T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMİK ARTIRIMI AMACIYLA KULLANILAN KEMİK ALLOGREFTİNE KARŞI İMMÜN TOLERANS OLUŞTURMA

ŞULE TUYGUN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEVGİ KALKANLI TAŞ

İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
KASIM/2024

İTHAF

“Aileme ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

İmmünoloji doktora eğitimim ve tez sürecim boyunca emeğini ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini aktararak yol gösterici olan kıymetli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ'a,

Doktora eğitimim süresince, engin bilgi ve deneyimlerinden her zaman faydalandığım değerli Sağlık Bilimleri Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı hocalarıma,

Hamidiye Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarının kıymetli yöneticisi Uzm. Vet. Hekim Cumaali DEMİRTAŞ'a ve ekibine,

Çalışma projemi (2023/60) finansal olarak desteklemesinden dolayı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğüne,

İmmünoloji doktora eğitimim boyunca bilimsel ve sosyal fark etmeksizin her sıkıntımda yanımda olmasından ve tez çalışmamın her aşamasında vermiş olduğu yoğun emeklerden dolayı sevgili meslektaşım Dt. Cihan DÖLEK'e,

Deneyimlerini ve bilgisini paylaşmaktan hiçbir zaman imtina etmeyen Doç. Dr. Y. Erçin SÖNMEZ'e,

Doktora tezimin histopatolojik çalışmalarına verdikleri destekleri için Prof. Dr. Dilek YAVUZER ve Uzm. Dr. Nedim POLAT'a,

Her zaman her koşulda desteklerini yanımda hissettiğim eşim Uzm. Dr. U. Hakan TUYGUN'a ve çocuklarım B. Ece TUYGUN ile H. Emir TUYGUN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
RESİMLER LİSTESİ viii
SİMGELER VE KISALTMALAR ix
ÖZET xi
ABSTRACT xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ YANITLARI 4
2.1.1. Doğal İmmün Yanıtlar 4
2.1.2. Edinsel İmmün Yanıtlar 5
2.1.2.1. B hücreleri ve antikorlar 5
2.1.2.2. T hücreleri ve hücresel immün yanıt 5
2.2. HLA MOLEKÜLÜ 5
2.2.1. HLA Sınıf I ve II Molekülleri 6
2.3. NAKİLDE ALLOİMMÜN YANIT 6
2.3.1. Direkt Tanıma 6
2.3.2. İndirekt Tanıma 6
2.4. TRANSPLANTASYON İMMÜNOLOJİSİ 7
2.4.1. Transplantasyon 7
2.5. KEMİK GREFTLERİ 7
2.5.1. Kemik Greftlerinin Biyolojisi 7
2.5.2. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler 7
2.6. ALLOGREFTLERDE REJEKSİYON MEKANİZMASI 8
2.6.1. Transplantasyon İmmünolojisi Antijenleri 8
2.6.2. İmmünolojik Allogreft Rejeksiyonu 8
2.6.2.1. Hümoral immün yanıt 8
2.6.2.2. Hücresel immün yanıt 8
2.6.2.3. Hücresel ve hümoral immün yanıt 9
2.6.3. Allorejeksiyonun Dinamiği 9
2.6.3.1. Akut rejeksiyon 9
2.6.3.2. Kronik rejeksiyon 9
2.7. İMMÜN TOLERANS MEKANİZMALARI 10

2.7.1. Santral Tolerans 10
2.7.2. Periferik Tolerans 10
2.8. TRANSPLANTASYON TOLERANSI 10
2.8.1. T hücreleri ve İmmün Tolerans 10
2.8.2. B hücreler ve İmmün Tolerans 12
2.9. TOLERANS İNDÜKSİYONUNDA STRATEJİK YAKLAŞIMLAR 12
2.9.1. Kimerizm, Mikskimerizm ve Transplant Toleransı 12
2.9.2. T Süpresör Hücreler, T Regülatör Hücreler ve İmmün Modülasyon 13
2.9.3. Lenfodepletif Strateji 13
2.9.4. Doğal Bağışıklık Sisteminin Manipülasyonu 14
2.9.5. Dentritik Hücre Tedavisi 14
2.9.6. Terapötik İnfüzyon 14
2.9.7. Kositümülasyon Blokajı 15
2.9.8. Mezenkimal Kök Hücre Tedavileri 15
2.9.9. Gen Terapi 15
3. GEREÇ VE YÖNTEM 16
3.1. GEREÇLER 16
3.1.1. Deney Hayvanları 16
3.1.2. Deneyde Kullanılan Laboratuvarlar ve Olanaklar 17
3.1.3. Deneyde Kullanılan Malzemeler 17
3.2. YÖNTEM 18
3.2.1. Deney Cerrahi Akış Planı 18
3.2.2. Greft Cerrahisi ve Uygulaması 21
3.2.3. Deney Hayvanlarının Bakımı ve İlaç verilmesi 24
3.2.4. Patolojik Örnek Alınması 26
3.2.5. Sıçanların Sakrifikasyonu 27
3.2.6. Histopatolojik İşlemler 27
3.2.7. Lenfosit Boyama Protokolü 27
3.2.8. Değerlendirme 27
4. BULGULAR 29
4.1. Gruplardaki Histopatolojik Mikroskobik Görünüm ve Yorumlar 29
5. TARTIŞMA 35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 40
KAYNAKLAR 42
EK 45

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Sıçanların ağırlık ölçümü 18

Resim 3.2: Cerrahi alan hazırlığı 19

Resim 3.3: Sıçanlara intraperitonal genel anestezi uygulaması 20

Resim 3.4: Sıçanlara antiseptik uygulaması 21

Resim 3.5: Sıçanların femur ve tibiasının çıkarılması 22

Resim 3.6: Alıcı sıçanlara greft yerleştirilmesi 23

Resim 3.7: Sıçanlara sütür uygulanması ve pansuman yapılması 23

Resim 3.8: Sıçanlara pansuman uygulaması 24

Resim 3.9: Sıçanlara intravenöz ilaç uygulaması 25

Resim 3.10: Sıçanlara gavaj uygulaması 25

Resim 3.11: Sıçanlardan patolojik örnek alınması 26

Resim 3.12: Patolojik örnek 26

Resim 4.1: Birinci çalışma grubu (x40, H&E) 29

Resim 4.2: Birinci çalışma grubu (x100, H&E) 30

Resim 4.3: Birinci kontrol grubu (X40, H&E) 30

Resim 4.4: Birinci kontrol grubu (X100, H&E) 31

Resim 4.5: İkinci çalışma grubu (X40, H&E) 31

Resim 4.6: İkinci çalışma grubu (X40, H&E) 32

Resim 4.7: İkinci kontrol grubu (X40, H&E) 33

Resim 4.8: İkinci kontrol grubu (X100, H&E) 33

Resim 4.9: Üçüncü çalışma grubu (X40, H&E) 34

Resim 4.10: Üçüncü çalışma grubu (X100, H&E) 34

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAS : Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre/

ASH : Antijen Sunan Hücre

BMP : Kemik Morfojenik Proteinleri

CTA : Kompozit Doku Allogreftleri

ICOS : İndüklenebilir Kostimülatör

IDO : Indoleamine 2,3-Dioxygenase

IgG : İmmünoglobulin G

HLA : İnsan Lökosit Antijeni

MHC : Majör Histokompatibilite Kompleksi

MLR : Mikst Lenfosit Reaksiyonu

MMF : Mikofenolat Mofetil

MSC : Mezenkimal Kök Hücreler

PBMC : Periferik Kan Mononükleer Hücreler

PTLD : Post-Transplant Lenfoproliferatif Hastalık

SC : Subkütan

Tconv : Alloreaktif Konvensiyonel T Hücreleri

TCR : T Hücre Reseptörü

TLR : Toll-Benzeri Reseptörler

Treg : Alloreaktif Regülatör T Hücreleri

Ts : T Süpresör

UCB **:** Göbek Kordonu Kanı

KEMİK ARTIRIMI AMACIYLA KULLANILAN KEMİK ALLOGREFTİNE KARŞI İMMÜN TOLERANS OLUŞTURMA

ÖZET

Amaç: Otolog kemik greftleri büyük kemik kaybıyla oluşan fonksiyonel ve estetik deformitelerde ilk tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. Ancak, otolog rekonstrüksiyon seçenekleri tükendiğinde, ortez ve protez tedavileri uygulanmaktadır. Kemik allogreft transplantasyonunun bu tür durumlar için iyi bir alternatif olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada büyük kemik defektlerinin tedavisinde otolog kemik greftlerinin yetersiz kaldığı durumlarda immün tolerans oluşturularak allogreft kullanımının artırılması hedeflenmiştir. Abatacept, Siklosporin ve Basiliximab gibi immünsüpresif ve immün modülatör ajanlar kullanılarak rejeksiyonun önlenmesi ve immün toleransın sağlanması incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Deneyde n=9 Sprague Dawley (outbred) ve n=4 Sprague Dawley (inbred) sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar; çalışma, kontrol, sham ve donör grubu olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Çalışma grubuna immünsüpresif ilaçlar ve kemik grefti, kontrol grubuna serum fizyolojik ve kemik grefti, sham grubuna ise sadece cerrahi kesiler uygulanmıştır. Çalışma ve kontrol gruplarından alınan kemik allogreftleri, ilaçların kesilmesini takiben 15 günlük aralıklarla histopatolojik olarak incelenmiştir.

Bulgular: Çalışma grubundaki sıçanlarda immünolojik tolerans gelişmiş, rejeksiyon bulgusu saptanmamıştır. Kontrol grubunda ise yoğun lenfosit infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve nekroz alanları gözlemlenmiştir.

Sonuç: Abatacept, Siklosporin ve Basiliximab ile uygulanan immünsüpresif tedavi protokolü, allogreft rejeksiyonunu önleyerek immün toleransın gelişmesini sağlamıştır. Bu bulgular, mevcut çalışmada kullanılan immün tolerans oluşturma stratejisinin kemik allogreftlerine karşı immünolojik reddi önlemede etkili bir strateji olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Abatacept, Allogreft, İmmün Tolerans, Sıçan

DEVELOPING IMMUNE TOLERANCE AGAINST BONE ALLOGRAFT THAT IS USED TO BONE AUGMENTATION

ABSTRACT

Aim: Autologous bone grafts are considered the first treatment option for functional and aesthetic deformities caused by large bone loss. However, when autologous reconstruction options are exhausted, orthotic and prosthetic treatments are used. Bone allograft transplantation has been proposed as a good alternative method for these cases. In this study, we aimed to promote the use of allograft bone grafts in cases where autologous bone grafting is insufficient by inducing immunological tolerance. Immunosuppressive and immunomodulatory agents such as Abatacept, Cyclosporine, and Basiliximab were used to prevent rejection and induce immune tolerance.

Materials and Methods: The study involved n=9 Sprague Dawley (outbred) and n=4 Sprague Dawley (inbred) rats. The animals were divided into four groups: experimental, control, sham and donor groups. The experimental group received immunosuppressive drugs and bone graft, while the control group was given saline solution and bone graft the sham group underwent only surgical incisions. Bone allografts obtained from the experimental and control groups were examined histopathologically at 15 day intervals following the discontinuation of the medications.

Results: In the experimental group, immune tolerance was established and no signs of rejection were observed. In contrast, the control group showed significant lymphocyte infiltration, vascular congestion and necrotic areas.

Conclusion: The immunosuppressive treatment protocol using Abatacept, Cyclosporine and Basiliximab successfully prevented allograft rejection and induced immune tolerance. These findings suggest that the immune tolerance induction strategy used in the present study could be an effective approach in preventing immunological rejection of bone allografts.

Key Words: Abatacept, Allograft, Immune Tolerance, Rat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bağışıklık sisteminin belirli bir organizmada bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarma kapasitesine sahip maddelere veya dokuya tepki vermemesi durumuna immün tolerans veya immünolojik tolerans denir. Bağışıklık sisteminde; immunolojik tolerans, merkezi (intratimik) ve periferik (timik olmayan) olarak sağlanmaktadır. Ayrıca klinik uygulamada operasyonel toleranstan da söz etmek mümkündür. Operasyonel tolerans, sağlıklı bir konakta herhangi bir immunsupresif ilaç kullanmaksızın histolojik ret belirtileri göstermeyen, iyi işleyen bir grefti tanımlar. Bu çalışmanın amacı; operasyonel tolerans ile kemik allogreftlerine karşı immün tolerans oluşturmaktır. Bu sayede allogreftin rezorbe olmadan ve hacmini koruyarak daha etkin ve verimli bir şekilde kullanılmasına katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Günümüzde yapılan kemik transplantasyonlarında sıklıkla otogreftler ve allogreftler kullanılmaktadır. Otogreftler, immünojenik olmadıklarından ve kemik morfogenetik proteinleri (BMP) ve diğer büyüme faktörleri gibi bir kemik grefti materyalinden beklenen tüm özellikleri sunduğundan altın standart olarak hizmet etmektedir. Spesifik olarak otogreftler; osteoindüksiyon, osteogenez ve osteokondüksiyon elde etmek için gerekli bileşenlere sahiptir. Ancak otogreftler hastanın kendi vücuduna ait bir bölgeden kemik alınmasını gerektirir. Bu nedenle greft alınan bölgede ikinci bir operasyon sahası oluşacağından morbidite, deformite, yara izi ile sonuçlanabilir ve bunlara ek olarak kanama, iltihaplanma, enfeksiyon ve kronik ağrı gibi cerrahi risklere sebep olur. Ayrıca otogreftler defekt bölgesinin mümkün veya mevcut olandan daha büyük hacimlerde kemik gerektirdiği durumlarda uygun tedavi seçeneği olmayabilir (1). Allogreftler ikinci en yaygın kullanılan greftleridir. Genetik olarak birbirinden farklı iki birey arasında gerçekleştirilen organ nakline allotransplant, bu işleme ise allotransplantasyon adı verilir. Donör organ ve dokuları yaşayan insanlardan beyin hasarı veya dolaşım sorunu sebebiyle ölen insanlardan alınabilir. Otogreftlerle karşılaştırıldığında, allogreftlerde immünreaksiyon ve enfeksiyon bulaşma riski vardır. Ancak otogreftlere göre allojenik greftler daha az maliyetlidir ve doku alınan bölgede saha yaralanması, morbidite, deformite, yara izi, kanama, iltihaplanma, enfeksiyon, kronik ağrı gibi cerrahi riskler bulunmaz. Ancak allotransplantasyonda, alıcının bağışıklık sisteminin donör organ veya dokusuna saldırdığı ve onu yok ettiği bir reddetme

süreci oluşabilir. Alıcının, bağışlanan organının reddedilme riskini azaltmak için hayatının geri kalanında immünosupresif ilaçlar alması gerekebilir. Genel olarak, vücudun bir organ naklini reddetmesini önlemek için immünosupresyon tedavisi uygulanır. Bu tedavide kullanılan immünosüpresif ajanlarla ilişkili yan etkiler ve uzun süreli immünosupresif ilaç kullanımı riskleri, klinisyenler ve transplant alıcıları için birtakım zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Bu sebeple bağışıklığı baskılayıcı ilaçların en aza indirilmesi veya kesilmesi, transplantasyonda ana hedeftir. Bu konuda operasyonel tolerans çalışmaları devam etmektedir.

Transplantasyon toleransına ulaşmak için alloreaktif konvensiyonel T hücrelerinin (Tconv) tükenmesi ve alloreaktif regülatör T hücrelerinin (Treg) artması olmak üzere iki zorunlu bileşeni vardır. Bu iki bileşen arasındaki dengeyi sağlamak için stratejiler geliştirilmektedir. İmmünosüpresif tedavide kullanılan ilaçların başarısız olduğu durumlarda kimerik ve hücresel tolerojenik karma tedaviler denenmektedir. Kostimülasyon Blokajı da bu tedavilerden biridir. T hücre aktivasyonunu ve allogreft reddini etkili bir şekilde önler. T hücreleri anerjik hale gelir ve indüklenebilir T hücre ko-stimülatörü (ICOS) eksprese eder ve düzenleyici bir rol oynar. Abatacept ve Belatacept, kostimulasyon blokajında sitotoksik T lenfosit Antijen-4 (CTLA-4) ve IgG1'den meydana gelen füzyon proteinleri olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, alloreaktif T hücre yanıtlarının güçlü inhibisyonunu sağladıkları için tolerans oluşturmada etkilidirler. Bu çalışmada Abatacept kullanılmıştır.

Günümüzde, kemik transplantasyon uygulamalarında yaygın olarak demineralize allogreftler kullanılmakta olup bu grefte karşı rejeksiyon oranı düşük olsa da greftin üretim zorluğu, yüksek maliyeti, hazırlanma sürecinde yapısal bütünlük ile mekanik güçte yüksek oranda düşüşün olması ve uygulama sonrasında da rezorpsiyona uğraması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajları elimine etmek amacıyla allografti işleme tabi tutmaksızın dokuyu doğrudan transplante etmek hedeflenmektedir. Uygulama sonrası allogreft kemik rezorpsiyonu minimal düzeyde gerçekleşeceği öngörülmektedir. Bu durum kemik varlığını sürdürmek için kullanılan allogreft hacmin korunması için avantaj olacaktır. Ancak yayımlanan literatürler incelendiğinde konuyla ilgili olarak somut bir çalışmaya yer verilmemiştir. Literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışma ile deney hayvanlarından elde edilen veriler daha sonra insan üzerinde yapılacak

klinik çalışmalara örnek teşkil edecektir. Yeni tasarlanacak hayvan modeli çalışmaları için de çok daha doğru ve güvenilir bilgiler elde edilmesine fayda sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ YANITLARI

İmmünoloji kelimesi kökenini Latince "immunitas" sözcüğünden almıştır. Bu bilim dalı bağışıklık sisteminin verdiği tepkileri inceleyen bir disiplindir. Bağışıklık kavramı genel olarak hastalıklardan, özellikle de bulaşıcı hastalıklardan korunmayı ifade etmektedir. Bağışıklık sistemini oluşturan hücreler ve moleküller, vücuda giren yabancı maddelere karşı birlikte hareket ederek koordineli bir savunma tepkisi üretir. Bu sürece bağışıklık tepkisi denir ve bu tepkinin temel amacı mikroplara karşı vücudu korumaktır. Ancak bulaşıcı olmayan yabancı maddeler ve organizmanın kendine ait tümörlü hücreleri de bağışıklık tepkilerini tetikleyebilir. Ayrıca normalde vücudu enfeksiyonlardan koruyan bağışıklık sisteminin bazı unsurları, bazen bireylerde doku hasarına ve çeşitli hastalıklara yol açabilir (2).

