T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BÖBREK TAŞI İLE İLİŞKİLİ PİYELONEFRİTTE YARDIMCI T HÜCRE VE DÜZENLEYİCİ B HÜCRE CEVAPLARININ ARAŞTIRILMASI

BENGÜ AKÇAM ÇELİK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEVGİ KALKANLI TAŞ

İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
HAZİRAN/2026

İTHAF

“Değerli eşim ve aileme ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora serüvenimin başlangıcından tamamlanmasına kadar geçen tüm eğitim ve tez sürecimde eşsiz bilgi birikimi, vizyonu ve akademik tecrübesiyle yolumu aydınlatan ve güzelleştiren, karşılaştığım her zorlukta yapıcı çözümleri ve sabrıyla beni her zaman daha iyisini yapmaya teşvik eden değerli danışman hocam İmmünoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ'a saygıyla en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel süreçlerini laboratuvarında yürütmeme imkan tanıyan, ihtiyaç duyduğum laboratuvar sarf malzemelerinin ve cihazların temininde sağladığı olanaklarla sürecimi destekleyen ve akademik rehberliği ile çalışmama ışık tutan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Nilgün IŞIKSAÇAN'a en içten şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın klinik aşamalarının yürütülmesine imkan tanıyan, hastaların dahil edilme, örnek toplama ve takip süreçleri boyunca yapıcı, destekleyici ve yol gösterici yaklaşımlarıyla katkılarını esirgemeyen Üroloji Kliniği değerli hocaları Sayın Uzman Dr. Cem Tuğrul GEZMİŞ'e ve Sayın Doç. Dr. Arif KALKANLI'ya; ayrıca hasta takibi ve örnek alımı süreçlerindeki özverili destekleriyle çalışmaya katkı sunan tüm Üroloji Kliniği asistanlarına ve hemşirelerine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deneysel süreçlerini yürüttüğüm kritik ve yoğun dönemde sadece akan hücre ölçer ve ELISA aşamalarında değil bilgi, tecrübe ve yardımseverliğiyle her daim desteğini yanımda hissettiğim sevgili arkadaşım MSc. Tamay Seda TAŞÇI'ya; ayrıca aynı Biyokimya İleri Analiz Laboratuvarı çalışanları değerli büyüklerim Hatice KINALI'ya, Evrim TEKBAŞ YILMAZ'A, Sibel ŞİMŞEK'e ve Havva KAŞIKÇI'ya laboratuvarda geçen her zamanımda beni evimde gibi hissettirdikleri, destekleri ve özellikle sağlıklı kontrol grubu için gönüllü toplama sürecindeki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

İmmünoloji Anabilim Dalı'na adım attığım ilk günden son günüme kadar gerek bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık bulduğum gerekse kalplerinin güzelliği ile huzura doyduğum, araştırmacı ruhlarını çok sevdiğim ve her konuda fikir alışverişi yapabildiğim; meslektaşlarım olarak ders döneminden tez sürecime, proje hazırlama aşamalarından kabul ve sonlandırmaya, deneylerin gerçekleştirilmesinden istatistiksel analiz süreçlerine kadar sayamadığım her konuda paha biçilemez destekleri ve yardımlarıyla yükümü hafifleten, fikir ve katkılarıyla ufkumu açan, akademik yolcuğun en yoğun ve zorlu günlerinin

üstesinden birlikte geldiğim ebedi dostlarım PhD. Aylin Seher UZUNOĞLU'na ve PhD. Merve Saide UZUNOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Doktora yolcuğuna birlikte başladığım, ders döneminden doktora yeterliliğe, tez sürecinden mezuniyete kadar inişli-çıkışlı her aşamayı birlikte aştığımız, bilgisi ve desteğini hayatımdan esirgemeyen varlığıyla bu süreci çok daha anlamlı ve katlanılır kıldığı için dostum ve meslektaşım PhD. Elifnaz İLGAR'a teşekkür ederim.

Yüksek lisansta başlayan dostluğumuzu doktora sürecimin sonuna kadar her konuda manevi desteği ve güzel kalbiyle hissettiren, akan hücre ölçer aşamalarında bilgi, katkı ve tecrübesiyle tezimi zenginleştiren değerli dostum Gamze AKGÜN'e çok teşekkür ederim.

Kilometrelerce ötede her daim kalbinin ve dualarının gücünü benimle hissettiğim, hayatımın her aşamasında bana koşulsuz sevgisiyle inanıp destek olan annem Azize AKÇAM'a, hem babam hem ilk öğretmenim olarak bilgi ve tecrübesiyle bilim yoluma daima ışık tutan bilgi çınarım Murat AKÇAM'a, bebekliğimden bu yana sevgi ve destekleriyle beni büyüten, geliştiren ve her daim koruyan ablalarım Ceydahan ve Şeydahan AKÇAM'a sonsuz teşekkür ederim.

Ve bu uzun ve meşakkatli eğitim yolculuğumun her anında bana ve başarabileceğime benden daha fazla inanan, her konuda maddi ve manevi koşulsuz ve sonsuz desteğiyle güç veren, her pes edişimde sabrı, sevgisi ve anlayışıyla yeniden ayağa kalktığım, çalışmamın gizli kahramanı, anılarımın en güzel ortağı, dürüstlüğünü, kişiliğini ve yüreğini çok sevdiğim eşim Mert ÇELİK'e hayatımdaki sonsuz emekleri için tüm kalbimle teşekkür ederim. Bebekliğinden beri her anıma yoldaş olan, sevgi dili ile bana huzur veren ailemizin minik üyesi kedim Paşa'ya varlığı için teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sürecinde 'Enfeksiyon Hastalıklarının İmmünolojisi alt alanı' kapsamında sağladıkları 100/2000 YÖK Doktora Bursu desteğinden dolayı Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK) teşekkür ederim.

Son olarak bu tez çalışmasını '2024-A3-01 - Doktora / Tıpta Uzmanlık Öğrencilerine Yönelik A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı' kapsamında '41159' proje numarası ile kabul eden ve destekleyen Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (TÜSEB) desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vii
TABLOLAR LİSTESİ x
ŞEKİLLER LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR xiv
ÖZET xvi
ABSTRACT xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. İMMÜN SİSTEM 3
2.2. DOĞAL İMMÜN SİSTEM 4
2.3. EDİNSEL İMMÜN SİSTEM 9
2.3.1. Hücresel İmmünite 10
2.3.1.1. Th1, Th2 ve Th17 yardımcı T lenfositler 12
2.3.1.2. T foliküler hücreler (Tfh) 14
2.3.1.3. T regülatör hücreler (Treg). 15
2.3.2. Hümoral İmmünite ve B Lenfositler 16
2.3.2.1. B regülatör hücreler (Breg): 17
2.4. PİYELONEFRİT PATOGENEZİ 20
2.4.1. İdrar Yolu Enfeksiyonları, Piyelonefrit ve Böbrek Taşı Oluşumu 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYALLER 29
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Antikorlar 29
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler ve Solüsyonlar 30
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Malzemeler 31
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Yazılımlar 32
3.1.5. ELISA Yönteminde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması 33
3.2. ÇALIŞMA PLANI 34
3.2.1. Çalışma Kapsamı ve İzinler 35
3.2.2. Sağlıklı Bireylerin ve Hastaların Seçimi 35
3.2.2.1. Sağlıklı bireylerin çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri 36
3.2.2.2. Hasta bireylerin çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri 36

3.2.3. Sağlıklı Bireyler ve Hastalardan Onam ve Venöz Kan Alımı 37
3.2.4. Venöz Kandan B Regülatör Hücre (Breg) Boyanması 37
3.2.5. Venöz Kandan T Foliküler Hücre (Tfh) Boyaması 38
3.2.6. Venöz Kandan T Regülatör Hücre (Treg) Boyaması 38
3.2.7. Venöz Kanın 4 Saatlik Uyarımı, Yardımcı T Hücre ve Hücre İçi Sitokin Boyaması 39
3.2.8. Venöz Kandan Serum Örneklerinin Stoklanması ve Stoklanan Serum Örneklerinden ELISA Yöntemi ile IL-10 Sitokini Konstantrasyonu Ölçümü 39
3.3. ANALİZLER 41
3.3.1. Lenfositlerin B Regülatör Hücre (Breg) Hücre Analizi 41
3.3.2. Lenfositlerin T Foliküler Hücre (Tfh) Analizi 42
3.3.3. Lenfositlerin T Regülatör Hücre (Treg) Analizi 42
3.3.4. Lenfositlerin Hücre İçi Sitokin ve Yardımcı T Hücre Analizi 43
3.3.5. IL-10 Sitokini Konstantrasyonu Ölçümü ve Analizi 46
3.3.6. İstatistiksel Analiz 46
4. BULGULAR 47
4.1. BÖBREK TAŞI İLE İLİŞKİLİ PİYELONEFRİT TANISI KONULMUŞ HASTALARA AİT BULGULAR 47
4.1.1. Hastaların Teşhisi, Demografik Özellikleri Ve Klinik Verileri 47
4.2. DENEYSEL BULGULAR 51
4.2.1. $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg Hücre Alt Gruplarının Karşılaştırılması 51
4.2.2. T Foliküler Hücre (Tfh) Alt Grubunun Karşılaştırılması 53
4.2.3. Düzenleyici T Hücre (Treg) Alt Grubunun Karşılaştırılması 54
4.2.3.1. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Regülatör hücre kompozisyonu (Breg/Treg) dengeleri 55
4.2.4. CD3+CD4+ T lenfosit kapısından IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) Yardımcı T Hücre Alt Gruplarının Karşılaştırılması 56
4.2.5. CD3+CD4+ Yardımcı T Hücre ile İlgili Polarizasyon Analizleri 61
4.2.5.1. Stimülasyon İndeksi (SI) değerlerinin karşılaştırılması 61
4.2.5.2. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th1/Th2 polarizasyon dengesi 62
4.2.5.3. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17/Th2 polarizasyon dengesi 63
4.2.5.4. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg dengesi 64
4.2.5.5. Piyelonefrit hastalarında efektör/regülatör dengesi ve Th2 yanıtının kompansatuar rolü 65
4.2.5.6. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg dengesi 66
4.2.5.7. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th2 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg dengesi 67

4.2.5.8. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / Treg oranı karşılaştırması 68
4.2.6. Hasta ve Kontrol Grupları Arasındaki İmmün Hücre Frekanslarının Karşılaştırılması 69
4.2.7. Bellek T lenfosit kapısından IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) Yardımcı T Hücre Alt Gruplarının Değerlendirilmesi 70
4.2.8. IL-10 Sitokin Konsantrasyon Ölçümünün Değerlendirilmesi 75
4.2.8.1. Uyarılmış IFN-γ, IL-4 ve IL-17 sitokin frekansları ve serum IL-10 düzeyleri arasındaki Spearman korelasyon matrisi 76
4.2.8.2. Regülatör hücre popülasyonları ve serum IL-10 düzeyleri arasındaki Spearman korelasyon matrisi 77
4.2.9. Piyelonefrit Hastalarında Klinik, İmmünolojik ve Hematolojik Parametrelerin Spearman Korelasyon Isı Haritası (Heatmap) 78
4.2.10. Periferik İnflamasyon Belirteçleri ve Edinsel İmmünite Sitokin Oranları Arasındaki Korelasyon Analizleri 82
5. TARTIŞMA 85
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 117
KAYNAKLAR 119
EKLER 129

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: İmmünfenotipleme çalışmasında kullanılan antikorların listesi 29

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kitlerin ve solüsyonların listesi..... 30

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi..... 31

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan cihazların ve yazılımların listesi..... 32

Tablo 4.5: Çalışmaya dahil edilen hastalara ait demografik veriler ve klinik parametreler. 48

Tablo 4.6: Hasta ve kontrol grupları arasındaki immün hücre frekanslarının karşılaştırılması. 69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3. 1: Sulandırılmış insan IL-10 standardının hazırlanışı. 33

Şekil 3. 2: Çalışma planının şematik gösterimi. 34

Şekil 3. 3: $CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre alt gruplarının kapılama stratejisi ile gösterimi. 41

Şekil 3. 4: Tfh hücre alt grununun immün fenotipleme analizinin kapılama stratejisi ile gösterimi. 42

Şekil 3. 5: Treg hücre alt grununun immün fenotipleme analizinin kapılama stratejisi ile gösterimi. 43

Şekil 3. 6: Uyaransız tüplerde yardımcı T hücre popülasyonlarına ait hücre içi sitokinlerin immün fenotipleme analizinin kapılama stratejisi ile gösterimi. 44

Şekil 3. 7: Uyaranlı tüplerde yardımcı T hücre popülasyonlarına ait hücre içi sitokinlerin immün fenotipleme analizinin kapılama stratejisi ile gösterimi. 45

Şekil 4.1: Piyelonefrit tanılı hastalara ait önemli veriler. 49

Şekil 4.2: Piyelonefrit tanılı hasta oranlarına (%) göre hidronefroz derecelerinin gösterilmesi 50

Şekil 4.3: $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında karşılaştırılması.. 51

Şekil 4.4: $PD1^{+}CXCR5^{+}$ T foliküler hücre frekansının sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında karşılaştırılması.. 53

Şekil 4.5: $CD4^{+}FOXP3^{+}$ düzenleyici T hücre frekansının sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında karşılaştırılması. 54

Şekil 4.6: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg / Treg oranlarının karşılaştırılması.. 55

Şekil 4.7: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg / Treg oranlarının karşılaştırılması.. 56

Şekil 4.8: Uyaransız (unstimulated) T Helper hücre sitokin frekanslarının karşılaştırılması. A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasının ayrı ayrı gösterimi. 57

Şekil 4.9: Uyaranlı (stimulated) T Helper hücre sitokin frekanslarının karşılaştırılması. A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasının ayrı ayrı gösterimi. 58

Şekil 4.10. Sağlıklı kontrol grubunda uyaransız-uyaranlı A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının karşılaştırması. 59

Şekil 4.11: Hasta grubunda uyaransız-uyaranlı A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının karşılaştırması. 60

Şekil 4.12: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında T helper hücrelerinin IL-17 Stimülasyon İndeksi (SI) değerlerinin karşılaştırılması. 61

Şekil 4.13: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th1/Th2 polarizasyon dengesinin karşılaştırılması.. 62

Şekil 4.14: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17/Th2 polarizasyon dengesinin karşılaştırılması. 63

Şekil 4.15: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranlarının karşılaştırılması. 64

Şekil 4.16: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th2 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranlarının karşılaştırılması.. 65

Şekil 4.17: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg oranlarının karşılaştırılması. 66

Şekil 4.18: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th2 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg oranlarının karşılaştırılması. 67

Şekil 4.19: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / Treg oranlarının karşılaştırılması. 68

Şekil 4.20: Uyaransız (unstimulated) bellek T Helper hücre sitokin frekanslarının karşılaştırılması. A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasının ayrı ayrı gösterimi. 71

Şekil 4.21: Uyaranlı (stimulated) bellek T Helper hücre sitokin frekanslarının karşılaştırılması. A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasının ayrı ayrı gösterimi. 72

Şekil 4.22: Sağlıklı kontrol grubu uyaransız-uyaranlı A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının karşılaştırması. 73

Şekil 4.23: Hasta grubunda uyaransız-uyaranlı A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının karşılaştırması. 74

Şekil 4.24: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında serum IL-10 konsantrasyonlarının karşılaştırılması. 75

Şekil 4.25: Serum IL-10 konsantrasyonları ile uyarılmış IFN-γ, IL-4 ve IL-17 sitokin frekansları arasındaki ilişkilerin Spearman korelasyon analizi ile gösterimi. 76

Şekil 4.26: Serum IL-10 konsantrasyonları ile Breg, Treg ve Tfh hücre frekansları arasındaki ilişkilerin Spearman korelasyon analizi ile gösterimi. 77

Şekil 4.27: Klinik laboratuvar verileri ile akan hücre ölçer analiz bulguları arasındaki çok değişkenli ilişkileri gösteren Spearman korelasyon matrisi. 78

Şekil 4.28: Klinik laboratuvar verileri ile akan hücre ölçer analiz bulguları (T helper sitokin polarizasyon oranları) arasındaki çok değişkenli ilişkileri gösteren Spearman korelasyon matrisi. 82

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADCC : Antikor Aracılı Hücresel Sitotoksisite

ASH : Antijen Sunucu Hücre

BHR : B Hücre Reseptörü

BREG : B Regülatör Hücre

CD : Cluster of Differentiation

CRP : C-Reaktif Protein

CXCR5 : C-X-C motif chemokine receptor 5

DC : Dendritik Hücre

DAMP : Hasar İlişkili Moleküler Patern

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FBS : Foetal Bovine Serum

FDC : Foliküler Dendritik Hücre

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FOXP3 : Forkhead Box P3

GC : Germinal Merkez

HSC : Hematopoietik Kök Hücre

IFN-γ : İnterferon-Gama

IG : İmmünoglobulin

IL : İnterlökin

KIR : Öldürücü İmmünoglobulin-Benzeri Reseptör

MFI : Ortalama Floresans Yoğunluğu

MHC : Majör Histokompatibilite Kompleksi

NET : Nötrofil Ekstrasellüler Tuzak

NK : Doğal Öldürücü Hücre

NOX2 : NADPH Oxidase 2

OD : Optik Dansite

PAMP : Patojen İlişkili Moleküler Patern

PD-1 : Programmed Cell Death Protein-1

PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

PRR : Patern Tanıyan Reseptör

RNS : Reaktif Azot Türleri

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

STAT : Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü

STL : Sitotoksik T Hücre

TFH : T Foliküler Yardımcı Hücre

TGF-β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta

TH : Yardımcı T Hücre

THR : T Hücre Reseptörü

TNF-α : Tümör Nekroz Faktörü-Alfa

TREG : T Regülatör Hücre

TÜSEB : Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı

WBC : Beyaz Kan Hücresi

BÖBREK TAŞI İLE İLİŞKİLİ PİYELONEFRİTTE YARDIMCI T HÜCRE VE DÜZENLEYİCİ B HÜCRE CEVAPLARININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Çalışma, böbrek taşlı piyelonefrit hastalarında yardımcı T hücre (Th), düzenleyici B hücre (Breg), düzenleyici T hücre (Treg) ve T foliküler hücre (Tfh) frekanslarını akan hücre ölçerde değerlendirmeyi ve hastalığın edinsel immün yanıtla ilgili hücresel mekanizmalarını aydınlatmayı planlamaktadır. Böylece hücrelerin dağılımındaki dengesizlikleri ve inflamatuar süreç üzerindeki etkilerini ortaya koyarak, hastalığın patofizyolojisine bilimsel katkı kazandırmayı, klinik tanı-tedavi yaklaşımlarında özgün immünolojik temel oluşturmayı hedeflemektedir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 25 hasta ve 25 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Hastaların demografik, klinik verileri kaydedilmiştir ve periferik kan örneklerine hücre yüzeyi ve içi boyama protokolleri uygulandıktan sonra Breg, Treg ve Tfh frekansları akan hücre ölçerde değerlendirilmiştir. Sitokin frekansları, uyaransız ve 4 saatlik *in vitro* stimülasyonun ardından hücre içi boyama protokolü uygulandıktan sonra değerlendirilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde parametrik, non-parametrik istatistiksel testler ile çok değişkenli korelasyon analizleri kullanılmıştır.

Bulgular: Hasta grubunda immün yanıtı baskılayıcı rolü olan bellek-benzeri ($CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$) ve geçişsel ($CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$) Breg frekansları sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Uyaransız koşullarda hastalardaki IFN-γ(Th1) ve IL-17(Th17) frekansları anlamlı şekilde yüksek iken; stimülasyon sonrasında IL-4(Th2) frekansının anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. Ayrıca, hastalarda Th1/Th2 ve Th17/Th2 oranlarında belirgin düşüş gözlenirken; Th17/Breg ve IL-4/Breg oranlarında ileri derecede anlamlı artışlar kaydedilmiştir.

Sonuç: Hastalığın patogenezinde Breg frekansında belirgin sayısal kayıp yaşandığı ve bu zafiyetin periferik toleransı bozduğu gösterilmiştir. İmmün sistemin, regülatör boşluğu ve kronikleşen pro-inflamatuar (Th1/Th17) baskıyı dengelemek amacıyla kompanse edici Th2(IL-4) kayması stratejisi geliştirdiği tespit edilmiştir.

Hastalığın yarattığı şiddetli ve kronik inflamatuar stresin, pro-inflamatuar bellek T hücrelerinde fonksiyonel tükenmişliğe yol açarak immün homeostazı bozduğu ve doku hasarı riskini artırdığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akan Hücre Ölçer, Böbrek Taşı, Düzenleyici B Hücreleri (Breg), İmmün Homeostaz, Piyelonefrit, Yardımcı T Hücreleri

INVESTIGATION OF HELPER T CELL AND REGULATORY B CELL RESPONSES ASSOCIATED WITH KIDNEY STONE-RELATED PYELONEPHRITIS

ABSTRACT

Aim: This study aims to evaluate the frequencies of helper T (Th) cells, regulatory B (Breg) cells, regulatory T (Treg) cells, and follicular T (Tfh) cells using flow cytometry in patients with nephrolithiasis-associated pyelonephritis, thereby elucidating the cellular mechanisms associated with the adaptive immune response. Consequently, by uncovering the imbalances in cellular distribution and their impact on the inflammatory process, the study intends to provide scientific insights into the pathophysiology of the disease and establish a novel immunological foundation for clinical diagnosis and therapeutic approaches.

Materials and Methods: The study enrolled 25 patients and 25 healthy individuals. Demographic and clinical data of the patients were recorded. Peripheral blood samples were subjected to cell surface and intracellular staining protocols, after which Breg, Treg, and Tfh cell frequencies were analyzed via flow cytometry. Cytokine frequencies were evaluated under unstimulated conditions and following 4 hours of *in vitro* stimulation using an intracellular staining protocol. Data analysis was performed using parametric and non-parametric statistical tests, as well as multivariate correlation analyses.

Results: In the patient group, the frequencies of memory-like (CD19+CD24hiCD27+) and transitional (CD19+CD24hiCD38hi) Breg cells, which exert an immunosuppressive role, were found to be statistically significantly lower compared to healthy controls. Under unstimulated conditions, the frequencies of IFN-γ (Th1) and IL-17 (Th17) were significantly elevated in patients; conversely, a significant increase in IL-4 (Th2) frequency was observed following stimulation. Furthermore, while a marked decline was observed in the Th1/Th2 and Th17/Th2 ratios of patients, highly significant increases were recorded in the Th17/Breg and IL-4/Breg ratios.

Conclusion: The findings demonstrate that a prominent numerical loss in Breg frequency occurs during the pathogenesis of the disease, and this deficiency disrupts

peripheral tolerance. To counteract this regulatory deficit and the chronic pro-inflammatory (Th1/Th17) pressure, the immune system appears to deploy a compensatory Th2 (IL-4) shift strategy. Ultimately, it is concluded that the severe and chronic inflammatory stress induced by the disease perturbs immune homeostasis and elevates the risk of tissue damage by driving functional exhaustion in pro-inflammatory memory T cells.

Key Words: Flow Cytometry, Kidney stone, Regulatory B Cells (Breg), Immune Homeostasis, Pyelonephritis, Helper T Cells

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), dünya genelinde her yıl milyonlarca bireyi etkileyen, yüksek prevalansa sahip en yaygın enfeksiyonlardan biridir. Bu geniş klinik spektrumun en ağır formlarından biri olan piyelonefrit, renal pelvis ve parankimi tutarak renal skarlaşmaya ve kalıcı böbrek fonksiyon kayıplarına yol açabilen inflamatuar bir hastalıktır. Piyelonefrit gelişiminde anatomik ve fonksiyonel bozukluklar temel risk faktörleri olarak tanımlanmaktadır; bu bağlamda böbrek taşları (nefrolitiazis), hem idrar stazına neden olarak bakteriyel kolonizasyonu kolaylaştırmakta hem de dokuda kronik irritasyon ve oksidatif stresi tetikleyerek süreci komplike hale getirmektedir. Özellikle üreaz üreten bakterilerin varlığında gelişen enfeksiyon taşları (struvit), patojenler ile taş oluşumu arasında çift yönlü bir ilişki kurarak tedavisi zor, inatçı bir enfeksiyon döngüsü yaratmaktadır.

Hastalığın immünopatolojisine dair mevcut literatür büyük oranda doğal immün yanıt mekanizmalarına odaklanmıştır; ancak enfeksiyonun ortadan kaldırılması veya kronikleşmesi arasındaki dengeyi belirleyen edinsel immün yanıt bileşenlerinin rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Edinsel immünitede yardımcı T hücre (Th) alt grupları, salgıladıkları 'imza sitokinler' aracılığıyla savunma stratejisini belirler. Th1 (IFN-γ) ve Th17 (IL-17) hücreleri, pro-inflamatuar etkileriyle patojen eliminasyonu ve nötrofil kemotaksisinden sorumluyken; Th2 (IL-4) hücreleri ve düzenleyici T hücreleri (Treg), inflamasyonu baskılayarak doku onarımı ve immün homeostazı yönetir.

Son yıllarda dikkat çeken bir diğer grup olan düzenleyici B hücreleri (Breg), özellikle IL-10 salgılayarak aşırı immün yanıtları frenleme ve periferik toleransı sürdürme kapasitesine sahip kritik bir hücre popülasyondur. Breg hücrelerinin $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ (bellek benzeri) ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ (geçişsel) gibi farklı fenotipik alt gruplarının, kronik inflamatuar süreçlerde ve doku hasarında koruyucu roller üstlendiği gösterilmiştir. Ancak böbrek taşı ile komplike olmuş piyelonefrit vakalarında, bu regülatör hücrelerin frekansları ve efektör T hücreleriyle (Th1/Th2/Th17) olan oransal dengeleri daha önce kapsamlı bir şekilde incelenmemiştir.

Bu çalışma, böbrek taşı olan piyelonefrit hastalarında klinik ve laboratuvar bulgularına ek olarak yardımcı T hücre (Th), düzenleyici B hücre (Breg), düzenleyici T hücre (Treg) ve T foliküler yardımcı hücre (Tfh) frekanslarını akan hücre ölçer yöntemiyle değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Araştırma, söz konusu hücre popülasyonlarındaki sayısal ve fonksiyonel sapmaları ortaya koyarak, hastalığın patofizyolojisinde 'regülatör zafiyet' ve 'kompansatuar Th2 kayması' gibi özgün immünolojik mekanizmaları tanımlamayı hedeflemektedir. Bu doğrultuda elde edilen bulgular, böbrek taşı ile ilişkili piyelonefrit patogenezinde edinsel immün yanıtların rolünün anlaşılmasında bilimsel bir temel oluşturacak ve gelecekte planlanabilecek çalışmalara ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İMMÜN SİSTEM

Evrende yaşayan her canlı doğumdan ölüme kadar tüm yaşamı boyunca endojen ve ekzojen birçok faktör ile karşılaşır. Bu faktörlerin büyük çoğunluğunu oluşturan mikroorganizmalar oldukça geniş bir çeşitliliğe ve sayıya sahiptir. Bazı mikroorganizmalar vücudumuzdaki sistemlerin işleyişine katılarak yararlı olarak nitelendirilebilirken bazıları ise vücudumuzun savunma hattını aşarak hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir ve zararlı olarak nitelendirilir. Hastalıkların oluşumuna yol açabilen virüs, bakteri ve parazit gibi bu zararlı mikroorganizmalar 'patojen' olarak adlandırılır. Vücudumuzun bu patojenleri tanımak, yok etmek ve vücudu korumak üzere mükemmel bir uyum içerisinde çalışan 'immün sistem (bağışıklık sistemi)' olarak adlandırılan bir savunma sistemi mevcuttur. İmmün sistem doku, organ, proteinleri, molekülleri ve işlevine göre özelleşmiş hücre tipleriyle tüm vücuda yayılarak kusursuz bir 'immün yanıt' sağlar. İmmün yanıtların öncelikli ve ana görevi vücudu patojenlere karşı savunmak olsa da aynı zamanda ölü, hasar görmüş veya anormal hücreleri de yok etmekten ve vücudun homeostaz durumunu sağlamaktan sorumludur. Çok çeşitli ve birbirinden farklı yapıdaki tehditlere karşı, onları tanıyan ve etkisizleştiren özelleşmiş mekanizmalarıyla farklı yanıtlar verir. Verilen yanıtlarla immün yanıtın şiddeti artabilir veya yanıt baskılanabilir (1).

İmmün sistem doğal ve edinsel immün sistem olarak adlandırılan birbiri ile iş birliği içerisinde çalışan iki sistemden oluşur. Doğal immün yanıt; patojenlerin ortak yapısal ve fonksiyonel özelliklerini spesifik olmadan tanıyarak onları hızlı bir şekilde yıkıma uğratmak ve ortadan kaldırmak için hazır bulunan ve vücudun ilk koruma bariyerini oluşturan sistemdir. Edinsel immün sistem ise; kendinden olanı (öz hücreleri) tanıyabilen, birçok farklı patojeni tanıyan ve tekrar maruziyet sonrası patojenlere ait antijenlere spesifik yanıtlar oluşturarak daha güçlü ve hızlı yanıt verebilen ve aynı zamanda karşılaştığı antijenlere özgü bir hafıza oluşturan sistemdir (2).

2.2. DOĞAL İMMÜN SİSTEM

Doğal immün sistem, vücuda giren çok çeşitli patojenlere karşı erken ve hızlı yanıtlar oluşturarak vücudun ilk savunma hattı olarak görev yapan sistemdir. Bu sistem konak hücrelerde bulunmayan ama patojen veya yabancı maddelerde bulunan ortak yapısal bileşenleri tanır ve ortadan kaldırmak için yanıt verir. Aynı zamanda hasar görmüş veya nekroza uğramış konak hücrelerinden salgılanan molekülleri de tanır ve bu hücrelerin yok edilerek vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar. Ortak özellikteki antijenlere karşı aynı yanıt oluşturmasından dolayı özgünlük göstermez.

Doğal immün sistem, fiziksel ve kimyasal bariyerler, özel reseptörler ve çözünebilir (soluble) moleküller ve doğal immüniteye özgü hücrelerden oluşan kompleks bir birleşimdir. Epitel doku ve mukoza zarı, doku ve organların yüzeylerinde bulunur ve patojenlerin girişini önlemek için fiziksel bariyer görevi üstlenir. Epitel dokuların yüzeyinde üretilen veya fagositik granüllerde bulunan antimikrobiyal maddeler kimyasal bariyer görevi görürler. Mikroorganizmalardaki patojen-ilişkili moleküler paternleri (PAMPs) ve hasarlı konak hücrelerdeki hasar-ilişkili moleküler paternleri (DAMPs) ve tanıyan patern tanıyan reseptörler (PRRs) doğal immün sistemin özel reseptörleridir. Aynı zamanda bu reseptörler, kompleman proteinleri veya antikor ile kaplanmış opsonize antijenlerin Fc reseptörlerine ve kompleman reseptörlerine bağlanmasına dayanan geniş bir tanıma yelpazesine sahiplerdir. Doğal immün sistemin hücrelerini fagositoz yapabilen nötrofil ve makrofajlar gibi hücreler; doğal öldürücü hücreler (NK), dendritik hücreler (DC) ve inflamatuar mediatörleri salan hücreler olan bazofiller, eozinofiller ve mast hücreleri oluşturur. Ayrıca kompleman proteinleri, çeşitli lektin ve C-reaktif protein gibi inflamasyonla ilişkili serum proteinleri olarak doğal immün yanıtlarda önemli rol oynarlar (1).

Epitel tabaka, mikrobiyal istilaya ve çevresel etkilere karşı ilk koruma hattını oluşturan konak savunma sisteminin önemli bir bileşenidir. Patojenler deriden, ağız, burun, göz, kulak ve üreme organları gibi vücut açıklıklarından fiziksel temas, solunum ve yutma yolları ile vücuda girebilir. Bu nedenle vücudun patojenlerle ilk karşılaşma yeri; cilt yüzeyini ve solunum, sindirim, idrar ve genital yüzeylerini saran epitel tabakadır. Epitel tabaka patojenlerin vücuda girişini engellemek üzere fiziksel ve kimyasal bariyer görevi üstlenir. Epitel tabaka birbirine sıkıca bağlı hücrelerden oluşur ve bu hücreler mekanik bir bariyer oluşturur. Bu tabakada yerleşik olan hücreler salgıladıkları

antimikrobiyal peptidler ile kimyasal bariyer oluşturarak patojenlerini girişini engeller. Amfipatik bir peptit antibiyotik olan defensinler, virüs, bakteri, mantar ve parazitler gibi birçok farklı patojenin zarlarına bağlanıp bütünlüğünü bozar (3). Keratinize epitel hücreleri ve mukozal epitel hücreler tarafından salgılanan mukus, patojenlerin epitel tabakası ile temasını zorlaştırır ve önler. Aynı şekilde deride bulunan yağ bezleri tarafından salgılanan yağ asitleri ve laktik asit bakteri büyümesini engeller. İntraepitelyal lenfositler epitel tabakada hücreler arası sıkı bağlantıların altında bulunan immün savunmada ve mukozal homeostazın korunmasında önemli bir rol oynayan özel bir lenfosit grubudur. Bu lenfositler patojenlere karşı sitokin ve sitolitik moleküllerin salınımını içeren sitotoksik mekanizmalar yoluyla enfekte hücreleri doğrudan öldürebilir. Ayrıca immün yanıtı güçlendiren ve diğer immün hücreleri aktive eden interferon-gama (IFN-γ) dahil olmak üzere çeşitli sitokinler üreterek diğer immün yanıtlarını da düzenler. Bu hücreler aynı zamanda epitel hücre ölümü ve rejenarasyonunu modülasyonu gibi bir çok önemli immünolojik sürece katılır (4,5).

Makrofajlar ve nötrofiller, patojenleri yok etme, inflamasyon ve doku onarımı gibi önemli rolleri ile doğal immün yanıtların ana oyuncularıdır. Patojenler epitel tabakadaki savunma mekanizmalarını atlatıp dokulara geçebilirse, hem patojenler hem de dokularda bulunan makrofajlar sinyaller oluşturur. Bu sinyaller dolaşımda hazır halde bulunan nötrofilleri enfeksiyon bölgesine yönlendirecek olan endotel hücreleri aktive ederler. Bir granülosit alt tipi olan nötrofiller, enfeksiyon veya yaralanma bölgelerine hızlı bir şekilde çekilir. Bu bölgede fagositoz, degranülasyon, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve patojenleri hareketsizleştiren ve öldüren nötrofil ekstrasellüler tuzaklarının (NETs) oluşumu gibi antimikrobiyal mekanizmaları devreye girer. Eğer nötrofillerin ortama saldığı proteazlar ve histonlar gibi sitotoksik yapılar uygun şekilde düzenlenmez ise, çevre dokularda hasar meydana gelebilir. Nötrofiller mikrolitrede 4000 ile 10.000 sayı ile kanda en çok bulunan lökositlerdir ve sayıları enfeksiyon durumunda daha da artabilir. (6–8).

Diğer granülosit çeşitleri olan eozinofiller ve bazofiller de farklı immün yanıtlar ile ilişkilendirilmişlerdir. Bazofiller, mast hücrelerine kıyasla daha az granüle sahip olmalarına rağmen, güçlü bir şekilde interlökin (IL)-4 ve IL-13 üretirler. Bu sitokinler, Th2 hücre farklılaşmasının desteklenmesinde ve IgE-aracılı kronik alerjik yanıtlarının düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Ayrıca, bazofiller hem IgE'ye bağımlı hem de

IgE'den bağımsız inflamatuar süreçlerle ilişkilendirilmiştir (9,10). Eozinofiller, alerjik yanıtların geç fazında, astım ve paraziter enfeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli efektör hücrelerdir. Bu hücreler, majör bazik protein ve diğer enzimleri içeren sitotoksik granülleriyle karakterizedir. Granüller, kronik inflamasyon sırasında doku hasarına yol açsa da belirli koşullarda rejenerasyon ve homeostazın sürdürülmesine katkıda bulunur. Eozinofiller, genellikle mast hücreleri ve bazofiller tarafından üretilen kemokinler ve sitokinler aracılığıyla bölgeye çekilir. Ancak mast hücreleri ve bazofiller gibi ani degranülasyon göstermekten ziyade, işlevleri süreğen inflamatuar yanıtlarla ilişkilidir. Bu hücrelerin dokulara göçü ve ardından gerçekleşen degranülasyonu, eozinofilik özofajit, kronik astım ve atopik dermatit gibi hastalıkların patofizyolojisinde merkezi bir rol oynamaktadır. Ayrıca inflamasyon sonrası doku yeniden şekillenmesi ve onarım süreçlerinde de görev alırlar (11–13).

Nötrofillerle kıyasla kanda daha düşük sayıda bulunan monositler, kemik iliği kökenli fagositik hücrelerdir ve enfeksiyon bölgelerine genellikle nötrofillerden sonra göç ederler. Monositler yalnızca fagositoz kapasiteleri ile değil, aynı zamanda T lenfositlerine antijen sunabilme yetenekleri ve çeşitli sitokinleri üretebilmeleri nedeniyle de immün yanıtının düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Sitoplazmalarında fagositik vakuoller, lizozomlar ve hücre iskeleti filamentleri barındırmaları, patojenlerin eliminasyonu açısından önemlidir. Monositlerin en ayırt edici özelliklerinden biri farklı doku bölgelerine göç edebilmeleri ve uzun ömürlü, patojenlere karşı daha dirençli efektör hücreler olan makrofajlara farklılaşabilmeleridir. Dolaşımdaki monositlerden veya embriyonik öncüllerden köken alan dokuya yerleşik makrofajlar, yerel çevresel sinyallere yanıt olarak fenotip ve fonksiyonlarını uyarlayabilen dikkat çekici bir plastisite gösterirler. Farklı dokularda bulunan makrofajlar bulundukları dokulara göre isimlendirilirler. Karaciğerde Kupffer hücresi, akciğerde alveolar makrofaj, merkezi sinir sisteminde mikroglia, kemik iliğinde osteoklast ve isterstisyel bağ dokusunda histiyosit adını alırlar. Benzer şekilde mononükleer fagositik hücre alt grupları grupları vardır ve makrofajlara farklılaşabilirler. Anatomik lokalizasyonları farklı olsa da makrofajlar benzer görevler üstlenirler (14–16).

Makrofajlar genel fonksiyonlarına göre, mikrobisidal etki gösteren M1 makrofajlar ve immüno modulatör rolü olan M2 makrofajlar olmak üzere iki grupta incelenir. Makrofajların ana görevi fagositozdur. Bu hücreler patojenleri, apoptotik

hücreleri ve hücresel kalıntıları özel reseptörler aracılığıyla fagosite ederler (17,18). Fagosite edilen patojenler, fagolizozomlarda lizozomal enzimler ve reaktif oksijen ve azot türleri (ROS/RNS) aracılığıyla parçalanır; NOX2 gibi enzimler mikrobiyal öldürme için gerekli oksidatif patlamanın oluşumunda kritik rol oynar. Makrofajlar aynı zamanda doku onarımı ve metabolik süreçlerin homeostazında rol oynayan immün yanıtların en önemli düzenleyicileridir (19–21). Hem doğal hem de edinsel immün sistemi yönlendirebilen çeşitli sitokin ve kemokinler salgılarlar. Enfeksiyonun erken evrelerinde, klasik olarak aktive edilmiş olan M1 makrofajlar, patojen yayılımını sınırlamak için tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α), IL-1β ve IL-6 gibi proinflamatuar mediyatörler üretir. Salgılanan bu sitokinler fagositik hücrelerin aktivasyounu, endotelde adezyonun artışını ve enfekte dokulara geçişini hızlandırır. İmmün yanıt ilerledikçe alternatif olarak aktive edilmiş M2 makrofajlar, inflamasyonun bitmesine katkıda bulunan ve doku onarımını kolaylaştıran IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β gibi anti-inflamatuar sitokinler salgılar (17,19).

Bu fonksiyonların yanı sıra makrofajlar antijen sunucu hücre (ASH) olarak görev üstlenir. Antijenlerle karşılaştıklarında aktifleşen bu hücreler, patojenleri yakalayıp fagosite eder ve ardından parçalayarak peptit fragmanları halinde majör histokompatibilite kompleksi (MHC) aracılığıyla T lenfositlere sunar. Böylelikle makrofajlar, lenfositlerle iş birliği içinde hem doğal hem de edinsel immün yanıtın aktivitesine katkıda bulunan ana oyuncudurlar (17).

Dendritik hücreler (DC'ler), göz, beyin ve testis hariç çeşitli dokularda bulunan miyeloid soylu kilit hücrelerdir. Bulundukları anatomik konumlara göre etkili ve özelleşmiş fonksiyon gösterirler. Deride Langerhans, kanda ve lenfoid dokularda plazmasitoid DC'ler ve lenf nodlarında folliküler dendritik hücreler adını alırlar (22,23). DC'ler fagositik aktivite gösteren güçlü ASH'ler olarak edinsel immün sistem yanıtlarını başlatır ve düzenlerler. Patojenleri yakalayabilen uzun uzantılara sahip olmaları ve ayrıca sınıf I ve sınıf II MHC'leri ile eş uyaran molekülleri yüksek düzeyde eksprese edebilmeleri sayesinde antijenin yakalanması, işlenmesi ve T hücrelerine sunularak özgül edinsel immün yanıtların başlatılmasında profesyonel rol oynarlar (24,25). Bu süreçler patojen kökenli ve tümör ilişkili antijenlere karşı etkili T hücresi aktivasyonunun temelini oluşturmaktadır. DC'lerin doğal ve edinsel immün sistemler arasındaki çapraz etkileşimi, onları immünoterapide, özellikle kanser aşılarının geliştirilmesinde merkezi aktörler

haline getirmektedir (26,27). T hücre aktivasyonundaki rollerine ek olarak DC'ler, immün toleransın sürdürülmesine de katkıda bulunmakta; böylece aşırı immün yanıtlarının otoimmüniteye yol açmasını engellemektedir. Bu çift yönlü işlevsellik organizma için kritik öneme sahiptir. Çünkü DC'lerin olgunlaşma durumu ve aldıkları çevresel sinyallere bağlı olarak immün yanıtların sonu değişebilmektedir. DC'ler özellikle kronik inflamasyon ya da doku onarımı sırasında istenmeyen immün yanıtları baskılamak amacıyla T regülatör hücrelerini (Treg'ler) uyarabilir. DC fonksiyonunun düzenlenmesi ise sitokinler, PAMP'lar ve DAMP'lar dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (26,28).

Normal koşullarda NK hücreleri periferik kan, kemik iliği ve dalakta bulunan doğal immün sistemin en önemli hücrelerinden biridir. Bu hücreler hızlıca göç ederek virüsle enfekte olmuş, değişmiş ve tümörlü hücreleri direk tanıma ve sitotoksik öldürme mekanizmasına sahiptir. Aktivasyonları için spesifik bir antijeni tanımaları gerekmez. Bu yönleriyle sitotoksik T lenfositlerden ayrılırlar (29,30). NK hücrelerinin aktivasyonu ve işlevleri, hücre yüzeylerinde bulunan ve hedef hücrelerle etkileşime giren uyarıcı ve baskılayıcı reseptörler arasındaki hassas denge tarafından düzenlenir. Bu reseptörler arasında öldürücü immünoglobulin-benzeri reseptörler (KIR'ler) ve NKG2D gibi moleküller yer alır. Bu reseptörler hedef hücrelerdeki ligandlarına bağlanır ve bu bağlanma NK hücrelerinin aktivasyonunu uyarır. Aktive olan NK hücreleri sitotoksik işlevlerini, hedef hücre ile temas halinde olduğu bölgeden perforin ve granzim içeren sitotoksik granüllerin salınımı aracılığıyla gerçekleştirir. Salınan granüller hedef hücrelerin apoptozunu uyaran enzimleri aktive eder, lizis başlatılır ve sonunda hücre yok edilir (31–33). Ayrıca NK hücreleri immün yanıtları düzenleyen interferon-gamma (IFN-γ) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi çeşitli sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri salgılayarak diğer immün hücrelerin toplanmasını ve aktivasyonunu kolaylaştırır. Böylece diğer hücrelerle etkileşime girerek hem immünmodülatör bir rol üstlenir hem de edinsel immün yanıtı uyarırlar. Ayrıca NK hücreleri, antikor aracılı hücresel sitotoksisite (ADCC) mekanizmasında önemli bir rol oynar; antikorla kaplanmış hücreleri tanıyıp yok ederek belirli immünoterapilerin etkinliğini de artırır. NK hücreler viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar gibi durumlarda görev aldıkları gösterilmiştir (33,34).

Kemik iliğinden köken alan ve dolaşımda progenitör hücreler olarak bulunan mast hücreleri, dokulara göç ederek farklılaşır ve çeşitli sitokinlerin etkisiyle olgunlaşırlar.

Özellikle patojenlere yoğun biçimde maruz kalan deri, solunum yolları ve gastrointestinal sistem çevresindeki dokularda geniş bir dağılım gösterirler. Mast hücreleri allerjen, parazit veya bakteri gibi farklı etkenlerle uyarılabilir ve aktivasyonları Fc reseptörleri ve Fc reseptörleri dışı olmak üzere iki mekanizma ile yönetilir (35).

Özellikle alerjik yanıtlarda rol oynayan mast hücreleri, antijenlerin yüksek afiniteye sahip FcεRI reseptörlerine bağlanan immünoglobulin E (IgE)'ye çapraz bağlanmasıyla aktive olurlar. Sitoplazmalarında bol miktarda granül barındıran mast hücreleri, aktivasyonun ardından degranülasyon ile vazoaktif aminleri ve proteolitik enzimler gibi mediatörlerini serbest bırakır. Bu mediatörler proinflamatuar, antiinflamatuar ve/veya immünsüpresif işlevler gösterebilir. En önemli mediatörlerden birisi vazodilatasyon ve kılcal geçirgenliği arttıran histamindir. Diğer bir mediatör olan proteolitik enzimler ise bakterileri öldürür yada mikrobik toksinlerin inaktivasyonu sağlar (36–38). Geniş bir mediatör repertuvarı salgılama yetenekleri sayesinde çeşitli biyolojik süreçleri etkileyebilirler. Mast hücreleri alerjik reaksiyonların ötesinde, edinsel immün yanıtların düzenlenmesi, enfeksiyonlara verilen yanıtlar ve immün homeostazın korunması ve doku yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere pek çok immünolojik süreçte önemli aktörlerdir (39,40).

2.3. EDİNSEL İMMÜN SİSTEM

Edinsel immün sistem, omurgalı bağışıklığının son derece özgül ve uzun süreli bir yanıt geliştirmek üzere evrilmiş karmaşık bir bileşenidir ve T lenfosit alt tiplerinin yönettiği hücresel immünite ve B lenfosit ürünü olan antikorların aracılık ettiği hümoral immünitenin bir kombinasyonudur. Bu iki sistem hem birbirleriyle hem de doğal immün sistemle iş birliği ve uyum içerisinde çalışır. Bu iş birliği kritik öneme sahiptir; çünkü doğal immünite yanıtları enfeksiyonları sınırlamaya yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda belirli patojenlere karşı daha özelleşmiş edinsel yanıtların gelişmesine zemin hazırlar (41,42).

İlk savunma hattı olarak görev yapan doğal immün sistem, belirli yapıları tanıma ve yanıt mekanizmalarını kullanır. Sitokinler ve dendritik hücreler tarafından gerçekleştirilen antijen sunumu gibi doğal immün sistem tarafından sağlanan sinyaller edinsel immün sistemin aktivasyonunu uyarır. Edinsel immün sistem çok sayıda patojenin farklı epitoplarını seçici olarak tanır ve spesifik yanıtlar verir. Bu sistemdeki hücreler klonal seçim ve çoğalma gibi süreçlerden geçerek antijene özgül geniş bir

repertuvara sahip antikorlar veya güçlü sitotoksik yanıtlar oluşturur. Edinsel immün sistem yanıtları doğal immün sistem yanıtlarına kıyasla daha geç başlangıçlıdır. Ancak edinsel immün sistem bellek oluşturma yeteneğine sahiptir ve böylece patojenle sonraki karşılaşmada daha hızlı ve güçlü yanıt sağlar. Lenf nodları, dalak ve lenfoid dokulara edinsel immün sistemin kritik bariyerleridir. Edinsel immün sistem, yalnızca enfeksiyonlara karşı mücadele etmez, kanser ve otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli rol oynar. Ayrıca bu sistemin antijenleri tanıma ve bellek oluşturma gücü, hastalıklara karşı geliştirilen aşıların etkinliğinin temelini oluşturur (43,44).

Edinsel immün sistem farklı uyaranlara karşı özel ve güçlü yanıtlar oluşturmak üzere T ve B lenfositleri olarak adlandırılan iki hücre tipi kullanır. Bu lenfositlerin antijen tanıma mekanizmaları birbirlerinden farklılık gösterir. T lenfositler küçük peptit yapıdaki antijenleri tanırken, B lenfositler daha büyük yapıdaki protein, nükleik asit, karbonhidrat veya lipit yapılı antijenleri tanır. Sunulan peptitler, T hücrelerde bulunan T hücre reseptörleri (THR) ile tanınır. Aynı zamanda eş uyaranların da etkileşime girmesi ile hücreler aktive edilir ve aktive edilen lenfositler enfeksiyon bölgesine veya lenfoid organlara göç ederler. Benzer şekilde B hücreler de sunulan antijenleri B hücre reseptörleri (BHR) aracılığı ile tanır ancak aktivasyon aşamaları farklılık gösterir. Aktive olan B lenfositler antikor üretirler ve salarlar, böylece antikorlar immün yanıt durumunda ihtiyaç duyulan bölgeye yönlendirilerek uzak da olsa savunma sağlarlar (42,45).

2.3.1. Hücresel İmmünite

Hücresel immünite, hücre içi patojenlere, virüslere ve kanser hücrelerine karşı savunmada önemli rol oynayan edinsel immünitenin büyük bir unsurudur. Hücresel immünite mekanizmaları; immün gözetimi, tehditlerin ortadan kaldırılmasında farklı fonksiyonlara sahip olan CD4+ yardımcı T hücreleri (Th) ve CD8+ sitotoksik T hücreleri (STL) olmak üzere T lenfositlerinin aktivasyonunu ve farklılaşmasını içerir. Bu sistemin en kritik özelliği ise çeşitli patojenlere karşı spesifik ve uzun süre korumayı sağlamak için bellek hücreleri ile immünolojik hafızayı oluşturmadaki başarısıdır (43).

