



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ-İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERİTROSİT SÜSPANSİYONLARINDA DEPOLANMA SÜRECİNİN
T HÜCRE ALT GRUPLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Salih Haldun BAL

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2015



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ-İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

ERİTROSİT SÜSPANSİYONLARINDA DEPOLANMA SÜRECİNİN
T HÜCRE ALT GRUPLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Salih Haldun BAL

(DOKTORA TEZİ)


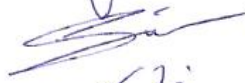



Danışman: Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL

Bursa-2015

Bu tez, Uludağ Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
UAP(T) – 2011/53 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne,

Bu tez, j¼rimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. H. Barbaros ORAL	
¼ye	Prof. Dr. G¼her G¼RAL	
¼ye	Prof. Dr. G¼nnur DENİZ	
¼ye	Doç. Dr. Ferah BUDAK	
¼ye	Doç. Dr. Yasemin HEPER	

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunun tarih,
sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	31
3.1. Kanların alınması ve örneklerin hazırlanması	31
3.1.1. Lökositi azaltılmamış eritrosit süspansiyonu örneklerinin elde edilmesi	32
3.1.2. Lökositi azaltılmış eritrosit süspansiyonu örneklerinin elde edilmesi	33
3.1.3. Örneklerin sonraki aşamalar için hazırlanması	34
3.2. Sitokinlerin çalışılacağı örnek plazmaların ayrıştırılması ve çalışılması	35
3.2.1. Reajenlerin ve örneklerin hazırlanması	35
3.2.2. Test prosedürü	36
3.2.3. Sitokin düzeyi sonuçlarının hesaplanması	38
3.3. Filtre edilmemiş eritrosit süspansiyonu örneklerinde flow-sitometrik ölçümler	38
3.3.1. Lenfosit alt gruplarının değerlendirilmesi	38
3.3.1.1. Th1, Th2, Th9, Th22 ve Treg protokolü	39
3.3.1.2. Th17 protokolü	40
3.4. Filtre edilmemiş eritrosit süspansiyonu örneklerinden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve transkripsiyon faktörlerinin çalışılması	41
3.4.1. Mononükleer hücrelerin ayrıştırılması	42
3.4.2. RNA izolasyonu	43
3.4.3. cDNA sentesi	44
3.4.4. Real Time PCR yöntemiyle transkripsiyon faktörlerinin çalışılması	45
3.4.4.1. 384 kuyucuklu panelle çalışma	46
3.4.4.2. 96 kuyucuklu panelle çalışma	47
3.4.4.3. PCR süreci	48
3.4.4.4. Veri analizi	48
3.5. İstatistiksel değerlendirme	48
4. BULGULAR.....	50
4.1. T hücre alt grupları için bulgular	50
4.2. Transkripsiyon faktörleri için bulgular	53
4.3. Sitokinler için bulgular	55
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	61
6. EKLER.....	78
7. KAYNAKLAR.....	90
8. TEŞEKKÜR.....	103
9. ÖZGEÇMİŞ.....	104

ÖZET

GİRİŞ: Allojeneik kan transfüzyonu komplikasyonu olan Transfüzyon İlişkili İmmün Modülasyonun (TRIM), allojeneik lökositlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışma ile TRIM mekanizmalarına yönelik yeni bilgiler elde etmek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: 10 bağışçıdan sağlanan tam kanlar eritrosit süspansiyonuna (ES) dönüştürüldükten sonra eşit iki bölüme ayrılarak bölümlerden birisi lökosit filtresinden geçirildi. Elde edilen lökosit azaltılmış (LA-ES) ve azaltılmamış (normal) ES'ler (N-ES) üç eşit parçaya ayrılarak 0, 21, ve 42 depo günleri için örnekler oluşturuldu. Bu örneklerin süpernatantlarında, ELISA yöntemi ile IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- α , TGF- β , IFN- γ düzeyleri ölçüldü. N-ES'lerde Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg hücreleri flow-sitometrik olarak hücre içi sitokin ekspresyonlarına göre araştırıldı. N-ES'lerde T hücre alt gruplarına ait transkripsiyon faktörleri T-bet, GATA3, PU.1, RORC2, AHR ve FoxP3 Real-Time PCR yöntemiyle araştırıldı.

BULGULAR: Hücre içi sitokinlerden TNF- α , IL-4 ve IL-5 düzeylerinin 21. günde arttığı; IFN- γ , IL-22 ve Foxp3 düzeylerinin azaldığı; CD4⁺CD25⁺CD127⁻ hücrelerin arttığı; transkripsiyon faktörlerinden TBX21, GATA3 ve SPI.1 düzeylerinin azaldığı; N-ES süpernatantında IL-22 düzeylerinin azaldığı ve TGF- β düzeylerinin arttığı saptandı ($p<0,05$). Hücre içi sitokinlerden TNF- α , IL-4, IL-5 ve IL-17A düzeylerinin 42. günde arttığı; IFN- γ düzeylerinin azaldığı; CD4⁺CD25⁺CD127⁻ hücrelerin arttığı; transkripsiyon faktörlerinden AHR, FOXP3 ve RORC2 düzeylerinin arttığı; LA-ES süpernatantında IL-17A düzeylerin arttığı saptandı ($p<0,05$). Aynı gün N-ES örneklerinde belirlenen TGF- β düzeylerindeki artış sınırdan anlamlı bulundu ($p=0,051$).

TARTIŞMA VE SONUÇ: Depolanma sürecinde N-ES'ler içinde aktivite kazanan Th2 (21. ve 42. günler), Th17 ve Treg (42. günler) hücreler ile süpernatanda biriken TGF- β TRIM fenomenine katkı sağlıyor olabilirler. Ancak TRIM etkisinin sadece N-ES'lerle değil, LA-ES'lerle de oluştuğunun düşünülmesi, lökosit dışı etkenlerin de TRIM mekanizmasında rol oynadığını ve yeni çalışmalara gerek olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: TRIM, İmmünmodülasyon, Transfüzyon, Yardımcı T hücre alt grupları, Lökoredüksiyon

SUMMARY

INTRODUCTION: Transfusion Related Immunomodulation (TRIM) is an allogeneic blood transfusion complication that is thought to be arised from allogeneic leukocytes. Purpose of this study is to obtain new knowledges about TRIM mechanisms.

MATERIAL AND METHODS: Red blood cell suspensions (RBCs) were separated from whole bloods that were donated from 10 blood donors. Every RBCs separated equal two portions. Leukoreduction conducted for one portion of them and achieved both leukoreduced RBCs (LR-RBCs) and non-luekoreduced (normal) (N-RBCs). LR-RBCs's and N-RBCs's were separated to three equal portions as the 0, 21 and 42 storage day samples. IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- α , TGF- β and IFN- γ levels were measured with ELISA method in all samples. Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 and Treg cells were evaluated with flow-cytometry method according to intracellular cytokine production in N-RBCs. Specific transcription factors (T-bet, GATA3, PU.1, RORC2, AHR, FoxP3) of Th cell subsets were investigated with Real-Time PCR method in N-RBCs.

RESULTS: Levels of intracellular cytokines TNF- α , IL-4 and IL-5 were increased; whereas IFN- γ , IL-22 and Foxp3 were decreased, levels of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ cells were increased, levels of transcription factors TBX21, GATA3 and SPI.1 were diminished, IL-22 levels were decreased and TGF- β levels were increased in N-RBCs supernatants at 21. storage days ($p < 0,05$). Levels of intracellular cytokines TNF- α , IL-4, IL-5 and IL-17A were increased; whereas IFN- γ were decreased, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ cell levels were increased, levels of transcription factors AHR, FOXP3 ve RORC2 were elevated and IL-17A levels were increased in LR-RBCs supernatants at 42. storage days ($p < 0,05$). At the same day TGF- β levels were also increased in N-RBCs supernatants ($p = 0,051$).

DISCUSSION AND CONCLUSION: During the stroge time, elevation of Th2 (21st and 42nd days), Th17 and Treg (42nd days) cell activity and accumulation of TGF- β in N-RBCs may be involved in the TRIM phenomenon. But it is being considered that TRIM can occur related with not only N-RBCs but also LR-RBCs. Therefore, we should take into account effects of other factors different from allogeneic leukocytes on the TRIM mechanisms.

Keywords: TRIM, Immunomodulation, Transfusion, Helper T cell subsets, Leukoreduction

1. GİRİŞ

Transfüzyon hayat kurtarıcı bir uygulamadır. Ancak ciddi ve hayatı tehdit edici komplikasyonları bulunmaktadır. Bu reaksiyon ve komplikasyonlar, transfüzyon sırasında ya da sonrasında ortaya çıkabilen istenmeyen etkilerdir. Bunlardan bazıları hafif ve gelip geçici olabilirken, bazıları ciddidir ve ölümlü sonuçlanabilir. Bu nedenle karar verirken yarar-zarar hesabının çok iyi yapılması gerekmektedir. Hekimleri bu hesabı yapmaya zorlayan komplikasyonlar enfeksiyöz, immünolojik olmayan ve immünolojik komplikasyonlar şeklinde sınıflandırılabilir.

- *Enfeksiyöz Komplikasyonlar:* Transfüzyon aracılığı ile alıcıya mikroorganizma aktarımı olarak tanımlanabilir. Mikroorganizma kaynağı bağışçı olabildiği gibi, kan bileşeni üretim sürecindeki kontaminasyonlar da olabilir. Bu sayede kanda bulunabilen hemen tüm mikroorganizmaların transfüzyon ile bulaşabildiğini söylemek mümkündür. Bakterilerin, virüslerin, mantarların, parazitlerin ve hatta prionların bulaştığına yönelik kanıtlar bulunmaktadır. Bu grup komplikasyonlar hayati tehlike yaratacak düzeyde sorun oluşturabileceği gibi hiçbir sorun yaratmaksızın da meydana gelebilmektedir. Önlenmeleri için yapılan çok sayıda kan bankacılığı uygulaması bulunmaktadır.

- *İmmünolojik Olmayan Transfüzyon Reaksiyonları:* Transfüzyon sırasında veya sonrası immün mekanizmalardan bağımsız olarak alıcıda sorun yaratan durumlar şeklinde tanımlanabilir. Çeşitli kaynaklarda enfeksiyöz komplikasyonlar da bu başlık altında incelenmektedir. Dolaşım yüklenmesi, hipotansif reaksiyonlar, hipotermi, hipo veya hiperkalemi, immün olmayan hemoliz, asit-baz dengesi bozuklukları, hemosiderozis ve ağrılı transfüzyon reaksiyonları başlıca immünolojik olmayan reaksiyonlardır. Bu grup reaksiyonlar önlem alınmaz ve fark edilmezlerse yaşamı tehdit edici olabilirler. Önlenmeleri için daha çok klinik olmakla birlikte kan bankacılığını da ilgilendiren uygulamalar bulunmaktadır.

- *İmmünolojik Transfüzyon Reaksiyonları:* Transfüzyon sırasında veya sonrasında alıcıda ortaya çıkan immün sistem aracılı sorunlar şeklinde tanımlanabilir. Temel olarak kan bağışçısı kaynaklı eritrosit-lökosit-trombosit antijenlerinden (antigen; Ag), antikorlardan (antibody; Ab), immün hücrelerden, bunlardan açığa çıkan mediyatörlerden ve plazma proteinlerinden kaynaklanmaktadır. Ürün içerisindeki koruyucu solüsyon bileşenleri de bu tür reaksiyonlara neden olabilmektedir. Önlenmeleri için yapılan çok sayıda kan bankacılığı uygulaması (lökosit azaltma, ışınlama, yıkama vb) bulunmaktadır. Bu grup reaksiyonların başlıcaları şunlardır:

- o Akut hemolitik transfüzyon reaksiyonları (AHTR)
- o Febril non-hemolitik transfüzyon reaksiyonu (FNHTR)
- o Alerjik transfüzyon reaksiyonu; ürtiker veya anafilaktik
- o Transfüzyonla ilişkili akut akciğer hasarı (Transfusion related acute lung injury; TRALI)
- o Geç hemolitik transfüzyon reaksiyonu (GHTR)
- o Transfüzyonla ilişkili graft versus host hastalığı (TiGVHH)
- o Post transfüzyon purpura (PTP)
- o Transfüzyonla ilişkili immünmodülasyon (TRIM)

Çalışmamızda bu komplikasyonlardan TRIM değerlendirilmek istenmiş, depolanma sürecinde kan bileşeni içinde meydana gelen değişimlerin TRIM ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla yardımcı T hücre (T helper; Th) alt grupları ve plazmadaki sitokinler depolanma sürecinin ilk, orta ve son günü için hazırlanan örneklerde değerlendirilmiştir. Ayrıca lökosit azaltımının (lökoreduksiyon) TRIM'i engellemedeki rolü de değerlendirilmiştir.

TRIM (Transfüzyonla ilişkili immünmodülasyon)

TRIM, allojeneik kan transfüzyonu (AKT) sonrasında alıcıda gelişen bir takım immün değişiklikler ve bu değişikliklerin alıcıdaki oluşturduğu etkileri tanımlayan bir tablodur. Yukarıda özetlenen transfüzyonla ilişkili komplikasyonların önemlilerinden bir tanesidir. Nedeni ve oluş mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olan gerek laboratuvar, gerekse klinik olarak kendini gösteren bu immün değişikliklere ve etkilerine TRIM adı verilmektedir. TRIM, AKT sonrası transfüzyon alıcılarında;

- Graft ömrünü uzatmak,
- Crohn hastalığı rekürrens hızını azaltmak,
- Tekrarlayan spontan abortus sıklığını azaltmak gibi *olumlu sonuçların* yanı sıra;
- Kanser rekürrenslerini artırmak,
- Postoperatif bakteriyel enfeksiyon sıklığını artırmak,
- Kısa dönem mortalite olasılığını artırmak ve
- Latent bazı enfeksiyonların yeniden aktivite kazanmasına neden olmak gibi *olumsuz sonuçlar* doğuracak şekilde gelişen tabloyu durumu tanımlar (1-2).

TRIM ilk kez 1973 yılında, böbrek transplantasyonu bekleyen hastalara yapılan transfüzyonların graft ömrü üzerindeki olumlu etkilerinin gözlemlenmesiyle tanımlanmıştır

(3). Hayvan deneyleriyle, gözlemsel klinik çalışma ve deneyimlerle desteklenen bu tablo, AKT'nin AIDS pandemisine kadar böbrek transplantasyonu öncesi standart bir yaklaşım halini almasına neden olmuştur. Ama bahsedilen bu olumlu etki randomize kontrollü çalışmalarla desteklenememiştir. Küratif cerrahiye giden hastalardan cerrahi öncesi AKT alanlarda tümör büyümesinin ve metastaz gelişiminin hızlandığının bildirilmesi ve AKT ile kanser rekürrensi arasında bir ilişki olduğunun öne sürülmesi sonucunda TRIM'in diğer etkileri belirlenmeye başlanmıştır (4). Ardından bu durum başka çalışmalar ile de desteklenmiştir (5-7). AKT'nin kanser rekürrensi üzerine bu olumsuz etkisinin ortaya atılmasından sonra transfüzyonun alıcı immün sistemi üzerindeki etkileri ilgi çekici bir alan olmuş ve bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda AKT'nin, kanser rekürrensi, postoperatif bakteriyel enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, latent enfeksiyonların reaktivasyonu gibi çok sayıdaki tablo ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Mowbray ve arkadaşları (8) spontan abortusları olan kadınlara gebelik öncesi eşlerinden alınmış lenfositlerin verilmesiyle abortus olasılığının azaldığını saptamıştır. Peters ve arkadaşları (9) Crohn hastalığı nedeniyle opere edilen ve operasyon sırasında AKT alan hastalarda nüks sıklığının almayanlara göre çok daha az olduğu belirlemiştir. AKT'nin postoperatif bakteriyel enfeksiyonlar açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalar ile desteklenmiş (10-12); CMV, HIV gibi latent bazı enfeksiyonların reaktivasyon olasılığını artırdığı bildirilmiş (13) ve AKT sonrası tüm nedenlere bağlı mortalite artışı ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (14). Bu birkaç örnek dışında da TRIM fenomenine odaklanmış çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalardan elde edilen veriler TRIM fenomeninin varlığını ve/veya şiddetini doğrulamak, altta yatan ana mekanizmayı çözmek için henüz yeterli olamamıştır (15).

TRIM'in Olası Mekanizmaları

TRIM etkisinin kökenine inmek isteyen çok sayıda araştırmacı, sınıf II HLA molekülü taşıyan allojeneik lökositleri (16), allojeneik dendritik hücrelerini (17), mikrokimerizmi (18-19), histamin, eozinofil katyonik protein, eozinofil protein X, myeloperoksidaz, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 gibi biyolojik yanıt düzenleyicilerini (20), sitokinleri (21-24), biyoaktif lipitleri (25-26), eritrosit süspansiyonu (ES) süpernatantını (27-28), kan bileşenlerinin stok süresini (29-30), çözünür Fas ligandı (çFasL) (24, 31), çözünür HLA sınıf I (çHLA-I) moleküllerini (24, 32) ve benzeri birçok olası etkeni konu alan araştırmalar yapmıştır. Yapılan bu çalışmalar yukarıda da söylendiği gibi, TRIM fenomeninin gerçek

mekanizmasını çözmek için yeterli olmamıştır. Ancak AKT'nin alıcıda bir takım immün değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Azalmış Th sayısı (33-34), azalmış T hücre yanıtı (33-34), azalmış doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücre fonksiyonu (33-35), CD4/CD8 [Th/sitotoksik T hücre (Tc)] oranında azalma (33-34, 36), geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında azalma (33-34, 37), antijen sunumunda yetersizlik (33-34), lenfosit blastogenezinde baskılanma (33-34), azalmış sitokin [İnterlökin-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ)] üretimi (33-34, 38), azalmış monosit/makrofaj fagositik fonksiyonu (33-34, 39) ve artmış antiidiyotipik-Ab ve antiklonotipik-Ab üretimi (33-34) bu değişikliklere örnek olarak verilebilir. Bu olası immün değişikliklere bakılarak TRIM etkisinin;

1. Kan bileşeni içerisinde bulunan mononükleer hücreler (MNH),
2. Depolanma sürecinde bileşen içerisinde biriken biyolojik yanıt düzenleyiciler ve immünolojik mediyatörler (BYD-İM),
3. Allojeneik plazmada bulunan çözünür insan lökosit Ag (human leukocyte antigen; HLA) sınıf I peptitler aracılığıyla oluşabileceği ifade edilmiştir (1).

Allojeneik MNH'ler kan bileşeni içinde doğal olarak bulunan bağışçısı kaynaklı hücrelerdir. Özel yöntemler kullanılarak kan bileşeni içinden uzaklaştırılmadıkları zaman transfüzyon ile alıcıya geçerek TRIM etkisinin oluşumuna katıldıkları gösterilmiştir (16). Blajchman ve arkadaşları (40) AKT yapılan hayvanlardan (fare ve tavşan) toplanan dalak hücrelerinin infüzyonu ile AKT'nin tümör büyütücü etkisini edinsel (pasif) olarak aktarılabilmişlerdir. Bu çalışmada AKT yapılan hayvanlardan elde edilen dalak hücrelerinin infüze edildiği hayvanlarda, sinjeneik veya lökosit azaltılmış (LA) AKT alan hayvanlardan elde edilen dalak hücrelerinin infüze edildiği hayvanlara göre pulmoner nodül sayısı belirgin biçimde yüksek bulunmuştur. Bu çalışma allojeneik MNH'lerin AKT ile ilişkili immüsupresyonda rolü alabileceğini göstermektedir.

Depolanma sürecinde biriken BYD-İM ise çok çeşitlidir. Bunlar genellikle beklemekle MNH'lerden salınsa da (sitokinler, histamin, eozinofil katyonik protein gibi), diğer kan hücreleri tarafından açığa çıkarılanları da (serbest Hb, çözünür CD40L, lipid mediyatörler gibi) vardır. Kabaca sitokinler, eikosanoidler, büyüme faktörleri, çözünür FasL, çözünür HLA sınıf-I, ubikutin, doku plazminojen aktivatörü gibi özetlenebilecek bu BYD-İM'in depolanma süresine bağlı olarak süpernatant içerisinde birikerek AKT sonrası alıcıda TRIM etkisinin oluşumuna katıldıkları gösterilmiştir (20, 41). Baumgartner ve arkadaşları (27) kan bileşeni süpernatantlarının sağlıklı kişilerin MNH'leri ile karşılaşması halinde düzenleyici T hücre (regülatör T hücre; Treg) artışına neden olduğunu saptamıştır. Bu çalışma da AKT

sonrası ürün süpernatantının alıcı immün sisteminde Treg artışına, dolayısıyla immüsupresyona yol açabileceğini düşündürmektedir.

Ghio ve arkadaşları (41) 30 günlük ES süpernatantında çHLA-I ve çFasL konsantrasyonunu belirgin şekilde yüksek bulmuş, bu yoğunluğun bileşen içinde kalan rezidüel lökositlerle ve depolanma süresiyle ilişkili olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada çHLA-I moleküllerinin Tc hücre aktivitesini engellediği, hem çHLA-I hem de çFasL moleküllerinin allojeneik MLR'u (mixed lymphocyte reaction) baskıladığı ve çFasL molekülünün apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (41). Bu çalışma immün düzenleyici etkinin allojeneik kan bileşenleri süpernatantları ile oluşabileceğini göstermenin yanı sıra, belirli bir süre depolanan otolog kan bileşeni süpernatantında biriken çözünür moleküller aracılığıyla da gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmalara benzer çok sayıda araştırmadan elde edilen sonuçlar TRIM'e yönelik önemli bilgiler sağlamış olsa da konuya net bir açıklama getirmekten uzak kalmıştır. Ancak elde edilen sonuçlar TRIM fizyopatolojisine yönelik çeşitli hipotezleri doğurmuştur. Çoğunluğu "*klonal delesyon*", "*immüsupresyon*" ve "*anergi*"ye dayandırılan bu hipotezlerden bazıları şu şekilde özetlenebilir (1, 42):

Klonal delesyon: Antijen spesifik immüsupresyonun mekanizmalarına yönelik erken teori klonal delesyon görüşüdür. Bu bağlamda hem MNH'lerin hem de çHLA-I moleküllerinin klonal delesyonda rolü olabileceği düşünülmektedir.

➤ *Kan bileşeni içindeki MNH'ler ile ilgili olanlar:* Allojeneik lökositler yani kan bağışçısına ait lökositlerin taşıdığı HLA antijenleri ile uyarılan ve proliferen olan alıcı lenfosit klonlarının, bu sırada organ transplantasyonu gibi durumlarda kullanılan sitotoksik immüsupresif ilaçların etkisiyle yok olabileceği savunulmaktadır (43). Ancak sitotoksik ilaçlardan ziyade allojeneik HLA antijenlerine karşı daha önceden aktive olmuş alıcı T lenfosit klonlarının, transfüzyon aracılığıyla yüksek doz aynı antijenler ile karşılaşması durumunda artan Fas ligand (FasL) aktivasyonunun T hücre apoptozuna ve ilgili klonun delesyonuna yol açabileceği bir diğer açıklama olarak kabul görmüştür (44).

➤ *Depolanma sürecinde biriken BYD-İM veya çözünür moleküller ile ilgili olanlar:* Allojeneik plazmadaki çHLA-I antijenleri ile TRIM ilişkisinin klonal delesyon üzerinden olabileceği ifade edilmektedir. T lenfosit klonlarının timusdaki gelişimi sırasında T hücre reseptörlerinin (THR) güçlü biçimde antijen tanınmasının sonuçlarından birisi de bu klonların yok olmasıdır (44-45). Allojeneik plazmada bulunan çHLA-I peptitlerin alıcı timik dolaşımına ulaşmasının bu antijenlere spesifik T hücre klonlarının delesyonuyla sonuçlanabileceği belirtilmiştir (46).

İmmüsupresyon:

➤ *Kan bileşeni içindeki MNH'ler ile ilgili olanlar:* *In vitro* koşullarda allojeneik ES ile karşılaşmayla Treg düzeyinin yükseldiğinin gösterilmiş olması (27) transfüzyon sonrası Treg aracılı bir immüsupresyon gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Öte yandan CD200 eksprese eden dendritik hücrelerin immüsupresif etkilerinin monoklonal antikorlar ile bloke edilerek tümör büyütücü etkilerinin baskılanması bu hücrelerin AKT sonrası gelişen immüsupresyonda rolleri olabileceği göstermiştir (17). Aynı çalışmada AKT sonrası alıcı dalağında Transforme edici büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor- β ; TGF- β) üretimi yapan hücrelerin sayısının arttığının gösterilmesi, immüsupresif etkide bu sitokinin de rolü olabileceğini düşündürmüştür.

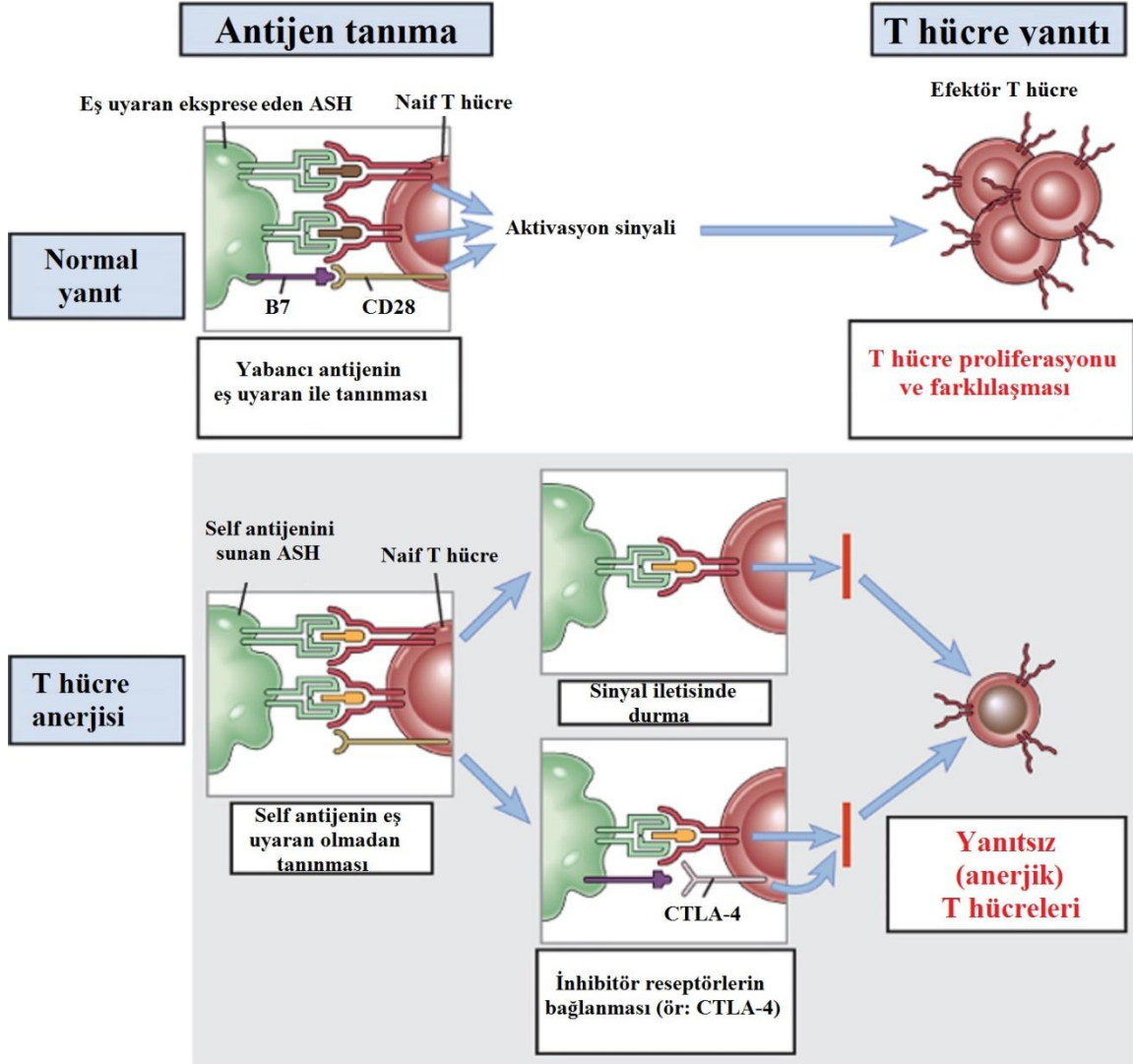
➤ *Depolanma sürecinde biriken BYD-İM veya çözümler moleküller ile ilgili olanlar:* Çözümler moleküllerle ilgili hipotezler allojeneik kan bileşeni süpernatantında bulunabilen χ HLA-I ve χ FasL ile ilgilidir (41). Allojeneik plazmadaki χ HLA-I moleküllerinin, CD8 molekülleri ile bağlanarak allojeneik veya otolog HLA peptitlerinin tanınmasını engelleyebileceği; χ FasL sekresyonunu artırarak aktive olmuş allojeneik ve otolog CD8 hücreleri ile Fas pozitif hücrelerin apoptozunu destekleyebileceği düşünülmektedir (47). Süpernatandaki χ FasL moleküllerinin alıcıya nakli sonrası bu moleküllerin NK ve Tc hücre yüzeyinde bulunan Fas molekülleriyle birleşerek bu hücrelerin, yüzeyinde FasL eksprese eden virüsle enfekte hücreler ile etkileşimini bozabileceği ve virüsle enfekte hücrelerin apoptozunu engelleyebileceği ifade edilmiştir (48).

➤ *Anti-idiotip antikorlar:* Transfüzyon sonrası alıcıya geçen bağışçı THR ve antikorları alıcı açısından antijenik epitoplara olurlar. Bu yeni antijenlere karşı sentezlenen anti-idiotip antikorların transfüzyon sayısı ile paralel olarak çeşitliliği de artar. Bu antikorların, bir organ transplantasyonu sonrasında transplant THR ve MHC kompleksleri ile intereferans yaratarak rejeksiyon mekanizmasını durdurabileceği bildirilmiş ve anti-idiotip antikorları bulunan böbrek nakli hastalarında graft ömrünün daha uzun olduğu gösterilmiştir (49).

Anerji:

➤ *Kan bileşeni içindeki MHN'ler ile ilgili olanlar:* AKT alıcısında bağışçı HLA'larına spesifik klonlar aktive olurlar. Alıcı immün sistemi, yabancı gördüğü bu HLA'lara spesifik yanıt verebilmek için bu yabancı HLA'ların kendi antijen sunan hücreleri (ASH) tarafından kendi T lenfositlerine sunulmasını ister. Bu sunum sırasında T hücrelerin aktivite kazanabilmesi için, hem ASH yüzeyindeki MHC sınıf II ile sunulan antijenin THR'leri

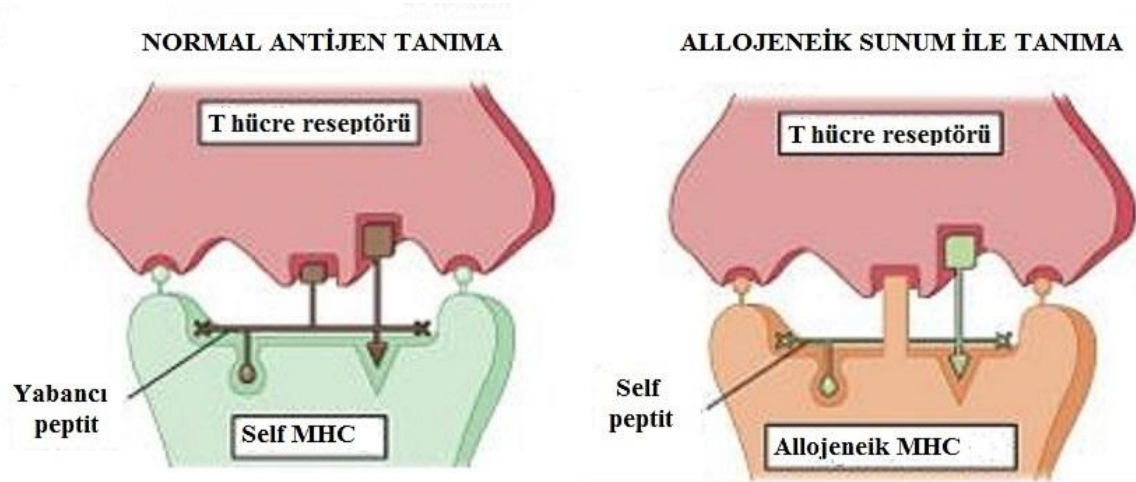
tarafından spesifik olarak tanınması, hem de ASH yüzeyindeki B7-1 ve B7-2 eş uyarıcı moleküllü ile T hücre yüzeyindeki CD28 eş uyarıcı molekülünün etkileşmesi gerekir. Eş uyarıcının yokluğunda ilgili T hücre klonunda immün yanıtızsızlık (Anerji) gelişir (50) (Şekil-1). Ayrıca B7-1 ve B7-2 ekspresyonunda azalma durumunda T hücre yüzeyinde ekspresyon alan CTLA-4'ler de, B7-1 ve B7-2'e CD28'den daha güçlü afiniteyle bağlanarak T hücreye sağladıkları inhibitör sinyaller ile anerjiye yol açabilmektedir (44) (Şekil-1). Anerjik klonlar spesifik antijen ile tekrar karşılaştıklarında immün yanıt oluşturamazlar.



Şekil-1: T hücre anerjisi (kaynak (44)'ten alınarak düzenlenmiştir)

Transplantasyon nedeniyle kullanılan siklosporin ve takrolimus gibi immünsupresif ilaçlar hücrelerin eş uyarıcı ekspresyonunu baskılayan moleküllerdir. Bu ilaçların kullanıldığı dönemde AKT yapılan hastaların yetersiz eş uyarıcı nedeniyle bağışçı HLA'larına spesifik klonlarının anerjiye yöneleceği; bu anerjik klonların da spesifik antijenleri taşıyan grafitin sağ kalımına destek olacağı düşünülmektedir (42). Bu konuda diğer bir yaklaşım ise anerjiyi AKT'nin damar yoluyla yapılan bir uygulama olmasına

bağlamıştır. Buna göre intravenöz (İV) yolla alıcı dolaşımına geçen bağışçı antijenleri dalak veya karaciğer makrofajları, monositler ya da B hücreler gibi profesyonel olmayan ASH'ler tarafından yakalanıp T hücrelere sunulmaktadır. Dolayısıyla B7-1 ve B7-2 eş uyaran eksprese etmede dendritik hücreler kadar yetkin olmayan bu hücrelerin antijen sunumunun, spesifik klonları anerjiye yönlendireceği düşünülmektedir (51). Bir diğer olası anerji mekanizmasının ise bağışçı lökositlerinin, kendi antijenlerini alıcı lenfositlerine sunma becerisiyle ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. Bir self antijenin yabancı bir kişiye sunulabilmesi için MHC-peptit kompleksinin yabancı T hücre reseptörü tarafından tanınacak şekilde yabancı MHC-peptit kompleksi formunu taklit etmesi gerekir (52) (Şekil-2). Eğer AKT alıcısıyla kan bağışçısı arasında böyle bir paylaşım varsa bağışçı lökositleri alıcıya antijen sunumu yapabilirler. Ancak kan ürünü içerisinde transfüzyon gününü beklerken eş uyaran eksprese etme özelliklerini önemli ölçüde yitirdiklerinden bu sunum biçiminin ilgili T hücre klonunun anerjisiyle sonuçlanabileceği ifade edilmiştir (51).



Şekil-2: Bağışçı lökositlerinin antijen sunumu (kaynak (52)'den alınarak düzenlenmiştir)

Yukarıda bahsedilen ve geçmişten beri üzerinde en sık durulan mekanizmalara mikrokimerizm, Th1 tip immün yanıtın Th2 tip yanıtı dönüşümü, immünkompetan hücrelerin apoptozunun uyarılması gibi çeşitli mekanizmaları eklemek mümkündür.

Mikrokimerizm:

Kan bağışçısı ve alıcısı arasındaki HLA uyumu, alıcıda allojeneik lökositlerin uzun yıllar yaşayabilmesine neden olabilmektedir. Küçük miktarda bağışçı lökositlerinin alıcıda uzun zamanlı engraftmanına mikrokimerizm denmektedir (18-19). Kan alıcıları dışında travma hastalarında, karaciğer transplant alıcılarında, yenidoğan döneminde exchange transfüzyon alanlarda ve gebelik öyküsü olanlarda uzun yıllar sonra bağışçıya veya fütüse ait lökositlere rastlanmıştır. Mikrokimerizm, alıcı immün yanıtının baskılanmasına, bağışçı lökositlerine tolerans gelişimine ve allograft sağ kalımına neden olabilmektedir. Bunu da

Th1 sitokinlerinin üretimini ve Tc hücre aktivasyonunu baskılayıp Th2 sitokinlerinin salınımını artırarak yaptığı gösterilmiştir (53-54). AKT'nin de benzer şekilde etki edebileceği; Th1 sitokinlerinin üretimini baskılayarak antijen işleme, makrofaj aktivasyonu, sitotoksik aktivite gibi çeşitli hücrel immün işlevlerin bozulmasına yol açabileceği düşünülmektedir.

Th1→Th2 dönüşümü:

Bu dönüşümün nasıl ve hangi mekanizma ile olduğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak AKT sonrası alıcılarda Th2 tipi sitokin (IL-4, IL-5 veya IL-10) düzeyleri yükselirken (53, 55-58) Th1 tipi sitokin (IFN- γ , IL-2) düzeylerinin düştüğünün (38, 53, 55-58) çok sayıda çalışma ile gösterilmesi; TRIM etkisinden sorumlu mekanizmalardan birinin Th1→Th2 dönüşümü olduğunu düşündürmektedir (42, 59-60). TRIM'in graft ömrünü uzatmak, Crohn hastalığı rekürrens hızını azaltmak, kanser rekürrenslerini artırmak, postoperatif bakteriyel enfeksiyon sıklığını artırmak gibi etkileri düşünüldüğünde bu hipotez güç kazanmaktadır. Bu dönüşümden sorumlu tutulan mekanizmalar çok iyi bilinmese de öne sürülen mekanizmalardan bir tanesi kanın İV yolla verilmiş olmasıdır. Daha önce de bahsettiğimiz gibi damar içi verilen antijenler yetersiz eş uyaran ekspresyonu nedeniyle enerjide yol açabilmektedir (51). Bu eş uyaran yetersizliğinin Th2 yanıtının güçlenmesi nedeniyle olabileceği düşünülmüştür (55, 61). Th1→Th2 dönüşümünden sorumlu tutulan bir diğer unsur ise depolanma sürecinde kan bileşeni süpernatantında biriken moleküllerdir. Bu süreçte biriken ubiquitin Th2 yanıtını güçlendirdiği gösterilmiştir (57). Ayrıca AKT sonrası alıcı makrofajlarından artan TGF- β ve prostoglandin E₂ (PGE₂) salınımı olduğu (53, 61) ve PGE₂'nin ise Th1 yanıtını baskıladığı gösterilmiştir (62).