Bağışıklık sistemi mikroplara karşı doğal ve kazanılmış olmak üzere iki tür yanıt üretir. Doğal bağışıklık, organizmada halihazırda mevcut olan ve tehlikeli ajanlara karşı savunma sağlayan mekanizmalardan oluşur.

Edinsel bağışıklık ise vücudun yabancı bir madde ile karşılaştığında ona özgü bir yanıt geliştirerek aynı maddeyle tekrar karşılaştığında daha güçlü bir tepki vermesini sağlar. Edinsel bağışıklık, hümoral ve hücresel bağışıklık olarak ikiye ayrılır.

2.1.1. Doğal İmmün Yanıtlar

Doğal bağışıklık yanıtının immünolojik hafızası yoktur ve savunma mekanizmaları ile vücudu koruma görevini üstlenir. Bu nedenle doğal bağışıklık sisteminin en belirgin özelliklerinden biri, antijenle tekrar karşılaşıldığında yanıtının değişmemesidir. Bu savunma mekanizması, özellikle patojenlerle ilk karşılaşmada önemli bir rol oynar. Doğal bağışıklığın savunma elemanları arasında solunum yolları, gastrointestinal sistem, cilt ve deri salgıları, mide asidi, laktoferrin gibi çözünür bileşikler, müsin, myeloid hücreleri ile kan dolaşımında önemli görev üstlenen kompleman sistemi ve onun bileşenleri yer alır. Bir patojenin konağı enfekte edebilmesi için öncelikle vücut yüzeyindeki epitelyal bariyerleri aşması gerekir. Mukozal epitel hücreleri, patojenlere

karşı mukus salgısı ile korunurken vücut yüzeyi ise antimikrobiyal ve dezenfektan özellikteki maddelerle kaplıdır. (3,4).

2.1.2. Edinsel İmmün Yanıtlar

Spesifik bağışıklık yanıtı, antijenlerle doğrudan etkileşime giren ve bu antijenlerle yeniden karşılaşıldığında daha güçlü bir tepki veren elemanlardan oluşur. Mikroorganizmalara karşı bağışıklık tepkisi, B lenfositlerin ürettiği immünoglobulinler (Ig) olarak bilinen antikorlar ve T lenfositlerin aracılığıyla gerçekleşir. Lenfosit olgunlaşma aşamasında antijen varlığı gerekli değildir. Ancak olgun bir antijen reseptörü eksprese etmelerinin ardından bu hücreler yaşamlarını sürdürür ve daha ileri aşamalara ulaşmaları antijen varlığına bağlı hale gelir (5).

2.1.2.1. B hücreleri ve antikorlar: B lenfositleri yüzeylerinde IgM ve IgD molekülleri eksprese ettiklerinde olgunlaşmış hale gelirler ve antijenle karşılaştıktan sonra hafıza hücrelerine dönüşürler ve bu antijen reseptörleri IgG, IgA veya IgE olarak salgılanırlar (3,6)

2.1.2.2. T hücreleri ve hücresel immün yanıt: T lenfosit kök hücreleri kemik iliğinden timusa devamlı olarak göç ederler ve olgunlaşma sürecini burada tamamlarlar. Timus ergenlik döneminde pubertal dejenerasyona uğramasına rağmen, T lenfositleri yaşam boyu timusta gelişip olgunlaşmaya devam eder. Timusta olgunlaşmamış T hücreleri, kendine ait İnsan lökosit antijeni (HLA) moleküllerini tanır ve süreç timik eğitim, ardından pozitif seçilim ve negatif seçilimle devam eder. T hücre reseptör kompleksinde bulunan CD3, CD4, CD8 molekülleri önemli bir rol oynarlar. $CD4^+$ T hücreleri HLA sınıf II molekülleriyle birlikte antijenleri tanıyarak çoğunlukla yardımcı T hücreleri (T helper) olarak işlev görür. $CD8^+$ T hücreleri ise HLA sınıf I molekülleri aracılığıyla antijen tanır ve sitotoksiktirler (7,8). $CD4^+$ T hücreleri ürettikleri sitokinlere göre tekrar gruplara bölünürler (9).

2.2. HLA MOLEKÜLÜ

Altıncı kromozomun kısa kolunda HLA gen bölgesi yer alır. HLA, çeşitli hücrelerin yüzeyinde bulunan proteinleri kodlayan genleri barındıran bölgedir. Bu bölgedeki polimorfizmin oldukça yüksek olması nedeniyle, bu genler tarafından kodlanan proteinler, hasta ve donör arasındaki uyumsuzluklarda, özellikle rejeksiyon sürecinde kritik bir rol oynar (10).

2.2.1. HLA Sınıf I ve II Molekülleri

Hücrelerin yüzeyindeki glikoprotein yapısında olan HLA sınıf I molekkülleri çekirdekli tüm hücrelerde bulunur. Görevleri antijenleri $CD8^+$ lenfositlerine sunmaktır. Bu bölge, HLA-A, HLA-B ve HLA-C olmak üzere üç ana bileşenden oluşur ve fonksiyonel açıdan önemli bir rol oynar (11).

Sınıf II HLA molekülleri ise immün sistemle ilişkili hücrelerde bulunur. Bunlar arasında B lenfositleri, makrofajlar, dendritik, Kupffer ve benzeri hücreler, Antijen sunan hücre (ASH) ile insanlarda uyarılmış T lenfositleri yer alır (12–14).

2.3. NAKİLDE ALLOİMMÜN YANIT

Alloantijenlere karşı gelişen immün yanıt oldukça güçlüdür ve HLA molekülleri bu immün yanıtta yönlendirme görevi yapar. Allel çeşitliliği fazla olan HLA genleri, popülasyonların patojenlere karşı savunmasında avantaj sağlasa da, hücre ve organ nakillerinde olumsuz bir faktör haline gelir. Nakledilen organ (allogreft), alıcının T lenfositleri tarafından hem direkt hem de dolaylı yol ile tanınır. Bu tanıma süreçlerinde, T lenfositlerinin farklı alt sınıflarına ek olarak B lenfositleri, makrofajlar gibi fagositik hücrelerin aktivasyonu da rol oynar (15).

2.3.1. Direkt Tanıma

Allogreftin donöre ait diğer hücrelerin üzerinde bulunan HLA ve buna bağlı proteinlerin, alıcıdaki T lenfositleri ile tanınması sürecine dayanır. Donör hücrelerindeki ASH'lar, alıcının ikincil lenf organlarına göç eder. Bu süreçte HLA tarafından sunulan peptid, alıcının alloreaktif T hücreleri tarafından yabancı olarak algılanır ve T hücre aktivasyonunu tetikler. Bu immün yanıtın sonucunda etkinleşen T hücreleri, ikincil lenf organlardan dolaşıma katılarak bağışıklık tepkisi başlatabilir (15).

2.3.2. İndirekt Tanıma

Bu tanıma, erken doğal bağışıklık yanıtı ile başlar ve doğal bağışıklık hücreleri (NK hücreleri) ile ASH'lerin (makrofajlar) aktivasyonu ile gelişir. Alıcının ASH'leri, kendi HLA molekülleri aracılığıyla donörün antijenlerini alıcıdaki T hücrelerine sunar. Donöre ait allogreft vücutta kaldığı müddetçe bu yolak devamlı çalışır (16–18). İndirekt yolağın plastisite özelliği yüksektir. Bu sayede, immün modülasyon yöntemleri için toleransının sağlanmasında kullanılabilir (19).

2.4. TRANSPLANTASYON İMMÜNOLOJİSİ

2.4.1. Transplantasyon

Cerrahi transplantasyon, canlı hücre, doku veya organların bulundukları bölgeden bir diğerine taşınarak yerleştirilmesi işlemidir. Canlı dokuların, aynı organizmada farklı bir bölgeye taşınması ya da farklı organizmalar arasında aktarılmasıyla başka bölgelere yerleştirilmesi işlemidir (20). Transplantasyonlar, ototransplantasyon, izotransplantasyon, allotransplantasyon ve zenotransplantasyon olarak adlandırılır (21).

2.5. KEMİK GREFTLERİ

2.5.1. Kemik Greftlerinin Biyolojisi

Kemik doku mühendisliğinin temel amacı, kemiğin belirlenen anatomik bölgede iyileşmesini sağlayacak bir yanıt oluşturmaktır. Klinik başarı, kemik oluşumunun yeniden şekillenmesi ile çevre kemik dokusu ile bütünleşmesi ve oluşan kemiğin işlevini sürdürebilecek mekanik dayanıklılığa sahip olmasıyla ölçülür. Kemik greftlerinin biyolojik süreçlerini anlamak için bazı kavramların açıklanması önemlidir (22,23). Bunlar; osteointegrasyon, osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteogenezis kavramlarıdır.

Kullanılan greft materyalleri, osteointegrasyon, osteogenezis, osteokondüksiyon veya osteoindüksiyon özelliklerinden bir ya da birkaçını içerebilir (24).

2.5.2. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler

Travma, kemik enfeksiyonları, konjenital anomaliler, kas iskelet sistemi tümörlerinin cerrahisi gibi durumlarda meydane gelen kemik kayıplarını tedavi etmek için kemik greftleri ve kemiğin yerine geçebilecek malzemelere sıklıkla başvurulmaktadır (25,26).

Kemik grefti olarak otogreftler ve allogreftler yaygın olarak tercih edilmektedir. Kemik yerine kullanılabilecek materyaller arasında ise doğal veya sentetik seramikler, demineralize kemik matriksi, BMP, otolog kemik iliği, büyüme faktörleri ve kompozit greftler yer alabilmektedir.

2.6. ALLOGREFTLERDE REJEKSİYON MEKANİZMASI

2.6.1. Transplantasyon İmmünolojisi Antijenleri

Organizmada bağışıklık tepkisi başlatan ve bu tepki sonucunda ortaya çıkan antikorlar ve hücre yüzeyinde bulunan moleküllerle birleşebilme kapasitesine sahip, vücuda yabancı olan maddelere "antijen" adı verilir. Transplantasyonda yer alan antijenler; ABO kan grubu antijenleri, majör ve minör MHC antijenleri ile dokuya özgü antijenler olarak gruplandırılabilir. (21,27).

2.6.2. İmmünolojik Allogreft Rejeksiyonu

Transplantasyon uygulanan hastalarda, immünsupresif tedavi verilmediği durumda, hümoral ve hücresel immün sistem allografti reddetmektedir.

2.6.2.1. Hümoral immün yanıt: Hümoral allogreft rejeksiyonunda, rejeksiyon mekanizması antikorlar aracılığıyla gerçekleşir. Antikorlar, hiperakut, akut ve kronik allogreft rejeksiyonunda rol oynar. Doğal bağışıklık sistemi, erken bir yanıt olarak antikor üretimini başlatarak veya gebelik, kan transfüzyonu ya da geçmiş transplantasyon öyküsü nedeniyle önceden mevcut olan antikorlar yoluyla allojenik rejeksiyon mekanizmasını tetikler. ABO ve HLA antijenlerine bağlanan antikorlar, antikor aracılı hücre tahribatına yol açar (28–30).

2.6.2.2. Hücresel immün yanıt: Antijen sunumunun ardından, hücresel immün yanıt ile birlikte adaptif bağışıklık sistemi harekete geçer. T hücreleri, allogreft rejeksiyonunu doğrudan, dolaylı ve yarı-doğrudan moleküler yollarla gerçekleştirir. T hücrelerinin alloantijenlere karşı immün aktivasyonu ve rejeksiyon sürecinin başlaması için üç temel sinyal gereklidir (31,32).

İlk sinyal: ASH, T hücrelerini aktive eder. Bu süreçte dendritik hücreler ve T hücreleri arasında karşılıklı bir etkileşim meydana gelir. Donörden gelen antijenlerin T hücre reseptörü (TCR) ve majör histokompatibilite kompleksi (MHC) birleşimi ile T hücrelerinin uyarılması sağlanır (16).

İkinci sinyal: T hücrelerinin yüzeyinde bulunan kostimülatör moleküller (CD28), makrofajlar, dendritik hücreler ve B lenfositlerinin yüzeyindeki ligandlar (B7-1 veya B7-2, CD80/CD86) ile etkileşime girer. Bu, birinci kostimülatör yolaktır ve burada

inhibe edici molekül CTLA-4'tür. CTLA-4 Ig kullanımı ile akut rejeksiyon baskılanabilir. Dendritik hücrelerde bulunan CD40, T hücrelerindeki CD154 (CD40 ligand) ile birleşerek T hücrelerinde B7 protein sentezini tetikler. CD40 ve CD154 etkileşimi, ikinci sinyal yolağıdır. Bu etkileşim, anti-CD40 ve anti-CD154 ile engellendiğinde, T hücrelerinin aktivasyonu ve çoğalması durur. Bu da anerji ve allotoleransın oluşmasına yol açar (33,34).

Üçüncü sinyal: T hücreleri aktive olur ve IL-2 salgılamaya başlar. Bu, T hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını hızlandırır (31).

2.6.2.3. Hücresel ve hümoral immün yanıt: Daha ileri süreçlerde, doğal ve adaptif immünitenin, allogreft rejeksiyonunda etkili hale gelmesi hücresel ve hümoral mekanizmalarla birlikte gerçekleşir. Bu iki yanıt tipi, allogreftin reddedilmesinde sinerjik bir şekilde çalışarak hem hücresel hem de antikor aracılı rejeksiyon mekanizmalarını devreye sokar.

2.6.3. Allorejeksiyonun Dinamiği

Allorejeksiyon dinamiği, akut ve kronik rejeksiyon olmak üzere iki ana başlıkta incelenir.

2.6.3.1. Akut rejeksiyon: Alıcının immün sistemi tarafından grefte karşı oluşturulan immünolojik cevap karmaşık bir süreç olup transplantasyondan birkaç gün ile birkaç hafta arasında gerçekleşebilir. Birinci aydan başlayarak altıncı aya kadar akut rejeksiyon atakları meydana gelebilir. T hücrelerinin etkinleşmesi ile hem hücresel hem hümoral immünite birlikte çalışır. Akut rejeksiyon; arterlerde trombosit agregasyonu, fibrinoid nekroz ve vasküler oklüzyon ile karakterize edilir. Bu süreçte allogreftte ise lökosit infiltrasyonu ve fokal nekroz odakları görülür (35–37).

2.6.3.2. Kronik rejeksiyon: Transplantasyon gerçekleştikten bir yıl veya sonrasında meydana gelir. Kronik rejeksiyon, immünolojik olmayan ve immunolojik faktörlere bağlıdır ve sağlıklı doku yapısı ve fonksiyonun kaybıyla karakterize olan fibrozis oluşur. Akut rejeksiyon atak sıklığına, alıcının yaşına, duyarlılığına, MHC antikorlarına ve uygulanan immünsüpresyon tedavisine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Ayrıca hipertansiyon, sitomegalovirüs enfeksiyonları, sigara kullanımı ve hiperlipidemi gibi faktörler de bu duruma etki eder (38).

2.7. İMMÜN TOLERANS MEKANİZMALARI

2.7.1. Santral Tolerans

Yüksek afiniteye sahip self reaktif ve antijene özgü T ve B hücrelerinin timus ve kemik iliği gibi merkezi organlarda delesyon yoluyla yok edilmesi sürecidir (39,40). Timusta gerçekleşen bu mekanizma, santral T hücre toleransı olup, klonal seçilim olarak adlandırılır (39) .

2.7.2. Periferik Tolerans

Santral tolerans mekanizmasından kaçan düşük afiniteli self reaktif T ve B hücreleri, sekonder lenfoid organlarda periferik tolerans aracılığıyla delesyonel ya da delesyonel olmayan mekanizmalarla ortadan kaldırılır (39,41).

2.8. TRANSPLANTASYON TOLERANSI

Farmakolojik ajanların idame immun süpresyon olarak kullanılmadığı durumlarda oluşan transplantasyon toleransı, uzun süreli olarak allogreftin yaşaması olarak tanımlanır. Klinik olarak tolerans transplante edilen organın fonksiyonlarına devam etmesi, histolojik rejeksiyon bulgularının görülmemesidir. İmmunsüpresif ilaç ile tedavi alan transplantasyon hastalarında idame tedavi ile "operasyonel tolerans" gelişmektedir (41). Transplantasyon toleransı timusta gerçekleşen santral delesyon, periferik delesyon ve delesyon dışı mekanizmalar yoluyla sağlanabilir. Başarılı bir tolerans indükleme mekanizması, klinik uygulamalarda stabil, güçlü ve ölçülebilir olmalı ve allogreft ile uyum içinde çalışabilmelidir (42).