Hücresel immün yanıtlar DC'ler, makrofajlar ve B hücreler gibi ASH'lerin patojenleri yakalaması, parçalara ayırıp işlemesi ve MHC molekülleri aracılığı ile bu parçaları T hücrelerine sunması ile başlatılır. ASH'ler, antijenleri proteolitik işlemlerden geçirerek peptitlere kadar parçalar. Bu peptitler T lenfositlerine direk olarak sunulamaz, ancak MHC sınıf I ve II yüzey molekülleri aracılığı ile sunum yapılır. Viral ve tümör

antijenler gibi sitozoldeki hücre içi (endojen) protein yapıdaki antijenler sitoplazmada işlenir, endoplazmik retikuluma gönderilir ve MHC sınıf I molekülüne bağlanarak kararlı kompleksler oluşturulur. Ardından kompleksler golgi aygıtı ile hücre yüzeyine taşınarak CD8+ sitotoksik T lenfositlerine sunulur. Böylece hedef hücreyi öldürmek üzere CD8+ T lenfositler aktive olur (42).

Öte yandan patojenler ve onların ürünleri gibi hücre dışı kaynaklardan yakalanan ekstraselüler (ekzojen) antijenler ASH'ler tarafından içeri alınarak vezikül oluşturularak sitoplazmaya gönderilir, veziküller hücre içine göç eder, asitlenir ve lizozomlarla birleşir. Asitli ortam ve endozomlardaki ve lizozomların proteazların etkisiyle antijenler peptitlere parçalanır. Bu sırada MHC sınıf II molekülleri ER'de sentezlenir ve Golgi aracılığıyla taşınarak MHC sınıf II içeren kompartmanları oluşturur ve bunlar endozomlar veya lizozomlardaki peptitlerle birleşerek kompleksler oluşturur. Böylece MHC sınıf II antijen kompleksi ASH yüzeyinde CD4+ Th lenfositlerine sunulur. Sunulan peptitler, T hücrelerde bulunan T hücre reseptörleri (THR) ile tanınır (41).

Timus, naif T hücrelerin köken aldığı ve olgunlaşmalarını tamamladığı yerdir. Ardından kan dolaşıma giren hücreler buradan periferik lenfoid organlara göç ederler. Hem kan hem de periferik lenfoid dokular arasındaki dolaşım süreci süreklidir. Aynı zamanda peptid-MHC komplekslerini taşıyan ASH'ler T hücreleriyle etkileşime girmek ve antijen sunumu yapmak üzere lenfoid dokulara girer. İlk başta bu etkileşim rastgele, spesifik olmayan ve daha zayıftır ancak spesifik antijenin tanınması ve sağlanan ek sinyaller ile güçlenir (43).

T hücrelerin aktivasyonu, çoğalması ve farklı hücre tiplerine farklılaşması için ilk sinyal, ASH'lerin MHC molekülleri ile antijenleri sunmasıdır. Bu sunumda CD4 ve CD8 eşreseptörler MHC moküllerine bağlandığında ilişkili tirozin kinazlar CD3 sitoplazmik alanlarına yaklaşarak, T hücresi aktivasyon sinyallerini ileten aktivasyon kaskadları başlatır. T hücrelerinin tam anlamıyla aktivasyonu ve efektör hücrelere dönüşebilmesi için sadece ilk sinyal yeterli değildir aynı zamanda ikinci sinyal olarak ASH'ler üzerinde bulunan CD80/CD86 ve T hücrelerin üzerinde bulunan CD28 eş uyaran moleküllerin de etkileşime girmesi gerekir. ASH'ler tarafından salgılanan sitokinler de üçüncü sinyal etkisi göstererek daha fazla T hücre aktivasyonu, çoğalması ve alt tiplere farklılaşmasını uyarır. Farklılaşan hücreler ürettikleri özel imza sitokinleri ile immün yanıtlarda en etkili performansı gösterirler (46).

2.3.1.1. Th1, Th2 ve Th17 yardımcı T lenfositler: Aktive olan T lenfositler klonal genişleme, çoğalma ve efektör hücrelere farklılaşma aşamalarına geçerler. CD4+ Th'lar, çeşitli patojenlere karşı en etkili yanıtı oluşturmak amacıyla immün yanıtın ve hümoral immünitenin regülasyonunda önemli rol oynayan T lenfosit alt grubudur. CD4+ Th lenfositler antijen ile karşılaştıktan sonra, her biri farklı imza sitokin profilleri ve işlevsel yeteneklerle karakterize edilen Th1, Th2, Th17, Treg hücreler ve T foliküler hücre (Tfh) olmak üzere çeşitli alt kümelere farklılaşır. Th lenfositlerin farklılaşma serüveninde çeşitli sitokinlerin, THR etkileşiminin ve T-bet, GATA3, Bcl-6 gibi transkripsiyon faktörlerinin hem rekabet ettiği hem de iş birliği yaptığı hassas bir denge vardır (1).

Th1 hücreleri, virüsler ve bazı bakteriler gibi hücre içi patojenlere karşı verilen immün yanıtların kritik oyuncularıdır. Makrofajlar ve DC'ler gibi ASH'lerden salgılanan IL-12, IL-23, IL-27 ve Tip I IFN gibi sitokinler Th1 farklılaşmasına katkıda bulunur. IL-12 ve interferon-gama (IFN-γ) sitokinlerinin etkisiyle Th0'lar Th1 hücrelere farklılaşır. Özellikle IL-12 sitokini, Th1 hücrelerin hayatta kalımını uyarırken, Th2 hücreler için ana düzenleyici transkripsiyon faktörü olan GATA-3'ün ekspresyonunu baskılar. IFN-γ sitokini, transkripsiyon faktörü olan sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT)-1'i aktive eder ve aynı zamanda T-bet'in ekspresyonunu düzenler. T-bet, Th1 farklılaşmasının ana düzenleyicisi olarak görev yapar. Bu hem IL-12 reseptör beta-2'nin eksresyounu hem de Th1 hücreleri tarafından üretilen imza sitokin olan IFN-γ ekspresyonunu uyarır. Böylece IL-12'ye karşı sürekli yanıt oluşturulur ve bu da daha fazla IFN-γ üretimi ve Th1 farklılaşmasını uyaran STAT4'ü aktive eder. Th1 farklılaşma süreci, IL-12'nin ötesinde zengin bir sitokin yelpazesinden etkilenir. IL-18 sitokini Th1 farklılaşmasında tek başına uyarıcı olmasa da IL-12 reseptörünün ekspresyonunu arttırarak ve T hücrelerin efektör fonksiyonlarını güçlendirerek farklılaşmaya katkıda bulunur. IL-27, IL-12 ile sinerjik olarak etki ederek T-bet ekspresyonunu güçlendirir ve böylece Th1 gelişim yolağını sağlamlaştırır. Ayrıca ATF3 gibi ek transkripsiyon faktörleri, erken Th1 farklılaşma sürecini düzenler. Bu sitokinler ve transkripsiyon faktörleri arasındaki moleküler etkileşim, Th1 farklılaşmasının karmaşıklığını vurgulamaktadır (46,47).

Th1'lerin aksine hücre dışı immüniteden sorumlu hücreler olan Th2 lenfositler; özellikle helmintler gibi parazitlere karşı savunmada ve astım-alerjik reaksiyonların

patogenezinde önemli rol oynarlar. Th2 farklılaşmasını yönlendiren imza sitokin IL-4; STAT6'yı aktive ederek Th2 lenfosit farklılaşmasını yönlendiren transkripsiyon faktörü GATA-3'ün ekspresyonunu uyarır. Aktive olan GATA3, yalnızca Th2 farklılaşmasını daha da kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi Th2 ile ilişkili sitokinlerin genlerinin ekspresyonunu da artırarak Th2 fenotipinin gelişimine katkıda bulunur. Böylece GATA-3, Th1 hücrelerin faklılaşmasındaki faktörleri engelleyerek, Th2 lenfositlerin farklılaşmasını ve yanıtlarını yönlendirir. Th2 hücre biyolojisinde NFATc2 ve IRF4 gibi diğer transkripsiyon faktörleri de önemli rol oynar. NFATc2, Th2 hücrelerindeki gen düzenleyicilerle bir etkileşim sergiler ve GATA3 ve c-Maf ile iş birliği içinde IL-4 gen ekspresyonunu uyarır. Benzer şekilde, IRF4 ve GATA3 arasındaki etkileşim, IL-4 ekspresyonunu etkileyerek Th2 yanıtlarını artırır. IRF4, Th2 sitokin ekspresyonunun önemli bir modülatörü olarak kabul edilmiştir ve Th2 fenotipini oluşturmak için sinerjik olarak çalışan transkripsiyon faktörlerinin karmaşık bir etkileşimini göstermektedir. Ayrıca, Th lenfositler arasındaki denge, immün homeostazın devamlılığı için önem taşır ve IL-10 gibi sitokinler Th2 yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynar (48–50).

CD4+ yardımcı T lenfositlerin daha geç keşfedilen bir alt kümesi olan Th17 lenfositler hücre dışı bakteriler ve mantarlara karşı savunmada görevli hücrelerdir. Ayrıca otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli rol oynarlar. IL-17 üretimiyle karakterize edilen Th17 hücrelerinin farklılaşması, çeşitli sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve mikrobiyota tarafından etkilenen karmaşık bir süreci kapsar. Bu farklılaşmayı yönlendiren birkaç önemli faktör vardır; TGF-β, IL-6 ve IL-23 gibi spesifik sitokinler, hücre içi sinyal yolakları ve mikrobiyal kaynaklardan gelen çevresel sinyallerdir. TGF-β tek başına, transkripsiyon faktörü FOXP3'ün ekspresyonunu uyararak Treg hücre farklılaşmasını uyarabilir. Ancak IL-6 varlığında TGF-β, naif T hücrelerinin Th17 hücrelerine farklılaşmasını yönlendirir. Bu da Th17'ye özgü genlerin ekspresyonu için kritik olan transkripsiyon faktörü RORγt'nin aktivasyonunu gerektirir. Th17 farklılaşmasına katkıda bulunan diğer transkripsiyon faktörleri RORα, STAT3 ve IRF4'dir. Bununla birlikte Th17 hücreler Th1 ve Th2 lenfositlerin farklılaşmasında rol oynayan T-bet ve GATA-3 transkripsiyon faktörlerini eksprese etmezler. TGF-β ve IL-6'nın yanı sıra, IL-1, IL-23 ve IL-21 gibi ek sitokinlerin de Th17 hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Özellikle IL-23 sitokini, Th17 soyuna ilk bağlılıkta değil ancak çoktan farklılaşmış Th17 hücrelerinde IL-17 sitokini

ekspresyonunu koruyarak ve inflamatuar yeteneklerini destekleyerek bu hücrelerinin sağkalımı ve çoğalması için gereklidir (50–52).

Th17 lenfositler bir immün yanıt durumunda nötrofillerin toplanması, aktivasyonunu, göçü, dokuların yeniden modellenmesi ve onarımını katkıda bulunan IL-17A, IL-17F ve IL-22 sitokinlerini üretirler. Th17 hücreleri tarafından üretilen sitokinler, özellikle IL-17, romatoid artrit ve multipl skleroz gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda, inflamasyon ve doku hasarının onarılmasında önemli roller oynar. Ayrıca IL-17, çeşitli hücre tiplerindeki reseptörüne bağlanarak IL-6 ve kemokinler gibi proinflamatuar medyatörlerin ekspresyonuna yol açar ve bu da inflamatuar yanıtı daha da güçlendirir (53).

2.3.1.2. T foliküler hücreler (Tfh): T foliküler yardımcı (Tfh) hücreler, özellikle lenfoid dokuların germinal merkezlerinde (GC) immün yanıtların düzenlemesinde kritik bir rol oynayan CD4+ T hücrelerinin özel bir alt kümesidir. Bu hücrelerin ana işlevi B hücrelerine hücre olgunlaşması, sınıf değiştirme, afinite olgunlaşması ve antikor üretimi için gerekli yardımı sağlamak ve uzun süreli immünolojik belleğin gelişimini artırmaktır. Tfh hücreleri, foliküler bölgelere göçlerini kolaylaştıran ve germinal merkez oluşumu ve korunması için B hücreleriyle gerekli etkileşimleri destekleyen CXCR5, PD-1 ve ICOS gibi temel belirteçlerin ekspresyonu ile karakterize edilir (51).

T foliküler yardımcı hücrelerin farklılaşması, çeşitli çevresel faktörler ve transkripsiyonel düzenleyicilerden etkilenen kompleks bir süreçtir. Tfh hücre farklılaşmasının merkezinde, Tfh hücre fonksiyonu ve lenfoid folikül içindeki konumlanması için gerekli olan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü Bcl-6 yer alır. Bcl-6, naif CD4+ T hücrelerinin Th1 ve Th2 hücrelerine farklılaşmasını engeller ve böylece onları Tfh soyuna yönlendirir. c-Maf ve BATF gibi diğer transkripsiyon faktörleri de B hücre aktivasyonu ve farklılaşması için gerekli bir sitokin olan IL-21 üretimini düzenleyerek Tfh hücre gelişimini iş birliği içinde artırır. Aktive olan Tfh hücreleri tarafından salgılanan IL-21, germinal merkez (GC) oluşumunu kolaylaştırır ve B hücresi proliferasyonunu ve sınıf değişimini etkiler. Tfh farklılaşma süreci, özellikle IL-6 ve IL-21 olmak üzere, dendritik hücrelerden ve B hücrelerinden gelen sitokinlerden de etkilenir (54,55).

T-B hücre sınırında Tfh hücrelerinin B hücreleriyle etkileşimi kritiktir. THR tarafından tanınma ve sinyalizasyonun ardından Tfh farklılaşmasına gerekli sinyalleri sağlayan ICOS ve CD28 dahil olmak üzere kostimülatör moleküller aracılık eder. Aktif Tfh hücreleri, IL-21 salgılayarak hem kendi üzerlerindeki IL-21 reseptörü aracılığıyla otokrin etki oluşturur hem de B hücreleri üzerinde eksprese edilen IL-21 reseptörüne bağlanarak plazma hücrelerine farklılaşmasını uyarırlar. T-B hücre ara yüzünde yer alan Tfh hücreleri, diğer Th hücre alt gruplarına kıyasla CD40L, ICOS ve OX40 gibi eş-uyaran moleküllerini daha yüksek düzeylerde eksprese eder. Bunun yanı sıra, foliküllere yönelimde kritik öneme sahip olan CCR7 ve CXCR5 moleküllerinin ekspresyonu da Tfh hücrelerinde belirgindir. Foliküler dendritik hücreler (FDC'ler) de dahil Tfh hücreleri, CXCL13'ün kemokin reseptörü ve lenfoid dokuların foliküler bölgelerinde B ve T hücrelerinin uygun konumlanmasından sorumlu olan CXCR5'i yüksek oranda ifade eder. Bu reseptör–ligand etkileşimi sayesinde Tfh hücreleri, B hücrelerine yardımcı olabilecekleri foliküler alanlara lokalize olabilir. Sekonder lenfoid dokularda B hücre foliküllerinin oluşumu için gerekli olması nedeniyle CXCR5, tüm olgun B lenfositler tarafından da eksprese edilebilmektedir. Böylece CXCL13 üretiminin yoğun olduğu bölgelerde birlikte konumlanarak etkin B–T hücre etkileşimlerini gerçekleştirir. Bu etkileşimlerin sonucunda B hücreleri, antikor üretmek üzere plazma hücrelerine farklılaşır. Tfh hücre farklılaşması ile T hücreye bağlı antikor yanıtının uyarılmasında rol alan moleküllerin ekspresyon düzeylerindeki artış veya azalış, bazı otoimmün hastalıklar ve immün yetmezliklerin patogenezinin aydınlatılmasında önemli bir rehber niteliği taşıyabilir (54,56,57).

2.3.1.3. T regülatör hücreler (Treg): Yardımcı T hücrelerinin özelleşmiş bir alt grubu olan regülatör T hücreleri (Treg'ler), klasik olarak fareler ve insanlarda CD25'in (IL-2Rα) yüksek düzeyde sürekli ekspresyonu ve FOXP3 transkripsiyon faktörünün varlığı ile tanımlanan bir hücre grubudur. Treg hücreler, otoreaktif T hücrelerin aktivasyonunu ve çoğalmasını baskılayarak organizmayı otoimmüniteden korur. Böylece patolojik immün aktivasyonun baskılanması ve özellikle öz-toleransın korunması için önemlidir (58).

Regülatör T hücrelerin nicelendirilmesi ve tanımlanması için temel bir moleküler belirteç olan FOXP3, Treg hücrelerin gelişimi ve fonksiyonunda ana düzenleyici unsurdur. Ayrıca Treg hücreler fonksiyonlarına bağlı olarak CD62L, CD69,

CD71, CD122, CTLA-4, HLA-DR ve glukokortikoid kaynaklı TNF-α reseptörü (GITR) gibi belirteçleri eksprese ederler. Treg hücre farklılaşmasında IL-2 ana sitokin olarak rol oynarken, TGF-β da farklılaşmaya katılır. Tregler baskılama mekanizmalarını CTLA-4 gibi inhibitör moleküller ile doğrudan hücre teması yoluyla veya salgıladıkları IL-10 ve TGF-β gibi sitokinler aracılığıyla gerçekleştirirler (59–61).

Deneysel ve klinik immünolojide Treg'ler, yalnızca otoimmünitenin değil, aynı zamanda akut ve kronik enfeksiyonlar, kanser, alerjik hastalıklar, transplantasyon ve sistemik inflamasyondaki immün yanıtların da kritik düzenleyicileridir. Bu durum, farklı hastalık bağlamlarındaki geniş önemlerini ortaya koymaktadır (62,63).

Regülatör T hücreler immün homeostaz ve toleransın merkezî düzenleyicileridir; bu nedenle antimikrobiyal immünitenin yanı sıra enfeksiyonla ilişkili immünopatolojiyi de şekillendirme potansiyeline sahiptirler. Enfeksiyöz bağlamlarda Treg'lerin ikili etkiler sergilediği tanımlanmaktadır: bir yandan immün yanıtları sınırlayarak dokuya zarar veren inflamasyonu azaltabilirken, diğer yandan koruyucu, patojene özgü immüniteyi baskılayarak temizlenmenin gecikmesine veya kronik enfeksiyona katkıda bulunabilirler. Bu ikilik, viral ve viral olmayan enfeksiyonlarda tutarlı biçimde vurgulanmakta; klinik sonuçların, konak immün durumu ve patojen biyolojisine bağlı olarak aşırı inflamasyon ya da yetersiz efektör fonksiyon tarafından belirlenebildiği gösterilmektedir (63,64).

2.3.2. Hümoral İmmünite ve B Lenfositler

Hümoral immünite, antijen maruziyetini takiben B hücreleri ve plazma hücreleri tarafından antijene özgül antikorların üretilmesiyle tanımlanan edinsel immünitenin temel bir koludur. B lenfositler, edinsel immünitenin ana oyuncularıdır ve klasik olarak antikor salgılayan hücrelere farklılaşabilme yetenekleri ile tanımlanır. Antikorlar; nötralizasyon, fagositozu uyaran opsonizasyon ve kompleman aktivasyonu gibi efektör mekanizmalar aracılığıyla koruyucu etki gösterir. Kompleman sistemi, patojenlerin hızlı tanınmasını ve eliminasyonunu desteklemesi ile antikor yanıtlarının şekillendirilmesine katkıda bulunması açısından hümoral immünitenin önemli bir tamamlayıcısıdır. Antikor üretiminin ötesinde B hücreleri, T hücrelerine antijen sunumu ve sitokin salgılanması yoluyla immün yanıtların düzenlenmesine ve immün homeostazın korunmasına katkıda bulunur. Bu sayede farklı bağlamlarda $CD4^+$ T hücrelerinin aktivasyonunu ve polarizasyonunu şekillendirebilirler. Fonksiyonel olarak farklı B hücre alt gruplarının

patojenik ve/veya düzenleyici aktiviteler sergileyebildiği gösterilmiştir. Bu durum, B lenfositlerin tek tip bir efektör hücre grubundan ziyade heterojen alt gruplar içerdiğini ortaya koymaktadır (65,66).

Yaşamın erken döneminde B hücre gelişimi ve B hücresi soyuna yönelim, prenatal dönemde fetal karaciğerde başlamaktadır ve yaşam boyunca kemik iliğinde devam etmektedir. B lenfositler T lenfositlere benzer şekilde çok farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip olan kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerden (HSC'ler) köken alır. T lenfositlerden farklı olarak B hücreleri timusa göç etmezler ve kemik iliği, doğumdan sonra B hücresi oluşumunun birincil yeri olarak görev yapar (1).

B lenfositlerinin gelişimi ve olgunlaşmasındaki adımlar, Ig genlerinin kesin bir sırayla yeniden düzenlenmesi ve ekspresyonu, antijen öncesi reseptör kontrol noktasında gelişen B hücrelerinin seçimi, proliferasyonu ve olgun B hücresi repertuarının seçimidir. Memelilerde B hücresi gelişimi, farklı aşamalara ayrılabilen iyi tanımlanmış bir sıralı süreci izler: pre-pro-B hücre, pro-B hücre, pre-B hücre, olgunlaşmamış B hücre, T1 B hücre, T2 B hücre, olgun B hücre, aktif B hücre ve plazma B hücre aşamalarıdır. Erken gelişim aşamalarında B hücreleri, B hücresi olgunlaşması için gerekli olan immünoglobulin ağır zincirlerinin üretilmesinden sorumlu V(D)J yeniden düzenlemeleri de dahil olmak üzere kritik test süreçlerinden geçer. B hücre reseptör zincir genlerinin yeniden düzenlenmesini ve merkezi tolerans yoluyla otoreaktif hücrelerin çıkarılmasını takiben, olgunlaşmamış T2 B hücreleri dalağa yer geçiş yapar. Periferik tolerans sürecinden geçen olgunlaşmamış T2 B hücreleri, MZ B hücrelerine farklılaşarak kısa ömürlü plazma hücrelerine veya olgun foliküler B2 hücrelerine farklılaşır ve ardından T hücre bağlı aktivasyon üzerine önce aktif B hücrelerine, sonra plazmablastlara ve uzun ömürlü plazma hücrelerine veya hafıza B hücrelerine dönüşür. Ayrıca kısa ömürlü plazma hücrelerine de dönüşerek ekstrafoliküler yanıt sağlarlar (67–69).

2.3.2.1. B regülatör hücreler (Breg): B regülatör hücreler (Breg), B lenfositlerin son yıllarda daha iyi araştırılan ve tanımlanan bir alt grubudur. Yapılan çalışmalarda Breg'lerin enfeksiyon hastalıkları, alerji, otoimmün hastalıklar, transplantasyon ve kanser olmak üzere birçok klinik durumda rol oynadığını göstermiştir. İnsanlarda Breg hücre popülasyonu oransal olarak periferik kan B lenfositlerinin <%1'ine karşılık gelir. Antikor üreten ya da antijen sunan B hücrelerin aksine Breg hücreler özellikle immün yanıtın baskılanmasında ve homeostaz durumunun sürdürülmesinde

etkili olan hücrelerdir. Breg hücreleri diğer B hücre alt gruplarından ayıran ve tanımlayan özel bir transkripsiyon faktörü veya yüzey belirteci henüz keşfedilmemiştir. Breg'ler fonksiyonları veya salgıladıkları IL-10, IL-35 ve TGF-β gibi immün baskılayıcı sitokinler ile tanımlanırlar. Özellikle IL-10, Breg hücrelerin tanımlanmasında en sık kullanılan sitokindir. Genel olarak Breg'ler ürettikleri sitokinler aracılığıyla Th1, Th17, STL, monositlerin ve pDC'lerin aktivasyonunu baskılarken, tam aksine $FOXP3^+$ Treg, Tr1 ve iNKT hücrelerin aktivasyonunu uyarır (70,71).

B regülatör hücrelerin gelişimi ve uyarılması çevresel sinyallere güçlü biçimde bağımlıdır. Hücre-hücre etkileşimleri (CD40-CD40L etkileşimi), PAMP ve DAMP'lar, inflamatuar sitokinler veya bazı ilaçlar gibi uyaranlar da dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar Breg farklılaşmasını tetikleyebilir. Breg hücreler fenotipik açıdan heterojen bir popülasyondur. İnsanlarda en fazla araştırılan Breg hücreler, IL-10+Breg hücreleri olarak adlandırılan IL-10 eksprese eden Breg hücrelerdir. Bu hücreler $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ (bellek benzeri) veya $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ (immatüre/geçişsel/transitional B hücre) fenotipinde tanımlanır. Ayrıca granzim B eksprese eden $CD19^+CD38^+CD1d^+IgM^+CD147^+$ fenotipi ile tanımlanan $GZMB^+$ B hücreleri, $CD19^+CD25^{hi}CD71^{hi}CD73^{lo}$ fenotipinde tanımlanan Br1 hücreleri, $CD19^+CD27^{int}CD38^{hi}$ ve $CD39^+CD73^+$ fenotipleriyle gösterilen plasmablastlar ve fenotip olarak çeşitlilik gösteren TGF-β^+ Breg, IL-35^+ Breg ve Tim-1^+ Breg hücreler keşfedilmiştir (70,72,73).

B regülatör hücrelerin en belirgin özelliklerinden birisi IL-10 sitokini aracılığıyla immün homeostazın korunmasıdır. IL-10, önemli immün düzenleyici işlevlere sahip pleiotropik bir sitokindir. İmmün sistemdeki anti-inflamatuar rolü birçok hücre tipinin faaliyetlerini etkiler. IL-10, Th1 ilişkili IFN-γ, IL-2, TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını engeller ve böylece lenfosit hattının Th2 yanıtlarına doğru farklılaşmasını sağlar. Ayrıca IL-10, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler üzerinde güçlü immün baskılayıcı etki gösterir. Bu hücrelerin IL-1α ve β, IL-6, IL-12, IL-18 ve TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinler ve ilişkili kemokinler salgılamasını engeller ve böylece hücrelerin farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve lenfoid organlara göçünü önler. Ayrıca ASH'lerin antijen sununumunu baskılayan anti-inflamatuar bir sitokin olarak görev yapar. Bunun yanında IL-10 immün yanıtlarda uyarıcı etki de gösterir. B lenfositleri uyarır ve germinal hücrelerde apoptozu önler, hücre

büyümesini, proliferasyonunu ve aktivasyonunu artırır ve immünoglobulin salgılayan plazma hücrelerine farklılaşmayı sağlar. IL-10 ayrıca Treg'lerin farklılaşmasında ve işlevinde de önemli bir rol oynar. IL-10, virüsler, bakteriler, mantarlar ve diğer patojenlerin neden olduğu enfeksiyon sırasında immünitenin ana düzenleyici sitokinlerinden biridir ve enfeksiyonu sınırlayarak veya sonlandırarak konakçı korumasında kilit bir rol oynar. Bu yönleriyle IL-10 sitokini sağlıklı bir immün yanıtın orkestra şefi gibi görev üstlenerek immün yanıtları düzenler (74–77).

IL-10 salgılayan en önemli hücre gruplarından birisi $CD19^{+}CD24^{high}CD27^{+}$ fenotipindeki Breg hücre grubudur. Bu popülasyon genellikle bellek B hücreleri ile ilişkilendirilir. CD27 ekspresyonunun olması bu hücrelerin daha önce antijenle karşılaşmış ve deneyim kazanmış olduğunu düşündürür. Bu hücrelerin güçlü IL-10 sitokin salgılaması, $CD4^{+}$ T hücre proliferasyonunu ve Th1 ve Th17 hücre yanıtlarını baskılar. IFN-γ, TNF-α gibi inflamatuar sitokinlerin salınımını azaltır ve immün toleransı destekler. $FoxP3^{+}$ Treg gelişimini uyarır. Ayrıca monositleri ve DC'leri baskılar. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin aşırı inflamasyonu kontrol altına alarak otoimmün yanıtların frenlenmesinde önemli rol oynadığı anlaşılmıştır (78–80).

IL-10 salgılayan diğer önemli hücre grubu $CD19^{+}CD24^{high}CD38^{high}$ fenotopindeki Breg hücrelerdir ve immatüre veya geçişsel hücreler olarak da adlandırılır. Bu popülasyondaki hücreler kemik iliğinden perifere yeni çıkmış, olgunlaşma sürecindeki hücreleri temsil eder. $CD19^{+}CD24^{high}CD38^{high}$ Breg'ler kanda ve inflamasyon bölgesinde bulunur ve immün yanıtlarda düzenleyici roller üstlenirler. Bu hücrelerin yüksek IL-10 ekspresyonu ve salınımı, Th1 ve Th17 lenfositlerin farklılaşmasını inhibe eder ve Treg'leri uyarır. Ayrıca virus-spesifik $CD8^{+}$ T hücre yanıtlarını baskılar. Bu popülasyondaki hücrelerin otoimmün hastalıklar veya çözülemeyen enfeksiyonlar sırasında inflamatuar yanıtları azaltarak, immün tolerans için gerekli olan hassas dengenin korunmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (79,81,82).

2.4. PİYELONEFRİT PATOGENEZİ

2.4.1. İdrar Yolu Enfeksiyonları, Piyelonefrit ve Böbrek Taşı Oluşumu

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), normalde steril olan idrar yolunun mikrobiyal infiltrasyonu olarak tanımlanır ve her yıl Dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen en yaygın enfeksiyonlardan biridir (83). İYE prevalansı yaş, cinsiyet ve coğrafya gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişir. Genel olarak İYE'ler her yaş grubu ve cinsiyeti etkiler. Özellikle çocukluk çağında en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır. Yaşamın ilk yıllarında kadın ve erkeklerde eşit olarak görülse de sonraki yıllarda kadınlarda erkeklere kıyasla daha yaygındır (84,85). 1990 yılından 2019'a kadar 204 ülke ve bölgede İYE'nin prelevalansını yaş, cinsiyet ve sosyoekonomik duruma göre analiz etmeyi amaçlayan bir araştırmada, 2019'da küresel olarak 404 milyondan fazla kişinin İYE geçirdiği (1990'a göre %60 artış) ve İYE ile ilgili yaklaşık 237.000 ölüm olduğu bildirilmiştir. Bildirilen en yüksek vaka sayısı ise 30 ila 34 yaş arasındaki yaş grubunda bulunmuştur (86). Bununla birlikte, İYE'lerin sağlık kurumlarına eksik bildirimi ve değişen tanımları nedeniyle, küresel olarak İYE'lerin kesin prevalansını belirlemek zordur.

İdrar yolu enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu bakteriyel enfeksiyon kaynaklıdır, ancak mantar, viral ve paraziter enfeksiyonlar da İYE'ye yol açabilir. İYE'lerin çoğuna, başta *Escherichia coli* olmak üzere *Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter* türleri dahil *Enterobacteriaceae* ailesinden Gram-negatif patojenler neden olur. Fungal İYE'ler bakteriyel İYE'ler kadar yaygın olmasa da kalıcı kateterleri, diyabeti veya yakın zamanda antibiyotik kullanımı olan hastalarda enfeksiyon riski artar (87,88). İYE teriminin kapsadığı klinik durumlar; asemptomatik bakteriüri (ASB), akut komplike olmayan sistit, tekrarlayan sistit, kateterle ilişkili ASB, kateterle ilişkili İYE, prostatit ve piyelonefriti içerir. Bu klinik durumlar başta hastanın üriner sistemine ve cinsiyetine, komorbid durumlara ve taşların, stentlerin veya kateterlerin varlığı dahil olmak üzere genitoüriner öyküye dayalı semptomların varlığı veya yokluğu ile ayırt edilir (89). En yaygın İYE, mesanede asemptomatik bakteri (genellikle *E.Coli* - yeni atılan idrarda genellikle $>10^5$ bakteri/ml) kolonizasyonu sonucu gelişen sistittir. Ayrıca enfeksiyon tüm idrar yolu boyunca oluşabilir ve bunun sonucunda piyelonefrit, üretrit ve prostatit gelişebilir (90,91). Klinikte sub-klinik enfeksiyon gösteren asemptomatik hastalar olabildiği gibi, yaşamı tehdit eden ürosepsis vakaları da görülmektedir. Hasta gruplarının

heterojenlik göstermesi nedeniyle yıllardır yapılan araştırmalara rağmen hastalık ciddiyetini ve karmaşıklığını korumaktadır (92). Bu nedenle İYE'nin sınıflandırılması, klinik açıdan hastalara hızlı ve uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve uygulanması açısından önemlidir. Genel olarak İYE sınıflandırması, idrar yolundaki konuma, klinik semptomlara, ilgili komplike faktörlerin varlığına, laboratuvar verilerine ve mikrobiyolojik bulgulara göre yapılır. Buna göre klinik olarak İYE'ler, komplike olmayan veya komplike İYE olarak kategorize edilir (93,94).

Komplike olmayan İYE, menopoz öncesi dönemde ve gebe olmayan, bağışıklığı baskılanmamış, ürogenital sistemde anatomik ve fonksiyonel anormallikleri olmayan ve doku invazyonu ve sistemik enfeksiyon belirtileri göstermeyen enfeksiyon türüdür (92). Bu enfeksiyonlar alt İYE'ler (sistit) ve üst İYE'ler (piyelonefrit) olarak ayrılır. Kadın cinsiyet, geçirilmiş bir İYE, cinsel aktivite, vajinal enfeksiyon, diyabet, obezite ve genetik yatkınlık dahil olmak üzere çeşitli risk faktörleri sistit ile ilişkilidir (95). Komplike olmayan İYE'ler, genellikle hafif ila orta şiddetli klinik seyir gösterir ve kısa süreli antibiyotik kullanımıyla başarılı bir şekilde tedavi edilebilir. Yine de enfeksiyonun böbreklere yayılarak piyelonefrite gibi daha ciddi komplikasyonlara neden olmasını önlemek için en kısa sürede tedavi etmek önemlidir. Bu İYE'ler genellikle kapsamlı tanı testi gerektirmez ve tedaviye genellikle hastanın semptomlarına ve basit bir idrar çubuğu testine (urine dipstick test) göre başlanabilir (88).

Komplike İYE'ler anormal bir üriner sistem veya enfeksiyona yatkınlığı artıran başka herhangi bir faktörün varlığında ortaya çıkan idrar yollarındaki enfeksiyonları kapsar. Komplike İYE tanımına;

- Özel fonksiyonel veya anatomik anormallikler (üriner obstrüksiyon, nörolojik hastalığın neden olduğu üriner retansiyon gibi),
- Omurilik travması,
- Böbrek yetmezliği ve böbrek nakli,
- Kateterizasyon veya stent,
- Diabetes mellitus ve immün sistem baskılanması,
- Gebelik ve böbrek taşı gibi yabancı cisimlerin varlığı dahil olmak üzere üriner sistem veya konak savunmasını tehlikeye atan faktörlerle ilişkili tüm İYE'ler dahil edilir. Diğer bir tanımla komplike olmayan tüm İYE'ler, komplike İYE'ler olarak kabul edilir (96,97).

Komplike İYE'de anlamlı kabul edilen bakteriüri, kadın ve erkeklerin orta akımdaki idrar örneğinde sırasıyla $\geq 10^5$ CFU/mL ve $\geq 10^4$ CFU/mL sayıları ile tanımlanır (94). Bu İYE'lerdeki bakteriyel spektrum, komplike olmayan İYE'lerdekinden çok daha geniştir ve biyofilm oluşumu gözlenebilir. Komplike İYE'lerin en yaygın nedensel ajanı, üropatojenik *Escherichia coli*'dir (UPEC). UPEC'den sonra neden olan ajanların yaygınlık sırası *Enterococcus spp., K. pneumoniae, Candida spp., S. aureus, P. mirabilis* ve *P. aeruginosa'dır* (95). Komplike İYE'lerin ciddi seyri, konak savunma mekanizmaları ile üropatojenlerin virülansı arasındaki dengeye bağlıdır. Aslında bakteriyel patogenez, bakterinin konak savunma mekanizmalarını aşma, biyofilm oluşturma ve idrar yolu veya kan dolaşımının farklı ortamlarında hayatta kalma yeteneğinin bir kombinasyonudur (98).

Piyelonefrit, renal pelvisi ve parankimini tutan enfeksiyöz ve inflamatuar bir hastalıktır. Renal skarlaşmaya ve böbrek fonksiyonlarının bozulmasına yol açabilir. Genellikle bakteriler üretradan girerek mesanede sistit oluştururlar. Ardından enfeksiyon böbreğe ulaşarak piyelonefrite neden olur. Nadiren de olsa patojenler hematojen yol ile böbreğe girerler. Direkt yayılım çok nadir olmakla birlikte lenfojen yayılım için yeterli kanıt yoktur. Piyelonefrit oluşumunda sıklıkla komplike İYE'lerdeki bakteri türleri etkendir. Böbrek enfeksiyonuna yol açan bakterilerin büyük bölümü bağırsaklarda bulunan ve sindirime yardımcı olan mikroorganizmalardır. Özellikle kadınlarda genital enfeksiyonlar da idrar yollarına geçerek enfeksiyona yol açabilir. Piyelonefrit oluşum riskini arttıran faktörler;

- Vezikoüreteral reflü,
- Böbrek taşı,
- Böbreklerde doğumsal anomaliler,
- Böbrek yetmezliği ve böbrek nakli,
- Prostat büyümesi (erkeklerde),
- Kateter kullanımı,
- Diabetes mellitus, İmmün sistemi baskılanmış veya immün yetmezliği olan kişilerdir. Ayrıca yeterli su tüketimi yapmayan ve idrarını tutan bireylerde de piyelonefrit gelişme riski yüksektir (99,100).

Kostovertebral açı hassasiyeti ve ağrısı, hematüri ve muhtemelen sistit semptomları (vakaların sadece %50'sinde mevcuttur) gibi lokal semptomların yanında; sistemik belirti ve bulgular yaygın ve sıklıkla şiddetli olup halsizlik, ateş (>38°C), titreme,

mide bulantısı ve kusma, sık sık acil ve ağrılı idrara çıkma, deliryum belirtisi olarak zihinsel karışıklık ve septik şok ile birliktedir (92). C-reaktif protein (CRP) ve eritrosit sedimantasyon hızı sıklıkla yükselir ve vakaların %20'sinde kan kültürleri pozitiftir. Enfeksiyon normalde fokal olmasına rağmen, böbrek yetmezliğine neden olan diffüz enfeksiyon meydana gelebilir. Şiddetli enfeksiyon, özellikle *E. Coli* gibi bakteri ile bulaşıyorsa amfizematöz piyelonefrite duyarlı olan diabetes mellituslu hastalarda papiller nekroza neden olabilir. Bu tür bir enfeksiyon sıklıkla nefrektomi gerektirir ve hayatı tehdit eder. Böbrek içinde veya böbrek kapsülünün ötesine uzanan bir apse (perinefrik apse) oluşabilir (91,101).

Piyelonefrit akut ve kronik olabilir. Akut piyelonefrit kadınlarda daha sık görülür. En yaygın 2 semptom genellikle ateş ve yan ağrısıdır. Akut piyelonefrit komplike olmayan ve komplike olarak ayrılabilir. Komplike piyelonefrit hasta grubu içerisinde gebeler, kontrolsüz diyabetli, böbrek transplantasyonlu, böbrek taşı ve üriner anatomik anormallikleri, akut veya kronik böbrek yetmezliğinin yanı sıra bağışıklığı baskılanması olan ve kateter, stent takılan hastalar vardır. Akut piyelonefrite yol açan diğer risk faktörleri arasında genetik yatkınlık (düşük CXCR1 ekspresyonu gibi), yüksek mikrobiyal yük, patojen virülans özellikleri (P fimbriae gibi adezinler) yer alır (99,102). Kronik piyelonefrit ise tekrarlayan akut ataklarla kendini gösteren veya birkaç yıl içinde sinsice ortaya çıkan ve kademeli olarak böbrek fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilen son dönem böbrek hastalığı olarak keşfedilmiştir. Kronik piyelonefrit, ksantogranülomatöz piyelonefrit (XGP) ve amfizematöz piyelonefrit (EPN) gibi başka türlü tanımlanmayan varyantları kapsar. Kronik piyelonefrit vakalarının çoğu, tekrarlayan ve kalıcı enfeksiyonlarda veziko-üreterik reflü ile ilişkilendirilmiştir, ancak bu durum, kronik böbrek hastalığına yol açan birçok kronik inflamatuar renal sürecin son dönemidir. Önleyici böbrek nakli için göreceli endikasyonlardan biridir (103,104).

Böbrek taşları (nefrolitiazis veya diğer adıyla ürolitiyazis), böbreklerin içinde meydana gelen minerallerden ve tuzlardan oluşan sert tortulardır. Nefrolitiazis, kalsiyum oksalat (CaOx), kalsiyum fosfat veya ürik asit gibi taş oluşturan tuzların konsantrasyonu yüksek olduğunda ortaya çıkar. Konsantrasyon, kristallerin oluşmasına veya önceden oluşturulmuş kristallerin büyümesine ve tortu oluşturmasına izin verecek kadar yüksek olduğunda, idrar aşırı doymuştur (105). Kanda bulunan bazı mineraller de böbreklerden atılırken idrarda belli bir çözünürlükte ve denge halinde bulunur. Çeşitli nedenlerle çoğu

zaman idrar konsantre hale geldiğinde, minerallerin çözünürlüğü azalır, birikir ve kristalleşerek birbirine yapışır ve çöken kristal veya kristalli katılaşmış tortular taşları oluşturur. Oluşan tortular böbrekten genitoüriner sistem yoluyla seyahat ederler ve küçük boyutlu taşlar üretra yoluyla ağrısız olarak vücudu terk ederler. Daha büyük taşlar böbreklerden mesaneye kadar idrar yolunun herhangi bir bölümünü etkileyebilir (106).

Böbrek taşı hastalığı dünya nüfusunun %5-20'sini etkileyen oldukça yaygın bir hastalıktır. Sanayileşmiş ülkelerde prevalansı gitgide artabilmektedir. Bazı tıbbi durumlar, beslenme faktörleri, yetersiz sıvı tüketimi, aşırı vücut ağırlığı, bazı ilaçlar ve besin takviyeleri böbrek taşı oluşmasının nedenleri arasındadır (107). Nefrolitiazis hem kronik hem de sistemik durumlarla birlikte görülmektedir. Artan sayıda kanıt; inflamasyon, oksidan-antioksidan dengesizliği, anjiyogenez, pürin metabolizması ve üre döngüsü bozukluklarının nefrolitiazis gelişiminde çok önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (108,109). Normal koşullar altında reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi vücutta sıkı bir şekilde kontrol edilir. Klinik ve deneysel çalışmaların sonuçları, böbrek epitelinin yüksek CaOx ve kalsiyum fosfat (CaP) kristallerine maruz kalmasının, aşırı ROS ürettiğini göstermektedir. Nefrolitiazisli hastalar, kontrollerle karşılaştırıldığında artmış ROS oranı, lipid peroksidasyon ürünleri, proinflamatuar sitokinler ve proanjiyojenik faktörler ile karakterize edilmiştir (110). Nefrolitiazis seyrinde CaOx kristalleri, insan böbrek dokusunda Randall plaklarına (RP'ler) yapışır ve zamanla birikerek daha büyük formları oluşturur. Henüz ayrıntılı olarak aydınlatılamasa da böbrek dokusunda taş oluşumu doğrudan idrar yolu epiteli üzerinde olumsuz etki yaratır ve potasyum sisteminde önemli ürodinami bozukluklarına yol açar. Bunun sonucunda böbrek taşı kronik enfeksiyöz ve inflamatuar süreçleri tetikleyen önemli faktörlerden biri haline gelir. Kronik böbrek yetmezliğini tetikleyen patolojiler arasında böbrek taşlarının varlığına bağlı olarak gelişen piyelonefrit ön sıralarda yer almaktadır (111).

Kronik İYE'ler de bir çeşit böbrek taşı olan struvit taşlarının oluşumuna yol açar ve taş hastalığı da İYE riskini daha da artırır, bu nedenle İYE ile nefrolitiazis arasında çift yönlü bir ilişki vardır. Enfeksiyon taşları olarak da bilinen struvit taşları üreaz üreten bakterilerle (*Proteus sp, Haemophilus sp, Klebsiella sp ve Ureaplasma urealyticum*) enfekte hastalarda ortaya çıkar. Üreaz, üreyi amonyak ve CO2'ye hidrolize ederek idrar pH'ını yükseltir ve sürekli olarak alkalin bir idrar verir. Ayrıca karbonat oluşumuna yol

açar. Kalsiyum karbonat, struvit ile çökelerek, toplayıcı sistemde bakterilerin yapıştığı büyük taşlar oluşturur. Struvitler tüm böbrek taşlarının %15-20'sini oluşturur (112,113). Struvit taşları üriner staz veya tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu özellikle kronik mesane, nörojenik mesane, idrar diversiyonu ile komplike olduğunda veya idrar yoluna yerleştirilen kateter gibi yabancı maddelerin varlığında daha sık oluşur. Vakaların çoğunda struvit taşları, üreaz üreten patojenlerin renal tübüllere girerek böbreklere ulaşıp piyelonefrite neden olduğunda oluşur. Tübüllerin ve renal interstisyumun dahil olduğu bölgede oluşan inflamatuar yanıt sonucu üst üste yığılmış piyelonefritli strüvit taşları birikir. Struvit taşları üst üste enfeksiyonla pelvikalisiyel sistemi tıkayabilir ve uygun şekilde tedavi edilmezse önemli morbiditeye yol açabilir (114,115).

Piyelonefritin şiddeti ve sonucu birçok açıdan enfeksiyöz ajanların üropatojenitesi, ürodinami bozukluğu ve immünolojik yanıt ile belirlenir. Böbrek taşı olan piyelonefrit hastalarında hastalığın patogenezinin anlaşılabilmesi, uzun ve inatçı seyir gösteren hastalık seyrine karşı hızlı ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için; böbrekteki taşın varlığı ve patojenlerin neden olduğu enfeksiyonun başlaması ve ilerlemesiyle birlikte buna karşı oluşturulan immün yanıtta rol oynayan hücrelerin ve yolakların araştırılması önemlidir. Piyelonefrit ve böbrek taşı ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalar genellikle doğal immün yanıtlar üzerine odaklanmıştır. Edinsel immün yanıt ile ilgili mekanizmalar ise henüz netlik kazanmamıştır. Enfeksiyona karşı gelişen güçlü bir immün yanıtta T hücre alt gruplarının rolü büyüktür. CD4+ Th'ler, lenfositlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Salgılanan sitokinlere bağlı olarak Th lenfositler, morfolojik olarak benzer ancak fonksiyonel olarak çeşitli alt gruplara ayrılarak farklı efektör yanıtlarını gösterirler. ASH tipine ve ortamda bulunan sitokinlerin etkisiyle uyarılma sırasında öncül lenfosit olan Th0; Thl, Th2, Th17 ve Treg hücre ana alt gruplarına farklılaşır ve salgıladıkları farklı imza sitokinlerine göre değerlendirilebilirler (43,44).

Th1 hücreler, virüs, bakteri ve toxoplazma dahil olmak üzere hücre içi patojenlere karşı koruma sağlar. IL-12 ve IFN-γ varlığında Th0'lar Th1 lenfositlere farklılaşır ve IFN-γ salgılarlar. İmza sitokini IL-4 olan Th2 hücreler, genellikle hümoral immün yanıtları da yönlendirerek helmintler gibi hücre dışı parazitlere karşı konak savunmasında, alerji ve astım gibi inflamatuar reaksiyonlarda görevlidir. Th2 hücreler inflamasyonu baskılayarak aynı zamanda doku onarımı ve yara iyileşmesinde etkilidir. Th1 ve Th2 hücreleri

arasındaki yönelim, immün sistemin dengeleyici bir terazisi gibi çalışır. Bir tarafın aktivasyonu diğer tarafın aktivasyonunu baskılayarak konak savunmasının profesyonel etkili bir yanıt vermesini sağlar. Th17 hücreler ise hücre dışı bakterilere ve mantarlara karşı konak savunmasında rol oynarlar ve otoimmün hastalıklarda önemli etkilere sahiptirler. Bu hücreler nötrofillerin toplanması, aktivasyonu ve göç etmesi, dokuların yeniden modellenmesi ve onarımı, antimikrobiyal proteinlerin üretimi ile ilişkili IL-17A (IL-17), IL-17F ve IL-22 sitokinlerini üretirler (116,117). Farelerle yapılan bir çalışmada IFN-γ ve IL-4 ve IL-10 knockout fareler, hem akut sistit hem de piyelonefrite karşı duyarlılık açısından değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda *il4-/-* ve *il10-/-* farelerin enfeksiyon dinamikleri wild tip farelere benzerlik gösterirken, *ifn-/-* farelerde idrar yolu enfeksiyonunun görülme sıklığı ve şiddetinin arttığı tespit edilmiştir. Bu da idrar yolu enfeksiyonu sırasında IFN-γ ve Th1 aracılı inflamatuar yanıtların rolüne işaret etmektedir (118). Akut fokal bakteriyel nefrit (AFBN) ve akut piyelonefrit (APN) tanısı konulan çocuklarda yapılan bir çalışmada, ciddi böbrek enfeksiyonuna sahip olan AFBN hastalarında APN'li hastalara kıyasla daha yüksek IFN-γ ve IL-6 seviyesi tespit edilmiştir (119). Başka bir çalışmada APN tanısı konmuş 37 çocuğun ve yaşları eşleştirilmiş bakteriyel enfeksiyona sahip ama UTI olmayan kontrol grubundaki 37 çocuğun sitokin düzeyleri karşılaştırılmıştır. Akut piyelonefritin akut evresinde idrardaki ortalama IL-1α, IL-4, IL-6 ve IL-8 konsantrasyonları kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış ve antibiyotik tedavisi sonrasında azalmıştır (120).

Böbrek hastalıkları üzerine yapılan araştırmalar, pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-17'nin bakteriyel ve fungal enfeksiyonlarda patojenin ortadan kaldırılması ve hasarlı dokunun onarımı gibi süreçlere eşlik ederek konak savunmasında etkili rol oynadığı, bunun yanısıra kronik inflamasyon ve doku hasarının ilerleyişi ile birçok otoimmün böbrek hastalıklarına yol açabileceğini göstermiştir (121). Yapılan bir çalışmada IL-6 ve IL-17'nin idrar seviyeleri, kandidürik hastalarda kontrollere kıyasla önemli ölçüde yüksek ve anlamlı bulunmuştur (122). Sadece kadın hastalardan alınan örneklerle yapılan bir çalışmada ise UPEC'in neden olduğu idrar yolu enfeksiyonu sırasında sitokin IL-17A'in rolü ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Buna göre UPEC kaynaklı İYE'de IL-17A seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilirken IL-4 seviyesinde fark bulunamamıştır (123). Çoğunluğu kadın yoğun bakım ve üroloji ünitelerinden olan kandidüri hastaları ile yapılab bir çalışmada ise idrar IL-17 ve IL-22 düzeyleri, kandidüri olmayan kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur

(124). Yapılan başka bir çalışmada hiperoksalüri olan piyelonefritli kadınlarda olmayanlara kıyasla IL-4, IL-17, IL-23 ve MCP-1 sitokinleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada, tekrarlayan piyelonefritli hastalarda kandaki IL-17 seviyesi ile günlük oksalat atılımı arasında orta düzeyde doğrudan bir korelasyon belirlenmiştir (125).