Apoptoz:

TRIM etkisinin olası nedenlerinden birisi de depolanma sürecindeki kan bileşeninde apoptoz sonucu ölen hücrelerin alıcıya nakline bağlanmıştır. Buna göre nakledilen apoptotik hücrelerin TGF- β aktivasyonu ile bağlantılı olarak alıcıda immüsupresyona yol açtığı varsayılmaktadır (63). Bu görüşü destekler nitelikli bir çalışmada bağışçı apoptotik lenfositlerinin transfüzyonuyla allograft kabulünün güçlendiği ve kanda CD4⁺CD25⁺ Treg düzeyinin arttığı belirlenmiştir (64). Benzeri bir diğer çalışmada ise karaciğer transplantından 7 gün önce organ bağışçısı sıçandan alınan apoptotik lenfositlerin organ alıcısı sıçana nakledilmesi ile graft sağ kalımında anlamlı bir artış saptanmış ve Th2 sitokin düzeylerinde (IL-4, IL-10) saptanan artışın bu toleransın oluşmasında rolü olabileceği düşünülmüştür (65).

TRIM etkisinde lökositler ve süpernatanın dışında eritrositlerle ilgili bir takım özelliklerin de rolü olabileceği çeşitli çalışmalarla işaret edilmiştir.

Eritrositler:

ES depolanma sürelerinin, transfüze edilen ürün sayısının ve eritrosit kökenli mikropartiküller (MP) gibi etkenlerin TRIM gelişiminde rol oynayabileceği tartışılmıştır. Yapılan bir çalışmada, lökositlerin kendilerinin transfüzyonuyla kanser retansiyonu arasında ilişki bulunamazken, LA-ES ve N-ES transfüzyonunun bunu yaklaşık 3 kat artırdığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada 9 günden daha uzun süre depolanmış otolog veya allojeneik kan transfüzyonlarının kanser progresyonunu artırdığı ama daha kısa süre depolanmaların zararlı etkilerinin bulunmadığı bildirilmiştir (66). Hod ve arkadaşları (67), ES transfüzyonunun zararlı birçok etkisinin, uzun süre depolanmış ES'lerin transfüzyonundan sonra alıcı dolaşımından temizlenen eritrositlerden açığa çıkan demirden kaynaklandığını ileri sürmüştür. Araştırmacılar depolanmış ama taze olmayan fare LA-ES'lerinin %16'sının transfüzyondan sonraki iki saat içerisinde monosit/makrofaj sistemi tarafından temizlendiğini göstermiştir. Buna göre, alıcı plazmasında serbest demir seviyesi depolanmış ES (taze olmayan) transfüzyonlarından sonra daha yüksek bulunmakta ve artan demir düzeyi sepsis riskini, hatta mortaliteyi artırabilmektedir (67). Yüksek miktarda hemoglobin (Hb) alımı ise makrofaj plastisitesini M1 veya M2 aktivasyon durumuna dönüştürebilmektedir (68). Hb'nin makrofajlar tarafından yüksek miktarda alınımının ardından artış gösteren Hb yıkım ürünü hem, hem oksijenaz-1 (HO-1) enzimi tarafından kontrol edilir. Hem artışına bağlı olarak yükselen HO-1, dendritik hücrelerin gelişimini engelleme, proenflamatuvar ve allojeneik immün cevabı baskılama özelliklerinden dolayı immünespresif bir enzim olarak kabul edilir (69). HO-1'in ve hem yıkım ürünü karbonmonoksitin, Treg indüksiyonuna destek vererek immün toleransa aracılık ettikleri gösterilmiştir (70-71). Yükselen hem ve buna bağlı HO-1 düzeyinin makrofajları M2 şeklinde aktive olmaya ve Treg hücreleri uyarmaya yönlendirebilir (72). Ancak hipoteze göre taze olmayan ES transfüzyonu ile ortaya çıkan çok yüksek düzeydeki hücre içi hem konsantrasyonu HO-1'in etkisini bozmaktadır. Azalan HO-1 aktivitesi ise makrofajların M1 şeklinde aktive olmasına, reaktif oksijen ürünlerinin yüksek düzeyde üretilmesine ve proenflamatuvar sitokinlerin neden olmaktadır (72). Böylelikle oksidatif baskı ve enflamatuvar süreç engellenmemektedir. Bu tablo ES'lerin depolanma sürelerine göre supresif veya enflamatuvar etkiler ortaya çıkartabileceğinin bir göstergesi durumundadır (72). Aynı zamanda, taze ES'lerin immün baskılayıcı aktiviteleri olduğu, depolanma süresiyle bu etkilerini yitirdikleri (73), daha uzun süre depo edilen ES'lerin taze ES

transfüzyonlarına göre daha çok eritrosit alloimmünizasyonuna neden oldukları (74) varsayımlarını da desteklemektedir. ES'lerin depolanma süresiyle AKT'nin çeşitli klinik sonuçlarının paralellliğini gösteren daha pek çok çalışma bulunmaktadır. 14 günden uzun süre depolanan ES'lerin bir yıllık mortaliteyi (75) ve enfeksiyöz komplikasyonları (76) artırdığının, ortalama 6 gün daha uzun süreyle depolanmış ES'lerin multiorgan yetmezliğine (77) ve ortalama 8 gün uzun depolananların sepsise bağlı ölümlere yol açtığına (78) gösterilmesi bu çalışmalara örnek olarak verilebilir. Bu etkilerin transfüzyon sayısı arttıkça daha fazla artış göstereceğini öngörmek yanıltıcı olmayacaktır. Zaten 3 üniteden fazla ES transfüzyonunun mortaliteyi artırdığını gösteren çalışmalar (14, 79) da bu öngörüğü desteklemektedir. Öte yandan eritrosit depolanma lezyonlarının da transfüzyonun immün düzenleyici rolüne sağladıkları katkılar tartışılmaktadır. ES'lerde depolanma süreci boyunca meydana gelen bazı değişikliklere eritrosit depolanma lezyonları adı verilmektedir. Bu süreçte eritrositlerde ATP ve pH azalmakta, şekilleri ve enerji metabolizmaları bozulmakta, membran satabilitelerinin azalmasıyla eritrosit kökenli MP'ler oluşmaktadır (80). Depolanma süreci boyunca miktarı artabilen bu MP'lerin immüsupresif özellikte oldukları gösterilmiştir (81). AKT ile alıcıya geçtiklerinde immüsupresif bir etkiye neden olabilecekleri bildirilmiştir (82). Ekzozomlar ve MP'ler farklı yollarla plazma membranından türeyen, hücreler arası iletişimde ve immün düzenlenmede rol oynadıkları düşünülen yapılardır (83). Ekzozomlar 0,03-0,1 µm, MP'ler 0,1-1,0 µm boyutlarında olabilmektedir (82). Bu yapılar köken aldıkları hücreye ait bazı yüzey moleküllerini, sitoplazmik proteinleri ve genetik materyali taşırlar (82-83). Bu yapıların hücreler arası iletişimi ya hedef hücelere spesifik adezyon molekülleri ve ligandları aracılığıyla doğrudan temasla, ya da sitokinler, biyoaktif lipitler gibi çözünür yapılar aracılığıyla dolaylı olarak sağladıkları düşünülmektedir (82-83).

Görüldüğü gibi geçmişten günümüze TRIM'in mekanizmasına yönelik bir kısmını yukarıda paylaştığımız çok sayıda hipotez üretilmiştir. Hiçbiri net bir açıklama getiremeye de buraya kadar anlatılanlara dikkat edildiğinde allojeneik MNH'ler ve genellikle bunlarla ilişkili yapıların TRIM'in en önemli kaynağı durumunda olduğunu algılamak mümkündür. Bu nedenle lökoredüksiyon ile TRIM etkisinin ortadan kaldırılabileceğini düşünülebilir. Ancak LA-ES ve LA trombosit süspansiyonlarında (LA-TS) depolanma sürecinde lipitler, serbest hemoglobin, sitokinler ve MP'ler gibi yapıların biriktiği ifade edilmiştir (28). Bu yapılar TRIM'in lökositler ve onlarla ilişkili yapılar dışındaki kaynaklardan da köken alabileceğini düşündürmekte ve lökoredüksiyonun etkinliğini sınırlandırmaktadır. Buna rağmen lökositler ve ilişkili yapılar hala en önemli kaynak durumundadır ve

lökoredüksiyonun TRIM etkisini azaltabileceği düşüncesi önemini korumaktadır. Bu nedenle çalışmamızda kan bileşeni içindeki lökositlerin ve depolanma sürecinde biriken BYD-İM'in TRIM gelişimi üzerindeki olası etkileri ve lökoredüksiyonun bu tabloyu engelleme kapasitesi değerlendirilmek istenmiştir. Lökositlerin etkilerini değerlendirmek için lökosit azaltılmamış ES (normal-ES; N-ES) örneklerinde depolanma süreci boyunca Th lenfosit alt gruplarında oluşan değişiklikler araştırılmıştır. LA-ES'lerde teorik olarak lökosit bulunmadığı veya ölçülebilir düzeyin altında bulunduğu düşünüldüğünden bu değerlendirme sadece N-ES'lerde yapılmıştır. Bileşen içerisinde biriken BYD-İM'in etkinliğini değerlendirmek için LA-ES ve N-ES örneklerinde depolanma süreci boyunca biriken sitokinlerin düzeyleri ölçülmüştür. Lökoredüksiyonun TRIM'i engellemedeki etkinliğini değerlendirmek için ise, LA-ES ile N-ES'lerde ölçülen sitokin düzeylerinin iki grup arasında karşılaştırılmasından yararlanılmıştır.

Th Lenfosit Alt Grupları

MNH'lerin TRIM tablosundaki rollerini değerlendirmek için yapılan çok sayıda çalışmanın bazıları bu etkilerini destekler, bazıları reddeder niteliktedir. Her bir TRIM etkisiyle lökositlerin ilişkilendirildiği klinik çalışmalara aşağıdaki örnekleri vermek mümkündür.

- AKT'nin, özellikle de N-ES'lerin **kanser rekürrensini** artırdığı görüşünü değerlendirmek için planlanmış randomize kontrollü çalışmada, kolorektal kanser cerrahisi sırasında veya sonrasında N-ES transfüzyonu yapılmış kişilerde LA-ES transfüzyonu yapılanlara göre kanser rekürrensinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır (84). Kanser cerrahisi sırasında yapılan N-ES transfüzyonunun kanser rekürrensini artırmadığını gösteren başka çalışmaların da bulunması rekürrenslerin sadece bağışçı lökositlerine bağlanmaması gerektiğini düşündürmektedir (85-86). Öte yandan kanser cerrahisi sırasında güçlenen Th2 yanıtı, perioperatif nutrisyon, anemi gibi çok sayıdaki faktörün tabloya katkı yapabileceği; üstelik bazı anesteziğin immüsupresif etkilerinin perioperatif AKT aracılığıyla daha da güçlenebileceği ve bu tabloya yol açabileceği ileri sürülmektedir (87).

- **Postoperatif bakteriyel enfeksiyonların** değerlendirildiği çalışmalarda da sonuçlar çelişkili bulunmuştur. Transfüze edilen allojeneik lökositler ile postoperatif enfeksiyon sıklığı arasında ilişki olmadığını bildiren çalışmaların (88-89) yanı sıra, lökositlerin uzaklaştırılmasıyla postoperatif bakteriyel enfeksiyon riskinin azaltılabileceğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır (90). Çalışmalar arasındaki bu farklılığın ilişkilendirildiği tanı,

transfüzyon sayısı, cerrahi türü gibi değişkenlerin düzeltilmesiyle lökositlerle postoperatif enfeksiyon sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (90).

- Allojeneik lökositlerin kardiyak cerrahi hastaları dışındaki hasta gruplarında **kısa dönem mortalite** ile ilişkisi olmadığı hesaplanmıştır (91). Kardiyak cerrahi hastalarında LA-ES kullanımı ile kısa dönem mortalite olasılığının azaldığını bildiren çalışmaların yanı sıra (14, 79, 92), mortalite sıklığını etkilemediğini bildiren çalışma da bulunmaktadır (93). Ancak bu çalışmada yararlanılan N-ES'lerin buffy-coat tabakası uzaklaştırılmıştır.

- Allojeneik lökositlerin **graft ömrünü** uzattığını (94) ya da tersini ortaya koyan çalışmalar (95) ve bilinenin aksine HIV-CMV gibi **latent enfeksiyonlara** tekrar aktivasyon kazandırmadığını ve viral yükü değiştirmedini gösteren çalışmalar (96) bulunmaktadır.

Görüldüğü gibi çalışmaların yöndeş ve karşıt bu sonuçları TRIM etkisinde lökositlerin rolü konusunda soru işareti oluşturmaktadır. Ancak bu çalışmalarda lökositleri azaltma yolları, transfüze edilen ES'lerin raf ömürleri, transfüze edilen ES miktarı gibi çok sayıda değişken bu sonuçlar üzerine etki etmiştir. Öte yandan hastaların tanıları, klinik gidişatları gibi diğer değişkenler de bu heterojeniteye katkı yapmış ve ortaya çıkan etkinin sadece allojeneik lökositlere bağlı olup olmadığı net olarak gösterilememiştir. Bu nedenle allojeneik lökositlerin TRIM etkisinde rolü olabileceği düşüncesinden yola çıkılarak kurguladığımız çalışmamızın bir bölümünde N-ES'ler içerisindeki Th hücreler ve bu hücrelerin depolanma sürecinde gösterdikleri değişimler araştırılmıştır.

Özel bir patojene karşı geliştirilen özgül immün yanıt hücresel veya humoral olarak sınıflandırılabilir ve CD4⁺ Th hücresi bu her iki tip yanıtı yöneten primer hücre tipidir. Th hücrelerin farklı tipte yanıt verme kapasitesi, üretilen ortama saldıkları sitokinlerle yakından ilişkilidir. Mosmann ve arkadaşları (97) tarafından 1986 yılında CD4⁺ Th hücrelerin sitokin salgılama özelliklerine göre Th1 ve Th2 olmak üzere iki alt tipe ayrılacağı ortaya konmuştur. Daha çok viral enfeksiyonlar ve tümörlere karşı immün yanıtta yer alan CD8⁺ T hücreleri de farklı sitokinler sentezleyen alt gruplara (Tc1 ve Tc2) farklılaşabilmektedir. Özellikle son 10 yılda yoğun olarak yapılan immünolojik ve moleküler çalışmalar Th hücrelerin efektör veya düzenleyici roller üstlenen başka alt gruplarının (Th9, Th17, Th22 ve Treg) bulunduğunu ortaya koymuştur (98). Efektör CD4⁺ Th hücreler arasındaki bu çeşitlilik temelde, işgalci mikroorganizmaların türüne ve yapısına göre konağı en etkin şekilde korumaya yöneliktir. Efektör Th hücreler naif Th hücrelerden sekonder lenfoid organlarda gelişirler. Bu gelişim için; spesifik olarak antijen sunan ASH'lerin veya bu sürece katılan diğer hücre tiplerinin yardımına ve aktive olmuş Th hücreler tarafından yaratılan sitokin çevresinin yönlendirmesine ihtiyaç duyarlar (99). Bu uyarım sonucunda

naif Th hücrelerden gelişen efektör Th hücreleri spesifik transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle hücre içinde ve hücre yüzeyinde yaptıkları ekspresyonlara göre sınıflanırlar.

Herhangi bir organizma farklı fonksiyonlar için özelleşmiş birbirinden farklı çok sayıda hücreden meydana gelmiş olsa da tüm hücreler aynı genomu sahiptir. Aynı genomun farklı ifadeleri ile bu çeşitlilik meydana gelmektedir. Genom içinde bulunan genler çok önemli proteinleri kodlasalar dahi ifade edilmedikleri sürece hücre fonksiyonlarına herhangi bir etki ve katkı sağlamazlar. DNA üzerinde bulunan genlerin ifade edilebilmesi için ilk olarak transkripsiyon işleminin gerçekleşmesi gerekir. Transkripsiyon, RNA polimeraz enzimi aracılığı ile DNA'nın mRNA şeklinde yazılımıdır, yani DNA'dan RNA'ya genetik bilgi aktarımıdır. Bu aktarım protein sentezi ve dolayısı ile genin hücre fonksiyonlarına etkisi için gerekli ilk basamaktır. DNA üzerindeki belli bir bölgeye bağlanarak RNA polimeraz aracılığıyla genin transkripsiyonunu düzenleyen proteinlere de transkripsiyon faktörleri adı verilir (100). Her efektör Th hücresi spesifik transkripsiyon faktörünün kontrolünde naif Th hücreden farklılaşır ve kendine özgü sitokinleri eksprese ederek fonksiyonunu gösterir. Sitokinler doğal ve edinsel immünite hücrelerinden salgılanan ve bu hücrelerin çeşitli fonksiyonlarına aracılık eden proteinlerdir. Mikroplara ve diğer antijenlere yanıt sonucu üretilen sitokinler, immün yanıtta katılan hücreleri uyarır. Sentezleri kısa ve kendini sınırlayan bir mekanizmaya sahiptir. Depo edilmezler. Hücrenin uyarılması sonucu başlayan yeni gen transkripsiyonu ile sentezlenir ve salgılanırlar. Hedef hücredeki spesifik reseptörleri aracılığıyla etkilerini lokal veya sistemik olarak gösterirler. Sitokin reseptör ilişkisi sonrası genellikle hedef hücrede gen ekspresyon değişikliği sonucu yeni bir fonksiyonun ekspresyonu başlar. Hedef hücrenin sitokine olan bu yanıtı feed-back mekanizmalarla sıkı şekilde kontrol altında tutulur. Sitokinler doğal immün sistemi ve edinsel immün sistemi düzenleyip hematopoezi uyarabilirler. Edinsel immün yanıtın aktivasyon fazında lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasını uyarırken; doğal ve edinsel immün yanıtın efektör fazında mikropları ve diğer antijenleri yok etmek için farklı efektör hücreleri uyarırlar. Tümör Nekroze eden Faktör (TNF), IFN- α , IFN- β , IL-1, IL-6, IL-10, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27 gibi sitokinler daha çok doğal immüntenin sitokinleriyken; IFN- γ , TGF- β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL17 gibi sitokinler de edinsel immüntenin sitokinleridir (101). Çalışmamızda sitokinlerden; efektör Th hücrelerin sınıflandırılmasında, depolanma sürecinde ES süpernatantında meydana gelen değişimlerin değerlendirilmesinde ve lökoredüksiyonun etkinliğinin yorumlanmasında yararlanılmıştır.

Çalışmamızda efektör Th hücreleri yani Th alt grupları hücre yüzeyi-hücre içi ekspresyonlarına ve spesifik transkripsiyon faktörlerine göre değerlendirilmiştir. Yüzey

ekspresyonları için CD3, CD4, CD25 ve CD127 moleküllerinden; hücre içi ekspresyonlar için TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL17, IL-21, IL-22 ve Foxp3'den; spesifik transkripsiyon için TBX21, GATA3, SPI.1, RORC2, AHR ve FOXP3'ten yararlanılarak bu molekülleri eksprese eden Th alt grupları belirlenmiştir.

İlk tanımlanan yardımcı tip T hücreleri olan **Th1 hücreleri** ürettikleri yüksek doz IFN- γ ile fagositlerin aktivasyonunu, opsonizan-kompleman bağlayan antikorların üretimini yönlendirerek hücre içi patojenlere karşı savunmada rol oynarlar (102). Bu hücreler aynı zamanda proenflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve TNF- β da üretirler (103). Bu sayede hem doğal hem de hücrel immün yanıtı uyarırlar. Bu hücreler konağın zorunlu hücre içi patojenlerden korunmasında önemli oldukları kadar, aşırı ve kontrolsüz aktivasyonlarıyla doku hasarına ve hatta bazen otoimmün bozukluklara yol açabilirler (104).

Th1 hücrelerinin naif Th hücrelerden farklılaşmasının anahtar unsuru ve potent indükleyicisi IL-12'dir. Bu sitokin bakteri ve virüslerdeki korunmuş paternleri taşıdıkları Toll-like reseptörler (TLR) aracılığıyla tanıyarak aktive olan dendritik hücrelerden ve makrofajlardan salgılanır. IL-12'nin etkisine IFN- γ 'nın güçlendirici bir katkısı olduğu gösterilmiştir (105). IL-12 ve IFN- γ uyarısı sonucunda; naif Th hücrelerde IL-12'nin STAT1, IFN- γ 'nın STAT4 aracılığıyla Th1-spesifik transkripsiyon faktörü TBX21'in (T-bet) aktivasyonunu güçlendirmesi Th1 farklılaşmasını sağlamaktadır (98, 106-107).

Th2 hücreler de Th1 hücreleri ile aynı zamanda tanımlanmışlardır. Bu hücreler IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 ve IL-13 üretirler. T yardımcı tip 2 yanıtı hümmoral immün yanıtlarla ilişkilidir ve helmintler gibi hücre dışı patojenlere dirençte önemlidirler. Bu hücreler aynı zamanda akciğerlerde mukozal immünitede de rol oynar. Özellikle Th2 yanıtın aberan artışları atopik astım gibi kronik enflamatuvar solunum yolu hastalıklarına yol açar (108).

Th2 hücreler, primer immün yanıt sırasında erken IL-4 üretimi sayesinde naif Th hücrelerden farklılaşırlar (109). Bu sitokin naif Th hücrelerinin Th2 yönünde kutuplaşmasına neden olan en potent sitokin olup dendritik hücrelerin naif Th hücreleri Notch aracılı uyarımı sonucu üretilir (110). IL-4 ile IL-4R etkileşimi STAT6 aracılığıyla Th2 için spesifik transkripsiyon faktörü olan GATA3'ün ekspresyonunu sağlayarak Th2 farklılaşmasını düzenler (98, 103, 107). Ancak farklılaşmanın erken evresindeki GATA3 seviyesi naif Th hücrelerin Th2 yönünde farklılaşmasını sağlayacak düzeyde IL-4 sentezlenmesi için yeterli olamayabilmektedir. Bu durumda Th2 farklılaşması şu şekilde gelişmektedir: Naif Th hücrenin efektör hücrelere dönüşümünde THR sinyal gücünün ve sitokin çevresinin kritik olduğu bildirilmiştir (111). Farklılaşmanın erken aşamasında THR sinyalinin güçlü olmasının Th1, zayıf olmasının Th2 dönüşümüne neden olduğu

gösterilmiştir (112). Zayıf şekilde uyarılan T hücreler erken evrede GATA3 eksprese eder, IL-2 üretir ve STAT5'i aktive ederler. Bu aktivasyondan 14-24 saat sonra bu hücrelerde THR bağımlı, IL-4/STAT6 bağımsız IL-4 üretimi başlar. Endojen üretilen bu IL-4, IL-4R aracılığıyla zayıf THR sinyali üzerine etki ederek STAT6 üzerinden GATA3 ekspresyonunu artırır. Artan GATA3 ve süregelen STAT5 aktivasyonu, IL-4 üretimini şiddetlendirir. Bu şekilde meydana gelen pozitif döngü Th2 dönüşümüne öncülük etmektedir (113). Bu süreçte artan GATA3 (114) ve güçlü STAT5 aktivasyonu (115) TBX21 ekspresyonunu baskılayarak Th1 gelişimini bloke etmektedir. *In vitro* koşullarda STAT5 ve GATA3 eşgüdümü Th2 dönüşümünden sorumludur (116). Th2 dönüşümünün aksine, güçlü bir THR aktivasyonu IL-2 reseptörünü desensitize etmenin yanı sıra güçlü bir ERK aktivasyonuna yol açarak STAT5 aktivasyonunu, dolayısıyla da GATA3 ekspresyonunu baskılar (111). Böylelikle Th2 aktivasyonunu bloke ederek Th1 farklılaşmasına yol açar. Th1 ve Th2 farklılaşması IFN- γ ile IL-4 ve TBX21 ile GATA3 arasındaki etkileşimlerden köken alan karşılıklı düzenlenme mekanizmalarına sahiptir (117). THR sinyal gücünün düzenleyici etkisi de bir diğer düzenleyici mekanizma olarak karşılıklı düzenlenme mekanizmalarına eklenebilir.

Son birkaç yılda tanımlanan bir Th hücre alt tipi olan **Th9 hücreleri** ağırlıklı olarak IL-9 üreten hücrelerdir. Bu proenflamatuvar hücrelerin otoimmün hastalıkların büyük çoğunluğunda ve alerjik enflamasyonda rolleri olduğu düşünülmektedir (118). Ancak Th9 hücrelerin otoimmün ve alerjik enflamasyonda ana IL-9 kaynağı olup olmadıkları, enflamasyonun güçlenmesine nasıl katkıda buldukları veya Th2 hücreler ile nasıl etkileştikleri tam olarak aydınlatılamamıştır (119). Bu hücrelerin TGF- β ve IL-4 etkisi altında naif Th hücrelerinden veya sadece TGF- β etkisi altında Th2 hücrelerinden farklılaşabildiği gösterilmiştir (120). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda Th9'un ayrı bir Th alt grubu mu veya Th2'nin özelleşmiş bir formu mu olduğu henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Çünkü bu hücreler daha önceden Th2 hücreler ile ilişkilendirilmiş olan hem IL-9 hem de IL-10'u üretirler. Bununla beraber Th9 hücrelerin ürettikleri IL-9 miktarları Th2'den çok daha fazla; buna karşın IL-4, IL-5 ve IL-13 miktarları çok daha düşüktür. Ayrıca bu hücreler Th2, Th17 ve Treg hücreleri ile ilgili transkripsiyon faktörlerini (sırasıyla, GATA-3, ROR- γ t ve Foxp3) eksprese etmezler (121). Spesifik transkripsiyon faktörü SPI.1 (122) olan bu hücreler IL-9'un en önemli kaynağı gibi görünse de bu sitokin Th2 ve Th17 tarafından da eksprese edilebilmektedir (123-124).

Th17 hücreleri yeni tanımlanan efektör T hücrelerindendir. Bakteriler ve funguslar gibi hücre dışı patojenlere karşı savunmada, doku enflamasyonunda (125) ve otoimmünite

gelişiminde (126) kritik rol oynayan bu hücreler, TGF- β ve IL-6'nın birlikte etkisiyle naif Th hücrelerden farklılaşırlar. IL-6 ve TGF- β STAT3 aracılığıyla spesifik transkripsiyon faktörü RORC2 ekspresyonuna ve Th17 kutuplaşmasına neden olur. Th17 hücreler IL-17A, IL-17F ve IL-21 üretirler (119, 127). IL-17 ailesi sitokinler, proenflamatuvar sitokin ve kemokinlerin aracılığıyla dokudaki enflamatuvar yanıtları kontrol eder (128). IL-17 ekspresyonu multipl skleroz, romatoid artrit, psöriazis ve enflamatuvar barsak hastalıkları gibi otoimmün hastalıklar ve alerjik yanıtlar ile ilişkilidir (129). IL-21, IL-6'nın yerini alarak TGF- β ile birlikte IL-17 ve IL-23R ekspresyonunu güçlendirir ve Th17 dönüşümünde pozitif döngü meydana getirir (130). Son aşamada Th17 aktivasyonu IL-23R/IL-23 etkileşimi aracılığıyla stabilize olur. Bu hücrelerin oimmünitedeki rolünün IL-23 aracılığıyla gerçekleştiği, IL-12'ninkin bu yönde bir etkisinin bulunmadığı ifade edilmiştir (131-132).

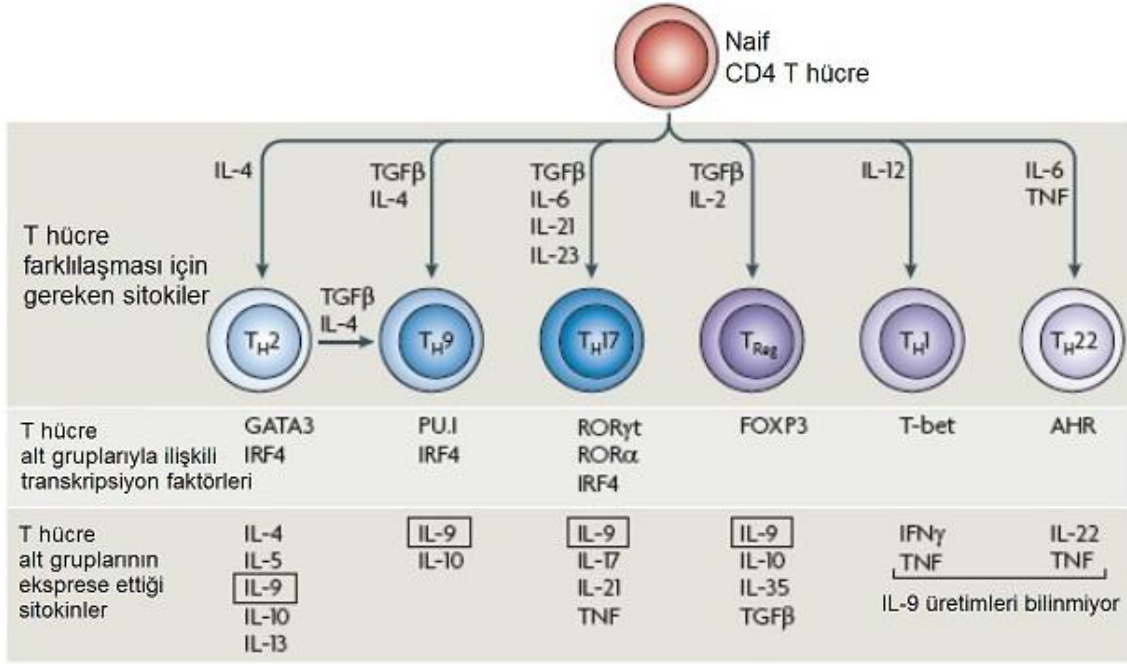
Th17 hücreler ile Th1 hücrelerin karşılıklı mutlak antagonistik olduğu ifade edilmiş (133), TBX21 ekspresyonu ve Th1 farklılaşmasının Th17 yanıtı yokluğunda bozulduğu (134-135), IFN- γ 'nın Th17 (136), IL-17'nin de Th1 gelişimini engellediği gösterilmiştir (137). Öte yandan Th1 \rightarrow Th2 farklılaşmasındaki karşılıklı düzenlemeye benzer bir ilişkinin Th17/Treg hücreler arasında da olduğu ifade edilmektedir. Buna göre THR sinyalinin güçlü olması naif hücreleri Th17, zayıf olması da Treg yönünde farklılaşmaya yönlendirmektedir (111). Th1 \rightarrow Th2 de olduğu gibi burada da IL-2/STAT5 yolağının rol aldığı gösterilmiştir. THR zayıf şekilde uyarıldığında aktive olan STAT5, Th17 farklılaşması için gerekli olan STAT3 ile yarışmaya girerek etkinliğini bloke eder (138). Dolayısıyla zayıf THR sinyali ortamda Th17'ye yönlendirecek sitokinler bulunsa bile naif Th hücreler, Foxp3 eksprese etmeye ve Treg hücelere farklılaşmaya yönlendirilir (139). Aksine güçlü THR sinyali IL-2/STAT5 yolağını baskılayacak, STAT3 hedefine yarışmasız olarak bağlanacak, RORC2 ekspresyonuna aracılık edecek ve naif Th hücrelerin Th17 hücelere farklılaşmasına aracılık edecektir (111). Bu mekanizmaya ek olarak Foxp3'ün RORC2 fonksiyonlarını antagonize ederek Th17 gelişimini bloke ettiği de bildirilmiştir (140).

Son zamanlarda tanımlanan bir başka Th alt grubu **Th22**'dir. Bu hücreler IL-6 ve TNF- α 'nın birlikte etkisiyle naif Th hücrelerden farklılaşırlar. Eksprese olan spesifik transkripsiyon faktörü AHR, naif Th hücrelerin Th22 hücelere farklılaşmasına neden olur (103, 141). Bu farklılaşma sonunda oluşan Th22 hücreler IL-22 üretirler (121). IL-22'nin yanı sıra IL-13 ürettiği gösterilen bu hücrelerin Th1, Th2 ve Th17 hücelere özgü olan sitokinleri (sırasıyla IFN- γ , IL-4 ve IL-17) çok daha düşük miktarlarda sentezlediği gösterilmiştir. Th22 hücreleri ilk olarak alerjik dermatit ve psöriazis gibi enflamatuvar deri

hastalıklarındaki rolleri ile gündeme gelmiştir. IL-22, epitel hücrelerine etki ederek antimikrobiyal savunmayı güçlendirecek moleküllerin ekspresyonunu artırır (142). Bu şekilde özellikle gram negatif hücre dışı patojenlere karşı savunmada rol alırlar (143). Aynı zamanda bu hücrelerin proliferasyonunu uyarıp, sağ kalımını artırarak doku iyileşmesinde (142) ve enflamatuvar deri hastalıklarında epidermal yanıtı düzenlemede rol alırlar (121). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler IL-22'nin bu etkilerinde proenflamatuvar sitokinlerin rolleri olduğunu düşündürmektedir. Buna göre; TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin varlığında IL-22 patojen bakteri ve virüslere karşı enflamasyonu güçlendirici rol oynarken; ortamda TNF- α yoksa enflamatuvar süreci yatıştırarak yara iyileşmesini ve doku tamirini kolaylaştırmaktadır (121).

Regülatör T (Treg) hücreler ya timus'ta gelişir (doğal olarak meydana gelen Treg; nTreg) veya THR stimülasyonunu takiben TGF- β varlığında naif T hücrelerinden farklılaşırlar (indüklenen Treg; iTreg) (144-145). Diğer immün yanıtı pozitif yönde destekleyen Th hücrelerin aksine Treg hücreleri immün yanıtı baskılayıcı olarak işlev görürler. Treg hücrelerin en belirgin işlevi self-toleransın ve immün homeostazın sağlanması ve devam ettirilmesidir. Treg hücrelerin bunu tolerojenik dendritik hücrelerin gelişimini desteklerken, diğer denritik hücrelerin enflamatuvar özelliklerini ve efektör T hücrelerini harekete geçirme yeteneklerini bozarak (146) veya sitokin aracılı (147) olarak yaptıkları düşünülmektedir. Treg hücre fonksiyonunun bozulması otoimmünite ve enflamatuvar patolojilerin ortaya çıkmasına katkıda bulunur. Ayrıca Treg hücrelerinin enfeksiyöz ajanlara karşı immün yanıtların dengelenmesinde ve patojenin ortadan kaldırılmasından sonra immün homeostazın sağlanmasında önemli olduğu iddia edilmektedir. Treg hücreleri Foxp3 adı verilen bir transkripsiyon faktörünü spesifik olarak eksprese eder ve bu transkripsiyon faktörünün hücre içi ekspresyonu en spesifik Treg belirteci olarak kabul edilir (144-145). Foxp3 Treg hücreleri için etkin bir düzenleyici olarak bilinir (107). Hem nTreg hem de iTreg hücreler Foxp3 eksprese eder ve efektör Th hücreleri baskırlar. Bu nedenle birbirlerinden kolay ayırt edilemezler. Öte yandan bazı koşullarda aktive olan efektör T hücrelerin de geçici bir süreliğine düşük düzeyde Foxp3 eksprese ettikleri bilinmektedir (144). Aynı zamanda yüksek düzeyde CD127 eksprese eden bu hücrelerin (148-149) aksine Treg hücreler yüksek düzey Foxp3 ve düşük düzeyde CD127 eksprese etmekte veya hiç etmemektedir (148, 150-151).

Bilinen tüm Th hücre alt grupları, ilgili transkripsiyon faktörleri ve salgıladıkları sitokinler Şekil-3 de özetlenmiştir (103).



Şekil-3: Th hücre alt grupları, transkripsiyon faktörleri ve sitokinleri (kaynak (103)'den alınarak düzenlenmiştir)

Yakın zamana kadar T hücre farklılaşmasının doğrusal ve geri dönüşsüz olduğu kabul edilirdi. Ancak yakın zamanda farklılaşmış T hücrelerin uygun uyarana dönüşebileceği (118) ve *in vitro* olarak sitokin profillerini değiştirebildiği gösterilmiştir (152). Etektör T hücrelerin fenotipik stabilitesi, herhangi bir harici uyarana yok ise, transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu, farklı yollara yönlendirecek genlerin baskılanması, epigenetik modifikasyonlar ve miRNA'lar ile sağlanmaktadır (118). T hücrelerin immün yanıt sonucu çeşitli dokularda biriktiği ve farklı mikroçevrelerle karşılaştığı düşünüldüğünde, T hücre alt gruplarının geri dönüşsüz farklılaşmasının tehlikeli olabileceği bildirilmiştir (118). T hücre platisitesine, özellikle de Th17 ve Treg hücrelerin platisitelerine yönelik çok sayıda örnek bulunmaktadır.

Th17 platisitesi: Özellikle enflamatuvar koşullarda, IL-12 etkisiyle, düşük düzeyde IL-12Rβ2 eksprese eden Th17 hücrelerin IFN-γ eksprese etme özelliği kazanması sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (153) ve IFN-γ ile IL-17 eş zamanlı üretilirler (154). Klasik Th1 hücrelerden farklı olarak CD161 eksprese eden bu hücrelerin, Th1 gelişiminin bir aşamasında oluşan hücreler ya da bilinmeyen bir programdan kaynaklanan kalıcı alt gruplar olup olmadıkları net değildir. Th17 hücreler IL-4'ten zengin ortamda IL-4 ve IL-17A üreten Th17/Th2 hücrelere de dönüşebilmektedir (155). Öte yandan, yapılan bir çalışmada, IL-17 üreten Th2 hücrelerin, klasik Th17 ve Th2 hücrelerin havayollarında oluşturduğu sırasıyla nötrofil ve eozinofil infiltrasyonundan daha güçlü lökosit infiltrasyonu, musin üretimi ve

goblet hiperplazisine neden olduğu gösterilmiştir (156). Bu durum sitokin profilinde değişiklik olan hücrelerin klasik hücrelere göre daha agresif olabileceğini düşündürmektedir (118).