2.8.1. T hücreleri ve İmmün Tolerans

Santral ve periferik olmak üzere iki tür tolerans vardır. Santral Tolerans/Klonal delesyon, timusta meydana gelen santral T hücre toleransı, klonal seleksiyon olarak adlandırılır (39). Timus, yaşam boyu self toleransın devamlılığını sağlar ve allogreftlerde donör spesifik toleransın oluşumunda da rol oynayabilir. Merkezi lenfoid bir organ olan timusa, alloantijenlerle yapılan manipülasyonlarla T hücre delesyonunun intratimik olarak gerçekleştirilmesi sonucunda tolerans sağlanabilir. Alloantijenin doğrudan timusa enjekte edilmesi yoluyla santral toleransın indüklenmesi hayvan deneylerinde gösterilmiştir (43).

Periferik tolerans ise birçok şekilde oluşturabilir.

1. Ekstratimik delesyon: Rapamasin gibi ilaçlar, T hücrelerde periferik apoptozis ve ekstratimik delesyona, anerjiye ve baskılamaya neden olabilir (39,44). Ekstratimik delesyon, kemik iliği transplantasyonu ve kostimülatör blokaj yöntemiyle de gözlemlenmiştir (45). Bu süreçte hücre yüzeyindeki apoptozis tetikleyici reseptörler rol oynar (34).

2. Anerji: T lenfositler, efektör fonksiyonlarını yerine getiremeyecek şekilde moleküler değişikliklere uğrayarak etkisiz hale getirilir ve etkili bir immün yanıt gelişmez. Buna "anerji" adı verilir. Kostimülatör moleküllerin ve sinyal yollarının bloke edilmesi anerji gelişimine yol açar. Anerjik hücreler antijenle karşılaştığında yanıt vermez (21,40,45).

3. Treg hücreler: Periferik toleransta önemli bir görev üstlenen immün düzenleyici hücrelerdir. Treg hücreler, hücrelerin birbirleriyle temas kurma mekanizmalarıyla, IL-10, TGF-β gibi sitokinlerle otokrin etki ve parakrin yollarla diğer hücreler üzerinde etki göstererek immün düzenleme görevini üstlenir (46).

4. Tolerojenik dendritik hücreler: Periferik lenfoid organlarda bulunan bu hücreler, yüksek plastisiteye sahiptir ve Treg hücrelerin fonksiyonları ve çoğalmaları üzerinde etkili olabilir (47).

5. İhmal edilme (Ignorance): İmmünoterapi sürecinde, stabil transplantasyon toleransı gelişirken bazı alloreaktif T hücrelerin santral delesyona uğramama ihtimali vardır. Bu aşamada alloreaktif T hücrelerle regülatör mekanizmalar arasında dengenin sağlandığı kararsız bir immün yanıtsızlık durumu ortaya çıkar (44,46). Korneal allotransplantasyon veya kapsüllenmiş pankreas adacık allotransplantasyonlarına yönelik tolerans buna örnek olarak verilebilir (48).

6. İnhibitör moleküler sinyaller: PD-1 ve CTLA-4 gibi inhibitör sinyaller, immün yanıtın düzenlenmesinde görev alır. İmmün yanıt, bu moleküllere özel uyarıcı veya inhibitör antikorlar kullanılarak modüle edilebilir (40).

7. Sitokinler: Sitokinler ve çözünür faktörlerin immün düzenlemede önemli bir rolu vardır. IL-17 ve IFN-γ gibi sitokinler inflamasyonda ve hemostazda görev alır. İmmün toleransın devamlılığında ise IL-10 ve TGF-β sitokinler görev alır. IL-6 ise Th17 aracılığıyla Treg gelişimini engelleyerek inflamatuar hastalıklara rol açar. Treg hücreler

ve efektör T hücrelerinin fonksiyonları ile hayatta kalmaları IL-2 sitokini gerektirir. IL-2 seviyelerindeki azalma, efektör T hücrelerinin gelişimini baskılar ve immün toleransın gelişmesini sağlar (40).

2.8.2. B hücreler ve İmmün Tolerans

B lenfositleri, yüzeylerinde yüksek afinitede self antijenlere karşı immunoglobulin (Ig) bulundurduklarında, kemik iliğinde delesyon ve reseptör denetimi yoluyla ortadan kaldırılırlar. Düşük afiniteye sahip self reaktif B hücreleri ise periferik lenfoid organlarda, nondelesyonel mekanizmalar aracılığıyla ortadan kaldırılmaktadır. Bu mekanizmalar arasında anerji, inhibitör reseptörlerin etkin duruma geçmesi, hücresel tükenme (exhaustion), regülatör T hücreleri, immün regülatör sitokinler ve tolerojenik dendritik hücrelerin rolü yer almaktadır (40).

2.9. TOLERANS İNDÜKSİYONUNDA STRATEJİK YAKLAŞIMLAR

Allojenik doku nakillerinde karşılaşılan en büyük zorluk, immünsüpresif ilaçların devamlı olarak kullanımı ve bu ilaçların yarattığı yan etkilerdir. İmmüntolerans indüksiyon çalışmalarının asıl amacı, alıcıda immün baskılama yaratmadan allogreftin reddini engelleyerek donöre özgü tolerans sağlamaktır. En az yan etkiyle en etkili yöntemi kullanarak toleransın sürekliliğini sağlamak, allogreftin ömrünü uzatmak ve immünsüpresif tedaviyi minimize etmek, donöre özgü tolerans oluşturmanın temel hedefidir (49).

2.9.1. Kimerizm, Mikskimerizm ve Transplant Toleransı

Bir canlının belirli bir yüzdesinde kendisine ait olmayan başka hematopoietik seriden hücrelerin bulunması durumuna kimerizm denir ve kimerizmin farklı çeşitleri vardır (45,49). Mikrokimerizm ve makrokimerizm olarak adlandırılır. Tüm hematopoietik seri donöre ait ise buna da Total Makrokimerizm denir (45). Transplantasyon toleransı açısından mikst kimerizm, daha avantajlıdır çünkü total kimerizmde alıcının tüm immün sistemi donör immün sistemi ile tamamen değiştirilirken, mikst kimerizmde alıcının immün sistemi korunur. Hem donöre hem de alıcıya ait reaktif immün sistem hücreleri birlikte yer alır, bu da üçüncü bir vericiden gelecek antijenlere karşı immün savunmanın gerçekleşmesine sebep olur. (50).

2.9.2. T Süpresör Hücreler, T Regülatör Hücreler ve İmmün Modülasyon

Allojenik uyarım durumunda, baskılayıcı özelliklere sahip $CD8^+$ ve $CD28^-$ yüzey molekülü eksprese eden bir T hücre alt grubu olan T süpresör (Ts) hücrelerinin geliştiği ve bunların hem zenojenik hem de allojenik bağışıklık tepkilerini Mikst Lenfosit Reaksiyonu (MLR) sırasında baskıladığı gösterilmiştir (51). Ts hücreleri MHC I molekülü eksprese eder ve Th2 hücrelerinin antijen spesifik yanıtını baskılayarak Th2 hücrelerinin immünsüpresif işlevlerini ortaya çıkarır. Ts hücreleri, ASH'lerdeki kostimülatör molekülleri inhibe eder ve inhibitör molekülleri uyararak ASH'lerde anerji oluşumunu sağlar, böylece ASH'leri tolerojenik hücrelere dönüştürür. Aynı zamanda Treg hücrelerin oluşumunu teşvik eder ve immünsüpresif etkileri bulunmaktadır. Treg hücreler, Tolerojenik ASH'ler ve Ts hücreler arasında bir etkileşim mevcuttur (52).

Treg hücreleri ($CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$) timusta gelişir. Bu hücrelerin yüzeyinde CD4 reseptörü ve CD25 reseptörü eksprese ederler ve farklılaşmaları Foxp3 adlı transkripsiyon faktörü ile gerçekleşir. Treg hücreleri, T hücrelerinin ($CD4^+$) farklılaşmış bir alt grubudur ve periferdeki $CD4^+$ T lenfositlerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Bu hücreler doğal Treg hücreler olup, otoimmün hastalıkların baskılanmasında ve self proteinlere karşı toleransın sağlanmasında görev yaparlar. İmmün düzenleyici hücrelerdir (53–55).

Timus dışındaki periferik bölgelerde, naif $CD4^+$ T hücrelerinin tolerojenik koşullar ve antijen mevcudiyetinde farklılaşmasıyla periferik $CD4^+$, $CD25^+$, $Foxp3^+$ Treg hücreleri oluşur (54,56).

2.9.3. Lenfodepletif Strateji

Lenfositlerin sayısını azaltma veya aktivitelerini sınırlama süreci olarak tanımlanır. Alıcıdaki bağışıklık sistemini baskılamak ya da kontrol altında tutmak için lenfositlerin sayısının düşürülmesi veya fonksiyonlarının sınırlandırılması gerekebilir.

Lenfodeplesyon, organ nakli sırasında "indüksiyon tedavisi" olarak uygulanarak, alloreaktif Tconv hücrelerinin prekürsörlerinin sıklığını azaltma ve akut allogreft reddini engellemede etkili bir yöntemdir. Ancak, hücrelerin deplesyon sonrasında yeniden çoğalması sırasında, devam eden idame tedavisi T hafıza hücrelerinin ve alloantikorların gelişimini tetiklememek adına gereklidir (57).

2.9.4. Doğal Bağışıklık Sisteminin Manipülasyonu

Toll benzeri reseptörler, iskemi-reperfüzyon yaralanması sırasında doğal bağışıklık tepkilerini düzenler ve adaptif alloimmün tepkilerin başlamasını sağlar. Bu yüzden, Toll benzeri reseptör (TLR) adaptör proteini olan MyD88'in eksikliği, donör antijenine karşı spesifik bir tolerans oluşturur. MyD88 yokluğunda, Treg hücrelerinin Tconv hücrelerine karşı dengeleyici etkisi değişir ve bu durum reddetme yerine toleransın oluşmasını destekler (58)

2.9.5. Dentritik Hücre Tedavisi

Kemik iliği kaynaklı dendritik hücreler, myeloid ya da lenfoid serilerden farklılaşabilirler ve yüksek bir plastisiteye sahiptirler. Olgunlaşmamış dendritik hücreler periferik dokular ve kanda bulunurken, olgun dendritik hücreler sekonder lenfoid organlarda yer alır, öncül dendritik hücreler ise kemik iliğinde bulunur. Deri altı dokusunda yerleşmiş olan immatür dendritik hücreler, antijen uyarısıyla olgunlaşır ve kan yoluyla T hücreleri açısından zengin olan lenfoid organlara taşınırlar. Bu olgun dendritik hücreler, lenfoid organlarda antijenleri naif T hücrelerine sunarak bu hücreleri etkinleştirir, aynı zamanda B hücrel çoğalmasını ve antikor üretimini, NK hücrelerinin ise etkinleşmesini sağlarlar. Eğer antijen uyarısı gerçekleşmezse, bu immatür dendritik hücrelerin, kostimülatör moleküllerin eksikliği nedeniyle tolerojenik özellik kazandıkları ve T hücre toleransını destekledikleri düşünülmektedir (59,60).

Yapılan çalışmalarda, otolog kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerin in vitro ortamda donör alloantijenleri ile uyarıldığında, spesifik Treg hücre oluşumunu ve çoğalmasını artırdığı ortaya konulmuştur (61).

2.9.6. Terapötik İnfüzyon

Bazı durumlarda, Treg hücreleri izole edilip genişletilerek hastaya yeniden enjekte edilebilir. Bu tedavi yöntemi, Treg hücre popülasyonunu artırarak baskılayıcı fonksiyonlarını güçlendirmeyi hedefler ve böylece nakil toleransını teşvik eder. Treg hücreleri, donör, alıcı ya da üçüncü taraflardan (raf ürünü olarak) izole edilebilir ve bu hücrelerin izole edilebileceği kaynaklar arasında periferik kan mononükleer hücreler (PBMC'ler), göbek kordonu kanı (UCB) ve pediatrik timus yer alır. İn vivo ve ex vivo genişletilmiş poliklonal Treg'ler, in vitro olarak uyarılmış antijen spesifik ve genetik olarak modifiye edilmiş Treg'ler üzerinde yapılan ön klinik çalışmalar,

immünsüpresyonun minimuma indirilmesi bağlamında uzun vadeli greft sağkalımını artırma açısından umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. Günümüzde, Treg tabanlı çeşitli tedavi yaklaşımları, insan deneylerinde güvenlik ve etkinlik açısından değerlendirilmektedir (62).

2.9.7. Kositümülasyon Blokajı

Alloreaktif T hücrelerinin aktif hale gelmesi, sinyal-1 ve sinyal-2'nin sağlanmasını gerektirir. Kostimülasyonun engellenmesi, T hücre aktivasyonunu ve allogreft reddini etkili bir şekilde durdurur. T hücreleri, anerjik duruma geçer ve düzenleyici bir rol üstlenerek İndüklenebilir Kostimülatör (ICOS) eksprese eder. En çok araştırılan ve en kritik olan kostimülasyon sinyalleri CD28:B7 ve CD40:CD40L etkileşimleridir. CTLA-4, B7'ye bağlanarak T hücresini baskılamak için CD28'e kıyasla 10-20 kat daha yüksek bir afinite gösterir. Bu etkileşim aynı zamanda CTLA-4'ün, düzenleyici $CD4^+$ hücrelerde indoleamine 2,3-dioxygenase'yi (IDO) indüklemesine yol açar. Abatacept ve Belatacept, CTLA-4 ve IgG1'den oluşan füzyon proteinleri olup, alloreaktif T hücre yanıtlarını güçlü şekilde baskılar. Belatacept, Abatacept'e kıyasla daha etkili olsa da, Belatacept ile tedavi edilen hastalarda kalsinörin inhibitörlerine göre lenfoproliferatif bozukluk riskinin daha fazla olduğu görülmüştür (63–65).

2.9.8. Mezenkimal Kök Hücre Tedavileri

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), salgıladıkları çözünür faktörler ve hücre-hücre etkileşimleri yoluyla immün modülasyonu düzenler ve immünsüpresyon sağlarlar. MSC'lerin bu özellikleri hem solid organ hem de kompozit doku nakillerinde tolerans indüksiyonu üzerine yapılan deneylerde ümit vadetmektedir.

2.9.9. Gen Terapi

Retrovirüs, adenovirüs veya non-viral yöntemlerle gen transferi yoluyla terapötik ajanlar arasında yer alan sitokinler, antikorlar ve rekombinant ligandlar aktarılarak ve bağışıklık özelliklerinden yararlanılarak immun modülasyon amacıyla allotransplantasyonlarda kullanılmaktadır. Bu ajanlar, allogreft reddini ve iskemik hasarı engellemek, ayrıca donör alloantijenlerine karşı immüntolerans oluşturmak için umut vadetmektedir (66).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunulan tez projesi, etik kurul onayı almıştır (Ek). Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine yapılan başvuru ve onay sürecinin tamamlanmasının ardından, deney için gerekli malzemelerin alımı gerçekleştirilmiştir.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Deney Hayvanları

Deneyde kullanılmak üzere, Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezinden outbred özellikte 9 adet erkek Sprague Dawley sıçan; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarından ise inbred özellikte 4 adet erkek Sprague Dawley sıçan temin edilmiştir. Bu sıçanlar, 12 haftalık yaşta ve ortalama 300-350 gram ağırlığında teslim alınmış, deneylerin gerçekleştirileceği Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarına yerleştirilmiştir. Deney sürecinde hayvanların günlük kilo alımları, genel sağlık durumları ve cerrahi müdahaleler öncesinde düzenli kilo alımı ve sağlıklı olma halleri gözlenmiştir.

Deney grupları:

- Çalışma grubu: 3 adet outbred Sprague Dawley sıçan. Donör grubundan alınan femur ve tibia gibi allogreft kemikler, sıçanların sırt bölgesindeki cilt altına yerleştirilmiş ve deney kapsamında verilmesi planlanan ilaçlar uygulanmıştır.

- Kontrol grubu: 3 adet outbred Sprague Dawley sıçan. Donör grubundan alınan femur ve tibia gibi allogreft kemikler sırt bölgesine yerleştirilmiş, ancak deney ilacı yerine serum fizyolojik uygulanmıştır.

- Sham grubu: 3 adet outbred Sprague Dawley sıçan. Cerrahi komplikasyonları izlemek ve sağ kalımı değerlendirmek amacıyla sadece cilt kesisi oluşturulmuş ve cerrahi dikiş uygulanmıştır.

- Donör/Verici grubu: 4 adet inbred Sprague Dawley sıçan. Bu sıçanlardan femur ve tibia kemikleri allogreft olarak alınmıştır. Kullanılacak allogreftlerin aynı genetik

özelliklere sahip sıçanlardan alınması, immüntolerans oluşturmak için planlanmış bu çalışmadaki olası rejeksiyon sonucu için aynı derecede katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Outbred ve inbred sıçanların kullanımı: Bu projede, sıçanlar, immünolojik deneyde kullanıldığından, verici gruplar için genetik homojenite sağlamak amacıyla inbred sıçanlar seçilmiştir. Verici grubundan elde edilen allogreftler, genetik olarak tamamen aynı özelliklere sahiptir. İnbred sıçanlar, genetik homojeniteyi artırıp heterojenliği azaltmak amacıyla kardeşlerin çiftleşmesiyle üretilir. Yirmi ve daha fazla jenerasyon boyunca yapılan bu üretimle izogenik soylar elde edilir. Outbred sıçanlar ise kardeş olmayan, farklı genetik özelliklere sahip bireylerdir. Deneyde, inbred allogreft kullanılarak immünolojik toleransın değerlendirilmesi için genetik bağlantısı olmayan outbred sıçanlarda rejeksiyon belirtilerinin tarafsız bir şekilde ortaya konması amaçlanmıştır. Bu nedenle çalışma ve kontrol gruplarında outbred sıçanlar tercih edilmiştir.

