *Flow Cytometri Protocols*. Second ed. Totova, NJ: Humana Press Inc; vol 263; p.95-107.
176. Karaboz İ, Kayar E, Akar S. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR* (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi) 2008;6(2):01-18.
177. Ghanekar SA, Maecker HT. Cytokine flow cytometry: multiparametric approach to immune function analysis. *Cytotherapy* 2003;5:1–6.
178. Motta VN, Martins SL. Impairment of cytomegalovirus-specific cellular immune response as a risk factor for cytomegalovirus disease in transplant recipients. *Braz J Med Biol Res* 2008;41:5-11.
179. Laane E, Tani E, Bjorklund E, Elmberger G, Everaus H, Skoog L, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry Part B Clin Cytom* 2005;64B1:34-42.
180. Dunphy CH. Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128(9):1004-1022.
181. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993;159:196–207.
182. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995; 187:117–128.
183. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995;86:1408–1419.
184. Nylander S, Kalies I, Brefeldin A; but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1999;224:69–76.

185. Maecker HT, Maino VC, Picker LJ. Immunofluorescence analysis of T-cell responses in health and disease. *J Clin Immunol* 2000;20:391–399.
186. Nomura LE, Walker JM, Maecker HT. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. *Cytometry* 2000;40(1):60-8.
187. Sund F, Lidehall AK, Claesson K, Foss K, Tötterman T, Körsger O, Eriksson BM. CMV-specific T-cell immunity, viral load, and clinical outcome in seropositive renal transplant recipients: a pilot study. *Clinical Transplantation* 2010;24:401-409.
188. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9:1214–1222.
189. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Habedank D, Hetzer R, Cherepnev G, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1031-1036.
190. Maecker HT, Hassler J, Payne JK, Summers A, Comates K, Ghanayem M, Morse M. Precision and linearity targets for validation of an IFN-gamma ELISPOT, cytokine flow cytometry and tetramer assay using CMV peptides. *BMC Immunol* 2008;9:1-9.
191. Eid AJ, Brown RA, Arthurs SK, Lahr BD. A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transplant Int* 2010;23(5):506-13.
192. Harvala H, Stewart C, Muller K, Burns S, Marson L, MacGilchrist A, et al. High risk of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *J Med Virol* 2013;85:893-898.
193. Snyder LD, Medinas R, Chan C, Sparks S, Davis WA, Palmer SM, et al. Polyfunctional cytomegalovirus-specific immunity in lung transplant recipients receiving valganciclovir prophylaxis. *Am J Transplant* 2011;11:553-560.
194. Eid AJ, Brown RA, Hogan WJ, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Litzow MR, et al. Kinetics of interferon-gamma producing cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes and the risk of subsequent CMV viremia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2009;11:519-28.
195. Engstrand M, Lidehall AK, Totterman TH, Herrman B, Eriksson BM, Korsgren O. Cellular responses to cytomegalovirus in immunosuppressed patients: circulating CD8+ T cells recognizing CMVpp65 are present but display functional impairment. *Clin Exp Immunol* 2003;132: 96-104.

196. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, Khatamzas E, Pitcher CJ, Bunde T, et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods* 2001;255: 27-40.
197. Nylander S, Kalies I, Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1999;224:69-76.
198. Ticha O, Stouracova M, Kuman M, Studenik P, Freiburger T, Litzman J. Monitoring of CD38^{high} expression in peripheral blood CD8⁺ lymphocytes in patients after kidney transplantation as a marker of cytomegalovirus infection. *Transpl Immunol* 2010;24:50-6.
199. Maecker HT, Rinfret A, D'Souza P, Darden J, Roig E, Landry C, et al. Standardization of cytokine flow cytometric assays. *BMC Immunol* 2005;6:1-18.
200. Cunliffe J, Derbyshire N, Keeler S, Coldwell R. An approach to the validation of flow cytometry methods. *Pharm Res* 2009;26(12):2551-7.
201. Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S, et al. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res* 2006; 23(2):312-28.
202. Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, Tournay C, Lowenberg B, Bolhuis RL, et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 2001;98:1358-1364.
203. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003;101:407-414.
204. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2001;7:1232-1240.
205. Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982; 307:7-13.
206. Abate D, Fiscon M, Saldan A, et al. Human cytomegalovirus-specific T-cell immune reconstitution in preemptively treated heart transplant recipients identifies subjects at critical risk for infection. *J Clin Microbiol* 2012;50:1974-80.

207. Lisboa LF, Kumar D, Wilson LE, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* 2012; 93:195–200.
208. Patel M, Stefanidou M, Long CB, et al. Dynamics of cell-mediated immune responses to cytomegalovirus in pediatric transplantation recipients. *Pediatr Transplant* 2012;16:18–28.
209. Gratama JW, Boeckh MB, Nakamura R. Immune monitoring with iTag MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent CMV infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 2010; 116(10):1655-1662.
210. Ozdemir E, St John LS, Gillespie G, Rowland-Jones S, Champlin RE, Molldrem JJ, et al. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells. *Blood* 2002;100:3690-3697.
211. Cantisán S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodríguez-Benot A, Gutiérrez-Aroca J, et al. informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant* 2013;13:738-45.
212. Shabir S, Kaul B, Pachnio A, Banham GD, Smith H, Chand S, et al. Impaired Direct Priming of CD8 T Cells by Donor-Derived Cytomegalovirus Following Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2013 (Epub ahead of print).
213. Lee S, Park JB, Kim EY, Joo SY, Shin EC, Kwon CH, et al. Monitoring of cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell response with major histocompatibility complex pentamers in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2011;43:2636-40.
214. Lozza L, Lilleri D, Percivalla E. Simultaneous quantification of HCMV spesifik CD4+ ve CD8+ T cells by a novel method using monocyte-derived HCMV-infected immature dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005;35:1795-1804.
215. Snyder LD, Medinas R, Chan C, Sparks S, Davis WA, Palmer SM, et al. Polyfunctional cytomegalovirus-specific immunity in lung transplant recipients receiving valganciclovir prophylaxis. *Am J Transplant* 2011;11:553-60.
216. Chiereghin A, Gabrielli L, Zanfi C, Petrisli E, Lauro A, Piccirilli G, et al. Monitoring cytomegalovirus T-cell immunity in small bowel/multivisceral transplant recipients. *Transplant Proc* 2010;42:69-73.
217. Hebart H, Dagnik S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M, et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99:3830-3837.

218. Sabbaj S, Pass RF, Goepfert PA, Pichon S. Glycoprotein B vaccine is capable of boosting both antibody and CD4 T-cell responses to cytomegalovirus in chronically infected women. *J Infect Dis* 2011;203:1534-41.