Treg plastisitesi: Treg hücrelerin kültür koşullarında diğer Th tiplerine dönüşebildiği bilinmektedir (98). Treg'lerin bunu Foxp3 ekspresyonlarını azaltarak veya ortadan kaldırarak yaptığı bildirilmiştir (157-158). Bu azalmanın hücreyi Treg hattından çıkartmasa da supresif etkisini kaybettirdiği ve diğer T hücre alt gruplarına dönüşme özelliği kazandırdığı belirtilmektedir (157-158). nTreg (159) ve iTreg (160) hücrelerin IL-6 ile uyarılması sonucu IL-17 eksprese ettiğinin gösterilmesi Treg hücrelerin Th17 hücrelere dönüşebileceğini göstermektedir. Foxp3'ün baskılanıp IL-17 ekspresyonunun güçlenmesi için IL-6 aracılı sinyal yeterli görünmektedir. Ancak Treg hücrelerin Th17 hücrelere dönüşümü için Foxp3'ün tamamen yok olmasının gerekmediği, hem Foxp3 hem de IL-17 eksprese eden hücrelerin bulunduğu bildirilmiştir (159-160). Öte yandan, Treg-Th17 plastisitesine benzer bir dönüşümün Treg-Th2 hücreleri arasında da olduğu ifade edilmiştir. Foxp3 düzeyinin azalması durumunda *in vivo* koşullarda Treg hücrelerin, IL-4 eksprese eden Th2 hücreler dönüştüğü, bu dönüşümün Th2 tip immün yanıt ile ilişkili hastalıkların temeli olabileceği bildirilmiştir (158, 161). Bu iki durumdan çıkartılabileceği gibi; Treg hücrelerin Foxp3 ekspresyon düzeyleri bu hücrelerin fonksiyonları veya plastisitelerinin temel anahtarı durumundadır. Ayrıca Foxp3 eksprese eden Treg hücrelerin, Th1 farklılaşmasını sağlayacak kültür ortamında IFN- γ (98, 162-163), IL-4 bulunan ortamda ise IL-9 eksprese ettiği de (164) gösterilmiştir.

Özetlenecek olursa; Th17 hücreleri uygun koşullarda Th1 ve Th2 hücrelerine dönüşürken; Treg hücreleri de Th1, Th2, Th9 ve Th17 hücrelerine dönüşebilmektedir.

Bileşen İçerisinde Biriken Biyolojik Yanıt Düzenleyiciler ve İmmünojenik Mediyatörler

ES'lerde depolanma sürecinde biriken BYD-İM'in TRIM etkisinde rolleri olabileceği düşünülmektedir. ES süpernatantının MNH kültüründe Treg aktivitesini (27) ve TGF- β aktivitesini artırdığının gösterilmesi (165), LA-ES süpernatantının tam kan kültüründe IL-6, IL-10 ve TNF- α düzeylerinde artışa neden olması (166) depolanma sürecinde birikim gösteren BYD-İM'in TRIM etkisinde rolleri olabileceğini düşündüren çalışmalara örnek olarak verilebilir. TRIM etkisinde rolleri olabileceği düşünülen BYD-İM'den bazıları şunlardır: Sitokinler (21-24), çözünür FasL ve çözünür HLA klas I molekülleri (1, 59, 87,

165), LPS'ler, non-polar lipidler, lizofosfatidilkolinler (167), eikosanoidler (prostoglandinler ve tromboksanlar) (168), serbest demir (68, 169-171) ve MP'ler (28).

Eikosanoidlerin bekleyen ES süpernatantında birikim gösterdikleri bildirilmiştir (168). Bunlardan PGE₂'nin T hücre fonksiyonlarını (172) ve Th1 yanıtını baskılayarak (62), TGF- β ile birlikte Treg gelişimini uyardığının gösterilmesi (173) TRIM gelişimindeki olası rollerinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ekzozomlar ve MP'ler, hücreler arası iletişimi sağlarken sitokinler, biyoaktif lipidler gibi çeşitli mediyatörleri salgılayabilmektedir (82-83). Salgıladıkları bu yapıların TRIM etkisinde rolleri olabilmektedir (28). Ürün içinde biriken LPS'lerin hücre kültüründe sitokin üretimini uyardığının (174) ve Treg aktivitesini artırdığının gösterilmesi (175) LPS'leri de TRIM gelişiminde suçlanan biyoaktif maddeler arasına sokmaktadır. Ürün içinde biriken yapılara bir diğer örnek serbest demirdir. Demirin potansiyel immün düzenleyici etkisi ve makrofajların antimikrobiyal fonksiyonları için demire gereksinim duyduğu bilinmektedir (169). Retikuloendotelial sistem hücreleri enflamasyona yanıt olarak demir salınımlarını baskılamakta ve patojenlerin demirden yoksun kalarak ölmelerini sağlamaktadır (170). Demir yetersizliğinde enfeksiyonlar azalır, immün yanıt Th1 yönünde gelişirken; artan demir konsantrasyonunda bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık artmakta ve immün yanıt Th2 yönünde gelişmektedir (171). Bununla birlikte demir yüklü makrofajların proenflamatuvar (M1) formdan anti-enflamatuvar (M2) forma dönüştüğü belirtilmiştir (68). Ürün içinde biriken serbest demir de bu mekanizmalarla TRIM gelişimine katkı yapabilmektedir. Bu örnekleri daha da çoğaltmak mümkündür. Bizim çalışmamızda BYD-İM arasından sitokinler değerlendirilmiştir. Sitokinler daha önce de bahsedildiği gibi; enflamatuvar ve immün yanıtlara aracılık eden farklı hücre tipleri tarafından üretilen proteinler olup; immün sistem hücreleri arasında bağlantıyı sağlayan birincil mediyatörlerdir (101). Depolanma süreci boyunca özellikle N-ES süpernatantında birikim gösterebilir ve alıcıda çeşitli immün düzenlenmelere neden olabilirler (21-24). Bu görüşü destekler nitelikteki bazı çalışmalarda LA ve N-ES'lerde depolanma sürecinde sitokin düzeylerinde değişiklikler oluştuğunun gösterilmesi çalışmamız için yönlendirici olmuştur (176-177). Bu nedenle çalışmamızda LA-ES ve N-ES örnek süpernatantlarında Th alt gruplarıyla ilişkili sitokinler olan IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- α , TGF- β ve IFN- γ 'nın plazma düzeyleri araştırılmıştır. Ürün süpernatantının olası etkileri ve lökosit azaltımının etkinliği çalışmamızda bu şekilde değerlendirilmiştir.

Kan Bileşenlerinde Lökosit Azaltımı

Kan bileşeni içindeki lökositlerin transfüzyon sırası ve sonrasında doğurabilecekleri olumsuz etkiler nedeniyle miktar olarak azaltılması işlemi lökosit azaltımı olarak tanımlanır. Günümüzde kan bileşenlerinde lökosit azaltımı eritrosit antijenlerine karşı antikorların saptanmasından ve enfeksiyöz tarama testlerinin kullanılmaya başlanmasından sonra transfüzyon tıbbındaki en önemli üçüncü gelişme olarak değerlendirilmektedir (59). Bu azaltım, *filtrasyon*, *santrifügasyon* ve *yıkama* yollarıyla yapılabilmektedir.

Lökosit filtrasyonu, bu yöntemlerin içinde en etkili lökosit azaltma yöntemi olup, lökosit filtreleri aracılığıyla gerçekleştirilen bir işlemdir. Ürün bu filtrelerden geçirilerek lökositlerden arındırılır. Farklı özellik ve kapasitelerde lökosit filtreleri bulunur. Bunlardan log3 lökosit filtreleri %99,9 lökosit azaltımı sağlarken, log4 lökosit filtreleri en ileri düzey (%99,99) azaltma sağlayan araçlardır. Uluslararası standartların gerektirdiği kan bileşeni içindeki (250-300 mL) lökosit sayısının 1×10^6 'dan düşük seviyede olma koşulunu sadece log3 ve log4 lökosit filtreleri ile uygulanan bu yöntem sağlamaktadır.

Santrifügasyon yönteminde ürünün santrifügasyonu sonucu lökositlerin yoğun olduğu tabaka (buffy coat) başka bir ortama alınarak lökosit azaltılmaya çalışılır. Yöntemin lökositlerden arındırma etkinliği % 70-80 kadardır.

Yıkamanın asıl amacı lökosit azaltmak değil plazmanın uzaklaştırılmasıdır. Ama bu işlem ile de ürün içerisindeki lökositler belirli düzeyde azaltılabildiği için bu amaçla da kullanılabilir. Bu yöntemde lökosit azaltma steril koşullarda, serum fizyolojik ile eritrositlerin karıştırılıp santrifügasyonu ve süpernatanın uzaklaştırılması şeklinde birbirini tekrarlayan birkaç işlem şeklinde yapılır. Yöntemin lökositlerden arındırma etkinliği % 95-98 kadardır.

Bu işlem iki şekilde yapılmaktadır:

1. Depolama öncesi lökosit azaltımı (DÖ-LA); kan bileşeni hazırlanırken yani kan bileşeni kan deposuna girmeden önce yapılır. Bu yolla lökositlerin depolanma süreci boyunca zararlı bir takım mediyatörleri salgılaması ve bu mediyatörlerin ürün içinde birikimi engellenmiş olur.

2. Depolama sonrası lökosit azaltımı (DS-LA); transfüzyon amacıyla alıcıya gönderilmeden hemen önce yani kan deposundan çıktıktan sonra yapılır. Bu yolla transfüzyon sırasında alıcıya geçen lökositler azaltılır ama depolanma süreci boyunca ürün içinde bulunan lökositlerden salınarak biriken mediyatörler işlem etkinliğini azaltır. DS-LA-ES süpernatanın MNH kültüründe TGF- β aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (165).

Bu nedenle en ideal lökosit azaltma yöntemi, 3 log veya tercihen 4 log lökosit filtreleri kullanılarak yapılan DÖ-LA'dır. DÖ-LA'nın ürün içindeki sitokin düzeyini azalttığı gösterilmiştir (178). Ayrıca Phelan ve arkadaşları (179) çalışmalarında, DÖ-LA'nın ES transfüzyonunun oluşturduğu zarar verici etkileri engellediğini göstermiştir. Hodge ve arkadaşları (165) ise DÖ-LA'nın depolanan ES'lerin immünomodülatör etkilerini engellerken, DS-LA'nın bu etkiyi yok edemediğini belirlemiştir. Bu çalışmalar DÖ-LA'nın etkinliğini gösteren çalışmalardan iki tanesidir. En etkili lökoredüksiyon yöntemi lökosit filtrasyon olduğu için metin içerisinde lökosit azaltımı ifadesiyle aksi belirtilmedikçe lökosit filtrasyonu işaret edilmiştir.

Lökosit azaltımının, febril non-hemolitik transfüzyon reaksiyonların, CMV gibi bazı enfeksiyöz ajanların geçişini ve HLA alloimmünizasyonunu engellendiği bilinmektedir. Ancak transfüzyonun diğer komplikasyonları üzerindeki etkinliğine yönelik kanıtlar çeşitli ve çelişkilidir. Fransa, İngiltere, Kanada gibi gelişmiş ülkeler tüm kan bileşenlerini DÖ-LA işlemi uygulanarak kullanılmaktadır (üniversal lökoredüksiyon). Bu ülkelerde üniversal lökoredüksiyon uygulamasından önceki ve sonraki döneme ait postoperatif enfeksiyon ve mortalite sıklıklarını değerlendiren "before&after" çalışmalarından sadece bir tanesinde mortalite sıklığının üniversal lökoredüksiyon uygulaması sonrası azaldığı saptanmış (180), diğerlerinde mortalite ve postoperatif enfeksiyon sıklığı üzerine olumlu bir etki belirlenmemiştir (1). Bu ve benzeri retrospektif çalışmaların yanında gözlemsel çalışmaların sonuçları da değişkendir. Örneğin travma hastalarında lökoredüksiyonun pnömoni sıklığını %45 oranında azalttığı (181) ama mortalite üzerine herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (182). Bazı metaanalizlerde lökoredüksiyonun enfeksiyöz komplikasyonlar ve mortalite üzerine etkisi olmadığı hesaplanırken (183-184); bazılarında da özellikle kolorektal ve kardiyak cerrahi sırasında LA-AKT alan hastalarda postoperatif enfeksiyon riskinin %10 daha az olduğu hesaplanmıştır (90). Kardiyak cerrahi sırasında LA-AKT alan hastalarda mortalitenin ve postoperatif enfeksiyon sıklığının anlamlı şekilde düştüğünü gösteren randomize kontrollü çalışmalar (14, 79) lökosit azaltmanın olumlu etkilerini ortaya çıkaran ve vurgulayan gözlemsel çalışmaları desteklemektedir. Daha çok gözlemsel çalışmalarda ortaya atılan lökosit azaltmanın TRIM gelişimini engelleme konusundaki olumlu etkisi randomize kontrollü çalışmalarla net olarak desteklenememektedir. Yukarıda da paylaşıldığı gibi olumlu sonuçlar bildiren randomize kontrollü çalışmalar olduğu gibi olumsuz sonuçlar bildirenler de vardır.

Lökoredüksiyonun etkinliğini bizim çalışmamızda olduğu gibi sitokinler aracılığıyla değerlendirirken; depolanma sürecinde kan bileşeni içinde birikebilen ama lökosit

filtrelerinden geçerek lökoredüksiyondan kurtulabilen ekzozomlar ve MP'ler (82-83) gibi molekülleri, LPS'ler (174-175), serbest demir (68, 169-171), eikosanoidler (168, 172-173) gibi mediyatörleri göz önünde bulundurmak gerekir. Çünkü ES süpernatanı TRIM etkisine yol açabilen lökositlerden veya lökosit dışı kaynaklardan köken alan çok sayıda molekül içermektedir ve böyle yapılar lökoredüksiyonun etkinliğini azaltmaktadır.

Amaç ve Çalışmanın Önemi

Kesin mekanizması belirsiz olsa da, immün regülasyondaki kritik önemleri ve geniş repertuarlarıyla Treg'ler, TRIM'de akla gelen ilk hücre grubudur. Bu konuda önemli ve detaylı bir çalışma olan Baumgartner ve arkadaşlarının (27) çalışması bizim çalışmamıza ilham kaynağı olmuştur. Baumgartner çalışmasında; N-ES ve 3log filtreler ile elde ettiği LA-ES'lerin 1 ve 42. gün örneklerine ait süpernatantlar ile sağlıklı kişilerden alınmış periferik kan MNH'lerini kültür ortamında karşılaştırarak Treg gelişimini değerlendirmiştir. Aynı zamanda LA-ES, N-ES ve kültür süpernatantlarında sitokin düzeylerini araştırmıştır. Tüm ES süpernatantlarının lökoredüksiyondan ve depolanma süresinden bağımsız olarak hücre kültüründe Treg gelişimini uyardığını bildirmiş; bu gelişimin süpernatandaki sitokinlerden bağımsız olduğunu belirtmiştir.

Çalışmamız ES'lerin TRIM ile ilişkisini değerlendirmek amacıyla kurgulanmıştır. Ürün içinde depolanma süreci boyunca meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi, TRIM ile ilişkilendirilmesi ve lökoredüksiyon-TRIM ilişkisinin değerlendirilmesi çalışmamızın hedeflerini oluşturmuştur. Değişim düzeyleri belirlenecek parametreler olarak; Th hücre alt grupları ve plazma sitokin düzeyleri seçilmiştir. Kan bileşeni içindeki MNH'lerin TRIM'deki rollerini belirlemek için; Th alt gruplarının depolanma sürecinde N-ES'ler içinde gösterdikleri değişimlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Kan bileşeni plazmasında depolanma sürecinde biriken BYD-İM ve çözünür mediyatörlerin TRIM'deki rollerini belirlemek için; N-ES ve LA-ES süpernatantlarındaki sitokin profillerinin süreç içinde gösterdikleri değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Lökoredüksiyonun etkinliğini yorumlamak için; N-ES ve LA-ES süpernatantlarındaki sitokin profillerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Analizler aynı bağışçıya ait LA ve N-ES örneklerinde gerçekleştirilmiş; N-ES'lerde Th hücre alt grupları araştırılırken, LA-ES ve N-ES'lerde sitokin düzeyleri ölçülmüştür. Baumgartner'in çalışmasından farklı olarak analizler doğrudan üründe yapılmış, tüm Th alt grupları ve onlarla ilişkili sitokinlerin plazma düzeyleri daha sık aralıklarla araştırılmış ve lökoredüksiyonda 4log filtreler kullanılmıştır. Analizlerin ürün içinde yapılmasıyla TRIM etkisinin ES içinde başlayan bir sürecin hastadaki yansıması olup olmadığı değerlendirmek istenmiştir. Analiz profilinin genişletilmesiyle Th alt gruplarının ve ürettikleri sitokinlerin TRIM'deki olası etkilerini değerlendirmek amaçlanmıştır. 0, 21 ve 42. gün örneklerinde analizlerin yapılmasıyla depolama sürecinin TRIM etkisindeki rolü araştırılmak istenmiştir. 4log filtrelerin kullanımıyla 10 kat daha fazla lökosit azaltarak bu düzeydeki lökoredüksiyonun TRIM etkisini azaltma gücünü değerlendirmek amaçlanmıştır.

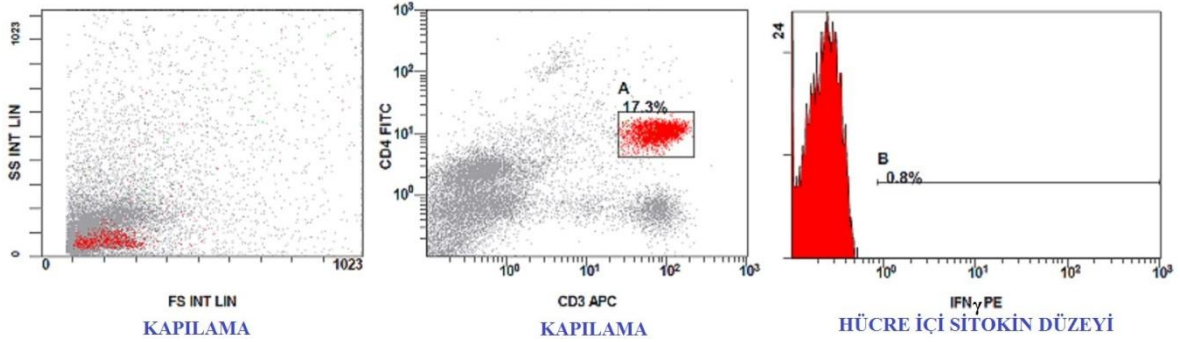
2. GENEL BİLGİLER

Çalışmamızda bağışçılardan alınan kan bileşenleri steril koşullarda ikiye bölündükten sonra bunlardan birine içindeki lökositleri azaltmak amacıyla filtrasyon işlemi uygulanırken, diğerine herhangi bir lökosit azaltıcı işlem uygulanmadı. Böylelikle LA-ES ile N-ES'ler elde edildi. N-ES'lerde akım-sitometre yöntemi ile Th hücre alt grupları, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) yöntemi ile transkripsiyon faktörleri ve Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ile sitokin profilleri araştırılırken, LA-ES'lerde sadece ELISA ile sitokin profilleri araştırıldı. Bu nedenle bu bölümde kullandığımız üç yöntem hakkında kısa bilgiler verilecektir.

Akım-Sitometre

Akan bir sıvı içindeki hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesini sağlayan sistemdir. Süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey antijenlerinin belirlenmesi, T ve B lenfosit alt gruplarının saptanması, lösemi ve lenfoma tiplmesi, DNA analizi, hücre içi sitokinlerin saptanması, kromozom analizi gibi birçok konuda kullanılan bir yöntemdir. Süspansiyon halindeki bu hücrelerin büyüklük ve granülaritelerine göre tek hücre düzeyinde ölçülebilmesi yaydıkları floresan yoğunluğuna bağlıdır. Bu florensansı sağlamak için önce bu hücrelerin floresan işaretli (Fluorescein isothiocyanate; FITC, Phycoerythrin; PE, Peridinin-chlorophyll proteins; PerCP vb) monoklonal antikorlarla işaretlenmesi gerekir. İşaretlenmiş bu hücrelerden floresan açığa çıkarmak için güç kaynağı olarak lazer kullanılmaktadır. Lazer ışınının aynı anda tek hücre üzerine düşmesi ve sadece onun analizi yapabilmesi için işaretlenmiş bu hücrelerin lazer kaynağı önünden tek sıra halinde geçmesi gerekmektedir. Tek sıra halindeki bu geçiş, sistemin *hidrolik sistem* veya *akıcı sıvı sistemi* olarak isimlendirilen alt sistemi tarafından sağlanır. Hidrostatik basınçla süspansiyonun akış kabineye gönderildiği *hidrolik sistem* sayesinde saniyede yaklaşık 500 hücrenin tek sıra halinde lazer önünden geçişi ve analizi sağlanmaktadır. Bu geçiş sırasında lazer yardımıyla açığa çıkan floresan saçılımının analizinin yapılabilmesi için toparlanıp düzgün bir şekilde dedektörlere gönderilmesi gerekir. Floresan saçılımlarının derlenmesinden *optik sistem* olarak isimlendirilen bir diğer alt sistem sorumludur. Optik sistemle toparlanan floresan saçılımlar, Forward Scatter (FS), Side Scatter (SS) ve floresan dedektörlerine (FL-1, FL-2, FL-3 vb) ulaştırılır. FS lazer ışık kaynağı ile aynı yönde bulunur ve aynı yönde 20° açıyla etrafa yayılan ışınları toplayarak

hücre yüzey alanı ve büyüklüğü hakkında bilgi verir. SS eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayılan ışığı ölçerek granülarite ve hücre içyapısı hakkında bilgi verir. FL'ler ise farklı dalga boylarındaki floresan ölçümler, florokrom maddelerle işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri veya sitokin ve DNA gibi hücre içi moleküller hakkında bilgi verir. Dedektörlere ulaşan sinyalin "Photo Multiplier Tubes" (PMT) ile amplifiye edilerek elektrik sinyale çevrilmesi ve analiz için bilgisayara aktarılmasından da *elektronik sistem* olarak isimlendirilen diğer bir alt sistem sorumludur. Bu şekilde elde edilen hücre büyüklüğü, granülaritesi ve işaretli monoklonal antikolarla belirlenmiş hedef antijene ait bilgiler grafikler aracılığı ile gösterilir. FS/SS histogramı ile hücre süspansiyonu içindeki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılır. Süspansiyon içinde büyüklük ve granülarite özelliklerine göre dağılım gösteren bu hücre popülasyonları içinden bilgi edinilmek istenen gruplar çerçevelenerek belirlenebilir. Bu işleme *kapılama işlemi* denmektedir ve bu işlemden sonra sadece kapılanan bölgedeki hücreler hakkında bilgi edinilir (Şekil-4) (185-187).



Şekil-4: Kapılama işlemi ve hücre içi sitokin düzeyi

RT-PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu *in vitro* / *in vivo* ortamlarda uygulanabilen DNA amplifikasyon metodudur. Özgün genetik parçacıkların "Taq polimeraz" yardımıyla çoğaltılmasını sağlar. Gerekli reaktif ve ekipman yardımıyla DNA replikasyonunun *in vitro* ortamda defalarca tekrarlanması sonucu istenen DNA dizisinin (150–3000 nükleotidlik diziler) milyarlarca kopyası oluşturulabilir. Ancak RNA ile çalışılacağı zaman ilk önce reverse transkripsiyonla cDNA elde etmek gerekmektedir. Gerekli olan reaktifler:

- Kalıp olarak kullanılacak DNA (genomik DNA) veya komplementer DNA (cDNA)
- İki tane tek iplikli sentetik DNA oligonükleotidi (forward ve reverse primer)
- Dört tip deoksiribonükleotid trifosfat (dNTPs)
- Yüksek sıcaklıkta çalışabilecek bir DNA polimeraz (Taq DNA pol.).

Bu reaktifler yardımı ile üç ana döngünün çevrimler halinde tekrarlanması sonucu istenen DNA dizisinin kopyaları çıkartılabilmektedir. PCR temelde üç ana döngünün tekrarlarından oluşur:

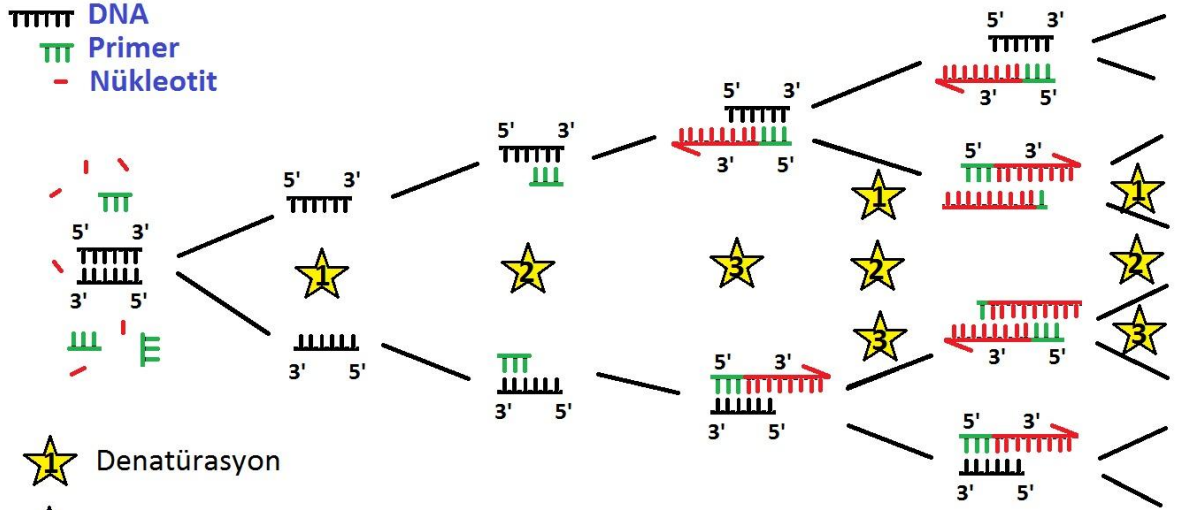
- Denatürasyon
- Annealing (eşleşme)
- Elongasyon (uzama)

Denatürasyon aşamasında 94-98°C'de çift iplikçikli DNA'nın iki tek iplikçiğe ayrılması, annealing aşamasında 37-60°C'de primerlerin tek iplikçik halindeki kalıp DNA'ya spesifik olarak bağlanmaları, uzama aşamasında ise 72°C'de primerlerle sınırlandırılmış olan bölgelerin Taq polimeraz enzimi tarafından amplifikasyonu sağlanır. Denatürasyon ve uzama aşamalarındaki sıcaklıklar değişmezken, annealing sıcaklığı istenen DNA dizisinin AT/GC içeriğine göre değişebilir. Döngüler yaklaşık 30-35 defa tekrar edilir. Yeni sentezlenen fragmentler bir sonraki döngüde kalıp görevi göreceklerinden her döngüde çoğaltılmak istenen dizinin logaritmik (2^n) bir artışı söz konusudur (Şekil-5).

Bu döngüsel işlemlerin Thermo Cycler (sıcaklık düzenleyici) gibi ekipmanla birleştirilmesi ve sonuçların işlem sırasında belirlenebilmesi ile RT-PCR geliştirilmiştir. RT-PCR'da ürünlerin analizi agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlere gerek kalmadan; diziye spesifik olmayan floresan boyalar ya da diziye spesifik probler yardımıyla işlem sırasında yapılabilmektedir. Bu yöntem ile DNA ve mRNA örnekleri tek bir test tüpünde kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek düşük bir kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Ayrıca bu yöntemde ayrıca işlemler gerçek zamanlı olduğu için reaksiyon aşamaları da izlenebilmektedir.

ELISA

ELISA, özgül antijen-antikor bağlantısını enzimle işaretli antikorlarla göstererek, antijen veya antikorları araştırmaya olanak sağlayan immünokimyasal bir ölçüm tekniğidir. İşaretlemede kullanılan enzimin spesifik substrat aracılığıyla açığa çıkan renkli ürünlerin ölçülmesiyle, aranan antijen veya antikor hakkında bilgi edinmeyi sağlar. Özgül antikorlar aracılığıyla örnekteki antijenler, özgül antijenler aracılığıyla örnekteki antikorlar değerlendirilebilir. Gerekli malzeme ve reaktifler şunlardır:



★ Denatürasyon

★ Eşleşme

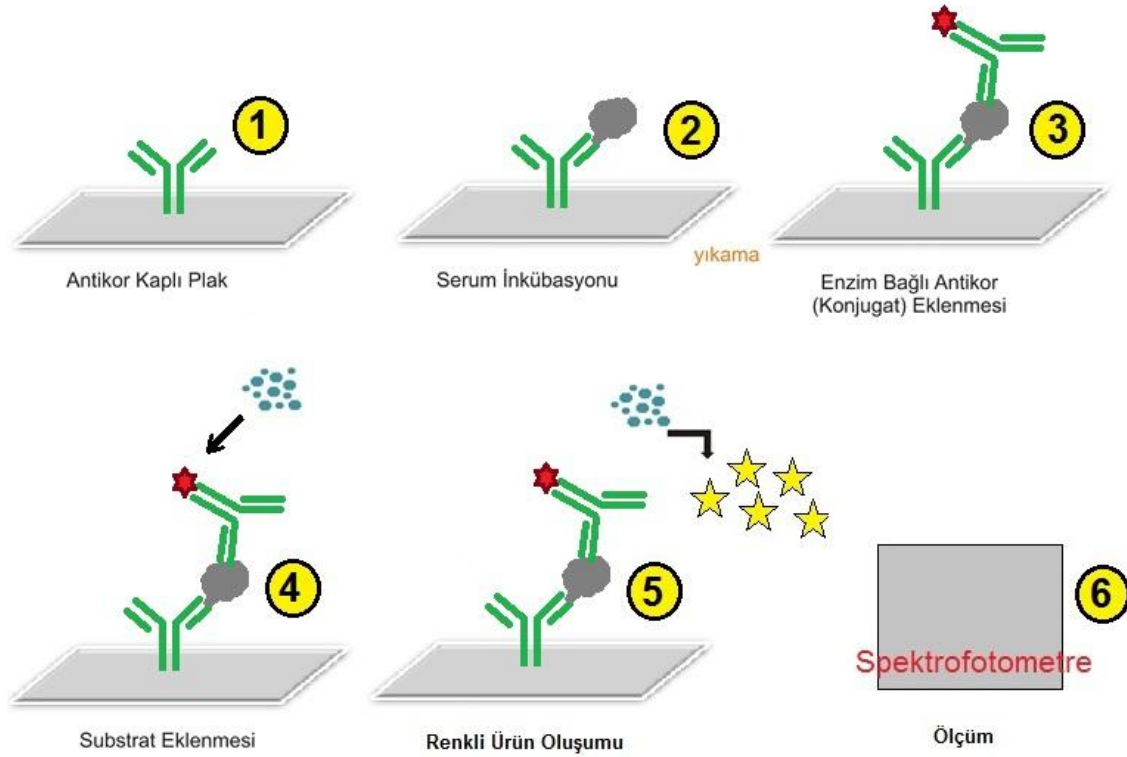
★ Uzama

Şekil-5: PCR

- Katı faz olarak kullanılacak polistren ölçüm tüpü, boncuk veya mikroplak kuyucukları
- Katı faza adsorbe edilmiş reaktif: Bu reaktif, örnekte antijen araştırılan durumlarda antikor; antikor araştırılan durumda antijen olabilir.
- Konjugat/Reaktif: Alkalen fosfataz (ALP), horseradish peroksidaz (HRP), biotin ve benzeri bir enzimle ile işaretlenmiş spesifik antikor veya anti-human antikor.
- Substrat: Konjugattaki enzimin renk değiştirmesi için kullanılan 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazolium chlorid (BCIP/NBT), Tetrametilbenzidin (TMB) ve streptavidin ve benzeri kromojenik solüsyonlar.
- Yıkama solüsyonu (Phosphate Buffered Saline; PBS): İşlem basamakları arasında spesifik olmayan bağlantıları engellemek amacıyla yapılan yıkama işleminde kullanılır.
- Durdurma solüsyonu: Kromojenik substratın kendiliğinden renk değiştirmesini engellemek için kullanılan asidik/bazik çözeltiler.
- Spektrofotometre: İşlem sonunda ortaya çıkacak renk şiddeti ve analit konstrasyonunu ölçmek için kullanılır.

Reaktif adsorbe edilmiş katı faza örnek pipetlenir ve inkübe edilir. Örnekte reaktifte spesifik antijen veya antikor var ise reaktifte bağlanarak antikor-antijen kompleksleri oluşturması beklenir. Yıkama ile antikor-antijen kompleksleri dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır. Konjugat eklenir, inkübe edilir ve antijen-antikor-konjugat komplekslerinin [(primer antikor-spesifik antijen-enzim işaretli spesifik antikor) veya (primer antijen-spesifik

antikor-enzim işaretli anti-human antikor)] oluşması beklenir. Yıkama ile antijen-antikor-konjugat kompleksi dışındaki maddeler ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra substrat eklenir. Ardından durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır ve spektrofotometrede değerlendirilir (Şekil-6). Örnekte reaktifte spesifik antijen veya antikor var ise renkli ürün oluşur ve negatif kontrol değerlerine göre anlamlı bir sonuç elde edilir. Renkli ürün oluşumu, örnekte bulunan reaktifte spesifik ligandın konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



Şekil-6: ELISA

Katı faza adsorbe edilen reaktifin ve eklenen konjugatın türüne göre ELISA'nın direkt, indirekt, sandviç ve kompetitif ELISA gibi türleri bulunmaktadır. Ayrıca kullanılan katı fazın (lateks partikül gibi) ve konjugatı işaretleyen yapının (floresan madde, luminesans veren madde gibi) türlerine; yöntemdeki ve okuma aşamasındaki farklılıklara göre de Mikropartikül Enzim İmmünoassay (MEİA), Floresan Polarizasyon İmmünoassay (FPIA), Kemilüminesans olarak isimlendirilen ELISA teknikleri bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

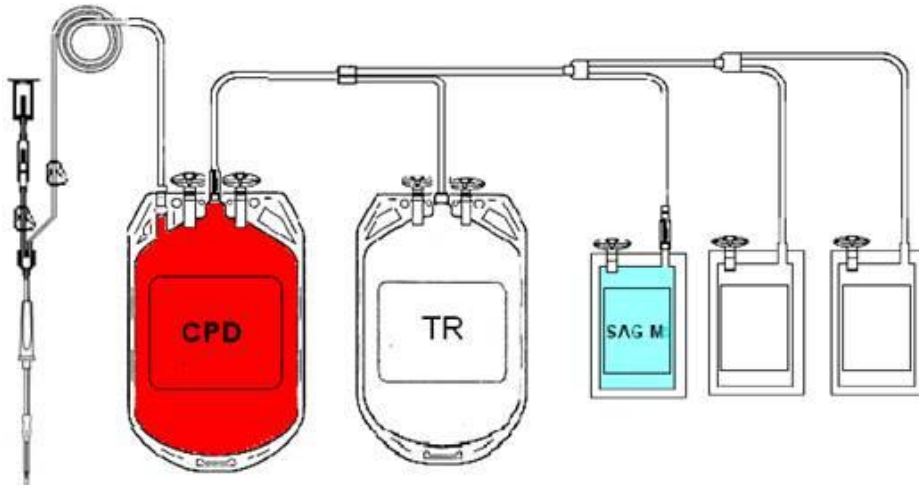
Bu çalışma;

- 3.1. Kanların alınması ve örneklerin hazırlanması
- 3.2. Sitokinlerin çalışılacağı örnek plazmaların ayrıştırılması ve çalışılması
- 3.3. Filtre edilmemiş ES örneklerinde akım-sitometrik ölçümlerin yapılması
- 3.4. Filtre edilmemiş ES örneklerinden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve transkripsiyon faktörlerinin çalışılması
- 3.5. İstatistiksel değerlendirmenin yapılması aşamalarından oluşmaktadır.