3.1.2. Deneyde Kullanılan Laboratuvarlar ve Olanaklar

Deney sürecinde, her bir sıçanın ayrı kafeslerde barınabilmesi için yeterli alan sağlanmıştır. Bu ayrım, cerrahi müdahale sonrası sıçanlar arasında kanibalizm riskini önlemek amacıyla yapılmıştır. Deney laboratuvarı, hayvanların sağlıklı ve güvenli bir ortamda barındırılmasını sağlamak amacıyla uygun bir şekilde tasarlanmıştır. Laboratuvarın hijyenik koşulları, düzenli olarak uygulanan temizlik ve sterilizasyon prosedürleri ile korunmaktadır. Cerrahi ekipmanlar, deney öncesinde ve sonrasında sterilize edilmektedir. Havalandırma sistemi, deney ortamının hijyenini sağlamakla birlikte, sıcaklık ve nem kontrolü de hayvanların stres seviyelerini minimize etmek ve sağlıklı bir yaşam alanı sunmak için büyük bir önem taşımaktadır. Ayrıca, hayvanların sağlık durumunu izlemek amacıyla gelişmiş görüntüleme ve izleme sistemleri kullanılmakta, düzenli gözlemlerle davranışsal değişiklikler takip edilerek, gerektiğinde müdahale edilmektedir. Yeterli beslenme ve su temini sağlanarak, hayvanların ihtiyaçlarına uygun özel diyetler ile desteklenmektedir. Deneyler, etik kurallara uygun bir şekilde yürütülmekte ve hayvanların refahı her zaman ön planda tutulmaktadır,

3.1.3. Deneyde Kullanılan Malzemeler

Anestezi için kullanılan ilaçlar: Ketamin (90 mg/kg) ve Ksilazin (10 mg/kg) intraperitonel olarak uygulanarak genel anestezi sağlanmıştır.

Cerrahi set: Bistüri, bistüri sapı, portegü, cerrahi pens ve kemik pensi kullanılmıştır.

Cerrahi dikiş malzemesi: 4/0 polyglactinden üretilen, emilebilir, sentetik, örgülü ve monoflaman dikiş materyali (Vicryl).

Pansuman için kullanılan malzemeler: Serum fizyolojik ve %10 povidon iyot.

3.2. YÖNTEM

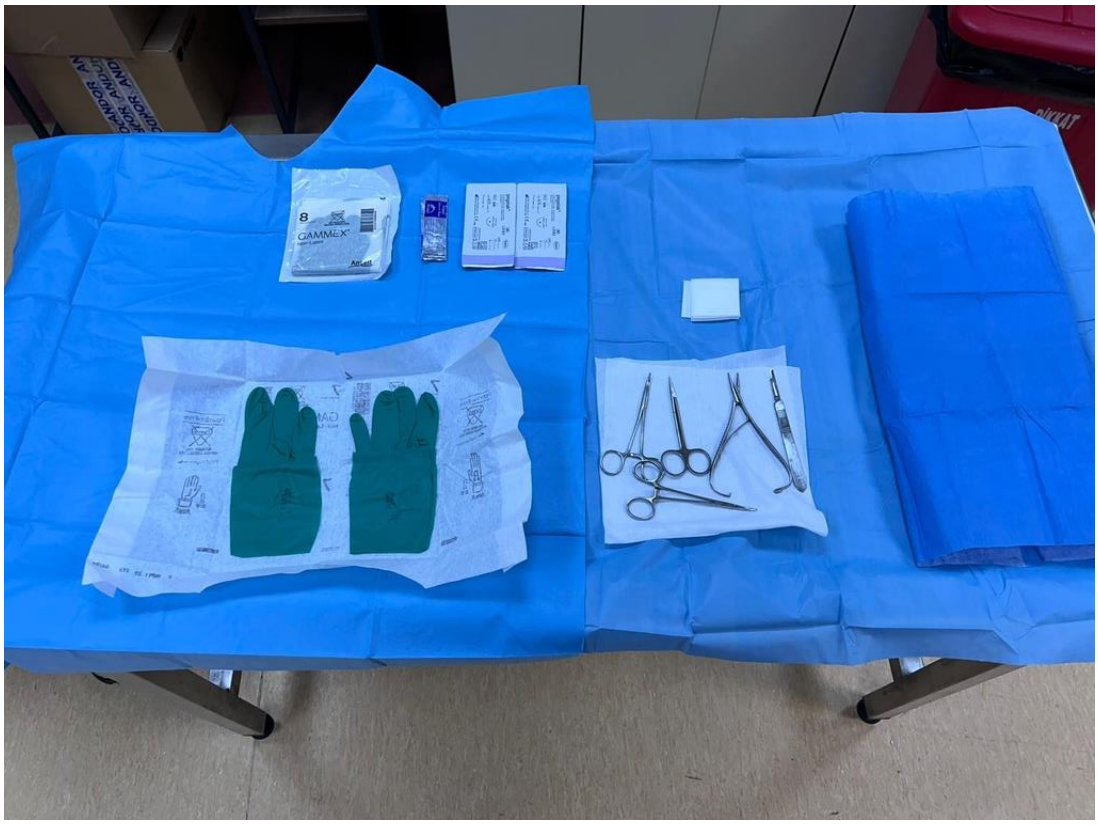
3.2.1. Deney Cerrahi Akış Planı

Cerrahi işlem öncesi, genel anestezi uygulaması için ketamin ve ksilazin dozlarının belirlenmesi amacıyla sıçanların ağırlıkları ölçülmüştür (Resim 3.1).



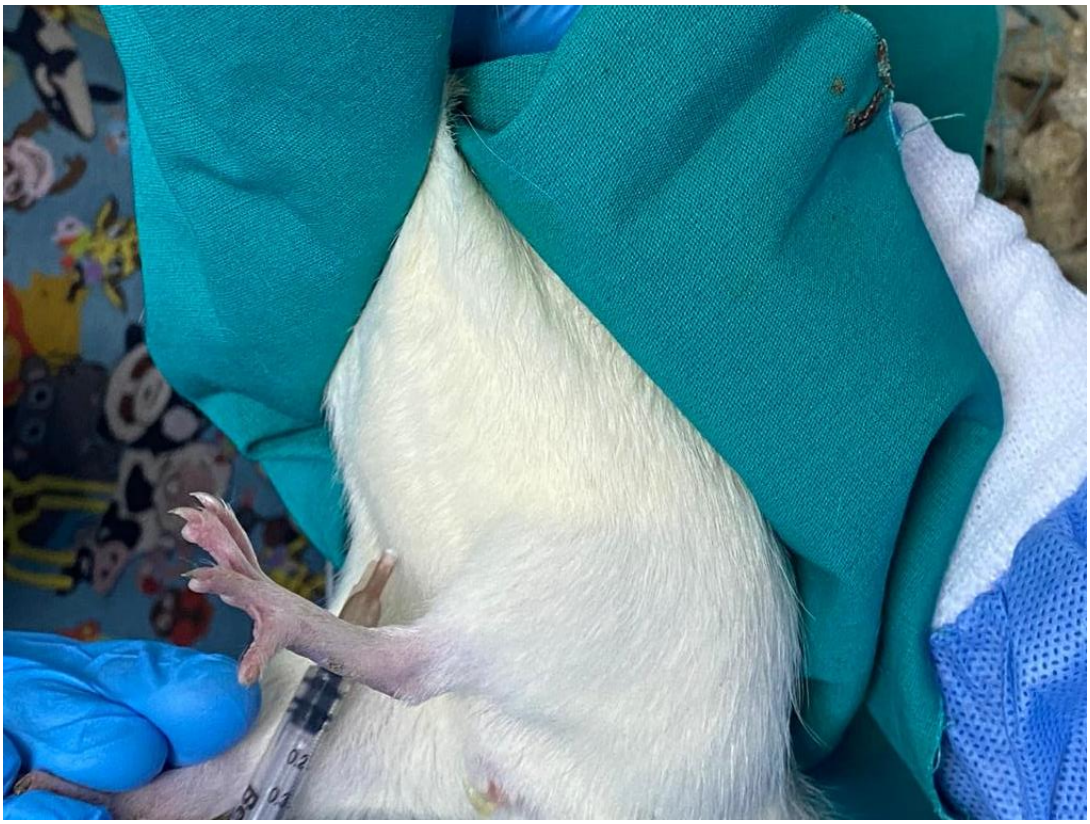
Resim 3.1: Sıçanların ağırlık ölçümü

Ağırlık ölçümleri tamamlanmasının ardından ratların opere edileceği cerrahi alanın hazırlığı sağlanmıştır (Resim 3.2).



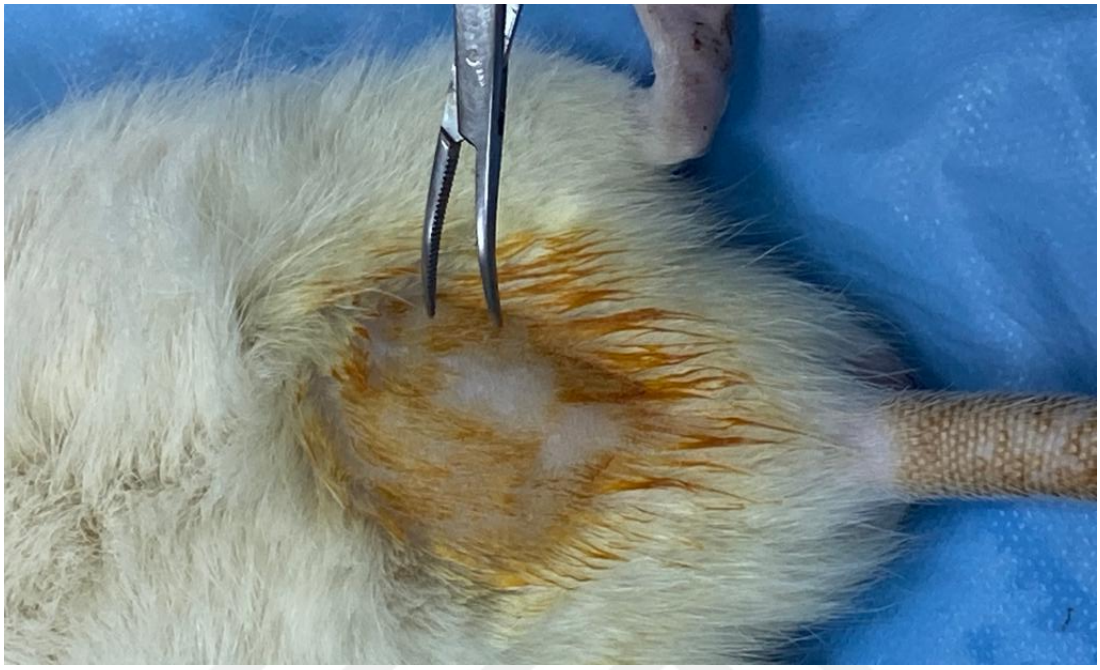
Resim 3.2: Cerrahi alan hazırlığı

Ratlara intraperitonel olarak ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) uygulanarak genel anestezileri sağlanmıştır (Resim 3.3).



Resim 3.3: Sıçanlara intraperitonal genel anestezi uygulaması

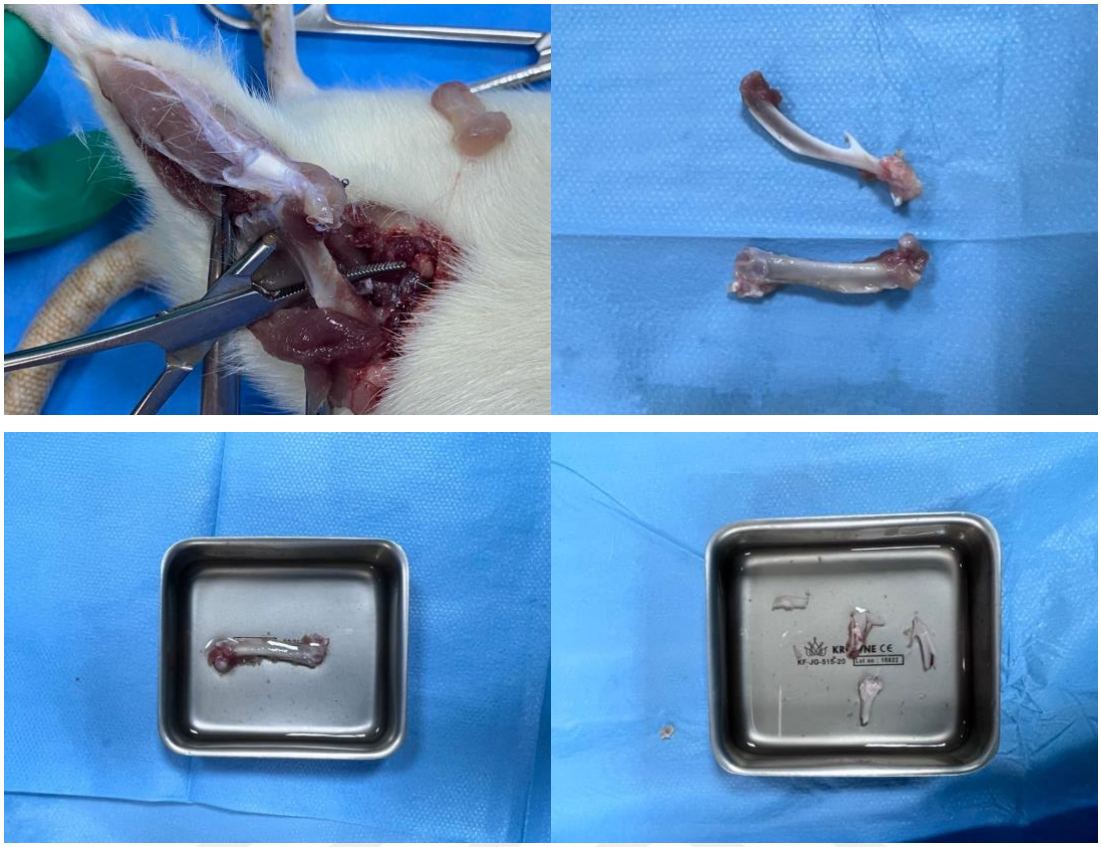
Ratların cerrahi operasyon bölgesi tıraşlanarak cilt açığa çıkarılmış ve %10 povidon iyot ile ciltlerine antiseptik uygulanmıştır (Resim 3.4).



Resim 3.4: Sıçanlara antiseptik uygulaması

3.2.2. Greft Cerrahisi ve Uygulaması

Donör olarak belirlenen ratların femur ve tibiaları alıcı ratların cilt altına yerleştirilmek üzere opere edilerek çıkarılmıştır (Resim 3.5).



Resim 3.5: Sıçanların femur ve tibiasının çıkarılması

Alınan allogreftler çalışma grubu ve kontrol grubundaki ratlara prone pozisyonda sırt derisine yaklaşık 1 cm kesi yapıldıktan sonra deri altına yerleştirilmiştir (Resim 3.6)



Resim 3.6: Alıcı sıçanlara greft yerleştirilmesi

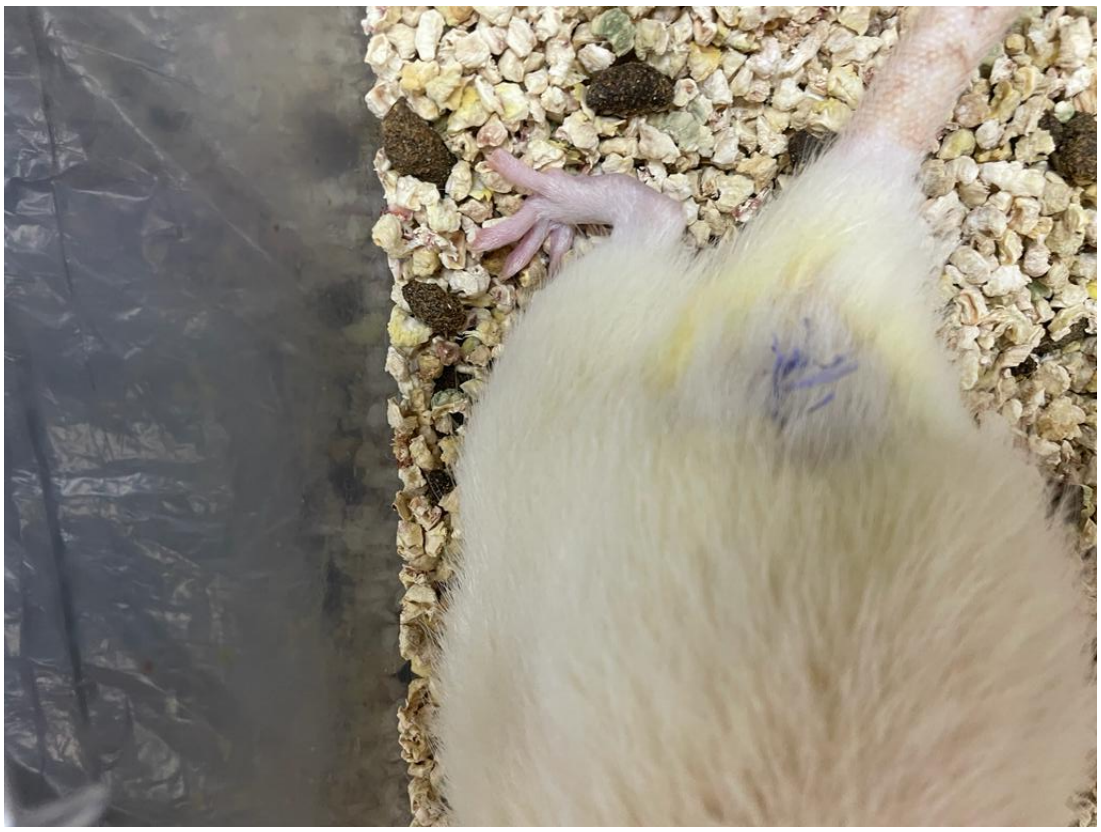
Allogreftlerin yerleştirilmesinin ardından deri 4/0 polyglactin sütür ile kapatılarak %10 povidon iyot ile ratlara pansuman yapılmıştır (Resim 3.7).