Regülatör T hücreler immün sistemin denetleyici, düzenleyici veya frenleyici birimi olarak görev yapan özel bir T lenfosit alt grubudur. Otoimmüniteyi engelleyerek ve aşırı inflamatuar yanıtları sınırlandırarak organizmayı korumada hayati öneme sahiptirler. Treg'ler özellikle IL-10, IL-35 ve TGF-β gibi anti-inflamatuar sitokinleri salgılayarak ve çeşitli mekanizmalar yoluyla immün yanıtları baskılar. Yapılan araştırmalarda Treg'lerin, glomerülonefrit ve transplantasyonda sistemik otoimmün ve allojenik yanıtları düzenlediği anlaşılmıştır. Böbrek içindeki (intrarenal) regülatör T hücreleri (Tregler), böbreğe göç edenler dahil olmak üzere, hem doğal hem de edinsel immün hücreleri üzerinde ve muhtemelen böbreğin kendi hücreleri üzerinde baskılayıcı etkilere sahiptir (126). Yapılan fare çalışmaları Treg'lerin işlev bozukluğu veya eksikliğinin sisplatin kaynaklı nefrotoksisite, nefrotoksik nefrit (NTN), anti-miyoperoksidaz glomerulonefrit ve akut iskemik böbrek hasarı gibi durumlarda hastalığın şiddetini artırdığını göstermiştir. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda ise Treg sayılarındaki azalmanın insan böbrek hastalığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin böbrek biyopsilerindeki $Foxp3^+$ T hücresi sayısının, ANCA-ilişkili vaskülit hastalarında böbrek sağkalımını öngörebileceği düşünülmektedir. Bir başka hastalık olan Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) hastalarında periferik kandaki Treg sayısının azaldığı gözlemlenmiştir. Özellikle düşük bir Treg/Th17 oranının lupus nefriti ile ilişkili olduğu ve klinik şiddetle ters orantılı olduğu saptanmıştır (127).

Etkili bir immün yanıt sadece hücresel immünite ile sınırlı değildir. Hücre dışında bulunan mikrop ve toksinlere karşı salgıladıkları antikorlar ile hümoral immüniteyi sağlayan B hücrelerinin rolü büyüktür. B hücreler, efektör antikorları salgılayan plazmablastlara farklılaşma, antijen sunumu ve inflamatuar sitokinlerin üretimi yoluyla efektör T hücre yanıtını modüle edebilirler (43). Ek olarak, patojenlere ve otoantijenlere karşı immün yanıtı düzenleyen bir B hücresi alt kümesi de vardır. Breg olarak adlandırılan bu hücreler, salgıladıkları IL-10, TGF-β ve IL-35 gibi sitokinler ile enfeksiyon hastalıkları, otoimmün ve alerjik hastalıklar, kanser ve transplantasyonda immün

modülatör etkiye sahip hücrelerdir (70,128). Breg hücrelerini diğer B hücre alt gruplarından ayıran spesifik bir transkripsiyon faktörü ya da yüzey belirteci henüz bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda IL- 10 üretimi, Breg hücrelerinin tanımlayıcı bir özelliği olarak kabul edilmiştir. Farklı Breg alt grupları olan $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ hücrelerinin IL-10 ürettiği ve çeşitli hastalıklarda inflamasyonu kontrol altına alarak düzenleyici rolünün olduğu gösterilmiştir. Periferik kanda bulunan B10 Bregler, efektör $CD4^{+}$ T hücre proliferasyonunu ve IFN-γ, TNF-α ve IL-4 gibi sitokin ekspresyounu baskılayarak naif T hücrelerinin Th1 ve Th17'ye değişimini engeller ve ayrıca Treg hücrelerini indükleyebilir (74,129).

Regülatör B hücreler ve böbrek hastalıkları ile ilgili bugüne kadar yapılan araştırmalar genellikle transplantasyon üzerine yoğunlaşmış olsa da sistemik ve otoimmün hastalıklarda Breg hücrelerinin koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (130,131). Böbrek taşı ve piyelonefrit ile ilişkili hastalıklarda $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre alt gruplarının tespitine yönelik herhangi bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Buna karşın yapılan iki farklı çalışmada SLE hastalarında $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücrelerinde işlev bozukluğu ve diyabetik nefropati (DN) hastalıklarında $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre sayısında düşüş tespit edilmiştir (132,133).

Tüm bilgilerden yola çıkarak çalışmamız, böbrek taşı olan piyelonefrit hastalarında hücre içi sitokinleriyle birlikte yardımcı T hücre (Th), düzenleyici B hücre (Breg), düzenleyici T hücre (Treg) ve T foliküler hücre (Tfh) frekanslarını akan hücre cihazında değerlendirmeyi ve bu sayede hastalığın edinsel immün yanıt ile ilgili hücresel mekanizmalarına ışık tutmayı planlamaktadır. Çalışma, söz konusu immün hücrelerin dağılımındaki dengesizlikleri ve bu dengesizliklerin inflamatuar süreç üzerindeki etkilerini ortaya koyarak, hastalığın patofizyolojisine dair bilimsel bir derinlik kazandırmayı ve gelecekteki klinik tanı ve tedavi yaklaşımları için özgün bir immünolojik temel oluşturmayı hedeflemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Çalışmada Breg, Th alt grupları, Tfh ve Treg hücre gruplarının belirlenmesinde hücrelerin eksprese ettiği spesifik antijenlere özgü floresan işaretli antikorlar içeren bir panel oluşturuldu. Hücre yüzey ve hücreiçi immünfenotipleme deneylerinde Tablo 3.1'de belirtilen antikorlar kullanıldı.

Tablo 3.1: İmmünfenotipleme çalışmasında kullanılan antikorların listesi.

Antikor	Florokrom/ Boya	Klon	Marka	Ürün No
Anti-human CD45 antibody	KrO	J33	Beckman Coulter	B36294
Anti-human CD3 antibody	FITC	UCHT1	Beckman Coulter	A07746
Anti-human CD19 antibody	ECD	J3-119	Beckman Coulter	A07770
Anti-human CD24 antibody	APC	ALB9	Beckman Coulter	A87785
Anti-human CD27 antibody	PE	1A4CD27	Beckman Coulter	B96790
Anti-human CD38 antibody	PB	LS198-4-3	Beckman Coulter	B92396
Anti-human CD3 antibody	APC-A750	UCHT1	Beckman Coulter	A94680
Anti-human CD4 antibody	ECD	SFCI12T4D11	Beckman Coulter	6604727
Anti-human CD45RO antibody	PC5.5	UCHL1	Beckman Coulter	B30638
Anti-human IFN-γ antibody	FITC	45.15	Beckman Coulter	IM2716U
Anti-human IL-4 antibody	PC7	MP4-25D2	Beckman Coulter	B90441
Anti-human IL-17A antibody	PB	BL168	Beckman Coulter	B76266
Anti-human CD25 antibody	PB	B1.49.9	Beckman Coulter	A82944
Anti-human FoxP3 antibody	AF647	259D	Beckman Coulter	B30650

Tablo 3.1: (Devam)

Anti-human CD3 antibody	APC	UCHT1	Beckman Coulter	IM2467
Anti-human CD4 antibody	APC-A700	13B8.2	Beckman Coulter	B10824
Anti-human CD279 (PD-1) antibody	PC7	PD1.3	Beckman Coulter	A78885
Anti-human CD185 (CXCR5) antibody	FITC	J252D4	BioLegend	356914

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler ve Solüsyonlar

Çalışmada hücre gruplarının tespit edilmesinde planlanan her bir deney prosedürüne özgü kitler ve solüsyonlar seçildi. Tablo 3.2'de gösterilen kitler ve solüsyonlar çalışma planında belirtilen şekilde kullanıldı.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kitlerin ve solüsyonların listesi.

Kitler/Solüsyonlar	Marka	Ürün No
DURActive 1 stimulation kit	Beckman Coulter	C11101
PerFix-nc cell permeabilization kit	Beckman Coulter	B31168
VersaLyse lysing solution	Beckman Coulter	A09777
IsoFlow Sheath Fluid	Beckman Coulter	8417170-AD
Human Interleukin 10, IL-10 ELISA Kit	BT Lab	E0102Hu
DPBS, no calcium, no magnesium solution (1X)	ThermoFisher Gibco™	14190-094
Foetal Bovine Serum (FBS) (0,1 μm membrane filtered)	Biological Industries	04-001-1A
Steril distile su (1L)	Polifarma	E24230012A
Tıbbi kullanım amaçlı etil alkol (%96 hacmen)	Alagöz Kimya ve Sağlık Ürünleri San. Tic. A.Ş.	64-17-5

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Çalışmaların gerçekleştirilebilmesi amacıyla laboratuvar ortamında Tablo 3.3'de belirtilen çeşitli sarf malzemeler temin edildi ve kullanıldı.

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi.

Sarf Malzemeler	Marka	Ürün No
5 ml Polypropylene flow tüpleri	Beckman Coulter	2523749
EDTA'lı kan alma tüpü (mor kapaklı)	BD Vacutainer	368499
Lityum heparin kan alma tüpü (yeşil kapaklı)	Vacusera	234402
Jelli kan alma tüpü (sarı kapaklı)	Vacusera	HM0780
15 ml'lik vida kapaklı konik tüp	Fıratmed	8890000106
50 ml'lik vida kapaklı konik tüp	Fıratmed	8870000087
1.5ml Şeffaf Mikro Santrifüj Tüpü	Nest	615601
3 ml'lik steril pastör pipeti	Citotest Labware Manufacturing	31027003US
0,5 µl - 10 µl ayarlanabilir otomatik pipet	Discovery Comfort	4052-D
2 µl - 20 µl ayarlanabilir otomatik pipet	Dragonlab	DL.7010101005
10 µl - 100 µl ayarlanabilir otomatik pipet	Discovery Comfort	4054-D
100 µl - 1000 µl ayarlanabilir otomatik pipet	Axygen® Axypet®	AP-1000
Laboratory film	Parafilm	PM-996
Tüp sporu (standı)	Tıpkimsan	499007224

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Yazılımlar

Tüm hücre gruplarının tespit edilmesi amacıyla deneylerin gerçekleştirilmesi, hücrelerin okutulması, analizlerinin yapılması ve değerlendirilmesi aşamalarında Tablo 3.4.'de gösterilen cihazlar ve yazılımlar kullanıldı.

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan cihazların ve yazılımların listesi.

Cihazlar	**Marka**	**Ürün No**
Navios 10 Color Flow Cytometer	Beckman Coulter	AY08109
Santrifüj	Nüve Bench-Top Santrifüj	NF 1200R
Santrifüj	VWR	Mega Star 600r Micro Pack
Vorteks	Onilab MX-S	8051102000
Laminar flow kabini	Bioair Tecnilabo	Aura PCR
CO2 inkübatörü	Thermo Electron Corporation Hera Cell 150	40644156
ELISA okuyucu	Multiskan GO 1.01.10	1510-04466C
Buzdolabı ve derin dondurucu (Büro Tipi)	Arçelik	1060
Buzdolabı ve derin dondurucu (Büro Tipi)	Altus	AL 370 N

Yazılımlar	Bağlantı linki
Kaluza	https://kaluzasoftware.com
GraphPad Prism 8.0.2	https://www.graphpad.com

3.1.5. ELISA Yönteminde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Deneye başlamadan önce kit talimatına göre bütün reaktifler oda sıcaklığa getirildi. Plağın yıkama aşamasında kullanılmak üzere 10 ml 25X yıkama tampon konsantresi, distile su ile karıştırıldı ve 500 ml 1X yıkama tamponu olacak şekilde hazır hale getirildi. Kullanılacak olan standart çözeltiyi hazırlamak için, 120 µl standart çözelti (1600 pg/ml) 120 µl standart seyreltici ile karıştırıldı ve 800 pg/ml'lik standart stok çözelti elde edildi. Seyreltme işlemine başlanmadan önce, standart çözelti 15 dakika boyunca hafifçe çakalanarak bekletildi. Her bir standart noktası için S1, S2, S3, 4 ve S5 olacak şekilde 5 ayrı tüp isimlendirildi. Elde edilen 800 pg/ml'lik standart stok çözelti standart seyreltici ile 1:2 oranında seri olacak şekilde tekrar tekrar seyreltildi ve sonucunda 400, 200, 100 ve 50 pg/ml'lik çözeltiler elde edildi (Standart seyreltici 0 pg/ml olarak kabul edilir).

Standart: 1600 pg/ml

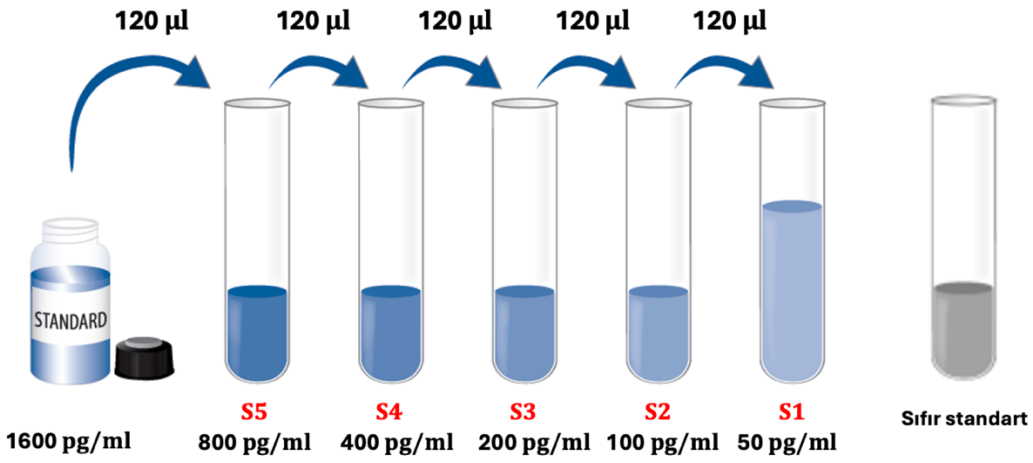
S5: 800 pg/ml = 120 µl standart çözelti (1600 pg/ml) + 120 µl standart seyreltici

S4: 400 pg/ml = 120 µl S5 (800 pg/ml) + 120 µl standart seyreltici

S3: 200 pg/ml = 120 µl S4 (400 pg/ml) + 120 µl standart seyreltici

S2: 100 pg/ml = 120 µl S3 (200 pg/ml) + 120 µl standart seyreltici

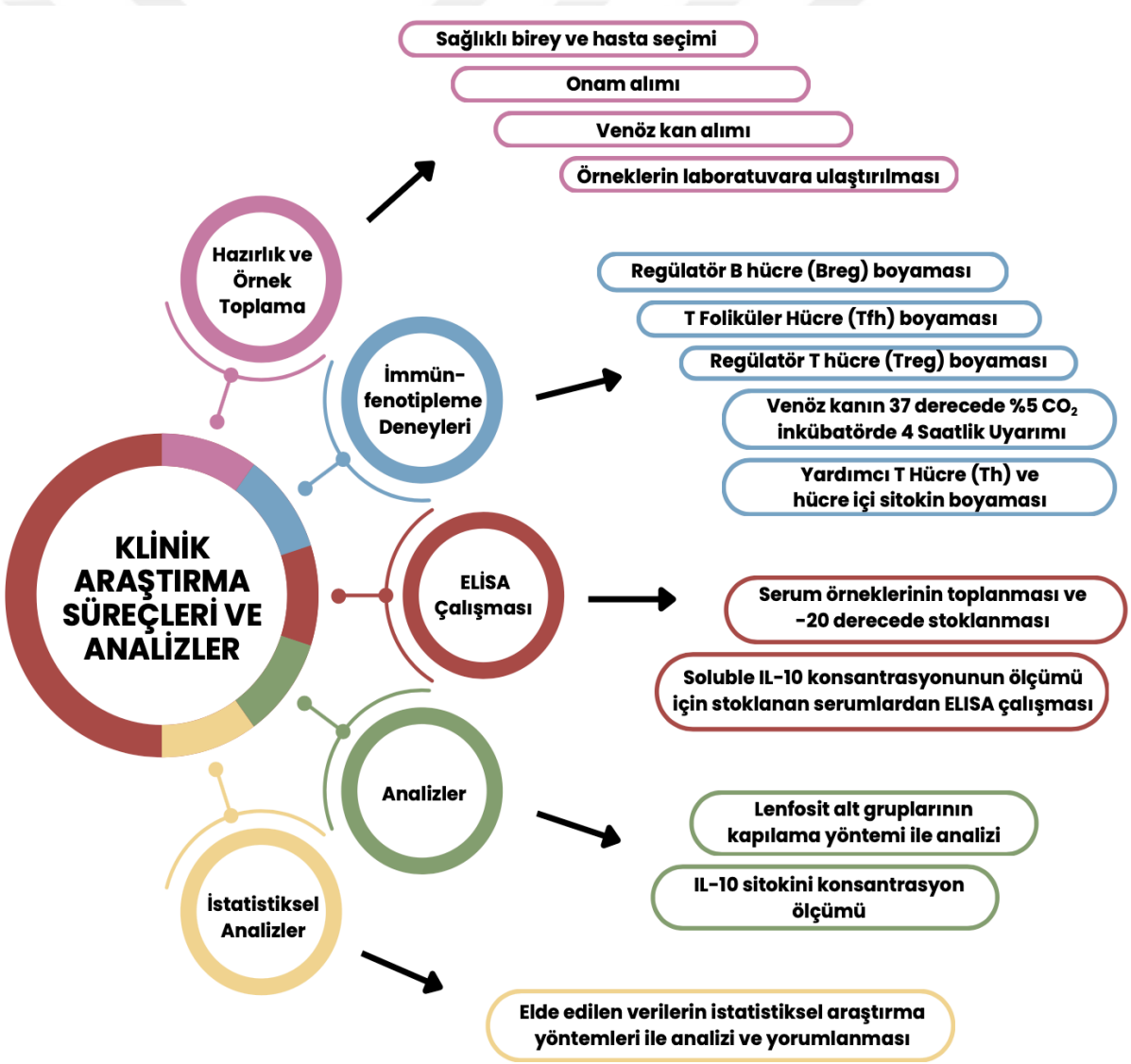
S1: 50 pg/ml = 120 µl S2 (100 pg/ml) + 120 µl standart seyreltici



Şekil 3. 1: Sulandırılmış insan IL-10 standardının hazırlanışı.

3.2. ÇALIŞMA PLANI

Bu çalışmada, sağlıklı bireyler ve böbrek taşı olan piyelonefrit tanılı hasta gruplarından alınan venöz kan örnekleri kullanılarak immünolojik deney yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma sürecinin ana basamakları; örnek toplama, immün-fenotipleme deneyleri, ELISA çalışmaları, analizler ve istatistiksel değerlendirme basamaklarından oluşmaktadır. Çalışma planı Şekil 3.2'de alt basamaklar ile gösterilmiştir. Bu bütüncül yaklaşım sayesinde piyelonefrit tanılı hasta grubunda edinsel immün yanıtın değişen dinamiklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.



Şekil 3. 2: Çalışma planının şematik gösterimi.

3.2.1. Çalışma Kapsamı ve İzinler

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne sunulan bu tez çalışması 'Karar 2023-25/38' numarası ile doktora tezi olarak kabul edilmiştir. Araştırmaya ait çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için; hastaların klinik değerlendirmelerinin yapılacağı ve kan örneklerinin toplanacağı İstanbul Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden 27.09.2023 tarihli 'Kurum İzin Belgesi' alınmıştır. Bu izin belgesi ile sunulan proje önerisi Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 12.10.2023 tarihli toplantısında görüşülmüş ve yapılabilirliği uygun görülmüştür. Bu karar doğrultusunda 23-64 kayıt numarası ile etik kurul izni temin edilmiştir. Bununla birlikte İstanbul Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniği ve SBÜ Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi İleri Analiz Laboratuvarı'nda çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için hastanelerin bağlı olduğu İl Sağlık Müdürlüğü'ne sunulan proje önerisi, İl Sağlık Müdürlüğü Sağlık Hizmetleri Başkanlığı Araştırma, Basılı Yayım, Duyuru İçeriği Değerlendirme Komisyonu 23.05.2024 tarih ve 2024/09 sayılı kararınca uygun görülmüştür. Ek olarak, çalışmanın deneylerinin gerçekleştirileceği SBÜ Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi İleri Analiz Laboratuvarı'na hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinin uygun koşullarda taşınabilmesi için 'Biyolojik Materyal Taşıma Formu (BMTF)' gerekli kişiler tarafından imzalanmış ve onay alınmıştır.

Bu tez çalışması, 2024-A3-01 - Doktora / Tıpta Uzmanlık Öğrencilerine Yönelik A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı kapsamında başvurulan '41159' nolu proje ile TÜSEB tarafından kabul edilmiş ve desteklenmeye hak kazanmıştır.

3.2.2. Sağlıklı Bireylerin ve Hastaların Seçimi

Tez çalışmasına Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği'ne başvuran böbrek taşı ile ilişkili piyelonefrit tanısı konan 25 hastanın ve kontrol grubu olarak yaş uyumlu 25 sağlıklı bireyin dahil edilmesi planlanmıştır (G-Power 3.1 analizi ile; α=0,05 , β=0,95 ve etki büyüklüğü=0,80 olacak şekilde hesaplama yapılmıştır). Hasta ve sağlıklı bireyler aşağıda belirlenen dahil edilme ve dışlanma kriterlerine göre seçilerek çalışmaya alınmıştır.

3.2.2.1. Sağlıklı bireylerin çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri:

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

1. Çalışma sırasında enfeksiyonu, kronik hastalığı ve otoimmün hastalık hikayesi bulunmayan,

2. Son 6 ayda steroid veya immün baskılayıcı ilaçlar kullanmamış 18-80 yaş aralığındaki bireyler dahil edilmiştir.

Çalışmadan dışlanma veya çıkarılma kriterleri

1. Aktif enfeksiyonu bulunan,

2. Malignitesi olan,

3. Gebelik durumu olan,

4. Pediatri yaş grubuna dahil olan (<18 yaş),

5. İmmün yetmezlik öyküsü olan ve immün baskılayıcı ilaç kullanan hastalar ve

6. Klinik olarak durumu biyolojik örnek almaya uygun olmayan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2.2.2. Hasta bireylerin çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri:

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

1. Kostovertebral açı hassasiyeti ve ağrısı pozitif olan,

2. Ateş >37,5°C olan,

3. Sistemik akut faz reaktanlarından (CRP, WBC) en az biri artmış olan,

4. Tam idrar tetkikinde (TİT) lökositüri (piyüri) olan,

5. Üriner sistemde böbrek taşı varlığı olan,

6. Çalışmaya dahil edilme kriterini karşılayan ve biyolojik örnek almaya elverişli olan olgulardan "Gönüllü onam formunu" imzalamış 18-80 yaş aralığındaki hasta bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmadan dışlanma veya çıkarılma kriterleri

1. Malignitesi olan,
2. Gebelik durumu olan,
3. Pediatri yaş grubuna dahil olan (<18 yaş),
4. İmmün yetmezlik öyküsü olan ve immün baskılayıcı ilaç kullanan hastalar,
5. Klinik olarak durumu biyolojik örnek almaya uygun olmayan hastalar ve
6. Çalışma için onamlarını geri çeken olgular çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2.3. Sağlıklı Bireyler ve Hastalardan Onam ve Venöz Kan Alımı

Çalışmaya dahil edilme kritlerine uygun olan hastalara ve sağlıklı bireylere çalışmanın önemi, süreci ve kan alımı hakkında detaylı bilgilendirmeler yapılmıştır. Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden Gönüllü Onam Formu imzalatılarak onayları alınmıştır. Onamlar alındıktan ve hastane yatışının ardından tedavi başlamadan önce etik koşullara ve gerçekleştirilecek deney protokolüne uygun olarak heparinli tüpe 2 ml tam kan ve sarı jelli tüpe 3-5 ml tam kan alınıp bekletilmeden çalışılmak üzere SBÜ Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi İleri Analiz Laboratuvarı'na alınan BMTF ile soğuk zincir koşullarında dikkatli bir şekilde taşınmıştır.

3.2.4. Venöz Kandan B Regülatör Hücre (Breg) Boyanması

Breg hücrelerin tespiti için, hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden yeşil kapaklı heparin içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Antikorların ekleneceği örnek tüpleri isimlendirildi. $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücrelerin tespit edilmesi için örnek tüplerine; anti-CD45KrO, CD3 FITC, CD19 ECD, CD24 APC, CD27 PE ve CD38 PB antikorlarından 5'er µl eklendi. Antikorların eklenmesinin ardından tüplere 100'er µl tam kan eklendi ve tüplerin içeriklerinin homojen bir şekilde karışabilmesi için 6-8 sn hızlı bir şekilde vorteks yapıldı. Ardından tüm tüpler 15-20 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından tüm tüplere 0,5 ml VersaLyse lizat solüsyonu eklendi. Tüpler 15 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi ve akan hücre ölçer cihazında okutuldu.

3.2.5. Venöz Kandan T Foliküler Hücre (Tfh) Boyaması

Tfh hücrelerin tespiti için, hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden yeşil kapaklı heparin içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Antikorların ekleneceği örnek tüpleri isimlendirildi ve tüplere; anti-CD45KrO, CD3 APC, CD4 A700, CXCR5 (CD-185) FITC ve PD-1 PC7 antikorlarından 5'er µl eklendi. Antikorların eklenmesinin ardından tüplere 100'er µl tam kan eklendi ve tüplerin içeriklerinin homojen bir şekilde karışabilmesi için 6-8 sn hızlı bir şekilde vorteks yapıldı. Ardından tüm tüpler 15-20 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından tüm tüplere 0,5 ml VersaLyse lizat solüsyonu eklendi. Tüpler 15 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi ve akan hücre ölçer cihazında okutuldu.

3.2.6. Venöz Kandan T Regülatör Hücre (Treg) Boyaması

Treg hücrelerin tespiti için, hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden yeşil kapaklı heparin içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Test tüplerine 50'er µl tam kan eklendi. Ardından PerFix nc reagent Buffer 1 (Fixative Reagent)'den her bir tüpe 5 µl eklendi. Tüplerin içeriklerinin homojen bir şekilde karışabilmesi için 6-8 sn hızlı bir şekilde vorteks yapıldı ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon devam ederken ayrı bir tüpe 300 µl Perfix nc Buffer 2 (Permeabilizing Reagent) eklendi ve üzerine anti-CD45KrO, CD3 FITC, CD4 ECD, CD25 PB antikorlarından 5'er µl ve anti-FoxP3 APC 647 antikorundan 8 µl eklendi ve hepsi pipetaj yapılarak karıştırıldı. Fiksasyon aşamasının sonunda tüpler hızlıca vortekslendi ve ayrı tüpte hazırlanan karışım tüplere eklenerek homojen bir şekilde karışması için tekrar vortekslendi. Ardından tüm tüpler karanlıkta ve oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 3 ml PBS eklendi, karanlıkta ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve ardından 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Konsantre 10X PerFix nc Buffer 3 solüsyonu 1X (1:10 oranında, 1 µl Buffer 3, 9 µl distile su) olacak şekilde hazırlandı ve 3 ml eklendi. Hızlıca vortekslendi ve 500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantların uzaklaştırılmasının ardından pellete 500 µl 1X PerFix nc Buffer 3 solüsyonu ile süspanse edildi ve hücreler akan hücre ölçer cihazında okutuldu.

3.2.7. Venöz Kanın 4 Saatlik Uyarımı, Yardımcı T Hücre ve Hücre İçi Sitokin Boyaması

Deneyde sağlıklı bireylerden ve hastalardan yeşil kapaklı heparin içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Bütün hastalar ve sağlıklı bireyler için uyaransız (unstimulated) ve uyarımlı (stimulated) olacak şekilde 2 tane tüp planlandı. Uyaransız tüplere yalnızca 70'er µl tam kan eklendi. Uyarım için 70'er µl tam kan alındı ve Brefeldin-A ve PMA-İyonomisin içeren-Beckman Coulter DurActive tüplerine aktarıldı. Tüm tüpler 37°C %5 CO_2 inkübatörde 4-5 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra tüpler etüvden çıkarıldı ve tüm tüplere anti-CD45KO ve CD45RO PC5.5 hücre yüzey antikorları eklendi. Karanlıkta ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Üzerlerine 25 µl PerFix nc reagent Buffer 1 (Fixative Reagent) eklendi. Kırmızı pellet ayrışıncaya kadar vorteks yapıldı. Karanlıkta ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere 2 ml PBS eklendi ve 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü, pelletlerin üzerine 25 µl %100 FBS eklendi ve kırmızı pellet ayrışıncaya kadar vortekslendi. Ardından tüplere 300 µl Perfix nc Buffer 2 (Permeabilizing Reagent) eklendi ve tekrar vortekslendi. Tüplere anti-CD3 APC A750, CD4 ECD antikorlarından 5'er µl ve anti-IFN-g FITC, IL-4 PC7 ve IL17-A PB antikorlarından 8'er µl eklendi ve tüpler 6-8 saniye yüksek hızda vorteks yapıldı. Tüm tüpler karanlıkta ve oda ısında 45 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplere konsantre 10X PerFix nc Buffer 3 yıkama solüsyonu 1X (1:10 oranında, 1µl Buffer 3, 9 µl distile su) olacak şekilde hazırlandı ve 3 ml eklendi. 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet üzerine 0,5 ml 1X PerFix nc Buffer 3 eklenerek tüpler akan hücre ölçer cihazında okutuldu.

3.2.8. Venöz Kandan Serum Örneklerinin Stoklanması ve Stoklanan Serum Örneklerinden ELISA Yöntemi ile IL-10 Sitokini Konstantrasyonu Ölçümü

Serum örneklerinin stoklanması amacıyla hasta ve sağlıklı bireylerden alınan sarı kapaklı vakumlu jelli tüplerdeki kan örnekleri kullanıldı. Tüpler 1798 g'de 10 dk santifüj edildi. Ardından alta kalan jel kısmına temas etmeyecek şekilde serum kısmı pastör pipet yardımıyla 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler isimlendirilerek IL-10 konsantrasyonunun ölçümü için yapılacak olan ELISA çalışmasında kullanılmak üzere -20°C'de stoklandı. Deneyde IL-10 sitokinin konstantrasyonun ölçümünde; önceden insan IL-10 antikoru ile kaplanmış 96 kuyucuğa sahip plaktan oluşan sandviç model sistemi ile

hazırlanan ELISA kiti tercih edildi. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve hasta ve sağlıklı kontrol serumları kit prosedüründe belirlenen talimatlara göre oda sıcaklığında uygun hale getirildi. Çalışmaya başlamadan önce deney sırasında oluşabilecek hataları önlemek amacıyla, dilüe edilmiş standartların, hasta ve sağlıklı bireylerden toplanan serum örneklerinin ekleneceği mikrokuyular belirlendi ve ELISA plağına benzer olarak hazırlanan kağıt şablon üzerinde isimlendirilerek yerleşim planı yapıldı.

Önceden belirlenen kuyucuk yerleşim şablonuna göre;

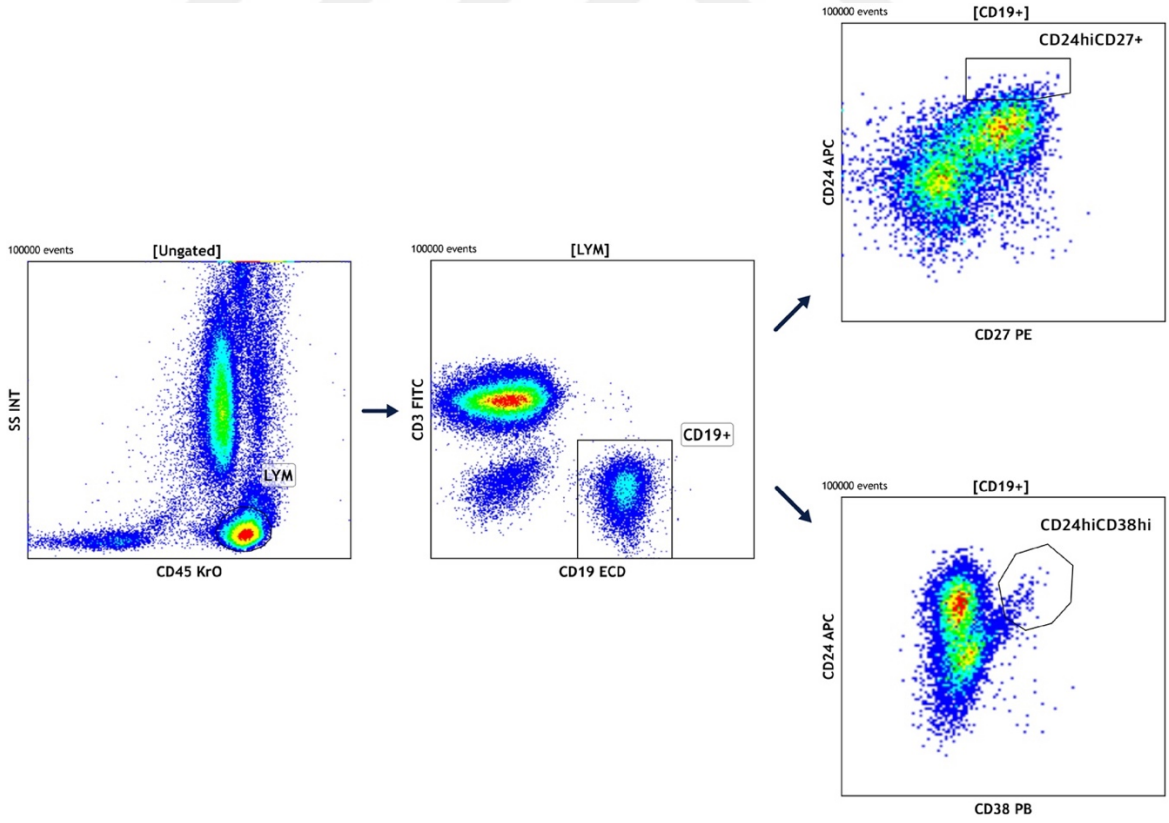
- Standartın ekleneceği kuyucuğa 50 µl standart eklendi. (Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiği için biyotinlenmiş antikor bu kuyucuğa eklenmedi).
- Örneklerin ekleneceği kuyucuklara hasta ve sağlıklı kontrollere ait serum örneklerinden 40'ar µl eklendi.
- Ardından bu kuyucuklara 10 µl anti-IL-10 antikoru eklendi.
- Daha sonra boş kontrol kuyucukları hariç standart ve örnek kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve iyi bir şekilde karıştırıldı. Plaka iyi bir şekilde kapatıldı ve 37 ^{o}C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından koruyucu tabaka çıkarıldı. Plaka yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Her bir yıkamada bölmeler 300 µl yıkama tampon ile 1 dakikaya kadar bekletildi.
- Yıkama işlemleri bittikten sonra plakanın emici kağıt havlu ile kurulanması sağlandı.
- Her bir kuyuya 50 µl A substrat çözeltisi eklendi. Ardından her bir kuyuya 50 µl B substrat çözeltisi eklendi. Plaka iyi bir şekilde yeniden kapatıldı ve 37 ^{o}C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından her bir kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve mavi rengin sarıya dönüşümü görüldü.
- Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış ELISA okuya plak yerleştirilerek her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.

3.3. ANALİZLER

Deney protokollerinin uygulanmasının ardından sağlıklı bireyler ve hastalara ait tüm tüpler Beckman Navios akan hücre ölçer cihazında okutuldu ve hücre alt grupları kapılama stratejisi yöntemi ile Kaluza Analysis Software (Version 2.4) program kullanarak analiz edildi ve yüzdeleri hesaplandı.

3.3.1. Lenfositlerin B Regülatör Hücre (Breg) Hücre Analizi

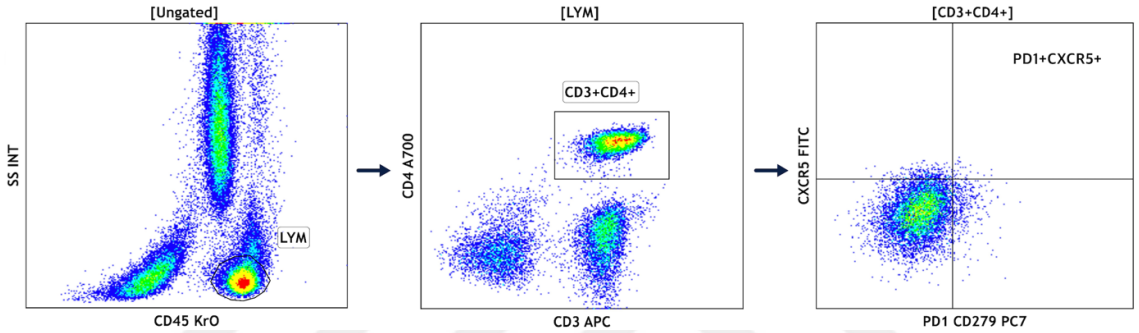
Venöz kana hücre yüzey protokolünün uygulanmasının ardından hücreler akan hücre ölçer cihazında okutuldu. Lenfositleri debri kısımdan net bir şekilde ayırmak için öncelikle kapılama yöntemi ile $CD45^{+}$ hücreler belirlendi, ardından $CD3^{-}CD19^{+}$ B lenfositler kapılandı ve bu kapıdan $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre alt gruplarının yüzdeleri hesaplandı (Şekil 3.3). Sağlıklı kontrol grubu ile hasta grubu hücre yüzdeleri karşılaştırılarak değerlendirildi.



Şekil 3. 3: $CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre alt gruplarının kapılama stratejisi ile gösterimi.

3.3.2. Lenfositlerin T Foliküler Hücre (Tfh) Analizi

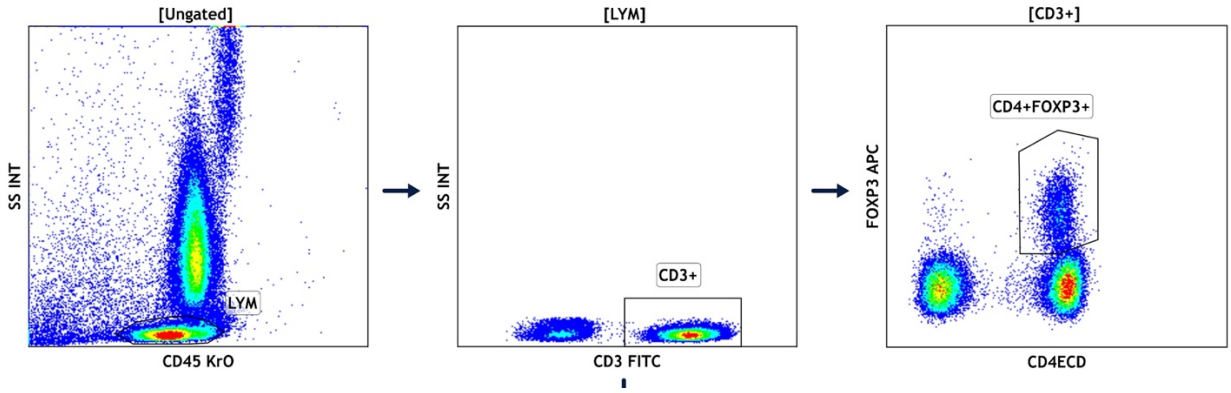
Venöz kana hücre yüzey protokolünün uygulanmasının ardından hücreler akan hücre ölçer cihazında okutuldu. Lenfositleri net bir şekilde ayırmak için öncelikle $CD45^+$ hücreler belirlendi ve ardından $CD3^+CD4^+$ T yardımcı lenfositler kapılandı. Bu hücre kapısından çift pozitif $PD1^+CXCR5^+$ hücre popülasyonu kapılanarak T foliküler hücreler yüzde olarak hesaplandı (Şekil 3.4). Sağlıklı kontrol grubu ile hasta grubu hücre yüzdeleri karşılaştırılarak değerlendirildi.



Şekil 3. 4: Tfh hücre alt grununun immün fenotipleme analizinin kapılama stratejisi ile gösterimi.

3.3.3. Lenfositlerin T Regülatör Hücre (Treg) Analizi

Venöz kana hücre yüzey protokolünün uygulanmasının ardından hücreler akan hücre ölçer cihazında okutuldu. Lenfositleri net bir şekilde ayırmak için öncelikle CD45+ hücreler belirlendi ardından CD3+ T lenfositler kapılandı ve bu hücreler içerisinden $CD4^+FOXP3^+$ Treg hücre oranı (%) hesaplandı (Şekil 3.5). Sağlıklı kontrol grubu ile hasta grubu hücre yüzdeleri karşılaştırılarak değerlendirildi.

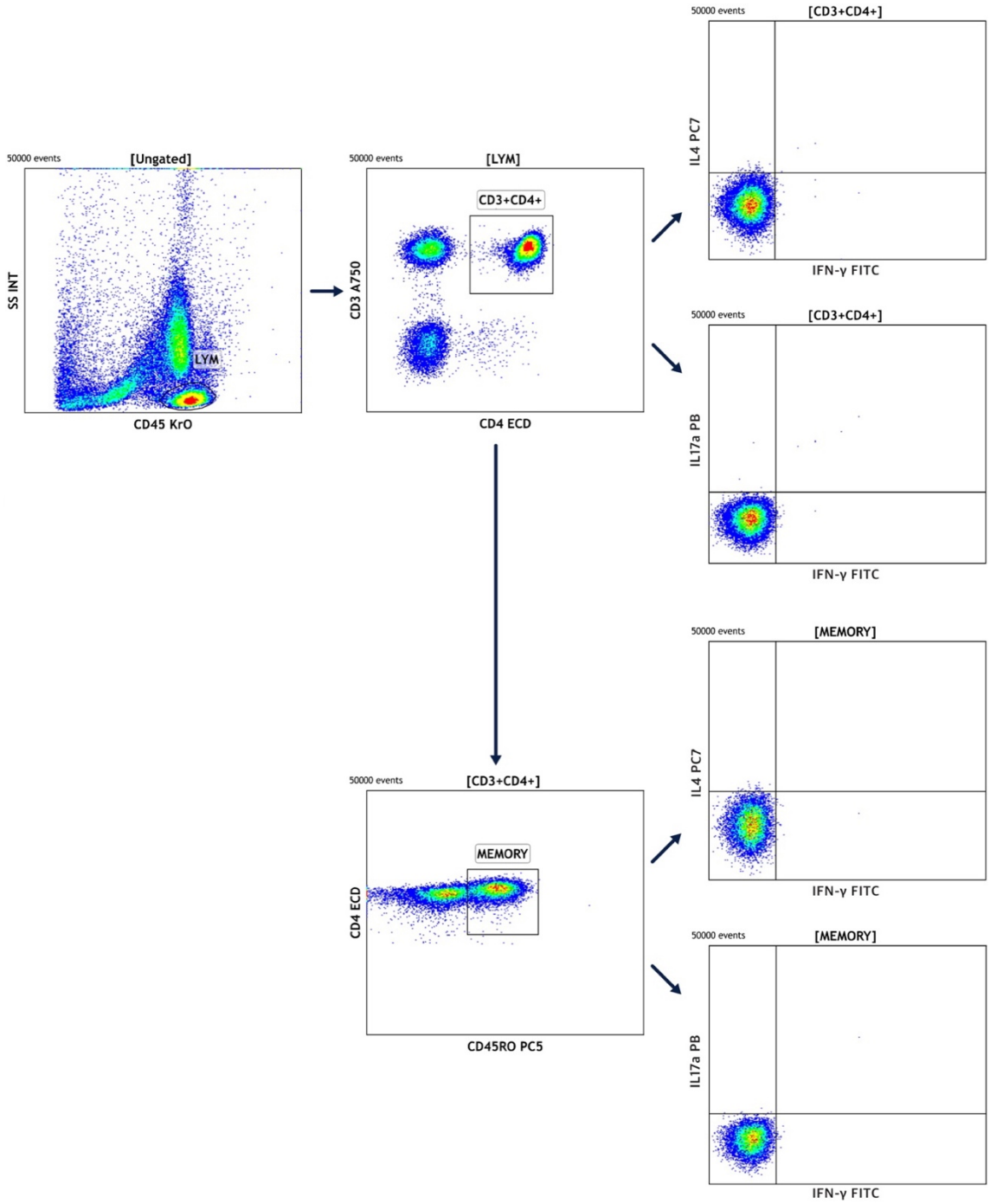


Şekil 3. 5: Treg hücre alt grununun immün fenotipleme analizinin kapılama stratejisi ile gösterimi.

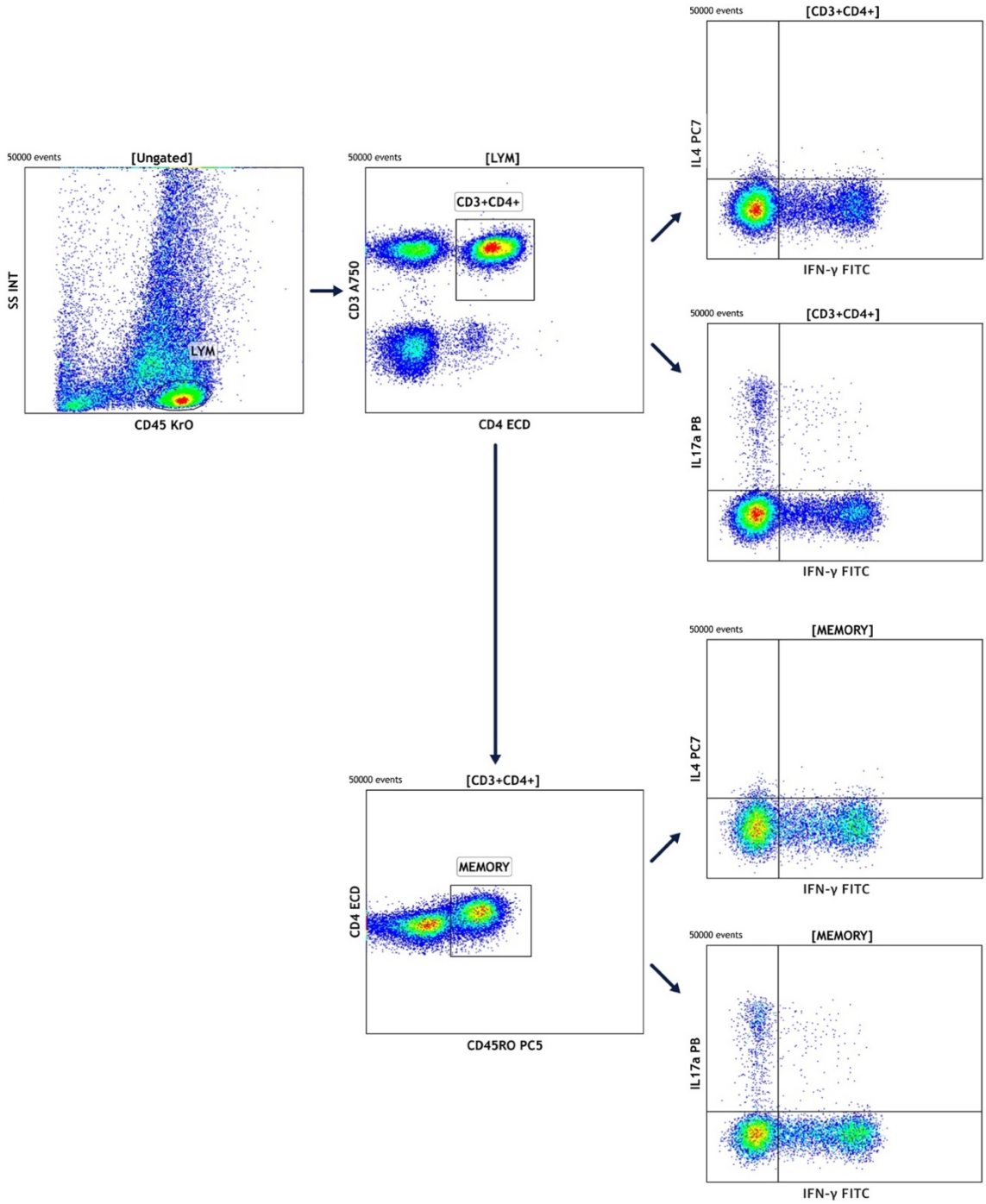
3.3.4. Lenfositlerin Hücre İçi Sitokin ve Yardımcı T Hücre Analizi

Venöz kanın Brefeldin-A ve PMA-İyonomisin içeren Beckman Coulter DurActive tüpleri içerisinde inkübatörde 4-5 saatlik *in vitro* stimülasyonu sonrası hücre yüzey ve hücre içi boyama protokolü uygulandı. Hem uyaransız hem uyaranlı tüpler akan hücre ölçerde okutulduktan sonra T yardımcı hücre alt grupları tespit edilirken total lenfositler içerisinden kapılama yöntemi ile Th1, Th2 ve Th17 hücre alt gruplarından her biri sırasıyla IFN-γ, IL-4 ve IL-17 imza sitokin oranları ile hesaplandı.

Bu analiz yönteminde öncelikle lenfosit popülasyonunu net bir şekilde debri kısımdan ayırmak amacıyla CD45+ hücreler seçildi. CD45+ hücreler içerisinden CD3+CD4+ T yardımcı lenfositler ve CD4+CD45RO+ T hafıza hücreler kapılandı. Bu iki kapıdan ise ardından IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) yardımcı T hücre frekansları tespit edilmiştir (Şekil 3.6 ve 3.7). Sağlıklı kontrol grubu ile hasta grubu hücre yüzdeleri karşılaştırılarak değerlendirildi.



Şekil 3. 6: Uyaransız tüplerde yardımcı T hücre popülasyonlarına ait hücre içi sitokinlerin immün fenotipleme analizinin kapılama stratejisi ile gösterimi.



Şekil 3. 7: Uyaranlı tüplerde yardımcı T hücre popülasyonlarına ait hücre içi sitokinlerin immün fenotipleme analizinin kapılama stratejisi ile gösterimi.

3.3.5. IL-10 Sitokini Konstantrasyonu Ölçümü ve Analizi

Sağlıklı bireylerden ve hastalardan stoklanan serum örneklerinden IL-10 ölçümü için bu moleküle özgü antikorlarla kaplanmış sandviç model sistemi ile hazırlanmış ELISA plağı kullanıldı ve üretici firmanın deney prosedürüne uygun olarak çalışıldı.