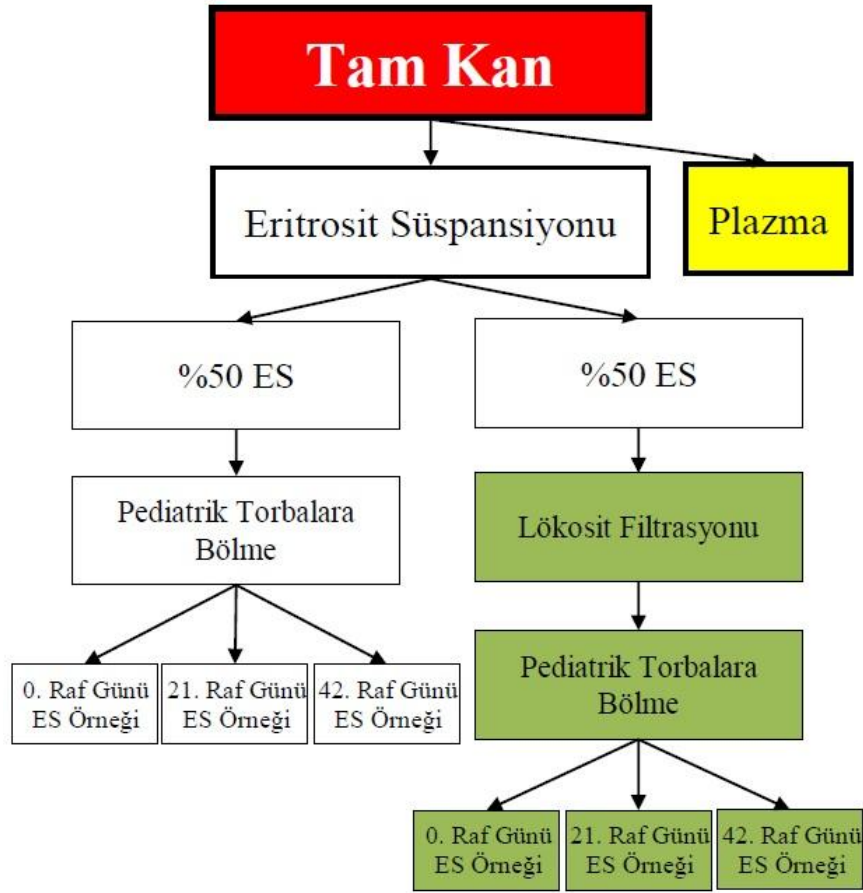
3.1. Kanların Alınması ve Örneklerin Hazırlanması

Çalışma için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alındı (Onay No: 2011-3/20 ve Onay Tarihi: 25.01.2011). Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezine başvuran ve "Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi 2011" bağışçı seçim ölçütlerine uygun 10 gönüllü bağışçıdan *CPD/SAG-M Dörtlü Pediatrik Komponent Sistemi* isimli kan torbalarına (Mamül Kodu: 20000006380, Kansuk, Türkiye) (Şekil-7) alınan 10 ünite tam kanda Şekil-8 deki algoritma uyarınca aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

- N-ES örneklerinin elde edilmesi
- LA-ES örneklerinin elde edilmesi
- LA-ES / N-ES örneklerin sonraki aşamalar için hazırlanması



Şekil-7: CPD/SAG-M Dörtlü Pediatrik Komponent Sistemi



Şekil-8: Tam Kandan Örneklerin Hazırlanma Algoritması

3.1.1. N-ES Örneklerinin Elde Edilmesi:

Oda sıcaklığında 2-6 saat bekletilen tam kanlar, ES ve taze plazma elde etmek amacıyla “Soğutmalı (4°C) Komponent Santrifüjü”nde (Hettich, Roto Silenta 630 RS, Almanya) 3100 rpm hızda 18 dakika çevrildi. Tabakalanan tam kanın en üstte kalan bölümü (plazma) ayrı bir torbaya alındı (Şekil-9) ve “Hortum Kapatma Cihazı” (Delcon, HemoWeld-T, İtalya) aracılığı ile steril olarak sistemden



Şekil-9: Plazmanın ayrılması

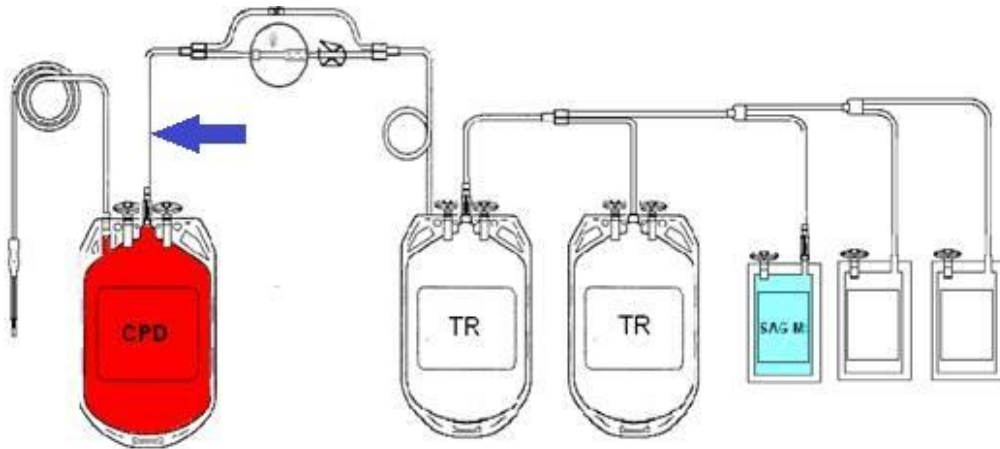
ayrıldı. Ana torba içerisinde kalan ES'nin üzerine pediatrik torbalardan birinde bulunan ek solüsyon (SAG-M) eklendi. Elde edilen ek solüsyonlu ES'nin yarısı eşit olarak üç pediatrik torbaya paylaştırıldı (Şekil-10a). Ardından önceden kimliklendirilmiş olan üç pediatrik torba N-ES'lerin 0, 21 ve 42 stok günü örneklerini oluşturmak üzere hortum kapatma cihazı ile birbirinden ayrıldı (Şekil-10b).



Şekil-10: N-ES örneklerinin oluşturulması (a) ES'nin bölünmesi, (b) N-ES ve ES örnekleri

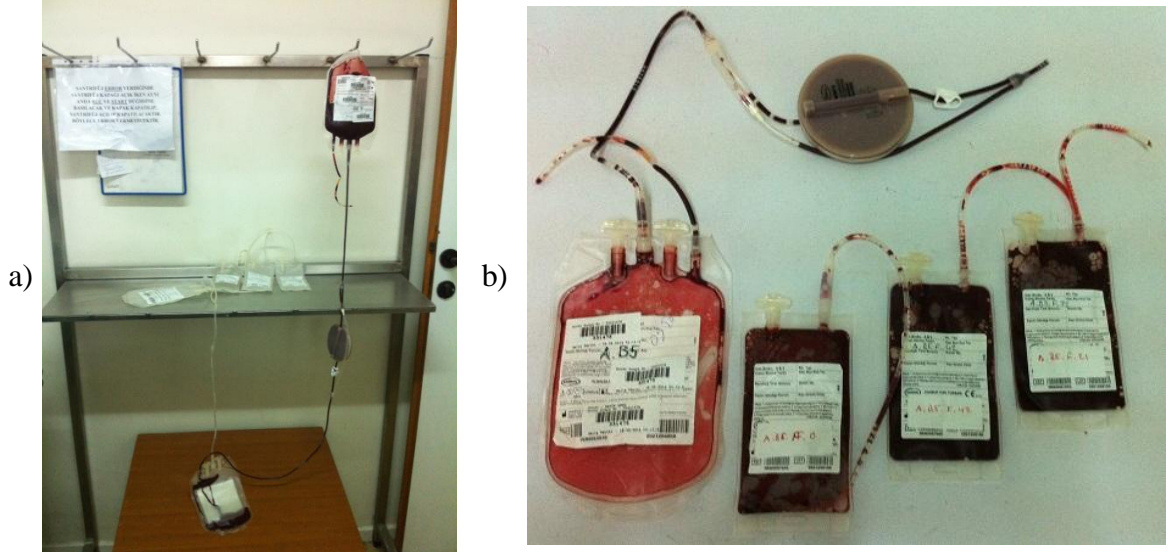
3.1.2. LA-ES Örneklerinin Elde Edilmesi:

Pediatrik torbalara bölünmeden ana torbada bırakılan ES, LA-ES örneklerini oluşturmak amacıyla, 4log lökosit filtreli *Tam Kan Lökosit Filtreli CPD/SAG-M Dörtlü Pediatrik Komponent Sistemi* (Kansuk, Türkiye) adlı torbalarla Şekil-11'de ok ile işaret edilen yerden



Şekil-11: Kan Lökosit Filtreli CPD/SAG-M Dörtlü Pediatrik Komponent Sistemi steril koşullarda birleştirildi. Birleştirme için TSCD-T model "Steril Tüp Birleştirme Sistemi" (Terumo, ABD) kullanıldı. Birleştirme sonrası ES, birleştirildiği torba sisteminde

bulunan ve ürün içerisindeki lökositleri %99,99 (4log) azaltma kapasitesi olan lökosit filtresinden (Pall, İngiltere) geçirilerek transfer torbaya aktarıldı (Şekil-12a). Transfer torbasına aktarılan ES, üç pediatrik torbaya eşit olarak dağıtıldı. Daha önceden kimliklendirilmiş olan pediatrik torbalar 0, 21 ve 42. raf günleri için LA-ES örneklerini oluşturdu (Şekil-12b).

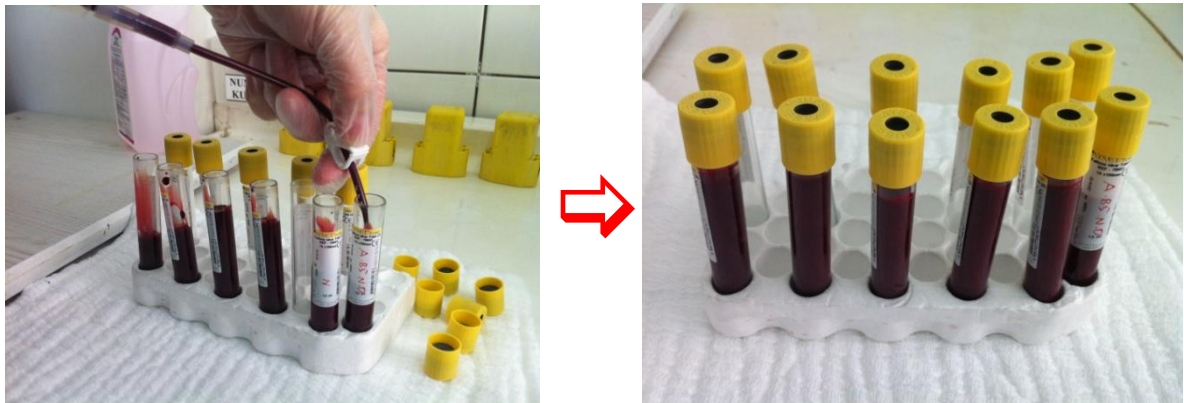


Şekil-12: LA-ES örneklerinin oluşturulması (a) ES'nin filtrasyonu, (b) LA-ES örnekleri

Oluşturulan N-ES ve LA-ES örneklerinin 21 ve 42. raf gününü temsil edecek olanları kan saklama dolaplarında (Nüve, Türkiye) saklanırken, 0. gün örnekleri çalışmanın geri kalan aşamaları için işleminden geçirildi ve hazırlandı. Bu hazırlık işlemleri 21 ve 42. raf günleri geldiğinde ilgili örneklere de 0. gün örneklerine benzer şekilde uygulandı.

3.1.3. LA-ES / N-ES Örneklerin Sonraki Aşamalar İçin Hazırlanması:

LA-ES ve N-ES örnek torbaları içindeki kanlar 5-7 adet tüplere 10'ar mL'lik aktarıldı (Şekil-13).



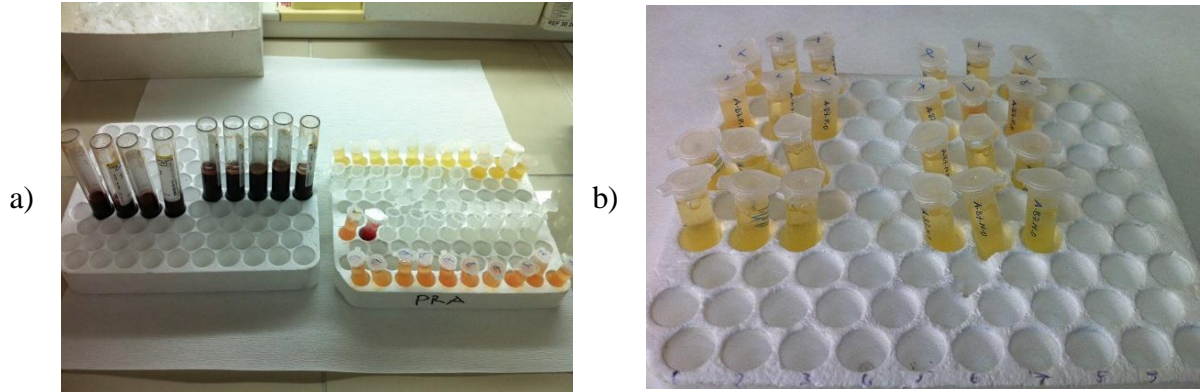
Şekil-13: LA-ES ve N-ES örneklerinin tüplere aktarılması

LA-ES örnek tüplerinin tümü, lökositten arındırıldıkları ve içlerinde teorik olarak yeterli düzeyde lökosit bulunmadığı düşünüldüğü için sadece sitokin çalışmaları için plazma kaynağı olarak ayrıldı.

N-ES örnek tüplerinin biri lenfosit alt gruplarına yönelik akım-sitometrik ölçümler için, ikincisi RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve transkripsiyon faktörlerini çalışmak için, geriye kalanlar ise sitokin çalışmaları için plazma kaynağı olarak ayrıldı.

3.2. Sitokinlerin Çalışılacağı Örnek Plazmaların Ayrıştırılması ve Çalışılması

Sitokin çalışmaları için ayrılan N-ES ve LA-ES örnek tüpleri önce 3.500 x g de 10 dakika santrifüj edildi. Plazmaları ayrılarak 1,5 mL'lik küçük tüplere aktarıldı (Şekil-14a). Küçük tüpler plazma içinde kalan hücre artıklarından plazmayı arındırmak için 15.000 x g de 7 dakika ikinci kez santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası örnekler yeni tüplere alınarak etiketlendi ve -20/-80 °C derin dondurucularda (Sanyo, Japonya ve Revco, ABD) saklandı (Şekil-14b).



Şekil-14: Örnek plazmalarının elde edilmesi (a) Küçük tüplere aktarma (b) Saklanan örnekler

Saklanan örneklerde IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- α , TGF- β ve IFN- γ 'nın plazma düzeylerini belirlemek için ticari ELISA kitleri (BioLegend, ABD) kullanıldı.

3.2.1. Reaktiflerin ve Örneklerin Hazırlanması:

- Tüm reaktifler kullanmadan göre sulandırıldı.
- Wash Buffer (20x) kendisinin 19 katı deiyonize su ile sulandırılıp 1x dilüsyonuna getirilerek 1x Wash Buffer elde edildi. İçinde kristalize yapı kalmamasına dikkat edildi. Kristalleşme var ise oda ısısında bekletildi ve çözünene kadar vortekslendi.

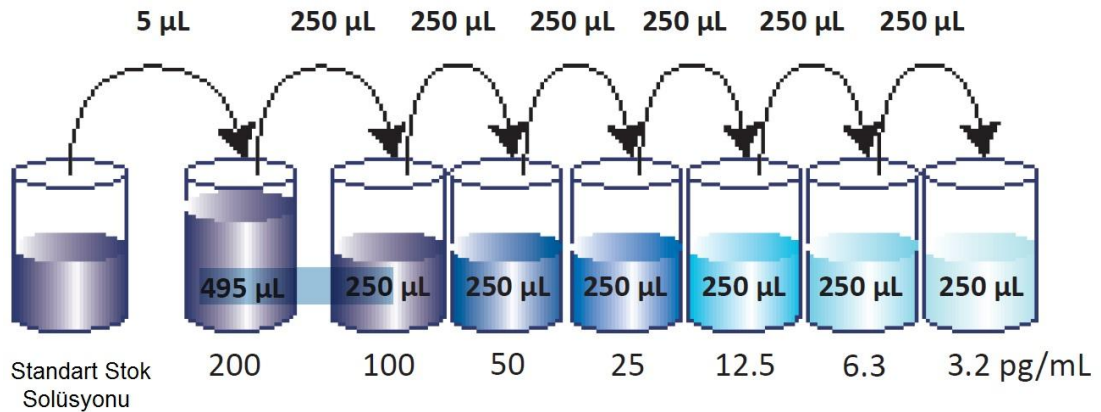
- Liyofilize haldeki sitokin standartları 20 ng/mL Standart Stok Solüsyonu elde etmek üzere, şişe üzerinde belirtilen miktarlarda Assay Buffer A solüsyonu ile sulandırıldı. Sulandırılan standartlar 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tamamen karışması için hafifçe vortekslendi.

- IL-4 ölçümleri için liyofilize haldeki matriks C'nin ve IL-8 ölçümleri için liyofilize haldeki matriks A'nın kullanılması gerektiği için bu sitokinler ölçüleceği zaman liyofilize malzeme şişe içinde 2mL deiyonize su ile sulandırılıp, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tamamen karışması için hafifçe vortekslendi.

- Plazma örneklerinin sulandırılmasına kit talimatına göre gerek olmadığı için örnekler sulandırılmadı.

3.2.2. Test Prosedürü:

- Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
- Her sitokin için istenen oranda dilüe edilmiş Standart Stok Solüsyonu elde etmek için belirtilen miktarda Standart Stok Solüsyonu yine belirtilen miktarda Assay Buffer A ile sulandırılarak 500 µL'lik volüm elde edildi. Elde edilen volüm 250 µL'lik aktarımlarla 6 kez ½ sulandırıldı (Şekil-15).



Şekil-15: IL-17A Standart Stok Solüsyonu dilüsyonu

- Plaktaki tüm kuyucuklar en az 4 kez 1x Wash Buffer ile yıkandı ve ters çevirip kurutma kağıdına vurularak kurutuldu. Sonraki tüm yıkamalar aynı şekilde yapıldı.

- Standartların ve örneklerin plak üzerindeki yerleşimi Şekil-16'daki gibi yapıldı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1/1	Std 1/1	1	9	17	25	33	41	49	57		
B	Std 1/2	Std 1/2	2	10	18	26	34	42	50	58		
C	Std 1/4	Std 1/4	3	11	19	27	35	43	51	59		
D	Std 1/8	Std 1/8	4	12	20	28	36	44	52	60		
E	Std 1/16	Std 1/16	5	13	21	29	37	45	53			
F	Std 1/32	Std 1/32	6	14	22	30	38	46	54			
G	Std 1/64	Std 1/64	7	15	23	31	39	47	55			
H	Sıfır Std	Sıfır Std	8	16	24	32	40	48	56			
	Standartlar		Örnekler									

Şekil-16: ELISA plaklarında standartların ve örneklerin yerleşim planı

- IL-6, 9, 10, 13, 17A, 22, IFN- γ , TNF- α , TGF- β için, tüm kuyucuklara 50 μ L Assay Buffer A,
- IL-4 için, standart kuyucuklarına 50 μ L Matrix C, örnek kuyucuklarına 50 μ L Assay Buffer A,
- IL-8 çalışılırken, standart kuyucuklarına 50 μ L Matrix A, örnek kuyucuklarına 50 μ L Assay Buffer A eklendi.
- Şekil-16'daki plana uygun şekilde 50'şer μ L standart ve 50'şer μ L örnek uygun kuyucuklara pipetlenip plak üzeri Plate Sealer ile kapatıldı.
- Plaklar oda ısında 2 saat süresince 200 rpm de çalkalanarak (Biosan, Mini Rocker MR-1; Letonya) inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda plak içeriği dökülüp plak 4 kez yıkandı.
- Çalışılan sitokine spesifik antikolar her kuyucuğa 100'er μ L pipetlenip, plak üzeri kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak inkübe edildi.
- Plak içeriği lavaboya dökülüp, plak 4 kez yıkandı.
- Her kuyucuğa 100'er μ L Avidin-HRP pipetlenip, plak üzeri kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 20 dakika çalkalanarak inkübe edildi.
- Plak içeriği dökülüp, plak 5 kez yıkandı. İlk 4 yıkama öncekiler gibi iken, arka plan sinyalini en aza indirmek amacıyla 5. yıkamada yıkama solüsyonu kuyucuklarda 30-60 saniye bekletildi.
- Her kuyucuğa 100'er μ L Substrate Solution pipetlendikten sonra plaklar karanlıkta 10-30 dakika bekletildi.
- Karanlıktan çıkartılan plakların tüm kuyucuklarına 100'er μ L Stop Solution eklendikten sonra 30 dakika içinde 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Sunrise, Tecan, İsviçre) absorbans değeri belirlendi (Ölçüm dalgaboyu: 450 nm; Referans dalgaboyu: 620 nm).
- Her sitokin için Şekil-17'dekine benzer veriler elde edildi.

Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 450 nm
Read mode: Normal
Unit: OD

Raw data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.888	1.357	0.236	0.402	0.246	0.405	0.327	0.102	0.12	0.077	0	0
B	1.535	1.214	0.449	0.473	0.256	0.314	0.152	0.09	0.122	0.071	0	0
C	0.388	0.498	0.738	0.9	0.222	0.16	0.273	0.081	0.095	0.084	0	0
D	0.311	0.442	1.118	0.217	0.869	0.297	0.545	0.082	0.088	0.088	0	0
E	0.273	0.228	0.256	0.098	0.109	0.101	0.104	0.111	0.117	0	0	0
F	0.182	0.164	1.238	0.158	0.229	0.088	0.122	0.114	0.142	0	0	0
G	0.1	0.102	0.43	0.09	0.094	0.092	0.091	0.108	0.144	0	0	0
H	0.088	0.094	0.083	0.101	0.107	0.089	0.08	0.086	0.317	0	0	0

Şekil-17: ELISA sonuçlarına örnek

3.2.3. Sitokin Düzeyi Sonuçlarının Hesaplanması:

Her sitokin için ayrı ayrı eğri oluşturulup elde edilen verilen buna göre değerlendirildi. Eğri oluşturmak için standartların sonuçları ve referans değerler kullanıldı. Her standart dilüsyon için elde edilen 2 değerın ortalaması alındı. Bu ortalama değerin X eksenine, referans değerin Y eksenine getirilmesi ile eğriler ve bunlara ilişkin formüller elde edildi. Elde edilen formüller örneklerden elde edilen sonuçlara uygulanarak sitokin düzeylerine yönelik asıl değerlere ulaşıldı.

3.3. Filtre Edilmemiş ES Örneklerinde Akım-Sitometrik Ölçümlerin Yapılması

N-ES'lere ait örnek tüplerinden bir tanesi, akım-sitometre yöntemi ile Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ve Treg hücrelerinin yüzey belirteçlerine ve hücre içi sitokin ekspresyonlarına göre araştırılmasında kullanıldı. Bu grup çalışma, LA-ES içerisinde teorik olarak yeterli düzeyde lökosit bulunmadığı düşünüldüğü için, LA-ES'lerde yapılmadı.

3.3.1. Lenfosit Alt Gruplarının Değerlendirilmesi:

Çalışmada her örnek için 19 adet akım-sitometre tüpü (12x75 mm) kullanıldı. İnsan MNH yüzey belirteçlerine karşı sıçan ve farelerden elde edilmiş fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC), peridinin-chlorophyll proteins (PerCP), phycoerythrin-cyanin5.1 (PE-Cy5) veya alexa-fluor 647 (AF647) ile işaretli monoklonal antikorlardan yararlandı. Kullanılan antikorların prospektüs bilgileri

doğrultusunda Th1, Th2, Th9, Th22 ve Treg hücreler için farklı, Th17 için farklı protokol uygulandı.

Çalışmamızda kullanılan monoklonal antikorlar: IgG1 FITC, IgG1 APC, IgG1 PE, IgG2A PE, IgG1 AF647 / CD3 FITC / CD4 PE (BioLegend, ABD), IgG1-PE Cy5 (eBioscience, ABD), CD3 APC, CD4 FITC, IFN- γ PE, TNF- α PE, IL-4 APC, IL-5 PE, IL-9 PE, IL-21 APC, IL-22 PE, IL-17 AF647 / CD3 FITC / CD4 PE (BioLegend, ABD), IL-13 FITC, IL-21 APC, Foxp3 PE Cy5, CD4 FITC / CD25 PE, CD127 APC (eBioscience, ABD), CD3 PerCP ve CD4 PE (BD Biosciences, ABD).

3.3.1.1. Th1, Th2, Th9, Th22 ve Treg Protokolü

- Bu grup için 17 adet akım-sitometre tüpü kullanıldı.
- Her tüpe N-ES örneğinden 100 μ L eklendi.
- Yüzey belirteçlerini monoklonal antikorlarla işaretlemek için, boyalar ile konjuge monoklonal antikorlar her tüpe Tablo-1’de belirtildiği şekilde eklendi.
- Tüpler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi.
- Yüzey belirteçlerini monoklonal antikorlar ile işaretledikten sonra hücre içi sitokinlerin saptanması için bir sonraki aşamaya geçildi.
- 10 x Permiabilisation Buffer (eBioscience, ABD) 1/10 oranında distile su ile dilüe edilerek, inkübasyonu tamamlanan tüplere 2 mL eklendi.
- 300 x g’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatanı pipetlenerek atıldı.
- Dipte kalan pelletlerin üzerine 100 μ L Intracellular Fixation Buffer (eBioscience, ABD) eklendi, vortekslendi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- Tüplerin üzerine 2 mL 1/10 oranında dilüe edilmiş Permiabilisation Buffer eklenerek 300 x g’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatanı pipetlenerek atıldı. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı.
- Tüm tüplere Tablo-2 de belirtildiği şekilde konjuge monoklonal antikorların eklenmesi ile hücre içi boyama yapıldı.
- Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- Her tüpe 2 mL 1/10 oranında dilüe edilmiş Permiabilisation Buffer eklenerek 300 x g’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatanı pipetlenerek atıldı.
- Her tüpe 500 μ L 1/10 oranında dilüe edilmiş Permiabilisation Buffer eklenerek akım-sitometrede (Navios, Beckman/Coulter, ABD) okutuldu.

Tablo-1: MNH yüzey belirteçleri için monoklonal antikorlar

Tüp No		Antikor	Miktar (µL)	Antikor	Miktar (µL)
1	Th1	CD4 FITC	6	CD3 APC	3
2		CD4 FITC	6	CD3 APC	3
3		CD4 FITC	6	CD3 APC	3
4	Th2	CD4 FITC	6	CD3 PerCP	3
5		CD4 FITC	6	CD3 PerCP	3
6		CD4 PE	6	CD3 PerCP	3
7		CD4 PE	6	CD3 PerCP	3
8		CD4 PE	6	CD3 PerCP	3
9		CD4 PE	6	CD3 PerCP	3
10	Th9	CD4 FITC	6	CD3 APC	3
11		CD4 FITC	6	CD3 APC	3
12	Th22	CD4 FITC	6	CD3 APC	3
13		CD4 FITC	6	CD3 APC	3
14		CD4 FITC	6	CD3 PerCP	3
15		CD4 FITC	6	CD3 PerCP	3
16	T _{reg}	CD4 FITC / CD25 PE	5	IgG1 APC	5
17		CD4 FITC / CD25 PE	5	CD127 APC	5

3.3.1.2. Th17 Protokolü:

- Prospektüs bilgisi gereği Th17 için yüzey belirteçleri ve hücre içi sitokinleri eş zamanlı çalışıldı.
- Th17 için 2 adet akım-sitometre tüpü kullanıldı ve her tüpe N-ES örneğinden 100 µL eklendi.
- Üzerlerine 500 µL Fixation Buffer (BioLegend, ABD) eklendi, vortekslendi ve 20 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 1/10 oranında dilüe edilmiş Permiabilisation Wash Buffer dan (BioLegend, ABD) iki tüpe de 2'şer mL eklenerek 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatanı pipetlenerek atıldı. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı.
- Tüplere 100'er µL Permiabilisation Wash Buffer ekleyip, üzerine Tablo-3 de belirtildiği şekilde konjuge monoklonal antikorlar eklendi.
- Oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- 1/10 oranında dilüe edilmiş Permiabilisation Buffer ile 2 kez yıkama yapıldı.

Her tüpe 500 µL 1/10 oranında dilüe edilmiş Permiabilisation Buffer eklenerek akım-sitometrede değerlendirildi.

Tablo-2: Hücre içi sitokinler için monoklonal antikorlar (Açık renkli sütun)

Tüp No		Antikor	Miktar (µL)	Antikor	Miktar (µL)	Antikor	Miktar (µL)
1	Th1	CD4 FITC	6	CD3 APC	3	IgG1 PE	5
2		CD4 FITC	6	CD3 APC	3	IFN-γ PE	5
3		CD4 FITC	6	CD3 APC	3	TNF-α PE	5
4	Th2	CD4 FITC	6	CD3 PerCP	3	IgG2A PE	5
5		CD4 FITC	6	CD3 PerCP	3	IL-5 PE	5
6		CD4 PE	6	CD3 PerCP	3	IgG1 FITC	5
7		CD4 PE	6	CD3 PerCP	3	IL-13 FITC	5
8		CD4 PE	6	CD3 PerCP	3	IgG1 APC	5
9		CD4 PE	6	CD3 PerCP	3	IL-4 APC	5
10	Th9	CD4 FITC	6	CD3 APC	3	IgG2A PE	5
11		CD4 FITC	6	CD3 APC	3	IL-9 PE	5
12	Th22	CD4 FITC	6	CD3 APC	3	IgG1 PE	5
13		CD4 FITC	6	CD3 APC	3	IL-22 PE	5
14		CD4 FITC	6	CD3 PerCP	3	IgG1 APC	5
15		CD4 FITC	6	CD3 PerCP	3	IL-21 APC	5
16	T _{reg}	CD4 FITC / CD25 PE	5	IgG APC	5	IgG PE Cy5	5
17		CD4 FITC / CD25 PE	5	CD127 APC	5	Foxp3 PE Cy5	5

Tablo-3: Th17 yüzey belirteçleri için monoklonal antikorlar

Tüp No		Antikor	Miktar (µL)
18	Th17	IgG1 AF647 / CD3 FITC / CD4 PE	10
19		IL-17 AF647 / CD3 FITC / CD4 PE	10

3.4. Filtre edilmemiş ES örneklerinden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve transkripsiyon faktörlerinin çalışılması:

N-ES'lere ait örnek tüplerinden biri, T hücre alt gruplarına ait transkripsiyon faktörleri olan T-bet, GATA3, PU.1, RORC2, AHR ve Foxp3'ü RT-PCR yöntemiyle araştırmada kullanıldı. Bu çalışma, içerisinde teorik olarak yeterli düzeyde lökosit bulunmadığı için LA-ES'lerde yapılmadı. Transkripsiyon faktörlerinin araştırılması aşağıda belirtilen dört aşamada gerçekleştirildi.

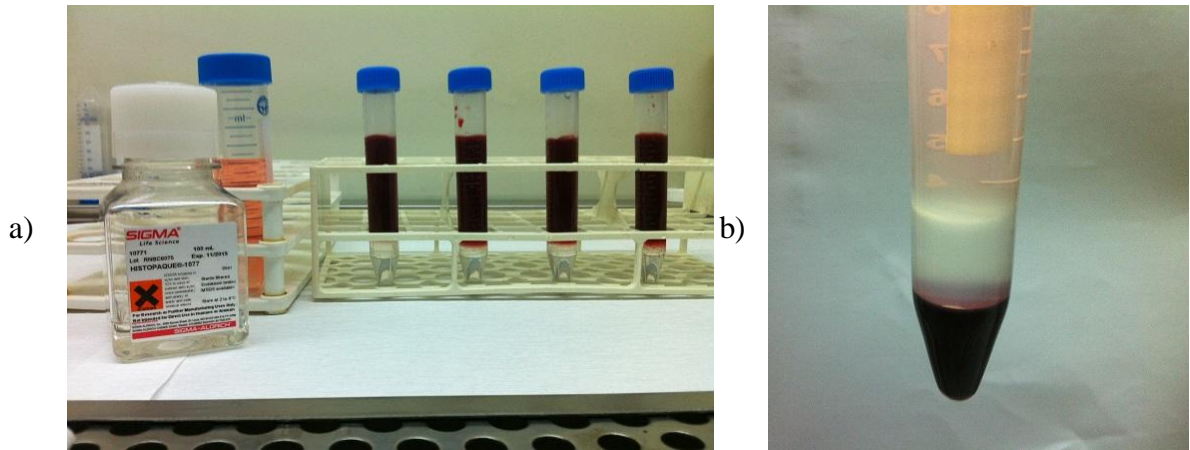
- 3.4.1. Örnek tüplerindeki MNH'lerin ayrıştırılması
- 3.4.2. MNH'lerden RNA izolasyonu
- 3.4.3. cDNA sentezi
- 3.4.4. Real-Time PCR yöntemiyle transkripsiyon faktörlerinin çalışılması

3.4.1. Örnek Tüplerindeki MNH'lerin Ayrıştırılması:

MNH'ler Ficoll (Histopaque-1077, Sigma Aldrich, MO, ABD) ile dansite gradient yöntemiyle ayrıştırıldı. Ayrıştırma işlemleri sınıf II kabinde gerçekleştirildi.

- Bu işlem için 15 mL'lik 4 test tüpüne 3'er mL Ficoll eklendi.
- N-ES örneği 50 mL'lik test tüpüne boşaltıldı ve üzerine yaklaşık x2 veya x3 oranında (~20-30 mL) RPMI (Lonza RPMI 1640, Belçika) eklenerek karıştırıldı. Bu karışım 4 tüpe, Ficoll'ün üzerine, ama Ficoll ile karıştırılmadan eşit miktarda dağıtıldı (Şekil-18a).

- Tüpler 2500 rpm hızında 20 dakika santrifüj edildi.
- Santrifügasyon sonrası içeriği eritrosit, Ficoll, MNH'ler ve RPMI şeklinde tabakalanan tüpten (Şekil-18b), eritrosit ile temas etmeden bir miktar Ficoll tabakası, MNH zonu ve bir miktar da RPMI tabakası pipetlenerek alındı.



Şekil-18: MNH ayrıştırma (a) Örneğin Ficoll üzerine eklenmesi (b) Santrifügasyon sonrası tabakalar

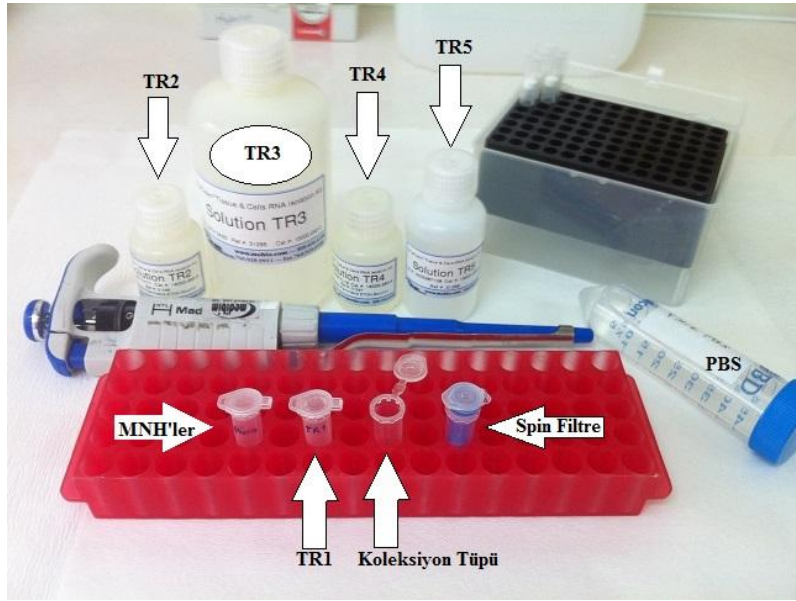
- Pipetlenen sıvı yeni hazırlanan 15 mL'lik iki test tüpüne aktarıldıktan sonra üzerlerine 10-12 mL seviyesine kadar RPMI eklendi.
- Bu tüpler 1500 rpm hızında 10 dakika daha santrifüj edilip, süpernatantları atıldı.
- Dibinde hücre bulunan tüplerden ilki vortekslendikten sonra üzerine 1mL PBS eklenerek resüspande edildi. Ardından ikinci tüp vortekslenerek ilk tüpteki resüspande

edilen hücreler bu tüpe aktarıldı ve karıştırıldı. Bu sayede yaklaşık 1 mL hacme sahip MNH süspansiyonu elde edildi.

- Süspansiyonu içindeki lökositler *Thoma Lamı* ile sayıldı.

3.4.2. MNH'lerden RNA İzolasyonu:

MNH süspansiyonundan RNA izolasyonu için UltraClean Tissue&Cells RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, ABD) kullanıldı (Şekil-19).



Şekil-19: RNA İzolasyon Kiti

İzolasyon aşağıda belirtildiği gibi yapıldı ve tüm aşamalar oda ısısında gerçekleştirildi.

- MNH süspansiyonu iki kez 2000 x g de 5 dakika santrifüj edilerek PBS ile yıkandı ve hücreler çöktürüldü. Süpernatanı atıldı.

- Çöken hücrelerin homojenizasyonu için, doku matriksini eriterek RNA'nın serbestleşmesini sağlayacak TR1 solüsyonunun hacmi belirlendi. Kullanılan kitin önerdiği şekilde, lökosit sayısı 5×10^6 dan az olan örnekler için 300 μ L, 5×10^6 – 1×10^7 arasında olan örnekler için 600 μ L TR1 solüsyonu hazırlandı ve her 100 μ L TR1 solüsyonuna 1 μ L β merkaptotanol (β ME) eklendi.

- Hazırlanan TR1 solüsyonu, çökeltinin üzerine 300 (veya 600) μ L eklendi.

- Örnek 2 mL'lik yeni bir koleksiyon tüpüne alındı ve görünür hücre debris kalmayana kadar 2 dk vortekslendi.

- Serbestleşen RNA'nın *Spin Filtre* membranına tutunması için gerekli ideal koşul, lizata (homojenize edilmiş hücre süspansiyonu) TR2 solüsyonundan (%70'lik etanol) 1 volüm (300 veya 600 μ L) eklenerek ve karıştırılarak sağlandı.

- 600 µL lizat spin filtreye aktarıldı ve 11.500 x g de 1 dakika çevrildi. Filtre yerinden çıkartılarak dipte kalan filtrat atıldı. Filtre aynı 2 mL'lik koleksiyon tüpüne geri kondu. TR1 ve TR2 solüsyonlarından 600'er µL kullanıldıysa, işlem tekrarlandı. Böylelikle RNA, membrandan geçerken filtreye bağlandı.

- Filtre 500 µL TR3 solüsyonu (kolondan proteinleri uzaklaştıran yıkama tamponu) ile yıkandı ve 11.500 x g de 1 dakika çevrildi.

- Filtre yeni bir 2 mL'lik koleksiyon tüpüne aktarıldı ve 500µL TR4 solüsyonuyla (etanol içerir ve solüsyon TR3'ten tuzları uzaklaştırır) 11.500 x g de 1 dakika çevrilerek yıkandı. Filtre yerinden çıkartılarak dipte kalan filtrat atıldı. Filtre aynı 2 mL'lik koleksiyon tüpüne geri kondu.

- Yukarıdaki 500µL TR4 solüsyonuyla yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı.

- Membranı kurutmak için filtre 2 mL'lik boş bir koleksiyon tüpünde 13.000 x g de 2 dk çevrildi ve yeni bir 2 mL'lik koleksiyon tüpüne aktarıldı.

- Kuruyan membrandan RNA'yı ayırmak için, 75 µL TR5 solüsyonu (RNase-Free su) doğrudan filtre membranı üzerine eklendi. 1 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra 11.500 x g de 1 dakika çevrildi. Filtre atıldı ve tüpteki RNA, cDNA sentezi için bir sonraki aşamaya aktarıldı.

3.4.3. cDNA sentezi:

Basamak 4.2. de elde edilen RNA taslak olarak kullanılarak cDNA sentezlendi. Sentez için ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, ABD) kullanıldı. Kitin protokolüne göre cDNA ürünü aşağıdaki gibi elde edildi:

- İlk olarak derin dondurucuda bekletilmesi gereken sistem bileşenleri buzları eritilerek soğutulmuş supora yerleştirildi.

- Steril RNase içermeyen mikrofüj tüpüne aşağıdaki bileşenler belirtilen miktarlarda eklenerek toplam 8 µL'lik bir hacim oluşturuldu ve karıştırıldı. İzole edilen RNA miktarı 42. gün örneklerinde azaldığı için kit prospektüsüne uygun olarak, 0 ve 21. gün örnekleri ile 42. gün örnekleri için farklı RNA ve primer miktarları kullanıldı (Tablo-4).

- Karışım, 70 °C de 5 dakika bekletilerek RNA denatüre edildi.