Resim 3.7: Sıçanlara sütür uygulanması ve pansuman yapılması

3.2.3. Deney Hayvanlarının Bakımı ve İlaç verilmesi

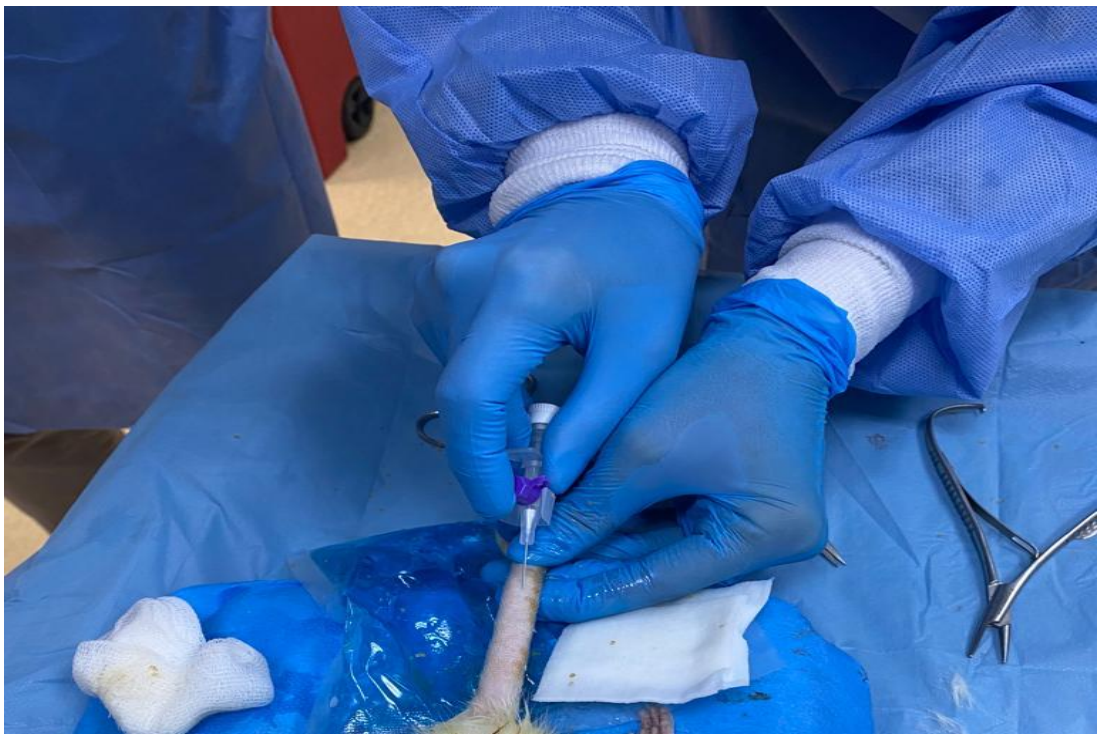
Ratların deri altına yerleştirilen kemik allogreftine karşı İmmünolojik tolerans oluşturmak amacıyla kullanılan ilaçların verilmesi ve ratların sağkalımlarının maksimumda sağlanması için rat bakımları düzenli bir şekilde yapılmıştır. Pansuman için %10 povidon-iyot gün aşırı olarak uygulanmıştır (Resim 3.8).



Resim 3.8: Sıçanlara pansuman uygulaması

İlaçlar sadece çalışma grubundaki ratlara uygulanmıştır. Kontrol grubundaki ratlara ise çalışma grubundaki ratlara verilen ilaçlar dozunda plasebo olarak serum fizyolojik verilmiştir. İmmünosüpresif ilaç olarak Abatasept (Orencia) 250 mg flakon; ilk doz operasyon gününden bir gün önce sonraki dozlar ise beşinci, ondördüncü, yirmisekizinci günler ve son olarak kırkbeşinci gün olmak üzere 10mg/kg hesabı ile intravenöz (IV) uygulanmıştır. Bunlara ek olarak anti-CD25 basiliximab (Simulect) 20 mg flakon; 0.28 mg/kg hesabı ile operasyon gününden bir gün önce ve beşinci günde intravenöz (IV) uygulanmıştır (Resim 3.9). Son olarak da Siklosporin (Sandimmun neoral 50 ml) 100 mg solüsyon; operasyon günü ve devam eden yedi gün (dahil) boyunca her sıçan için 15mg/kg oral (PO) yoldan gavaj yoluyla verilmiştir (Resim 3.10). Tüm ilaçların

doz ayarlaması ilaç prospektüslerine göre yapılmıştır. Sadece, abatacept tolerans oluşumunu sağlamak amacıyla deneysel yaklaşımla kırkbeşinci günde ek doz olarak 10mg/kg hesabı ile tekrar verilmiştir.



Resim 3.9: Sıçanlara intravenöz ilaç uygulaması



Resim 3.10: Sıçanlara gavaj uygulaması

3.2.4. Patolojik Örnek Alınması

Kemik allogerftine karşı immünolojik tolerans oluşturmak için sıçanlara verilen ilaçların bitiş tarihinden 15'er gün aralıklarla hem çalışma grubu hem de kontrol grubuna yerleştirilen kemik allogreftler, etrafındaki deri dokusu ile birlikte çıkarılarak (Resim 3.11, 3.12) rejeksiyonda önemli bir gösterge olan Lenfosit infiltrasyonunun olup olmadığının incelenmesi için histopatolojik değerlendirme yapılmıştır.



Resim 3.11: Sıçanlardan patolojik örnek alınması



Resim 3.12: Patolojik örnek

3.2.5. Sıçanların Sakrifikasyonu

Deneydeki tüm sıçanlar genel anestezi altında servikal dislokasyon yapılarak sakrifiye edilmiştir.

3.2.6. Histopatolojik İşlemler

Histopatolojik incelemeler için alınan dokular, %10'luk formalde 24-48 saat süreyle fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası dokular, fiksatifin uzaklaştırılması için bir gece boyunca akan su altında yıkanmıştır. Dehidratasyon sürecinde sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika bekletilmiştir. Ardından, dört farklı aseton serisinde de 20'şer dakika işlem görmüştür. Şeffaflaştırma işlemi için dokular, iki farklı ksilene 30'ar dakika maruz bırakılmıştır. Dokulara birer saatlik iki kez yumuşak parafin ile immersiyon işlemi uygulanmış ve sonrasında sert parafin bloklarına gömülmüştür. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) kullanılarak dokulardan 5µ kalınlığında kesitler alınmıştır.

3.2.7. Lenfosit Boyama Protokolü

Hematoksilen-Eozin boyama protokolü şu şekilde uygulanmıştır: Kesitler, deparafinizasyon işlemi için bir gece boyunca 60°C'lik etüvde bekletilmiştir. Daha sonra, ilk 20 dakika (etüvde), ardından ikisi 10'ar dakika olmak üzere üç farklı ksilen serisinde işleme tabi tutulmuştur. İlk dehidratasyon işlemi için kesitler beş farklı azalan alkol serisinden geçirilmiştir. Distile su ile çalkalanan kesitler beş dakika boyunca hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra, fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla kesitler beş dakika boyunca akan su altında yıkanmıştır. Daha sonra iki dakika boyunca eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyanmıştır. Boyama sonrası sırasıyla %70, %80, %96 ve iki seri absolü alkol serilerinden geçirilmiş ve kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika süreyle üç farklı ksilen serisinde bekletilmiştir. Son olarak kesitler entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır.

3.2.8. Değerlendirme

Alınan biyopsi örneklerinde allorejeksiyon ve nekroz patolojisi değerlendirmesi yapılmıştır. Bu amaçla, alıcı cilt altı dokusu ile verici kemik dokusunu birlikte içeren

histolojik kesitler hazırlanmış ve hücresel infiltrasyonlar ayrıntılı olarak aşağıdaki parametreler göz önünde bulundurularak incelenmiştir.

Rejeksiyon histopatolojisinde greft ve etrafında hücresel inlamasyon mevcuttur. Özellikle, T hücrelerinin baskın olduğu inflamatuar hücrelerin varlığı ile karakterizedir. Ayrıca vasküler hasar, endotel hücrelerinde inflamasyon ve nekroz odakları gözlenir, ayrıntılı şekilde incelendiğinde;

Hiperakut rejeksiyon histopatolojisinde hiperakut rejeksiyon, greft damarlarında yoğun polimorf nükleer lökosit (PMN) birikimi, geniş mikrotrombüs oluşumu ve trombosit kümelenmesi ile tanımlanan bir histolojik özelliktir. Vasküler bütünlük bozulabilir ve bu da kanama ile ortaya çıkabilir.

Akut rejeksiyon histopatolojisi greftin bağ dokusunda makrofajlar ile T hücrelerinin eşit dağılımıyla karakterize edilir. Eğer eş zamanlı bir enfeksiyon mevcut değilse, genellikle düşük miktarda polimorf nükleer lökosit (PMN) gözlenir. Erken akut rejeksiyon aşamasında, sadece birkaç küçük perivasküler infiltrasyon alanı fark edilebilir. Ancak, bu bölgeler zamanla genişleyerek büyük lökosit kümelenmelerine yol açabilir ve doku yapısını bozabilir. Vasküler dokularda görülen lökosit infiltrasyonu, çoğunlukla olumsuz bir prognozun habercisi olarak değerlendirilir. Rejeksiyon ilerledikçe, mikroskopik düzeyde doku hasarına rastlanabilir; bu, piknotik çekirdekler ve hücresel kalıntılar gibi doku tahribatı belirtilerini içerir.

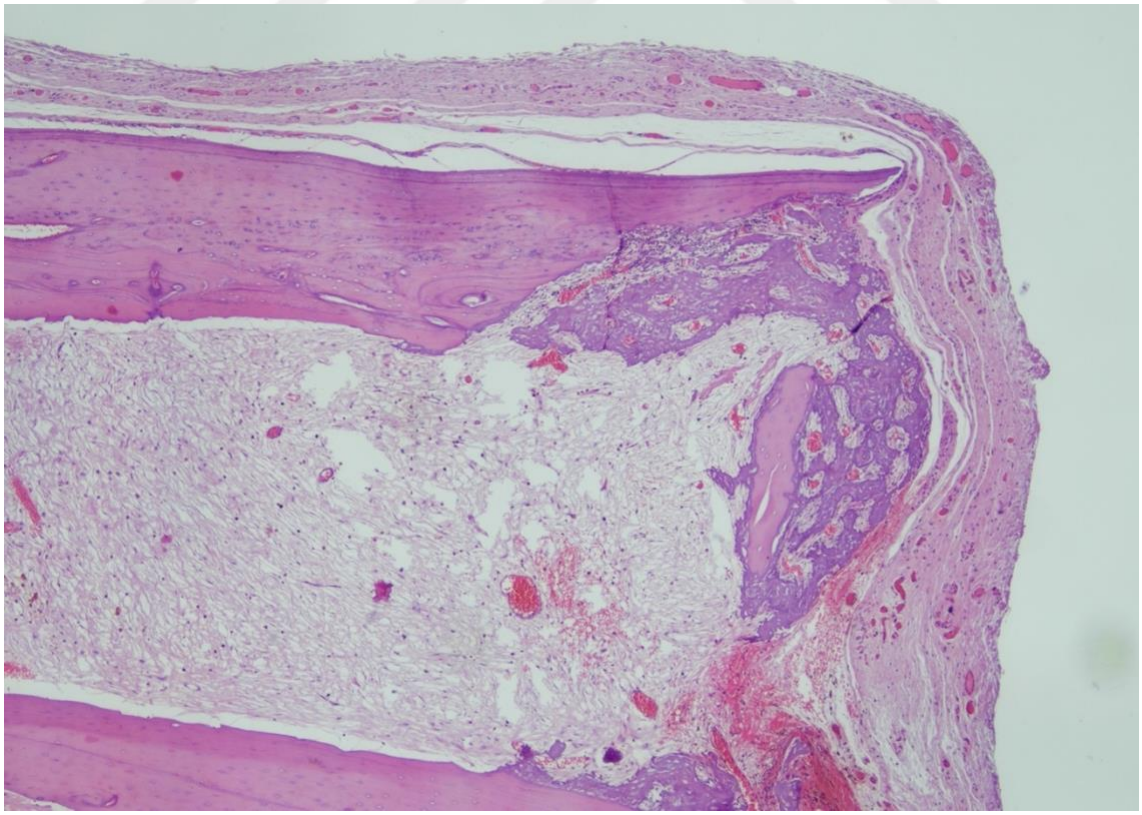
Kronik rejeksiyon histopatolojisi genellikle greftin büyük ve orta boy arterlerinde, bazen de damarlarında meydana gelen neointimal oluşum nedeniyle damar lümenlerinin daralması ile karakterize edilir. Bu neointimal yapıda, düz kas hücreleri ve bol miktarda ekstraselüler matriks maddesi gibi çeşitli bileşenler bulunur. Vasküler lezyonlar yalnızca greft bölgesiyle sınırlı kalır ve greft damarları, aynı alanda dahi farklı derecelerde etkilenmiş olabilir. Bu lezyonlar, ateroskleroz ile ilişkili olanlardan belirgin bir fark gösterir. Vasküler lezyonların ortaya çıkışı çoğunlukla belirgin interstisyel fibrozis ile birlikte olur ve bağ dokusu interstisyumda sürekli birikim gösterir. Lökosit infiltrasyonu ise genellikle hafif düzeyde ya da hiç olmayabilir. İlerleyen dönemlerde, ciddi doku hasarına, vasküler yetersizliğe ve greft parankim dokularının atrofisine yol açar, sonuç olarak greftin işlevini geri dönülemez biçimde kaybetmesine neden olur. Bu patolojik süreç yıllar sürebilir, ancak belirli fizyolojik ve immünolojik faktörler bu süreci, nakilden sonraki birkaç hafta içinde hızlandırabilir (67).

4. BULGULAR

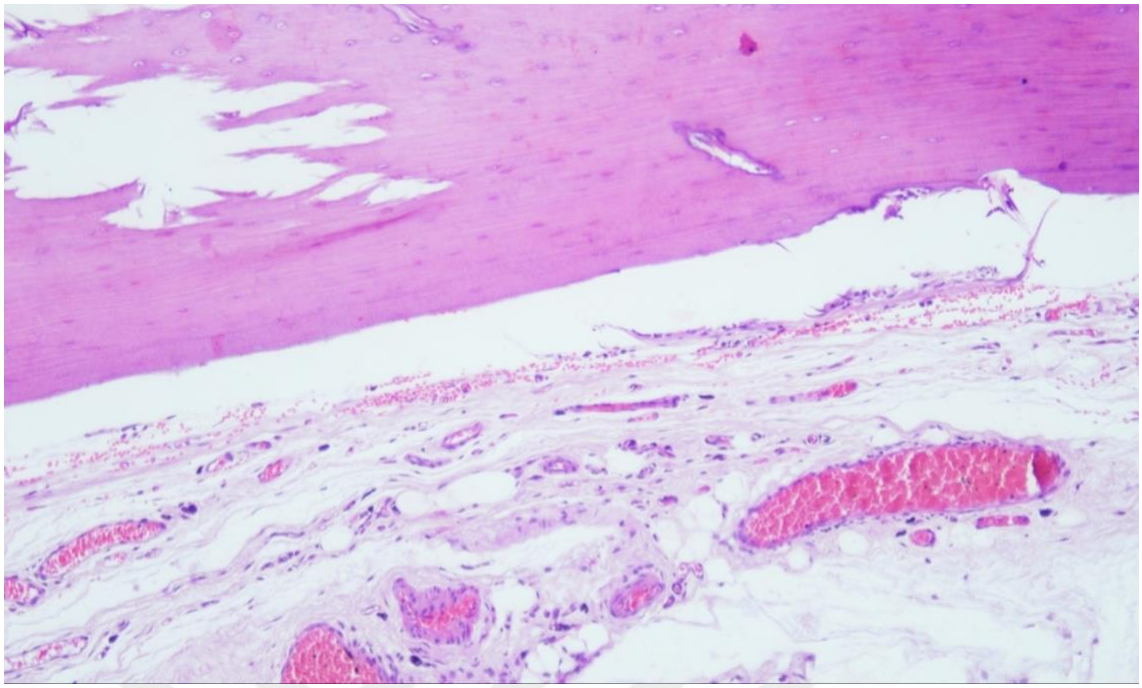
Tolerans oluşturma amacıyla allogreft yerleştirilip ilaç uygulanan çalışma grubundaki üç sıçanın tamamı deney süresince hayatta kalmış ve bu sıçanlardan histopatolojik preparatlar hazırlanmıştır. Buna karşın, allogreft yerleştirilip ilaç verilmeyen kontrol grubundaki üç sıçandan birisi genel anestezi komplikasyonu sonucu uyanamamış kalan iki sıçan için histopatolojik preparatlar hazırlanmıştır.

4.1. Gruplardaki Histopatolojik Mikroskobik Görünüm ve Yorumlar

İlaçların kesilmesini takiben 15 gün sonra çalışma grubundaki birinci sıçandan alınan kesitler x40 ve x100 olarak incelenmiştir (Resim 4.1 ve 4.2). Bu kesitlerde normal kemik dokusu ve stroma yapısında bütünlük olduğu görülmektedir. Rejeksiyon bulguları olan başlıca lenfosit infiltrasyonu olmak üzere nekrotik alanlar, vasküler konjesyon, fibröz dokular izlenmemektir.