Prosedürde belirlenen konsantrasyon ve dilüsyon değerleri analiz programına kayıt edildi. Plaktaki sıralarına uygun olarak çalışılan örneklerin ELISA okuyucuda 450 nm'de OD değerleri ölçüldü ve serumdaki IL-10 sitokin konsantrasyonları hesaplandı. Konsantrasyon değerleri 4PL eğrisinden formülize edildi. Serum örnekleri double (çift) olarak çalışıldı ve sonuç değerleri iki ölçümün ortalamalarından yazıldı. Sağlıklı kontrol grubu ve hasta grubu sitokin konsantrasyonları karşılaştırıldı.

3.3.6. İstatistiksel Analiz

Hastalara ilişkin klinik ve demografik bazı veriler ortalama (Ort) ± standart deviasyon (SD) (minimum-maksimum) değerleri olarak verildi.

Gruplar arasındaki farklılık GraphPad Prism 8 programı (GraphPad Software, Inc. CA, USA) kullanılarak analiz edildi. Deneysel verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. İki grup arasındaki karşılaştırmalar için parametrik dağılım gösteren veriler için Unpaired t testi, non-parametrik dağılım için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Non-parametrik dağılım gösteren eşleştirilmiş/bağımlı iki ölçümün karşılaştırılması için Wilcoxon signed ranks testi kullanıldı. P-değeri ≤ 0.05 değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Ayrıca çalışmada bazı önemli veriler için iki değişken arasında ilişki olup olmadığını değerlendirmek amacıyla Spearman korelasyon analizi kullanıldı ve karşılaştırılan değişkenler korelasyon matrisi şeklinde gösterildi. Böylece çok sayıda değişkenin birbirleriyle ilişkisi birlikte değerlendirildi. Ek olarak, klinik veriler ve immünolojik veriler arasındaki korelasyonların birlikte değerlendirilmesi amacıyla normal dağılım göstermeyen parametreler için uygun olan çok değişkenli Spearman korelasyon testi kullanılarak Heatmap (ısı haritası) oluşturuldu. (Haritanın sağında verilen renk skalası korelasyon katsayısını (r) temsil eder; kırmızı tonlar pozitif, beyaz tonlar ise negatif korelasyonu simgelemektedir.

4. BULGULAR

4.1. BÖBREK TAŞI İLE İLİŞKİLİ PİYELONEFRİT TANISI KONULMUŞ HASTALARA AİT BULGULAR

4.1.1. Hastaların Teşhisi, Demografik Özellikleri Ve Klinik Verileri

Çalışmaya T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniği'ne başvuran ve böbrek taşı mevcut olan piyelonefrit tanısı konulmuş ve yatışı yapılmış 25 hasta birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilme kritlerine uygun olan hastalara ve sağlıklı bireylere çalışmanın önemi, süreci ve kan alımı hakkında detaylı bilgilendirmeler yapılmıştır. Çalışmaya katılmayı kabul eden hasta bireylerden Gönüllü Onam Formu imzalatılarak onayları alınmıştır. Çalışma sırasında hastaların demografik, klinik ve immünolojik verileri toplanmıştır.

Çalışmaya katılan tüm hastalardan ve yaş uyumlu herhangi bir kronik hastalık öyküsü bulunmayan sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örnekleri; Breg alt gruplarının, hücre içi sitokinleri ile Th alt gruplarının, Treg ve cTfh hücrelerin hücre yüzeyi ve hücreiçi boyama yöntemleri ile tespiti ve IL-10 sitokini konsantrasyon ölçümünü içeren immünolojik değerlendirme için SBÜ Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi İleri Analiz Laboratuvarı'na BMTF ile soğuk zincir koşullarında dikkatli bir şekilde taşınmıştır ve deneyler gerçekleştirilmiştir.

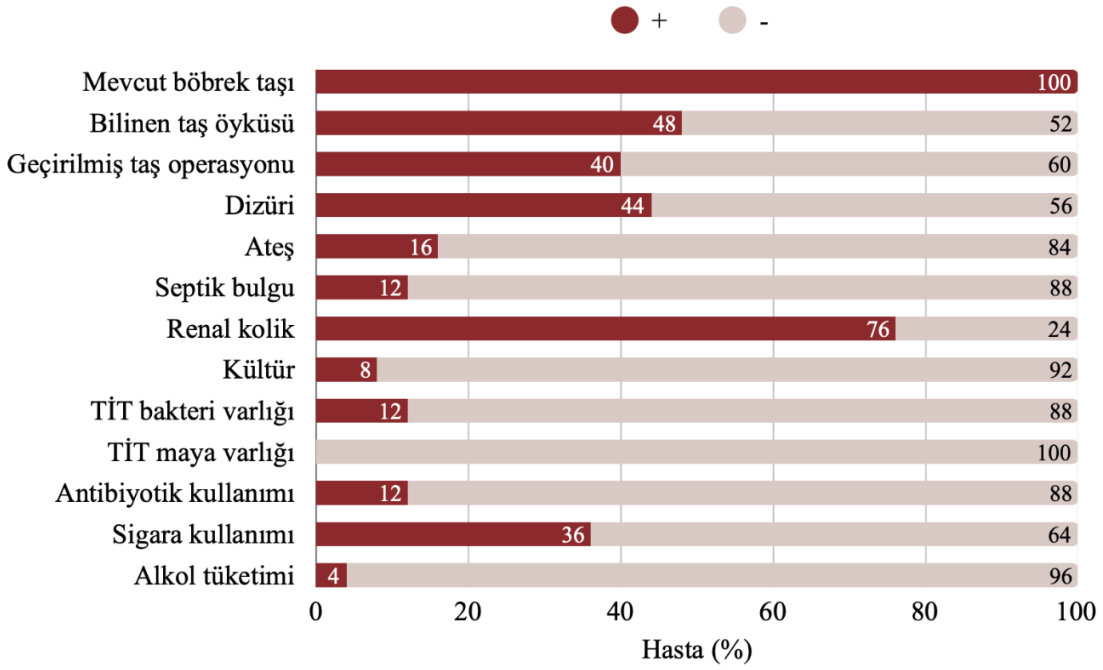
Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri ve ana klinik bulguları Tablo 4.5'de gösterilmiştir. Çalışmaya 02.09.2025 ve 04.11.2025 tarihleri arasında üroloji kliniğine başvuran hastalar katılmıştır. Böbrek taşı olan piyelonefrit tanısı almış 25 hastadan 7'si (28%) kadın, 18'i (72%) erkek hastaydı. Bu hastaların yaş ortalaması 49,48 ± 16,96 yıldı. Hastaların Vücut Kitle İndeksi (VKİ/BMI) 27,72 ± 5,13 kg/m^2 idi. Hastaların semptom gösterme günleri ortalama 8,04 ± 11,28 gündü.

Tablo 4.5: Çalışmaya dahil edilen hastalara ait demografik veriler ve klinik parametreler.

Hasta kodu	Yaş (yıl)/ C	SG (gün)	BTÖ	GTO	Taşın yeri	Taşın boyutu (mm)	HU	HD	Ateş	CRP	D	RK
P1	36/K	3	-	-	üreter	4X5	600	2	+	287	+	+
P2	26/E	3	+	+	üreter	5X14	350	1	-	17	-	+
P3	60/K	5	+	-	üreter	9X8	1100	2	-	115	+	-
P4	60/E	7	-	-	üreter	9x5	1500	2	-	18	-	+
P5	73/K	1	-	-	üreter	7X10	850		-	12	-	-
P6	56/K	2	+	+	üreter	13x11	1400	2	-	139	-	+
P7	73/E	60	+	+	üreter	15x10	1700	2	-	53	-	-
P8	67/E	10	+	+	böbrek	7x6	700	1	+	198	-	-
P9	54/E	4	-	-	üreter	7X5	1400	1	-	32	+	+
P10	75/E	3	-	-	böbrek	6X8,5	1500	0	-	107	+	-
P11	73/E	7	+	+	üreter	9X11	1100	4	-	15,2	-	+
P12	60/K	5	+	+	üreter	10x6	1000	1	+	135	+	+
P13	21/E	4	+	+	üreter	4x3	330	3	-	3,2	-	-
P14	49/E	5	-	-	üreter	7X9	1300	1	-	154	+	+
P15	31/K	1	-	-	üreter	4,5X7	1200	0	+	1,3	+	+
P16	39/E	20	-	-	üreter	5X7	1270	0	-	3,2	+	+
P17	35/E	7	-	-	üreter	7X11	1365	1	-	1,4	-	+
P18	39/E	5	-	-	üreter	7X16	1700	2	-	20	-	+
P19	30/E	3	+	+	üreter	7X16	1800	2	-	118	-	+
P20	70/E	4	+	+	üreter	16x12	818	3	-	8	+	+
P21	44/K	10	+	-	üreter	4x9	935	1	-	5	+	+
P22	34/E	7	-	-	üreter	4x7	1047	1	-	105	-	+
P23	38/E	7	-	-	üreter	4x7	978	2	-	24	-	+
P24	65/E	8	+	+	üreter	8x10	1709	2	-	7	-	+
P25	29/E	10	-	-	üreter	10x7	1800	3	-	2	+	+

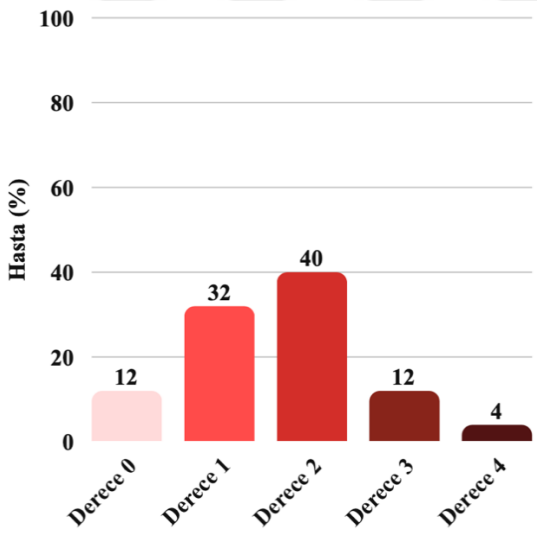
NOT: *BTÖ, bilinen taş öyküsü; C, cinsiyet; CRP, C-Reaktif Protein; D, dizüri; E, erkek; GTÖ, geçirilmiş taş operasyonu; HD, hidronefroz derecesi; HU, hounsfield unit; K, kadın; RK, renal kolik; SG, semptom gösterme. Hidronefroz dereceleri = 0, derece 0; 1, derece 1, 2, derece 2, 3, derece 3; 4, derece 4 olarak temsil edilmiştir. Taş boyutları en×boy olmak üzere mm (milimetre) cinsinden gösterilmiştir.*

Kliniğe başvurduğu esnada tüm hastalarda taş mevcuttur. Bu hastalardan 12 (48%)'sinde bilinen taş öyküsü ve 10 (40%) hastada ise önceden geçirilmiş taş operasyonu bilgisine ulaşılmıştır. Kliniğe başvuran 11 (44%) hastada dizürü şikâyeti vardır. Öte yandan 4 (16%) hasta yüksek ateş belirtisi ve 3 (12%) hastada septik bulgu gözlenmiştir. Hastaların 19 (76%)'unda ise renal kolik bulgusuna ulaşılmıştır. Kliniğe başvuran bütün hastalara idrar kültürü yapılmıştır. 2 (%8) hastanın idrarında üreme pozitiftir. Aynı zamanda hastalara Tam İdrar Tahlili (TİT) yapılmıştır. Bunun sonucunda 3 (%12) hastada bakteri görülürken hiçbir hastada maya görülmemiştir. Kliniğe başvurduğu esnada 3 (12%) hastada antibiyotik kullanımı mevcuttur. Toplam 25 hastadan 9 (36%)'u günlük hayatında sigara kullandığı belirtirken, sadece 1 (4%) hasta alkol tükettiğini bildirmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Piyelonefrit tanılı hastalara ait önemli veriler.

Klinikte değerlendirilen hastaların en yüksek CRP değeri 287 mg/L kaydedilmiştir. Ortalama CRP değerleri ise 63,21 ± 74,44'ür. Kliniğe yatışı yapılan ve tedavi altına alınan 23 (%92) hastada taşın konumunun üreterde ve 2 (%8) hastada ise böbrekte olduğu saptanmıştır. Hastalara ait taş bulgularının en küçük boyutu 4x3 mm iken en büyük boyutu 16x12mm'dir. En uzun taş boyutu ise 16 mm'dir. Hounsfield Unit (HU) ölçeklendirmesine göre en küçük değer 330 iken, en büyük değer 1800 bulunmuştur. Ortalama değer ise 1178,08 ± 416,17'dir. Hastaların hidronefroz dereceleri incelendiğinde; 3 (%12) hastada 0, 8 (%32) hastada 1, 10 (%40) hastada 2, 3 (%12) hastada 3 ve sadece 1 (%4) hastada 4 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Çalışma tamamlandığında hastaların toplam sağkalımı 100% idi.



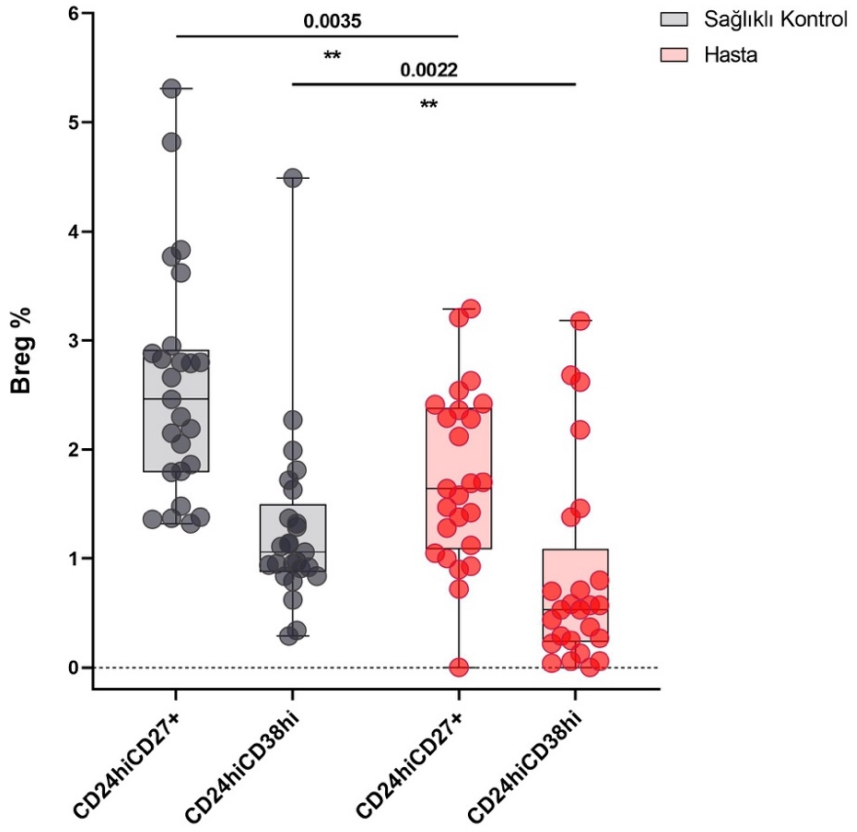
Şekil 4.2: Piyelonefrit tanılı hasta oranlarına (%) göre hidronefroz derecelerinin gösterilmesi.

Ek olarak hastaların bazı hemotolojik tahlil sonuçları laboratuvar referans değerlerine göre incelendiğinde; WBC değeri 8 (32%) hastada normal iken, 17 (68%) hastada yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde mutlak nötrofil değeri 4 (16%) hastada normal ancak 21 (84%) hastada yüksek tespit edilmiştir. Öte yandan mutlak lenfosit değeri 6 (24%) hastada düşük iken 19 (76%) hastada normal, trombosit değeri 3 (12%) hastada yüksek ve 22 (88%) hastada normal, mutlak monosit değeri ise sadece 1 (4%) hastada yüksek iken, 24 (96%) hastada normal bulunmuştur.

4.2. DENEYSEL BULGULAR

4.2.1. $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg Hücre Alt Gruplarının Karşılaştırılması

Periferik kandan hücre yüzey boyama yöntemi uygulanmasının ardından $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre alt grupları tespit edilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu ve hasta bireylerin hücre alt gruplarının yüzdeleri, anlamlılık değerinin tespit edilmesi amacıyla karşılaştırma yapılarak istatistiksel test yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Bu analiz Breg alt gruplarının frekansı hakkında bilgi sunarak, $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre alt gruplarının sağlıklı kontrollere kıyasla enfeksiyon varlığı durumunda immün yanıttaki rolünü değerlendirmemizi sağlamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol (n=25) ve böbrek taşı ilişkili piyelonefrit tanılı hasta (n=25) gruplarında periferik kan Breg hücre alt

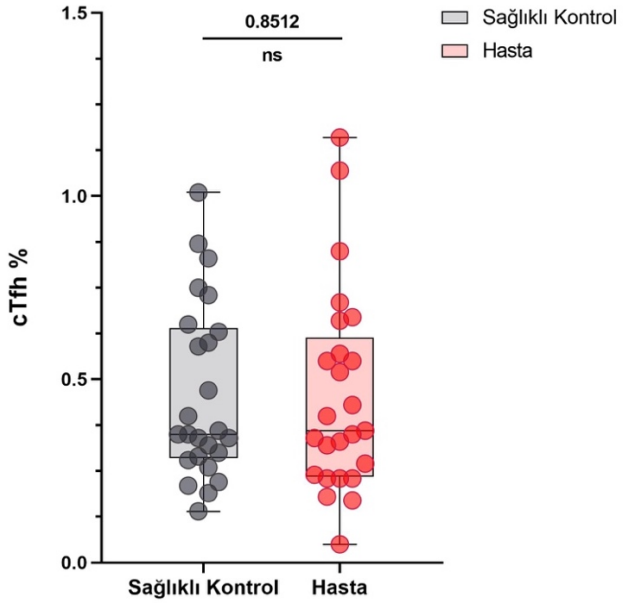
popülasyonlarının frekans dağılımları gösterilmiştir. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. **p<0,01.

NOT: Verilerin dağılımı kutu grafiği ile gösterilmektedir. Kutunun ortasındaki yatay çizgi medyan (ortanca) değeri; kutunun alt ve üst sınırları çeyrekler arası genişliği (Interquartile Range - IQR, 25. ve 75. persentiller) ifade eder. En alttaki ve en üstteki dikey çizgiler sırasıyla veri setindeki minimum ve maksimum değerleri göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıya ait veriyi temsil ederek örneklemdeki varyasyonu (çeşitliği) görselleştirmektedir. Veriler Shapiro-Wilk testi ile analiz edilmiş ve normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Bu nedenle gruplar arası karşılaştırmalarda non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

İstatistiksel analizler sonucunda $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg hücre alt grubu incelendiğinde, sağlıklı kontrol grubunun hücre frekansı hasta grubundaki hücre frekansına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,0035). Benzer şekilde $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre alt grubu incelendiğinde, sağlıklı kontrol grubunun hücre frekansı, hasta grubundaki hücre frekansına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,0022).

4.2.2. T Foliküler Hücre (Tfh) Alt Grubunun Karşılaştırılması

Periferik kandan hücre yüzey boyama yöntemi uygulanmasının ardından dolaşımdaki $PD1^{+}CXCR5^{+}$ Tfh alt grubu akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu ve hasta bireylerin Tfh yüzdeleri, anlamlılık değerinin tespit edilmesi amacıyla karşılaştırma yapılarak istatistiksel test yöntemleriyle değerlendirilmiştir (Şekil 4.4).

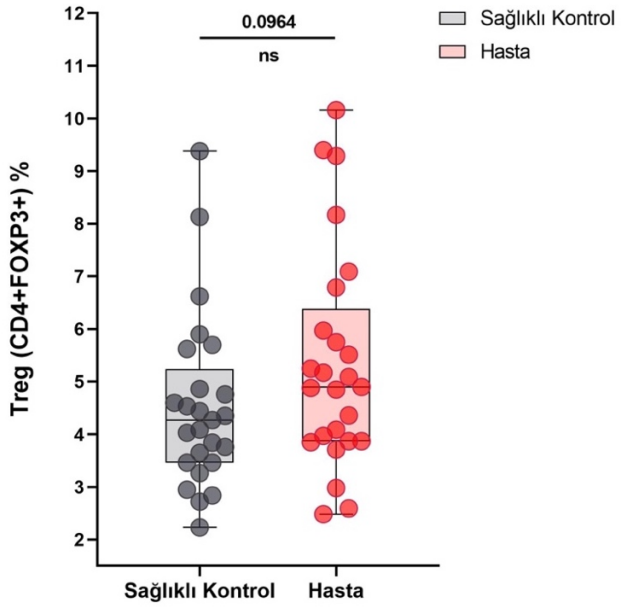


Şekil 4.4: $PD1^{+}CXCR5^{+}$ T foliküler hücre frekansının sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol (n=25) ve piyelonefritli hasta (n=25) gruplarında periferik kan $PD1^{+}CXCR5^{+}$ T foliküler yardımcı (cTfh) hücre frekansları gösterilmiştir. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. ns $p>0,05$.

İstatistiksel analizler sonucunda, $PD1^{+}CXCR5^{+}$ Tfh alt grubu incelendiğinde sağlıklı kontrol ve piyelonefrit tanılı hasta gruplarının hücre frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,8512$).

4.2.3. Düzenleyici T Hücre (Treg) Alt Grubunun Karşılaştırılması

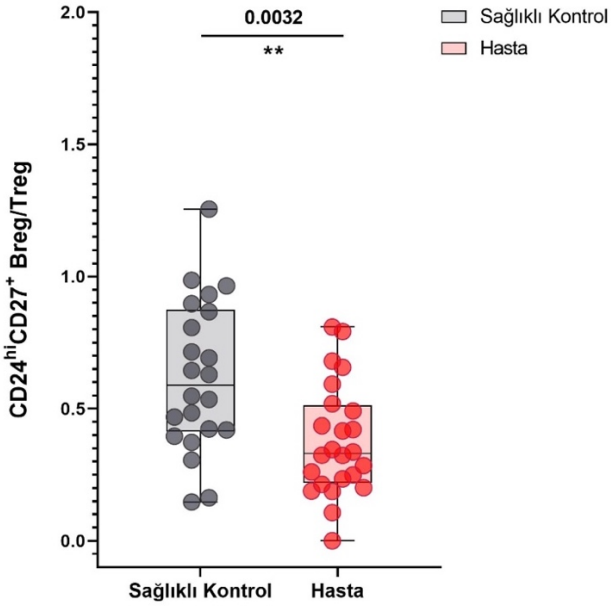
Periferik kandan hücre yüzey ve hücre içi boyama yönteminin uygulanmasının ardından $CD4^+FOXP3^+$ Treg hücre alt grubu tespit edilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu ve hasta bireylerin hücre alt gruplarının yüzdeleri, anlamlılık değerinin tespit edilmesi amacıyla karşılaştırma yapılarak istatistiksel test yöntemleriyle değerlendirilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: $CD4^+FOXP3^+$ düzenleyici T hücre frekansının sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol (n=25) ve piyelonefritli hasta (n=25) gruplarında periferik kan $CD4^+FOXP3^+$ Treg hücre frekansları gösterilmiştir. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. ns $p>0,05$.

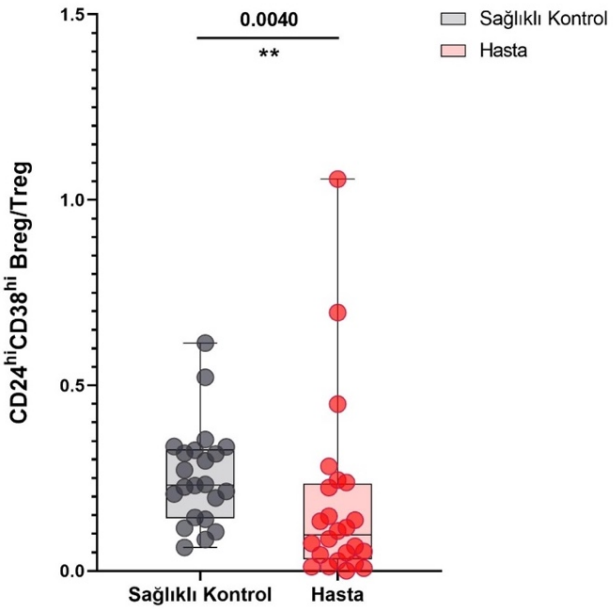
İstatistiksel analizler sonucunda, $CD4^+FOXP3^+$ Treg hücre alt grubu incelendiğinde sağlıklı kontrol ve piyelonefrit tanılı hasta gruplarının hücre frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,0964$).

4.2.3.1. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Regülatör hücre kompozisyonu (Breg/Treg) dengeleri:



Şekil 4.6: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg / Treg oranlarının karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol ve piyelonefritli hasta gruplarında, regülatör immün ağın iki temel bileşeni olan bellek benzeri regülatör B hücreleri ($CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg) ile regülatör T (Treg) hücreleri arasındaki oransal denge sunulmuştur. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. **p<0,01.

Hasta grubunda Breg/Treg oranı, sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir düşüş sergilemiştir (p = 0,0032).

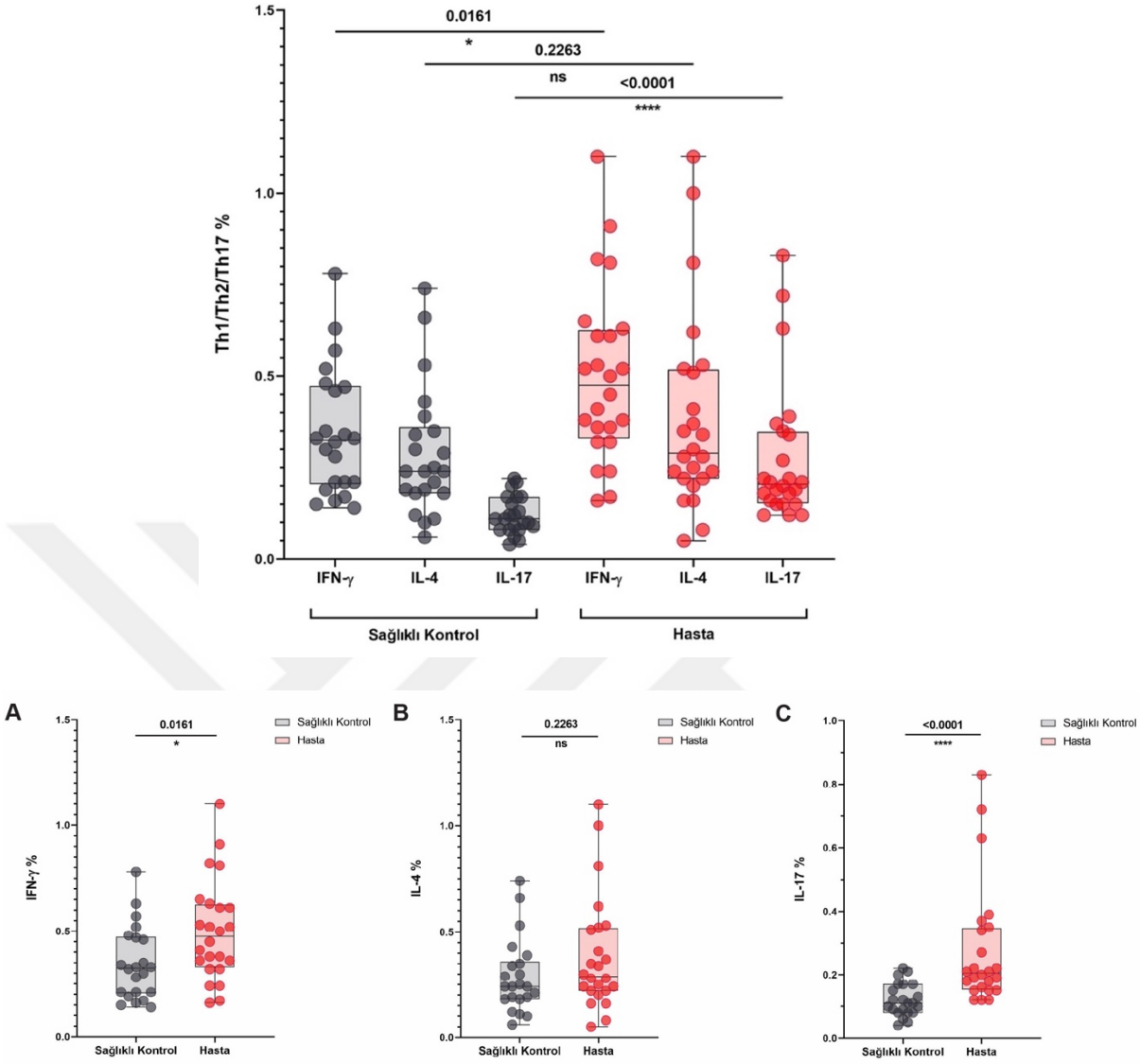


Şekil 4.7: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg / Treg oranlarının karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol ve piyelonefritli hasta gruplarında, regülatör sistemin geçişsel evre bileşenlerini yansıtmak amacıyla hesaplanan $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg/Treg oranları gösterilmektedir. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. **p<0,01.

Hasta grubunda geçişsel Breg/Treg oranı, sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir düşüş göstermiştir (p = 0,0040).

4.2.4. CD3+CD4+ T lenfosit kapısından IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) Yardımcı T Hücre Alt Gruplarının Karşılaştırılması

Periferik kanın uyaransız (bazal) ve uyaranlı tüplerde, 37°C %5CO_2 içeren etüv içerisinde 4 saatlik *in vitro* stimülasyonu sonrası hücre yüzey ve hücre içi boyama yöntemi uygulanmasının ardından CD3+CD4+ T lenfosit kapısı seçilerek IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) yardımcı T hücre frekansları tespit edilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu ve hasta bireylerin hücre alt gruplarının yüzdeleri, anlamlılık değerinin tespit edilmesi amacıyla karşılaştırma yapılarak istatistiksel test yöntemleriyle değerlendirilmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

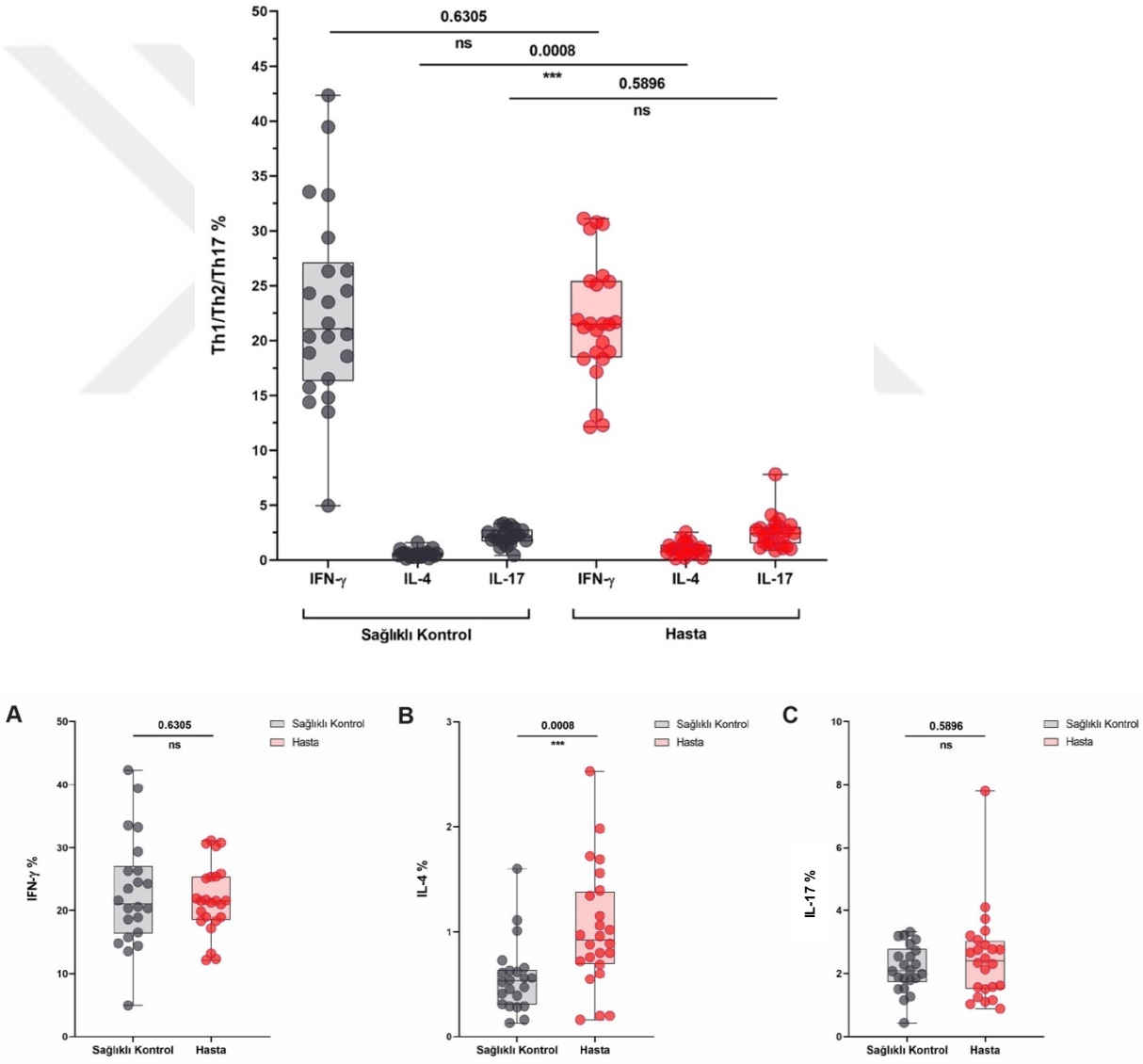


Şekil 4.8: Uyaransız (unstimulated) T Helper hücre sitokin frekanslarının karşılaştırılması. A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasının ayrı ayrı gösterimi. Sağlıklı kontrol (n=22) ve hasta (n=24) gruplarında, uyaransız ölçülen IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) frekansları gösterilmiştir. Veriler kutu grafiği (Ortalama±SD, Min-Max veya Medyan, IQR, Min-Max) olarak gösterilmiştir ve her bir nokta bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalar, Unpaired t testi ile veya Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. ns $p>0,05$; *$p<0,05$; ****$p<0,0001$.

(NOT: Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren IFN-γ gruplar arası karşılaştırmasında

parametrik Unpaired t-testi kullanılırken; normal dağılım göstermeyen IL-4, IL-17 ve diğer hücresel parametreler için non-parametrik Mann-Whitney U testi tercih edilmiştir.)

İstatistiksel analizler sonucunda, IFN-γ (Th1) ve IL-17 (Th17) frekansı hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0161 ve p<0,0001). Öte yandan IL-4 (Th2) frekansı incelendiğinde sağlıklı kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (p=0,2263).



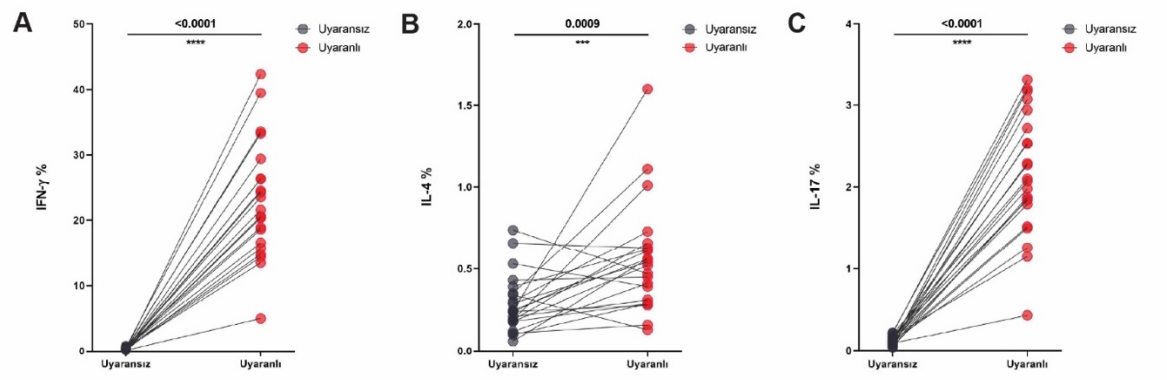
Şekil 4.9: Uyaranlı (stimulated) T Helper hücre sitokin frekanslarının karşılaştırılması. A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta grupları arasında

karşılaştırılmasının ayrı ayrı gösterimi. Sağlıklı kontrol (n=22) ve hasta (n=24) gruplarında, *in vitro* stimülasyon sonrası IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) frekansları gösterilmiştir. Veriler kutu grafiği (Ortalama±SD, Min-Max veya Medyan, IQR, Min-Max) olarak gösterilmiştir ve her bir nokta bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalar, Unpaired t testi ile veya Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. ns p>0,05; ***p<0,001.

(NOT: Normal dağılım gösteren IFN-γ verileri için parametrik Unpaired t-test; normal dağılım göstermeyen IL-4 ve IL-17 verileri için non-parametrik Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.)

İstatistiksel analizler sonucunda, IFN-γ (Th1) ve IL-17 (Th17) frekansı incelendiğinde sağlıklı kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (sırasıyla p=0,6305 ve p=0,5896). Öte yandan IL-4 (Th2) frekansı hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,0008).

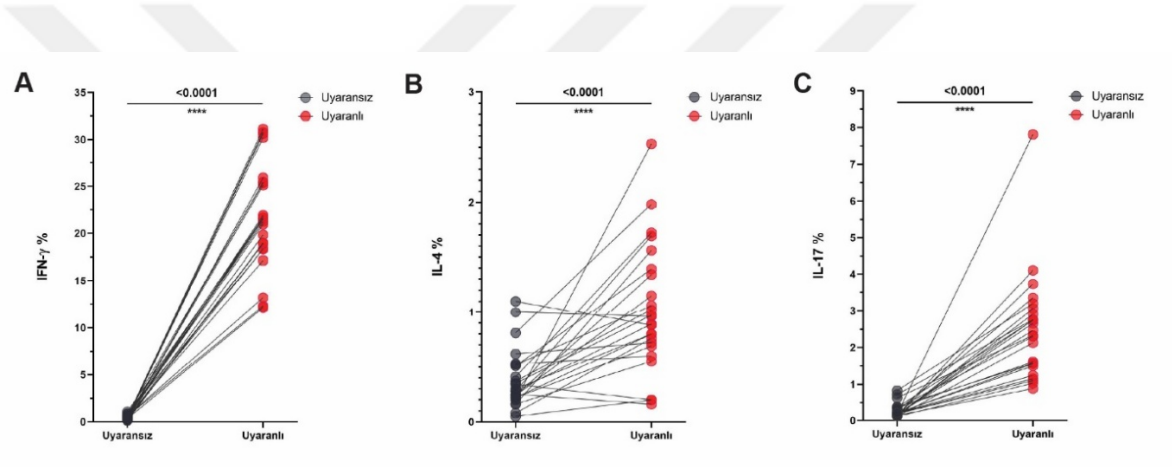
Sağlıklı kontrol ve hasta grubu arasındaki uyaransız ve uyaranlı karşılaştırmalara ek olarak, hem sağlıklı kontrol hem de piyelonefrit tanılı hasta grubunda uyaransız-uyaranlı IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) frekanslarının karşılaştırmaları gösterilmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Sağlıklı kontrol grubunda uyaransız-uyaranlı A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının karşılaştırması. Sağlıklı kontrol grubunda (n=22) T helper hücrelerinin uyarılmamış ve uyarılmış durumdaki sitokin üretim kapasiteleri, ölçülen uyarım öncesi-

sonrası değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında paired t testi kullanılırken, normal dağılıma uymayan eşleşmiş grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Wilcoxon matched-pairs signed-rank test kullanılmıştır. ***p<0,001; ****p<0,0001.

Sağlıklı kontrol grubunda uyaransız-uyaranlı IFN-γ, IL-4, IL-17 frekanslarının karşılaştırması incelendiğinde, uyaranlı IFN-γ, IL-4, IL-17 frekanslarında uyaransız frekanslara kıyasla anlamlı olarak artış tespit edilmiştir (sırasıyla p<0,0001, p=0,0009 ve p<0,0001).

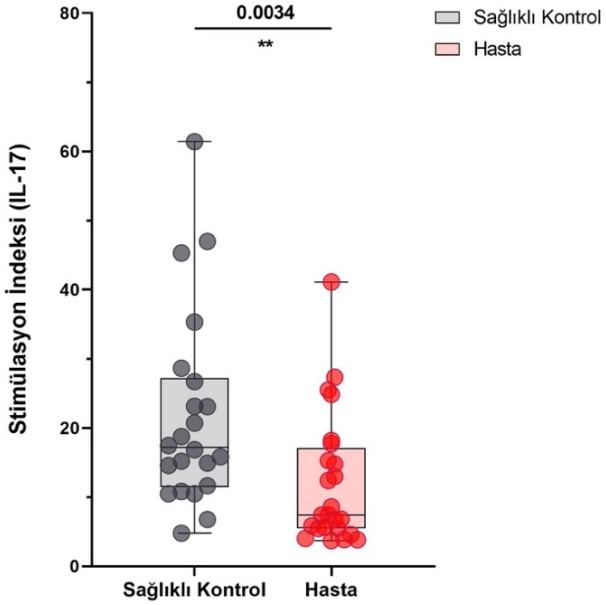


Şekil 4.11: Hasta grubunda uyaransız-uyaranlı A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının karşılaştırması. Piyelonefrit tanılı hasta grubunda (n=24) T helper hücrelerinin uyarılmamış ve uyarılmış durumdaki sitokin üretim kapasiteleri, ölçülen uyarım öncesi-sonrası değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında paired t testi kullanılırken, normal dağılıma uymayan eşleşmiş grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Wilcoxon matched-pairs signed-rank test kullanılmıştır. ****p<0,0001.

Piyelonefrit tanılı hasta grubunda uyaransız-uyaranlı IFN-γ, IL-4, IL-17 frekanslarının karşılaştırması incelendiğinde, uyaranlı IFN-γ, IL-4, IL-17 frekanslarında uyaransız frekanslara kıyasla anlamlı olarak artış tespit edilmiştir (sırasıyla p<0,0001, p<0,0001 ve p<0,0001).

4.2.5. CD3+CD4+ Yardımcı T Hücre ile İlgili Polarizasyon Analizleri

4.2.5.1. Stimülasyon İndeksi (SI) değerlerinin karşılaştırılması:

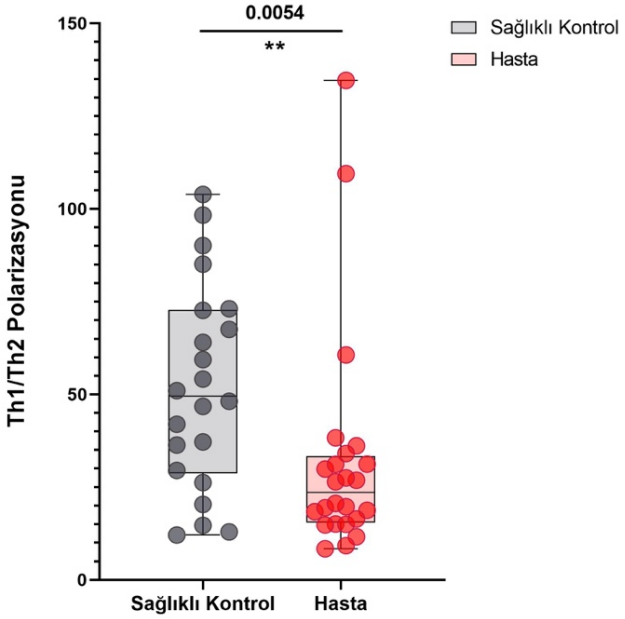


Şekil 4.12: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında T helper hücrelerinin IL-17 Stimülasyon İndeksi (SI) değerlerinin karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol ve piyelonefritli hasta gruplarında T helper hücrelerinin IL-17 üretim kapasitelerini yansıtan Stimülasyon İndeksi (SI) değerleri gösterilmiştir. SI değerleri, her bir katılımcı için (Uyarılı Hücre % / Uyaransız Hücre %) formülü ile hesaplanmıştır. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. **p<0,01.

Stimülasyon indeksi (SI) analizi sonucunda, sadece IL-17 parametresinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (Hasta SI medyan: 7,417; Kontrol SI medyan: 17,16; p=0,0034). IFN-γ ve IL-4 parametrelerinde gruplar arası anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). Hastalarda T helper hücrelerinin IL-17 üretim kapasitesinin uyarana karşı daha yüksek bir duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. p=0,0034 değeri, hasta grubunda uyarana karşı oluşan IL-17 yanıt kat sayısının (fold change) sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu göstermektedir.

(NOT: Hastalarda IL-17 SI değerinin daha düşük çıkması, aslında bu hücrelerin uyarana yanıt vermediği anlamına gelmez. Aksine, uyaransız (bazal) durumda IL-17 seviyelerinin hastalarda zaten yüksek olduğunu (saptanan $p < 0.0001$ bulgusuyla uyumlu), bu nedenle dışarıdan gelen uyarana karşı gösterilen "kat artışın" sağlıklı kontrollere kıyasla daha sınırlı kaldığını gösterir. Sağlıklı kontrollerde bazal IL-17 çok düşük olduğu için, uyaranla birlikte oluşan artış çok daha dramatik bir SI değeri yaratmaktadır.)

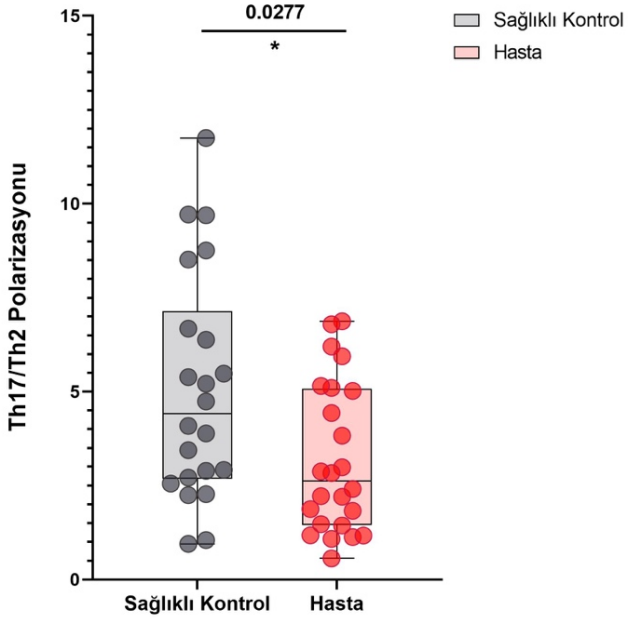
4.2.5.2. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th1/Th2 polarizasyon dengesi:



Şekil 4.13: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th1/Th2 polarizasyon dengesinin karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında efektör T hücre yanıtının polarizasyon yönünü belirlemek amacıyla hesaplanan Th1/Th2 (IFN-γ / IL-4) oranları gösterilmiştir. Her bir katılımcı için stimülasyon sonrası elde edilen IFN-γ+ (Th1) hücre frekansının IL-4 (Th2) hücre frekansına oranı hesaplanmıştır. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. **p<0,01.

Hasta grubunda Th1/Th2 oranının sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (p=0,0054).

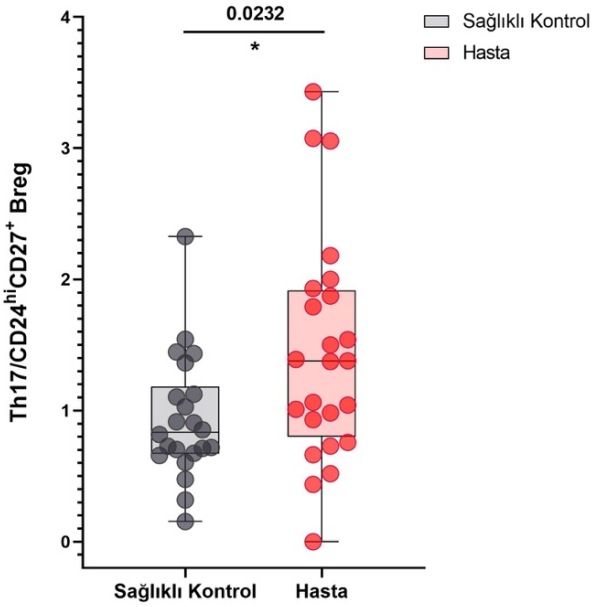
4.2.5.3. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17/Th2 polarizasyon dengesi:



Şekil 4.14: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17/Th2 polarizasyon dengesinin karşılaştırılması. Piyelonefritli hastalarda ve sağlıklı kontrollerde efektör T hücre yanıtının polarizasyonunu değerlendirmek amacıyla hesaplanan Th17/Th2 (IL-17 / IL-4) oranları sunulmuştur. Oranlar, her bir katılımcının stimülasyon sonrası elde edilen IL-17+ (Th17) hücre frekansının IL-4+ (Th2) hücre frekansına bölünmesiyle elde edilmiştir. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. *p<0,05.

Hasta grubunda Th17/Th2 oranı (Medyan: 2,623), sağlıklı kontrollere (Medyan: 4,416) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,0277).

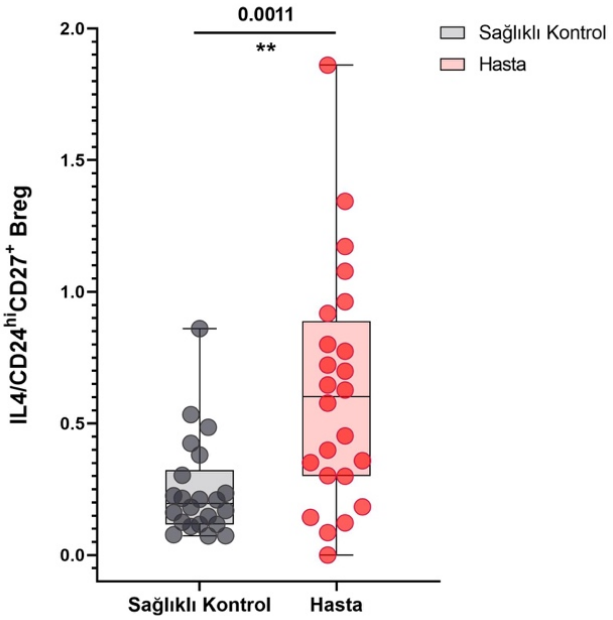
4.2.5.4. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg dengesi:



Şekil 4.15: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranlarının karşılaştırılması. Piyelonefrit hastalarında ve sağlıklı kontrollerde inflamatuar homeostazın bir göstergesi olan Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranları karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Efektör-regülatör dengesini belirlemek amacıyla, her bir katılımcının stimülasyon sonrası elde edilen $IL\text{-}17^{+}$ (Th17) hücre frekansı, bellek benzeri $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg hücre frekansına oranlanmıştır. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. *p<0,05.