- 5 dakikalık denatürasyon aşamasından sonra aşağıdaki bileşenler belirtilen miktarda örnek tüpüne eklendi.

- M-MuLV Reaction Mix (dNTPs ve optimize tampon) → 10µL

- M-MuLV Enzyme Mix (M-MuLV Reverse Transcriptase ve murine RNase Inhibitor) → 2µL

Tablo-4: Kullanılan RNA ve Primer miktarları

Örnekler	RNA	Primer d(T) ₂₃ VN (50µM)	Nükleaz içermeyen su	Toplam miktar
0. gün	3 µL	2µL	3 µL	8 µL
21. gün	3 µL	2µL	3 µL	8 µL
42. gün	6 µL	2µL	-	8 µL

- Eş zamanlı olarak örneklerdeki DNA kontaminasyonunu test etmek amacıyla revers transkriptazsız bir kontrol reaksiyonu oluşturuldu. Kontrol reaksiyonu hazırlanmak istendiğinde, ikinci bir steril RNase içermeyen mikrofuj tüpünde aşağıdaki bileşenlerden 8 µL'lik bir hacim daha oluşturuldu ve karıştırıldı.

- RNA örneği → 3 µL,
- Primer d(T)₂₃VN (50µM) → 2µL,
- Nükleaz içermeyen su → 3 µL
- Kontrol reaksiyonu karışımı, 70 °C de 5 dakika bekletilerek RNA denatüre edildi.
- 5 dakikalık denatürasyon aşamasından sonra aşağıdaki bileşenler belirtilen miktarda kontrol tüpüne eklendi.
 - M-MuLV Reaction Mix → 10µL
 - H₂O → 2µL
- 20 µL cDNA sentez reaksiyonu (hazırlandıysa kontrol reaksiyonu da) 42°C da bir saat inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonrası enzim 80°C de 5 dakikada inaktive edildi.
 - 30 µL H₂O eklenmesiyle reaksiyon PCR için 50µL'e dilüe edildi.
 - Elde edilen cDNA ürünü -20°C de saklandı.
 - PCR amplifikasyonu için cDNA volümünün PCR reaksiyon volümünün 1/10'unu aşmamasına dikkat edildi.

3.4.4. RT-PCR Yöntemiyle Transkripsiyon Faktörlerinin Çalışılması:

Elde edilen cDNA'larla, özel olarak hazırlanarak kuyucuklarına spesifik primer ve probalar yerleştirilmiş olan paneller aracılığıyla RNA ekspresyon düzeyleri belirlendi. cDNA'ların kuyucuklardaki spesifik primer ve probalar ile reaksiyona girmesi hedeflendi. Bunun için 384 kuyucuk (24 sütun, 16 satır) ve 96 kuyucuk (12 sütun, 8 satır) içeren;

isteğimize göre hazırlanmış RealTime Ready (Roche, Almanya) panelleri kullanıldı. 384 kuyucuklu panelin her sütunu, transkripsiyon faktörleri ile ilişkili 6 gen (*TBX21*, *GATA3*, *AHR*, *SPI.1*, *FOXP3*, *RORC2*), 5 referans gen (*HPRT1*, *RPL13A*, *ACTB*, *GAPDH*, *YWHAZ*), 3 pozitif ve 2 negatif kontrolden oluşmaktaydı (Şekil-20). 96 kuyucuklu panelin ilk 6 satırında transkripsiyon faktörleri ile ilişkili aynı 6 gen ile 5 referans gen ve 1 pozitif kontrol, 7 ve 8. satırlarında ise negatif kontrol kuyucukları bulunmaktaydı (Şekil-21). Referans genler PCR kontrolü ve araştırılan genin ekspresyonunun rölatif kantitasyonu, pozitif kontroller reverse transkripsiyon aşamasının kalitesinin değerlendirilmesi, negatif kontroller RNA'da genomik DNA kalıntısının olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla plağa eklendi.

	1	2	3	4 - - - - 23	24
A	TBX21	TBX21	TBX21	TBX21	TBX21
B	GATA3	GATA3	GATA3	GATA3	GATA3
C	AHR	AHR	AHR	AHR	AHR
D	SPI.1	SPI.1	SPI.1	SPI.1	SPI.1
E	FOXP3	FOXP3	FOXP3	FOXP3	FOXP3
F	RORC2	RORC2	RORC2	RORC2	RORC2
G	HPRT1	HPRT1	HPRT1	HPRT1	HPRT1
H	RPL13A	RPL13A	RPL13A	RPL13A	RPL13A
I	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB	ACTB
J	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH
K	YWHAZ	YWHAZ	YWHAZ	YWHAZ	YWHAZ
L	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +
M	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +
N	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +	Kontrol +
O	Kontrol -	Kontrol -	Kontrol -	Kontrol -	Kontrol -
P	Kontrol -	Kontrol -	Kontrol -	Kontrol -	Kontrol -

Şekil-20: RT-PCR için 384 kuyucuklu RealTime Ready paneli

3.4.4.1. 384 Kuyucuklu Paneller Transkripsiyon Faktörlerinin Araştırılması:

Her cDNA örneğinden, LightCycler 480 Probes Master (Roche, Almanya) aracılığıyla 160'ar µL'lik PCR karışımları hazırlandı. Bu karışımlar 64 µL su, 90 µL probe master ve 16 µL örnek cDNA'lardan meydana geldi. Her örnek için ayrı ayrı hazırlanan bu karışımlar Şekil-20'de görülen sütunlardaki (1-24 sütun) her sütunun ilk 15 kuyucuğuna 10'ar µL eklendi. 16. satır kuyucukları için cDNA içermeyen ikinci bir PCR karışımı daha hazırlandı. Bu karışımlar 4 µL su, 5 µL probe master ve 1 µL her örneğe özgü total RNA'lardan meydana geldi. 10 µL'lik bu karışımlar her örnek için ilgili sütunun 16. satırındaki negatif kontrol kuyucuğuna aktarıldı. Ardından 3845 kuyucuklu plağın üzeri LightCycler 480 Sealing Foil ile kapatıldı. Üzeri dikkatlice kapatılan plak kuyucukların kenarına yapışmış olabilecek damlacıkların inmesi için 2 dakika yaklaşık 1.500 x g de santrifüj edildi. Plak LightCycler 480 cihazına yerleştirilerek PCR süreci başlatıldı.

3.4.4.2. 96 Kuyucuklu Panelle Transkripsiyon Faktörlerinin Araştırılması:

Her cDNA örneğinden, LightCycler 480 Probes Master (Roche, Almanya) aracılığıyla 280'ar µL'lik PCR karışımları hazırlandı. Bu karışımlar 112 µL su, 140 µL probe master ve 28 µL örnek cDNA'lardan meydana geldi. Her örnek için ayrı ayrı hazırlanan bu karışımlar Şekil-21'de görülen satırlardaki (1-6 satırlar) kuyucuklara ve bir negatif kontrol kuyucuğuna (satır 5, sütun1 vb) 20'şer µL eklendi. Ayrıca cDNA içeren PCR karışımı dışında cDNA içermeyen ikinci bir PCR karışımı daha hazırlandı. Bu karışımlar 8 µL su, 10 µL probe master ve 2 µL her örneğe özgü total RNA'lardan meydana geldi. 20 µL'lik bu karışımlar her örnek için ayrılan diğer negatif kuyucuğa (satır 6, sütun1 vb) aktarıldı. Ardından 96 kuyucuklu plağın üzeri LightCycler 480 Sealing Foil ile kapatıldı. Üzeri dikkatlice kapatılan plak kuyucukların kenarına yapışmış olabilecek damlacıkların inmesi için 2 dakika yaklaşık 1.500 x g de santrifüj edildi. Plak LightCycler 480 cihazına yerleştirilerek PCR süreci başlatıldı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TBX21	GATA3	AHR	SPL1	FOXP3	RORC2	RPL13A	YWHAZ	HPRT1	ACTB	GAPDH	Kontrol+
B	TBX21	GATA3	AHR	SPL1	FOXP3	RORC2	RPL13A	YWHAZ	HPRT1	ACTB	GAPDH	Kontrol+
C	TBX21	GATA3	AHR	SPL1	FOXP3	RORC2	RPL13A	YWHAZ	HPRT1	ACTB	GAPDH	Kontrol+
D	TBX21	GATA3	AHR	SPL1	FOXP3	RORC2	RPL13A	YWHAZ	HPRT1	ACTB	GAPDH	Kontrol+
E	TBX21	GATA3	AHR	SPL1	FOXP3	RORC2	RPL13A	YWHAZ	HPRT1	ACTB	GAPDH	Kontrol+
H	TBX21	GATA3	AHR	SPL1	FOXP3	RORC2	RPL13A	YWHAZ	HPRT1	ACTB	GAPDH	Kontrol+
G	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-
H	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-	Kontrol-

Şekil-21: RT-PCR için 96 kuyucuklu RealTime Ready paneli

3.4.4.3. PCR süreci:

PCR süreci denatürasyon, amplifikasyon ve soğuma basamaklarından meydana geldi. Bu basamakların ayrıntıları aşağıdaki gibi gerçekleşti.

Denatürasyon;

- 1 siklus
 - 95°C'da 10 dakika

Amplifikasyon;

- 45 siklus
 - 95°C'da 10 saniye
 - 60°C'da 30 saniye
 - 72°C'da 1 saniye

Soğuma;

- 1 siklus
 - 40°C'da 30 saniyelik bir soğuma

3.4.4.4. Veri Analizi:

Second derivative ya da fit point metodu ile LightCycler 480 yazılımıyla gerçekleştirildi. Plağa üzerindeki referans genler analiz edilen panel genlerin ekspresyonlarının rölatif kantitasyonu için kullanıldı. Rölatif kantitasyon analizi ile elde edilen verilerin $\Delta\Delta C_t$ metodu ile data analizi yapıldı.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda sürekli değişkenler medyan (minimum-maksimum) değerleriyle ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar Mann Whitney testi, grup içi karşılaştırmalar ise Wilcoxon işaretli sıra testi kullanılarak yapıldı. Bağımlı zaman dilimlerinde ölçümü yapılan değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları için yüzde değişim değerleri hesaplandı ve bu değerlerin karşılaştırmaları yine Mann Whitney testi kullanılarak yapıldı.

$$\text{Yüzde değişim (YD)} = \frac{\text{Son ölçüm} - \text{İlk ölçüm}}{\text{İlk ölçüm}}$$

İstatistiksel analizler SPSS v.21 programında yapılmış olup, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

10 adet kan bağışısından tam kanlar alınıp, 0, 21 ve 42. depolanma günleri için LA-ES ve N-ES örnekleri oluşturulduktan sonra ilgili testler çalışıldı. N-ES'lerde T hücre alt grupları, transkripsiyon faktörleri ve sitokinler, LA-ES'lerde ise lökosit içermedikleri düşüncesiyle sadece sitokinler çalışıldı. Bu testler sonucunda elde edilen tüm bulgulara ve boxplot grafiklere EKLER bölümünde bulunan tablolar ve şekiller aracılığı ile ulaşılabilir. BULGULAR bölümünde sadece bu bulgulara yönelik çizgi grafiklere ve istatistiksel değerlendirme sonuçlarına yer verilmiştir.

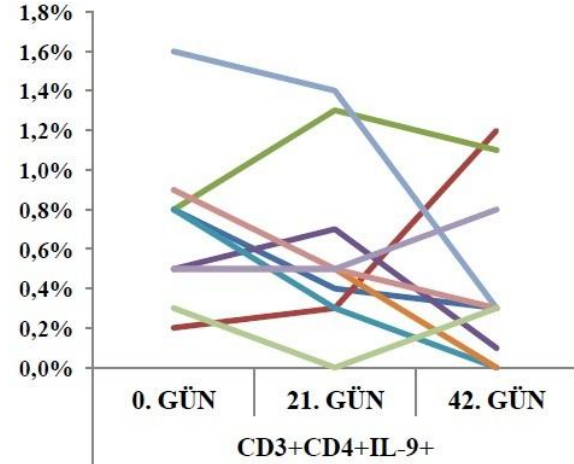
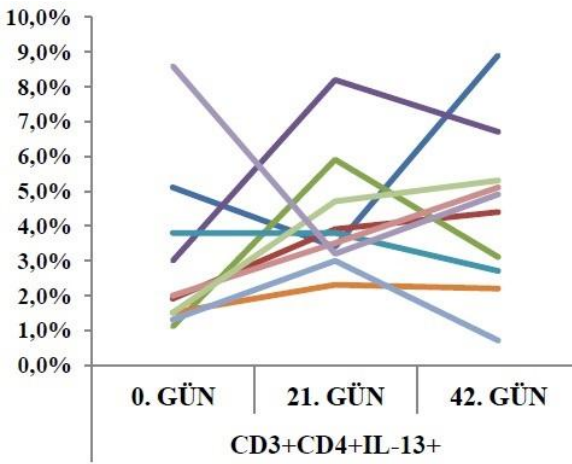
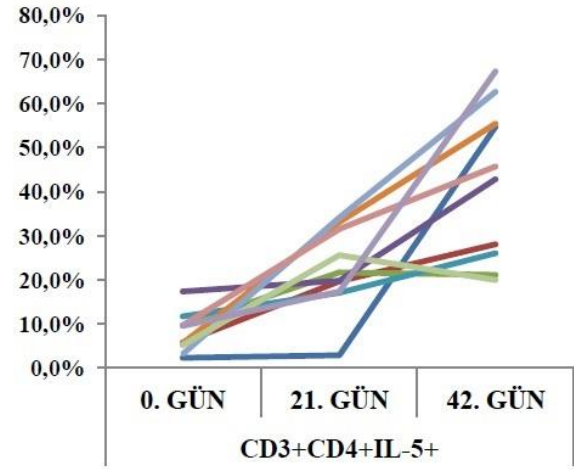
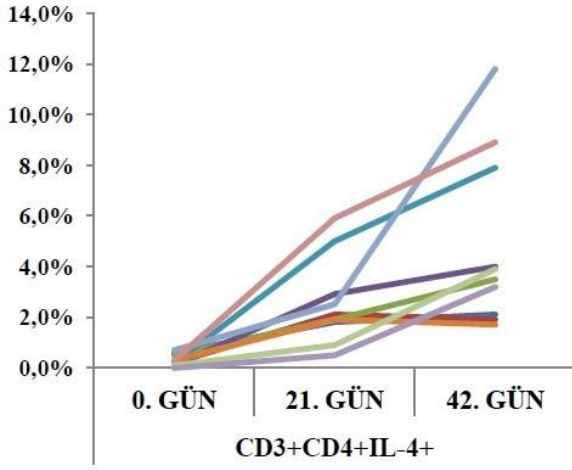
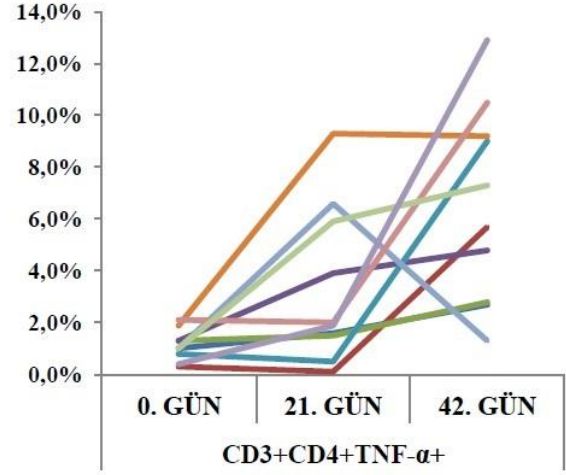
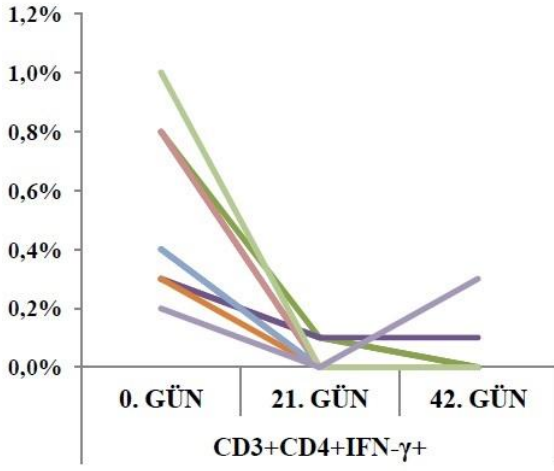
4.1. T Hücre Alt Grupları İçin Bulgular

Th hücre alt gruplarını değerlendirmek için hücre içi sitokinlerin akım-sitometrik ölçümleri aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Th1 için; $CD3^+CD4^+$ hücrelerde IFN- γ ve TNF- α ,
- Th2 için; $CD3^+CD4^+$ hücrelerde IL-4, IL-5 ve IL-13,
- Th9 için; $CD3^+CD4^+$ hücrelerde IL-9,
- Th17 için; $CD3^+CD4^+$ hücrelerde IL-17 ve IL-21,
- Th22 için; $CD3^+CD4^+$ hücrelerde IL-22
- Treg için; $CD4^+CD25^{high}$ hücrelerde Foxp3,
 $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ hücreler araştırıldı.

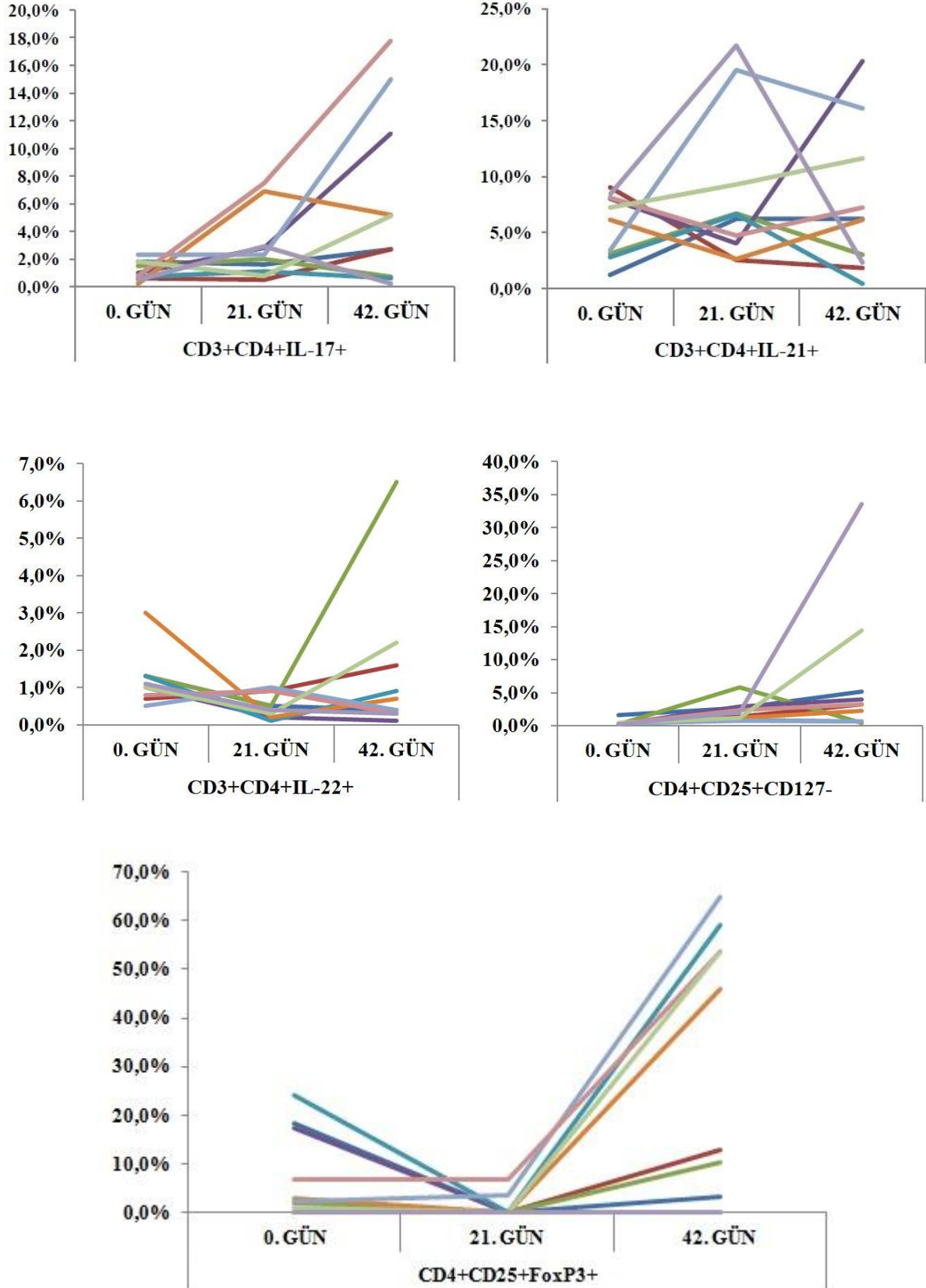
Akım-sitometrik ölçüm ile tüm T hücre alt gruplarının yüzde oranları elde edildi. T hücre alt gruplarının 0, 21 ve 42. günlerde saptanan yüzde değerleri aşağıda grafiklerle ifade edildiği gibidir (Şekil-22). Bu konudaki tüm test sonuçlarına ve boxplot grafiklere EKLER bölümü aracılığıyla ulaşılabilir.

BAĞIŞÇILAR — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10



Şekil-22: (%) oranlarına göre T hücre alt grupları

BAĞIŞÇILAR — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10



Şekil-22 (devam): (%) oranlarına göre T hücre alt grupları

Elde edilen sonuçların minimum, medyan ve maksimum değerlere göre genel istatistiksel bir özeti Tablo-5'te verilmektedir.

Tablo-5: T hücre alt grupları (%) değerleri özeti

(%)	0. GÜN	21. GÜN	42. GÜN
CD3⁺CD4⁺IFN-γ⁺ medyan (min:maks)	0,00400 (0,002 : 0,010)	0,00000 (0,000 : 0,001)	0,00000 (0,000 : 0,003)
CD3⁺CD4⁺TNF-α⁺ medyan (min:maks)	0,0100 (0,00 : 0,02)	0,0195 (0,00 : 0,09)	0,0650 (0,01 : 0,13)
CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ medyan (min:maks)	0,00250 (0,001 : 0,007)	0,02000 (0,005 : 0,059)	0,03700 (0,017 : 0,118)
CD3⁺CD4⁺IL-5⁺ medyan (min:maks)	0,07700 (0,024 : 0,174)	0,20800 (0,029 : 0,342)	0,44300 (0,200 : 0,673)
CD3⁺CD4⁺IL-9⁺ medyan (min:maks)	0,00650 (0,002 : 0,016)	0,00500 (0,000 : 0,014)	0,00300 (0,000 : 0,012)
CD3⁺CD4⁺IL-13⁺ medyan (min:maks)	0,01950 (0,011 : 0,086)	0,03650 (0,023 : 0,082)	0,04650 (0,007 : 0,089)
CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺ medyan (min:maks)	0,00900 (0,002 : 0,023)	0,02150 (0,005 : 0,075)	0,03900 (0,002 : 0,178)
CD3⁺CD4⁺IL-21⁺ medyan (min:maks)	0,06650 (0,012 : 0,090)	0,6400 (0,025 : 0,217)	0,6150 (0,004 : 0,203)
CD3⁺CD4⁺IL-22⁺ medyan (min:maks)	0,01050 (0,005 : 0,030)	0,00450 (0,001 : 0,010)	0,00550 (0,001 : 0,065)
CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ medyan (min:maks)	0,02700 (0,000 : 0,243)	0,00000 (0,000 : 0,069)	0,29400 (0,000 : 0,648)
CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ medyan (min:maks)	0,30000 (0,200 : 1,600)	1,70000 (0,800 : 5,800)	3,20000 (0,400 : 33,60)

Bulgular değerlendirildiğinde 0. güne göre 21 ve 42. günlerde saptanan değişiklikler şunlardır: 21. günde IFN- γ , IL-9, IL-22 ve Foxp3 eksprese eden Th hücrelerinde azalma, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A eksprese eden, CD127 eksprese etmeyen Th hücrelerinde artış görülmüştür. IL-21 eksprese eden Th hücrelerinde belirgin bir değişiklik saptanamamıştır. 42. günde ise IFN- γ , IL-9 ve IL-22 eksprese eden Th hücrelerinde azalma, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, Foxp3 eksprese eden ve CD127 eksprese etmeyen Th hücrelerinde artış saptanmıştır. IL-21 eksprese eden Th hücrelerinde belirgin bir değişiklik saptanamamıştır. Bu verilerin istatistiksel değerlendirmesi yapıldığında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- 21. günde, TNF- α , IL-4 ve IL-5 üreten ve CD127 üretmeyen hücrelerdeki artış ile IFN- γ , IL-22 ve Foxp3 üreten hücrelerdeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). IL-13 ve IL-17A eksprese eden hücrelerdeki artış ile IL-9 üreten hücrelerdeki azalma ise anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

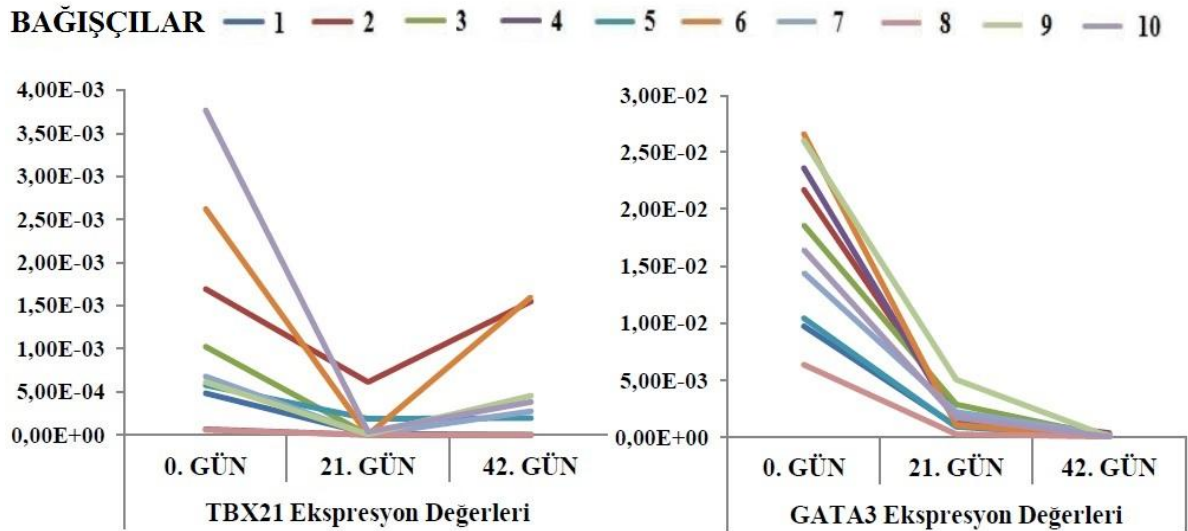
• 42. günde görülen TNF- α , IL-4, IL-5 üreten ve CD127 üretmeyen hücrelerdeki artış ile IFN- γ üreten hücrelerin azalışı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur. IL-13, IL-17A ve Foxp3'ü eksprede eden hücrelerdeki artış ile IL-9 ve IL-22 üreten hücrelerin azalışı ise anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). İstatistiksel değerlendirmeye yönelik bilgiler Tablo-6'da özetlenmiştir.

Tablo-6: T hücre alt grupları (%) değerlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları

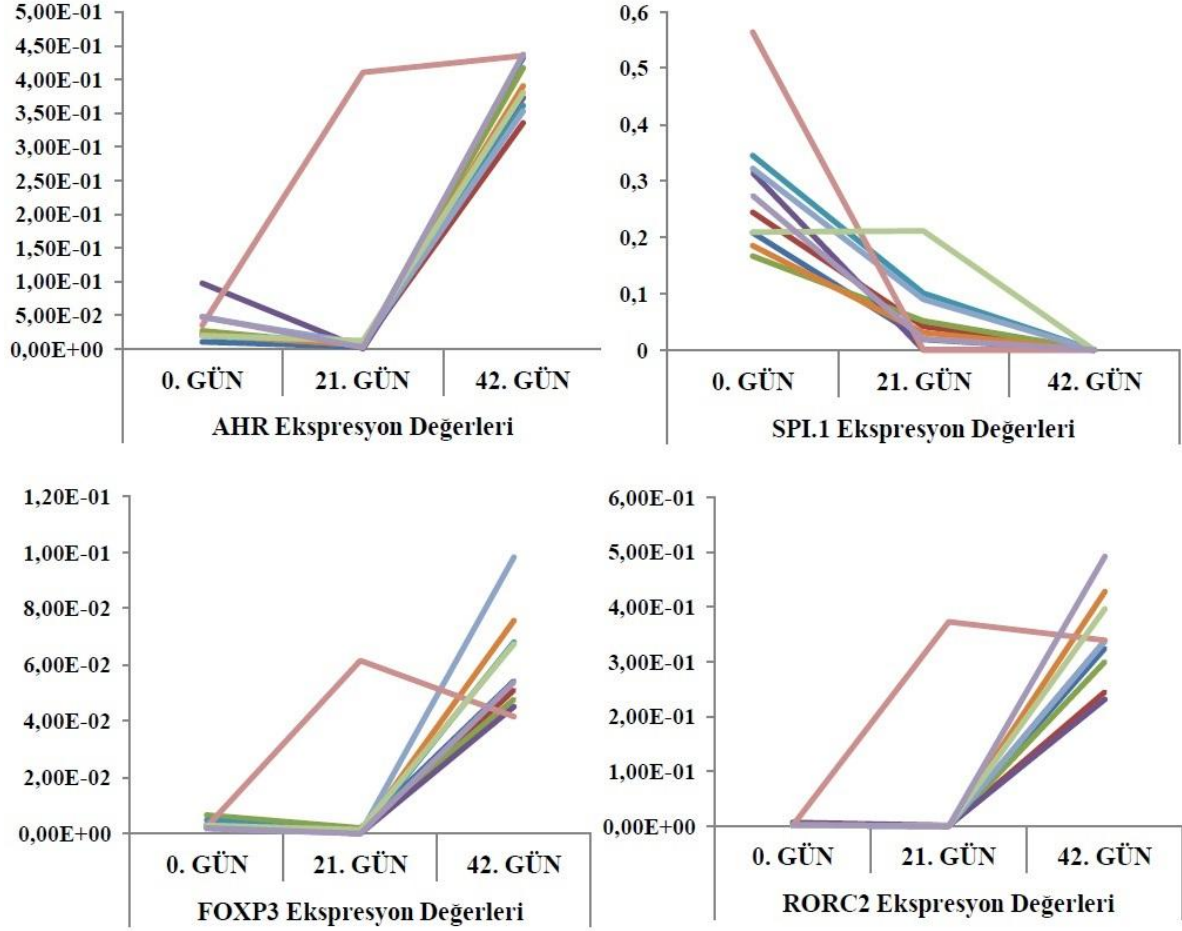
<i>p</i>	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-17A	IL-21	IL-22	Foxp3	CD127
21.- 0. gün	0,005	0,041	0,005	0,005	0,236	0,325	0,086	0,386	0,028	0,034	0,005
42.- 0. gün	0,007	0,005	0,005	0,005	0,102	0,172	0,028	0,678	0,721	0,066	0,005

4.2. Transkripsiyon Faktörleri İçin Bulgular

Transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarında 0, 21 ve 42. günlerde saptanan değişiklikler aşağıda grafiklerle ifade edilmiştir (Şekil-24). Bu konudaki tüm test sonuçlarına ve boxplot grafiklere EKLER bölümü aracılığıyla ulaşılabilir.



Şekil-24: Transkripsiyon faktörleri ekspresyon düzeyleri



Şekil-24 (devam): Transkripsiyon faktörleri ekspresyon düzeyleri

Elde edilen sonuçların minimum, medyan ve maksimum değerlere göre genel istatistiksel bir özeti Tablo-7’de verilmektedir.

Tablo-7: Transkripsiyon faktörleri değerleri özeti

		0. GÜN	21. GÜN	42. GÜN
TBX21	medyan (min:maks)	0,00064 (0,000 : 0,004)	0,00000 (0,000 : 0,001)	0,00023 (0,000 : 0,002)
GATA3	medyan (min:maks)	0,01750 (0,006 : 0,027)	0,00147 (0,000 : 0,005)	0,00000 (0,000 : 0,000)
AHR	medyan (min:maks)	0,02410 (0,011 : 0,098)	0,00560 (0,000 : 0,411)	0,38495 (0,336 : 0,437)
SPI.1	medyan (min:maks)	0,25925 (0,167 : 0,564)	0,03665 (0,000 : 0,212)	0,00019 (0,000 : 0,001)
FOXP3	medyan (min:maks)	0,00273 (0,002 : 0,006)	0,00040 (0,000 : 0,062)	0,05410 (0,042 : 0,098)
RORC2	medyan (min:maks)	0,00131 (0,000 : 0,006)	0,00000 (0,000 : 0,458)	0,33805 (0,232 : 0,492)

Bulgular değerlendirildiğinde 0. güne göre 21 ve 42. günlerde saptanan değişiklikler şunlardır: 21. günde transkripsiyon faktörlerinin tümünün ekspresyonlarında azalma, 42.

günde ise TBX21, GATA3 ve SPI.1 ekspresyonlarında azalma ile AHR, FOXP3 ve RORC2 ekspresyonlarında artış saptanmıştır. Bu verilerin istatistiksel değerlendirmesi yapıldığında;

- 21. günde görülen TBX21, GATA3 ve SPI.1 ifadelerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$), AHR, FOXP3 ve RORC2 ekspresyonlarındaki azalma ise anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

- 42. günde görülen TBX21, GATA3 ve SPI.1 ifadelerindeki azalma ile AHR, FOXP3 ve RORC2 ekspresyon düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirmeye yönelik bilgiler Tablo-8’da özetlenmiştir.

Tablo-8: Transkripsiyon faktörleri p değerleri

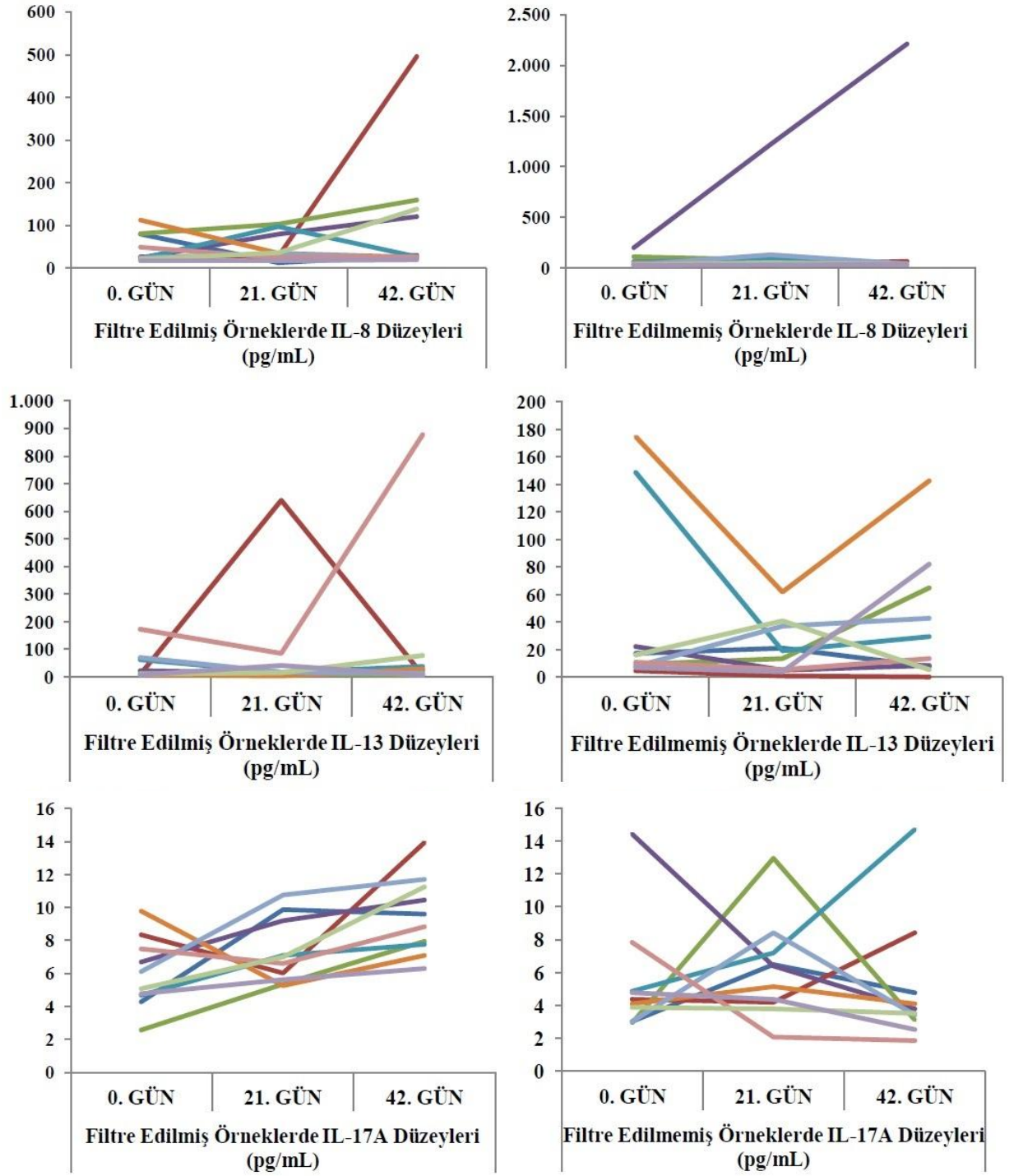
	TBX21	GATA3	AHR	SPI.1	FOXP3	RORC2
21. gün- 0. gün p	0,005	0,005	0,074	0,007	0,074	0,386
42. gün- 0. gün p	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005

Bu bulgulara göre 3 transkripsiyon faktörü (TBX21, GATA3 ve SPI.1) hem 21. günde hem de 42. günde istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir ($p<0,05$). Diğer 3 transkripsiyon faktörü (AHR, FOXP3 ve RORC2) 21. günde istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş ($p>0,05$), 42. günde ise anlamlı yükselme ($p<0,05$) göstermiştir.