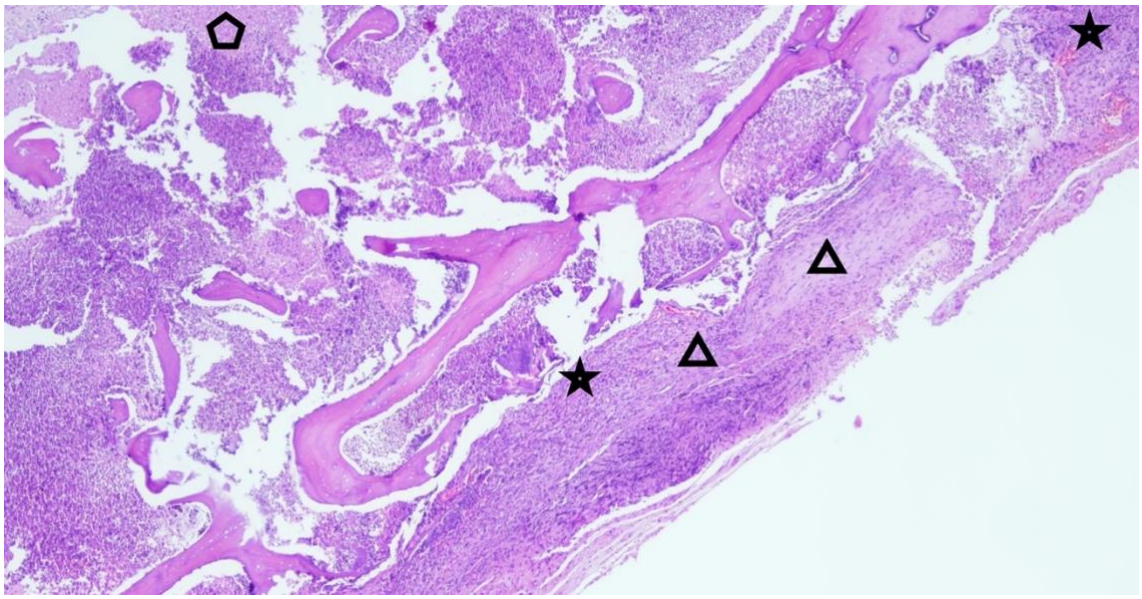


Resim 4.1: Birinci çalışma grubu (x40, H&E)

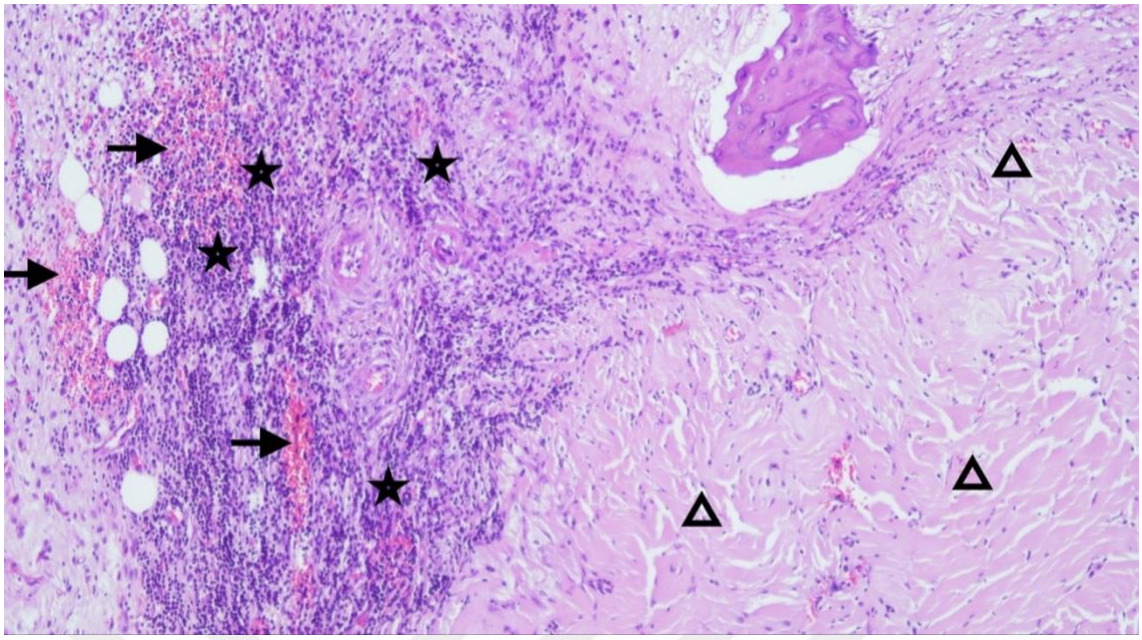


Resim 4.2: Birinci çalışma grubu (x100, H&E)

İlaçların kesilmesini takiben 15 gün sonra ilaç verilmeyen kontrol grubundaki ilk sıçndan alınan kesitler x40 ve x100 olarak incelenmiştir (Resim 4.3 ve 4.4). Akut rejeksiyonda görülen nekrotik alanlarla, vasküler konjesyon, fibröz dokular ve yaygın lenfosit infiltrasyonu izlenmektedir.

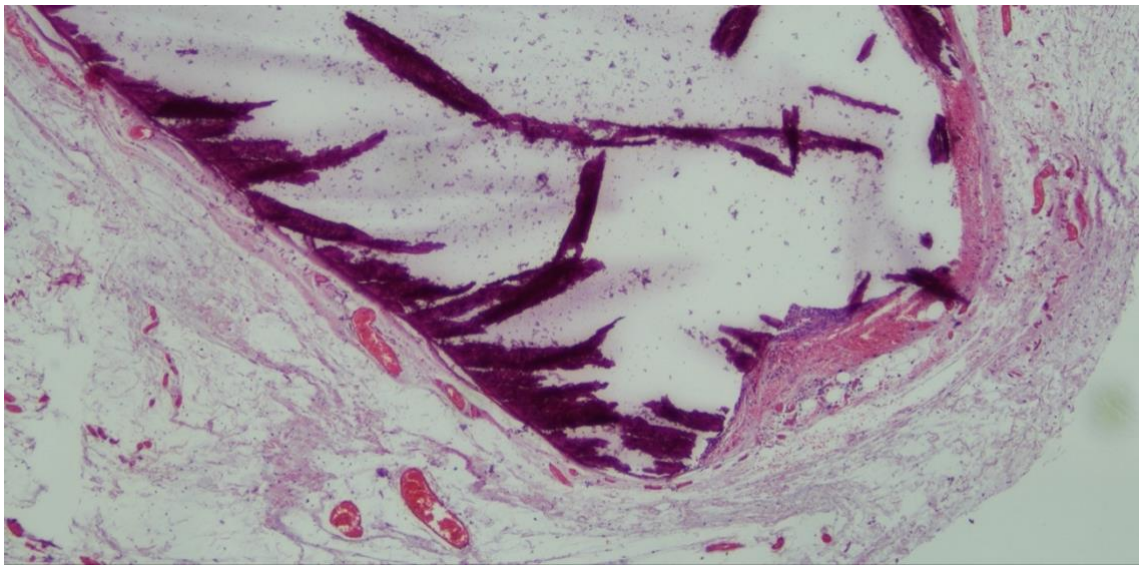


Resim 4.3: Birinci kontrol grubu (X40, H&E), (△Fibröz dokular, ★Lenfosit infiltrasyon alanları, ⬠ Nekrotik alanlar)

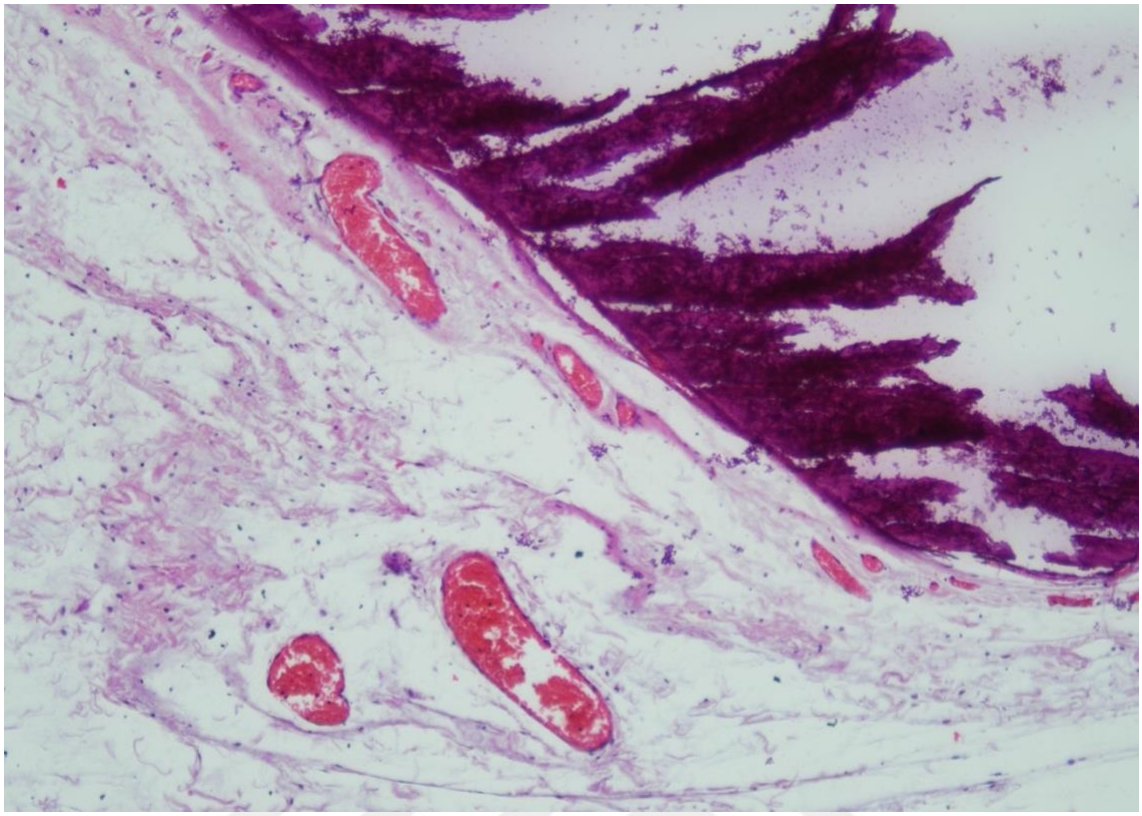


Resim 4.4: Birinci kontrol grubu (X100, H&E). (△ Fibröz dokular, ★ Lenfosit infiltrasyon alanları, ➡Vasküler konjesyon/Proliferasyon alanları)

İlaçların kesilmesini takiben 30 gün sonra çalışma grubundaki ikinci sıçandan alınan kesitler x40 ve x100 olarak incelenmiştir (Resim 4.5 ve 4.6). Bu kesitlerde, kemik dokusu ve stroma yapısında bütünlük olduğu görülmektedir. Rejeksiyon bulguları olan başlıca lenfosit infiltrasyonu olmak üzere nekrotik alanlar, vasküler konjesyon, fibröz dokular izlenmemektir.

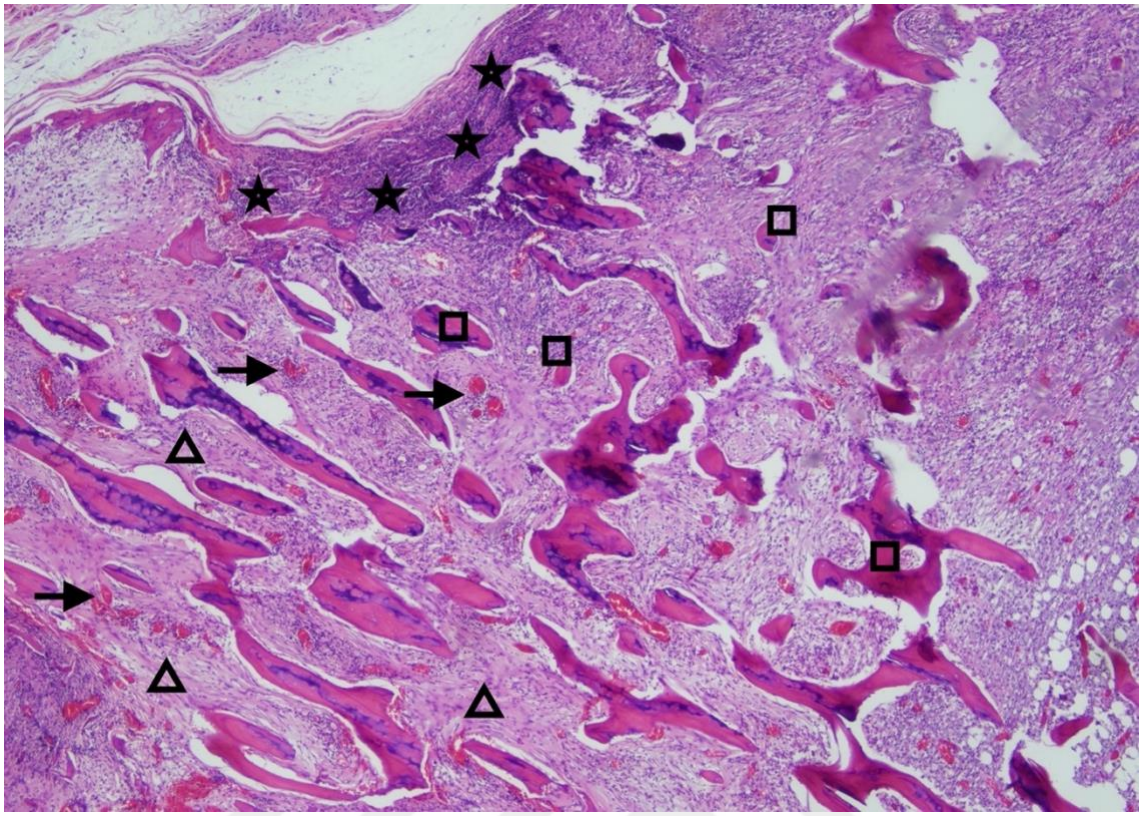


Resim 4.5: İkinci çalışma grubu (X40, H&E)

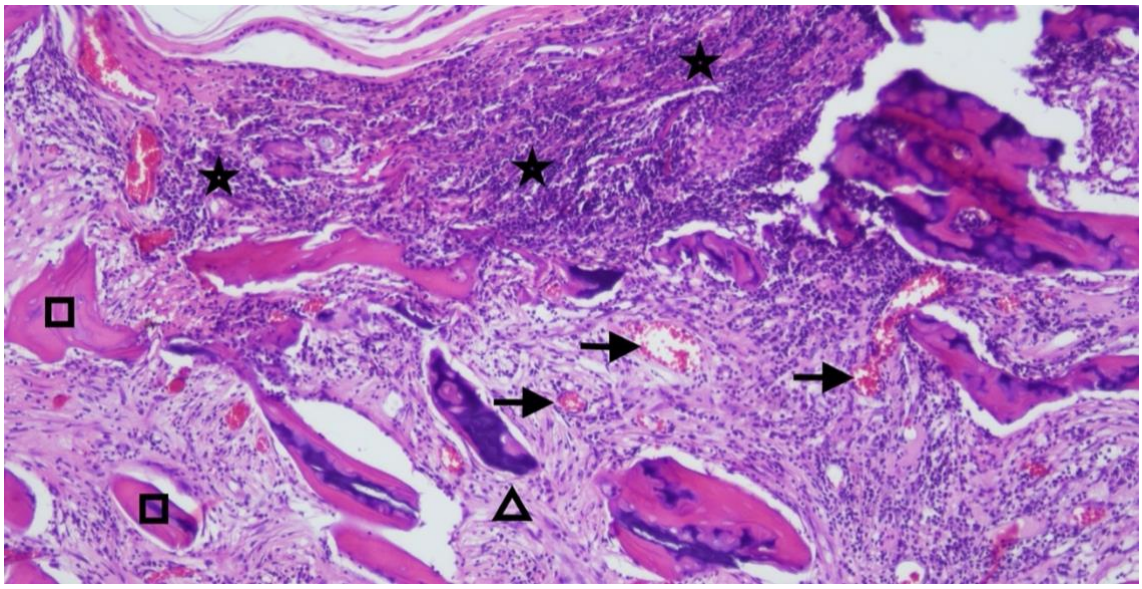


Resim 4.6: İkinci çalışma grubu (X40, H&E)

İlaçların kesilmesini takiben 30 gün sonra ilaç verilmeyen kontrol grubundaki ikinci sıçandan alınan kesitler x40 ve x100 olarak alınmıştır (Resim 4.7 ve 4.8). Akut rejeksiyonda görülen dejeneretif kemik alanları, nekrotik alanlarla, vasküler konjesyon, fibröz dokular ve yaygın lenfosit infiltrasyonu izlenmektedir.