Hasta grubunda Th17/Breg oranı (Medyan: 5,695), sağlıklı kontrollere (Medyan: 2,059) kıyasla istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir artış göstermiştir (p = 0,0232).

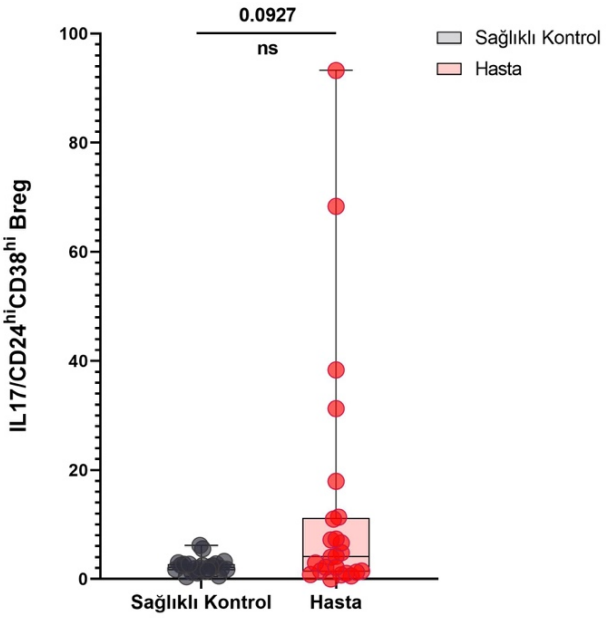
4.2.5.5. Piyelonefrit hastalarında efektör/regülatör dengesi ve Th2 yanıtının kompansatuar rolü:



Şekil 4.16: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th2 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranlarının karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında anti-inflamatuar (Th2) efektör sitokinlerin, $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg frekansına olan oranları gösterilmiştir. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. **p<0,01.

Hasta grubunda Th2/Breg oranı, sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir artış göstermiştir (p = 0,0011).

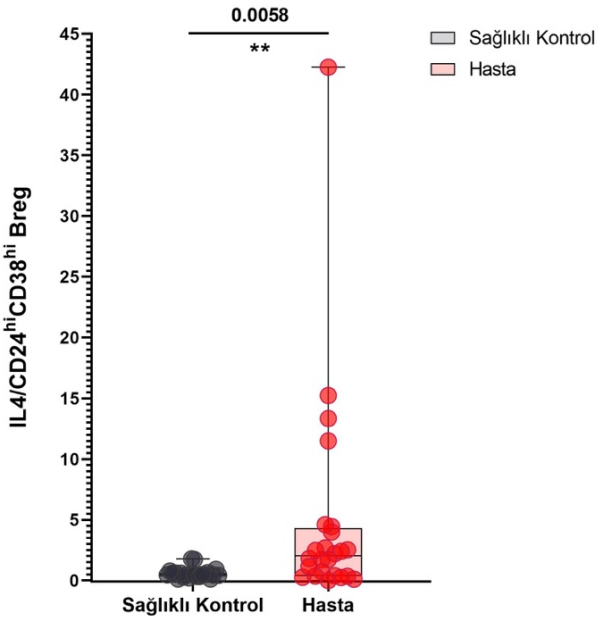
4.2.5.6. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg dengesi:



Şekil 4.17: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg oranlarının karşılaştırılması. Piyelonefrit hastalarında ve sağlıklı kontrollerde inflamatuar potansiyelin geçişsel regülatör B hücreleri üzerindeki baskısını değerlendirmek amacıyla hesaplanan Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg oranları gösterilmektedir. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. ns $p>0,05$.

Hasta grubunda medyan oran (4,103), kontrol grubuna (2,142) kıyasla sayısal olarak yaklaşık iki kat artış göstermiş olup, bu fark istatistiksel anlamlılık eğilimi (trend) sergilemektedir ($p = 0,0927$).

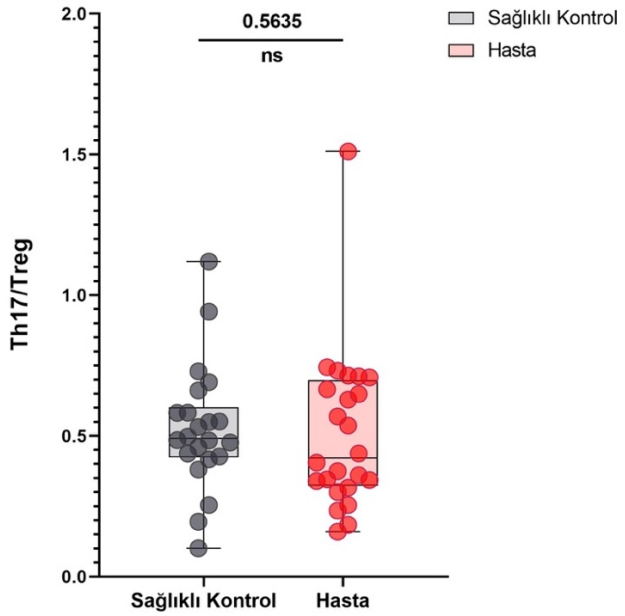
4.2.5.7. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th2 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg dengesi:



Şekil 4.18: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th2 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg oranlarının karşılaştırılması. Piyelonefrit hastalarında ve sağlıklı kontrollerde anti-inflamatuar efektör yanıt (Th2) ile geçişsel regülatör B hücreleri arasındaki oransal ilişki sunulmuştur. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. **p<0,01.

Hasta grubunda IL-4/Breg oranı, sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir artış göstermiştir (p = 0,0058). Hasta grubundaki medyan değer artışına, bireysel dağılımdaki belirgin heterojenlik eşlik etmektedir.

4.2.5.8. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / Treg oranı karşılaştırması:



Şekil 4.19: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında Th17 / Treg oranlarının karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol ve piyelonefritli hasta gruplarında, *in vitro* stimülasyon sonrası pro-inflamatuar efektör T hücreleri ile regülatör T (Treg) hücreleri arasındaki homeostatik dengeyi yansıtan Th17 / Treg (IL-17+ / $CD4^{+}FOXP3^{+}$) oranları sunulmuştur. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. ns $p>0,05$.

Hasta grubu (Medyan: 0,4219) ile kontrol grubu (Medyan: 0,4914) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p = 0,5635$).

4.2.6. Hasta ve Kontrol Grupları Arasındaki İmmün Hücre Frekanslarının Karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grupları arasındaki immün hücre frekanslarının karşılaştırılması gösterilmiştir (Tablo 4.6). Normal dağılım gösteren IFN-γ verileri için Unpaired t-test, diğer tüm parametreler için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Anlamlı değerler koyu punto ile belirtilmiştir FN-γ verileri Ortalama ± Standart Sapma, diğer tüm veriler Medyan (IQR) olarak sunulmuştur. *p<0,05 **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

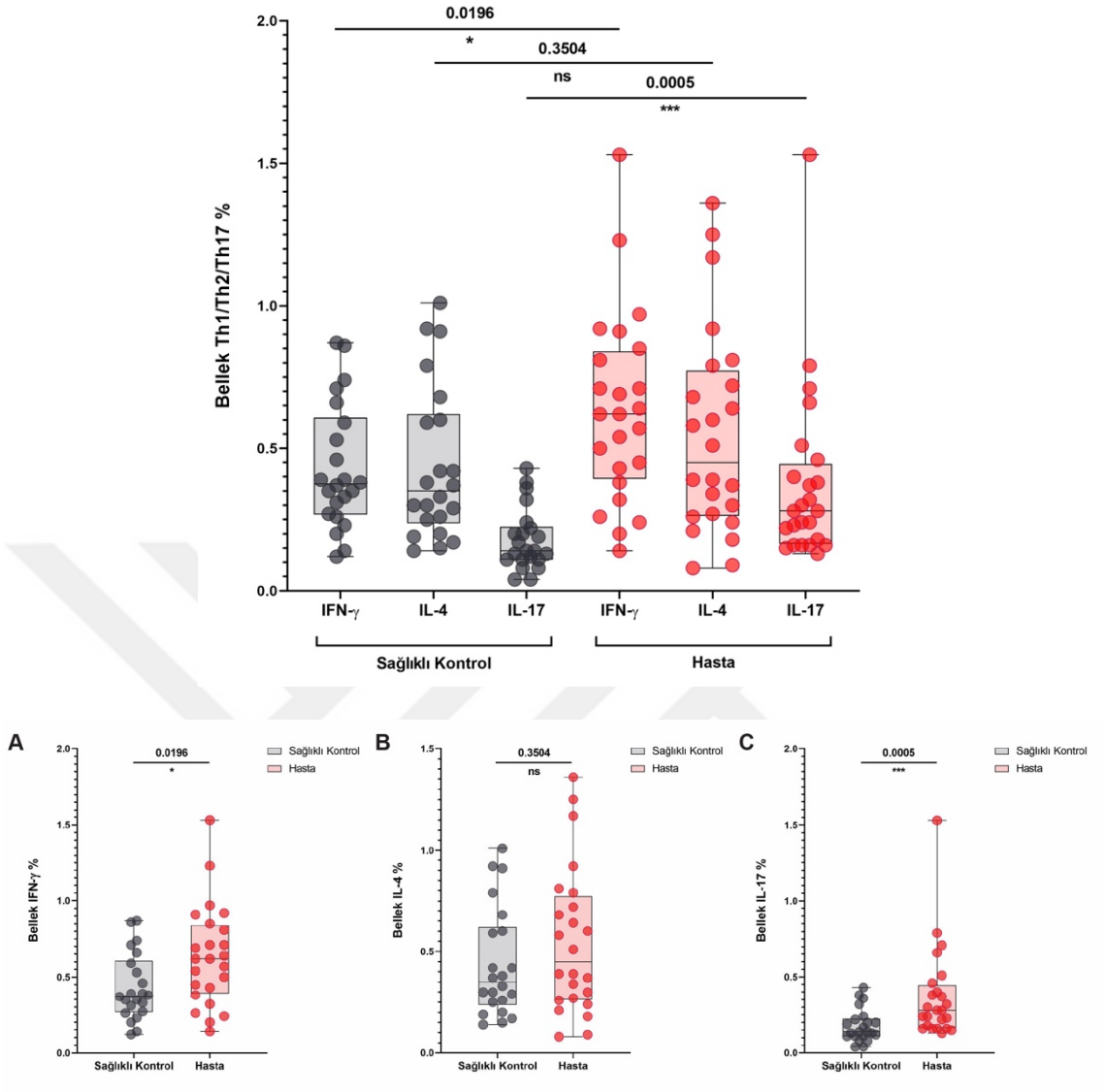
Tablo 4.6: Hasta ve kontrol grupları arasındaki immün hücre frekanslarının karşılaştırılması.

Hücre Grubu (%)	Sağlıklı Kontrol Median (IQR)	Hasta Median (IQR)	p
Breg			
$CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$	2,460 (1,795 – 2,915)	1,640 (1,085 – 2,385)	0,0035**
$CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$	1,060 (0,875 – 1,500)	0,530 (0,235 – 1,090)	0,0022*
Yardımcı T hücre (Uyaransız)			
IFN-γ	0,3455 ± 0,173	0,5000 ± 0,237	0,0161*
IL-4	0,240 (0,180 – 0,360)	0,290 (0,220 – 0,517)	0,2263
IL-17	0,1100 (0,080 – 0,170)	0,205 (0,153 – 0,347)	<0,0001****
Yardımcı T hücre (Uyaranlı)			
IFN-γ	22,87 ± 8,836	21,83 ± 5,497	0,6305
IL-4	0,530 (0,305 – 0,6375)	0,925 (0,697 – 1,378)	0,0008***
IL-17	2,085 (1,723 – 2,775)	2,40 (1,515 – 3,023)	0,5896
Treg			
$CD4^{+}FOXP3^{+}$	4,270 (3,460 – 5,240)	4,90 (3,870 – 6,380)	0,0964
Tfh			
$PD1^{+}CXCR5^{+}$	0,35 (0,285 – 0,640)	0,36 (0,235 – 0,615)	0,8512

Yapılan analizler sonucunda, piyelonefritli hasta grubunda hem $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ($p=0,0035$) hem de $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ ($p=0,0022$) Breg hücre frekanslarının sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. T helper hücre analizlerinde; uyarılmamış durumda hastalarda IFN-γ ($p=0,0161$) ve IL-17 ($p<0,0001$) seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak stimülasyon (uyaran) sonrası gruplar arasında IFN-γ ve IL-17 açısından fark bulunmazken, IL-4 sitokin seviyesinin hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ($p=0,0008$) gözlenmiştir. Treg ve Tfh hücre frekansları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.2.7. Bellek T lenfosit kapısından IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) Yardımcı T Hücre Alt Gruplarının Değerlendirilmesi

Periferik kanın uyaransız (bazal) ve uyaranlı tüplerde, 37°C %5CO_2 içeren etüv içerisinde 4 saatlik *in vitro* stimülasyonu sonrası hücre yüzey ve hücre içi boyama yöntemi uygulanmasının ardından CD45RO+ bellek T lenfosit kapısı seçilerek IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) yardımcı T hücre frekansları tespit edilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu ve hasta bireylerin hücre alt gruplarının yüzdeleri, anlamlılık değerinin tespit edilmesi amacıyla karşılaştırma yapılarak istatistiksel test yöntemleriyle değerlendirilmiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).

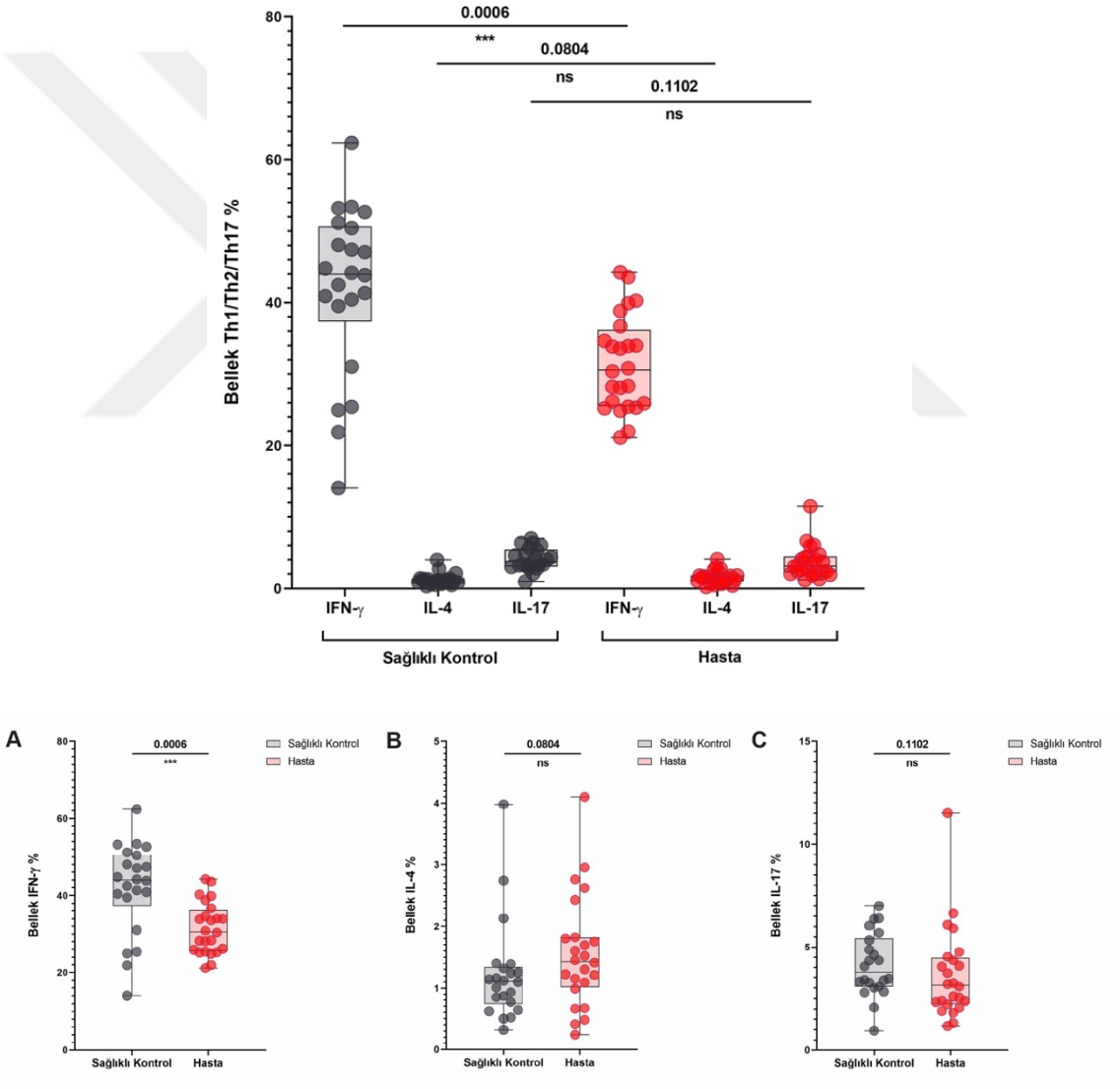


Şekil 4.20: Uyaransız (unstimulated) bellek T Helper hücre sitokin frekanslarının karşılaştırılması. A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasının ayrı ayrı gösterimi. Sağlıklı kontrol (n=22) ve hasta (n=24) gruplarında, uyaransız ölçülen bellek IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) sitokin frekansları gösterilmiştir. Veriler kutu grafiği (Ortalama±SD, Min-Max veya Medyan, IQR, Min-Max) olarak gösterilmiştir ve her bir nokta bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalar, Unpaired t testi ile veya Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. ns $p>0,05$; *$p<0,05$; ****$p<0,0001$.

(NOT: Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren IFN-γ gruplar arası karşılaştırmasında

parametrik Unpaired t-testi kullanılırken; normal dağılım göstermeyen IL-4, IL-17 ve diğer hücresel parametreler için non-parametrik Mann-Whitney U testi tercih edilmiştir.)

İstatistiksel analizler sonucunda, IFN-γ (Th1) ve IL-17 (Th17) frekansı hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0,0196 ve p=0,0005). Öte yandan IL-4 (Th2) frekansı incelendiğinde sağlıklı kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (p=0,3504).

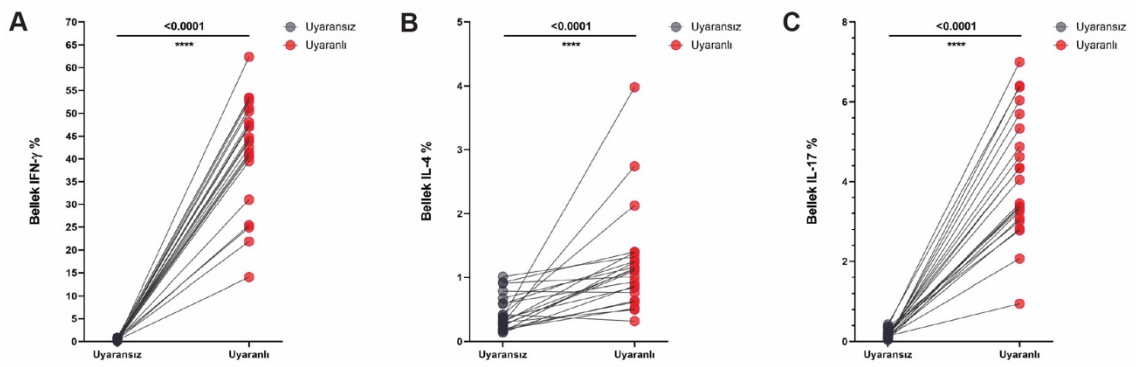


Şekil 4.21: Uyaranlı (stimulated) bellek T Helper hücre sitokin frekanslarının karşılaştırılması. A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının sağlıklı kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasının ayrı ayrı gösterimi. Sağlıklı kontrol (n=22) ve

piyelonefritli hasta (n=24) gruplarında, uyaran sonrası ölçülen bellek IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) frekansları gösterilmiştir. Veriler kutu grafiği (Ortalama±SD, Min-Max veya Medyan, IQR, Min-Max) olarak gösterilmiştir ve her bir nokta bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalar, Unpaired t testi ile veya Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. ns p>0,05; ***p<0,001.

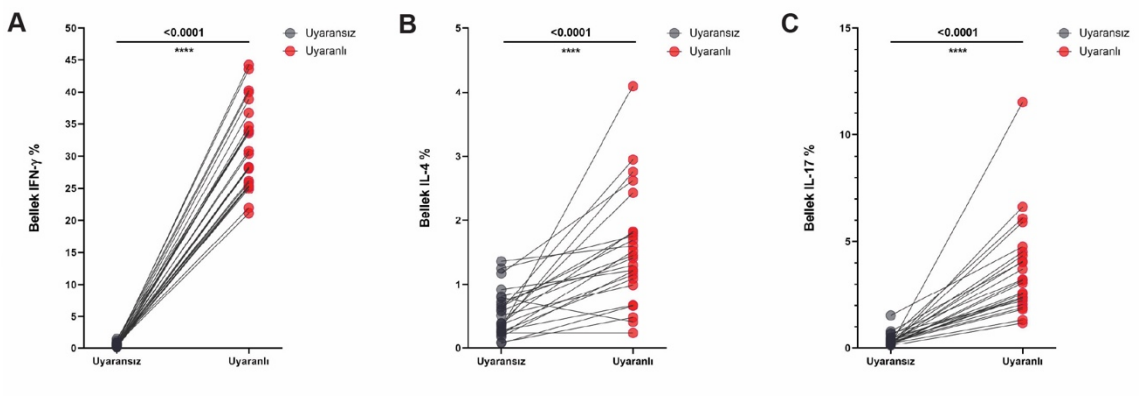
İstatistiksel analizler sonucunda uyarım sonrası, IFN-γ (Th1) frekansı sağlıklı kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,0006). Öte yandan IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) frekansı incelendiğinde sağlıklı kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (sırasıyla p=0,0804 ve p=0,1102).

Sağlıklı kontrol ve hasta grubu arasındaki uyaransız ve uyaranlı karşılaştırmalara ek olarak, hem sağlıklı kontrol hem de piyelonefrit tanılı hasta grubunda uyaransız-uyaranlı IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2) ve IL-17 (Th17) frekanslarının karşılaştırmaları gösterilmiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).



Şekil 4.22: Sağlıklı kontrol grubu uyaransız-uyaranlı A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının karşılaştırması. Sağlıklı kontrol grubunda (n=22) bellek T helper hücrelerinin uyarılmamış ve uyarılmış durumdaki sitokin üretim kapasiteleri, ölçülen uyarım öncesi-sonrası değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında paired t testi kullanılırken, normal dağılıma uymayan eşleşmiş grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Wilcoxon matched-pairs signed-rank test kullanılmıştır. ****p<0,0001.

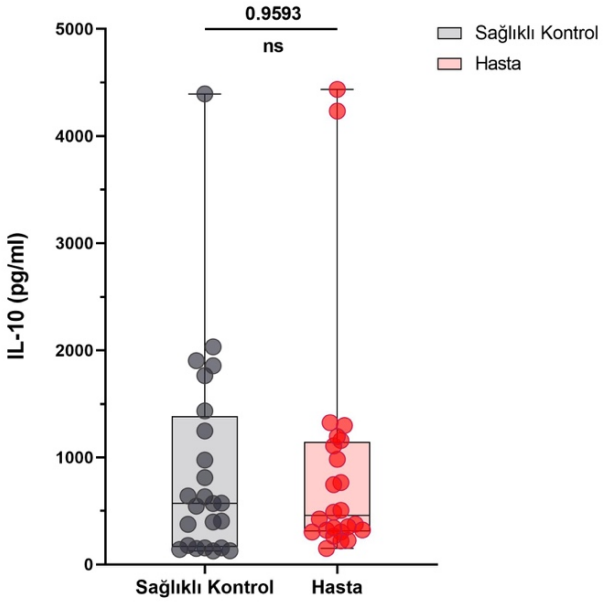
Sağlıklı kontrol grubunda uyaransız-uyaranlı IFN-γ, IL-4, IL-17 frekanslarının karşılaştırması incelendiğinde, uyaranlı IFN-γ, IL-4, IL-17 frekanslarında uyaransız frekanslara kıyasla anlamlı olarak artış tespit edilmiştir (sırasıyla p<0,0001, p<0,0001 ve p<0,0001).



Şekil 4.23: Hasta grubunda uyaransız-uyaranlı A) IFN-γ, B) IL-4 ve C) IL-17 frekanslarının karşılaştırması. Piyelonefrit tanılı hasta grubunda (n=24) bellek T helper hücrelerinin uyarılmamış ve uyarılmış durumdaki sitokin üretim kapasiteleri, ölçülen uyarım öncesi-sonrası değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında paired t testi kullanılırken, normal dağılıma uymayan eşleşmiş grupların karşılaştırılmasında non-parametrik Wilcoxon matched-pairs signed-rank test kullanılmıştır. ****p<0,0001.

Piyelonefrit tanılı hasta grubunda uyaransız-uyaranlı IFN-γ, IL-4, IL-17 frekanslarının karşılaştırması incelendiğinde, uyaranlı IFN-γ, IL-4, IL-17 frekanslarında uyaransız frekanslara kıyasla anlamlı olarak artış tespit edilmiştir (sırasıyla p<0,0001, p<0,0001 ve p<0,0001).

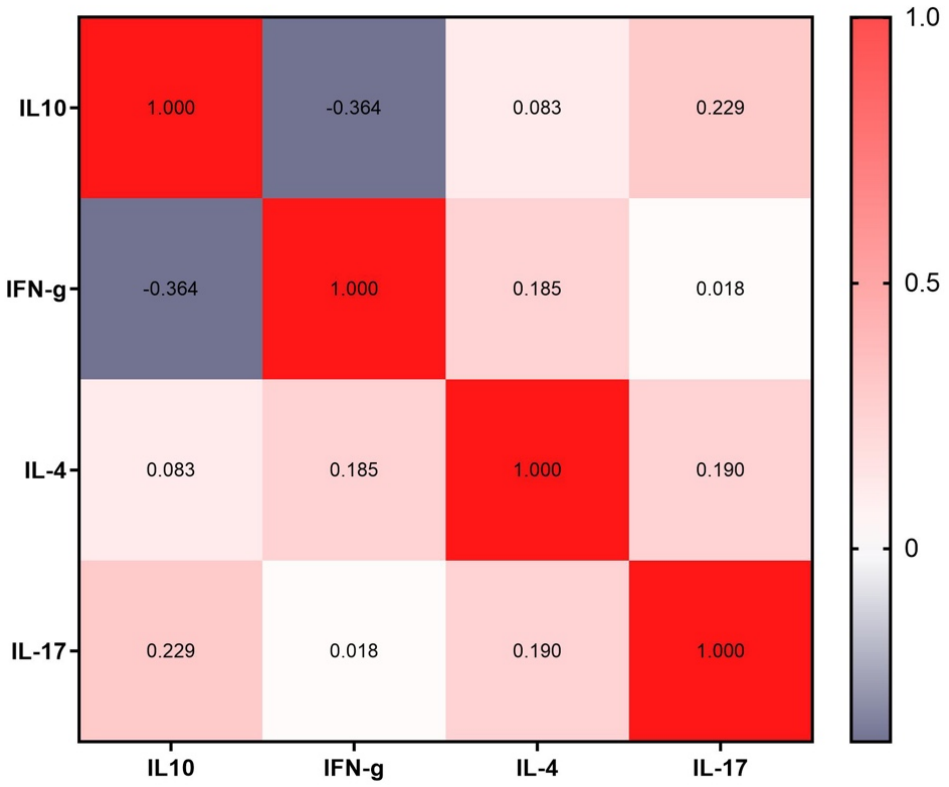
4.2.8. IL-10 Sitokin Konsantrasyon Ölçümünün Değerlendirilmesi



Şekil 4.24: Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında serum IL-10 konsantrasyonlarının karşılaştırılması. Sağlıklı kontrol (n=24) ve piyelonefritli hasta (n=24) gruplarından elde edilen serum örneklerinde IL-10 sitokin düzeyleri (pg/ml) karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Kutu grafikleri medyan, IQR ve minimum/maksimum değerlerini göstermektedir. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. ns $p>0,05$.

Hasta ve kontrol grupları arasında sistemik IL-10 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p = 0,9593$).

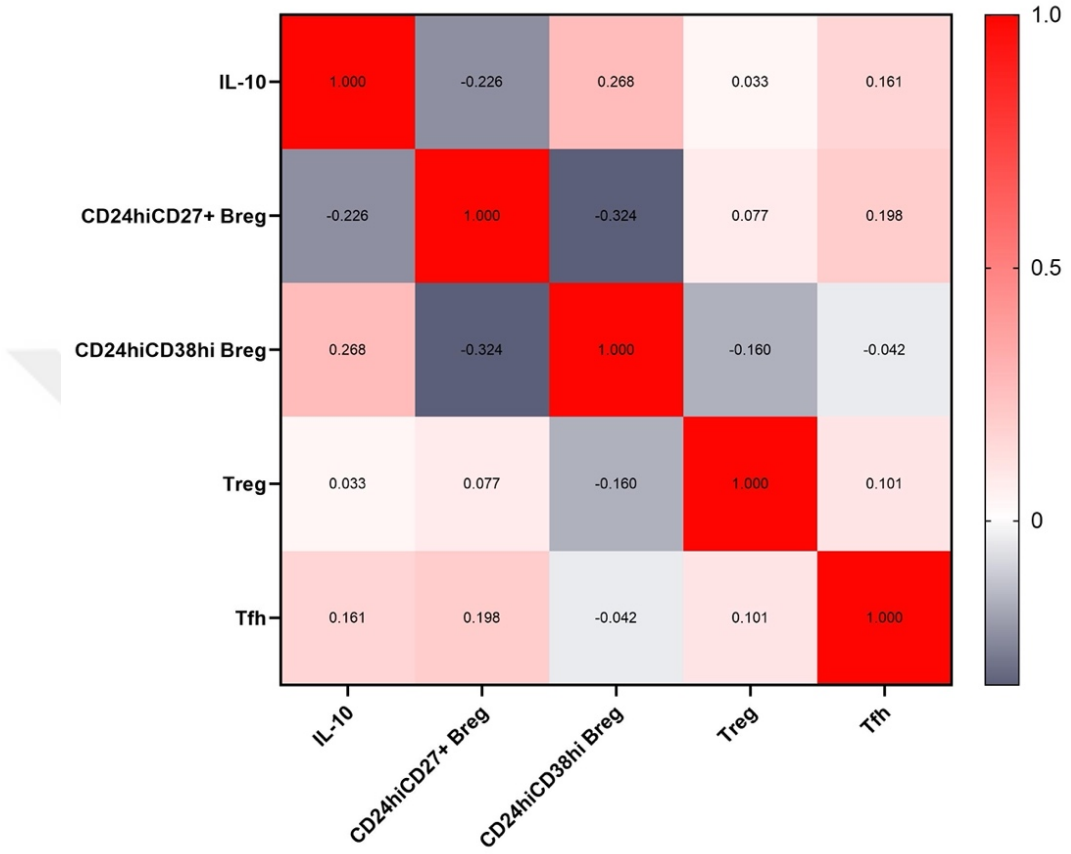
4.2.8.1. Uyarılmış IFN-γ, IL-4 ve IL-17 sitokin frekansları ve serum IL-10 düzeyleri arasındaki Spearman korelasyon matrisi:



Şekil 4.25: Serum IL-10 konsantrasyonları ile uyarılmış IFN-γ, IL-4 ve IL-17 sitokin frekansları arasındaki ilişkilerin Spearman korelasyon analizi ile gösterimi. Piyelonefrit tanılı hasta grubunda (n=23) serum IL-10 konsantrasyonları ile uyarılmış T helper hücrelerinden köken alan IFN-γ, IL-4 ve IL-17 sitokin frekansları arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Renk skalası, Spearman korelasyon katsayısını (r) temsil etmektedir; koyu kırmızı tonları güçlü pozitif korelasyonu, koyu gri tonları ise negatif korelasyonu simgelemektedir.

NOT: Hücre içindeki rakamlar hesaplanan r değerlerini göstermektedir. Köşegen üzerindeki değerlerin 1,00 olması, her parametrenin kendisiyle tam korelasyonunu (internal consistency) doğrulamaktadır.

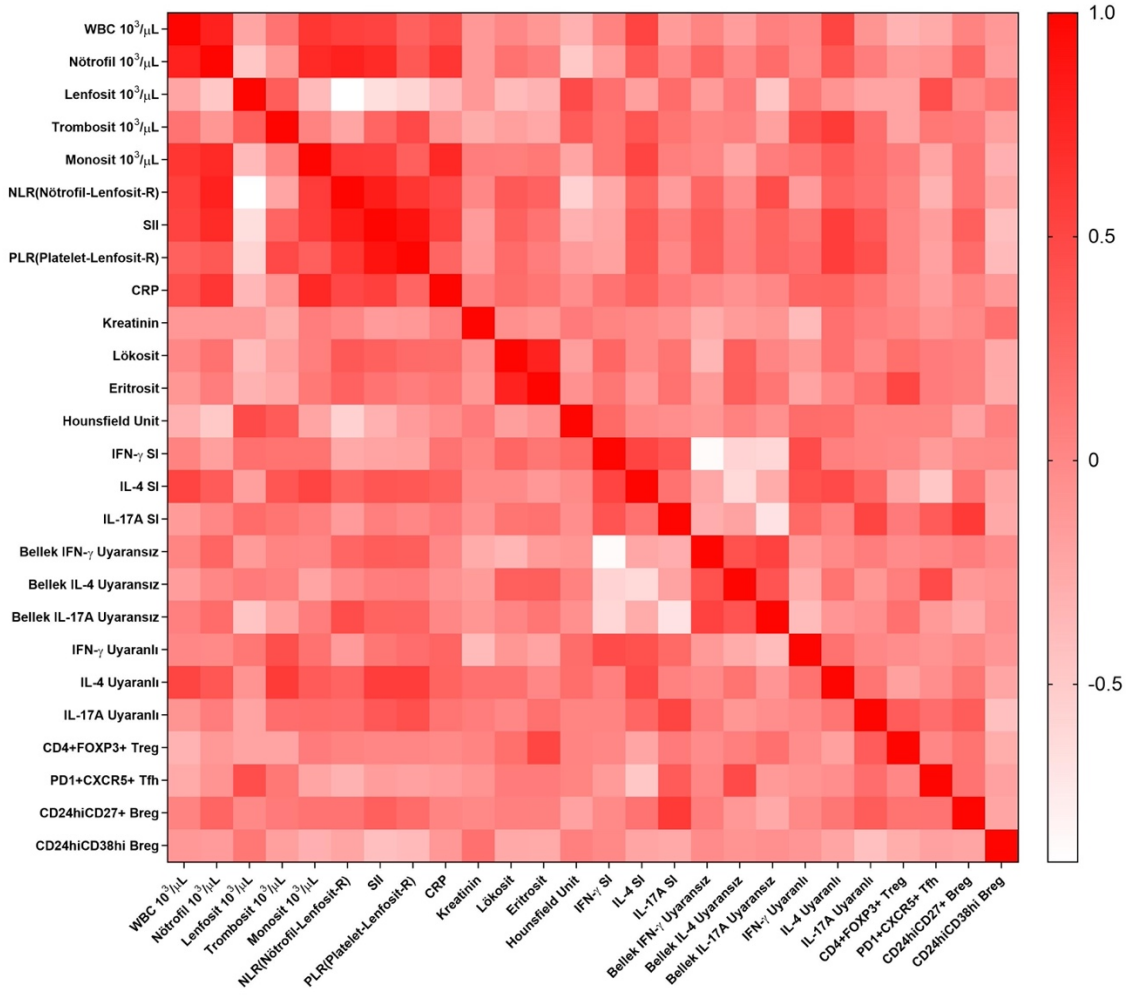
4.2.8.2. Regülatör hücre popülasyonları ve serum IL-10 düzeyleri arasındaki Spearman korelasyon matrisi:



Şekil 4.26: Serum IL-10 konsantrasyonları ile Breg, Treg ve Tfh hücre frekansları arasındaki ilişkilerin Spearman korelasyon analizi ile gösterimi. Piyelonefrit hastalarında (n=24) regülatör B hücre (Breg) alt grupları ($CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$), regülatör T (Treg) hücreleri ve T foliküler yardımcı (Tfh) hücre frekanslarının serum IL-10 konsantrasyonları ile olan ilişkisi Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Sağdaki renk skalası korelasyon katsayısını (r) temsil eder; kırmızı tonlar pozitif, gri tonlar ise negatif korelasyonu simgelemektedir.

NOT: Hücre içindeki rakamlar hesaplanan r değerlerini göstermektedir. Köşegen üzerindeki değerlerin 1,00 olması, her parametrenin kendisiyle tam korelasyonunu (internal consistency) doğrulamaktadır.

4.2.9. Piyelonefrit Hastalarında Klinik, İmmünolojik ve Hematolojik Parametrelerin Spearman Korelasyon Isı Haritası (Heatmap)



Şekil 4.27: Klinik laboratuvar verileri ile akan hücre ölçer analiz bulguları arasındaki çok değişkenli ilişkileri gösteren Spearman korelasyon matrisi. Piyelonefrit hastalarında (n=24) elde edilen klinik laboratuvar verileri (sistemik inflamasyon belirteçleri) ile *in vitro* akan hücre ölçer analiz bulguları (hücre frekansları, alt grup oranları ve stimülasyon indeksleri) arasındaki çok değişkenli ilişkileri gösteren Spearman korelasyon matrisi gösterilmektedir. Matristeki tüm kesişim noktaları, normal dağılım göstermeyen parametreler için uygun olan çok değişkenli Spearman korelasyon testi (non-parametrik) kullanılarak hesaplanmıştır. Sağdaki renk skalası korelasyon katsayısını (r) temsil eder; kırmızı tonlar pozitif, beyaz tonlar ise negatif korelasyonu simgelemektedir. *(CRP, C-*

Reaktif Protein; WBC, White Blood Cell; SI, Stimülasyon İndeksi; SII, Sistemik İmmün-İnflamasyon İndeksi)

Piyelonefrit tanılı hastalarda (n=24), doğal immün sistem yanıtını yansıtan hematolojik/sistemik inflamasyon belirteçleri, radyolojik veriler, lokal doku hasarı göstergeleri ve *in vitro* akan hücre ölçer bulguları (edinsel immünite hücre frekansları, sitokin reaktivite indeksleri) arasındaki dinamik ilişkileri belirlemek amacıyla kapsamlı bir Spearman korelasyon analizi yürütülmüştür. Elde edilen istatistiksel veriler, patofizyolojik fonksiyon gruplarına göre verilmiştir.

Sistemik İnflamasyon, Akut Faz Yanıtı ve Hücresel Hematoloji Dinamikleri: Akut enfeksiyon sürecindeki doğal immünite yükü incelendiğinde, periferik total lökosit (WBC) sayısının nötrofil (r=0,787, p<0,0001), monosit (r=0,627, p=0,001), NLR (r=0,548, p=0,006), SII (r=0,523, p=0,009) ve CRP (r=0,426, p=0,038) düzeyleri ile istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ve pozitif yönde korelasyonlar gösterdiği saptanmıştır. Benzer şekilde, nötrofil sayısının da monosit (r=0,720, p<0,0001), NLR (r=0,786, p<0,0001), SII (r=0,709, p=0,0001) ve CRP (r=0,625, p=0,001) ile güçlü pozitif yönde ilişkli olduğu saptanmıştır.

Sistemik inflamasyonun hücresel popülasyon üzerindeki yıkıcı etkisi, nötrofil ve lenfosit sayıları arasındaki belirgin ters orantı (r=-0,485, p=0,016) ile doğrulanmıştır. Buna paralel olarak lenfosit sayısındaki azalmanın (lenfopeni), birleşik inflamasyon indeksleri olan NLR (r=-0,897, p<0,0001), SII (r=-0,658, p=0,0004) ve PLR (r=-0,583, p=0,003) ile ileri derecede anlamlı negatif korelasyon ilişkisi gösterdiği belirlenmiştir. Trombosit sayısının ise PLR değerleri ile pozitif yönlü doğrusal bir ilişki kurduğu tespit edilmiştir (r=0,479, p=0,018).

Ayrıca birleşik indekslerin kendi aralarında ve CRP ile yüksek düzeyde korele olduğu saptanmıştır (NLR-SII: r=0,817, p<0,0001; NLR-PLR: r=0,627, p=0,001; NLR-CRP: r=0,487, p=0.,16; CRP-SII: r=0,545, p=0,006; SII-PLR: r=0,890, p<0,0001).

Doğal İmmünite Baskısı ve Edinsel Sitokin Reaktivitesi (SI) İlişkileri: Doğal immün sistem aktivasyon belirteçleri ile edinsel immünitenin sitokin polarizasyon kapasitesi karşılaştırıldığında, total WBC sayısının IL-4 SI (r=0,521, p=0,009) ve uyarılmış bellek IL-4 frekansı (r=0,513, p=0,010) ile anlamlı derecede pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Monosit sayılarının da benzer şekilde CRP (r=0,727,

p<0,0001) akut faz yanıtına paralel olarak IL-4 SI değerleriyle pozitif korelasyon sergilediği görülmüştür (r=0,517, p=0,009).

Birleşik sistemik indekslerden SII (r=0,561, p=0,004) ve PLR (r=0,566, p=0,004) seviyelerinin, aktivasyon sonrası uyarılmış bellek IL-4 frekansları ile doğrudan pozitif korelasyon içinde olduğu belirlenmiştir. PLR değerleri aynı zamanda uyarılmış bellek IL-17 frekansı ile de pozitif ilişki göstermiştir (r=0,430, p=0,036). Trombosit sayılarının ise uyarım sonrası elde edilen bellek IFN-γ+ (r=0,437, p=0,032) ve bellek IL-4+ (r=0,585, p=0,003) frekanslarıyla anlamlı pozitif yönde korelasyon gösterdiği bulunmuştur.

Buna karşın, periferik inflamasyonun kronik bir pro-inflamatuar zemini tetiklediği saptanmıştır. Azalan lenfosit sayısının (r=-0,459, p=0,024) ve artan NLR düzeylerinin (r=0,448, p=0,028) uyaransız (bazal) bellek IL-17+ frekanslarındaki yükseliş ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Sitokin Reaktivite İndekslerinin (SI) ve Bazal İnflamasyon Yükünün Karşılıklı Dinamikleri: Aktivasyon potansiyelini gösteren Stimülasyon İndeksleri incelendiğinde, IFN-γ SI ile IL-4 SI arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır (r=0,516, p=0,009). Her bir indeks, beklendiği üzere kendi uyarılmış hücresel sitokin profiliyle pozitif korelasyon göstermiştir (IFN-γ SI - uyarılmış IFN-γ SI: r=0,461, p=0,023; IL-4 SI - uyarılmış IL-4: r=0,472, p=0,0196; IL-17 SI - uyarılmış IL-17: r=0,509, p=0,011). Ayrıca IL-4 SI değerlerinin uyarılmış IFN-γ frekansıyla da pozitif yönde ilişkili olduğu bulunmuştur (r=0,417, p=0,042).

Ancak, hastaların *in vitro* uyarım öncesi taşıdıkları bazal (uyaransız) sitokin yükleri, reaktivite indeksleri üzerinde baskılayıcı bir ilişki ortaya koymuştur. IFN-γ SI değerlerinin, bazal bellek IL-4 (r=-0,574, p=0,003) ve bazal bellek IL-17A (r=-0,599, p=0,002) frekanslarıyla güçlü negatif korelasyonlar sergilediği görülmüştür. Bu ters orantı anomalisi, IL-17 SI ile bazal bellek IL-17 frekansı arasında ileri derecede anlamlı ve çok güçlü bir negatif ilişki oluşturmuştur (r=-0,682, p=0,0002). Uyaransız bellek T helper popülasyonunun kendi içinde ise bazal IFN-γ frekansının uyaransız IL-4 (r=0,423, p=0,030) ve uyaransız IL-17 (r=0,531, p=0,008) ile pozitif korelasyonlar sergilediği saptatmıştır.

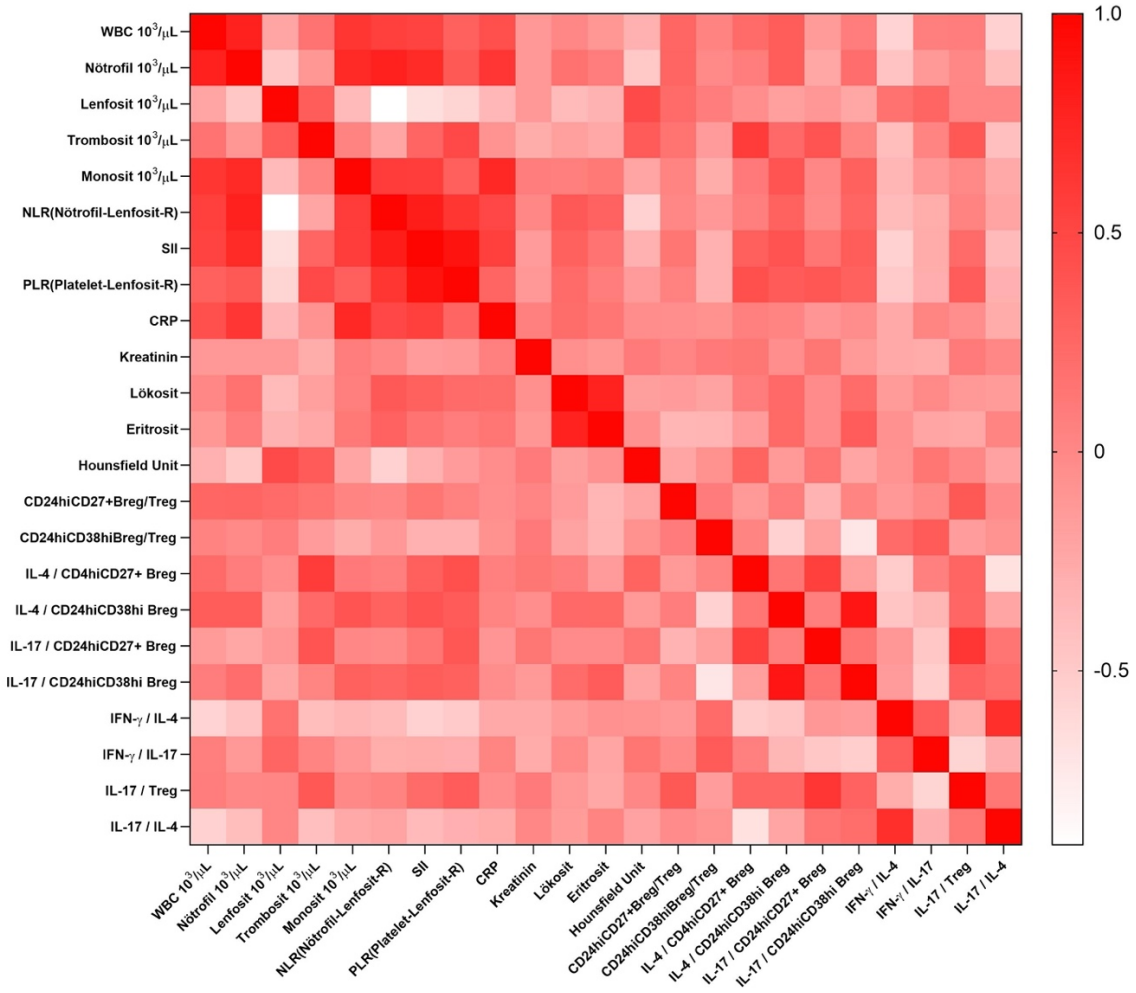
Edinsel Hücresel Ağlar: Tfh, Regülatör B (Breg) ve Regülatör T (Treg) Bağlantıları: Periferik lenfosit sayısının, foliküler helper T hücre (Tfh; $PD1^{+}CXCR5^{+}$) frekansı ile pozitif yönde korele olduğu görülmüştür (r=0,445, p=0,029). Bu hücresel

eksende, IL-4 SI reaktivitesinin (r=0,485, p=0,016) ve bazal bellek IL-4 frekansının (r=0,475, p=0,019) Tfh hücre frekanslarıyla anlamlı pozitif korelasyonlar içinde olduğu saptanmıştır.

Regülatör B hücre alt gruplarının sitokin ekseniyle olan ilişkilerinde iki zıt patern saptanmıştır. T hücrelerinin IL-17 SI reaktivite kapasitesi, bellek benzeri $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg frekanslarıyla güçlü pozitif korelasyon gösterirken (r=0,590, p=0,002), aktivasyon sonrası uyarılmış total IL-17 sitokin üretimi, geçişsel $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg frekanslarıyla anlamlı düzeyde negatif yönde korelasyon göstermiştir (r=-0,428, p=0,037).

Radyolojik ve Lokal Doku Hasarı Korelasyonları: Tomografik doku/taş yoğunluğu parametresi olan Hounsfield Unit (HU) değerlerinin, nötrofil sayısı (r=-0,492, p=0,015) ve NLR (r=-0,561, p=0,004) ile anlamlı negatif, lenfosit sayısı ile ise pozitif (r=0,462, p=0,023) yönde korele olduğu saptanmıştır. Son olarak, lokal idrar analizlerinde lökosit ve eritrosit yüklerinin birbiriyle yüksek düzeyde ilişkili olduğu görülmüş (r=0,776, p<0,0001), idrardaki eritrosit (hematüri) miktarının, periferik edinsel immünitenin klasik regülatör bileşeni olan $CD4^{+}FOXP3^{+}$ Treg hücre frekansı ile anlamlı pozitif korelasyon sergilediği tespit edilmiştir (r=0,499, p=0,013).