4.3. Sitokinler İçin Bulgular

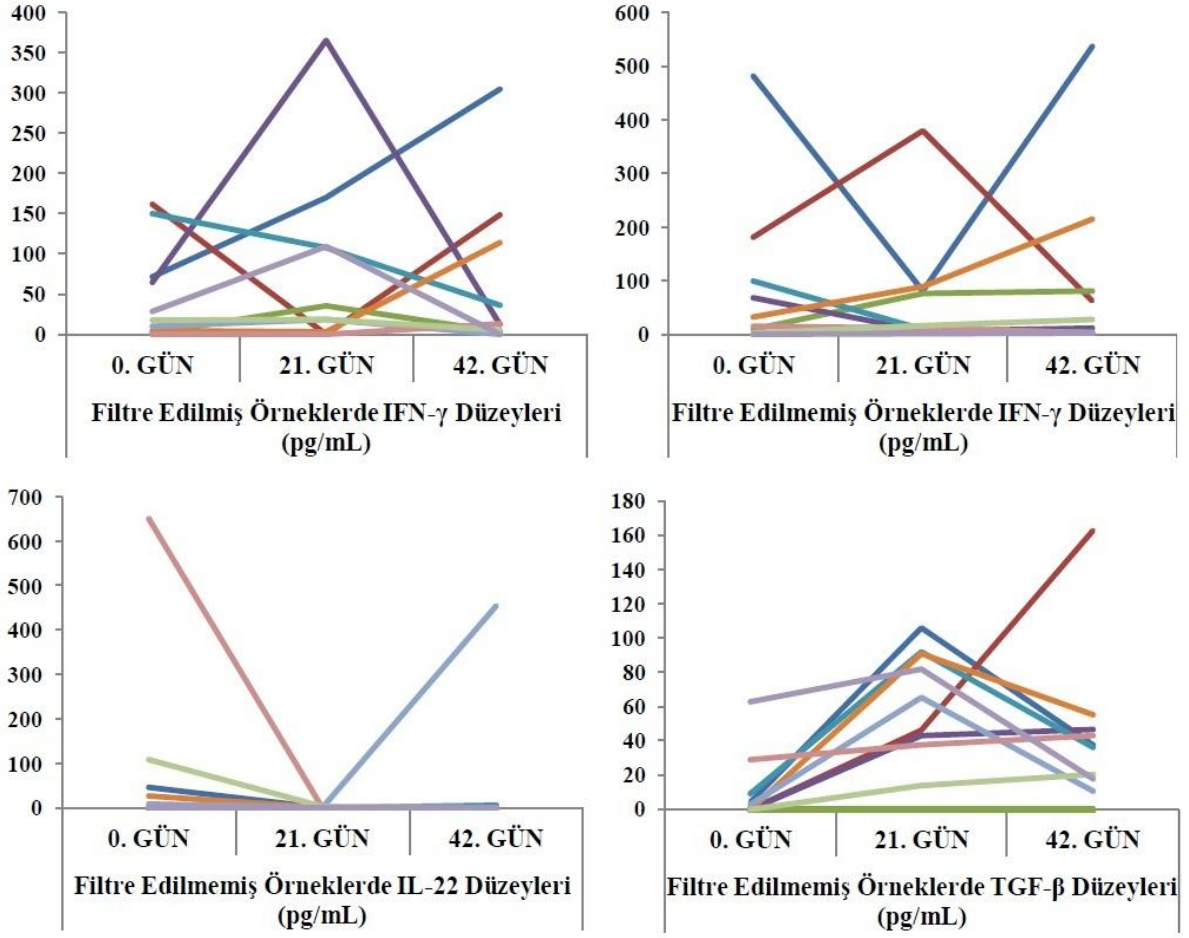
IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN- γ , TNF- α ve TGF- β düzeyleri hem LA-ES’lerde, hem de N-ES’lerde araştırıldı. EKLER bölümünde ayrıntısıyla görülebileceği gibi, IL-6, IL-10 ve TNF- α değerleri tüm LA-ES / N-ES örneklerinde sıfır bulundu. IL-4 değerleri LA-ES örneklerinden 2 tanesi (birinde 0 ve 21 günler, diğerinde 21 gün) ve N-ES örneklerinden 2 tanesi (birinde 21 ve 42 günler, diğerinde 42 gün) hariç sıfır bulundu. IL-9 düzeyleri N-ES örneklerinden 1 tanesi (sadece 42 gün) hariç sıfır bulundu. Ayrıca LA-ES örneklerinde IL-22 (bir örnek 0 gün hariç) ve TGF- β düzeyleri sıfır bulundu. Bu nedenle, LA-ES/N-ES örneklerinde IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, TNF- α , LA-ES örneklerinde IL-22 ve TGF- β değerleri hem istatistiksel değerlendirmeden, hem de sonuçların grafik olarak aktarımından çıkartıldı. IL-8, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN- γ ve TGF- β düzeylerinde 0, 21 ve 42. günlerde saptanan değerler aşağıda grafiklerle ifade edildiği gibidir (Şekil-25). Bu konudaki tüm test sonuçlarına ve verilere EKLER bölümü aracılığıyla ulaşılabilir.

BAĞIŞÇILAR — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10



Şekil-25: N-ES / LA-ES örneklerde sitokin düzeyleri

BAĞIŞÇILAR — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10



Şekil-25 (devam): N-ES / LA-ES örneklerde sitokin düzeyleri

Elde edilen sonuçların minimum, medyan ve maksimum değerlere göre genel istatistiksel bir özeti Tablo-9-10-11’te verilmektedir.

Tablo-9: IL-8 ve IL-13 değerlendirme sonuçları

		IL-8		IL-13	
		LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES
0. GÜN	medyan	25,46	40,01	11,36	13,19
	(min:maks)	(17,65 : 112,60)	(25,46 : 200,39)	(8,48 : 173,26)	(4,44 : 174,64)
21. GÜN	medyan	34,56	63,50	16,05	16,38
	(min:maks)	(12,45 : 102,84)	(27,41 : 1218,76)	(4,44 : 639,15)	(0,74 : 61,62)
42. GÜN	medyan	28,71	36,51	23,28	21,43
	(min:maks)	(20,26 : 495,62)	(27,41 : 2214,37)	(5,11 : 877,63)	(0,00 : 142,68)

Tablo-10: IL-17 ve IL-22 değerlendirme sonuçları

		IL-17		IL-22	
		LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES
0. GÜN	medyan (min:maks)	5,58 (2,55 : 9,78)	4,24 (2,93 : 14,41)	0,00 (0,00 : 0,00)	3,67 (0,00 : 650,46)
21. GÜN	medyan (min:maks)	6,79 (5,25 : 10,74)	5,78 (2,07 : 12,96)	0,00 (0,00 : 0,00)	0,00 (0,00 : 2,33)
42. GÜN	medyan (min:maks)	9,20 (6,30 : 13,93)	3,66 (1,87 : 14,70)	0,00 (0,00 : 0,00)	0,00 (0,00 : 454,40)

Tablo-11: IFN- γ ve TNF- α değerlendirme sonuçları

		IFN- γ		TGF- β	
		LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES
0. GÜN	medyan (min:maks)	22,88 (0,01 : 161,48)	23,34 (0,01 : 481,48)	0,00 (0,00 : 0,00)	1,39 (0,00 : 62,72)
21. GÜN	medyan (min:maks)	26,60 (0,00 : 365,67)	13,81 (0,55 : 380,09)	0,00 (0,00 : 0,00)	55,87 (0,00 : 106,06)
42. GÜN	medyan (min:maks)	12,65 (0,00 : 304,74)	19,39 (1,48 : 537,30)	0,00 (0,00 : 0,00)	36,84 (0,00 : 162,61)

Bulgular değerlendirildiğinde 0. güne göre 21 ve 42. günlerde saptanan değişiklikler şunlardır: 21. günde LA-ES'lerde, IL-8, IL-13, IL-17A, IFN- γ düzeylerinde artış saptanırken, IL-22 ve TGF- β için herhangi bir değer saptanamamıştır. N-ES'lerde IL-8, IL-13, IL-17A ve TGF- β düzeylerinde artış, IL-22, IFN- γ düzeylerinde azalma saptanmıştır.

42. günde LA-ES'lerde, IL-8, IL-13, IL-17A düzeylerinde artış, IFN- γ düzeyinde azalma saptanırken, IL-22 ve TGF- β için herhangi bir değer saptanamamıştır. N-ES'lerde IL-13 ve TGF- β düzeylerinde artış, IL-8, IL-17A IL-22 ve IFN- γ düzeylerinde azalma saptanmıştır.

0, 21 ve 42. günlerde saptanan değişimlerin istatistiksel değerlendirmesi gruplar arası (N-ES ve LA-ES arası) karşılaştırma ve grup içi (N-ES ve LA-ES içinde) değerlendirme şeklinde iki biçimde yapılmıştır. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma yapılırken, N-ES örneklerine yönelik değerleri sıfır olan IL-22 ve TGF- β bu değerlendirmenin dışında bırakılmıştır. Karşılaştırma IL-8, IL-13, IL-17A ve IFN- γ 'nun LA-ES ve N-ES için hesaplanan yüzde değişim (YD), YD-1 ve YD-2 değerleri arasında yapılmıştır. Buna göre sadece LA-ES örneklerin 42. gününde IL-17A düzeyinde görülen artışta sınırda bir anlamlılık saptanmıştır ($p=0,052$). Diğer sitokin düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$)(Tablo-12).

Tablo-12: Filtre edilmiş ve edilmemiş gruplar arasında farklılık

		IL-8	IL-13	IL-17	IFN-γ
Baseline	<i>p</i>	0,190	0,739	0,190	0,971
YD-1	<i>p</i>	0,579	0,393	0,912	0,436
YD-2	<i>p</i>	0,684	0,631	0,052	0,529

Grup içi istatistiksel değerlendirme (LA-ES):

- 21. günde görülen IL-8, IL-13, IL-17A, IFN- γ düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo-13).

- 42. günde görülen IL-17A düzeylerinde artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$), IL-8, IL-13 düzeylerinde artış ve IFN- γ düzeyinde azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$)(Tablo-13).

Tablo-13: LA-ES sitokin düzeylerinde değişim

		IL-8	IL-13	IL-17	IFN-γ
21. gün- 0. gün	<i>p</i>	0,859	0,646	0,169	0,386
42. gün- 0. gün	<i>p</i>	0,285	0,508	0,012	0,721

Grup içi istatistiksel değerlendirme (N-ES):

- 21. günde görülen IL-22 düzeyindeki azalma ve TGF- β düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$), IL-8, IL-13, IL-17A düzeylerindeki artış ile IFN- γ düzeylerinde azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo-14).

- 42. günde görülen TGF- β düzeylerinde artış istatistiksel olarak sınırdan anlamlı bulunurken ($p=0,051$), IL-13 düzeyindeki artış ile IL-8, IL-17A IL-22 ve IFN- γ düzeylerinde azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$)(Tablo-114).

Tablo-14: N-ES sitokin düzeylerinde değişim

		IL-8	IL-13	IL-17	IL-22	IFN-γ	TGF-β
21. gün- 0. gün	<i>p</i>	0,103	0,541	0,646	0,043	0,878	0,008
42. gün- 0. gün	<i>p</i>	0,878	0,799	0,906	0,345	0,878	0,051

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

AKT sonrası alıcıda graft ömrünün uzaması, Crohn hastalığı rekürrenslerinin ve tekrarlayan spontan abortusların azalması, postoperatif bakteriyel enfeksiyonların, kanser rekürrenslerinin ve mortalitenin artması, latent enfeksiyonların alevlenebilmesi gibi sonuçlarla karşılaşılabilmektedir. TRIM fenomeni olarak tanımlanan bu etkinin ürün içindeki lökositlerden, plazmada biriken BYD-İM'den veya çHLA sınıf I moleküllerinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (1). Yani ES'ler içindeki lökositler ve süpernatant iki farklı kaynak durumundadır. Bu iki kaynağın depolanma sürecindeki ES'lerde gösterdiği değişimleri belirlemek ve TRIM ile ilişkilerini değerlendirmek için planlanan çalışmamızda;

- Th hücre profilindeki değişimler ve
- ES süpernatantındaki Th hücrelerle ilişkili sitokinlerin düzeyleri araştırılmış,
- Lökoreduksiyonun TRIM'i engellemedeki etkinliği değerlendirilmiştir.

Th Hücre Profilindeki Değişimler

TRIM ve allojeneik lökositler konusunda yapılan çalışmaların bir kısmı allojeneik lökositlerle TRIM etkileri arasındaki ilişkiyi desteklerken; bazıları zıt yönde sonuç bildirmiştir. Örneğin allojeneik lökositlerle kanser rekürrensleri (84-86), postoperatif bakteriyel enfeksiyonlar (88-89), kısa dönem mortalite (91, 93), graft ömrü (95) ve latent enfeksiyonların reaktivasyonu (96) arasında bir ilişki bulunmadığını gösteren çalışmaların yanı sıra; yine postoperatif bakteriyel enfeksiyonlar (90), kısa dönem mortalite (14, 79, 92) ve graft ömrü (94) arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar da vardır. Bu konuda çok sayıda klinik çalışma yapılsa da laboratuvar çalışmaları sınırlı sayıdadır. Kan bileşeni içindeki değişikliklerle TRIM ilişkisini incelemeyi hedefleyen az sayıdaki bu laboratuvar çalışmadan bir tanesi araştırmamızın yönlendiricisi olmuştur (27). Çalışmamızda ES'ler içindeki Th hücrelerin depolanma sürecinde gösterdiği değişimler ve bu değişimlerin TRIM ile ilişkisi incelenmiştir.

Bundan yaklaşık 20 yıl önce fonksiyonlarına ve sitokin paternlerine göre Th hücrelerin Th1 ve Th2 alt grupları bulunduğu şeklinde yapılan sınıflandırılmasının ardından, zaman içinde Th9, Th17, Th22 ve Treg alt tipleri tanımlanmıştır. Çalışmamızda tüm bu Th alt grupları, spesifik transkripsiyon faktörleri ve hücre içi-yüzeyi ekspresyonları aracılığıyla değerlendirilmiştir. T hücre alt grupları ile ilgili tüm test sonuçları ve boxplot grafikler EKLER bölümünde bulunmaktadır.

Th1 Hücreler

Naif Th hücrelerden IL-12, IFN- γ (105) ve spesifik transkripsiyon faktörü TBX21'in etkisiyle (106) gelişen Th1 hücreleri, yüksek doz IFN- γ (102) ve TNF- α/β (103) üretirler. Bu nedenle çalışmamızda Th1 hücreler TBX21, IFN- γ ve TNF- α ekspresyon düzeylerine göre değerlendirilmiştir. Yapılan testlerin sonucunda bulduğumuz TBX21 ve CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ düzeylerinde görülen anlamlı (21 ve 42 gün $p<0,05$) azalma bize Th1 hücrelerin yerlerini diğer alt grup hücrelerine bıraktığını düşündürmüştür. CD3⁺CD4⁺TNF- α ⁺ düzeylerinde saptanan anlamlı (21 ve 42 gün $p<0,05$) artış tabloyu biraz karıştırırsa da; TNF- α 'nın Th1 hücrelerin imza sitokini olmaması, Th1 hücrelerin asıl fonksiyonunu bu sitokin üzerinden oluşturmaması ve bu sitokinin Th22 gibi farklı hücreler (103, 121) tarafından da üretildiğinin gösterilmesi, TNF- α artışıyla, Th1 aktivitesi arasında paralellik olmayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bulgularımız depolanma sürecinde Th1 hücrelerin azaldığının, aktivitelerini yitirdiğinin veya yerlerini diğer efektör Th hücrelere bıraktığının göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Ürün içinde bulduğumuz bu sonucun AKT aracılığıyla alıcıda da aynen gelişip gelişmediği bilinmemektedir. Sonucun alıcıda da aynı şekilde gelişmesi, yani Th1 aktivitesinin azalması koşuluyla; AKT sonrası alıcılarda Th1 tipi sitokin düzeylerinin düştüğünü gösteren çeşitli çalışmalara (38, 53, 55-58) ve TRIM etkisinin Th1→Th2 dönüşümü sonucu oluştuğu varsayımına (42, 59-60) destek veren bir sonuç elde edilmiş demektir. Th1 aktivitesinin kaybolması AKT sonrası alıcıda Crohn hastalığı rekürrenslerinin, tekrarlayan spontan abortusların azalması ile postoperatif bakteriyel enfeksiyonların ve kanser rekürrenslerinin artmasını sağlayan neden olabilir.

Th2 Hücreler

Primer immün yanıt sırasında erken IL-4 üretimi sayesinde naif Th hücrelerden farklılaşırlar (109). IL-4 aracılığıyla aktive olan spesifik transkripsiyon faktörü GATA3, Th2 farklılaşmasını tetikleyerek IL-4, IL-5 ve IL-13 eksprese eden Th2 hücrelerin gelişimini sağlar (103). Çalışmamızda Th2 hücreler GATA3, IL-4, IL-5 ve IL-13 ekspresyon düzeylerine göre değerlendirilmiştir. Test sonuçlarına göre 21 ve 42 günlerde GATA3 düzeylerindeki azalma ($p<0,05$) ile CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ ($p<0,05$), CD3⁺CD4⁺IL-5⁺ ($p<0,05$) ve CD3⁺CD4⁺IL-13⁺ ($p>0,05$) düzeylerindeki artış bize depolanma sürecinde ürün içerisinde

anlamli şekilde Th2 gelişimi olduğunu gostermektedir. Bu sonuç birçok otorite tarafından TRIM'in oluş mekanizmalarından biri olarak kabul edilen AKT alıcısındaki Th1→Th2 dönüşümünün (38, 42, 53, 55-60) aslında ürün içerisinde başlayan bir süreç olabileceğini düşündürmektedir. Diğer bir ifade ile TRIM'in gerçek nedenlerinden biri Th1→Th2 dönüşümü olabilir ve bu dönüşüm ürün içerisinde başlayan bir sürecin alıcıda devamı şeklinde gerçekleşiyor olabilir. Örneğin bu hücrelerin ürettiği sitokinler veya alıcıda bu Th2'lerin bir şekilde sağ kalımı bu etkiye yol açıyor olabilir. Ayrıca Th2 yanıtının güçlenmesi durumunda eş uyaran ekspresyonunda azalma olduğunun gösterilmesi de TRIM etkisine katkıda bulunuyor olabilir (55, 61).

Sonuçlarımıza bakıldığında spesifik transkripsiyon faktörü ile hücre içi sitokin düzeyleri arasında uyumlu bir seyir bulunmamaktadır. GATA3 ile Th2 sitokinleri arasındaki bu uyumsuzluk şüphe uyandırmaktadır. Çalışmamızda bulunanın aksine GATA3 seviyesi yüksek ama sitokin düzeyi düşük bulunmuş olsa; bu duruma RNA interferans, posttranslasyonel modifikasyonlar gibi bir takım mekanizmalarla açıklama getirilebilirdi. Ancak, ekspresyonu zamanla neredeyse tamamen sıfırlanan bir transkripsiyon faktörü ile yüksek düzeyde sentezlenmiş hücre içi sitokinlerin açıklaması, transkripsiyon faktörünün erken evrede aktive olarak gerekli indüksiyonu yaptıktan sonra yok olması olabilir. IL-4 endojen olarak sentezlendikten sonra Th2 farklılaşmasının sürmesi için pozitif bir döngü oluşturmaktadır (113). IL-4 bu süreci güçlendirdiği ve bu polarizasyonu yönlendirdiği için ölçümlerimizde Th2 gelişimi saptanmış ancak zaman içinde düzeyi azalan GATA3 saptanamamış olabilir. Belki de IL-4 pozitif döngüsü oluştuktan sonra GATA3'e gerek duyulmuyor ve GATA3 ile Th2 farklılaşması arasındaki gibi bir tablo ortaya çıkıyor olabilir. Ya da tüm bunların dışında GATA3 ölçümü için yararlanılan RT-PCR süreci veya RNA izolasyon-cDNA elde etme süreçleriyle ilgili yaşanan bir takım aksaklıklar bu sonuca yol açmış olabilir. Sonuç olarak GATA3 ekspresyon düzeyi desteklemese de; Th2 dönüşümünün akım-sitometrik olarak saptanmış olmasını TRIM açısından önemli bir bulgu olabilir.

Th9 Hücreler

Bu hücreler naif Th hücrelerden IL-4 ve TGF-β birlikte etkisiyle (120) eksprese edilen spesifik transkripsiyon faktörü SPI.1'in (122) aktivasyonu ile gelişir; IL-9 ve IL-10 eksprese ederler. IL-9'un en önemli kaynağı görünseler de bu sitokin Th2 ve Th17 tarafından da eksprese edilebilmektedir (123-124). Çalışmamızda Th9 hücreler SPI.1 ve IL-9 ekspresyon

düzeylerine göre değerlendirilmiştir. Depolanma süreci boyunca SPI.1 ($p<0,05$) ve $CD3^+CD4^+IL-9^+$ ($p>0,05$) değerlerinde belirlenen azalma bize ürün içerisinde Th9 aktivitesinin azaldığını düşündürmüştür. Transkripsiyon faktöründeki anlamlı azalmaya paralel olmayan hücre içi IL-9 azalması, Th2 ve Th17 hücrelerin de IL-9 eksprese etmesinden kaynaklanıyor olabilir (123-124).

Çeşitli araştırmacılar tarafından IL-9'un Th17 gelişimini ve Treg'lerin supresif aktivitesini güçlendirdiği gösterilmiş (123-124), patolojik ve koruyucu immün yanıtlar arasında dengeleyici bir rolünün olabileceği öne sürülmüştür (117). Ancak çalışmamızda süpernatanda IL-9 düzeyi ölçülememesi elde ettiğimiz Treg ve Th17 sonuçlarıyla IL-9 arasında bir ilişki bulunmadığını düşündürmektedir. Th9'ların ürün içerisindeki aktivitelerinin zamanla azalması ve IL-9 ile diğer Th hücreler arasında bir ilişki saptanamaması, Th9 ve IL-9'un TRIM sürecinde bir etkisinin olmadığını düşündürmüştür.

Th17 Hücreler

Naif Th hücrelerden IL-6 ve TGF- β 'nın birlikte etkisiyle eksprese edilen spesifik transkripsiyon faktörü RORC2 aracılığıyla farklılaşan Th17 hücreler IL-17A, IL-17F ve IL-21 eksprese ederler (119, 127). Çalışmamızda Th17 hücreleri RORC2, IL-17A ve IL-21 ekspresyon düzeylerine göre değerlendirilmiştir. Bulgularımıza bakıldığında RORC2 düzeyinin 21. günde azaldığı ($p>0,05$), 42. günde arttığı ($p<0,05$), $CD3^+CD4^+IL-17A^+$ düzeylerinin arttığı (21. gün $p>0,05$, 42. gün $p<0,05$) ve $CD3^+CD4^+IL-21^+$ düzeylerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığı görülmektedir. Bu tablo bize depolanma sürecinin sonlarına yaklaştıkça ürün içinde Th17 aktivitesinin arttığını düşündürmektedir.

Bulgularımızdaki artan Th17 aktivitesiyle azalan Th1 aktivitesi, bu iki hücre grubu arasındaki mutlak antagonizmadan kaynaklanıyor olabilir (133, 136-137). Azalan bu Th1 aktivitesinin IL-17 baskısıyla mı oluştuğu, yoksa artan Th17 aktivitesinin azalan IFN- γ aracılığıyla mı meydana geldiğini anlayabilmek için süpernatandaki sitokin düzeylerine bakmak yararlı olabilir. Depolanma süreci içerisinde ES süpernatantlarında IL-17'nin ve IFN- γ 'nın belirli düzeylerde bulunduğunu belirlemiş olmamız bu etkileşimin IL-17'nin Th1 farklılaşmasını baskılaması şeklinde gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü süpernatanda IFN- γ azalma göstermemektedir.

Sonuçlarımıza bakıldığında dikkati çeken bir durum, 21 günde RORC2 düzeyindeki azalmaya rağmen IL-17A artışı ve belirli bir düzeyde IL-21 üretimidir. Bu tabloyu da

GATA3'teki azalmaya rağmen IL-4, IL-5 ve IL-13 düzeylerindeki artışı sağlayan benzer nedenler ile açıklamak mümkün görünmektedir.

Yapılan bir çalışmada Th1 ile Th17 arasındaki karşılıklı etkileşimin bozulmasının, özellikle Th1 yanıtının yokluğunun deneysel olarak daha şiddetli otoimmüniteye yol açtığı bildirilmiştir (133). Çalışmamız sonunda bulduğumuz Th1 hücrelerdeki azalma ve Th17 hücrelerdeki artış bu tabloya uymaktadır. Azalan Th1 hücre aktivitelere ek olarak Th17 hücrelerinin depolanma sürecinin sonlarına doğru kazandığı bu aktivitenin özellikle raf ömrünün sonlarına yaklaşmış N-ES alan hastalarda otoimmüniteye yatkınlık sağlayıp sağlamadığı bilinmemektedir. Bu konu araştırmaya açıktır. Yoğun ve raf ömrünün sonuna yaklaşmış N-ES transfüzyonu alan kişilerin otoimmüniteyle ilişkisi klinik bir çalışmayla değerlendirilebilir. AKT sonrası meydana gelen transplant alıcısında graft ömrünün uzaması, postoperatif bakteriyel enfeksiyonların, kanser rekürrenslerinin artması, latent enfeksiyonların alevlenebilmesi gibi tablolar immünsupresif bir etkiyi veya zayıflayan Th1 yanıtını işaret etmektedir. Eğer AKT immünsupresyon yapıyorsa böyle bir baskılanmaya otoimmün süreçlerin eşlik etmesi teorik olarak mantıklı olmayacaktır. Ama eğer AKT immünsupresyon yapmıyorsa, tablodan Th2 hücre aktivitesinin sorumlu olduğunu düşünmek ve bazı kişilerde bir takım otoimmün süreçlerin harekete geçebileceğini varsaymak mümkün olabilir.

Th22 Hücreler

Th22 hücreler, transkripsiyon faktörlerinin (AHR) ve ortamda bulunan IL-6 ve TNF- α 'nın birlikte etkisiyle naif Th hücrelerden farklılaşan hücrelerdir (103, 141) ve IL-22 üretirler (121). Çalışmamızda bu hücreler AHR ve IL-22 ekspresyon düzeylerine göre değerlendirilmiştir. AHR düzeyinde 21 günde azalma ($p>0,05$), 42 günde artış ($p<0,05$) belirlenirken, CD3⁺CD4⁺IL-22⁺ düzeyinde 21 ($p<0,05$) ve 42 günlerde azalma ($p>0,05$) saptanmıştır. Bu sonuç bize depolanma sürecinde ürün içerisinde Th22 aktivitesinin azaldığını düşündürmektedir. 42 günde AHR'deki anlamlı artışa rağmen, CD3⁺CD4⁺IL-22⁺ düzeyindeki azalmanın miRNA'lar, posttranslasyonel modifikasyonlar gibi çeşitli genetik mekanizmaların transkribe olan genin protein haline dönüşmesini engellemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Öte yandan Eyerich ve arkadaşlarına (121) göre Th22'ler TNF- α da eksprese etmektedir. Eğer öyle ise CD3⁺CD4⁺TNF- α ⁺ ekspresyon düzeyindeki anlamlı artış Th22 hücrelerden de kaynaklanıyor olabilir. Ancak hem bu sitokinin Th1 ve Th22'lerden

eksprese ediliyor olması, hem de Th22 hücrelerin imza sitokini olmaması nedeniyle bu artış Th22 dönüşümünü destekler bir bulgu olarak değerlendirilmemiştir. Sonuç olarak hücrenin asıl fonksiyonunu ifade eden sitokinin etkileri ve hücre içi ekspresyon düzeyleri bu hücrelerin TRIM gelişiminde rol almadıklarını düşündürmüştür.

Treg Hücreler

Enflamasyon gelişimini sağlayan efektör T hücrelerin aksine, kontrolünden sorumlu olan Treg hücreler TGF- β etkisiyle, doğal olarak timusta (nTreg) veya periferde naif Th hücrelerden farklılaşarak meydana gelirler (144-145). Foxp3'ün hücre içi ekspresyonu Treg hücrelerin en spesifik belirteci olarak kabul edilir (144-145). Bazı koşullarda aktive olan efektör T hücrelerin geçici bir süreliğine düşük düzeyde Foxp3 eksprese ettiklerinin gösterilmesi Treg hücreleri belirlemede zorluk yaratmaktadır (144). Bu hücreler Treg'lerden farklı olarak yüksek düzeyde CD127 eksprese ederler (148-149). Çalışmamızda Treg hücreler transkripsiyon faktörü FOXP3 ve hücre içi Foxp3 ekspresyonlarına göre değerlendirilmiştir. Depolanma süreci boyunca FOXP3'ün 21. günde azaldığı ($p>0,05$), 42. günde arttığı ($p<0,05$), CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ düzeyinin 21. günde azaldığı ($p<0,05$), 42. günde arttığı ($p>0,05$), CD4⁺CD25^{high} CD127⁻ düzeyinin 21 ve 42 günde arttığı ($p<0,05$) belirlenmiştir. Bu tablo Treg hücrelerin 21. günde aktivitelerini yitirirken; 42. günde aktivite artışı gösterdiğini düşündürmektedir. Bu sonuç ürün içerisindeki Treg aktivitesinin depolanma sürecinin sonlarına doğru arttığını göstermektedir. Elde ettiğimiz bu sonuç Baumgartner'in (27) çalışmasının sonucuna kısmen benzerlik göstermektedir. En azından depolanma sürelerinin sonlarına yaklaşan N-ES'lerdeki Treg aktivitesi bu benzerliği sağlamaktadır. Bulgularımız raf ömrünün sonuna yaklaşan N-ES'lerin transfüzyonu ile transfüzyonun immünespresif etkisi arasında ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Th2 immün yanıtının Treg gelişimini baskıladığı gösterilmiştir. Th2'lerin bunu GATA3'ün doğrudan promotör bölgesine bağlanarak Foxp3 ekspresyonunu baskılamasıyla yaptığı ifade edilmiştir (188). Çalışmamızda GATA3 düzeyinin azalıyor olması ve Treg'lerin 42 günde aktivitelerinin artıyor olması bu mekanizmanın en azından 21 günde görülen tablo ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan 21 gündeki aktivite azalması Th17/Treg karşılıklı düzenlenmesi kavramına da uymaktadır (111, 138-139). Çalışmamızda Th17 aktivitesi de Treg aktivitesi de depolanma süreci sonlarında artmaktadır. Ancak 21 günde Treg aktivitesi azalırken, Th17 aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmaktadır. 21 gündeki bu tablo Th17 hücrelerin,

Treg hücre farklılaşmasını zayıflatmasından kaynaklanıyor olabilir. Öte yandan Foxp3'ün RORC2 fonksiyonlarını antagonize ederek Th17 gelişimini bloke ettiği de bildirilmiştir (140). Ancak bu bulgu bizim sonuçlarımızla uyuşmamaktadır.

Bildiğimiz gibi efektör Th hücreler, naif hücrelerden, ASH'lerin yardımı ve aktive olmuş Th hücreler tarafından yaratılan sitokin çevresinin yönlendirmesi ile sekonder lenfoid organlarda farklılaşmaktadır. Tartışma içerisinde bahsedilen “*ES'lerin depolanma süreci boyunca Th hücrelerinde meydana gelen farklılaşma*” acaba naif Th hücrelerden efektör Th hücrelere olan farklılaşma mıdır? Bizim çalışmamızın kan saklama dolabında bekleyen kanlardaki Th alt gruplarını incelemek üzere tasarlandığı; Th alt grupları içerisindeki farklılaşmaların lenfoid dokulardan alınan örneklerde değil de N-ES örneklerinde çalışıldığı düşünüldüğünde, başka mekanizmaların rol oynamakta olduğunu varsaymak mümkündür. Teorik olarak naif Th hücrelerden efektör Th hücrelere farklılaşmanın kan torbaları içinde gerçekleşmesi beklenen bir durum değildir. O halde depolanma sürecinde Th alt grup profilinde belirlediğimiz farklılaşmaları nasıl izah edebiliriz?

Aşağıdaki üç yoldan birisi veya kombinasyonları bu sonucu doğurmuş olabilir.

- Naif Th hücreler bilmediğimiz bir mekanizma ile sekonder lenfoid dokuların dışındaki dokularda da (kan vb) efektör T hücrelere dönüşebiliyor
- Hiçbir dönüşüm olmuyor ama depolanma sürecinde hücrelerden bir kısmı ölürlen sağ kalan hücreler öne çıkarak elde ettiğimiz sonuçları oluşturuyor
- Plastisite sonucu canlı hücreler birbirlerine dönüşüyor

Bu bölüme kadar Th alt gruplarına yönelik sonuçlarımızın naif Th hücrelerin efektör Th hücrelere farklılaşmasıyla oluştuğunu düşünerek tartıştık. Ama bunun olabilmesi için gerekli koşullar tam olarak oluşmaması sonuçlarımızın bu yol ile gelişme olasılığının düşük olduğunu düşündürmektedir. Ama bilinmeyen bazı mekanizmaların bu tabloya yol açma olasılığını hesaba katmakta yarar vardır.

Depolanma sürecindeki LA ve N-ES'lerde lökosit sayımı yapmamamız çalışmamızın eksik kalmış bir yönü olarak kabul edilebilir. Bu nedenle hem lökoredüksiyonun etkinliği değerlendirilememiş; hem de ürün içerisindeki lökositlerin azalıp azalmadığını dokümanete edilememiştir. Ancak laboratuvar gözlemlerimiz, akım-sitometrik çalışmalarda yaşanan zorluklar ve RNA izolasyonu için *Thoma lamında* yaptığımız sayımlar depolanma süresi boyunca ES içindeki lökositlerin azalmakta olduğunu bize göstermiştir. Depolanma sürecinde lökositlerin karşılaştığı çeşitli etkenler, bazı Th hücre alt gruplarının yok olmasına yol açarken, koşullara bağlı olarak diğerlerinde daha farklı etkide bulunmuş olabilir. Böylelikle gruplar arasında dağılım farklılığı ortaya çıkmış, elde ettiğimiz sonuçlardaki Th

alt grupları arasındaki oransal farklılık meydana gelmiş olabilir. Ancak 21 gün azalan $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ ve $CD3^+CD4^+IL-22^+$ değerlerinin 42 günde tekrar artış göstermesi, bu öngörüyü zayıf kılmaktadır. Diğer alt grupları ifade eden parametrelerdeki ciddi azalma nedeniyle 42. gündeki bu artışlar oluşmuş olabilir düşüncesi de; sürekli artış gösteren Th2 ve Th17 hücreler nedeniyle anlamlı olmamaktadır.

Yakın zamanda farklılaşmış T hücrelerin uygun uyaran bulunması durumunda farklı bir efektör hücreye dönüşebildiğinin (118) ve farklılaşmış Th hücrelerin *in vitro* olarak sitokin profillerini değiştirebildiğinin (152) gösterilmesi elde ettiğimiz sonuçlarda plastisitenin de rolü olabileceğini düşündürmektedir. Th17 hücrelerin IFN- γ eksprese etme özelliği kazanarak IFN- γ ile IL-17'yi eş zamanlı üretmesi (153-154) plastisiteye örnek olarak verilebilir. Ama çalışmamızda hücre içi IFN- γ düzeyinin azalmakta olması bu hücrelerin sonuçlarımızla ilişkisi olmadığını düşündürmektedir. Bunun yanında Th17 hücreler Th17/Th2 hücrelere de dönüşebilmektedir (155). Burada akla hemen şu sorular gelmektedir. Acaba bulgularımız arasında özellikle 42 günde pik yapan $CD3^+CD4^+IL-4^+$ ve $CD3^+CD4^+IL-17A^{++}$ lardan bir bölümü Th17/Th2 hücrelerden kaynaklanıyor olabilir mi? 42 günde aktivitesini artıran Th17 hücreler Th2 hücrelere destek olmak amacıyla bir takım immün mekanizmaların sonucunda mı aktivite kazanıyor? Elimizdeki verilerle bu sorulara cevap vermemiz mümkün olmasa da, böyle bir değişimin olabilirliğini bilmek tabloya farklı bir bakış açısıyla bakmayı sağlamaktadır ve bu nokta araştırılmaya açıktır. Treg hücrelerin de plastisitesine yönelik bulgular bulunmaktadır. Treg'lerin Foxp3 ekspresyonlarını azaltabildiği veya ortadan kaldırabildiği, bu sayede diğer T hücre alt gruplarına dönüşebildiği bilinmektedir (157-158). Treg hücreleri Th17 hücrelere dönüşebilmekte, hem Foxp3 hem de IL-17 eksprese eden hücrelere haline gelebilmektedir (159-160). Öte yandan, benzer bir dönüşümün Treg-Th2 hücreleri arasında da olduğu ifade edilmiştir. Treg hücrelerin Th2 hücrelere dönüştüğü ve bunun Th2 tip immün yanıt ile ilişkili hastalıkların temeli olabileceği bildirilmiştir (158, 161). O halde, Foxp3 düzeyinin azalıp, Th2 ve Th17 aktivitesinin arttığı bulduğumuz 21 gündeki tablonun böyle bir dönüşümün sonucu olabileceğini düşünebilir miyiz? Evet, bu dönemde ürün içindeki Treg hücrelerin efektör Th2 ve Th17 hücrelere dönüştüğünü düşünmek mümkündür. Bu dönemde artış gösteren Th2 ve Th17 aktivitesi bu dönüşüme bağlanabilir. Aynı zamanda azalan Foxp3 düzeyinin RORC2 üzerindeki antagonist etkisinin azalmasından (140) veya aktive olan Th2 hücrelerin yaratacağı sitokin çevresinden dolayı naif Th hücreler Th17 ve Th2 hücrelere dönüşüyor, 42 günde belirlenen Th17 ve Th2 aktivasyonunu meydana getiriyor olabilirler. Belki de bu günde yeterli düzeyde Th17 ve Th2 aktivitesi sağlandığı için Treg'leri bu dönüşüme

yönlendiren uyararı ortadan kalkıyor, 42. gündeki CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ ve CD4⁺CD25^{high}CD127 düzeyindeki artış sağlanıyor olabilir. Foxp3 düzeyinde azalma ile Treg hücrelerin Th2 ve Th17 hücrelere dönüşebilme özelliği kazanmaları çalışmamızda bulunduğumuz sonuçlar örtüşmektedir. Ayrıca Foxp3 eksprese eden Treg hücrelerin, Th1 farklılaşmasını sağlayacak kültür ortamında IFN-γ (98, 162-163), IL-4 bulunan ortamda ise IL-9 eksprese ettiği de (164) gösterilmiştir. Th1 ve Th9 çalışmamızda aktivite yitiren hücreler olduğu için bu dönüşümün sonuçlarımızla bir ilişkisi olmadığını düşünölmüştür.