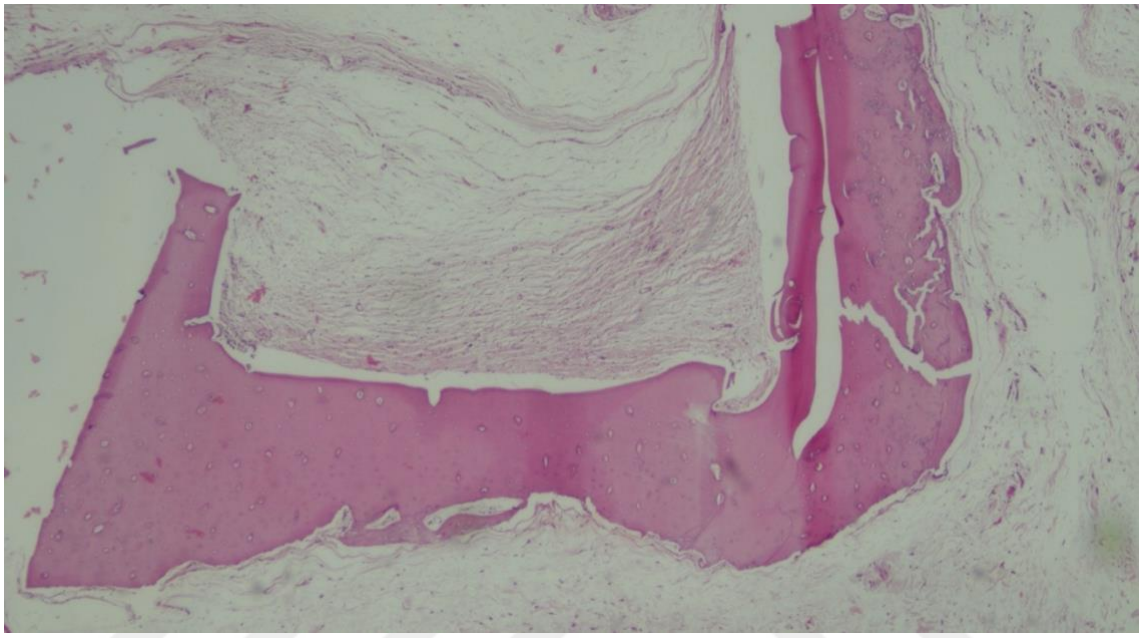


Resim 4.7: İkinci kontrol grubu (X40, H&E), (△ Fibröz dokular, □ Dejeneretif kemik alanları ★ Lenfosit İnfiltrasyon Alanları, ➡Vasküler konjesyon/Proliferasyon alanları)

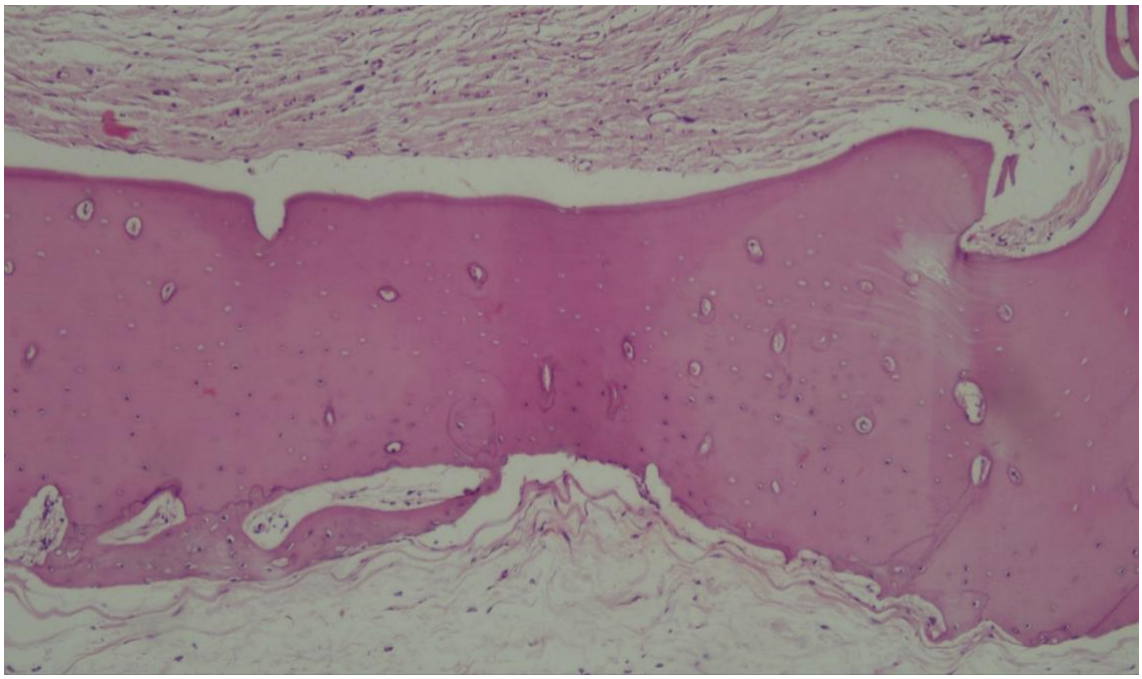


Resim 4.8: İkinci kontrol grubu (X100, H&E), (△ Fibröz dokular, □ Dejeneretif kemik alanları ★ Lenfosit infiltrasyon alanları, ➡Vasküler konjesyon/Proliferasyon alanları)

İlaçların kesilmesini takiben 45 gün sonra çalışma grubundaki üçüncü sıçandan alınan kesitler x40 ve x100 olarak incelenmiştir (Resim 4.9 ve 4.10). Bu kesitlerde normal kemik dokusu ve stroma yapısında bütünlük olduğu görülmektedir. Rejeksiyon bulguları olan başlıca lenfosit infiltrasyonu olmak üzere nekrotik alanlar, vasküler konjesyon ve fibröz dokular izlenmemektir.



Resim 4.9: Üçüncü çalışma grubu (X40, H&E)



Resim 4.10: Üçüncü çalışma grubu (X100, H&E)

5. TARTIŞMA

Sıçan modeli kullanılarak yapılan deneysel çalışmamızda, donörden alınan ve alıcının cilt altına yerleştirilen kemik allogreftlerine karşı operasyonel immünolojik tolerans geliştirmek amacıyla abatacept, siklosporin A ve baziliximab gibi immünsüpresif ve immünmodülatör ajanlar uygulanmıştır. Sonuçlar, bu ajanların kullanımıyla istenilen histopatolojik bulgulara ulaşıldığını göstermektedir. Organ ve doku nakillerinde sıklıkla görülen lenfosit infiltrasyonu, yani rejeksiyon bulgusu, çalışma grubunda gözlemlenmemiştir. İlaç verilmeyen kontrol grubunda ise aşırı lenfosit infiltrasyonu tespit edilmiştir. Bu bulgular, operasyonel immünolojik toleransın sağlanabileceğini ve nakil rejeksiyonunun önlenebileceğini ortaya koymaktadır.

Benzer çalışmalarda, immünsüpresif ilaç kullanılmayan allogreft nakli yapılan durumlarda, rejeksiyon belirteci olarak yaygın lenfosit infiltrasyonu rapor edilmiştir. Pradka SP ve arkadaşları "Rat Muskulokütanöz Allotransplantasyon Modelinde İskemik Süre ile Artan Akut Red Yanıtı Belirtileri" başlıklı çalışmasında, vaskülarize epigastrik flepler Wistar Kyoto (WKY) sıçanlarından Fisher türü sıçanlara nakledilmiştir. Operasyon sonrası dönemde, allogreftler günlük olarak akut rejeksiyon belirtileri açısından incelenmiş ve eritem, eksudasyon, ödem, deskuamasyon ile flapte ilerleyici büzülme gibi nekroz belirtileri gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, cilt altı dokular, yağ ve kas katmanları lenfosit infiltrasyonu açısından ayrı ayrı değerlendirilmiş ve deri ile kas dokularında agresif ve yaygın lenfosit infiltrasyonuna bağlı rejeksiyon belirtileri tespit edilmiştir (37). Rejeksiyon belirtilerinin ortaya çıkmaması için tolerans çalışmalarında MHC uyumsuzluğu olan nakillerde, donöre karşı oluşan MHC antikorları; ABO uyumsuz nakillerde ise verici A ve B antijenlerine karşı gelişen antikorların varlığında, hiperakut doğal bağışıklık yanıtı ve allorejeksiyon tetiklenebileceği için dikkate alınması gereklidir (68). Ayrıca Th1 hücreleri ve onun sitokinleri hücresel yanıtı başlatıp rejeksiyona sebep olurken, Th2 hücreleri hümoral cevapta görev alır. Th2 hücreleri, immün cevabı baskılayıcı sitokin olan IL-10'u salgılayarak immün yanıtı kontrol eder ve allogreft kabulünü artırabilir. Th1 hücre ve Th2 hücre dengesi, allogreftin kabul edilmesinde önemli bir faktördür (36). ASH'ler, alloantijenlerin sunulması yoluyla hücresel immün yanıtın oluşumuna katkıda bulunmaktadır (69). İmmün regülatör ve allojenik yanıtı düzenleyen Treg hücrelerinin yüksek oranı, allotolerans sağlanmasına ve allogreft

kabulüne katkıda bulunur (70). Allogreftte iskemik veya travmatik hasar meydana gelmesi ya da posttransplantasyonel enfeksiyonların gelişmesi, doğal immün sistemin aktivasyonunu tetikleyerek akut rejeksiyon ataklarının sıklığını artırır (36,37,71).

Tosyalıoğlu'nun gerçekleştirdiği çalışmada, tolerans oluşturmak amacıyla yağ doku kökenli mezenkimal kök hücreler (ADAS), immun modülatör özellikleri nedeniyle kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelere (MSC) alternatif bir strateji olarak düşünülmüştür. ADAS'ların kemik iliği kökenli MSC'lerle aynı immün modülatör özelliklere sahip olduğu deneysel olarak gösterilmiş ve ADAS'ların daha kolay ve hızlı elde edilebilmesi, onları immün modülasyon ve tolerans indüksiyonu için uygun bir seçenek haline getirmiştir. Donör kökenli ADAS'ların intravenöz (IV), lokal subkütan (SC) ve her iki yöntemin birlikte uygulanmasının, allogreft rejeksiyon süreci ve allogreftin yaşam süresi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmanın sonunda, immünsüpresif ajan kullanılmaksızın yapılan deri allogrefti uygulamalarında, donör kökenli ADAS tedavisinin tüm gruplarda allogreft yaşam süresini uzattığı ve rejeksiyon sürecini geciktirdiği tespit edilmiştir. Ancak çalışmada yer alan tüm gruplarda rejeksiyon belirtilerine rastlanmıştır. MSC'lerin ve ADAS'ların immün modülatör etkilerinin literatürde geniş yer bulduğunu ve ADAS'ların MSC'lerle benzer özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur (72).

Çalışmamızda, IL-2 reseptörünün (CD25) alfa alt birimine karşı insanlaştırılmış rekombinant monoklonal IgG1 kappa antikoru olan Basiliximab kullanılmıştır. Basiliximab'ın, katı organ transplantasyonlarında akut hücresel reddi azaltarak, uzun dönem greft ve hasta sağkalımını iyileştirdiği kanıtlanmıştır (73,74).

Ayrıca, transplant reddini önlemek amacıyla Siklosporin de kullanılmıştır. Siklosporin, bir kalsinörin inhibitörü olup organ nakli sonrası reddi önlemek için yaygın olarak kullanılan bir immünosüpresif ajandır (75–77) .

Çalışmamızda immüntolerans stratejilerinden biri olan ko-sitimülasyon blokajı için ise Abatacept kullanılmıştır.

Abatacept, CTLA-4 Ig olarak adlandırılan bir füzyon proteinidir ve T hücre kostimülasyon sinyalini düzenlemek için CD28 ile CD80/86 sinyal yolağını hedef alır. Bu protein, CTLA-4'ün hücre dışı bağlanma bölgesinin insan IgG1'in ağır zincir sabit bölgesine füzyon edilmesiyle oluşturulmuştur. IgG1 eklenmesi, CTLA-4'ün çözünürlüğünü artırarak CD80/86 için çözünür bir reseptör rolü üstlenmesini sağlar.

Abatacept, ASH’lerde CD80'e, CD28'e göre daha yüksek afiniteyle bağlanarak CD28 sinyalini inhibe eder. Bu bağlanma, T hücre proliferasyonunun aşağı regülasyonuna ve hümoral immün yanıtın baskılanmasına neden olur (78)

Ancak, abatacept, FDA tarafından yalnızca yetişkin romatoid artrit, juvenil idiyopatik artrit ve yetişkin aktif psoriatik artrit tedavisi için onaylanmıştır. CTLA-4 sinyal yolunun otoimmün hastalıklardaki önemli rolü göz önünde bulundurulduğunda, abatacept'in diğer sistemik romatizmal hastalıkların tedavisinde de potansiyel olarak etkili olabileceği düşünülmektedir (78).

Charlotte Uro-Coste ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir vaka serisi çalışmasında, abatacept'in romatoloji alanında yaygın bir kullanım alanına sahip olduğu ve romatoid artrit tedavisinde önemli bir rol oynadığı vurgulanmıştır. Bunun yanı sıra, abatacept'in böbrek nakli geçiren hastalarda idame tedavisi olarak sadece nadiren kullanıldığı da belirtilmiştir (79).

Çalışmamızın ana hedefi, immünsüpresif ilaçların belirli bir süre boyunca kullanılması yoluyla immün tolerans sağlamaktır. Bu yöntem, immünsüpresif ilaçların uzun süreli kullanımı sonucu ortaya çıkabilecek yan etkileri en aza indirmeyi amaçlamaktadır (79).

Aleksandra Klimczak ve arkadaşlarının kompozit doku allogreftleri üzerine yaptığı araştırmada, kompozit doku allogreftlerinin (CTA), solid organ nakilleri ile karşılaştırıldığında, antijeniklik seviyelerindeki farklılıklar nedeniyle reddedilme sürecinin farklı hücresel ve hümoral mekanizmalarla ilerlediği ifade edilmiştir. Çalışma, özellikle cilt dokusunun CTA'nın en immünojenik bileşeni olduğunu ve bu nedenle solid organ nakillerine kıyasla daha güçlü bir immünsüpresyon gerektirdiğini vurgulamaktadır. Bununla birlikte, immünsüpresif ilaçlar transplant alıcılarının yaşam süresini önemli ölçüde uzatmış olsa da ciddi yan etkiler hala transplantasyon alanında büyük bir problem teşkil etmektedir. Günümüzde klinikte yaygın olarak kullanılan modern immünsüpresifler, özellikle kalsinörin inhibitörleri, nefropati, hipertansiyon, hiperglisemi, hiperlipidemi ve post-transplant diyabet gibi yan etkilere sebep olabilmektedir. Mykofenolat mofetil (MMF) gastrointestinal rahatsızlıklar ve lökopeniye yol açabilirken, steroidler hipertansiyon, diyabet, kilo artışı, osteoporoz, gastrointestinal sorunlar ve kötü yara iyileşmesi gibi komplikasyonlara neden olabilmektedir. Uzun süreli immünsüpresyon, fırsatçı enfeksiyon riskini artırarak alogreft başarısızlığına zemin

hazırlayabilir. Kronik immünsüpresyonun en ciddi yan etkilerinden biri ise, kalsinörin inhibitörleri veya antimetabolitlerin uzun süreli kullanımı ile malignite riskinin artmasıdır. Ayrıca, anti-CD3 monoklonal antikorları veya antilenfosit antikorları ile yapılan indüksiyon tedavilerinin post-transplant lenfoproliferatif hastalık (PTLD) gelişimine yol açabileceği belirtilmiştir (36).

Ayrıca, solid organ nakli yapılan hastalar, uzun yıllar boyunca birçok ilaç kullanmak zorunda kaldıkları için ilaç kullanımına uyum konusunda zorluklar yaşayabilmektedirler. İmmünsüpresif ilaçların düzgün bir şekilde kullanılmaması, tedavinin başarısını olumsuz etkileyerek rejeksiyon, greft kaybı ve hatta ölüm gibi ciddi sonuçlara neden olabilmektedir (80) .

Bu sıçan deney modelimizde, çalışma grubunda cilt altına yerleştirilen kemik allogreftine karşı başarılı bir immünolojik tolerans sağlanmıştır. Otojen kemik greftlerine alternatif olarak değerlendirilen immüntolerans destekli allogreft uygulamaları, otojen greftlerin sağladığı avantajları muhafaza ederken, sınırlı kaynaklar ve donör morbiditesi gibi dezavantajları ortadan kaldırabilecek potansiyel bir çözüm sunmaktadır.

Travma, konjenital anomaliler, kemik enfeksiyonları, kas iskelet sistemi tümör cerrahisi, revizyon artroplasti ve spinal cerrahi gibi rekonstrüktif işlemler sırasında ortaya çıkan kemik defektlerini tedavi etmek için kemik greftleri ve alternatif kemik materyalleri giderek daha sık kullanılmaktadır (25,26)

Tedavi amacıyla kullanılacak "ideal" greftin, alıcı bölgenin yapısına uygun olması, kolaylıkla ve bol miktarda elde edilebilmesi, ayrıca donör alan morbiditesinin minimal düzeyde olması beklenmektedir. Otojen kemik greftlerinin sınırlı miktarda temin edilebilmesi ve önemli düzeyde donör alan morbiditesine neden olması, allojen ve ksenojen greftlerin ise immünolojik sorunlara yol açması, biyoaktif materyallerin kullanımının yaygınlaşmasına ve alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi yönünde yapılan deneysel çalışmalara zemin hazırlamıştır (81).