4.2.10. Periferik İnflamasyon Belirteçleri ve Edinsel İmmünite Sitokin Oranları Arasındaki Korelasyon Analizleri



Şekil 4.28: Klinik laboratuvar verileri ile akan hücre ölçer analiz bulguları (T helper sitokin polarizasyon oranları) arasındaki çok değişkenli ilişkileri gösteren Spearman korelasyon matrisi. Piyelonefrit hastalarında (n=24) elde edilen klinik laboratuvar verileri (sistemik inflamasyon belirteçleri) ile *in vitro* akan hücre ölçer analiz bulguları (T helper sitokin polarizasyon oranları) arasındaki çok değişkenli ilişkileri gösteren Spearman korelasyon matrisi gösterilmektedir. Matristeki tüm kesişim noktaları, normal dağılım göstermeyen parametreler için uygun olan çok değişkenli Spearman korelasyon testi kullanılarak hesaplanmıştır. Sağdaki renk skalası korelasyon katsayısını (r) temsil eder; kırmızı tonlar pozitif, beyaz tonlar ise negatif korelasyonu simgelemektedir. *(CRP, C-*

Reaktif Protein; WBC, White Blood Cell; SI, Stimülasyon İndeksi; SII, Sistemik İmmün-İnflamasyon İndeksi)

Piyelonefritli hastalarda, doğal immünite kaynaklı sistemik inflamasyon şiddeti ile edinsel immünite popülasyonundaki hücresel sitokin polarizasyon oranları (IFN-γ/IL-4, IL-17/IL-4, IFN-γ/IL-17) ve regülatör/efektör sitokin indeksleri arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Sistemik İnflamasyon Baskısı ve Th2 (IL-4) Polarizasyonu: Doğal immünite aktivasyon parametreleri ile edinsel immünite sitokin dengeleri kıyaslandığında; total lökosit (WBC) sayısının IFN-γ/IL-4 (r=-0,571, p=0,003) ve IL-17/IL-4 (r=-0,551, p=0,005) oranları ile ileri derecede anlamlı negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Benzer şekilde, nötrofil sayısının da IFN-γ/IL-4 oranı ile anlamlı bir ters orantı içinde olduğu bulunmuştur (r=-0,449, p=0,027).

Birleşik sistemik inflamasyon indekslerinden SII (r=-0,557, p=0,004) ve PLR (r=-0,497, p=0,013) düzeylerinin, edinsel immünitenin pro-inflamatuar/anti-inflamatuar dengesini gösteren IFN-γ/IL-4 oranı ile güçlü negatif korelasyonlar gösterdiği tespit edilmiştir.

Trombositler ve Regülatör B Hücre (Breg) Sitokin Dinamikleri: Dolaşımdaki trombosit sayısının, sistemik inflamasyon indeksi PLR ile pozitif doğrusal ilişki göstermesinin yanı sıra (r=0,480, p=0,017), $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ bellek benzeri Breg hücrelerinin popülasyon düzeyindeki anti-inflamatuar (IL-4) fonksiyonel kapasitesini yansıtan IL-4/$CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranı ile güçlü bir pozitif korelasyon kurduğu saptanmıştır (r=0,581, p=0,002). Öte yandan trombosit sayısının, total edinsel havuzdaki IL-17/IL-4 oranı ile negatif yönde korele olduğu saptanmıştır (r=-0,416, p=0,043).

Regülatör B Hücre Popülasyonları ile Edinsel Sitokin Polarizasyon Oranları Arasındaki İlişkiler: Edinsel immün sisteminin Breg popülasyonu ile T helper sitokin polarizasyon dengeleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde, bellek benzeri Breg frekansına oranla total T helper havuzundaki Th2 (IL-4) ağırlığını yansıtan IL-4/ $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg indeksinin, yine aynı regülatör popülasyona oranla pro-inflamatuar Th17 odağını gösteren IL-17/$CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg indeksi ile pozitif yönde güçlü bir korelasyon sergilediği saptanmıştır (r=0,546, p=0,005).

Ancak, bellek benzeri Breg havuzundaki kayba sekonder olarak tırmanan bu Th2/Breg polarizasyon indeksi (IL-4/CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+} Breg), total T helper popülasyonundaki genel pro-inflamatuar polarizasyon göstergeleri olan IFN-γ/IL-4 (r=-0,512, p=0,010) ve özellikle IL-17/IL-4 (r=-0,672, p=0,0003) oranları ile ileri derecede anlamlı negatif korelasyonlar göstermiştir.

Benzer bir kinetik geçişsel Breg popülasyonunda da saptanmıştır. IL-4/CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi} Breg indeksi ile IL-17/CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi} Breg indeksi arasında ileri derecede anlamlı ve çok güçlü bir pozitif korelasyon saptanırken (r=0,865, p<0,0001), T helper havuzundaki Th2 ağırlığının geçişsel Breg frekansına olan bu üstünlüğü, genel IFN-γ/IL-4 oranını anlamlı derecede negatif yönde etkilemiştir (r=-0,459, p=0,024).

Son olarak, total edinsel sitokin polarizasyon indekslerinin kendi aralarındaki ilişkilerde IFN-γ/IL-4 oranının IL-17/IL-4 oranı ile güçlü bir pozitif korelasyon kurduğu (r=0,681, p=0,0003), IFN-γ/IL-17 oranının ise IL-17/Treg oranı ile anlamlı derecede negatif yönde korelasyon gösterdiği (r=-0,583, p=0,00) saptanmıştır. Ayrıca IL-17/ CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+} Breg oranı ile IL-17/Treg oranı arasında anlamlı pozitif bir ilişki saptanmıştır (r=0,626, p=0,001).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, böbrek taşı ile ilişkili piyelonefrit tanılı hastalarında edinsel immün yanıtın temel bileşenleri olan yardımcı T hücre alt grupları (Th1, Th2, Th17), düzenleyici T hücreleri (Treg), T foliküler yardımcı hücreler (Tfh) ve düzenleyici B hücreleri (Breg) akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hasta grubunun demografik özellikleri incelendiğinde, bireylerin büyük çoğunluğunun erkek olduğu (%72) ve yaş ortalamasının ise 49,48 yıl olduğu saptanmıştır. Bu yaş ortalaması taş hastalığının en sık izlendiği aktif çalışma ve üretim çağındaki bireyleri kapsamaktadır. Erkeklerde taş sıklığının 60-80 yaşları arasında zirve yaptığı bildirilse de akut obstrüktif komplikasyonların daha genç yaşlarda da sıkça acil servislere başvuru nedeni olduğu bilinmektedir. Literatürde ürolitiyazis genellikle erkeklerde kadınlara oranla 2:1 oranında daha sık görülmektedir ve vakaların çoğu 20-50 yaş arasındadır. Bu veriler, çalışmamızdaki demografik dağılımın taş hastalığı epidemiyolojisiyle uyumlu olduğunu göstermektedir (134–136).

Çalışmada yer alan hastaların ortalama VKİ değerinin 27,72 ± 5,13 kg/m^2 olması popülasyonun genel olarak ‘fazla kilolu’ kategorisinde yer aldığını teyit etmektedir. VKİ değeri böbrek taşı bulunan piyelonefrit hastalarında önemli bir etken kabul edilebilir. Literatür, yüksek VKİ değerlerinin idrar pH’ını düşürerek ürik asit taşlarına zemin hazırladığını, aynı zamanda hiperinsülinemi yoluyla kalsiyum atılımını artırarak kalsiyum oksalat taşlarının oluşumunu tetiklediğini vurgulamaktadır. Ayrıca, obezite ile ilişkili kronik düşük dereceli inflamasyonun, üriner sistemin enfeksiyonlara karşı direncini azaltabileceği ve piyelonefrit komplikasyonunu daha olası hale getirebileceği düşünülmektedir (134,135).

Semptom gösterme süresinin ortalama 8,04 gün olması, hastaların çoğunlukla ‘akut-subakut’ bir evrede sağlık kuruluşuna başvurduğunu göstermektedir. Bu süre zarfında tıkanıklığın devam etmesi, böbrek parankiminde geri dönüşümsüz hasarların başlaması için yeterli bir süredir ve hastaların profesyonel yardıma başvurmadan önce ciddi bir ağrı süreci geçirdiklerini düşündürmektedir.

Klinik olarak hastaların %76'sında renal kolik (yan ağrısı), %44'ünde dizüri (idrar yaparken ağrı/yanma) ve %16'sında yüksek ateş saptanmıştır. Literatür, ani başlayan yan ağrısının taş obstrüksiyonunun temel belirtisi olduğunu, ancak ateş ve lökositoz varlığının tabloyu komplike hale getirerek obstrüktif piyelonefrit veya pyonefroz riskine işaret ettiğini vurgular (136).

Renal kolik, klasik olarak idrar akışının akut obstrüksiyonu sonucu ortaya çıkar (çoğunlukla bir üreter taşı nedeniyle) ve taşın lokalizasyonuna bağlı olarak yayılım gösterebilen şiddetli yan ağrısına neden olur; buna sıklıkla otonom semptomlar da (örneğin bulantı/kusma vb) eşlik eder (137,138). Ağrının mekanizması genellikle intralüminal basınç artışı, üreter düz kas kontraksiyonu ve inflamatuvar mediatörlerin nosiseptörleri duyarlı hale getirmesine bağlanmaktadır (139). Üriner taş hastalığı üriner enfeksiyonlarla birlikte bulunabileceğinden, nefrolitiyazis aynı zamanda İYE ve piyelonefrit gelişebilen bir durum olarak da tanımlanmaktadır; bu durum özellikle kronik veya komplike taş hastalıklarında (örneğin staghorn taşları ya da uzun süredir devam eden nefrokalsinozis) komplikasyon olarak görülebilir (140–143). Bu hastalarda renal kolik semptomları ile sistemik enfeksiyon bulgularının eş zamanlı bulunması klinik ve çalışmamız açısından önemlidir; çünkü bu durum enfekte ve obstrükte bir toplayıcı sistemi düşündürür.

Kliniğe başvuran hastaların neredeyse yarısında (%44) dizüri şikâyeti bildirilmiştir. Dizüri klasik olarak alt üriner sistem irritatif bir semptomdur ve sistit için tipik kabul edilir; semptom örüntüleri genellikle sistiti (dizüri, sık idrara çıkma, aciliyet, hematüri) piyelonefritten ayırt etmeye yardımcı olabilir. Ancak taş ile ilişkili hastalıkta klinik tablo çoğu zaman üst ve alt üriner sistem süreçlerinin iç içe geçtiği bir görünüm sergiler ve dizüri taş üreterin alt kısımlarına inerse veya mesaneye yakınsa daha sık görülebilir. Bu nedenle dizüri şikâyeti klinik olarak taş ve piyelonefrit varlığında değişkendir; bulunabilir ya da hiç olmayabilir (144–146).

Çalışmamıza katılan hastalarda sadece 4 (16%) hastada yüksek ateş olduğu kaydedilmiştir. Akut piyelonefrit şüphesi olan ve böbrek taşı bulunan hastalarda düşük dereceli ateşin ya da ateş olmamasının ciddi enfeksiyonu dışlamadığı vurgulanmaktadır. Piyelonefrit ateşsiz veya hafif ateşle seyredebilir; ayrıca taş hastalığı obstrüksiyon, apse ve destrüktif enfeksiyonlar gibi ciddi komplikasyonlarla ilişkili olabilir. Literatürde, yalnızca vücut sıcaklığının üst üriner sistem

enfeksiyonunu veya ağır hastalığı dışlamak için yeterli olmadığı gösterilmiştir (147–149). Çalışmalar ateşi farklı şekillerde tanımlasa da, piyelonefrit tanısı esas olarak klinik değerlendirmeye dayanır. Özellikle doğrulanmış bazı piyelonefrit olgularında hastaların ateşsiz başvurabildiği ve buna rağmen ciddi morbidite gelişebildiği bildirilmiştir. Bu nedenle böbrek taşı olan hastalarda düşük ateş veya ateş olmaması güven verici kabul edilmemeli; diğer klinik bulgular varsa dikkatli değerlendirme yapılmalıdır (147,150).

Literatürde, üriner sistem taş hastalığı olan bireylerde yaşam boyu nüks (rekürrens) oranlarının %50'lere kadar ulaştığı bilinmektedir (151). Çalışmamızda bulgulanan yüksek taş öyküsü oranı, bu hastaların metabolik veya anatomik olarak taş oluşumuna yatkınlığının devam ettiğini göstermektedir. Bilinen taş öyküsüne sahip hastalarda, üreaz üreten bakterilerin (örneğin Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae) varlığı durumunda enfeksiyon taşlarının (struvit) oluşumu hızlanmakta ve bu durum enfeksiyon ile taş oluşumu arasında kısır bir döngü yaratmaktadır (152). Hastalarımızın %76'sında renal kolik tablosunun ve %92'sinde taşın üreter lokasyonlu olmasının eşlik ettiği obstrüksiyon bulguları (hidronefroz), kronik taş hastalarında akut enfeksiyon alevlenmelerinin ne kadar hızlı gelişebileceğini destekler niteliktedir.

Daha da önemlisi, hastaların %40'ının geçmişte en az bir kez cerrahi müdahale (geçirilmiş taş operasyonu) almış olmasıdır. Ürolojik operasyonlar (perkütan nefrolitotomi, üreteroskopi vb.), üriner sistemin anatomik bütünlüğünde minimal de olsa değişikliklere, mukozal hasarlara veya üreteral striktürlere (darlıklara) yol açabilmektedir. Bu anatomik ve histolojik modifikasyonlar, bakterilerin ürotelyuma tutunmasını (adezyonunu) kolaylaştırarak kronik bakteriyel kolonizasyona ve dolayısıyla piyelonefrit riskinde artışa neden olmaktadır (153,154).

Çalışmamızda hastaların inflamatuar markerlarından CRP (ortalama: 63,21 ± 74,44 mg/L) , yüksek mutlak nötrofil (%84) ve yüksek WBC (%68) seviyeleri, taş öyküsü ve geçirilmiş operasyon zemininde gelişen obstrüksiyonun, konakta nasıl güçlü bir sistemik inflamatuar yanıt tetiklediğini doğrulamaktadır.

C-Reaktif Protein (CRP), akut faz reaksiyonları sırasında karaciğerden sentezlenen ve sistemik inflamasyon ile enfeksiyonların takibinde yaygın olarak kullanılan hassas bir biyobelirteçtir. Literatürde, üst üriner sistem enfeksiyonları ve piyelonefrit tablolarında CRP seviyelerinin belirgin şekilde yükseldiği bilinmektedir

(155,156). Çalışmamızda, klinikte değerlendirilen hastaların ortalama CRP değerinin 63,21±74,44 mg/L olduğu ve en yüksek CRP değerinin 287 mg/L gibi oldukça uç bir seviyeye ulaştığı kaydedilmiştir (Bulgular, Tablo 4.5). Bu belirgin artış, böbrek taşının neden olduğu obstrüksiyona (tıkanıklığa) eşlik eden akut bakteriyel piyelonefritin yarattığı şiddetli doku hasarını ve sistemik inflamatuvar yanıtı yansıtmaktadır. Yüksek CRP seviyeleri, hastaların klinik tablosunun ciddiyetini ortaya koymada ve tedaviye verilen yanıtın monitorizasyonunda kritik bir klinik öneme sahiptir. Ancak yüksek CRP seviyesi tanı koymada tek başına belirleyici bir faktör olarak kabul edilemez.

Çalışmaya dahil edilen hastaların tamamına yakınında (84%) nötrofil yüksek bulunmuştur. Akut piyelonefritte renal parankimin bakteriyel invazyonu veya böbrek taşının idrar yollarında yarattığı tıkanıklık (obstrüksiyon), idrar retansiyonuna ve bakterilerin (genellikle E. coli, Proteus mirabilis, Klebsiella) yukarı doğru tırmanmasına zemin hazırlar. Bakteriyel endotoksinler ve doku hasarı, kemokin ve sitokin salınımını (özellikle IL-1, IL-6 ve TNF-α) tetikleyerek kemotaksis yoluyla nötrofillerin hızla enfeksiyon odağına (böbrek parankimine) göç etmesine ve kemik iliğinden lökosit salınımının artmasına neden olur. Bu durum klinikte belirgin bir lökositoz ve nötrofil hakimiyeti olarak kendini gösterir (99). Taş obstrüksiyonunun eşlik ettiği olgularda, üriner sistem içi basınç artışı bakterilerin ve endotoksinlerin kana geçişini (bakteriyemi/endotoksemi) kolaylaştırarak bu yanıtı daha da derinleştirir. WBC değerleri de hastaların %68'inde normal referans aralığının üzerinde saptanmıştır. Barut ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, üreter taşı olan hastalarda akut piyelonefrit gelişen grubun medyan WBC değerleri, alt üriner sistem enfeksiyonu olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (157). Yapılan başka bir çalışmada en yüksek ortalama WBC değeri, *Pseudomonas spp.* kaynaklı enfeksiyonlarda (16.406/mm³) görülmüştür. Bunu *Proteus spp*. (15.730/mm³) ve *Klebsiella spp.* (14.998/mm³) vakaları izlemektedir (158). Çalışmamızdaki WBC ve nötrofil değeri yükseklikleri, idrar kültürleri negatif gelse dahi, böbrek içindeki şiddetli bir enfeksiyonu (pyonefroz/obstrüktif piyelonefrit) işaret eden ve acil müdahale gerektiren bir durumu yansıtmaktadır.

Adını BT tarayıcısını icat eden Sir Godfrey Hounsfield'den alan Hounsfield Ünitesi (HU), bilgisayarlı tomografi (BT) taramalarında doku yoğunluğunu tespit

etmek için kullanılan standart bir ölçüm ölçeğidir. Vücuttaki dokular ve çeşitli maddelerin farklı yoğunluk araları ve HU değerleri vardır. Klinikte HU değerleri doku türlerinin ayırt edilmesine, tıbbi görüntülerin yorumlanmasına ve hastalıkların izlemesine yardımcı olur. Özellikle ürolojide taş türünün (sertliği, yoğunluğu ve mineral yapısının) öngörülmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılır (159). Bu zamana kadar yapılan değerlendirmelere göre genellikle <1000 HU sahip taşlar yumuşak/orta sert yoğunluklu taşlar olarak kabul edilir şok dalgaları (ESWL tedavisi) ile kolayca kırılması beklenir. Özellikle ürik asit, sistin, struvit (enfeksiyon taşları) gibi taşlar bu grupta yer alır. >1000 HU ve özellikle 1200 HU üzerindeki taşlar sert taşlar olarak kabul edilir ve şok dalgalarına karşı oldukça dirençlidir. Bu taşlar için ESWL yerine doğrudan cerrahi alternatifler düşünülür. Kalsiyum oksalat monohidrat gibi taşlar bu grupta değerlendirilir (160,161). Bu bağlamda çalışmamıza dahil edilen bütün hastalar (100%) böbrek taşına sahip olduğu için HU değerleri çalışmamız açısından da kritik öneme sahiptir. HU ölçeklendirmesine göre en küçük değer 330 HU iken, en büyük değer 1800 HU bulunmuştur. Çalışma grubumuzdaki ortalama değerin 1178,08 ± 416,17 olması taşların çoğunlukla sert ve mineralize yapıda olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu taşların enfeksiyonla birlikteliği, yüzeylerine bakterilerin daha kolay tutunabildiği biofilm tabakalarının oluşumuyla ilişkili olabilir ve bu durumun obstrüktif piyelonefrit tablosunu derinleştirerek acil klinik müdahale gereksinimini arttırdığı düşünülmektedir. Çalışmadaki hastaların %92'sinde taşın üreterde yerleşmiş olması da dikkat çekicidir. Üreterdeki bir taş, böbrek içindeki bir taşa göre çok daha hızlı bir şekilde tam obstrüksiyona ve buna bağlı olarak intrapelvik basınç artışına neden olur. Basınç artışı, idrarın böbrek parankimine geri sızmasına (piyelotubüler, piyelovenöz ve piyelolenfatik reflü) yol açarak bakterilerin sistemik dolaşıma karışmasını kolaylaştırabilir.

Hidronefroz, idrar yollarındaki bir tıkanıklık ya da geriye kaçış (reflü) nedeniyle böbrek pelvisi ve kalikslerinin idrarla dolarak genişlemesi (dilatasyonu) durumudur. Zamanında müdahale edilmediğinde artan intrapelvik basınç böbrek parankiminde atrofiye ve fonksiyon kaybına yol açabilir. Bu nedenle hidronefroz derecelerinin tespiti, taşın yarattığı obstrüksiyonun şiddetini, gelişebilecek enfeksiyonun ciddiyetini ve cerrahi müdahale aciliyetini belirleyen en kritik radyolojik parametrelerden biridir. Onen derecelendirme sistemine göre çalışmamıza katılan hastaların %40'ında Derece 2, %12'sinde Derece 3 ve %4'ünde Derece 4 hidronefroz saptanmıştır. Derece 2 en sık görülen gruptur. Pelvis ve kalikslerde belirgin genişleme mevcuttur. Bu evre, tıkanıklığın

böbrek dokusu üzerinde ciddi bir basınç oluşturmaya başladığı kritik bir aşamadır. Derece 3 ve 4 hastaları yüksek dereceli hidronefroz grubundadır. Derece 3'te parankim incelmesi başlarken, Derece 4 bag kidney (torba böbrek) olarak adlandırılan ve parankimin ciddi şekilde atrofiye uğradığı son evreyi temsil eder. Çalışmamızdaki hastaların büyük çoğunluğunda Derece 2 ve üzeri hidronefroz olması; taşın idrar akışını ciddi şekilde engellediğini, toplayıcı sistemde belirgin genişlemeyi ve böbrek içi basıncın arttığını gösterir. Ayrıca hastalığın böbrek dokusuna zarar verebileceği 'orta-ağır' bir evrede teşhis edildiğini ve enfeksiyon kontrolünün yanı sıra acil dekompresyonun fonksiyonların korunması için hayati olduğunu göstermektedir. Literatürde, hidronefrozun varlığı piyelonefrit seyrini zorlaştıran bir faktör olarak kabul edilir ve sepsise ilerleme riskini artırır (162).

Bregler, salgıladıkları anti-inflamatuar sitokinler (özellikle IL-10, TGF-β ve IL-35) ve yüzey molekülleri aracılığıyla aşırı immün yanıtların baskılanmasında, otoimmün hastalıkların kontrol altına alınmasında, immün toleransın sürdürülmesinde ve doku hasarının önlenmesinde kritik role sahip bir B hücresi alt grubudur (70,163). Çalışmamızda dolaşımda bulunan ve özellikle IL-10 sitokini salgılayarak immün yanıtları baskılayan iki farklı Breg hücre alt grubunun hücre yüzey belirteçleri ile incelenmesi amaçlanmıştır. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda, böbrek taşı ilişkili piyelonefrit tanısı alan hasta grubunda hem $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ hem de $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ hücre frekanslarının, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.3, p=0,0035 ve p=0,0022).

Breg ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle otoimmün hastalıklar üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan bir çalışmada, Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) veya Romatoid Artrit (RA) gibi otoimmün ve kronik inflamatuar hastalıklarda da periferik kandaki $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücrelerinin azaldığı ve bu azalışın hastalık aktivitesiyle (şiddetiyle) ters korelasyon gösterdiği literatürde sıkça rapor edilmektedir (132). Sepsis hastalarıyla yapılan başka bir çalışmada sistemik enfeksiyona karşı vücudun kontrolsüz ve aşırı bir inflamatuar yanıt (sitokin fırtınası) vermesi durumunda, benzer şekilde periferik kandaki $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre oranlarında çok belirgin bir düşüş saptanmıştır. Bu azalma, vücudun yıkıcı inflamasyonu frenleme mekanizmasının çöktüğünü gösterir ve yüksek mortalite

oranıyla doğrudan ilişkilidir (164). Aktif romatoid artrit hastalarının dahil edildiği diğer bir çalışmada $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg frekansında azalma saptanmıştır. Hücrelerin azalması, eklemlerdeki Th1 ve Th17 kaynaklı inflamatuar hasarın (sinovit) kontrolsüz şekilde ilerleyebileceğini, otoreaktif yanıtların ve inflamasyonun gelişebileceğini göstermektedir (129). Çalışmalardan elde edilen bu çıkarımlar, üriner sistem enfeksiyonları ve buna eşlik eden taş patolojisi süreçlerinde de regülatör immün mekanizmaların zayıfladığına veya yön değiştirdiğine işaret etmektedir.

Piyelonefrit hastalarında her iki baskılayıcı hücre popülasyonunun periferik kan frekansındaki bu belirgin düşüş, bazı temel immünolojik mekanizmaları düşündürmektedir. İlk olası mekanizma, hücresel kemotaksis ve lokal infiltrasyonu akla getirmektedir. Periferik kandaki sayısal azalma, sistemik bir hücre kaybından ziyade, enfeksiyon ve taş mekanik irritasyonunun tetiklediği böbrek dokusuna (mikroçevresine) doğru gerçekleşen selektif bir hücresel göçün (kemotaksis) yansıması olabileceğidir. Enfeksiyon odağından salgılanan inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin (örn. CXCL12/SDF-1 ve CXCL13) etkisiyle Breg hücreleri, lokal doku hasarını sınırlamak üzere periferik kandan böbrek parankimine doğru infiltre olmuş olabilir. İkincisi ise immün tükenmişlik ve apoptozdur. UPEC gibi üropatojenik ajanların ve mikroçevredeki yoğun pro-inflamatuar sinyallerin neden olduğu kronik veya şiddetli stimülasyon, Breg hücrelerinde hücresel tükenmişliğe ve hızlandırılmış apoptoza yol açarak dolaşımdaki hücre havuzunu daraltmış olabilir. Diğer bir olası mekanizma ise, B hücreleri çevrelerindeki sitokin mikrodinamiklerine karşı oldukça esnek (plastisiteye sahip) hücrelerdir. Normal şartlarda IL-10 salgılayarak anti-inflamatuar rol oynayan Breg hücreleri, piyelonefrit veya sepsis gibi çok yoğun pro-inflamatuar sinyallerin varlığında baskılayıcı özelliklerini kaybedebilirler. Bu hücreler regülatör fenotiplerini (down-regülasyon ile CD24, CD27 veya CD38 ekspresyonlarını azaltarak) kaybedebilir ve inflamasyonu körükleyen, pro-inflamatuar sitokinler (IL-6, TNF-α gibi) salgılayan efektör B hücrelerine dönüşebilirler. Bu durum fenotipik olarak Breg sayısının azalması olarak yansır. Heinemann ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada, sağlıklı kontroller ile SLE hastaları karşılaştırıldığında, dolaşımdaki $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücre yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. *In vitro* ortamda CpG, PMA ve ionomycin ile uyarılma sonrasında hücre içi IL-10(+) üreten işlevsel Breg yüzdelerinin ise SLE hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede

azaldığı saptanmıştır. Bu fonksiyonel azalmanın (IL-10 üretim yetersizliğinin), SLE hastaları arasında özellikle Lupus Nefriti (LN) gelişen grupta çok daha belirgin olduğu görülmüştür ve bu durumun hastalarda immünoregülatör (baskılayıcı) fonksiyonun bozulduğunu (işlevsel bir yetersizlik/disfonksiyon olduğunu) yansıttığı ortaya koyulmaktadır (165).

Enfeksiyon varlığında Breg hücre dinamiklerinin immün yanıttaki rolü çift yönlü bir etkiye sahiptir (166,167). Akut bakteriyel invazyon aşamasında patojenin etkin bir şekilde temizlenmesi için Th1 ve Th17 temelli güçlü bir pro-inflamatuar yanıta gereksinim duyulur. Bu süreçte Breg hücrelerinin baskılayıcı etkisinin azalması, immün sistemin bakteriyel patojenlere karşı daha agresif ve effektör bir yanıt vermesini kolaylaştıran adaptif bir mekanizma olarak değerlendirilebilir. Ancak, regülatör kontrolün bu denli yetersiz kalması, akut inflamatuar yanıtın zamanında sonlandırılamamasına (rezolüsyon eksikliği) neden olarak, böbrek dokusunda kronik inflamasyona, parankimal harabiyete ve uzun vadede fibrozis gelişimine zemin hazırlama riski taşımaktadır (168). Sonuç olarak, elde ettiğimiz kantitatif veriler, böbrek taşı ilişkili piyelonefrit patogenezinde regülatör B hücre kollarının niceliksel yetersizliğinin inflamatuar homeostazı bozduğunu ve immünopatolojiyi derinleştirebileceğini göstermektedir. Bu durum, piyelonefrit kliniğinde gözlenen doku hasarının ve inflamasyonun ciddiyetini açıklayan önemli bir biyobelirteç olabilir.

Tfh hücreler, sekonder lenfoid organların germinal merkezlerinde B hücrelerinin proliferasyonu, somatik hipermutasyon, izotip değişimi ve yüksek afiniteli uzun ömürlü plazma ile bellek B hücrelerine farklılaşması süreçlerinde mutlak gerekliliğe sahip özelleşmiş bir T yardımcı hücre alt grubudur. Germinal merkezlerde yerleşik olan asıl hücrelerinin periferik dolaşımdaki yansıması olan ve yüzey fenotipi ile tanımlanan dolaşımdaki $PD1^{+}CXCR5^{+}$ Tfh hücreleri, hümoral immün sistemin aktivasyon durumu hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır. Çalışmamızda Tfh hücreler periferik kandan hücre yüzey boyama yöntemi uygulanmasının ardından akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir. Sağlıklı kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptananamıştır (Şekil 4.4, p=0,8512).

Piyelonefrit gibi lokalize ve şiddetli bir bakteriyel inflamasyon esnasında cTfh frekanslarında anlamlı bir artış veya azalış yönünde dalgalanma gözlenmemesi, immünolojik açıdan birkaç farklı mekanizmayla açıklanabilir. Özellkle enfeksiyon

hastalıklarında periferik hücre dinamikleri zamana son derece bağımlıdır. Bentebibel ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada antijenle karşılaştıktan sonra periferik kandaki cTfh hücrelerinin genellikle 7. günde pik yaptığını ve 14-21. günlerde başlangıç (homeostatik) seviyelerine geri döndüğünü net bir şekilde gösterilmiştir (169). Çalışmamızda hastaların başvuru anındaki semptom süreleri heterojenlik göstermektedir. Bu durum, farklı fazlardaki hastaların periferik havuzundaki olası artış veya azalış trendlerinin birbirini maskelemesine (blunting effect) ve dolayısıyla istatistiksel olarak anlamsız bir tablonun ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir ve literatürle uyumludur. Diğer bir kritik etken ise immün yanıtın anatomik lokalizasyonudur. Sistemik inflamasyon yaratan enfeksiyonlardan farklı olarak, akut veya subakut faz fark etmeksizin lokalize enfeksiyonlarda antijene özgü Tfh hücre aktivasyonu ve B hücre yardımı, periferik dolaşımdan ziyade ağırlıklı olarak enfeksiyonun drene olduğu bölgesel lenf düğümlerinde lokalize kalma eğilimindedir (170,171). Crotty ve ark. tarafından yayınlanan derlemede de cTfh hücrelerinin aslında dokuda (Germinal Merkez) yerleşik asıl Tfh hücrelerinin sadece dolaşımdaki 'bellek' yansımaları (memory counterparts) olduğunu vurgular (170). Bu bilgi lokal inflamasyonlarda bu hücrelerin dokuyu terk edip kana karışmasının kısıtlı olduğunun altını çizer. Dolayısıyla, yerel böbrek dokusunda veya renal lenf nodlarında devam eden yoğun germinal merkez reaksiyonları lokal bir alana hapsolmuş olabilir ve periferik kan havuzundaki total cTfh yüzdelerine kantitatif bir değişim olarak yansımamış olabilir.

Son olarak, çalışmamızda total cTfh yüzdeleri açısından gruplar arasında kantitatif bir fark saptanmamış olması, dolaşımdaki cTfh kompartmanında kalitatif veya fenotipik bir değişimin yaşanmadığı anlamına gelmemektedir. Literatürdeki güncel çalışmalar, total PD-1+CXCR5+ hücre frekansları sabit kalsa dahi, havuz içindeki aktif hücre klonlarının oranının enfeksiyon sürecinde belirgin şekilde değişebildiğini göstermektedir. Örneğin, aktif Tfh yanıtının belirlenmesinde hücresel aktivasyon belirteçlerinden olan ICOS ve CD38 ekspresyonlarındaki artışın, total hücre yüzdesine kıyasla immün yanıtı çok daha spesifik bir şekilde yansıttığı bildirilmiştir (172). Ayrıca, insan cTfh hücrelerinin sitokin profillerine ve transkripsiyon faktörlerine göre farklı alt gruplara (cTfh1, cTfh2, cTfh17) ayrıldığı; spesifik patojenlere karşı total hücre sayısı değişmeden bu alt gruplar arasında fenotipik bir kayma (skewing) yaşanabildiği bilinmektedir (173). Gelecekte yapılacak

çalışmalarda yalnızca total cTfh yüzdelerinin değil; ICOS gibi aktivasyon belirteçleri ile fonksiyonel alt grupların da (cTfh1, cTfh2, cTfh17) analize dahil edilmesi, lokal enfeksiyonlara karşı gelişen immün yanıtın periferik kana yansıyan kalitatif dinamiklerinin aydınlatılmasında yol gösterici olacaktır.

Treg'ler immün sistemin aşırı aktivasyonunu baskılayarak immün homeostazı koruyan, otoimmüniteyi engelleyen ve enfeksiyonlar esnasında gelişen inflamasyonun konak dokusuna zarar vermesini sınırlayan kritik bir baskılayıcı hücre popülasyonudur. Çalışmamızda sağlıklı kontrol ve hasta gruplarının Treg frekansları karşılaştırılmasında anlamlı bir fark bulunmasa da Şekil 4.5'teki kutu grafiği dikkatle incelendiğinde, hasta grubunun Treg yüzdelerinin ve medyan değerinin, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla artış eğilimi sergilediği görülmektedir. İstatistiksel olarak sınırda kalan bu p=0,0964 değeri ve hasta grubundaki artış eğilimi, klinik ve immünopatolojik açıdan büyük önem arz etmektedir.

Tıpkı Tfh gibi Treg hücrelerde de periferik hücre dinamikleri zamana bağlıdır. İmmün sistem inflamasyonun tepe noktasına ulaştığı akut fazın hemen ardından, yıkıcı inflamasyonu dizginlemek, böbrekte kalıcı skarla (renal scarring) sonuçlanabilecek doku hasarını sınırlamak ve iyileşme fazını başlatmak üzere koruyucu bir feedback mekanizması olarak Treg hücre popülasyonunu artırma eğilimine girmiş olabilir. Literatürde, enfeksiyonlar ve doku hasarı esnasında konak dokuyu aşırı immunopatolojiden korumak adına $Foxp3^+$ Treg hücrelerinin hızla aktive olduğunu ve baskılayıcı rol üstlendiğini bildiren çalışmalar bulgularımızdaki artış eğilimini açıklamaktadır (174). Çalışmamızda bu durumun tam bir istatistiksel anlamlılığa ulaşamamış olması, hastaların semptom sürelerinin ve evrelerinin geniş bir varyasyon (8,04 ± 11,28 gün) sergilemesi ile ilişkili olabilir. Kohorttaki hastaların bir kısmının enfeksiyonun erken fazında olmaları nedeniyle Treg düzeyleri henüz yükselmemiş olabilir; ancak hastaların bir kısmı inflamasyonun geç/subakut faza geçmesi nedeniyle Treg frekanslarında bir artış gözlenmiş olabilir. Bu durum, Treg düzeyindeki artış trendini istatistiksel anlamlılık sınırına taşımış ancak anlamlılık elde edilmesini engellemiş olabilir. Diğer bir olasılık ise dolaşımdaki hücre frekanslarının, her zaman inflamasyonun odağı olan organ düzeyindeki gerçek dinamikleri yansıtmayabileceğidir. Böbrek immünolojisi ve hasar modelleri üzerine yapılan öncü çalışmalar, inflamasyon anında Treg hücrelerinin periferden böbrek dokusuna hızla

göç ettiğini ve bu lokal birikimin renal skarlaşmayı ve kalıcı fibrozisi önlemede mutlak bir gerekliliğe sahip olduğunu göstermektedir (175). Dolayısıyla, hücrelerin periferik dolaşımdan hasarlı renal mikroçevreye doğru bu yoğun kemotaktik kaçışı, periferik kan örneklerindeki Treg artışının neden tam bir anlamlılığa istatistiksel anlamlılığa ulaşamayıp sınırda bir artış trendi olarak kaldığını açıklayan güçlü bir immünolojik fenomendir.

İmmün regülasyon, farklı hücre popülasyonlarının sinerji içinde çalıştığı dinamik bir ağdır. Piyelonefritli hastalarda Treg hücre frekanslarının stabil kalmasına rağmen, Breg/Treg oranında gözlenen bu dramatik azalma, regülatör sistemin mimari yapısının bozulduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.6, p=0,0032). Bu bulgu, patogenezdeki regülatör zafiyetin yaygın bir sistemik yetersizlikten ziyade, Breg popülasyonuna özgü selektif bir kayıp olduğunu doğrulamaktadır. Literatürde Treg ve Breg hücrelerinin birbirlerini karşılıklı olarak desteklediği bilinse de, çalışmamızda saptanan bu oransal sapma, piyelonefrit sürecinde Breg hücrelerinin inflamatuar baskı altında öncelikli olarak tükendiğini veya renal dokuya göç ederek periferik sirkülasyondan çekildiğini düşündürmektedir.

İmmün toleransın periferdeki en erken savunma hatlarından biri olan $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücrelerinin Treg hücrelerine olan oranı, piyelonefritli hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 4.7, p=0,0040). Bu bulgu, patogenezdeki regülatör dengesizliğin sadece matür/bellek hücreleri değil, aynı zamanda immün sistemin ‘eğitim’ ve ‘geçiş’ evresindeki hücreleri de kapsadığını göstermektedir. Özellikle hasta grubunda medyan değerin düşmesine rağmen bazı bireylerde gözlenen yüksek sapmalar, regülatör sistemin bu grup hastalarda çok daha heterojen bir yanıt sergilediğine işaret etmektedir. Önceki bulgularımızla birleştirildiğinde; hem $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ hem de $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg/Treg oranlarındaki bu eş zamanlı düşüş, piyelonefritteki immün yetersizliğin kökeninde Breg popülasyonunun Treg'lere kıyasla daha kırılgan bir yapıda olduğu ve inflamatuar süreçte öncelikli olarak tükendiği hipotezini pekiştirmektedir. Sonuç olarak, regülatör ağın Breg ayağındaki bu çöküş, Treg'lerin sayısal olarak korunmasına rağmen neden yeterli bir immün baskılama sağlayamadığını ve sistemin neden Th2 polarizasyonu gibi kompansatuar mekanizmalara ihtiyaç duyduğunu açıklayan temel yapısal kanıttır.

Çalışmamızın literatüre sunduğu en önemli ve özgün katkılardan birisi, hücresel immün yanıtın periferik kandaki aktivasyon düzeyini ortaya koymasıdır. Uyaransız (bazal) koşullarda (Şekil 4.8), piyelonefritli hastalarda hücre içi sitokin üretimi incelendiğinde, IFN-γ (Th1) ve IL-17 (Th17) frekansları sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (sırasıyla $p=0,0161$ ve $p<0,0001$).

Hastalardaki bazal Th17 ve dolayısıyla yüksek IL-17 düzeyleri, üriner sistem enfeksiyonlarındaki immünopatoloji ile tam bir paralellik göstermektedir. IL-17, epitelyal hücreler ve makrofajlar üzerinde etki göstererek nötrofillerin böbrek dokusuna ve enfeksiyon bölgesine kemotaksisinden sorumlu primer sitokindir. Araştırmalar, özellikle *E. coli* başta olmak üzere uropatojenik bakterilerin neden olduğu piyelonefrit modellerinde Th17 hücrelerinin lokal bakteri temizliği için elzem olan kemokin ve anti-mikrobiyal peptit imzasını tetiklediğini kanıtlamıştır (176). Ayrıca, obstrüktif böbrek taşlarının doğrudan fiziksel etkisinin böbrek epitel hücrelerinde ve makrofalarda NLRP3 inflamozomunu aktive ederek IL-1β salınımına yol açtığı; bu lokal IL-1β'nın da Th17 polarizasyonunu güçlü bir şekilde körüklediği bilinmektedir (177). Çalışmamızda bazal Th17 aktivasyonunun sağlıklı kontrollere göre böylesine belirgin yüksek olması, taşın oluşturduğu doku travması ile bakteriyel proliferasyonun birleşik etkisinin tetiklediği hücresel yanıtın güçlü bir göstergesidir. Hastaların %84'ünde saptanan yüksek nötrofil değerleri de bazal IL-17 yüksekliği ile doğrudan ilişkilendirilebilir ve bu durum piyelonefritteki yoğun doku infiltrasyonunu açıklar. Benzer şekilde IFN-γ salgılayan Th1 hücrelerindeki bazal yükseklik, hücresel immünitenin akut enfeksiyona karşı reaksiyonunu temsil eder. Yüksek IFN-γ seviyeleri, fagositik hücrelerin uyarılması ve patojen eliminasyonunda merkezi bir role sahiptir. Ortega Martell (2020) tarafından üriner sistem enfeksiyonları üzerine yapılan güncel derleme bulgularımızı desteklemektedir. Patojen invazyonuna karşı gelişen hücresel immünitede Th17 hücrelerinin hızla aktive olarak IL-17 salgıladığı ve bu yanıtın primer olarak enfeksiyon bölgesine yönelik nötrofil kemotaksisinden sorumlu olduğu vurgulanmıştır. Aynı derlemede belirtildiği üzere Th1 hücrelerinin de IFN-γ üreterek üriner enfeksiyona yanıt verdiği ve doğrudan makrofaj aktivasyonuna yol açtığı belirtilmektedir (178).

Hastaların ve sağlıklı kontrollerin periferik kan hücreleri *in vitro* uyarıma maruz bırakıldığında son derece kritik bir immünolojik dinamik tespit edilmiştir. Uyarım sonrası her iki grupta da tüm sitokin düzeyleri beklendiği üzere artmış olsa da (Şekil 4.9), hastalarda uyaransız durumda var olan anlamlı Th1 ve Th17 yükseklik farkı hasta ve kontrol grubu arasında kapanmış ve istatistiksel anlamlılığını yitirmiştir ($p>0,05$). Ancak, uyaransız ortamda kontrol grubuyla benzer düzeyde olan IL-4 (Th2) frekansı, uyaranlı ortamda hasta grubunda sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,0008$). Uyarımla gelen bu değişiklikler anti-inflamatuar yanıta yönelim ile açıklanabilir. Buna göre enfeksiyon nedeniyle hastaların *in vivo* Th1 ve Th17 yolakları halihazırda maksimum uyarılma kapasitesine yakın çalışmaktadır; dolayısıyla *in vitro* uyarım sağlıklı hücrelerin hastalarla aynı düzeye erişmesini sağlamıştır. Diğer taraftan, uyaran sonrasında hastalarda IL-4 (Th2) yanıtının kontrol grubundan ayrışarak şiddetli bir artış göstermesi, immün sistemin kompansatuar (dengeleyici) bir regülasyon mekanizmasına işaret etmektedir. İmmün sistemin, böbrek parankiminde aşırı Th1/Th17 aracılı nötrofil degranülasyonunu ve olası bir kalıcı renal skarlaşmayı önlemek adına güçlü bir anti-inflamatuar özellik gösteren Th2 yanıtına (IL-4) hızlıca yöneldiği görülmektedir. Bu durum, şiddetli inflamasyonun doku hasarını sınırlama çabası veya kronikleşme eğilimi olarak yorumlanabilir. Literatürler, böbrek ve idrar yolu hasarlarında makrofajlar ile dendritik hücrelerin pro-inflamatuar yanıttan IL-4 (Th2) aracılı onarıcı ve dengeleyici (M2/Tip 2) faza geçiş yaparak doku bütünlüğünü koruma, enfeksiyonu sınırlama ve rejenerasyonu yönetme süreçlerindeki kritik rollerini kapsamlı bir şekilde açıklamaktadır. Tip 2 (Th2) sitokinleri doku onarımını başlatır, ancak bu yara iyileşme (onarım) yanıtı eğer uygun şekilde sonlandırılamaz ve kronikleşirse, fibrotik patolojinin (aşırı kolajen birikimi ve kalıcı skarlaşmanın) doğrudan ve birincil sorumlusu haline gelebilir (179–182).

Hücresel aktivasyon kapasitesinin bir göstergesi olan Stimülasyon İndeksi (SI) analizinde hasta grubunda IL-17 üretimindeki kat artışın sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12, $p=0,0034$). Bu durum, hastalarda bazal düzeydeki yüksek IL-17 frekansının yarattığı 'tavan etkisi' ile açıklanabilir. Ayrıca, her ne kadar istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmasa da, hastalarda IFN-γ medyan (Hasta SI medyan: 45,67; Kontrol SI medyan: 69,34; $p=0,0566$) değerlerindeki azalma ve IL-4 (Hasta SI medyan: 2,954; Kontrol SI

medyan: 2,051; p=0,1329) değerlerindeki artış trendi, piyelonefrit patogenezinde immün yanıtın Th1'den Th2 yönüne doğru bir polarizasyon eğiliminde olduğunu ve bu dengenin pro-inflamatuar (IL-17) reaktivite kapasitesini doğrudan etkilediğini düşündürmektedir.

İmmün sisteminin enfeksiyona verdiği yanıtın niteliğini belirleyen en kritik parametrelerden biri Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki dengedir. Çalışmamızda piyelonefritli hastalarda Th1/Th2 oranının kontrol grubuna (Medyan: 49,58) kıyasla yaklaşık iki kat azalarak 23,51 seviyesine gerilediği tespit edilmiştir (Şekil 4.13, p=0,0054). Bu dramatik düşüş, periferik T helper hücre havuzunun pro-inflamatuar Th1 (IFN-γ) yanıtından ziyade, anlamlı derecede artış gösteren Th2 (IL-4) yanıtına doğru güçlü bir polarizasyon sergilediğini ortaya koymaktadır. Literatürde Th2 baskınlığının genellikle kronikleşme eğilimi veya hümoral yanıta geçişle ilişkili olduğu bilinmektedir; bu bulgu, piyelonefrit patogenezinde vücudun inflamasyonu sonlandırmak veya doku hasarını sınırlamak adına anti-inflamatuar karakterdeki Th2 yolunu seçtiğini, ancak bu durumun pro-inflamatuar savunma kapasitesini (Th1) zayıflatmış olabileceğini düşündürmektedir. Önceki bulgularımızla birleştirildiğinde, azalan Breg hücre frekanslarına rağmen gözlenen bu Th2 kayması (Th2 shift), sistemin regülatör açığı sitokin polarizasyonu yoluyla kompanse etmeye çalıştığına dair özgün bir kanıt sunmaktadır. Farelerle yapılan İYE'lerin mesanede neden bu kadar sık tekrarlandığını araştıran bilimsel bir çalışmada, immün yanıtın mesanedeki bakterileri yok etmek yerine epitel doku onarımına öncelik verdiğini ve CD301b+ dendritik hücrelerin başlattığı bu süreçte, Th2 tipi immün yanıtın baskın hale gelerek koruyucu olan Th1 yanıtını engellediği tespit edilmiştir (183).

İmmün sistemin efektör kollarından biri olan Th17 yanıtı, mukozal savunma ve nötrofilik inflamasyon için kritiktir (184). Çalışmamızda, piyelonefrit hastalarında Th17/Th2 oranının sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14, p=0,0277). Bu bulgu önceki Th1/Th2 verilerimizle birleştirildiğinde, hastaların immün profilinde genel bir Th2 kayması olduğunu doğrulamaktadır. Pro-inflamatuar karakterdeki hem Th1 hem de Th17 kollarının Th2 karşısında oransal olarak gerilemesi, piyelonefrit patogenezinde vücudun akut inflamatuar yanıtı sınırlamak adına anti-inflamatuar bir polarizasyonu tercih ettiğini göstermektedir. Ancak bu durumun, patojen eliminasyonu için gerekli olan agresif pro-inflamatuar

yanıtı zayıflatıp zayıflatmadığı tartışmaya açık bir noktadır. Özellikle Breg hücrelerindeki belirgin azalma dikkate alındığında, bu Th2 polarizasyonunun regülatör kapasite açığını kapatmaya yönelik kompansatuar bir mekanizma olabileceği değerlendirilmektedir.

İmmün sistemin enfeksiyona verdiği yanıtın başarısı, pro-inflamatuar efektör hücreler ile regülatör popülasyonlar arasındaki hassas dengeye bağlıdır (178). Çalışmamızda, piyelonefritli hastalarda Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranının kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2,7 kat arttığı saptanmıştır (Şekil 4.15, p=0,0232). Bu bulgu piyelonefrit patogenezinde regülatör kapasitenin (Breg), artan pro-inflamatuar (Th17) baskıyı dengelemekte yetersiz kaldığını (imbalance) açıkça ortaya koymaktadır. Özellikle Th17 hücrelerinin mukozal inflamasyon ve nötrofil aktivasyonu üzerindeki güçlü etkisi göz önüne alındığında, bu dengedeki bozulma, doku hasarının neden sınırlanamadığını ve inflamatuar sürecin neden kontrolsüz seyrettiğini açıklayan temel mekanizmalardan biridir. Breg hücrelerindeki sayısal azalmaya eşlik eden pro-inflamatuar reaktivite artışı, piyelonefritli bireylerde periferik toleransın kırıldığının ve sistemin doku yıkımına açık hale geldiğinin güçlü bir göstergesidir. Piyelonefrit veya İYE'lerde Breg hücre gruplarını araştıran herhangi bir çalışma bulunmasa da, bir enfeksiyon hastalığı olarak ağır ve kritik COVID-19 hastalarında IL-10'u salgılayan dolaşımdaki $CD24^{hi}CD27^{+}$ B10 Breg frekansında sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı bir düşüş olduğunu ortaya koymaktadır (185).

Piyelonefrit hastalarında immün homeostazın durumunu anlamak amacıyla gerçekleştirdiğimiz oran analizleri, hastalığın immünopatolojisine dair iki yönlü bir tablo ortaya koymaktadır. İlk olarak, Th17/Breg oranındaki anlamlı artış (p=0,0232), pro-inflamatuar baskının regülatör kontrol mekanizmalarını sayısal olarak aştığını ve sistemin doku hasarına açık bir inflamatuar evreye girdiğini doğrulamaktadır. Ancak en dikkat çekici bulgu, IL-4/Breg oranında gözlenen ileri derecede anlamlı artıştır (Şekil 4.16, p=0,0011). Bu sonuç, Breg hücrelerinde saptadığımız ciddi sayısal azalmaya rağmen, sistemin Th2 polarizasyonu (IL-4) üzerinden güçlü bir anti-inflamatuar yanıt üretmeye çalıştığını göstermektedir. Bu durum, piyelonefrit patogenezinde regülatör hücre açığını kapatmaya yönelik 'kompansatuar bir immün manevra' olarak yorumlanabilir. Başka bir deyişle; vücut azalan Breg hücrelerinin yarattığı boşluğu, T helper hücrelerini Th2 yönüne sevk ederek (sitokin polarizasyonu

yoluyla) dengelemeye çalışmaktadır. Bu 'efektör temelli regülasyon' stratejisi, hastalardaki inflamatuar sürecin neden kronikleşme veya doku hasarı sınırlama eğiliminde olduğunu açıklayan özgün bir mekanizmadır. Bulgularımıza benzer şekilde, yayınlanan bir makalede, mesane ve üriner sistem enfeksiyonlarına karşı verilen immün yanıtın epitel hasarını hızlıca onarmak için pro-inflamatuar fazdan (Th1/Th17) hızla Th2 (anti-inflamatuar ve onarıcı) fazına geçtiğini açıklar. Sistemin organ parankimini ve epiteli korumak adına Th2 yanıtını önceliklendirmesinin, bakteriyel temizlik için şart olan hücresel yanıtları zayıflatacağına, enfeksiyonun tam olarak temizlenememesine ve hastaların kronik / tekrarlayan enfeksiyonlara yatkın hale gelmesine neden olduğunu savunur (186).