T hücrelerinin plastisitesi, naif Th hücrelerden efektör T hücrelere dönüşümden farklı olarak sekonder lenfoid organlar dışında gerçekleşebiliyor ise elde ettiğimiz sonuçları daha çok plastisite ile açıklamak mantıklı olacaktır. Ancak her hangi şekilde gelişiyorsa gelişin depolanan N-ES'ler içerisinde Th profilinde değişiklikler oluşmaktadır. Ancak bu değişim ürün içerisinde dir. Th hücreler AKT sonrası alıcıya geçtiklerinde ürün içinde iken kazandıkları özelliklerini sürdürebiliyor ve sağ kalabiliyorlarsa, TRIM'in önemli etkenlerinden olabilirler. Sonuçlarımız, kan torbası içindeki tablonun alıcıya benzer şekilde yansması koşuluyla, bugüne değin TRIM'in en önemli nedeninin AKT'nin alıcıda Th2 yanıtını güçlendirmesi olduğunu düşünönenleri destekler niteliktedir. Her AKT sonrası TRIM bulgularına rastlanmaması da, torba içindeki tablonun alıcıya sınırlı durumlarda aynı şekilde yansmasından kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak depolanma sürecinde Th1, Th9 ve Th22 hücreleri aktivitelerini kaybederken Th2 ve Th17 hücreler aktivitelerini artırmıştır. Bu durum Treg hücrelerde 21. günde azalmış 42. günde artmıştır. Th alt gruplarında depolanma sürecinde bulunduğumuz bu değişiklikler TRIM'e yol açan mekanizmaları açıklama konusunda değerli veriler olabilir.

Lökoredüksiyonun Etkinliği

AKT sonrası bağışçı ile alıcı arasındaki HLA-DR antijenlerinin paylaşım durumuna göre alloimmünizasyon veya immüsupresyon gelişebileceği bildirilmiştir (189). En azından bir antijenin paylaşımı durumunda toleransın uyarıldığı, paylaşımın olmadığı durumlarda ise alloimmünizasyonun gerçekleştiği öne sürölmüştür (190). Allojeneik lökositlerin ve lökosit antijenlerinin istenmeyen bu durumların temel unsurları olabileceği ve lökosit azaltmanın bu tablolardan kurtulmak için yararlı olabileceği ifade edilmiştir (16). Çalışmamızda lökoredüksiyonun etkinliği N-ES ve LA-ES süpernatantlarındaki sitokin profillerinin karşılaştırılması ile belirlenmek istenmiştir. Etkinlik değerlendirmesinde Th hücre karşılaştırmasına yer verilmemiştir. Bunun nedeni teorik olarak depolanma öncesi

4log lökoredüksiyon işlemi uygulanan LA-ES örneklerinde ölçülebilir miktarda lökosit bulunmayacağına düşünülmesidir. Kan merkezimizde düzenli olarak yapılan kalite kontrol çalışmalarının sonuçları da bu görüşü desteklemektedir.

Lökosit azaltımının, febril non-hemolitik transfüzyon reaksiyonların, CMV gibi bazı enfeksiyöz ajanların geçişini ve HLA alloimmünizasyonunu engellendiği bilinmektedir. Ancak transfüzyonun diğer komplikasyonları üzerindeki etkinliğine yönelik kanıtlar çeşitli ve çelişkilidir. Etkili olduğunu gösteren çalışmaların (14, 79, 90, 180-181) yanı sıra etkisiz olduğunu gösteren çalışmalar da (1, 182-184) bulunmaktadır.

Bugüne kadar lökoredüksiyonun etkinliğini değerlendirmeyi amaçlayan çalışmaların önemli bölümünü klinik temelli çalışmalar oluşturmuştur ve TRIM'in klinik sonuçları üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Bizim çalışmamız bir laboratuvar çalışması olduğu için TRIM'de rol oynaması olası hücreler ve moleküller ile lökoredüksiyonun etkileri ürün içerisinde yapılan çeşitli ölçümlerle belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlarımıza bakıldığında, bu anlamda istatistiksel olarak anlamlı bulunabilecek tek sonuç, LA-ES süpernatantlarında 42. günde IL-17A düzeylerinin, N-ES'lerinkilere göre sınırdan bir anlamlılıkla ($p=0,052$) yüksek bulunmasıdır. İlginçtir ki teorik olarak içinde yeterli düzeyde lökosit bulunmayan LA-ES örneklerinde IL-17A düzeyleri N-ES örneklerinden daha fazla artış göstermiştir. Ancak lökoredüksiyonun etkinliğine yönelik karşılaştırmamızda IL-17A'dan çok daha önemli bir bulgumuz bulunmaktadır. Sadece N-ES süpernatantlarında ölçülebilen TGF- β düzeyleri bu bağlamda bize oldukça önemli bilgiler vermektedir. TGF- β hiçbir LA-ES örneğinde saptanamamış ama N-ES örneklerinde depolanma süreci boyunca artış göstermiştir (21 gün $p<0,05$, 42 gün $p=0,051$). LA-ES'lerde saptanamadığı için iki grubun karşılaştırıldığı istatistik değerlendirmeye alınmasa da, N-ES süpernatantlarındaki bu artış, TGF- β 'nın TRIM gelişimi açısından önemli olabileceğini öne süren çalışmaları desteklemektedir (165). Öte yandan, LA-ES'lerde böyle bir artışın bulunmaması, lökoredüksiyonun TRIM'i engellemede sağlayabileceği yararın göstergesi olarak kabul edilebilir. AKT ile alıcıya geçen bu sitokin, özellikle yoğun şekilde N-ES alan hastalarda yüksek miktarlara ulaşmış Th hücrelerin Treg hücrelere dönüşmesine ve transfüzyonun immünsupresif etkilerinin ortaya çıkmasına neden oluyor olabilir. N-ES'lerde TGF- β artışının kaynağı, ürün içerisinde bulunan ve bu sitokini eksprese eden T hücreler de dahil birçok lökosit alt grubu olabilir. Bu ekspresyonun nedenlerinden bir tanesi de ürün içinde biriken LPS'ler olabilir. Ürün içinde biriken LPS'lerin hücre kültüründe sitokin üretimini uyardığı ve Treg aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (174-175). LPS'ler sitokin üretimi ve Treg aktivasyonu ile klinik olarak immünsupresif etkinin görülmesine neden oluyor veya

etkiyi güçlendiriyor olabilir. LPS kökenli bu etki, lökoredüksiyon ile azaltılamaz ve lökoredüksiyonun etkisinin sınırlı kalmasında yol açabilir. Bizim belirlediğimiz TGF- β artışı belki de böyle bir etkinin sonucudur. Sadece N-ES'lerde artış saptanmasının nedeni de, LA-ES örneklerinde LPS'ler tarafından uyarılarak TGF- β üretecek yeterince lökositin bulunmaması olabilir. Ancak LA-ES'ler transfüze edildiğinde, ürün içinde birikmiş olan bu LPS'ler alıcıda benzeri bir etki ile Treg aktivasyonu sağlıyor ve böylece lökoredüksiyon etkinliğini yitiriyor olabilir. Belki de lökoredüksiyonun TRIM'i engelleme konusunda yetersiz olduğunu gösteren çalışmaların bu şekilde sonuç vermesinin nedeni, lökosit filtrelerinden geçerek etkilerini sürdürebilen, eritrositler, ekzozomlar gibi lökosit kökenli yapılar veya LPS'ler gibi lökosit dışı etkenler olabilir. Eğer TRIM gelişiminde böyle yapıların etkisi varsa, tek başına lökoredüksiyonun TRIM'i önlemek için yetersiz kalabileceğini öne sürmek yanlış olmayacaktır.

Süpernatanda Bulunan Sitokinler

ES'lerin depolanma sürecinde biriken bir takım BYD-İM'in (21-24, 28, 68, 167-171), çözünür FasL ve çözünür HLA klas I moleküllerinin (1, 59, 87, 165) TRIM etkisinde rolleri olabileceği bilinmektedir. Suçlanan mediyatörlerden bir tanesi de sitokinlerdir (21-24). ES süpernatalarında depolanma sürecinde sitokin düzeylerinin gösterdiği değişiklikler ve etkileri (27, 165-166, 176-178) çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalar transfüze edilen süpernatanın alıcıda da TRIM etkisine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, LA-ES ve N-ES süpernatalarında IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN- γ , TNF- α ve TGF- β düzeyleri ölçülerek TRIM etkisiyle ilişkileri değerlendirilmek istenmiştir. Araştırmamızda bu sitokinlerden IL-4, IL-6, IL-9, IL-10 ve TNF- α düzeyleri ya hiç ölçülememiş ya da istatistiksel değerlendirmeye katılamayacak kadar az sayıda ve düzeyde belirlenmiştir. Burada hemen şu soru akla gelmektedir: Çalışmamızda depolanma süreci içinde Th2 ve Th17 aktivitelerinde artış saptandığına göre, süpernatanda IL-4, IL-10 ve IL-6 düzeylerinde artış saptamak gerekmez miydi? Th2 aktivitesinin süpernatandaki karşılığı olarak IL-4 ve IL-10 düzeylerinin, Th17 farklılaşması için süpernatanda biriken TGF- β 'ya eşlik etme anlamında IL-6 düzeylerinin ölçülmesini beklenmek mümkün olabilirdi. Benzer şekilde hücre içinde artış gösteren TNF- α 'nın, süreç içinde azalsa da aktivitesi devam eden Th9 hücrelerin yansıması olarak IL-9'un özellikle N-ES süpernatalarında ölçülmesi beklenebilirdi. Ancak bu sitokinlerin düzeyleri ne LA-ES ne de N-ES süpernatalarında belirlenemedi. Bu durum laboratuvar kaynaklı olabileceği

gibi, sitokinlerin kolay yıkılma, ELISA ile zor saptanma ve kısa yarı ömürlü olma gibi bir takım özelliklerine veya süreç boyunca ürün içinde kullanılıyor olmalarına bağlı olarak karşımıza çıkıyor olabilir. Öte yandan süpernatanda IL-4 ve IL-6 düzeylerinde herhangi bir değer saptanamamasına rağmen Th2 ve Th17 farklılaşmasının oluşması; ürün içinde naif Th hücrelerden efektör Th gelişimine şüpheli bakışımızı destekler niteliktedir. Bu hücrelerin gelişimi için naif Th hücrelerin ortamda bulunan bu sitokinlere gereksinimleri bulunmaktadır.

Çalışmamızda LA-ES'lerde IL-8, IL-13, IL-17A, IFN- γ düzeyleri, N-ES'lerde IL-8, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN- γ , TGF- β düzeyleri değerlendirilebilmiştir. LA-ES'lerde IL-8, IL-13 ve IFN- γ düzeylerinin 0, 21 ve 42 gün günlerde gösterdiği değişiklikler ile IL-17A'nın 21 gün örneklerinde gösterdiği artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Sadece 42 gün örneklerinde IL-17A'nın gösterdiği artış anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). LA-ES'lerde IL-8, IL-13, IL-17A, IFN- γ düzeylerinin saptanabilir olması hatta IL-17A'nın artış göstermesi ilginç bir durumdur. Bu durumun sitokin düzeylerinin süreç boyunca çok fazla değişiklik göstermemesi nedeniyle LA-ES'lerin elde edildiği ilk gün ürün içerisindeki var oluşla açıklanması pek mümkün görünmemektedir. Sitokinlerin yarı ömürlerinin kısalığı nedeniyle depolanma sürecinde düzeylerinde bir azalma olması beklenirken, düzeyin sabit kalması veya artış göstermesi sitokin ekspresyonunun sürdüğünü düşündürmektedir. LA-ES'lerdeki bu üretimin kaynağı tam olarak anlaşılmasa da, ürün içerisinde bulunan lökosit dışı kaynaklardan veya lökosit filtresini geçebilen lökosit ilişkili yapılardan köken aldığını düşünmek mümkündür. Lökosit dışı kaynakların çalışma protokolümüz gereği hem LA-ES hem de N-ES'lerde eşit düzeyde bulunması gerektiği düşüncesinden hareketle; LA-ES'lerde sitokin ekspresyonunun ve IL-17A artışının daha ziyade lökosit filtresinden geçebilen lökosit ilişkili yapılardan kaynaklandığı düşünmek mantıklı görünmektedir. Bu bakış açısıyla ekzozomlar ve plazma membranı kaynaklı ekzozomlar ve MP'ler öncelikli olarak düşünülebilir. Bu yapılar boyutları nedeniyle lökoredüksiyondan kurtularak ürün içinde devam eden sitokin ekspresyonuna yol açabilirler. LA-ES süpernatatlarında N-ES'lere yakın ölçtüğümüz sitokin düzeylerinin ve IL-17A artışının nedeni bu yapılar olabilir. LA-ES'lerde önemsenecek düzeyde bulunan/bulunmayan lökositler tarafından bu yapılardan eksprese edilen sitokinlerin kullanılmaması, kümülatif birikimle saptamış olduğumuz IL-17A artışının nedeni olabilir. Ancak IL-22 ve TGF- β düzeylerinin LA-ES'lerde saptanamayıp N-ES'lerde saptanabilmesi ve diğer sitokin düzeylerinin artış göstermemesi bu varsayımı zayıflatmaktadır.

Çalışmamızda, N-ES süpernatantlarında LA-ES'ne ek olarak IL-22 ve TGF- β düzeyleri de ölçülebilmektedir. IL-8, IL-13, IL-17A ve IFN- γ düzeylerinin 0, 21 ve 42 gün örneklerinde gösterdiği değişiklikler ile IL-22'nin 42 gün örneklerinde gösterdiği azalma anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Sadece 21 gün örneklerinde IL-22'nin gösterdiği azalma ile TGF- β 'nin 21 gün örneklerinde gösterdiği artış anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). TGF- β 'nin 42 gün örneklerinde belirlenen artış ise sınırdadır ($p=0,051$). N-ES süpernatantında biriktiğini belirlediğimiz TGF- β , TRIM fenomeninin nedenlerinden birisi olabilir. Bulgumuz ES plazmasının immün düzenleyici etkisinden TGF- β 'nin sorumlu olduğu varsayımını (165) destekler niteliktedir. TGF- β , birincil etkisi T lenfositlerin ve diğer lökositlerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu baskılamak olan bir sitokindir. Antijen ile uyarılmış T hücreleri, LPS ile aktive olmuş mononükleer fagositler ve diğer bazı hücre tipleri tarafından eksprese edilir. T hücrelerin fonksiyonel olarak farklı olan alt gruplarına farklılaşmasının düzenlenmesi proliferasyonlarının ve efektör fonksiyonlarının baskılanması gibi fonksiyonları vardır (101). TGF- β bu özellikleri sayesinde N-ES'lerin transfüzyonu ile alıcıda geçici bir immünsupresyon meydana getiriyor veya naif hücreleri Treg hücrelere yönlendiriyor olabilir. DÖ-LA-ES'lerle alıcıya TGF- β geçişini engelleyerek, TGF- β 'nin nötrofil hareketleri (21), T hücre proliferasyonu (165) üzerine olumsuz ve baskılayıcı özelliklerinin önüne geçilebilir. Belki de bu sayede post-operatif bakteriyel enfeksiyonlar, kanser rekürrensi gibi bazı TRIM etkileri engellenebilir. Ancak tüm TRIM etkilerinin TGF- β ile açıklanacak kadar basit olmadığı unutulmamalıdır. Baumgartner ve arkadaşlarının (27) buldukları sonuç bizim N-ES süpernatantında bulduğumuz gibi süpernatanda biriken TGF- β 'den kaynaklanıyor olabilir.

Ek olarak sitokin sonuçlarımıza bakıldığında garip bir sonuç ile de karşılaşılmaktadır. Aynı bağışçıya ait LA-ES örneklerinin 0. gününde TGF- β ve IL-22 düzeyleri "0" bulunurken, N-ES örneklerinin 0. gününde on bağışçının beşinde yüksek TGF- β ve IL-22 düzeyi saptanmıştır. Her iki sitokin için elde edilen bu beş değer üçü ortak (1, 7 ve 8. bağışçılar) bağışçılarda bulunmuştur. Aynı anda aynı kişilerden alınan kanlardan hazırlanan LA ve N-ES örneklerinin 0. günlerinde IL-22 ve TGF- β 'nin bu farklı değerlerinin nedeni anlaşılabilmiştir.

Özetlemek gerekirse LA ve N-ES süpernatantlarında ölçtüğümüz sitokin değerlerinden hem T hücre alt grup sonuçlarımızla bağdaşan, hem de TRIM gelişiminde rol alma olasılığı olan sitokinler IL-17A ve TGF- β 'dir. IL-17A'nın naif Th hücrelerin Th17 hücrelere dönüşümünden ziyade, Th17 hücrelerden eksprese edildikten sonra farklılaşmayı güçlendirici etkisi olduğu bilinmektedir (130). Bu nedenle IL-17A'nın, Th17 aktivitesini

güçlendirip, Th1 yanıtının zayıflamasına, Th2 yanıtının güçlenmesine aracılık ederek TRIM etkisine katkı sağladığı düşünülebilir. TGF- β ise alıcıdaki naif Th hücrelerin Treg hücrelere farklılaşmasına aracılık ederek TRIM etkisinin immünsupresif özelliklerinin gelişmesini sağlıyor olabilir. Lökoreduksiyon işlemiyle bu supresif etkiden kurtulmak mümkün görünmektedir. Düzeyini ölçemediğimiz veya seviyelerini anlamlandıramadığımız diğer sitokinlerin TRIM gelişimine katkı açısından rolleri tarafımızca değerlendirilememiştir.

Süpernatant değerlendirirken depolanma süresi boyunca süpernatanda biriken sitokin dışı yapıların da göz önünde bulundurulmasında yarar vardır. Örneğin uzun süre depolanmış ES'ler aracılığıyla nakledilen apoptotik hücrelerin TGF- β aracılı immünsupresyona (63), allograft kabulünün güçlenmesine ve Treg düzeyinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (64). Ürün içindeki bu ölü hücre artıkları da TRIM nedenlerinden bir tanesi olabilir. Bundan başka plazma serbest demirinin de potansiyel immün düzenleyici etkileri olduğu (169), düşük demir düzeyinin immün yanıtın Th1, artan düzeyinin ise Th2 yönünde gelişmesine yol açtığı bilinmektedir (171). Depolanma sürecinde N-ES ve LA-ES'lerde biriken serbest demir ile TRIM arasında ilişki bulunabilir. Bir ürün içerisindeki demir düzeyi belki bu durumu doğuracak kadar yükselmeyebilir. Ancak yoğun ve görece olarak uzun süre depolanmış ES transfüzyonu alan hastalarda kümülatif olarak yükselen demir düzeyi bu tabloya yol açıyor olabilir. Bu durum AKT'nin immün düzenleyici etkilerinin ürünün depolanma süresi (67, 75-78) ve transfüze edilen ürün sayısı (14, 79) ile ilişkili olduğunu öne süren görüşlere de destek sağlanmaktadır. Bununla birlikte makrofajların demir yüklenmesinin, immün yanıtın Th2 yönünde kaymasına aracılık ettikleri (171) ve proenflamatuvar (M1) formdan antienflamatuvar (M2) forma dönüştükleri öne sürülmüştür (68). Depolanma sürecinde biriken demirin AKT sonrası alıcı makrofajlarında benzeri etkiler göstererek immün yanıtı Th2 yönünde değiştirmesi mümkündür. Yoğun ve uzun süre depolanmış ES transfüzyonu alan hasta immün sisteminde, ES süpernatantındaki serbest demir nedeniyle meydana gelebilecek M2 ve Th2 aktivitesindeki artış, bulgularımızda gösterdiğimiz ürün içindeki Th2 aktivite artışı ile birlikte TRIM mekanizmasında sinerjik bir etki oluşturuyor olabilir. Serbest demir, ES süpernatantında depolanma sürecinde biriken çok sayıda molekül ve mediyatörlerden sadece bir tanesidir. Transfüzyonun immün düzenleyici etkisinin nedenlerini anlamak için süpernatandaki diğer molekül ve mediyatörlerin değerlendirildiği kapsamlı çalışmalara gerek vardır.

TRIM etkisinde lökositler ve süpernatantın dışında eritrositlerle ilgili bir takım özelliklerin de rolü olabileceği çeşitli çalışmalarla işaret edilmiştir. ES depolanma

sürelerinin, transfüze edilen ürün sayısının ve eritrosit kökenli MP'ler gibi etkenlerin TRIM gelişiminde rol oynayabileceği tartışılmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalar eritrositlerin de kanser gelişimi ve progresyonu üzerine olumsuz etkileri olduğunu (66-67), sepsis riskini, hatta mortaliteyi artırabildiğini (67), makrofaj plastisitesini (M1- M2) etkilediğini (68), HO-1 aracılığıyla Treg indüksiyonuna aracılık ettiğini (70-72) göstermiştir. Öte yandan eritrosit depolanma lezyonlarının da transfüzyonun immün düzenleyici rolüne sağladıkları katkılar tartışılmaktadır. Özellikle eritrosit kökenli MP'lerin AKT ile alıcıya geçtiklerinde immunsupresif bir etkiye neden olabilecekleri bildirilmiştir (81-82). Eğer eritrositler yukarıda bahsettiğimiz gibi, depolanma süreleri, transfüze edilen ürün sayıları ve MP'leri aracılığıyla immün düzenlenmede rol alıyorsa, lökoreduksiyonun TRIM gelişimini engelleyici bir etkisi olmadığını savunan görüşlere destek sağlanmış olacaktır. Ancak eritrositler ve TRIM etkisi arasındaki ilişki ile ilgili yeni bilgilere ve çalışmalara gerek vardır.

ES'lerin depolanma süresiyle TRIM ilişkisini değerlendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. 14 günden uzun süre depolanan ES'lerin bir yıllık mortaliteyi (75) ve enfeksiyöz komplikasyonları (76) artırdığının, ortalama 6 gün daha uzun süreyle depolanmış ES'lerin multiorgan yetmezliğine (77) ve ortalama 8 gün uzun depolananların sepsise bağlı ölümlere yol açtığına (78) gösterilmesi bu çalışmalara örnek olarak verilebilir. Çalışmamızda Th2, Th17 ve Treg hücrelerinin depolanma sürecinin sonlarına doğru aktivite kazanması ve süpernatandaki TGF- β düzeyindeki yükselme uzun süre depolanmış N-ES'lerin transfüzyonunun immünmodülatör etki ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkilerin transfüzyon sayısı arttıkça daha fazla artış göstereceğini öngörmek yanıltıcı olmayacaktır. Zaten 3 üniteden fazla ES transfüzyonunun mortaliteyi artırdığını gösteren çalışmalar (14, 79) da bu öngörüğü desteklemektedir.

Bu güne değin TRIM konusunda yapılan çalışmalar genellikle klinik çalışmalar olmuştur. Bizim çalışmamız laboratuvar ortamında ürün içindeki immünolojik bazı parametrelerdeki değişimi belirlemeyi hedeflemiştir. Bir çok otoriteye göre TRIM etkisi, AKT'nin alıcıda immün yanıtı Th1'den Th2'e dönüştürmesiyle ortaya çıkmaktadır ve bu dönüşümde sıklıkla mikrokimerizm (53-54), transfüzyonun İV yapılan bir uygulanma olması (51) ve süpernatanda biriken moleküller (57) suçlanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarından bir tanesi bu görüşü destekler niteliktedir. Ürün içerisinde depolanma süreci boyunca Th1 hücreler aktivitelerini yitirmiş, Th2 hücreler baskın hale gelmiştir. N-ES'ler içinde bulduğumuz Th2 aktivite artışı belki de alıcıda mikrokimerizm, İV uygulama vb nedenlerle geliştiği düşünülen Th1→Th2 dönüşümünün temel nedenidir ve transfüzyon

aracılı mikrokimerizmin sonucu değil sebebidir. Ürün içindeki Th1→Th2 dönüşümü transfüzyon alıcısına yansıdığına TRIM'e yol açıyor olabilir. Ayrıca AKT'nin İV uygulanmasının, ES'lerin uzun süre depolanmasının ve Th2 tip immün yanıtın alıcıda enerjiye yol açarak TRIM'e neden olması (51, 55, 61); depolanma süreci boyunca artan Th2 aktivitesinin TRIM'e enerji aracılı katılımını da sağlıyor olabilir. Th2'ler dışında diğer önemli bulgumuz da depolanma süreci boyunca ürün içerisinde artış gösteren Th17 aktivasyonu olmuştur. TRIM ve Th17 hücre aktivasyonu ilişkisiyle ilgili çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca TRIM'in otoimmün bir süreci de kapsayıp kapsamadığı bilinmemektedir. Bu tartışmaya ve çalışmaya açık bir konudur. Çalışmamızda Treg hücreler süreç içerisinde önce aktivitelerini yitirmiş, depolanma süreci sonlarına doğru tekrar kazanmıştır. Bu tablo AKT'nin immüsupresif etkilerinde baskın rolü Treg'lerin oynamadığını ya da depolanma süresi uzun ES'ler transfüze edildiğinde oynayabileceğini düşündürmektedir. AKT sonrası alıcıda gelişen Treg aktivasyonunun oluşturduğu immüsupresyonun TRIM gelişiminde önemli olduğu bildirilmiştir (17, 27, 64). TRIM Treg'ler aracılığıyla depolanma süresinin sonlarına yaklaşmış N-ES'lerin transfüzyonu ile gelişiyor olabilir. Öte yandan LA-ES ve N-ES sürenatanları karşılaştırdığımızda süreç içerisinde N-ES süpernatantında artış gösteren TGF- β , transfüzyonun immüsupresif etkilerinin başlıca kaynağı olabilir. Bu sitokinin LA-ES'lerde saptanamamış olmasını da lökoredüksiyonun AKT'nin immüsupresör etkilerini azaltabileceğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak, AKT ile alıcıya önemli miktarda hem çözünür, hem de hücre ile ilişkili yabancı antijen/molekül geçmektedir. Bu antijen/moleküllerin alıcı dolaşımında varlıkları ve kalıcılıkları çeşitli immün yanıtlar için uygun zemini hazırlamaktadır. Bu yapılar nedeniyle alıcıda oluşan immün düzenlenmeye TRIM adı verilmektedir. TRIM gelişiminde daha çok bu antijen/moleküllerin lökosit kökenli olanları suçlanmaktadır. Ama eritrosit kökenli yapılardan da şüphelenilmektedir. N-ES depolanma sürecinde Th2, Th17 ve Treg aktivitelerinde bulduğumuz artış TRIM etkisinin ürün içinde başlayan bir süreç olabileceğini ve ES içindeki MNH'lerin bu süreçte rol oynayabileceklerini göstermiştir. Özellikle Th2 ve Treg sonuçlarımız ile TRIM'in olası mekanizmaları arasında paralellikler bulunmaktadır. Öte yandan özellikle N-ES süpernatantında biriken TGF- β alıcıdaki immüsupresyonda rol oynuyor olabilir. Bu durum yoğun transfüzyon alan hastalarda daha sık ve şiddetli yaşanıyor olabilir. Bu tablo ES süpernatantının TRIM gelişimindeki etkilerini ve transfüze edilen ürün sayısı ile olumsuz sonuçlar arasında ilişki olabileceğini göstermektedir. Yine TGF- β 'nın sadece N-ES süpernatantlarında saptanabilmesi lökoredüksiyonun süpernatant

aracılı TRIM gelişimini engellemede etkin olabileceğini düşündürmektedir. Aynı şekilde TRIM ile ilişkili olduklarını düşündüren Th alt gruplarına yönelik sonuçlarımız da lökoredüksiyonla TRIM etkisinin azaltılabileceğini göstermektedir. Ama lökosit dışı nedenler her zaman bu etkinliği sınırlandıracaktır. Ürün içinde Th2, Th17, Treg aktivitelerinde saptadığımız artışın depolanma süresinin uzunluğu ile paralel olması da, ürün raf ömrü ile TRIM arasında ilişki olduğunu göstermesi açısından önemli bir bulgudur.

Son olarak, TRIM etkileri her transfüzyon sonucunda karşılaşılan durumlar değildir ve etkilerin her birinin temelinde muhtemelen farklı mekanizmalar yatmaktadır. Tüm bu etkilere ürüne ve hastaya bağlı farklı değişkenler yol açmaktadır. Her ne kadar TRIM etkisinin temelinde ürün içerisinde bulunan lökositler ile süpernatanda biriken BYD-İM'in rolü olduğu ifade edilse de eritrositlerin, hatta kan bileşenlerinin elde edilmesi ve uzun süre depolanması amacıyla torba sistemleri içinde bulunan solüsyonların bile etkilerinin bulunabileceği unutulmamalıdır. Bundan sonra bu konuda planlanacak çalışmaların bu mantık çerçevesinde hazırlanması elde edilecek verileri daha değerli kılacaktır. Çünkü her bir TRIM etkisinin nedeni ürün içindeki farklı bir yapının ilgili hasta grubunda gösterdiği fonksiyona bağlı olabilir. Örneğin transfüzyon her hastada bakteriyel enfeksiyon yapmaktan ziyade postoperatif durumlarda bu tabloya yol açmaktadır. Bu hasta grubu içinde de lökoredüksiyon kardiyak cerrahi hastalarında bakteriyel kontaminasyonu engellerken, diğer operasyonlardan sonra etkisi olmamaktadır. Büyük olasılıkla her hasta grubu ürün içindeki farklı etkenlerden etkilenip TRIM'in klinik sonuçlarını göstermektedir. Bu durum bize her hastanın ve transfüzyonun diğerlerinden farklı, eşsiz olduğunu işaret etmektedir. Her hastada TRIM meydana gelmemesinin nedenleri, AKT alıcısında Th hücrelerin sağ kalamamasına, süpernatandaki mediyatörlerin dilüe olmasına, hastaların bu değişikliklerden etkilenecek klinik özelliğe sahip olmamasına, alınan transfüzyon sayısına ve ürünün raf ömrüne vb bağlı olabilir. Bu yüzden TRIM'i nedenleri ve sonuçları açısından değerlendirirken, bu konuda araştırma planlarken bu değişkenleri akılda tutmakta yarar vardır.

6. EKLER

	Stok günü	CD3+CD4+											CD4+CD25 ^{high}		
		IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-17A	IL-21	IL-22	FoxP3+	CD127-			
1	0	0,8%	1,0%	0,6%	2,4%	5,1%	0,8%	1,8%	1,2%	1,3%	18,5%	1,6%			
	21	0,0%	1,6%	1,8%	2,9%	3,4%	0,4%	1,6%	6,2%	0,5%	0,0%	2,7%			
	42	0,0%	2,7%	2,1%	54,7%	8,9%	0,3%	2,7%	6,2%	0,4%	3,3%	5,2%			
2	0	0,3%	0,3%	0,2%	5,8%	1,9%	0,2%	0,6%	9,0%	0,7%	0,0%	0,2%			
	21	0,1%	0,1%	2,1%	19,7%	3,9%	0,3%	0,5%	2,5%	0,9%	0,0%	1,4%			
	42	0,0%	5,7%	1,9%	28,1%	4,4%	1,2%	2,7%	1,8%	1,6%	12,9%	3,2%			
3	0	0,8%	1,3%	0,5%	9,8%	1,1%	0,8%	1,5%	3,1%	1,3%	2,1%	0,2%			
	21	0,1%	1,5%	1,9%	21,8%	5,9%	1,3%	2,0%	6,7%	0,5%	0,0%	5,8%			
	42	0,0%	2,8%	3,5%	21,2%	3,1%	1,1%	0,7%	3,0%	6,5%	10,4%	0,4%			
4	0	0,3%	1,3%	0,1%	17,4%	3,0%	0,5%	1,0%	8,0%	1,0%	17,5%	0,2%			
	21	0,1%	3,9%	2,9%	19,8%	8,2%	0,7%	2,8%	4,0%	0,2%	0,0%	2,9%			
	42	0,1%	4,8%	4,0%	42,8%	6,7%	0,1%	11,1%	20,3%	0,1%	0,0%	4,0%			
5	0	0,4%	0,8%	0,2%	11,8%	3,8%	0,8%	0,7%	2,8%	1,3%	24,3%	0,3%			
	21	0,0%	0,5%	5,0%	17,1%	3,8%	0,3%	1,1%	6,6%	0,1%	0,0%	0,9%			
	42	0,0%	9,0%	7,9%	26,1%	2,7%	0,0%	0,6%	0,4%	0,9%	59,2%	0,7%			
6	0	0,3%	1,9%	0,3%	5,7%	1,5%	0,5%	0,2%	6,1%	3,0%	3,0%	0,3%			
	21	0,0%	9,3%	1,9%	33,1%	2,3%	0,5%	6,9%	2,6%	0,2%	0,0%	1,2%			
	42	0,0%	9,2%	1,7%	55,4%	2,2%	0,0%	5,2%	6,1%	0,7%	45,9%	2,3%			
7	0	0,4%	1,0%	0,7%	3,3%	1,3%	1,6%	2,3%	3,4%	0,5%	2,4%	0,3%			
	21	0,0%	6,6%	2,5%	34,2%	3,0%	1,4%	2,3%	19,5%	1,0%	3,6%	0,8%			
	42	0,0%	1,3%	11,8%	62,6%	0,7%	0,3%	15,0%	16,1%	0,4%	64,8%	0,6%			
8	0	0,8%	2,1%	0,3%	9,7%	2,0%	0,9%	0,8%	8,1%	0,8%	6,9%	0,3%			
	21	0,0%	2,0%	5,9%	31,5%	3,5%	0,5%	7,5%	4,7%	0,9%	6,9%	2,4%			
	42	0,0%	10,5%	8,9%	45,8%	5,1%	0,3%	17,8%	7,2%	0,3%	53,6%	3,2%			
9	0	1,0%	1,0%	0,1%	5,3%	1,5%	0,3%	1,8%	7,2%	1,0%	1,2%	0,4%			
	21	0,0%	5,9%	0,9%	25,7%	4,7%	0,0%	0,8%	9,3%	0,3%	0,0%	1,2%			
	42	0,0%	7,3%	3,9%	20,0%	5,3%	0,3%	5,1%	11,6%	2,2%	53,8%	14,4%			
10	0	0,2%	0,4%	0,0%	9,6%	8,6%	0,5%	0,5%	8,4%	1,1%	0,0%	0,2%			
	21	0,0%	1,9%	0,5%	17,4%	3,2%	0,5%	2,9%	21,7%	0,4%	0,0%	2,0%			
	42	0,3%	12,9%	3,2%	67,3%	4,9%	0,8%	0,2%	2,3%	0,3%	0,0%	33,6%			

Ek-1: T hücre alt grupları akım-sitometre (%) sonuçları

	Stok günü	TBX21	GATA3	AHR	SPI.1	FOXP3	RORC2	
BAĞIŞÇILAR	1	0	4,79E-04	9,68E-03	1,08E-02	0,2078	2,07E-03	1,29E-03
		21	1,63E-05	9,01E-04	3,28E-03	1,89E-02	1,63E-03	0
		42	0	0	0,4325	0	5,43E-02	0,325
	2	0	1,69E-03	2,17E-02	2,15E-02	0,2446	3,11E-03	1,32E-03
		21	6,10E-04	1,96E-03	5,54E-03	4,23E-02	7,93E-04	2,70E-04
		42	1,55E-03	3,14E-04	0,3357	6,78E-04	5,09E-02	0,245
	3	0	1,02E-03	1,86E-02	2,67E-02	0,1671	6,47E-03	1,98E-03
		21	0	2,86E-03	4,56E-03	5,22E-02	1,95E-03	0
		42	0	0	0,4166	1,38E-04	4,78E-02	0,3001
	4	0	6,53E-05	2,36E-02	9,78E-02	0,3144	2,83E-03	6,18E-03
		21	0	1,27E-03	2,06E-05	4,28E-04	4,23E-06	1,62E+02
		42	0	1,45E-04	0,3724	2,44E-04	4,51E-02	0,2317
	5	0	5,79E-04	1,04E-02	1,92E-02	0,3455	4,88E-03	5,97E-04
		21	1,87E-04	8,86E-04	7,15E-03	1,01E-01	0	0
		42	1,93E-04	0	0,3611	1,72E-04	6,80E-02	0,3382
	6	0	2,62E-03	2,66E-02	2,10E-02	0,1854	2,73E-03	1,64E-03
		21	0	1,04E-03	5,65E-03	3,10E-02	0	0
		42	1,60E-03	0	0,3899	3,10E-04	7,58E-02	0,4277
	7	0	6,79E-04	1,44E-02	4,67E-02	0,3226	1,64E-03	7,00E-04
		21	0	2,17E-03	7,27E-03	8,97E-02	0	4,77E-07
		42	2,71E-04	1,56E-04	0,3526	5,31E-04	9,82E-02	0,3379
	8	0	5,69E-05	6,34E-03	3,54E-02	0,564	2,35E-03	4,93E-04
		21	0	2,33E-04	0,4108	0	6,15E-02	0,3733
		42	0	0	0,4354	1,37E-04	4,16E-02	0,339
	9	0	6,09E-04	2,60E-02	1,93E-02	0,2093	2,73E-03	1,04E-03
		21	6,86E-06	4,99E-03	1,21E-02	0,2116	1,24E-03	4,39E-04
		42	4,57E-04	0	0,38	2,14E-04	6,74E-02	0,3966
	10	0	3,76E-03	1,64E-02	4,76E-02	0,2739	2,01E-03	1,71E-03
		21	3,46E-05	1,67E-03	2,61E-03	2,06E-02	0	0
		42	3,79E-04	0	0,4366	1,23E-05	5,39E-02	0,4922

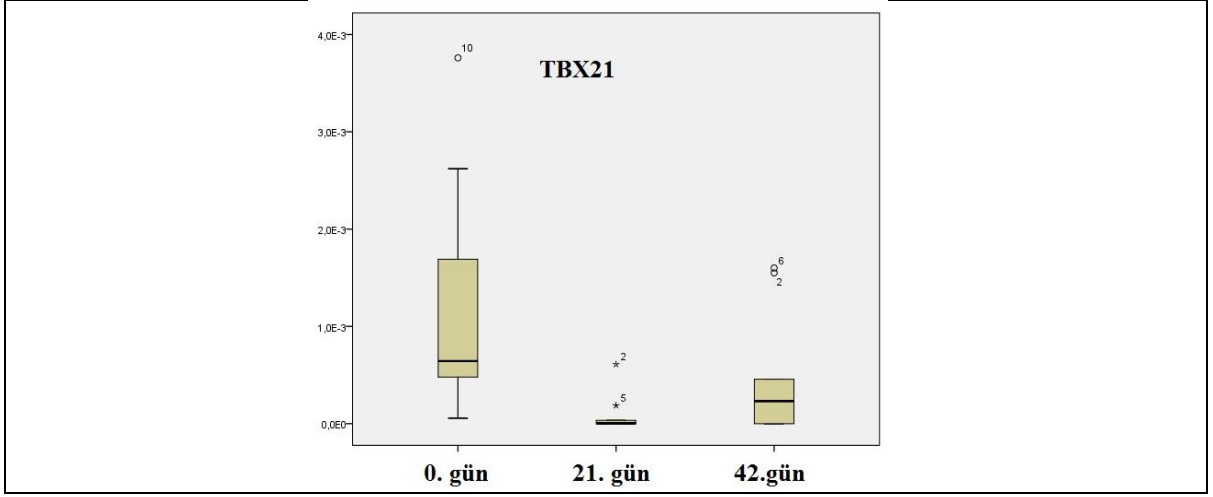
Ek-2: Transkripsiyon faktörleri sonuçlar