Greftin içerisindeki hücresel elemanların, kemik bütünleşmesi sağlanana kadar canlılıklarını koruyarak alıcı bölgede yeni kemik oluşumunu desteklemeleri gerekmektedir. Kemik grefti, eğer kemik oluşturan canlı hücreleri barındırıyorsa osteojenik olarak kabul edilir. Otojen kemik, nakledildiği anda veya yerine geçen materyaller otojenik kemik hücreleri ile zenginleştirildiğinde osteojenik özellik kazanır (82,83)

Çalışmamızda kullanılan immünsüpresif ilaçlarla elde edilen immüntolerans, nakledilen kemik allogreftinin osteojenik aktivitesinin devam etmesine imkan sağladığından, büyük kemik defektlerinin kapatılmasında ideal bir tedavi yöntemi olma potansiyeline sahiptir. Ancak deneysel çalışmada eksik kalan nokta, oluşturulan operasyonel immüntoleransın kesintiye uğrayıp uğramadığı hakkındaki bilginin deney sonlandığı için tespit edilememesidir. Literatür taramasında benzer bir çalışmaya rastlanmadığından, immüntoleransın izlenmesi gelecekte yapılacak araştırmalardan elde edilecek sonuçlarla karşılaştırılarak değerlendirilebilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ko-sitümülasyon blokajı stratejisi kullanılarak sıçanlarda deri altına yerleştirilen kemik allogreftlerinin reddini önlemek ve operasyonel immün tolerans geliştirmek amacıyla deney planlanmıştır. Deneyde immünsüpresif ve immün modülatör ajanlar olarak Abatacept, Siklosporin ve Basiliximab tercih edilmiştir. Literatürde bu konuda yapılan çalışmaların sınırlı olması, tolerans indüksiyonuna dair daha fazla araştırmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Tolerans kavramı, ilk olarak 1945 yılında Ray Owen tarafından tanımlanmış olup, günümüzde halen araştırılmakta olan bir konudur. Allogreft doku ve organ reddi, immünsüpresif ilaçlar olmadan mevcut immün tolerans stratejileri ile henüz tam anlamıyla önlenememiştir. Bu bağlamda immün modülasyon stratejilerinin ana amacı, immün tolerans oluşturmak ve immünsüpresif ilaç dozlarını minimum seviyede tutarak yan etkileri azaltmaktır.

İnsanlarda, fonksiyonel ve estetik deformitelerin tedavisi, otolog rekonstrüksiyon imkânlarının tükenmesi durumunda çoğunlukla ortez ve protez uygulamalarıyla sınırlı kalmaktadır. Ancak doku mühendisliği, kök hücre ve gen tedavilerindeki ilerlemeler, immünolojik mekanizmaların daha iyi anlaşılması ile yeni immün tolerans stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu çalışmanın da immün tolerans oluşturma stratejilerine katkı sağlaması beklenmektedir. Özellikle büyük kemik defektlerinin allogreftler ile kapatılabilmesi, immünsüpresif ilaçların ömür boyu kullanımını gereksiz kılacak önemli gelişmelerin önünü açabilir.

Büyük kemik defektlerinin otolog greftlerle kapatılmasının zorlukları, allogreftler ile ilgili immün tolerans oluşturma stratejilerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yapılan in vitro deneyde, Abatacept, Siklosporin ve Basiliximab kullanılarak kemik allogreftlerine karşı anlamlı bir immün tolerans elde edilmiştir. Histopatolojik bulgulara göre lenfosit infiltrasyonuna rastlanmamıştır. Çalışma grubundaki sıçanlarda, adaptif immün cevabın zirveye ulaştığı 15 günlük süreç dikkate alındığında, alınan dokularda normal histolojik görünüm elde edilmiştir. Buna karşılık, kontrol grubunda beklenen allogreft reddi belirtileri, yaygın lenfosit infiltrasyonu, damarların konjesyonu, fibrotik ve nekrotik alanlar şeklinde gözlemlenmiştir.

İmmünsüpresif ve immün modülatör ilaçların dozaj ve uygulama süreleri konusunda daha fazla hayvan deneyi ve literatür birikimine ihtiyaç duyulmaktadır. Gelecekteki öneriler arasında, sıçan deney modelinde oluşturulan operasyonel immün toleransın takibi ile ilgili daha fazla bilgi edinmek için benzer ilaçların kullanılması, sıçan sayısının artırılması ve sıçanların doğal yaşam sürelerinin tamamına kadar izlenmesi bulunmaktadır. Ayrıca, kemik allogreftlerine karşı geliştirilen immün toleransın moleküler ve immünolojik mekanizmalarını daha iyi anlamak amacıyla ek in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kemik allogreftlerine karşı immün tolerans geliştirilmesi, immünoloji alanında olduğu kadar rekonstrüktif işlemler sırasında da önemli bir tedavi seçeneği sunacaktır. Otolog kaynakların yetersiz kaldığı vakalarda, allogreft kullanımının daha yaygın ve etkin bir şekilde kullanılmasına öncülük etmesi beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. Crit Rev Biomed Eng. 2012;40(5):363–408.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier - Health Sciences Division; 2021.
3. Abbas AK LAH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Phiadelphia: W B Saunders; 2006. . Phiadelphia: W B Saunders; 2005. 16–39 p.
4. Rabb H. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: Implications for the kidney. Kidney Int. 2002 Jun;61(6):1935–46.
5. Charles AJ PTMWDJC. The recognation of antigen. 4th ed. New York; 1999. 79–163 p.
6. Francis DMA, Dumble LJ, Bowes L, Clunie GJA, Macdonald IM. Adverse Influence Of Recipient Lymphoid Resistance To In Vitro Immunosuppression On The Outcome Of Kidney Transplants. Transplantation. 1988 Dec;46(6):853–7.
7. Sumitran-Holgersson S. HLA-specific alloantibodies and renal graft outcome. Nephrology Dialysis Transplantation. 2001 May 1;16(5):897–904.
8. Pirim İ ÖGZENEA. Validation of Anti-HLA Antibodies in Serum of Blood Transfused or Organ Transplanted Patients. Eurasian J Med. 2007;181–4.
9. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol Rev. 2001 Aug 14;182(1):18–32.
10. Trowsdale J CRD. The 12th International MHC map genetic diversity of HLA. 1997;8.
11. Kuby J. Majör Histocompatibility complex. Immunology. 3rd ed. 1997. 224–240 p.
12. Abbas AK. LAH, PJS. The Major Histocompatibility Complex. Cellular and moleculer Immunology. 2nd ed. 1994. 104–114 p.
13. Kelly AP, Monaco JJ, Cho S, Trowsdale J. A new human HLA class II-related locus, DM. Nature. 1991 Oct;353(6344):571–3.
14. Greenberg A. Primer on Kidney Diseases. 4th ed. NKF, editor. Philadelphia, PA: Saunders; 2005. 444–445 p.
15. Resnick MI, Schaeffer AJ, Sahn SA, Heffner JE, Yaman Ö, Anafarta K. Böbrek Nakli El Kitabı. 3rd ed. Tuncer Karpuzoğlu, editor. Güneş Kitapevi; 2003. 17–37 p.
16. Trivedi HL. Immunobiology of rejection and adaptation. Transplant Proc. 2007 Apr;39(3):647–52.
17. Liu W, Xiao X, Demirci G, Madsen J, Li XC. Innate NK Cells and Macrophages Recognize and Reject Allogeneic Nonself In Vivo via Different Mechanisms. The Journal of Immunology. 2012 Mar 15;188(6):2703–11.
18. Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition. Curr Opin Organ Transplant. 2016 Feb;21(1):40–4.
19. Okumi M, Fishbein JM, Griesemer AD, Gianello PR, Hirakata A, Nobori S, et al. Role of Persistence of Antigen and Indirect Recognition in the Maintenance of Tolerance to Renal Allografts. Transplantation. 2008 Jan 27;85(2):270.
20. Burd A, Lam PK, Lau H. Allogenic skin: transplant or dressing? Burns. 2002 Jun;28(4):358–66.
21. Callaghan C, Bradley JA. Principles of Transplantation. Surgery (Oxford). 2003 Apr;21(4):iii–vi.
22. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. ANZ J Surg. 2001 Jun;71(6):354–61.
23. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop Relat Res. 2000 Feb;(371):10–27.
24. Fleming JE, Cornell CN, Muschler GF. Bone Cells and Matrices in Orthopedic Engineering. Orthopedic Clinics of North America. 2000 Jul;31(3):357–74.
25. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions, and Applications. The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume. 2001;83:98–103.
26. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of Calcium Phosphate-Based Cancellous Bone Void Fillers in Trauma Surgery. Orthopedics. 2002 May;25(5).
27. Abbas AK LAPS. Cellular and molecular immunology. Elsevier Health Sciences; 2014.
28. Cai J, Terasaki PI. Humoral Theory of Transplantation: Mechanism, Prevention, and Treatment. Hum Immunol. 2005 Apr;66(4):334–42.

29. Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. Curr Opin Immunol. 2005 Oct;17(5):541–5.
30. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. Immunol Rev. 2003 Dec 10;196(1):51–64.
31. Aw MM. Transplant immunology. J Pediatr Surg. 2003 Sep;38(9):1275–80.
32. Wallace CJ, Kingsmore DB. Transplantation and immunosuppressive therapy. Anaesthesia & Intensive Care Medicine. 2006 Jun;7(6):196–9.
33. Kinnear G, Jones ND, Wood KJ. Costimulation Blockade. Transplantation. 2013 Feb 27;95(4):527–35.
34. Rotrosen D, Matthews b JB, Bluestone JA. The immune tolerance network: A new paradigm for developing tolerance-inducing therapies. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002 Jul;110(1):17–23.
35. Siemionow M, Klimczak A. Basics of Immune Responses in Transplantation in Preparation for Application of Composite Tissue Allografts in Plastic and Reconstructive Surgery: Part I. Plast Reconstr Surg. 2008 Jan;121(1):4e–12e.
36. Klimczak A, Siemionow M. Immune Responses in Transplantation: Application to Composite Tissue Allograft. Semin Plast Surg. 2007 Nov;21(4):226–33.
37. Pradka SP, Ong YS, Zhang Y, Davis SJ, Baccarani A, Messmer C, et al. Increased Signs of Acute Rejection With Ischemic Time in a Rat Musculocutaneous Allotransplant Model. Transplant Proc. 2009 Mar;41(2):531–6.
38. Mundinger GS, Drachenberg CB. Chronic rejection in vascularized composite allografts. Curr Opin Organ Transplant. 2014 Jun;19(3):309–14.
39. Sprent J, Webb SR. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. Curr Opin Immunol. 1995 Apr;7(2):196–205.
40. Smilek DE, Ehlers MR, Nepom GT. Restoring the balance: immunotherapeutic combinations for autoimmune disease. Dis Model Mech. 2014 May 1;7(5):503–13.
41. Fuchs EJ. Transplantation tolerance: from theory to clinic. Immunol Rev. 2014 Mar 11;258(1):64–79.
42. Auchincloss H. In Search of the Elusive Holy Grail: the Mechanisms and Prospects for Achieving Clinical Transplantation Tolerance. American Journal of Transplantation. 2001 May;1(1):6–12.
43. Remuzzi G. Cellular basis of long-term organ transplant acceptance: Pivotal role of intrathymic clonal deletion and thymic dependence of bone marrow microchimerism-associated tolerance. American Journal of Kidney Diseases. 1998 Feb;31(2):197–212.
44. Wells AD, Li X, Strom TB, Turka LA. T–cell death and transplantation tolerance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001 May 29;356(1409):407–16.
45. Wekerle T. Transplantation tolerance induced by mixed chimerism. The Journal of Heart and Lung Transplantation. 2001 Aug;20(8):816–23.
46. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. Transpl Immunol. 2007 Feb;17(2):120–9.
47. Yamazaki S, Steinman RM. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. J Dermatol Sci. 2009 May;54(2):69–75.
48. Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. Transpl Immunol. 2004 Sep;13(2):117–30.
49. Leonard DA, McGrouther DA, Kurtz JM, Cetrulo CL. Tolerance Induction Strategies in Vascularized Composite Allotransplantation: Mixed Chimerism and Novel Developments. Clin Dev Immunol. 2012;2012:1–8.
50.Kawai T, Cosimi AB, Sachs DH. Preclinical and clinical studies on the induction of renal allograft tolerance through transient mixed chimerism. Curr Opin Organ Transplant. 2011 Aug;16(4):366–71.
51. Liu Z. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I- restricted CD8+CD28- T cells. Int Immunol. 1998 Jun 1;10(6):775–83.
52. Suciu-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. Transpl Immunol. 2003 Jul;11(3–4):235–44.
53. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? Int Immunol. 2009 Oct 1;21(10):1105–11.
54. Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. Journal of Clinical Investigation. 2004 Nov 15;114(10):1398–403.
55. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol. 2005 Apr 22;6(4):345–52.
56. Wan YY, Flavell RA. How Diverse--CD4 Effector T Cells and their Functions. J Mol Cell Biol. 2009 Oct 1;1(1):20–36.

57. Page E, Kwun J, Oh B, Knechtle S. Lymphodepletional Strategies in Transplantation. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 Jul 1;3(7):a015511–a015511.
58. Salisbury EM, Game DS, Lechler RI. Transplantation tolerance. Pediatric Nephrology. 2014 Dec 10;29(12):2263–72.
59. Ardavín C, Amigorena S, e Sousa CR. Dendritic Cells. Immunity. 2004 Jan;20(1):17–23.
60. Sim WJ, Ahl PJ, Connolly JE. Metabolism Is Central to Tolerogenic Dendritic Cell Function. Mediators Inflamm. 2016;2016:1–10.
61. Kuo YR, Huang CW, Goto S, Wang CT, Hsu LW, Lin YC, et al. Alloantigen-Pulsed Host Dendritic Cells Induce T-Cell Regulation and Prolong Allograft Survival in a Rat Model of Hindlimb Allotransplantation. Journal of Surgical Research. 2009 May;153(2):317–25.
62. Steiner R, Pilat N. The potential for Treg-enhancing therapies in transplantation. Clin Exp Immunol. 2023 Mar 16;211(2):122–37.
63. Vanrenterghem Y, Bresnahan B, Campistol J, Durrbach A, Grinyó J, Neumayer HH, et al. Belatacept-Based Regimens Are Associated With Improved Cardiovascular and Metabolic Risk Factors Compared With Cyclosporine in Kidney Transplant Recipients (BENEFIT and BENEFIT-EXT Studies). Transplantation. 2011 May 15;91(9):976–83.
64. Medina Pestana JO, Grinyo JM, Vanrenterghem Y, Becker T, Campistol JM, Florman S, et al. Three-Year Outcomes From BENEFIT-EXT: A Phase III Study of Belatacept Versus Cyclosporine in Recipients of Extended Criteria Donor Kidneys. American Journal of Transplantation. 2012 Mar;12(3):630–9.
65. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobertb E, et al. Rational Development of LEA29Y (belatacept), a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties. American Journal of Transplantation. 2005 Mar;5(3):443–53.
66. Wood KJ. Gene therapy and allotransplantation. Curr Opin Immunol. 1997 Oct;9(5):662–8.
67. VanBuskirk AM. Transplantation Immunology. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 1997 Dec 10;278(22):1993.
68. Somasundaran M, Quiroga I. Principles in transplantation: immunology. Surgery (Oxford). 2011 Jul;29(7):295–300.
69. Alpdogan O, van den Brink MRM. Immune Tolerance and Transplantation. Semin Oncol. 2012 Dec;39(6):629–42.
70. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4+CD25+ and CD4+CD25− Regulatory Cells Mediate Dominant Transplantation Tolerance. The Journal of Immunology. 2002 Jun 1;168(11):5558–65.
71. Goldstein DR. The Identity of Innate Immune Activators in Organ Transplantation: Origins from Within or Exterior to the Host? American Journal of Transplantation. 2007 Jul;7(7):1692–4.
72. Bilge Anıl Tosyalıoğlu. Sıçanlarda Allogreft Rejeksiyonunun Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İle İmmünmodulasyonu . [İzmir]: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı; 2016.
73. Hoofnagle JH. LiverTox. In: Drug-Induced Liver Disease. Elsevier; 2013. p. 725–32.
74. Vial T, Descotes J, Braun F, Behrend M. Drugs that act on the immune system: cytokines and monoclonal antibodies. In 2005. p. 415–49.
75. Tapia C, Nessel TA, Zito PM. Cyclosporine. 2024.
76. Nahide Onsun. Siklosporin. Istanbul: Turkderm-Turkish Archives of Dermatology and Venereology; 2016. 26–28 p.
77. Kyriakides G, Miller J. Use of cyclosporine in renal transplantation. Transplant Proc. 2004 Mar;36(2):S167–72.
78. Penn SK, Moreland LW. Abatacept. In: Rheumatoid Arthritis. Elsevier; 2009. p. 356–61.
79. Uro-Coste C, Atenza A, Heng AE, Rouzaire PO, Garrouste C. Abatacept Rescue Therapy in Kidney Transplant Recipients: A Case Series of Five Patients. Transpl Int. 2022;35:10681.
80. Ozdemir Koken Z, Talas M. Solid Organ Transplantasyonu Sonrası İmmünsupresif İlaç Kullanımına Uyum. 2017 Nov 17;
81. Altan A, Damlar İ. Dental İmplant Cerrahisinde Kullanılan Ağız Dışı Otojen Kemik Greftleri. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi. 2015 Sep 30;7(27).
82. Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts. J Bone Joint Surg Br. 2007 May;89-B(5):574–80.
83. Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone Graft Materials and Synthetic Substitutes. Radiol Clin North Am. 2006 May;44(3):451–61.

EK

Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 07.11.2022-13291

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 27.10.2022
Toplantı Sayısı : 10
Karar Sayısı : 01

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü İmmünoloji Ana Bilim Dalı **Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ**'ın "Kemik Artırımı Amacıyla Kullanılan Kemik Allogreftine Karşı İmmün Tolerans Oluşturma" başlıklı bilimsel çalışma önerisi 27.10.2022 tarihli sayılı toplantıda Etik Kurulumuz tarafından görüşülmüş olup, etik açıdan **"uygun"** olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Aslı Gibidir
Prof. Dr. Ülkan KILIÇ
HADYEK Başkanı

Evrakı Doğrulamak İçin : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSP58S1BFB&eS=13291

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.