İmmün sistemin en erken evre regülatör popülasyonlarından biri olan $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücreleri, periferik toleransın sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Piyelonefritli hastalarda pro-inflamatuar efektör yanıt ile $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücreleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla hesaplanan Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg oranları karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda, piyelonefritli hastalarda Th17 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg medyan oranı (4.103), kontrol grubuna (2.142) kıyasla sayısal olarak yaklaşık iki kat artış göstermiş olsa da bu fark istatistiksel anlamlılık sınırında kalmıştır (Şekil 4.17, p=0,0927). Bu bulgu her ne kadar $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ bellek benzeri Breg alt grubu kadar keskin olmasa da $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ geçişsel Breg popülasyonunun da artan Th17 baskısı karşısında regülatör kontrolü sağlama noktasında yetersiz kalma eğiliminde olduğunu düşündürmektedir. Pro-inflamatuar Th17 baskısının, geçişsel Breg hücrelerinin regülatör kapasitesini zorladığına dair biyolojik bir kanıt sunmaktadır. Özellikle hasta grubunda gözlenen bireysel değerlerdeki aşırı sapma (outliers), bazı hastalarda Th17 hakimiyetinin geçişsel Breg kontrolünden tamamen çıktığını göstermektedir. $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg alt grubunda saptadığımız ileri derecede anlamlı bozulma ile karşılaştırıldığında, geçişsel Breg popülasyonundaki bu daha sınırlı dengesizlik, piyelonefrit patogenezinde regülatör zafiyetin öncelikle antijenle karşılaşmış efektör/bellek hücre ekseninde şekillendiğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, pro-inflamatuar ve regülatör hücreler arasındaki bu oransal değişiklik, istatistiksel p-değerinden bağımsız olarak, hastalarda immün homeostazın bozulma yönünde bir eğilim sergilediğinin göstergesidir. Breg'lerle ilgili yapılan bir araştırmada ise, omurga son plak inflamasyonu (end plate inflammation) ve disk

dejenerasyonu olan hastalarda $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücrelerinin oranının (frekansının) sağlıklı kontrollere kıyasla azalmadığını, aksine hafif düzeyde daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Ancak hücresel işlevler incelendiğinde, hastalardan alınan Breg hücrelerinin uyarılma sonrasında inflamasyonu baskılayan IL-10 ve TGF-β1 sitokinlerini sağlıklı kontrollere göre çok daha az salgıladığı ve buna bağlı olarak Th1 ve Th17 gibi proinflamatuar T hücrelerinin aktivitelerini etkili bir şekilde baskılayamadığı ortaya konmuştur. Bu hücrelerin inflamasyonu kontrol etme yeteneğinde belirgin bir fonksiyonel kayıp (işlevsel yetersizlik) olduğunu kanıtlamaktadır (187).

İmmün sisteminin periferik tolerans noktalarından biri olan $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg hücreleri ile Th2 polarizasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde; piyelonefritli hastalarda IL-4 / Breg oranının dramatik bir yükseliş sergilediği saptanmıştır (Şekil 4.18, p=0,0058). Bu bulgu önceki IL-4 / $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg sonuçlarımızla paralellik göstererek, piyelonefrit patogenezinde kompansatuar bir Th2 kayması olduğunu kesinleştirmektedir. Hastalarda geçişsel Breg frekansının azalmasıyla bozulan regülatör denge, T helper hücrelerinin yoğun bir şekilde IL-4 üretimine sevk edilmesiyle dengelenmeye çalışılmaktadır. Özellikle bazı hastalarda bu oranın çok yüksek değerlere ulaşması (outliers), regülatör hücre açığının derinleştiği vakalarda Th2 sisteminin aşırı kompanzasyon moduna geçtiğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, hem bellek-benzeri ($CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$) hem de geçişsel ($CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$) Breg alt grupları üzerinden saptadığımız bu yüksek oranlar, piyelonefritli bireylerde immün sistemin regülatör hücre eksikliğini, sitokin ağını pro-inflamatuar eksenden anti-inflamatuar (Th2) eksene kaydırarak telafi etmeye çalıştığına dair bütüncül bir mekanizma sunmaktadır.

İmmün sistemin regülatör kolunun en stabil bileşenlerinden biri olan Treg hücrelerinin, pro-inflamatuar Th17 yanıtı üzerindeki oransal kontrolü incelendiğinde; piyelonefritli hastaların sağlıklı kontrollerle benzer bir profil sergilediği görülmüştür (Şekil 4.19, p=0,5635). Bu bulgu hastalık sürecinde T hücresi temelli regülasyon hattının (Treg) sayısal ve oransal olarak korunduğuna işaret etmektedir. Breg hücreleri üzerinden saptadığımız ileri derecede anlamlı dengesizliklerle ($p < 0,01$) birlikte değerlendirildiğinde; bu sonuç, piyelonefritteki regülatör defektin genel bir sistemik

çöküşten ziyade, Breg popülasyonuna özgü seçici bir zafiyet olduğunu kanıtlamaktadır. Sonuç olarak, uyarılmış hücreler arasındaki Th17/Treg oranının stabil kalması, patogenezdeki asıl immün sapmanın T hücresi regülasyonundan bağımsız olarak, Breg kaybı ve buna eşlik eden kompansatuar Th2 polarizasyonu ekseninde şekillendiği hipotezini güçlendirmektedir.

Çalışmamızdaki sunduğu diğer önemli ve özgün değerlerden biri de bellek Th hücreleri ile yapılan bu istatistiksel çıktılardır. Piyelonefrit patogenezinde hücresel immünitenin kalıcı izlerini ve sirkülasyondaki uyarılma düzeyini anlamak amacıyla uyaransız koşullarda gerçekleştirdiğimiz bellek Th alt grup analizleri, hastalık kronikliğine dair çok kritik veriler sağlamıştır.

Bulgularımıza göre, hastaların periferik kanındaki bellek T hücre havuzunda pro-inflamatuar karakterdeki IFN-γ (p=0,0196) ve özellikle mukozal inflamasyon/nötrofil kemotaksisinden sorumlu olan IL-17 (p=0,0005) hücre frekansları, herhangi bir dışsal uyaran olmaksızın sağlıklı kontrollere kıyasla ileri derecede yüksek saptanmıştır (Şekil 4.20). Bu durum, piyelonefritli bireylerde antijene maruz kalmış bellek hücrelerinin periferde sürekli bir 'kronik aktivasyon ve alarm' modunda kaldığını, pro-inflamatuar sitokin salınımının bazal düzeyde bile durdurulamadığını net bir şekilde ortaya koymaktadır. Yapılan deneysel bir araştırmada da özellikle IL-10 üreten B hücrelerinden (*IL-10(-/-)B hücre*) yoksun kimerik fareler, kimerik vahşi tip (*WT*) B hücreli farelere kıyasla şiddetlenmiş bir artrit geliştirmiştir. WT B hücreli farelere kıyasla IL-10(-/-) B hücreli farelerde Foxp3 Treg'lerin mutlak sayısında, *Foxp3* ekspresyon seviyelerinde önemli bir azalma ve inflamatuar Th1 ve Th17 hücrelerinde ise belirgin bir artış tespit edilmiştir (188). Bulgularımızdaki diğer önemli bir nokta ise, uyaransız bu bazal evrede anti-inflamatuar IL-4+ bellek hücre frekanslarında gruplar arasında hiçbir anlamlı fark bulunmaması (p=0,3504), çalışmamızın omurgasını oluşturan 'kompansatuar Th2 kayması' hipotezini doğrudan desteklemektedir. Hastalarda bazal düzeyde bir Th2 baskınlığı yoktur. Aksine, sistem bazal koşullarda tamamen pro-inflamatuar (Th1/Th17) bir yangının etkisi altındadır. Ancak immün sistem, uyarılma anında bu kronik inflamasyonu ve doku hasarı riskini dizginleyebilmek adına reaktif olarak topyekün bir Th2 polarizasyonuna (IL-4 ve dolaylı olarak IL-10 aksına) sığınmaktadır (183,186). Sonuç olarak, uyaransız bellek hücrelerindeki bu pro-inflamatuar zemin,

piyelonefritli hastalarda periferik immün toleransın bazal düzeyde zaten kırılmış olduğunu ve Breg kaybıyla birleştiğinde, sistemin bu burumu kontrol altına almak için stimülasyon altında neden agresif bir sitokin polarizasyonu (IL-4) sergilediğini mükemmel bir kronolojik sırayla açıklamaktadır.

İn vitro stimülasyon sonrası bellek T helper hücre kompartmanında elde ettiğimiz sitokin profilleri, piyelonefrit immünopatolojisinde kronik antijenik stimülasyonun yarattığı hücresel fonksiyon kaybını net bir şekilde ortaya koymaktadır. Uyaransız koşullarda hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulduğumuz bellek IFN-γ frekansları, hücreler *in vitro* ortamda güçlü bir şekilde stimüle edildiğinde sağlıklı kontrollere kıyasla paradoksal ve ileri derecede anlamlı bir düşüş sergilemiştir (Şekil 4.21, p=0,0006). İmmünolojik literatürde bu fenomen, kronik veya tekrarlayan enfeksiyon süreçlerinde antijene sürekli maruz kalan efektör/bellek T hücrelerinin fonksiyonel olarak yetersizleşmesi, yani 'T hücresi tükenmişliği' (T cell exhaustion/anergy) ile açıklanmaktadır (189,190).

Periferde bazal düzeyde sürekli sitokin salgılayan ve alarm durumunda olan hastaya ait Th1 bellek hücreleri, maksimal uyarım altında sağlıklı kontrollerin sergilediği pro-inflamatuar sıçramayı gerçekleştirememekte ve yanıtsız kalmaktadır. Bununla birlikte, stimülasyon sonrası bellek IL-17+ (p=0,1102) ve IL-4+ (p=0,0804) frekanslarında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Özellikle IL-4 verisinde hasta grubunda medyanın sayısal olarak daha yüksek olması ve istatistiksel anlamlılık sınırına yaklaşması (p=0,08), bellek havuzundaki Th1 hücreleri hızla tükenirken, Th2 (IL-4) yanıtının uyarım altında fonksiyonel kapasitesini koruma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, total T helper havuzunda saptadığımız genel bir Th2 kayması (Th1/Th2 ve Th17/Th2 oranlarındaki azalma) hipotezini hücresel mekanizma düzeyinde desteklemektedir: Sistemik Th2 polarizasyonunun asıl nedeni, Th2 bellek hücrelerinin sayıca çok fazla artması değil; pro-inflamatuar Th1 bellek odağının kronik inflamasyon nedeniyle fonksiyonel olarak tükenmesi ve popülasyonun oransal olarak Th2 eksenine kalmasıdır. Sonuç olarak uyaranlı bellek hücre verileri, piyelonefritte periferik pro-inflamatuar belleğin reaktivite kapasitesini kaybettiğini ve bu hücresel tükenmişliğin, Breg eksikliğiyle birleşerek hastalığın kronikleşme veya tekrarlama eğilimini körükleyen temel bir immünolojik zafiyet olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamız kapsamında kurulan *in vitro* uyarım modelinin fonksiyonel geçerliliğini test etmek ve homeostatik sınırları belirlemek amacıyla, sağlıklı kontrol grubuna ait bellek Th hücrelerinin bazal ve stimüle sitokin üretim profilleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, sağlıklı bireylerdeki bellek T hücre havuzunun dışsal uyarılara karşı yüksek bir fonksiyonel rezerv ve esnekliğe (immün reaktivite) sahip olduğunu net bir şekilde ortaya koymaktadır. Hücreler PMA-İyonomisin ile stimüle edildiğinde; bazal seviyede saptanamayacak kadar düşük olan pro-inflamatuar IFN-γ ve IL-17 ile anti-inflamatuar IL-4 frekansları istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir artış göstermiştir (Şekil 4.22, $p<0,0001$). Bu homojen ve güçlü aktivasyon paterni, hem metodolojik olarak sitokin indüksiyon protokolümüzün doğruluğunu kanıtlamakta hem de fizyolojik koşullarda bellek hücrelerinin vermesi gereken ideal yanıt eğrisini (immün kompetans) tanımlamaktadır. Bu grafik paneli, hasta grubunda gözlenen sapmaların (özellikle uyarılmış bellek hücrelerinde saptadığımız Th1/IFN-γ tükenmişliğinin) daha doğru yorumlanması açısından kritik bir kılavuzdur. Sağlıklı bellek hücreleri maksimal uyarım karşısında bu denli agresif ve kararlı bir pro-inflamatuar yanıt üretebilirken, piyelonefritli hastalarda bu kapasitenin anlamlı derecede baskılanmış olması, patogenezdeki hücresel anerji ve tükenmişlik hipotezimizi deneysel düzeyde pekiştiren bir veridir.

Piyelonefritli hastalara ait bellek T helper hücrelerinin bazal ve uyarılmış durumdaki sitokin üretim kinetikleri incelendiğinde, hücrelerin stimülasyona anlamlı bir dikey artışla yanıt verdiği saptanmıştır (Şekil 4.23, $p<0,0001$). Hücresel düzeydeki bu sitokin indüksiyonu, hastaların bellek T hücrelerinin genel uyarılma mekanizmalarının işlevsel olduğunu göstermektedir. Ancak bu reaktivite profili, sağlıklı kontrol grubunun verileriyle maksimal değerler (sıçrama pencereleri) üzerinden kıyaslandığında, patogenezdeki 'fonksiyonel rezerv kısıtlılığı' açıkça göze çarpmaktadır. Sağlıklı kontrollerde stimülasyon sonrası bellek IFN-γ frekansları medyan düzeyde ~%44 seviyelerine ulaşıp bireysel bazda %60'ları rahatlıkla aşabilirken, hasta grubunda maksimal yanıtların oldukça baskılandığı ve tepe noktalarının büyük oranda %20–40 bandında sıkıştığı görülmektedir. Bu durum, hastaların pro-inflamatuar Th1 bellek havuzunun niceliksel olarak uyarılabilse de, niteliksel olarak sağlıklı bir reaktivite tavanına ulaşamadığını, yani periferik kronik alarm durumuna bağlı bir fonksiyonel tükenmişlik içinde olduğunu doğrulamakta ve Th1 ekseninde baskılanmayı göstermektedir. Hasta grubunda özellikle IL-4 (Şekil 4.23-Grafik B) ve IL-17 (Şekil 4.23-

Grafik C) grafiklerinde uyarım sonrası çizgilerin çok daha geniş ve dağınık bir dikey saçılım sergilemesi, hastaların immün reaktivite kapasitelerinin homojen olmadığını göstermektedir. Bazı hastalarda pro-inflamatuar (Th17) sıçrama çok sınırlı kalırken, bazılarında Th2 (IL-4) yanıtının belirgin şekilde yukarı fırlaması, periferdeki tolerans kırılmasının ve Breg eksikliğinin bireysel klinik tablolara göre sitokin ağında farklı derinlikte yaralar açtığı fikrini pekiştirmektedir. Sonuç olarak; hasta grubunun kendi içindeki uyaransız-uyarılı artışı saklı kalmak kaydıyla, sağlıklı grubun sergilediği maksimal kapasiteye ulaşamamış olması, piyelonefrit patogenezinde periferik T helper belleğinin kronik antijenik baskı altında hırpalandığını ve bu fonksiyonel rezerv kaybının enfeksiyonun tekrarlama/kronikleşme eğilimine hücresel düzeyde zemin hazırladığını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, böbrek taşı ilişkili piyelonefrit hastaları ile sağlıklı kontrollerin serum IL-10 konsantrasyonları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.24, $p = 0,9593$). Literatürde, sistemik inflamatuar yanıtların IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin artışıyla karakterize olduğu belirtilse de (191), çalışmamızdaki bu bulgu birkaç biyolojik mekanizma ile açıklanabilir.

İlk olarak, IL-10'un kısa yarı ömrü ve sistemik dolaşımdaki kararsız yapısı, serum düzeylerinin doku düzeyindeki inflamatuar durumu tam olarak yansıtmasını zorlaştırabilmektedir. Piyelonefrit, renal parankimi etkileyen lokalize bir enfeksiyon olması sebebiyle, anti-inflamatuar yanıtın periferik dolaşıma yansımadan lokal mikroçevre ile sınırlı kalmış olması muhtemeldir.

Piyelonefrit sırasında IL-10 tespiti, enfeksiyonun evresine ve örneklemenin yapıldığı sistemik dolaşım ve renal dokuya bağlı yüksek derecede bağımlılık göstermektedir. IL-10 üretimi, hastalık akut enfeksiyondan iyileşme veya kronikleşme evrelerine doğru ilerledikçe önemli değişimlere uğrar. Akut fazda IL-10, pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF-α, IL-6 ve IL-8) yüksek seviyelerini dengelemek amacıyla sistemik dolaşıma salınır. Ancak, sistemik IL-10 artışı genellikle geçicidir ve daha çok inflamatuar "fırtınanın" şiddetini yansıtan bir belirteç görevi görür. Kronik veya lokalize piyelonefrit vakalarında, dokudaki üretim devam etmesine rağmen, dolaşımdaki IL-10 seviyeleri sıklıkla bazal değerlere döner veya

saptanamayacak düzeylere iner. Böbrek dokusundaki, dokudaki üretim daha kalıcı ve sürdürülebilirdir (192–195).

Akut evrede, nötrofil göçü ve oksidatif stres kaynaklı doku hasarını sınırlamak amacıyla IL-10 üretimi hızla indüklenir. Kronik evrede, dokudaki IL-10 üretiminin sürekli olması patolojik açıdan zararlı olabilir. Bu durum, 'lokalize tolerans' hali yaratarak immün sistemin geriye kalan bakterileri temizleme kapasitesini baskılar, bu da potansiyel olarak bakteriyel persistansa (kalıcılık) veya tekrarlayan enfeksiyonlara yol açabilir (193,194).

Hasta grubunda saptadığımız Breg hücresi kaybına rağmen IL-10 seviyelerinin bazal düzeyde korunması, immün sistemin bu eksikliği Th2 polarizasyonu (IL-4 artışı) gibi alternatif yolaklar üzerinden kompanse etmeye çalıştığını düşündürmektedir.

NOT: Sağlıklı olarak tanımlanan bireylerde IL-10'un yüksek çıkması genellikle o anki fizyolojik durumla ilişkilidir. Kontrol grubundaki bireyler, kan alımından birkaç gün önce hafif bir üst solunum yolu enfeksiyonu veya basit bir gastrointestinal rahatsızlık geçirmiş olabilir. Vücut, bu inflamasyonu temizledikten sonra "rezidüel" (kalıntı) olarak yüksek IL-10 seviyeleriyle sistemi dengelemeye (re-homestaz) çalışıyor olabilir. Mevsimsel alerjiler veya gıda hassasiyetleri, IL-10 üretimini tetikleyen en önemli faktörlerdendir. Birçok sağlıklı birey, farkında olmadığı bir alerjen maruziyeti nedeniyle bazal anti-inflamatuar seviyelerini yüksek tutuyor olabilir. Kan vermeden kısa bir süre önce yapılan yoğun egzersiz, kaslardan ve immün hücrelerden IL-10 salınımını dramatik şekilde artırabilir. Probiyotik kullanımı, Omega-3 takviyeleri veya anti-oksidan içeriği yüksek beslenme düzenleri, sistemik IL-10 düzeylerini bazal seviyenin üzerine çıkarabilir. IL-10 seviyeleri gün içindeki stres hormonları (kortizol gibi) ile doğrudan ilişkilidir. Kan alım saati veya bireyin o anki kaygı düzeyi sonuçları etkileyebilir.

Piyelonefrit hastalarında immün yanıtın koordinasyonunu anlamak amacıyla gerçekleştirilen korelasyon analizi sonucunda, serum IL-10 düzeyleri ile periferik T helper sitokin profilleri (IFN-γ, IL-4 ve IL-17) arasında istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü bir doğrusal ilişki saptanmamıştır (Şekil 4.25). Özellikle serum IL-10 ile pro-inflamatuar bir belirteç olan IFN-γ arasında gözlenen zayıf negatif korelasyon ($r = -0,36$), anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar mekanizmalar arasındaki klasik antagonizmanın bu hasta grubunda heterojen bir dağılım sergilediğini göstermektedir.

Benzer şekilde, stimülasyon sonrası anlamlı artış gösteren IL-4 (Th2) frekansları ile serum IL-10 seviyeleri arasındaki korelasyonun zayıf kalması (r = 0,08), sistemik IL-10 havuzunun sadece T helper hücre aktivasyonuna bağlı olmadığını, monositler veya Breg hücreleri gibi alternatif hücresel kaynakların ve lokal doku regülasyonlarının süreçte baskın rol oynayabileceğini kanıtlamaktadır. Sonuç olarak, sitokinler arası korelasyonun zayıf seyretmesi, piyelonefrit patogenezinde immün yanıtın tek bir baskın yolak üzerinden ilerlemek yerine, bireyler arası varyasyonu yüksek ve çok merkezli bir regülasyon mekanizması tarafından yönetildiğine işaret etmektedir.

Piyelonefrit hastalarında regülatör hücre dinamiklerini incelediğimiz korelasyon matrisinde (Şekil 4.26), immünolojik mekanizmaların karmaşıklığını ortaya koyan birkaç önemli bulgu öne çıkmaktadır. İlk olarak, iki farklı Breg alt grubu olan $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ ve $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ hücreleri arasında gözlenen negatif korelasyon (r = -0,324), bu hücrelerin patolojik süreçte birbirlerinden bağımsız olarak regüle edildiğini veya bir alt grubun diğerine göre baskın bir farklılaşma yolu izlediğini düşündürmektedir. Serum IL-10 seviyeleri ile Breg alt grupları arasındaki korelasyonun zayıf kalması ($CD27^{+}$ grubu için r = -0,226 ve CD38hi grubu için r = 0,268), piyelonefritli bireylerde sistemik IL-10 havuzunun tek bir regülatör kaynak tarafından domine edilmediğini kanıtlamaktadır. Özellikle $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg hücrelerinde saptadığımız anlamlı sayısal azalmaya rağmen, bu hücrelerin IL-10 ile negatif korelasyon eğilimi göstermesi, hastalarda kalan Breg popülasyonunun IL-10 üretim kapasitesinin baskılanmış olabileceğine veya regülasyonun IL-10'dan bağımsız hücresel mekanizmalar üzerinden yürütüldüğüne işaret etmektedir. Treg ve Tfh hücrelerinin diğer parametrelerle olan zayıf korelasyonları (r < 0,2), bu hücrelerin sirkülasyondaki frekanslarının akut inflamatuar süreçteki sitokin dalgalanmalarından bağımsız bir kararlılık sergilediğini göstermektedir. Sonuç olarak, matris genelindeki düşük korelasyon katsayıları, piyelonefritteki immün regülasyon bozukluğunun merkezi bir kontrol noktasından ziyade, hücreler arası heterojen bir ağ üzerinden şekillendiğini ve saptadığımız Breg kaybının sistemik sitokin düzeylerinden bağımsız primer bir hücresel defekt olabileceğini desteklemektedir.

Klinik laboratuvar verileri ile akan hücre ölçer analiz bulguları arasındaki çok değişkenli ilişkileri gösteren Spearman korelasyon matrisi (Şekil 4.27) ile ilgili çıkarımlar başlıklar halinde yorumlanmış ve gruplandırılmıştır.

Piyelonefritte doğal immünite stresi, lenfopeni ve pro-inflamatuar Th17 döngüsü: Piyelonefrit atakları sırasında doğal immün sistemin uyardığı akut faz yanıtı, kemik iliğinden yoğun bir nötrofil ve monosit mobilizasyonuna yol açmaktadır. Elde ettiğimiz WBC, nötrofil, monosit ve CRP arasındaki güçlü pozitif korelasyon matrisi bu akut doğal immün sistem infiltrasyonunu doğrulamaktadır. Ancak bu sürecin edinsel immün sistem popülasyonu üzerindeki etkisi belirgin bir lenfopeni tablosunun oluştuğunu göstermektedir.

İmmünopatolojik açıdan en dikkat çekici bulgularımızdan biri, periferik lenfosit sayısı azaldıkça ve NLR/SII indeksleri tırmandıkça, uyaransız bellek T hücre havuzundaki bazal IL-17A+ frekansının doğrusal olarak artmasıdır (r=-0,459 ve r=0,448). Bu durum, piyelonefritteki şiddetli doğal inflamasyon baskısıyla tüketilen periferik lenfosit popülasyonunda geriye kalan hücrelerin baskın olarak pro-inflamatuar Th17 fenotipine yöneldiğini göstermektedir.

Nötrofil kemotaksisinden sorumlu ana sitokin olan IL-17A'nın bazal düzeydeki bu süreğen yüksekliği, kemik iliğini sürekli uyararak nötrofil/lökosit oranını (NLR) artırmakta ve patogenezde doku hasarını kronikleştiren tehlikeli bir pro-inflamatuar feedback mekanizması yaratmaktadır

Edinsel immünite düzeyinde ‘kompansatuar Th2 kaymasının’ sistemik ve hücresel yapısı: Çalışmamızın kavramsal bulgusunu oluşturan ‘kompansatuar Th2 kayması’ hipotezi, bu genişletilmiş çok değişkenli korelasyon analiziyle sistemik ve hücresel düzeyde kesin olarak kanıtlanmıştır. Total lökosit (WBC) yükü, monosit sayıları ve birleşik sistemik indekslerin (SII, PLR), bellek T hücrelerinin in vitro uyarım altındaki IL-4 üretim performansı (IL-4 SI ve uyarılmış frekanslar) ile sergilediği tutarlı pozitif korelasyonlar ($r > 0,51$) bu durumu göstermekredir. Doğal immün sistemin tetikleyicileri ve sistemik inflamasyon şiddeti ne kadar yüksekse, edinsel immün sistem popülasyonu buna reaktif olarak o derece güçlü bir anti-inflamatuar Th2 (IL-4) yanıtı inşa etmektedir.

Bu durum, organizmanın piyelonefritteki kontrolden çıkma eğiliminde olan nötrofilik parankim hasarını dizginlemek ve renal dokuyu akut nekroz/fibrozis süreçlerinden korumak amacıyla, edinsel immünite sitokin düzeyinde topyekün bir baskılama barikatı kurmaya zorladığını göstermektedir. Trombosit sayılarının uyarılmış IL-4 ve IFN-γ frekanslarıyla kurduğu pozitif ilişkiler (r=0,585 ve r=0,437),

trombo-inflamasyon süreçlerinde trombositlerin edinsel T hücre sitokin salınım rezervini doğrudan destekleyen birer immünomodülatör ortak olarak işlev gördüğünü desteklemektedir.

Periferik süren inflamasyonun hücresel reaktivitesini düşürmesi: T Hücre Bitkinliği: Aktivasyon kapasitesini gösteren Stimülasyon İndeksleri (SI) ile uyaransız bazal hücre frekansları arasında saptanan ileri derecede anlamlı ve güçlü negatif korelasyonlar (özellikle IL-17 SI ile bazal bellek IL-17 arasındaki r=-0,682 değeri), piyelonefritli hastalardaki fonksiyonel T hücresi zafiyetinin niteliğini açıklamaktadır. Uyaransız bellek havuzunda bazal IFN-γ, IL-17 ve IL-4'ün kendi aralarında gösterdiği pozitif senkronizasyon, hastaların sirkülasyonda poliklonal ve süreğen bir 'immün alarm' yükü taşıdığını kanıtlamaktadır.

Ancak bu süreğen bazal aktivasyon, hücrelerin mitokondriyal ve sitokin üretim rezervlerini tüketmektedir. Periferik kanda uyaransız koşullarda pro-inflamatuar sitokin salgısı ne kadar yüksekse, hücreler dışsal ve maksimal bir aktivasyon sinyali (PMA/Ionomycin) aldıklarında o derece yetersiz kalmakta ve uyarım indeksleri (SI) düşmektedir. Bu çarpıcı ters orantı modeli, piyelonefritte edinsel pro-inflamatuar bellek popülasyonunu kronik antijenik stres nedeniyle "T hücresi bitkinliğine" (T cell exhaustion) sürüklendiğinin deneysel ve matematiksel göstergesidir.

Tfh eksikliği ve breg alt gruplarının karşılıklı tükenme (exhaustion) dinamikleri: lenfosit havuzundaki daralmanın, antijene özgü B hücresi yanıtlarının ve regülatör B hücre (Breg) gelişiminin ana yönlendiricisi olan $PD1^{+}CXCR5^{+}$ Tfh hücre frekanslarında da anlamlı bir düşüşe yol açtığı saptanmıştır (r=0,445). Tfh hücrelerinin hem IL-4 SI hem de bazal bellek IL-4 frekansıyla gösterdiği doğrusal pozitif korelasyonlar (r=0,48), kompansatuar anti-inflamatuar stratejinin (Th2) başarısının, Tfh-B hücresi germinal merkez iş birliğinin korunabilme derecesine bağlı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, piyelonefritteki şiddetli inflamasyona sekonder gelişen Tfh eksikliği, B hücre popülasyonunun ihtiyaç duyduğu T hücre desteğini keserek, çalışmamızın odak noktası olan Breg zafiyetini tetikleyen primer mekanizmalardan biri olarak öne çıkmaktadır.

Bu regülatör zafiyetin hücresel hiyerarşisi, Breg alt gruplarının Th17 ekseniyle kurduğu paradoksal ilişkilerle ortaya çıkmaktadır. IL-17 SI (korunmuş T hücre fonksiyonel rezervi) ile bellek benzeri $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg hücre frekansı

arasındaki güçlü pozitif korelasyon (r=0,590), T hücrelerinin fonksiyonel stabilitesini korumasında olgun bellek Breg'lerinin birincil koruyucu kalkan olduğunu kanıtlamaktadır.

Buna karşılık, uyarılmış total pro-inflamatuar IL-17A çıktısı yükseldikçe, erken evre geçişsel $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg frekansının anlamlı şekilde gerilemesi (r=-0,428), aktivasyon anında yükselen pro-inflamatuar sitokin fırtınasının, regülatör sistemin bu en hassas ve gelişimsel aşamadaki hücresini ($CD38^{hi}$ Breg) doğrudan baskıladığını veya enfeksiyon odağı olan renal parankime göç ettirerek periferik dolaşımdan sildiğini (immün-tüketim) ortaya koymaktadır.

Radyolojik hasar ve hematüri ekseninde lokal-sistemik bağlantıların klinik değerlendirmesi: çalışmamızda laboratuvar düzeyinde saptadığımız bu karmaşık immünopatolojik mekanizmalar, radyolojik ve klinik doku hasarı parametreleriyle kusursuz bir korelasyon entegrasyonu sunmaktadır. Tomografik bir doku yoğunluk kriteri olan Hounsfield Unit (HU) değerlerinin NLR ile gösterdiği güçlü negatif ilişki (r=-0,561), laboratuvardaki nötrofilik inflamasyon ve lenfopeni şiddetinin doğrudan renal parankimde ödem, pürülan eksüdasyon ve radyolojik doku yoğunluğu kaybı olarak klinik pratikte karşılık bulduğunu göstermektedir. NLR tırmandıkça, böbrekteki akut infiltrasyon ve doku hasarı derinleşmekte ve bu durum tomografik yoğunluğu (HU) aşağı çekmektedir.

Lokal doku bütünlüğünün bozulmasının (bariyer hasarı) doğrudan idrar göstergesi olan hematüri (idrar eritrosit yükü) ile periferik dolaşımdaki $CD4^{+}FOXP3^{+}$ Treg frekansı arasında saptanan pozitif korelasyon (r=0,499, p=0,013) ise lokal-sistemik feedback reaksiyonunun net bir kanıtıdır. Böbrekteki bariyer hasarı ve doku yıkımı derinleştikçe, edinsel immün sistem hasarı sınırlamak amacıyla sirkülasyona daha fazla Treg mobilize etmektedir.

Ancak, önceki analizlerimizde saptadığımız üzere, piyelonefritteki asıl regülatör hasarın Breg popülasyonunun seçici kaybından (Breg/Treg oranındaki dramatik çöküşten) kaynaklanması, Treg'lerin sirkülasyonda yüksek frekanslarda kalsalar dahi, yanlarında sinerji kuracakları bir Breg ortağı bulunmadığı için bu lokal doku hasarını (hematüriyi) tek başlarına durdurmada yetersiz kaldıklarını göstermektedir.

Sonuç: Özetle, entegre korelasyon haritamız piyelonefrit patogenezinde şu bütüncül modeli doğrulamaktadır: Şiddetli doğal immünite stresi ve lenfopeni periferde Tfh ve geçişsel Breg hücrelerinin kaybıyla (regülatör zafiyet) sonuçlanırken, bazal uyarılması yüksek pro-inflamatuar bellek hücrelerini fonksiyonel bitkinliğe sürüklemektedir; organizma ise bu hücresel çöküşü ve buna bağlı gelişen doku hasarını (HU düşüşü ve hematüri) lökosit/monosit bağımlı reaktif bir kompansatuar Th2 (IL-4) sitokin barikatıyla dengelemeye çalışmaktadır.

(NOT: Korelasyon matrisinin sol üst kadranı, piyelonefrit patogenezindeki şiddetli sistemik inflamasyonu ve doğal immün aktivasyonu yansıtmaktadır. Nötrofil-Lenfosit Oranı (NLR) ve Sistemik İmmün-İnflamasyon İndeksi (SII) gibi yeni nesil inflamatuar belirteçlerin, klasik akut faz reaktanları (CRP) ile sergilediği bu homojen ve güçlü pozitif korelasyon, hasta kohortundaki akut enfeksiyon yükünün ciddiyetini metodolojik olarak doğrulamaktadır.

Dolaşımdaki miyeloid seri elemanları (WBC ve Monositler) ile bellek T hücrelerinin IL-4 reaktivite kapasiteleri (SI ve Uyaranlı frekanslar) arasında saptanan pozitif korelasyon bölgeleri, tezin temel hipotezini görselleştirmektedir. Dokuya infiltre olan monosit/makrofaj yükü arttıkça edinsel sistemin IL-4 üretimini artırması, hasarlı dokuda (böbrekte) pro-inflamatuar inflamasyonu dizginlemek ve doku tamirini (M2 makrofaj polarizasyonu üzerinden) başlatmak amacıyla kurulan doğal-edinsel çapraz iletişimini (crosstalk) kanıtlamaktadır.

Korelasyon analizinin en çarpıcı bulgusu, bazal (uyaransız) pro-inflamatuar bellek hücre frekansları (IFN-γ ve IL-17A) ile bu hücrelerin uyarım sonrası reaktivite kapasitelerini gösteren Stimülasyon İndeksleri (SI) arasındaki negatif (beyaz renkli) korelasyonlardır. Bu ters orantı, hücrelerin periferik kanda bazal olarak ne kadar çok uyarılmış (inflame) durumdalarsa, yeni bir antijenik veya mitojenik uyarı karşısında o kadar tepkisiz kaldıklarını göstermektedir. Bu veri, piyelonefrit hastalarının pro-inflamatuar bellek popülasyonunda 'T hücresi bitkinliğini (exhaustion)' matematiksel bir model olarak ortaya koymaktadır.

Regülatör T ve B hücre popülasyonlarının sistemik inflamasyon belirteçlerinden (CRP, WBC) büyük oranda bağımsız (zayıf korele) hareket etmesi, bu hücrelerin piyelonefrit akut atağı sırasında sayısal veya fonksiyonel olarak

periferik dinamiklere entegre olamadığını, yani regülatör ağın sistemik inflamatuar yanıtla senkronizasyonunu kaybettiğini (regülatör zafiyet) desteklemektedir.

Klinik laboratuvar verileri ile akan hücre ölçer analiz bulguları (T helper sitokin polarizasyon oranları) arasındaki çok değişkenli ilişkileri gösteren Spearman korelasyon matrisi (Şekil 4.28) ile ilgili çıkarımlar başlıklar halinde yorumlanmış ve gruplandırılmıştır.

Sistemik doğal inflamasyon şiddetinin edinsel Th2 kaymasını tetikleyici rolü: Çalışmamızın ikinci çok değişkenli korelasyon matrisinden elde edilen en önemli çıktılardan biri, doğal immünite aktivasyonunun (WBC, nötrofil) ve sistemik inflamasyon yükünün (SII, PLR), edinsel immünite polarizasyon oranları olan IFN-γ/IL-4 ve IL-17/IL-4 ile gösterdiği güçlü ve net negatif korelasyonlardır ($r \approx -0,55$). Rapor edilen bu negatif korelasyonlar, patofizyolojik olarak anti-inflamatuar karakterdeki IL-4 sitokininin total edinsel popülasyon içindeki ağırlığının artmasına bağlıdır. Periferik nötrofil ve lökosit baskısı arttıkça, birleşik inflamasyon indeksleri (SII ve PLR) yükseldikçe, edinsel immün sistemin genel bazda pro-inflamatuar Th1 (IFN-γ) ve Th17 (IL-17) eksenlerinden uzaklaşarak Th2 (IL-4) yönüne kaydığı doğrulanmaktadır.

Bu veri, piyelonefritte saptadığımız ‘kompansatuar Th2 kayması’ modelinin, doğal immün sistem kaynaklı inflamasyonun şiddetiyle doğrudan yönlendirilen, doz-bağımlı bir homeostatik direnç ve parankimal dokuyu koruma mekanizması olduğunu kanıtlamaktadır. Organizma, doğal immün sistem elemanlarının yarattığı yıkıcı pro-inflamatuar baskıyı, edinsel havuzun IL-4 üretim kapasitesini reaktif olarak artırarak dengelemeye çalışmaktadır.

Trombositlerin Breg fonksiyonunu ve Th2 polarizasyonunu destekleyen rolü: Dolaşımdaki trombosit sayısının, $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ bellek benzeri Breg hücrelerinin popülasyon düzeyindeki anti-inflamatuar kapasitesini yansıtan IL-4/$CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranı ile güçlü pozitif korelasyon göstermesi ($r=0,581$, $p=0,002$), trombo-inflamasyon süreçlerine dair tezin özgünlüğünü desteklemektedir. Trombositlerin, total edinsel immün sistem düzeyindeki IL-17/IL-4 oranıyla ters orantılı ilişkisi ($r=-0,416$), bu hücrelerin anti-inflamatuar Th2 odağını destekleyici bir rol üstlendiğini göstermektedir.

Literatürde aktif trombositlerin, regülatör B hücrelerinin farklılaşmasını ve IL-4 salınım kapasitelerini yüzey ligandları (örneğin CD40L-CD40 aksı) veya salgısal medyatörler aracılığıyla doğrudan stimüle edebildiği gösterilmiştir. Piyelonefrit seyrinde gözlenen trombosit mobilizasyonunun, sayısal olarak çökmüş olan bellek benzeri Breg hücrelerinin fonksiyonel kalitesini (popülasyon düzeyindeki IL-4 reaktivite ağırlığını) artırarak sistemik regülasyona stratejik bir katkı sağladığı ileri sürülebilir.

Breg popülasyonlarının sitokin potansiyeli ve sistemik inflamasyonu baskılama gücü: Piyelonefrit patogenezinde periferik Breg popüasyonunda saptadığımız niceliksel düşüşün, edinsel immünitenin sitokin dengeleri üzerindeki yansımaları, literatürdeki feedback (geri bildirim) mekanizmalarıyla tamamen uyumlu bir patofizyolojik model sunmaktadır. Korelasyon analizinde hem bellek benzeri ($CD27^{+}$) hem de geçişsel ($CD38^{hi}$) Breg indekslerinde, IL-4/Breg ve IL-17/Breg oranlarının kendi içlerinde çok güçlü pozitif korelasyonlar göstermesi ($CD27^{+}$ için r=0,546; CD38hi için r=0,865), efektif Th2 ve Th17 yanıtlarının periferik regülatör B hücre yetersizliği zemininde eş zamanlı olarak tetiklendiğini işaret etmektedir.

Literatürde Breg hücrelerinin, salgıladıkları IL-10 aracılığıyla hem pro-inflamatuar Th1/Th17 yanıtlarını hem de edinsel Th2 polarizasyonunu homeostatik sınırlar içinde baskıladığı net olarak bilinmektedir. Piyelonefritli hastalarda ana fren mekanizması olan Breg popülasyonu sayısal olarak zafiyete uğradığında, T helper hücresel havuzu üzerindeki bu regülatör baskı ortadan kalkmaktadır. Bu zafiyet karşısında organizma, doku hasarını sınırlamak adına total T helper odağını agresif bir şekilde anti-inflamatuar karakterdeki Th2 (IL-4) aksına kaydırmaktadır.

Nitekim bu durum, bellek benzeri Breg eksikliği zemininde tırmanışa geçen Th2 ağırlığının (IL-4/ $CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg indeksi), total T helper havuzunun küresel pro-inflamatuar polarizasyon göstergeleri olan IFN-γ/IL-4 (r=-0,512) ve IL-17/IL-4 (r=-0,672) oranlarını dramatik şekilde aşağı çekmesiyle doğrulanmaktadır. Aynı şekilde geçişsel Breg kompartmanındaki baskılanmaya paralel olarak yükselen Th2/Breg dengesi de (IL-4/$CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ Breg), genel IFN-γ/IL-4 oranını anlamlı derecede baskılamaktadır (r=-0,459).

Bu doğrusal ilişkiler bütünsel olarak değerlendirildiğinde; piyelonefrit akut atağı sırasında sayısal olarak çöken Breg havuzunun yarattığı regülatör boşluğun,

edinsel immün sistem tarafından total sirkülasyondaki IL-4 salgısı artırılarak kompanse edilmeye çalışıldığını göstermektedir. Sonuç olarak, regülatör hücrelerin niceliksel kaybından doğan periferik tolerans kırılması, organizma tarafından edinsel sitokin ağında 'Th2 polarizasyon lehine' saptanan bir ağırlık değişimiyle (kompansatuar shift) dengelenmekte ve bu oransal kayma pro-inflamatuar Th1/Th17 sitokin fırtınasını sistemik düzeyde efektif bir şekilde frenlemektedir.

Akut fazdan rezolüsyon fazına geçiş: Çalışmamızda elde edilen çok değişkenli korelasyon analizlerinin bütünü, piyelonefrit hastalarının klinik ve hücresel profillerinin, literatürde tanımlanan klasik 'hiper-akut' inflamasyon fazından ziyade, 'akut sonrası rezolüsyon (iyileşme/sönümlenme) fazına' geçiş dönemini yansıtıyor olabileceğini düşündürmektedir. Her ne kadar periferik kan sayımlarında total lökosit (WBC), nötrofil ve monosit yükleri ile CRP gibi akut faz reaktanları arasında güçlü pozitif korelasyonlar saptansa da, bu doğal aktivasyon hücrelerinin edinsel immün sistem sitokin oranları (IFN-γ/IL-4 ve IL-17/IL-4) ile sergilediği ileri derecede anlamlı negatif korelasyonlar ($r \approx -0,55$) bu hipotezi kuvvetle desteklemektedir.

Literatürde, bakteriyel enfeksiyonların akut tepe noktasında Th1 (IFN-γ) ve Th17 (IL-17) sitokin fırtınasının dominant olduğu, doku hasarının bu evrede maksimuma ulaştığı bilinmektedir. Ancak bizim hasta kohortumuzda, sistemik lökosit ve nötrofil baskısı arttıkça pro-inflamatuar/anti-inflamatuar oranların paydasındaki Th2 (IL-4) ağırlığının tırmanışa geçmesi, immün sistemin yıkıcı akut fazı geride bıraktığına ve doku bütünlüğünü korumak adına aktif bir sönümlenme (resolution of inflammation) sürecini başlattığına işaret etmektedir.

Bu kronolojik kaymanın bir diğer moleküler kanıtı, dolaşımdaki trombosit yükünün IL-4/$CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg indeksi ile gösterdiği güçlü pozitif eşleşmedir ($r = 0,581$, $p = 0,002$). Akut inflamasyonun ilk evrelerinde pro-inflamatuar medyatörler salgılayan trombositler, inflamasyonun sönümlenme evresinde edinsel regülatör mekanizmaları ve doku tamir süreçlerini destekleyen sinyallere aracılık etmektedir. Sayısal olarak zafiyete uğramış olan bellek benzeri Breg popülasyonunun yarattığı regülatör boşluğa rağmen, T helper sisteminin güçlü bir Th2 (IL-4) yanıtı inşa ederek IFN-γ/IL-4 ve IL-17/L-4 pro-inflamatuar eksenlerini baskılaması, immün sistemin homeostazı yeniden sağlama gayretini doğrulamaktadır. Sonuç olarak bulgularımız, piyelonefrit patogenezinde örnekleme yapılan zaman diliminin, aktif

doku yıkımının sürdüğü soliter bir akut evreye değil; edinsel immünitenin sitokin dengelerini değiştirerek inflamasyonu kontrol altına almaya çalıştığı ve organizmayı iyileşme fazına taşıdığı dinamik bir geçiş penceresine (interim phase) karşılık gelebileceğini ortaya koymaktadır.

Akut çözünme yetersizliği ve kronikleşen inflamasyon paradoksu: Çalışmamızda elde edilen çok değişkenli korelasyon verileri, alternatif ve güçlü bir patofizyolojik yaklaşımla değerlendirildiğinde, hasta kohortundaki immünolojik profilin akut bir sönümlenme (rezolüsyon) sürecinden ziyade, baskılanamayan ve kronikleşme eğilimine giren süreğen bir inflamasyon tablosunu yansıttığı şeklinde de yorumlanabilir. Her ne kadar periferik lökosit (WBC) ve nötrofil yükü artarken, edinsel immün sistem polarizasyon indeksleri olan IFN-γ/IL-4 ve IL-17/IL-4 oranlarının anlamlı derecede gerilemesi ($r \approx -0,55$) ilk etapta bir sönümlenme evresi izlenimi verse de, bu durumun arkasındaki hücresel mekanizma edinsel efektör T hücrelerinin fonksiyonel tükenmişliği (exhaustion) olabilir.

Bakteriyel piyelonefrit patogenezinde patojen temizlenmesinin sağlanması için güçlü bir pro-inflamatuar Th1/Th17 yanıtı elzemdir. Sistemik inflamasyon indeksleri (SII, PLR) yükselirken edinsel sitokin dengesinin zorunlu olarak Th2 (IL-4) yönüne yönelmesi, akut fazın başarıyla sonlandığının değil, aksine patojeni ortadan kaldıracak efektör mekanizmaların yetersiz kaldığının ve immün sistemin kronik bir anerji evresine girdiğinin göstergesi olabilir. Th2 ağırlıklı bu oransal kayma doku hasarını geçici olarak sınırlasa da, bakteriyel eradikasyonu engelleyerek enfeksiyonun parankimde fokal olarak persistans göstermesine ve inflamasyonun kronikleşmesine zemin hazırlamaktadır.

Bu kronik kalıcılık ve regülatör sistem başarısızlığı hipotezi, matristeki en önemli noktalardan biri olan olan IL-17/$CD19^{+}CD24^{hi}CD27^{+}$ Breg oranı ile sistemik IL-17/Treg oranı arasındaki güçlü pozitif korelasyonla ($r = 0,626$, $p = 0,001$) doğrudan desteklenmektedir. Pro-inflamatuar Th17 eksenindeki yükselişin hem Treg hem de bellek benzeri Breg regülatör sistemlerini aynı anda ve paralel bir kinetikle zafiyete uğratması, organizmanın inflamasyonu sönümlendirecek efektif bir hücresel frene sahip olmadığını kanıtlamaktadır.

Koruyucu regülatör mekanizmaların (Breg ve Treg) pro-inflamatuar baskı altında senkronize bir şekilde çökmesi, sistemin homeostazı yeniden sağlama

(rezolüsyon) kapasitesini ortadan kaldırmaktadır. Sonuç olarak, yüksek lökosit stresi altında edinsel sitokin oranlarının aşağı çekilmesi, başarılı bir iyileşme fazından ziyade; regülatör zafiyetin kalıcı hale geldiği, patojen temizlenmesinin aksadığı ve sistemin kısır döngüye girerek kronik inflamatuar patikaya saptığı subakut/kronik bir geçiş evresini (interim persistent phase) modellemektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen veriler, piyelonefrit patogenezinde doğal immün sistem kökenli sistemik inflamasyon baskısının, edinsel immün sistem kompartmanında kronik bir 'T hücre tükenmişliği' (exhaustion) ve regülatör B hücre (Breg) alt gruplarında senkronize bir zafiyete yol açtığını; organizmanın ise bu hasarı özgün bir 'kompansatuar Th2 sitokin kayması' ile dengelemeye çalıştığını ilk kez bütüncül bir oransal modelleme ile ortaya koymuştur. Bu öncü bulgular doğrultusunda, gelecekteki klinik ve translational (uygulamalı) immünoloji çalışmalarına yönelik şu stratejik araştırmalar önerilmektedir:

Breg alt gruplarında gözlenen niceliksel kaybın, apoptoz mekanizmalarıyla mı yoksa hücrelerin göç (homing) dinamikleriyle mi ilişkili olduğunun anlaşılması için Annexin-V/PI sağkalım analizleri planlanabilir. Ayrıca, Breg'lerin majör fonksiyonel ve literatüre uyumlu sitokini olan IL-10 (ve transkripsiyon faktörü Blimp-1/Bcl-6 dengesi) hücresel düzeyde uyarımlı deneyler ile analize dahil edilerek, edinsel Th17 baskısının Breg kaynaklı IL-10 üretim kapasitesini moleküler düzeyde nasıl bloke ettiği araştırılabilir.

Periferik kan verileri, böbrek dokusundaki gerçek immün dinamikleri tam olarak yansıtmayabilir. Periferik kanda azalan regülatör hücrelerin (Breg'lerin) ve tırmanan Th17/nötrofil odağının böbrek dokusuna göç edip etmediğini doğrulamak adına, dokuya spesifik integrin ve kemokin reseptör profillerinin (CXCR3, CCR6, CXCR5 gibi) ekspresyonları incelenmelidir. Mümkün olan deneysel tasarımlarda veya hayvan modellerinde, renal biyopsi örnekleri üzerinde immünhistokimya (IHC) veya Spatial Transcriptomics (Uzamsal Transkriptomik) analizleri yapılarak, hücresel infiltrasyonun fokal mimarisi doku üzerinde doğrudan haritalandırma yapılabilir.

Hastalarımızda edinsel immün yanıtın Th2/IL-4 yönüne saptırılması, sistemin akut fazdan rezolüsyon fazına geçiş gayretini ya da patojen temizlenmesinin aksadığı kronik persistent bir evreyi yansıtıyor olabilir. Bu iki güçlü patofizyolojik alternatifin kronolojik netliğe kavuşturulabilmesi için, hastaların sadece akut atak anında değil; tedavi sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. aylardaki vizitlerinde de kan ve idrar örneklerinin toplandığı boylamsal (longitudinal) bir kohort tasarımı uygulanmalıdır. Böylece,

kompansatuar Th2 kaymasının kalıcı bir immün yorgunluğa mı dönüştüğü, yoksa başarılı bir doku tamir fazıyla mı sonlandığı kesin olarak ayırt edilebilecektir.

Gelecek çalışmalarda, bu T hücre tükenmişliğinin derinliğini ve moleküler mekanizmasını aydınlatmak amacıyla, bellek T hücreleri üzerinde tek hücre düzeyinde transkriptom analizi (Single-Cell RNA Sequencing - scRNA-Seq) yapılması ve PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 gibi immün kontrol noktası (immune checkpoint) reseptörlerinin ekspresyon yoğunluklarının akan hücre ölçer ile yüzey düzeyinde doğrulanması yapılabilir.

Tfh hücrelerinin değerlendirilmesinde sadece yüzey fenotipine odaklanmak yerine, ICOS ve CD38 gibi aktivasyon belirteçlerinin analize dahil edilmesi, lokal enfeksiyonlara karşı gelişen hümoral yanıt dinamiklerini daha spesifik yansıtabilir.

Total Treg frekansı yerine; naif (resting) ve yüksek baskılayıcı kapasiteye sahip aktif/efektör Treg alt gruplarının ayrımının yapılması, sirkülasyondaki havuzun iç kompozisyonundaki kaymaları yakalamak adına önemlidir.

Elde edilen bulguların genellenebilirliğini artırmak amacıyla, bütçe ve imkan doğrultusunda daha geniş ve farklı klinik evrelerdeki hastaları kapsayan çok merkezli çalışmaların yürütülmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abbas, A. K. ., Lichtman, A. H. ., Pillai, Shiv., & Baker, D. L. . (2022). *Cellular and molecular immunology*. Elsevier.
2. Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, *16*(4), 343–353. https://doi.org/10.1038/ni.3123
3. Johnstone, K. F., & Herzberg, M. C. (2022). Antimicrobial peptides: Defending the mucosal epithelial barrier. *Frontiers in Oral Health*, *3*. https://doi.org/10.3389/froh.2022.958480
4. James, O. J., Vandereyken, M., & Swamy, M. (2020). *Isolation, Characterization, and Culture of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes* (pp. 141–152). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0338-3_13
5. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., Park, E. J., & Kiyono, H. (2002). Autocrine IL-15 Mediates Intestinal Epithelial Cell Death Via the Activation of Neighboring Intraepithelial NK Cells. *The Journal of Immunology*, *169*(11), 6187–6192. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6187
6. Phillipson, M., & Kubes, P. (2019). The Healing Power of Neutrophils. *Trends in Immunology*, *40*(7), 635–647. https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.001
7. Kumar, V., & Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, *10*(11), 1325–1334. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.012
8. Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, *33*(5), 657–670. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011
9. Schwartz, C., Eberle, J. U., & Voehringer, D. (2016). Basophils in inflammation. *European Journal of Pharmacology*, *778*, 90–95. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.049
10. Karasuyama, H., Shibata, S., Yoshikawa, S., & Miyake, K. (2021). Basophils, a neglected minority in the immune system, have come into the limelight at last. *International Immunology*, *33*(12), 809–813. https://doi.org/10.1093/intimm/dxab021
11. Yamanishi, Y., & Karasuyama, H. (2016). Basophils and mast cells in immunity and inflammation. *Seminars in Immunopathology*, *38*(5), 535–537. https://doi.org/10.1007/s00281-016-0582-0
12. Rosenberg, H. F., Dyer, K. D., & Foster, P. S. (2013). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *13*(1), 9–22. https://doi.org/10.1038/nri3341
13. Felton, J. M., Lucas, C. D., Dorward, D. A., Duffin, R., Kipari, T., Vermeren, S., Robb, C. T., MacLeod, K. G., Serrels, B., Schwarze, J., Haslett, C., Dransfield, I., & Rossi, A. G. (2018). Mer-mediated eosinophil efferocytosis regulates resolution of allergic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *142*(6), 1884-1893.e6. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.01.029
14. Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, *12*(11), 1035–1044. https://doi.org/10.1038/ni.2109
15. Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, *17*(6), 349–362. https://doi.org/10.1038/nri.2017.28
16. Gasteiger, G., D'Osualdo, A., Schubert, D. A., Weber, A., Bruscia, E. M., & Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *Journal of Innate Immunity*, *9*(2), 111–125. https://doi.org/10.1159/000453397
17. Lendeckel, U., Venz, S., & Wolke, C. (2022). Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*, *8*(2), 12. https://doi.org/10.1007/s40828-022-00163-4
18. Cox, N., Pokrovskii, M., Vicario, R., & Geissmann, F. (2021). Origins, Biology, and Diseases of Tissue Macrophages. *Annual Review of Immunology*, *39*(1), 313–344. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-111748
19. Chen, S., Saeed, A. F. U. H., Liu, Q., Jiang, Q., Xu, H., Xiao, G. G., Rao, L., & Duo, Y. (2023). Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 207. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1
20. Herb, M., & Schramm, M. (2021). Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants*, *10*(2), 313. https://doi.org/10.3390/antiox10020313

21. Mosser, D. M., Hamidzadeh, K., & Goncalves, R. (2021). Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cellular & Molecular Immunology*, *18*(3), 579–587. https://doi.org/10.1038/s41423-020-00541-3
22. Mildner, A., & Jung, S. (2014). Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity*, *40*(5), 642–656. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016
23. O'Neill, D. W., & Bhardwaj, N. (2005). Differentiation of Peripheral Blood Monocytes into Dendritic Cells. *Current Protocols in Immunology*, *67*(1). https://doi.org/10.1002/0471142735.im22f04s67
24. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, *20*(1), 621–667. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828
25. Wu, L., & Liu, Y.-J. (2007). Development of Dendritic-Cell Lineages. *Immunity*, *26*(6), 741–750. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.006
26. Venketaraman, V. (2010). Dendritic cells in infectious disease, hypersensitivity, and autoimmunity. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 137. https://doi.org/10.2147/IJICMR.S11978
27. Gardner, A., de Mingo Pulido, Á., & Ruffell, B. (2020). Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00924
28. Stockwin, L. H., McGonagle, D., Martin, I. G., & Blair, G. E. (2000). Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunology & Cell Biology*, *78*(2), 91–102. https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00888.x
29. Mandal, A., & Viswanathan, C. (2015). Natural killer cells. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, *8*(2), 47–55. https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2014.11.006
30. Mace, E. M. (2023). Human natural killer cells: Form, function, and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *151*(2), 371–385. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.09.022
31. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869
32. Del Zotto, G., Marcenaro, E., Vacca, P., Sivori, S., Pende, D., Della Chiesa, M., Moretta, F., Ingegnere, T., Mingari, M. C., Moretta, A., & Moretta, L. (2017). Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *92*(2), 100–114. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21508
33. Chen, S., Zhu, H., & Jounaidi, Y. (2024). Comprehensive snapshots of natural killer cells functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 302. https://doi.org/10.1038/s41392-024-02005-w
34. Eguizabal, C., Zenarruzabeitia, O., Monge, J., Santos, S., Vesga, M. A., Maruri, N., Arrieta, A., RiÃ±Ã³n, M., Tamayo-Orbegozo, E., Amo, L., Larrucea, S., & Borrego, F. (2014). Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy: Pluripotent Stem Cells-Derived NK Cells as an Immunotherapeutic Perspective. *Frontiers in Immunology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00439
35. Jönsson, F., & Daëron, M. (2012). Mast Cells and Company. *Frontiers in Immunology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00016
36. Theoharides, T. C., Alysandratos, K.-D., Angelidou, A., Delivanis, D.-A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., & Kalogeromitros, D. (2012). Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1822*(1), 21–33. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.014
37. Christ, P., Sowa, A. S., Froy, O., & Lorentz, A. (2018). The Circadian Clock Drives Mast Cell Functions in Allergic Reactions. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01526
38. Maurer, M., & Pucillo, C. (2018). What we know (and don't know) about the biology and functions of mast cells and basophils. *Immunological Reviews*, *282*(1), 5–7. https://doi.org/10.1111/imr.12645
39. Galli, S. J., & Tsai, M. (2008). Mast cells: Versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *Journal of Dermatological Science*, *49*(1), 7–19. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.09.009
40. PRUSSIN, C., & METCALFE, D. (2006). 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *117*(2), S450–S456. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.016

41. Jain, A., & Pasare, C. (2017). Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *The Journal of Immunology*, *198*(10), 3791–3800. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602000
42. Wang, R., Lan, C., Benlagha, K., Camara, N. O. S., Miller, H., Kubo, M., Heegaard, S., Lee, P., Yang, L., Forsman, H., Li, X., Zhai, Z., & Liu, C. (2024). The interaction of innate immune and adaptive immune system. *MedComm*, *5*(10). https://doi.org/10.1002/mco2.714
43. Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S33–S40. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017
44. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, *14*(S2), 49. https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1
45. Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science*, *327*(5963), 291–295. https://doi.org/10.1126/science.1183021
46. Omar, I., Alakhras, A., Mutwali, S., & Bakhiet, M. (2025). Molecular insights into T cell development, activation and signal transduction (Review). *Biomedical Reports*, *22*(6), 1–8. https://doi.org/10.3892/br.2025.1972
47. Chi, H., Pepper, M., & Thomas, P. G. (2024). Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. *Cell*, *187*(9), 2052–2078. https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.03.037
48. Saravia, J., Chapman, N. M., & Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cellular & Molecular Immunology*, *16*(7), 634–643. https://doi.org/10.1038/s41423-019-0220-6
49. Zhu, J. (2018). T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(10), a030338. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030338
50. Kan, A. K. C., Tang, W. T., & Li, P. H. (2024). Helper T cell subsets: Development, function and clinical role in hypersensitivity reactions in the modern perspective. *Heliyon*, *10*(9), e30553. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30553
51. McGeachy, M. J., & Cua, D. J. (2008). Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity*, *28*(4), 445–453. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.001
52. Yosef, N., Shalek, A. K., Gaublomme, J. T., Jin, H., Lee, Y., Awasthi, A., Wu, C., Karwacz, K., Xiao, S., Jorgolli, M., Gennert, D., Satija, R., Shakya, A., Lu, D. Y., Trombetta, J. J., Pillai, M. R., Ratcliffe, P. J., Coleman, M. L., Bix, M., … Regev, A. (2013). Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature*, *496*(7446), 461–468. https://doi.org/10.1038/nature11981
53. Bhaumik, S., & Basu, R. (2017). Cellular and Molecular Dynamics of Th17 Differentiation and its Developmental Plasticity in the Intestinal Immune Response. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00254
54. Pratama, A., & Vinuesa, C. G. (2014). Control of TFH cell numbers: why and how? *Immunology & Cell Biology*, *92*(1), 40–48. https://doi.org/10.1038/icb.2013.69
55. Jogdand, G. M., Mohanty, S., & Devadas, S. (2016). Regulators of Tfh Cell Differentiation. *Frontiers in Immunology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00520
56. Weinstein, J. S., Herman, E. I., Lainez, B., Licona-Limón, P., Esplugues, E., Flavell, R., & Craft, J. (2016). TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nature Immunology*, *17*(10), 1197–1205. https://doi.org/10.1038/ni.3554
57. Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R., & Deenick, E. K. (2013). The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *13*(6), 412–426. https://doi.org/10.1038/nri3447
58. Benoist, C., & Mathis, D. (2012). Treg Cells, Life History, and Diversity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(9), a007021–a007021. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007021
59. Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nature Immunology*, *17*(11), 1322–1333. https://doi.org/10.1038/ni.3540
60. Ohue, Y., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science*, *110*(7), 2080–2089. https://doi.org/10.1111/cas.14069
61. Boonpiyathad, T., Sözener, Z. C., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2020). The role of treg cell subsets in allergic disease. In *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* (Vol. 38, Number 3, pp. 139–149). Allergy and Immunology Society of Thailand. https://doi.org/10.12932/AP-030220-0754
62. Sharabi, A., Tsokos, M. G., Ding, Y., Malek, T. R., Klatzmann, D., & Tsokos, G. C. (2018). Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(11), 823–844. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.148

63. Attias, M., Al-Aubodah, T., & Piccirillo, C. A. (2019). Mechanisms of human FoxP3+ Treg cell development and function in health and disease. *Clinical and Experimental Immunology*, *197*(1), 36–51. https://doi.org/10.1111/cei.13290
64. Rowe, J. H., Ertelt, J. M., & Way, S. S. (2012). Foxp3 + regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection. In *Immunology* (Vol. 136, Number 1, pp. 1–10). https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03551.x
65. Elgueta, R., De Vries, V. C., & Noelle, R. J. (2010). The immortality of humoral immunity. *Immunological Reviews*, *236*(1), 139–150. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00924.x
66. Ueno, H., Schmitt, N., Palucka, A. K., & Banchereau, J. (2010). Dendritic cells and humoral immunity in humans. *Immunology & Cell Biology*, *88*(4), 376–380. https://doi.org/10.1038/icb.2010.28
67. Cooper, M. D. (2015). The early history of B cells. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 191–197. https://doi.org/10.1038/nri3801
68. Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131*(4), 959–971. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046
69. Wang, Y., Liu, J., Burrows, P. D., & Wang, J.-Y. (2020). *B Cell Development and Maturation* (pp. 1–22). https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_1
70. Jansen, K., Cevhertas, L., Ma, S., Satitsuksanoa, P., Akdis, M., & van de Veen, W. (2021). Regulatory B cells, A to Z. *Allergy*, *76*(9), 2699–2715. https://doi.org/10.1111/all.14763
71. Mickael, M.-E., Bieńkowska, I., & Sacharczuk, M. (2022). An Update on the Evolutionary History of Bregs. *Genes*, *13*(5), 890. https://doi.org/10.3390/genes13050890
72. Neu, S. D., & Dittel, B. N. (2021). Characterization of Definitive Regulatory B Cell Subsets by Cell Surface Phenotype, Function and Context. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.787464
73. Baba, Y., Saito, Y., & Kotetsu, Y. (2020). Heterogeneous subsets of B-lineage regulatory cells (Breg cells). *International Immunology*, *32*(3), 155–162. https://doi.org/10.1093/intimm/dxz068
74. Catalán, D., Mansilla, M. A., Ferrier, A., Soto, L., Oleinika, K., Aguillón, J. C., & Aravena, O. (2021). Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.611795
75. Carter, N. A., Rosser, E. C., & Mauri, C. (2012). Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, *14*(1), R32. https://doi.org/10.1186/ar3736
76. Berthelot, J.-M., Jamin, C., Amrouche, K., Le Goff, B., Maugars, Y., & Youinou, P. (2013). Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, *80*(1), 18–22. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.04.010
77. Glass, M. C., Glass, D. R., Oliveria, J.-P., Mbiribindi, B., Esquivel, C. O., Krams, S. M., Bendall, S. C., & Martinez, O. M. (2022). Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets. *Cell Reports*, *39*(3), 110728. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110728
78. Bensussan, A. (2014). IL-10 Producing Regulatory B cells: Where Are We? *MOJ Immunology*, *1*(1). https://doi.org/10.15406/moji.2014.01.00003
79. Hasan, M. M., Thompson-Snipes, L., Klintmalm, G., Demetris, A. J., O'Leary, J., Oh, S., & Joo, H. (2019). CD24hiCD38hi and CD24hiCD27+ Human Regulatory B Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics. *The Journal of Immunology*, *203*(8), 2110–2120. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900488
80. Bradford, H. F., & Mauri, C. (2021). *Purification and Immunophenotypic Characterization of Human CD19+CD24hiCD38hi and CD19+CD24hiCD27+ B Cells* (pp. 77–90). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1237-8_5
81. Simon, Q., Pers, J.-O., Cornec, D., Le Pottier, L., Mageed, R. A., & Hillion, S. (2016). In-depth characterization of CD24highCD38high transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *137*(5), 1577-1584.e10. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.014
82. Zhu, Q., Rui, K., Wang, S., & Tian, J. (2021). Advances of Regulatory B Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.592914
83. Barber, A. E., Norton, J. P., Spivak, A. M., & Mulvey, M. A. (2013). Urinary Tract Infections: Current and Emerging Management Strategies. *Clinical Infectious Diseases*, *57*(5), 719–724. https://doi.org/10.1093/cid/cit284

84. Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., Gillespie, B., & Sobel, J. D. (2000). Urinary Tract Infection. *Annals of Epidemiology*, *10*(8), 509–515. https://doi.org/10.1016/S1047-2797(00)00072-7
85. Tullus, K., & Shaikh, N. (2020). Urinary tract infections in children. *The Lancet*, *395*(10237), 1659–1668. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30676-0
86. Zeng, Z., Zhan, J., Zhang, K., Chen, H., & Cheng, S. (2022). Global, regional, and national burden of urinary tract infections from 1990 to 2019: an analysis of the global burden of disease study 2019. *World Journal of Urology*, *40*(3), 755–763. https://doi.org/10.1007/s00345-021-03913-0
87. Davenport, M., Mach, K. E., Shortliffe, L. M. D., Banaei, N., Wang, T.-H., & Liao, J. C. (2017). New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nature Reviews Urology*, *14*(5), 296–310. https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.20
88. Chu, C. M., & Lowder, J. L. (2018). Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *219*(1), 40–51. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.231
89. McLellan, L. K., & Hunstad, D. A. (2016). Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in Molecular Medicine*, *22*(11), 946–957. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003
90. Nicolle, L. E. (2013). Urinary Tract Infection. *Critical Care Clinics*, *29*(3), 699–715. https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.014
91. Sheerin, N. S., & Glover, E. K. (2019). Urinary tract infection. *Medicine*, *47*(9), 546–550. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.06.008
92. Geerlings, S. E. (2016). Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections. *Microbiology Spectrum*, *4*(5). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0002-2012
93. Medina, M., & Castillo-Pino, E. (2019). An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic Advances in Urology*, *11*. https://doi.org/10.1177/1756287219832172
94. Smelov, V., Naber, K., & Bjerklund Johansen, T. E. (2016). Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. *European Urology Supplements*, *15*(4), 71–80. https://doi.org/10.1016/j.eursup.2016.04.002
95. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 269–284. https://doi.org/10.1038/nrmicro3432
96. Neal, D. E. (2008). Complicated Urinary Tract Infections. *Urologic Clinics of North America*, *35*(1), 13–22. https://doi.org/10.1016/j.ucl.2007.09.010
97. Schmiemann, G., Kniehl, E., Gebhardt, K., Matejczyk, M. M., & Hummers-Pradier, E. (2010). The Diagnosis of Urinary Tract Infection. *Deutsches Ärzteblatt International*. https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0361
98. Wagenlehner, F. M. E., Bjerklund Johansen, T. E., Cai, T., Koves, B., Kranz, J., Pilatz, A., & Tandogdu, Z. (2020). Epidemiology, definition and treatment of complicated urinary tract infections. *Nature Reviews Urology*, *17*(10), 586–600. https://doi.org/10.1038/s41585-020-0362-4
99. Belyayeva, M., Leslie, S. W., Rout, P., & Jeong, J. M. (2026). *Acute Pyelonephritis*.
100. Lane, D. R., & Takhar, S. S. (2011). Diagnosis and Management of Urinary Tract Infection and Pyelonephritis. *Emergency Medicine Clinics of North America*, *29*(3), 539–552. https://doi.org/10.1016/j.emc.2011.04.001
101. Gupta, K., Grigoryan, L., & Trautner, B. (2017). Urinary Tract Infection. *Annals of Internal Medicine*, *167*(7), ITC49–ITC64. https://doi.org/10.7326/AITC201710030
102. Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2018). Acute Pyelonephritis in Adults. *New England Journal of Medicine*, *378*(1), 48–59. https://doi.org/10.1056/NEJMcp1702758
103. Ademola, B., Atanda, A., Aji, S., & Abdu, A. (2020). Clinical, morphologic and histological features of chronic pyelonephritis: An 8-year review. *Nigerian Postgraduate Medical Journal*, *27*(1), 37. https://doi.org/10.4103/npmj.npmj_109_19
104. Efremova, O. A., Kamyshnikova, L. A., Veysalov, S. E., Sviridova, M. S., Obolonkova, N. I., Gayvoronskaya, M. A., & Wuraola, M. (2022). Investigation on the Association of Cardiovascular Markers with Severity of Chronic Pyelonephritis. *Archives of Razi Institute*, *77*(1), 315–321. https://doi.org/10.22092/ARI.2021.356614.1883
105. Nojaba, L., & Guzman, N. (2026). *Nephrolithiasis (Kidney Stones) (Archived)*.
106. Worcester, E. M., & Coe, F. L. (2008). Nephrolithiasis. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, *35*(2), 369–391. https://doi.org/10.1016/j.pop.2008.01.005
107. Mayans, L. (2019). Nephrolithiasis. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, *46*(2), 203–212. https://doi.org/10.1016/j.pop.2019.02.001
108. Sakhaee, K. (2008). Nephrolithiasis as a systemic disorder. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *17*(3), 304–309. https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3282f8b34d

109. Wigner, P., Grębowski, R., Bijak, M., Szemraj, J., & Saluk-Bijak, J. (2021). The Molecular Aspect of Nephrolithiasis Development. *Cells*, *10*(8), 1926. https://doi.org/10.3390/cells10081926
110. Khan, S. R. (2014). Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis. *Translational Andrology and Urology*, *3*(3), 256–276. https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2014.06.04
111. Thongboonkerd, V., Yasui, T., & Khan, S. R. (2021). Editorial: Immunity and Inflammatory Response in Kidney Stone Disease. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.795559
112. Brener, Z. Z., Winchester, J. F., Salman, H., & Bergman, M. (2011). Nephrolithiasis: Evaluation and Management. *Southern Medical Journal*, *104*(2), 133–139. https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e318206f6bd
113. Eisner, B. H., Deshmukh, S. M., & Lange, D. (2014). Struvite Stones. In *Urinary Stones* (pp. 48–56). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781118405390.ch5
114. Ciccarese, F., Brandi, N., Corcioni, B., Golfieri, R., & Gaudiano, C. (2021). Complicated pyelonephritis associated with chronic renal stone disease. *La Radiologia Medica*, *126*(4), 505–516. https://doi.org/10.1007/s11547-020-01315-7
115. Nicola, R., & Menias, C. O. (2018). *Urinary Obstruction, Stone Disease, and Infection* (pp. 223–228). https://doi.org/10.1007/978-3-319-75019-4_20
116. Littman, D. R., & Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation. *Cell*, *140*(6), 845–858. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.021
117. Thakur, A., Mikkelsen, H., & Jungersen, G. (2019). Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. *Journal of Immunology Research*, *2019*, 1–24. https://doi.org/10.1155/2019/1356540
118. Jones-Carson, J., Balish, E., & Uehling, D. T. (1999). Susceptibility of immunodeficient gene-knockout mice to urinary tract infection. *The Journal of Urology*, *161*(1), 338–341.
119. Mizutani, M., Hasegawa, S., Matsushige, T., Ohta, N., Kittaka, S., Hoshide, M., Kusuda, T., Takahashi, K., Ichihara, K., & Ohga, S. (2017). Distinctive inflammatory profile between acute focal bacterial nephritis and acute pyelonephritis in children. *Cytokine*, *99*, 24–29. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.06.012
120. Nickavar, A., Safaeian, B., & Valavi, E. (2016). Evaluation and Comparison of Urinary Cytokines for the Diagnosis of Acute Pyelonephritis. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, *4*(4). https://doi.org/10.5812/pedinfect.38877
121. Biswas, P. S. (2018). IL-17 in Renal Immunity and Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, *201*(11), 3153–3159. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801042
122. Helbig, S., Achkar, J. M., Jain, N., Wang, X., Gialanella, P., Levi, M., & Fries, B. C. (2013). Diagnosis and inflammatory response of patients with candiduria. *Mycoses*, *56*(1), 61–69. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02201.x
123. Sabah Ibrahim, N., & J Al-Hashimy, A. B. (2022). STUDY THE CORRELATION BETWEEN (IL-17A, IL-4) LEVELS AND SOME VIRULENCE GENES IN UROPATHOGENIC E. COLI AMONG IRAQI WOMEN. *Biochem. Cell. Arch*, *22*(1), 1381–1386. https://connectjournals.com/03896.2022.22.1381
124. Ahmadikia, K., Kordbacheh, P., Shadpour, P., Nami, S., Sarrafnejad, A., Mahmoodi, M., Safara, M., Rokni, M., Yarahmadi, M., Mahmoudi, S., Khezri, M., & Zaini, F. (2018). Increased Urine Interleukin-17 and Interleukin-22 Levels in Patients With Candidal Urinary Tract Infection. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, *12*(1), 33–39.
125. Stepanova, N., Tolstanova, G., Driyanska, V., & Kolesnyk, M. (2018). FP008HYPEROXALURIA-ASSOCIATED ALTERATIONS OF THE INTESTINAL COLONIZATION RESISTANCE IN PATIENTS WITH RECURRENT PYELONEPHRITIS. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *33*(suppl_1), i52–i52. https://doi.org/10.1093/ndt/gfy104.FP008
126. Alikhan, M. A., Huynh, M., Kitching, A. R., & Ooi, J. D. (2018). Regulatory T cells in renal disease. *Clinical & Translational Immunology*, *7*(1). https://doi.org/10.1002/cti2.1004
127. Ernandez, T., & Mayadas, T. N. (2016). The Changing Landscape of Renal Inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, *22*(2), 151–163. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.12.002
128. van de Veen, W., Stanic, B., Wirz, O. F., Jansen, K., Globinska, A., & Akdis, M. (2016). Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *138*(3), 654–665. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.006
129. Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M. R., Isenberg, D. A., & Mauri, C. (2013). CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17

differentiation. *Science Translational Medicine*, *5*(173). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005407
130. Long, W., Zhang, H., Yuan, W., Lan, G., Lin, Z., Peng, L., & Dai, H. (2021). The Role of Regulatory B cells in Kidney Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683926
131. Oleinika, K., Mauri, C., & Salama, A. D. (2019). Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, *15*(1), 11–26. https://doi.org/10.1038/s41581-018-0074-7
132. Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, *32*(1), 129–140. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009
133. Li, T., Yu, Z., Qu, Z., Zhang, N., Crew, R., & Jiang, Y. (2019). Decreased number of CD19+CD24hiCD38hi regulatory B cells in Diabetic nephropathy. *Molecular Immunology*, *112*, 233–239. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.05.014
134. Razi, A., Ghiaei, A., Dolatabadi, F. K., & Haghighi, R. (2024). Unraveling the association of bacteria and urinary stones in patients with urolithiasis: an update review article. *Frontiers in Medicine*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1401808
135. Chien, T.-M., Lu, Y.-M., Li, C.-C., Wu, W.-J., Chang, H.-W., & Chou, Y.-H. (2021). A retrospective study on sex difference in patients with urolithiasis: who is more vulnerable to chronic kidney disease? *Biology of Sex Differences*, *12*(1), 40. https://doi.org/10.1186/s13293-021-00382-3
136. Patti, L., & Leslie, S. W. (2026). *Acute Renal Colic*.
137. Fisang, C., Anding, R., Müller, S. C., Latz, S., & Laube, N. (2015). Urolithiasis. *Deutsches Ärzteblatt International*. https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0083
138. Lee, D. H., Chang, I. H., Kim, J. W., Chi, B. H., & Park, S. Bin. (2015). Usefulness of Nonenhanced Computed Tomography for Diagnosing Urolithiasis without Pyuria in the Emergency Department. *BioMed Research International*, *2015*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2015/810971
139. Serinken, M., Karcioglu, O., Turkcuer, I., Ozkan, H., Keysan, M., & Bukiran, A. (2008). Analysis of clinical and demographic characteristics of patients presenting with renal colic in the emergency department. *BMC Research Notes*, *1*(1), 79. https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-79
140. Mbouché, L. O., Mbassi, A. A., Mekeme, J. M., Makon, A. S. N., Fouda, P. J., & Angwafo III, F. F. (2021). Nephrectomy in a Patient with Medullary Sponge Kidney Associated with Severe Nephrocalcinosis and Nephrolithiasis: A Rare Condition. *Open Journal of Urology*, *11*(09), 332–341. https://doi.org/10.4236/oju.2021.119032
141. Christopoulos, C., Antoniou, N., Thempeyioti, A., Calender, A., & Economopoulos, P. (2005). Familial multiple endocrine neoplasia type I: the urologist is first on the scene. *BJU International*, *96*(6), 884–887. https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05731.x
142. Deniz Doğan, S., Yurtseven, Ş., & Köse Tosunöz, İ. (2024). Pain experiences of nephrolithiasis patients planned for percutaneous nephrolithotomy: A qualitative study. *International Journal of Urological Nursing*, *18*(2). https://doi.org/10.1111/ijun.12410
143. Tanwar, R., Rathore, K., & Rohilla, M. (2015). Nephrocutaneous fistula as the initial manifestation of asymptomatic nephrolithiasis: A call for radical management. *Urology Annals*, *7*(1), 94. https://doi.org/10.4103/0974-7796.148632
144. Aneke, I. A. (2022). Diagnosing renal disease. *InnovAiT: Education and Inspiration for General Practice*, *15*(1), 54–60. https://doi.org/10.1177/17557380211053030
145. Mba, B., MD, B. P. L., MD, N. H., Seares, J. M., & Joshi, U. (2019). All in the Stream. *Journal of Hospital Medicine*, *14*(12), 777–781. https://doi.org/10.12788/jhm.3286
146. Swonke, M. L., Mahmoud, A. M., Farran, E. J., Dafashy, T. J., Kerr, P. S., Kosarek, C. D., & Sonstein, J. (2018). Early Stone Manipulation in Urinary Tract Infection Associated with Obstructing Nephrolithiasis. *Case Reports in Urology*, *2018*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2018/2303492
147. DeYoung, T. H., Whittington, J. R., Ennen, C. S., & Poole, A. T. (2019). Pyelonephritis in Pregnancy: Relationship of Fever and Maternal Morbidity. *American Journal of Perinatology Reports*, *09*(04), e366–e371. https://doi.org/10.1055/s-0039-1695746
148. Alsultan, M., Kliea, M., Zedan, A. A., & Basha, K. (2025). Loin pain hematuria syndrome (LPHS) induced by pyelonephritis in diabetes mellitus female with brucellosis: a diagnosis of challenge. *Annals of Medicine & Surgery*, *87*(6), 3068–3070. https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000003312

149. Barzouhi, A. el, van Buren, M., & van Nieuwkoop, C. (2018). Renal and Splenic Infarction in a Patient with Familial Hypercholesterolemia and Previous Cerebral Infarction. *American Journal of Case Reports*, *19*, 1463–1466. https://doi.org/10.12659/AJCR.911990
150. Ciccarese, F., Brandi, N., Corcioni, B., Golfieri, R., & Gaudiano, C. (2021). Complicated pyelonephritis associated with chronic renal stone disease. *La Radiologia Medica*, *126*(4), 505–516. https://doi.org/10.1007/s11547-020-01315-7
151. Sorokin, I., Mamoulakis, C., Miyazawa, K., Rodgers, A., Talati, J., & Lotan, Y. (2017). Epidemiology of stone disease across the world. *World Journal of Urology*, *35*(9), 1301–1320. https://doi.org/10.1007/s00345-017-2008-6
152. Bichler, K.-H., Eipper, E., Naber, K., Braun, V., Zimmermann, R., & Lahme, S. (2002). Urinary infection stones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *19*(6), 488–498. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00088-2
153. Skolarikos, A., Geraghty, R., Somani, B., Tailly, T., Jung, H., Neisius, A., Petřík, A., Kamphuis, G. M., Davis, N., Bezuidenhout, C., Lardas, M., Gambaro, G., Sayer, J. A., Lombardo, R., & Tzelves, L. (2025). European Association of Urology Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Urolithiasis. *European Urology*, *88*(1), 64–75. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2025.03.011
154. Wagenlehner, F. M. E., Cek, M., Naber, K. G., Kiyota, H., & Bjerklund-Johansen, T. E. (2012). Epidemiology, treatment and prevention of healthcare-associated urinary tract infections. *World Journal of Urology*, *30*(1), 59–67. https://doi.org/10.1007/s00345-011-0757-1
155. Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754
156. Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2018). Acute Pyelonephritis in Adults. *New England Journal of Medicine*, *378*(1), 48–59. https://doi.org/10.1056/NEJMcp1702758
157. Barut, O., Kutlu Demirkol, M., Bilecan, E. B., Sahinkanat, T., & Resim, S. (2020). The Delta Neutrophil Index is an Early Predictive Marker of Acute Pyelonephritis in Patients with Ureteral Stone. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, *30*(11), 1149–1154. https://doi.org/10.29271/jcpsp.2020.11.1149
158. Mitroi, V., Mastalier, B., Chitca, D. D., Fieraru, A., Mitroi, I. M., Popovici, V., Ozon, E. A., & Săndulescu, O. (2026). Etiopathogenesis and Antibacterial Therapy Approach in Patients with Acute Obstructive Pyelonephritis—A Retrospective Study. *Antibiotics*, *15*(2), 164. https://doi.org/10.3390/antibiotics15020164
159. DenOtter, T. D., & Schubert, J. (2026). *Hounsfield Unit*.
160. Razi, A., Ghiaei, A., Dolatabadi, F. K., & Haghighi, R. (2024). Unraveling the association of bacteria and urinary stones in patients with urolithiasis: an update review article. *Frontiers in Medicine*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1401808
161. Rodríguez-Plata, I. T., Medina-Escobedo, M., Basulto-Martínez, M., Avila-Nava, A., Gutiérrez-Solis, A. L., Méndez-Domínguez, N., & Lugo, R. (2021). Implementation of a Technique Based on Hounsfield Units and Hounsfield Density to Determine Kidney Stone Composition. *Tomography*, *7*(4), 606–613. https://doi.org/10.3390/tomography7040051
162. Onen, A. (2020). Grading of Hydronephrosis: An Ongoing Challenge. *Frontiers in Pediatrics*, *8*. https://doi.org/10.3389/fped.2020.00458
163. İlhan, N. F., & Kalkanli Tas, S. (2013). The Role of Regulatory B Cells in Organ Transplantations. *Turkiye Klinikleri J Immun Allergy-Special Topics*, *6*(2), 29–35.
164. Wang, C., Xu, H., Gao, R., Leng, F., Huo, F., Li, Y., Liu, S., Xu, M., & Bai, J. (2022). CD19+CD24hiCD38hi regulatory B cells deficiency revealed severity and poor prognosis in patients with sepsis. *BMC Immunology*, *23*(1), 54. https://doi.org/10.1186/s12865-022-00528-x
165. Heinemann, K., Wilde, B., Hoerning, A., Tebbe, B., Kribben, A., Witzke, O., & Dolff, S. (2016). Decreased IL-10(+) regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, *45*(4), 312–316. https://doi.org/10.3109/03009742.2015.1126346
166. Mauri, C., & Menon, M. (2017). Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(3), 772–779. https://doi.org/10.1172/JCI85113
167. Chekol Abebe, E., Asmamaw Dejenie, T., Mengie Ayele, T., Dagnew Baye, N., Agegnehu Teshome, A., & Tilahun Muche, Z. (2021). The Role of Regulatory B Cells in Health and Diseases: A Systemic Review. *Journal of Inflammation Research*, *Volume 14*, 75–84. https://doi.org/10.2147/JIR.S286426
168. Dasgupta, S., Dasgupta, S., & Bandyopadhyay, M. (2020). Regulatory B cells in infection, inflammation, and autoimmunity. *Cellular Immunology*, *352*, 104076. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104076

169. Bentebibel, S.-E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R. A., Blankenship, D., Xu, H., Pascual, V., Banchereau, J., Garcia-Sastre, A., Palucka, A. K., Ramilo, O., & Ueno, H. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Science Translational Medicine*, *5*(176). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005191
170. Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*, *41*(4), 529–542. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004
171. Ueno, H. (2016). Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *Journal of Clinical Immunology*, *36*(S1), 34–39. https://doi.org/10.1007/s10875-016-0268-3
172. Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M. A., Arlehamn, C. L., Su, L. F., Cubas, R., Davis, M. M., Sette, A., Haddad, E. K., Poignard, P., & Crotty, S. (2013). Human Circulating PD-1+CXCR3−CXCR5+ Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. *Immunity*, *39*(4), 758–769. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.031
173. Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., Lavecchio, E. M., Punaro, M., Pascual, V., Banchereau, J., & Ueno, H. (2011). Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity*, *34*(1), 135. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.009
174. Belkaid, Y., & Rouse, B. T. (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology*, *6*(4), 353–360. https://doi.org/10.1038/ni1181
175. Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.-J., & Rees, A. J. (2013). The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature Reviews Immunology*, *13*(10), 738–753. https://doi.org/10.1038/nri3523
176. Peroumal, D., & Biswas, P. S. (2024). Kidney-Specific Interleukin-17 Responses During Infection and Injury. *Annual Review of Immunology*, *42*(1), 35–55. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-052523-015141
177. Mulay, S. R., Kulkarni, O. P., Rupanagudi, K. V., Migliorini, A., Darisipudi, M. N., Vilaysane, A., Muruve, D., Shi, Y., Munro, F., Liapis, H., & Anders, H.-J. (2013). Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1β secretion. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(1), 236–246. https://doi.org/10.1172/JCI63679
178. Ortega Martell, J. A. (2020). Immunology of urinary tract infections. *GMS Infectious Diseases*, *8*, Doc21. https://doi.org/10.3205/id000065
179. Abraham, S. N., & Miao, Y. (2015). The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nature Reviews Immunology*, *15*(10), 655–663. https://doi.org/10.1038/nri3887
180. Gause, W. C., Wynn, T. A., & Allen, J. E. (2013). Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, *13*(8), 607–614. https://doi.org/10.1038/nri3476
181. Lee, S., Huen, S., Nishio, H., Nishio, S., Lee, H. K., Choi, B.-S., Ruhrberg, C., & Cantley, L. G. (2011). Distinct Macrophage Phenotypes Contribute to Kidney Injury and Repair. *Journal of the American Society of Nephrology*, *22*(2), 317–326. https://doi.org/10.1681/ASN.2009060615
182. Rogers, N. M., Ferenbach, D. A., Isenberg, J. S., Thomson, A. W., & Hughes, J. (2014). Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. *Nature Reviews Nephrology*, *10*(11), 625–643. https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.170
183. Wu, J., Hayes, B. W., Phoenix, C., Macias, G. S., Miao, Y., Choi, H. W., Hughes, F. M., Todd Purves, J., Lee Reinhardt, R., & Abraham, S. N. (2020). A highly polarized TH2 bladder response to infection promotes epithelial repair at the expense of preventing new infections. *Nature Immunology*, *21*(6), 671–683. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0688-3
184. Sivick, K. E., Schaller, M. A., Smith, S. N., & Mobley, H. L. T. (2010). The innate immune response to uropathogenic Escherichia coli involves IL-17A in a murine model of urinary tract infection. *The Journal of Immunology*, *184*(4), 2065–2075. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902386
185. Cervantes-Díaz, R., Sosa-Hernández, V. A., Romero-Ramírez, S., Torres-Ruiz, J., Pérez-Fragoso, A., Meza-Sánchez, D. E., Gómez-Martín, D., & Maravillas-Montero, J. L. (2022). Circulating B10 regulatory cells are decreased in severe and critical COVID-19. *Journal of Leukocyte Biology*, *112*(2), 333–337. https://doi.org/10.1002/JLB.5COVCRA0721-387RR
186. Lukens, J. R., & Anand, P. K. (2020). Adapt(ed) to repair — TH2 immune responses in the bladder promote recurrent infections. *Nature Immunology*, *21*(6), 597–599. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0689-2

187. Xu, C., Zhang, M., Li, K., Ni, M., Bai, Y., Zhang, J., Song, X., & Wang, J. (2019). CD24hiCD38hi B regulatory cells from patients with end plate inflammation presented reduced functional potency. *International Immunopharmacology*, *70*, 295–301. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.034
188. Carter, N. A., Vasconcellos, R., Rosser, E. C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M. R., Flavell, R. A., & Mauri, C. (2011). Mice Lacking Endogenous IL-10–Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *186*(10), 5569–5579. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100284
189. Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nature Immunology*, *12*(6), 492–499. https://doi.org/10.1038/ni.2035
190. Baessler, A., & Vignali, D. A. A. (2024). T Cell Exhaustion. *Annual Review of Immunology*, *42*(1), 179–206. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-090222-110914
191. Mosser, D. M., & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, *226*(1), 205–218. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x
192. Sinuani, I., Beberashvili, I., Averbukh, Z., & Sandbank, J. (2013). Role of IL-10 in the progression of kidney disease. *World Journal of Transplantation*, *3*(4), 91. https://doi.org/10.5500/wjt.v3.i4.91
193. Rugo, H. S., O'Hanley, P., Bishop, A. G., Pearce, M. K., Abrams, J. S., Howard, M., & O'Garra, A. (1992). Local cytokine production in a murine model of Escherichia coli pyelonephritis. *Journal of Clinical Investigation*, *89*(3), 1032–1039. https://doi.org/10.1172/JCI115644
194. Ahmadi, S., Rosenblad, T., Sabari, S., Linden, M., Brandström, P., Chao, S. M., Svanborg, C., & Ambite, I. (2025). Analysis of the Innate Immune Response to Febrile UTI in Infants: Evidence of an Acute Cytokine Storm. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *44*(12), 1188–1200. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000004914
195. Mittal, R., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009). Evaluation of interleukin-10 production in Pseudomonas aeruginosa induced acute pyelonephritis. *Journal of Infection and Public Health*, *2*(3), 136–140. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2009.06.002

EKLER

EK-1.Etik Kurul Onayı

EK-2.Bilgilendirilmiş Onam Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: "Böbrek Taşı ile İlişkili Piyelonefritte Yardımcı T Hücre ve Düzenleyici B Hücre Cevaplarının Araştırılması"

Sorumlu Araştırıcının Adı: Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ
Diğer Araştırıcıların Adı: Prof. Dr. Nilgün IŞIKSAÇAN, Doç. Dr. Arif KALKANLI, Uzman Dr. Cem Tuğrul GEZMİŞ ve MSc. Bengü AKÇAM ÇELİK
Destekleyici (varsa): Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından desteklenen 41159 numaralı projedir.

Sayın gönüllü, "Böbrek Taşı ile İlişkili Piyelonefritte Yardımcı T Hücre ve Düzenleyici B Hücre Cevaplarının Araştırılması" isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde "Böbrek Taşı ile İlişkili Piyelonefrit" hastalığının görülmüş olmasıdır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, İmmünoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ sorumluluğu altındadır.

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?
İdrar yolu enfeksiyonları (İYE'ler) dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen en yaygın enfeksiyonlardan biridir ve prevalansı (yaygınlığı) yaş, cinsiyet ve coğrafya gibi faktörlere bağlı olarak değişir. İYE içerisinde yer alan piyelonefrit renal pelvisi ve parankimini tutan enfeksiyöz ve inflamatuar bir hastalıktır. Renal skarlaşmaya (yaralarına) ve böbrek fonksiyonlarının bozulmasına yol açabilir. Piyelonefrit oluşumunda sıklıkla bakteri türleri etkendir. Ayrıca piyelonefrit oluşum riskini arttıran faktörler arasında böbrek taşı vardır. Çeşitli nedenler ile oluşan böbrek taşı zaman içerisinde kronik enfeksiyöz ve inflamatuar süreçleri tetikleyen önemli faktörlerden biri haline gelir. Kronik böbrek yetmezliğini tetikleyen patolojiler arasında böbrek taşlarının varlığına bağlı olarak gelişen piyelonefrit ön sıralarda yer almaktadır. Piyelonefritin şiddeti ve sonucu birçok açıdan enfeksiyöz ajanların üropatojenitesi, ürodinami bozukluğu ve immünolojik cevap ile belirlenir. Gelişen enfeksiyona karşı konak savunmasında immün hücreler ve birbirleriyle ilişkileri etkili rol oynar. Bu nedenle immün hücrelerin oranlarının ve cevaplarının araştırılması hastalığın patogenezinin aydınlatılması açısından önem kazanmaktadır.

Araştırmamızın amacı;
- Böbrek taşı olan piyelonefrit hastalarında hastalığın seyrine göre değişen klinik semptomların kaydedilmesi,
- Piyelonefrit hasta grubu içerisinde böbrek taşının eşlik ettiği piyelonefrit sıklığının öğrenilmesi,
- Sağlıklı bireylere kıyasla böbrek taşı olan piyelonefrit hastalarında enfeksiyona karşı konak savunmasında rol oynayan yardımcı T hücre (Th) alt gruplarının ve regülatör B hücre (Breg) oranlarının akan hücre ölçer cihazında analiz edilerek değişen hücre oranlarının araştırılması,

- Böbrek taşı olan piyelonefrit hastalarında konak savunmasında hücre ve sitokinlerle immün cevabın ve homeostazın araştırılarak edinsel immün sistemin dinamikleri hakkında bilgi sağlanması,
- Akan hücre ölçer cihazıyla analiz edilen immünolojik parametrelerinin başarısının denetlenmesi,
- Bu süreçte toplanacak verilerin bilimsel toplantılarda sözlü sunum ve poster sunumu gibi araçlarla paylaşılması ile farkındalığın artırılmasıdır.

Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği'ne başvuran hastaların muayenesi, klinik değerlendirilmesi ve takibi Üroloji Uzmanı-Doç. Dr. Arif KALKANLI ve Üroloji Uzmanı-Dr. Cem Tuğrul GEZMİŞ tarafından yapılacaktır. Yapılan klinik değerlendirmenin ardından böbrek taşı ile ilişkili piyelonefrit tanısı konulan hastalar ve sağlıklı kontroller dahil edilme ve dışlanma kriterlerine uygun olmaları koşuluyla gerekli onamları alındıktan sonra çalışmaya dahil edilecektir. Gerçekleştirilecek deney protokolüne uygun olarak aynı miktarda tam kan alınıp eş zamanlı olarak çalışılacaktır. Çalışmaya böbrek taşı ile ilişkili piyelonefrit tanısı konan 25 hastanın ve kontrol grubu olarak yaş uyumlu 25 sağlıklı bireyin dahil edilmesi planlanmıştır.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım? (Bu bölüm aynen korunacaktır)
Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalasanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çalışmaya devam etmenizin sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

Bu çalışmaya katılırsam beni ne bekliyor?
Çalışmamızda yer almak üzere onam vermenizin ardından böbrek taşının eşlik ettiği piyelonefrit hastalığınız nedeni ile yapılan rutin tetkik ve tedavi işlemleriniz sırasında sizden yalnızca 10-15 ml venöz kan isteyeceğiz. Alınan kan deneylerin gerçekleşeceği donanımlı laboratuvara iletilecektir. Hedeflenen hücrelerin tespit edilebilmesi için çeşitli deneysel prosedürlerin uygulanacaktır, hücre oranları ve fonksiyon değişiklikleri akan hücre ölçer cihazında analiz edilecektir. Bu sayede çalışmamız böbrek taşı ile ilişkili piyelonefritte; Th ve Breg hücre alt tipleri arasındaki ilişki aydınlatılarak enfeksiyon durumunda immün homeostazın (dengenin) nasıl bozulduğu ve olası seyri hakkında fikir sağlayacaktır.
Araştırmamızın toplam süresi 12 aydır. Uygun hasta seçimi ve biyolojik örneklerin toplanması ve aynı zamanda örneklerin laboratuvarda akan hücre ölçer cihazı ile çalışması 8 ay süresince yapılacaktır.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?
1. Sayın gönüllü çalışmamız için sizden 10 – 15 ml venöz kan vermenizi isteyeceğiz. Bu toplam kan hacminin çok küçük bir yüzdesine denk gelmektedir ve bu sırada hafif ağrı hissetmeniz ve/veya morluk oluşması dışında olumsuz bir etki beklenmemektedir. Bu incelemelerle sizin hastalığınızı daha iyi anlamaya çalışacağız.
2. Araştırmadan dolayı göreceğiniz olası bir zararda gerekli her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacaktır; bu konudaki tüm harcalamalar da tarafımızdan karşılanacaktır.

Çalışmada yer almamın yararları nelerdir?
Araştırmaya katılmanız size ya da ailenize doğrudan yarar sağlamayabilir ancak araştırmacılara araştırılan hastalığın toplumdaki sıklığını öğrenebilmeleri, immünolojik açıdan hastalığın patogenezini aydınlatabilmeleri ve bu sayede geliştirilebilecek tedavi yöntemleri bulabilmeleri için katkı sağlayacaktır. Eğer incelemeler, sizin için önemli ama immün (bağışıklık) sisteminizle alakasız tıbbi sonuçlara ulaşırsa bunlar bu araştırma kapsamına alınmayacaktır ("rastlantısal bulgu" denilen), bu araştırmanın dışındaki bulguların ve onların sonuçlarının detaylı açıklamasını yapacak olan doktoruna haber verilecektir.

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir? (Bu bölüm aynen korunacaktır)
Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak? (Bu bölüm aynen korunacaktır)
Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?
Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ
GÖREVİ:
TELEFON :

ADI : Prof. Dr. Nilgün IŞIKSAÇAN
GÖREVİ:
TELEFON :

ADI : Doç. Dr. Arif KALKANLI
GÖREVİ:
TELEFON :

ADI : Uzman. Dr. Cem Tuğrul GEZMİŞ
GÖREVİ:
TELEFON :

ADI : MSc. Bengü AKÇAM ÇELİK
GÖREVİ: Sağlık Bilimleri Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi
TELEFON :

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)
İmmünoloji Anabilim dalında, Doç. Dr. Arif KALKANLI ve Uzm. Dr. Cem Tuğrul GEZMİŞ tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana

aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.
Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim).* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum. Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).
Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, aşağıda belirtilen bilgilerden Dr. Arif KALKANLI'yı ve Dr. Cem Tuğrul GEZMİŞ'i arayabileceğimi biliyorum.
TELEFON:
ADRES:

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

Görüşme tanığı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim
Adı soyadı, unvanı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

EK-3.Hastane İzin Belgesi

EK-4.İl Sağlık Müdürlüğü Onayı