Sitokinler (pg/mL)	Stok günü	Bağışçı-1		Bağışçı-2		Bağışçı-3		Bağışçı-4		Bağışçı-5	
		LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES
IL-4	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,74	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,70	4,81	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,76	0,00	3,58	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-6	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-8	0	79,43	60,57	26,76	30,66	81,38	111,30	24,16	200,39	22,21	57,32
	21	12,45	83,33	28,06	30,01	102,84	78,78	80,08	1218,76	97,64	89,84
	42	30,01	27,41	495,62	64,48	160,07	36,51	121,05	2214,37	26,76	36,51
IL-9	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,01
IL-10	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-13	0	11,50	17,22	8,81	4,44	8,81	9,15	22,94	21,93	63,30	145,71
	21	8,81	20,92	639,15	0,74	13,19	13,52	13,86	4,78	14,87	19,24
	42	18,23	7,80	8,14	0,00	5,11	64,65	28,32	8,48	38,41	29,33
IL-17A	0	4,28	3,03	8,33	4,38	2,55	2,93	6,69	14,41	4,67	4,86
	21	9,88	6,50	6,02	4,19	5,34	12,96	9,20	6,41	7,08	7,18
	42	9,59	4,77	13,93	8,43	7,95	3,13	10,46	3,80	7,76	14,70
IL-22	0	0,00	46,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IFN-γ	0	71,25	481,48	161,48	181,48	1,48	8,46	64,74	67,99	149,85	99,62
	21	170,32	80,55	0,08	380,09	34,97	75,90	365,67	5,20	107,53	8,46
	42	304,74	537,30	148,46	62,41	3,34	80,55	12,18	11,25	35,90	2,41
TNF-α	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TGF-β	0	0,00	4,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,19
	21	0,00	106,07	0,00	46,38	0,00	0,00	0,00	42,99	0,00	91,87
	42	0,00	37,46	0,00	162,61	0,00	0,00	0,00	46,76	0,00	36,21

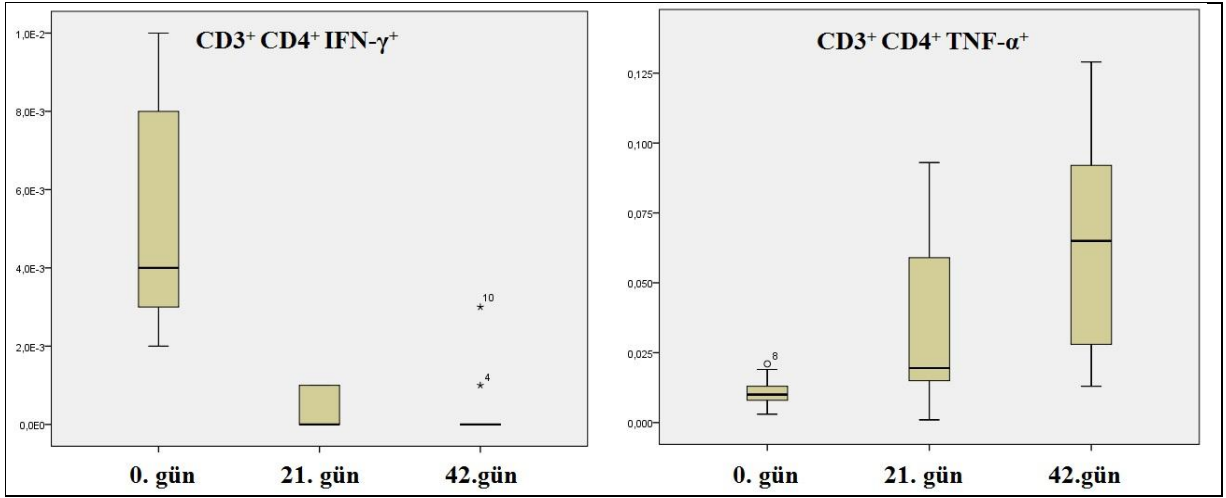
Ek-3: Sitokin ELISA sonuçları-1

Sitokinler (pg/mL)	Stok günü	Bağışçı-6		Bağışçı-7		Bağışçı-8		Bağışçı-9		Bağışçı-10	
		LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES	LA-ES	N-ES
IL-4	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-6	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-8	0	112,60	44,32	24,16	31,31	49,52	41,71	21,56	31,31	17,65	25,46
	21	35,21	41,71	33,91	127,55	24,81	46,92	36,51	48,22	17,65	27,41
	42	26,11	33,91	23,51	38,46	27,41	37,16	138,61	32,61	20,26	33,26
IL-9	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-10	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-13	0	8,48	174,64	70,37	7,80	173,29	10,50	11,17	15,88	8,48	6,80
	21	4,44	61,62	16,55	37,07	86,51	5,45	15,54	40,77	42,45	3,77
	42	29,33	142,68	12,51	42,79	877,63	13,52	78,78	5,45	5,45	81,80
IL-17A	0	9,78	4,09	6,12	3,03	7,47	7,85	5,06	3,90	4,77	4,77
	21	5,25	5,15	10,74	8,43	6,60	2,07	6,98	3,80	5,63	4,38
	42	7,08	4,09	11,71	3,42	8,82	1,87	11,23	3,51	6,31	2,55
IL-22	0	86,00	26,06	0,00	7,33	0,00	650,46	0,00	107,23	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	486,86	0,00	0,00	2,33	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	27,31	454,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IFN- γ	0	4,27	32,18	9,85	0,00	0,00	14,50	17,29	2,41	28,46	0,00
	21	2,87	88,46	18,22	8,92	0,00	11,71	18,22	15,90	108,92	0,55
	42	113,57	214,97	0,00	3,34	13,11	1,48	5,67	27,53	0,00	2,41
TNF- α	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TGF- β	0	0,00	0,00	0,00	2,78	0,00	28,92	0,00	0,00	0,00	62,72
	21	0,00	90,99	0,00	65,36	0,00	37,59	0,00	13,97	0,00	81,69
	42	0,00	55,18	0,00	10,57	0,00	43,12	0,00	20,25	0,00	17,86

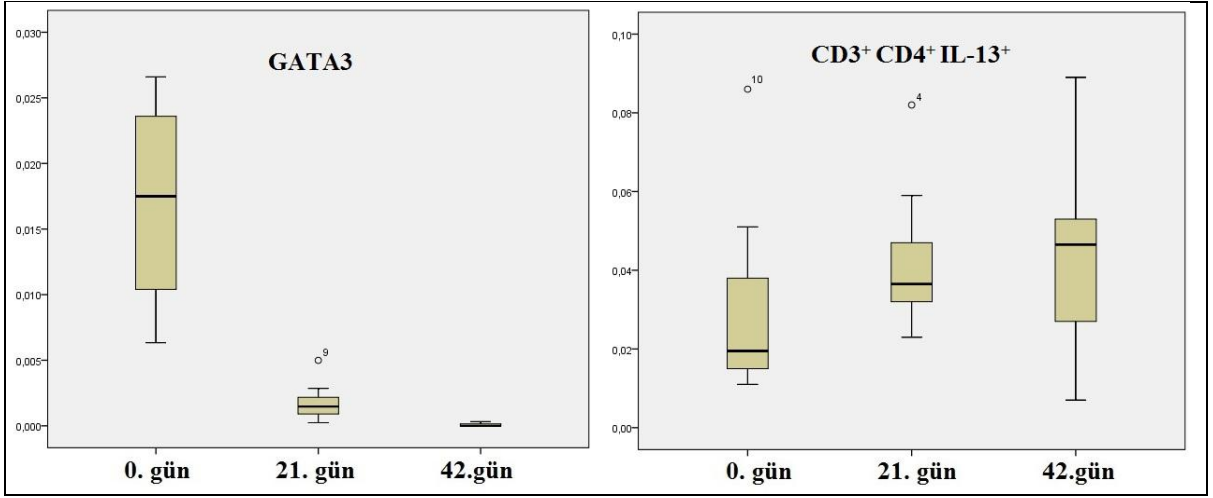
Ek-4: Sitokin ELISA sonuçları-2



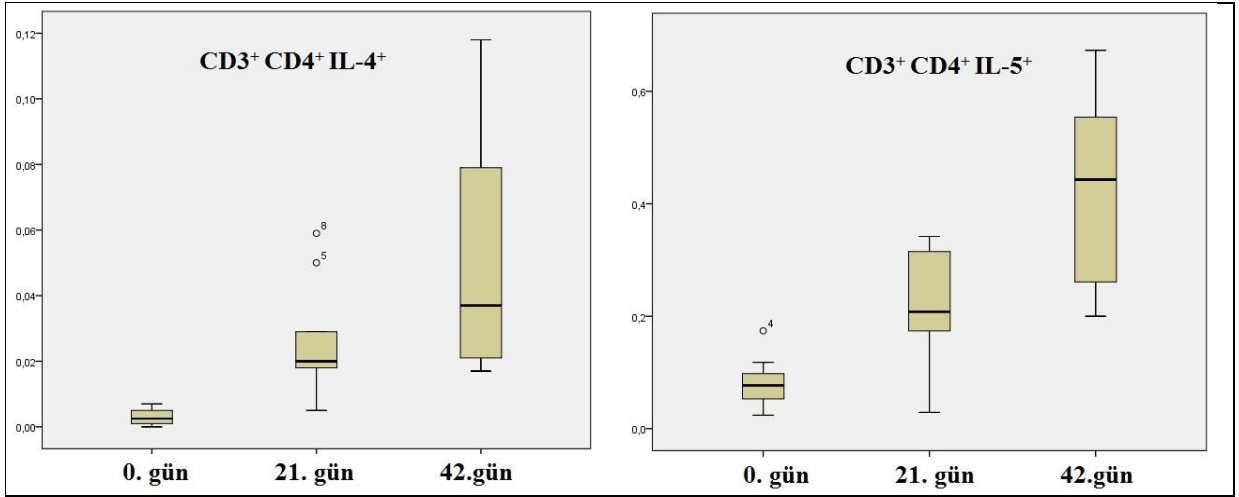
Ek-5: Depolanma sürecinde TBX21 ekspresyon düzeyleri



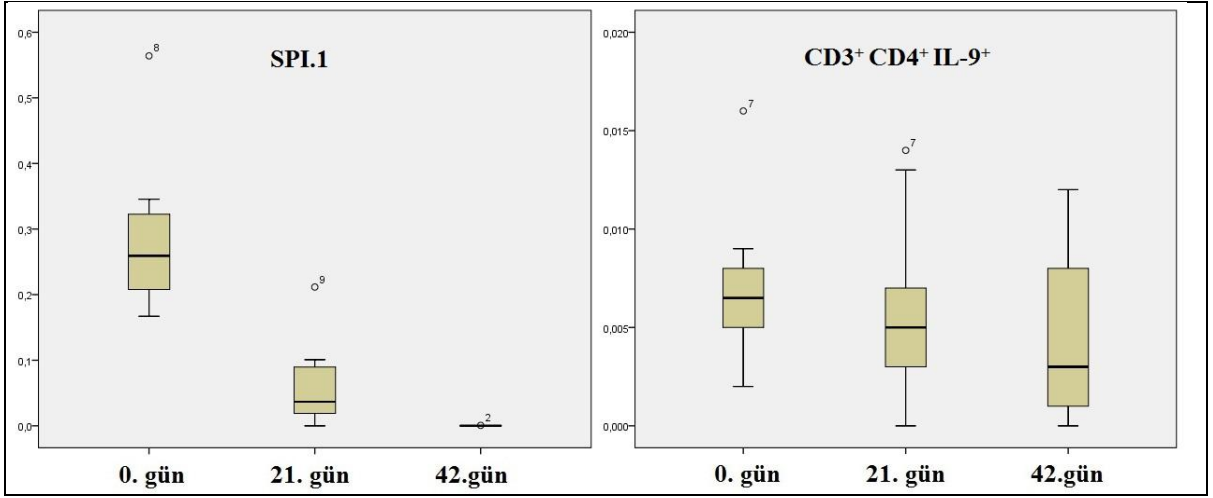
Ek-6: Depolanma sürecinde IFN- γ ve TNF- α ekspresye eden Th hücreleri



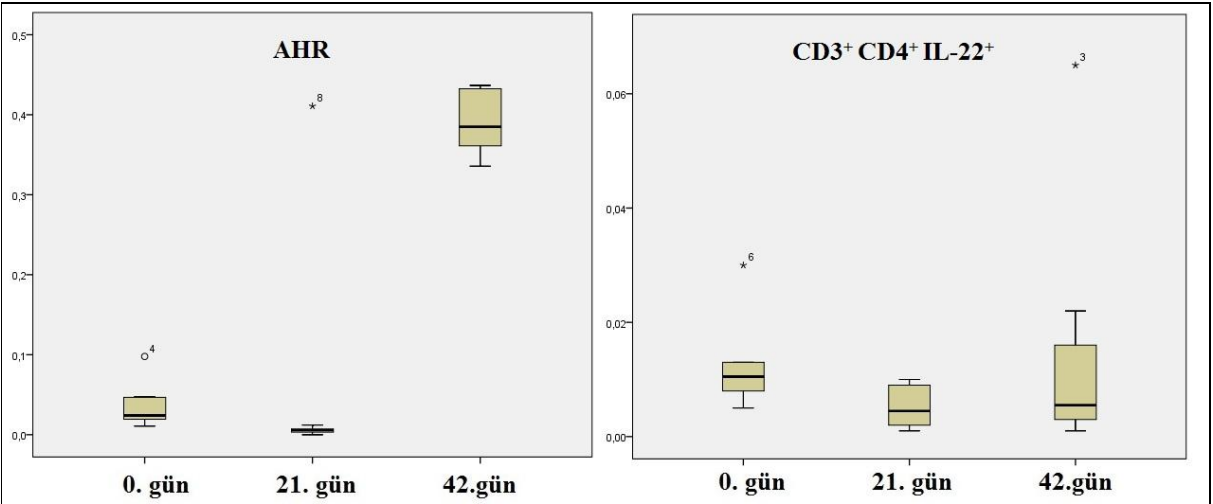
Ek-7: Depolanma sürecinde GATA3 ekspresyon düzeyleri ve IL-13 eksprese eden Th hücreler



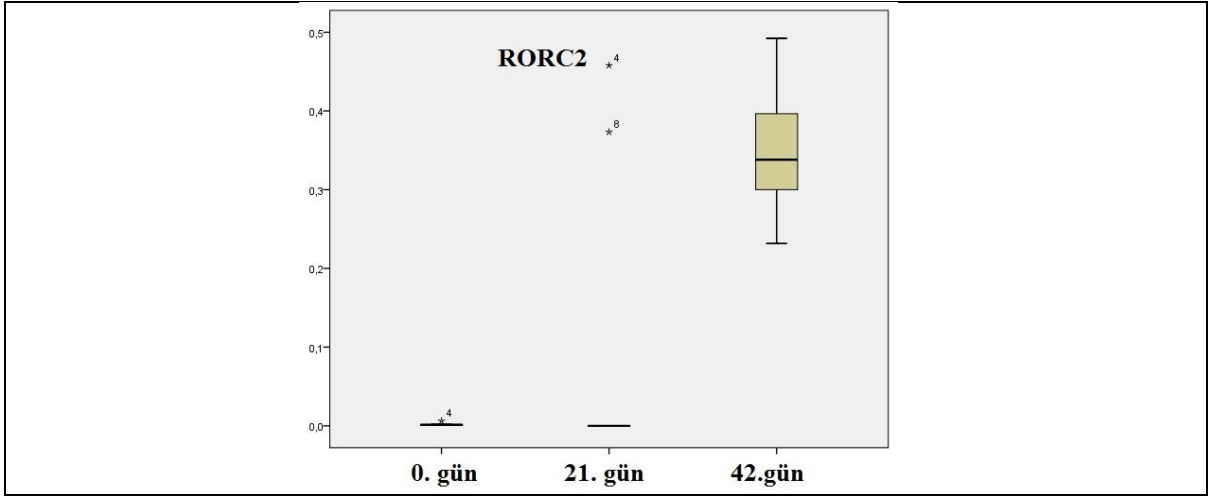
Ek-8: Depolanma sürecinde IL-4 ve IL-5 eksprese eden Th hücreler



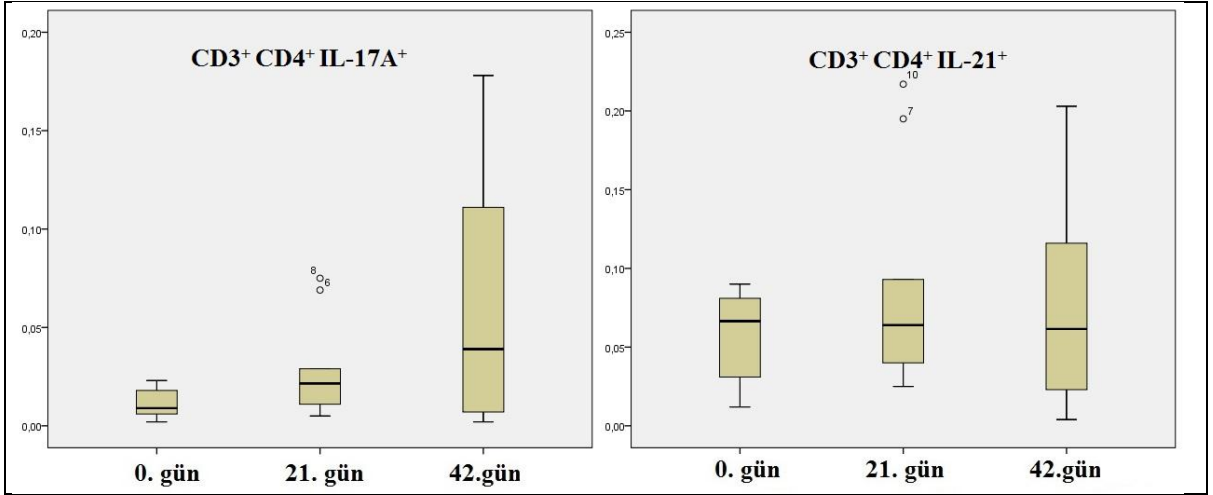
Ek-9: Depolanma sürecinde SPL.1 ekspresyon düzeyleri ve hücre içi IL-9 eksprese eden Th hücreler



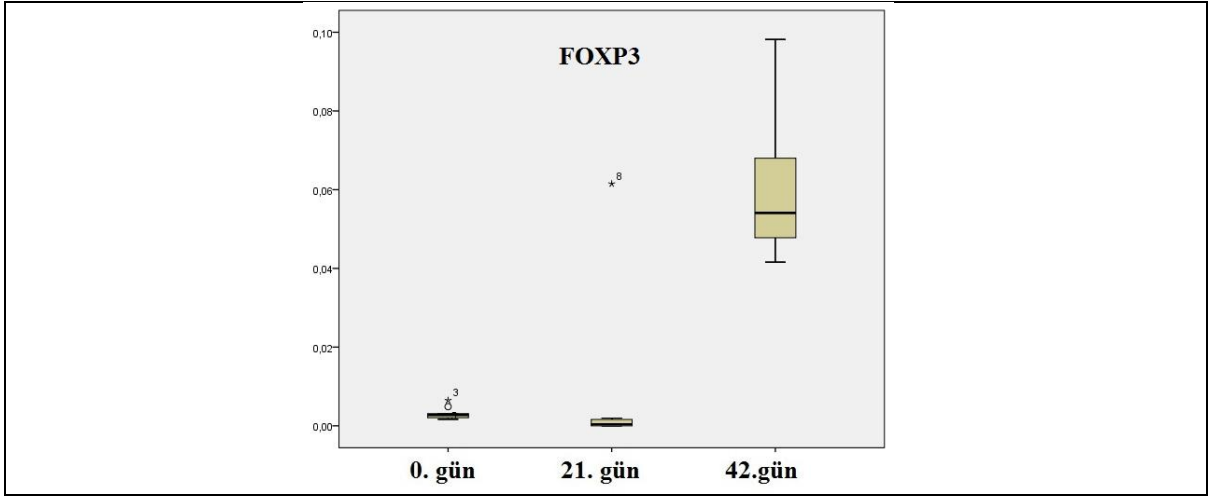
Ek-10: Depolanma sürecinde AHR ekspresyon düzeyleri ve IL-22 eksprese eden Th hücreler



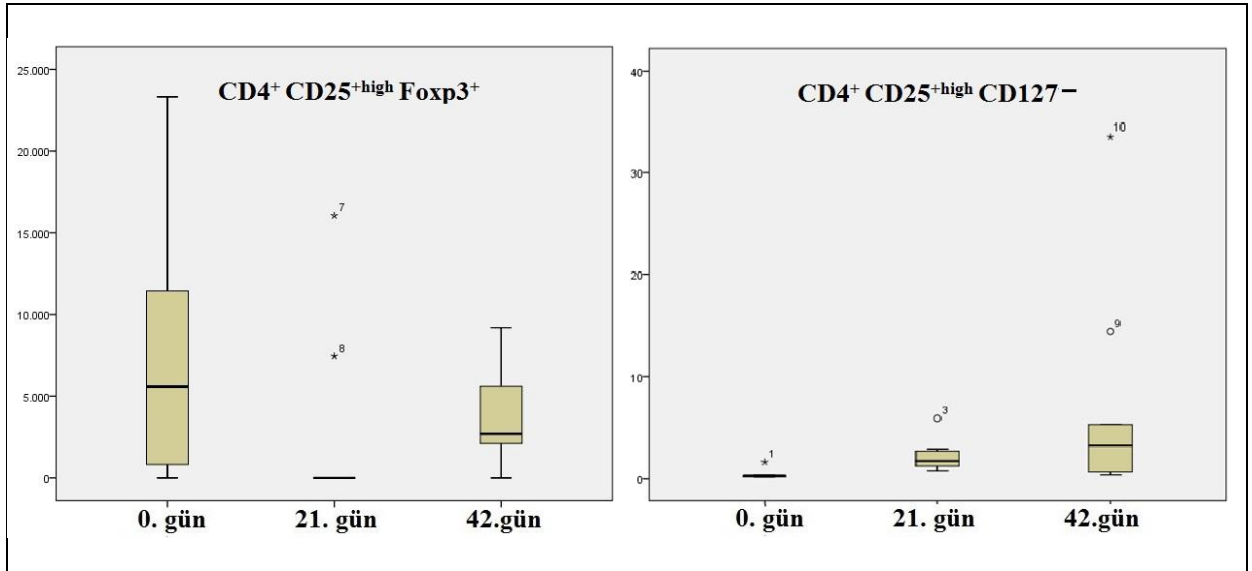
Ek-11: Depolanma sürecinde RORC2 ekspresyon düzeyleri



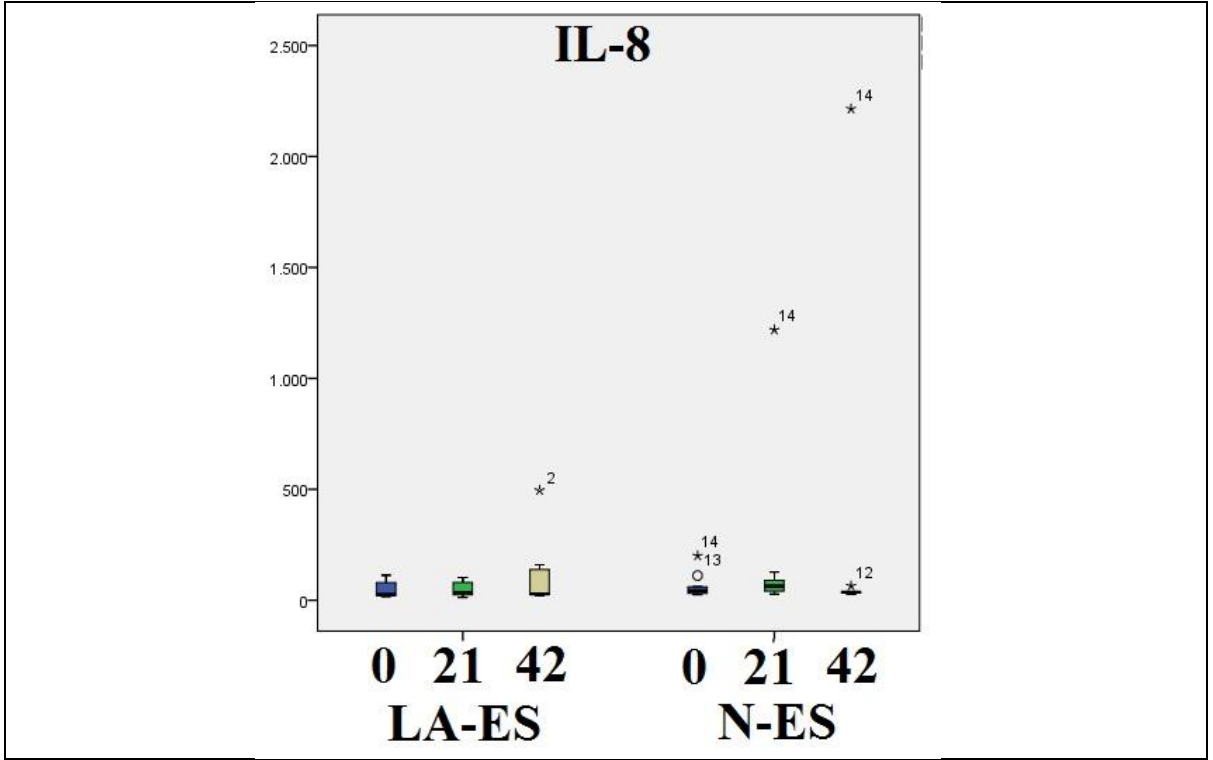
Ek-12: Depolanma sürecinde IL-17A ve IL-21 eksprese eden Th hücreler



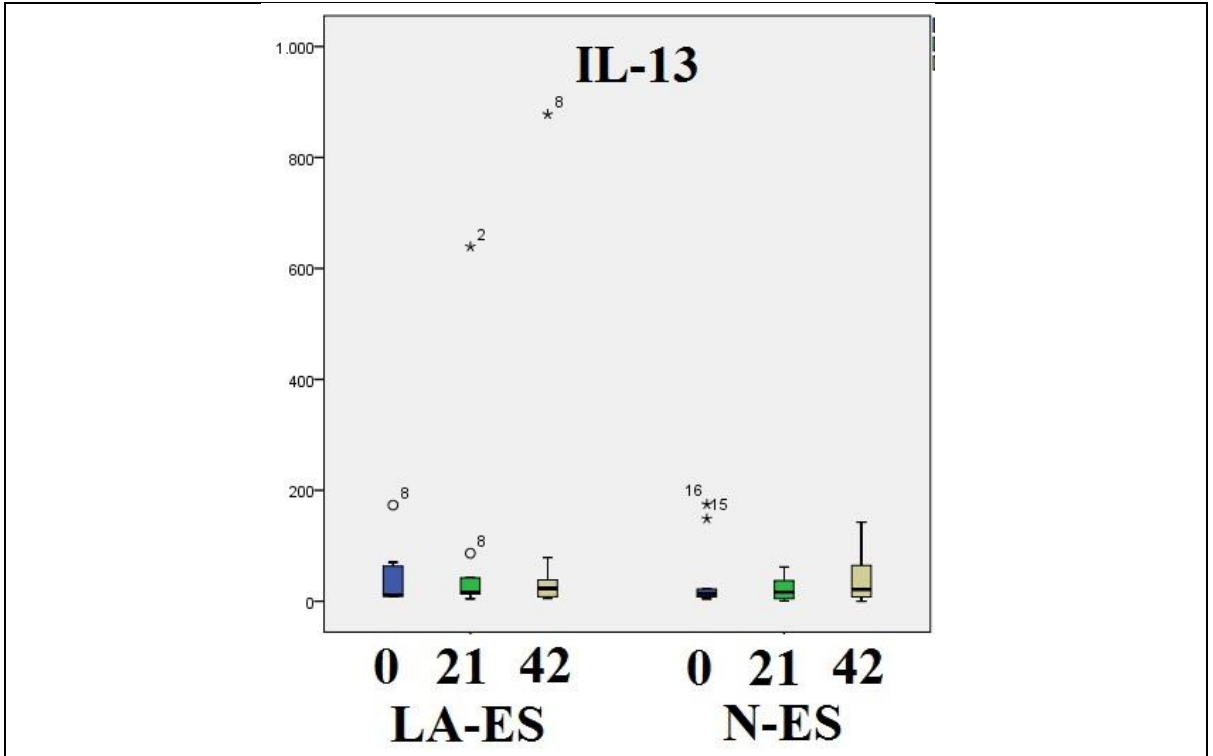
Ek -13: Depolanma sürecinde FOXP3 ekspresyon düzeyleri



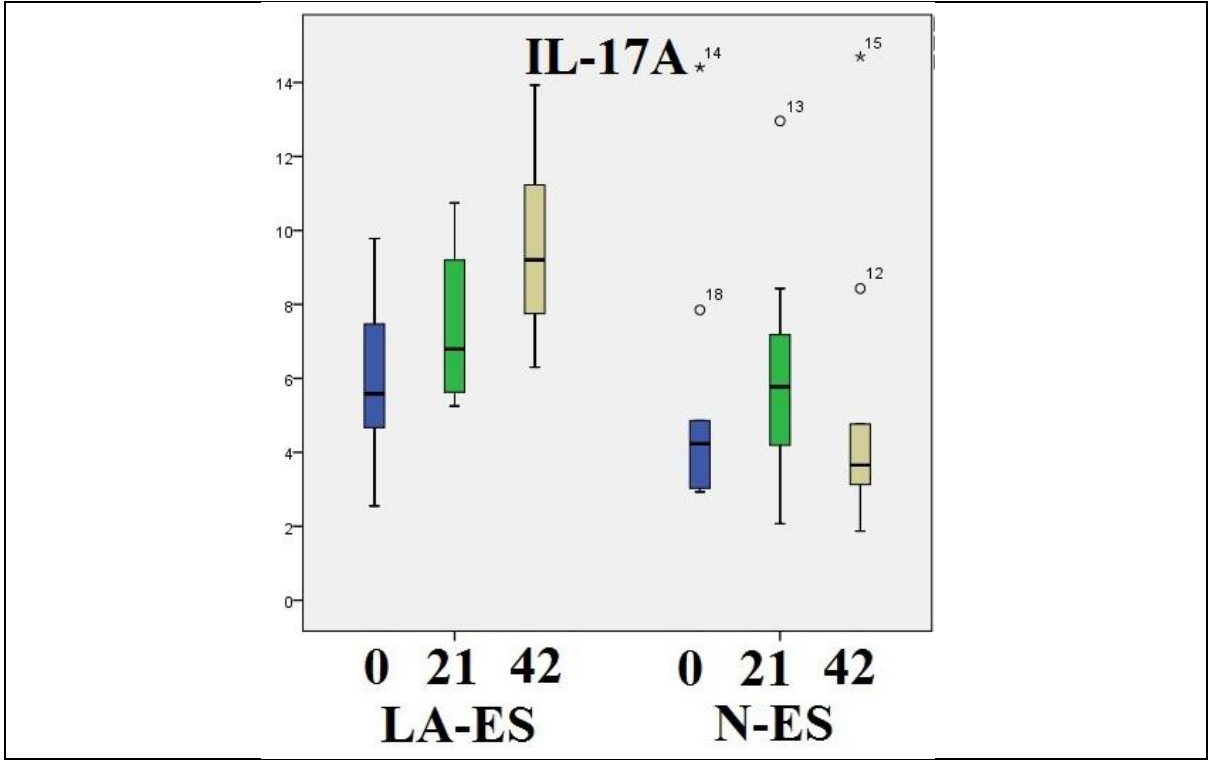
Ek-14: Depolanma sürecinde Foxp3 ve CD127 eksprese eden Th hücreler



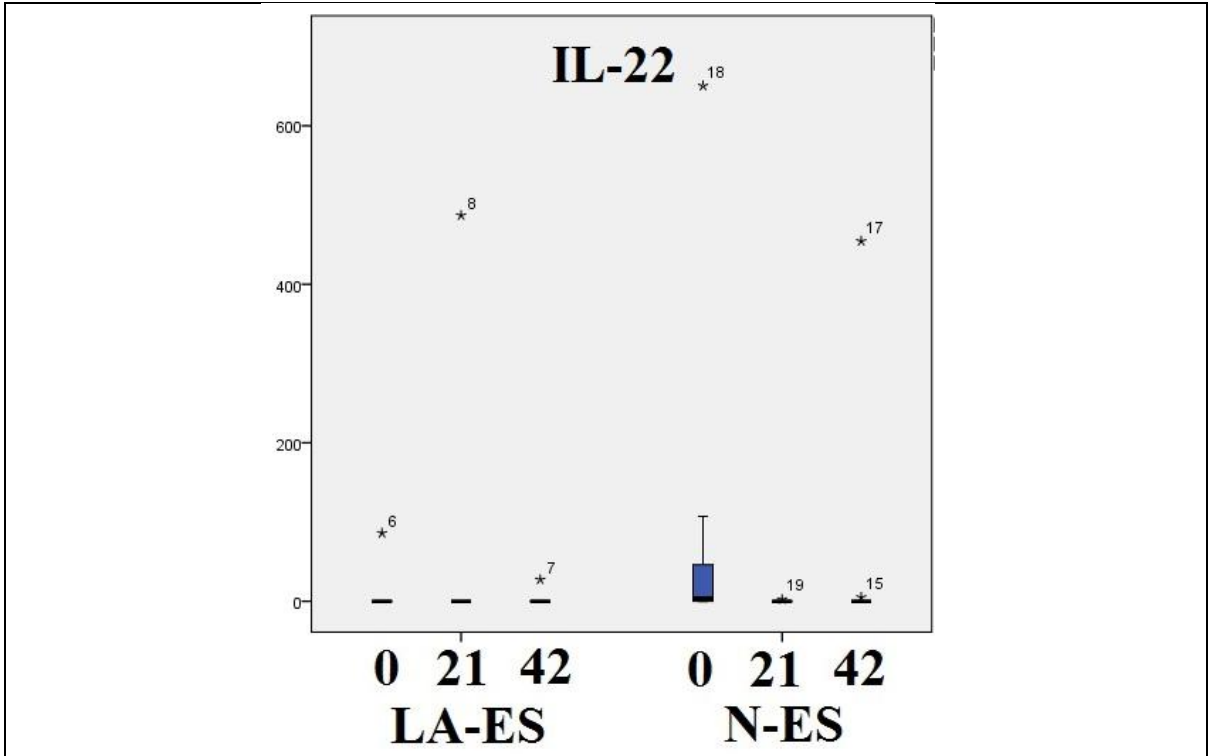
Ek-15: Depolanma sürecinde LA ve N-ES'lerde IL-8 ekspresyon düzeyleri



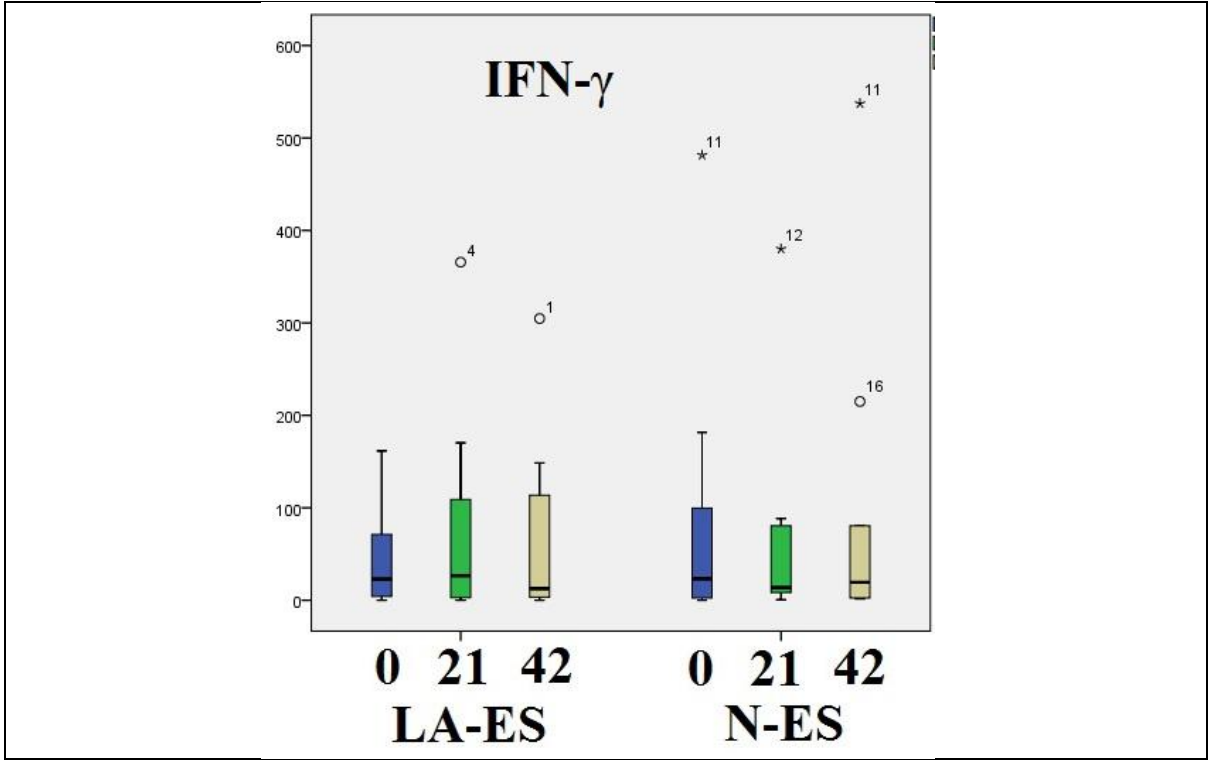
Ek-16: Depolanma sürecinde LA ve N-ES'lerde IL-13 ekspresyon düzeyleri



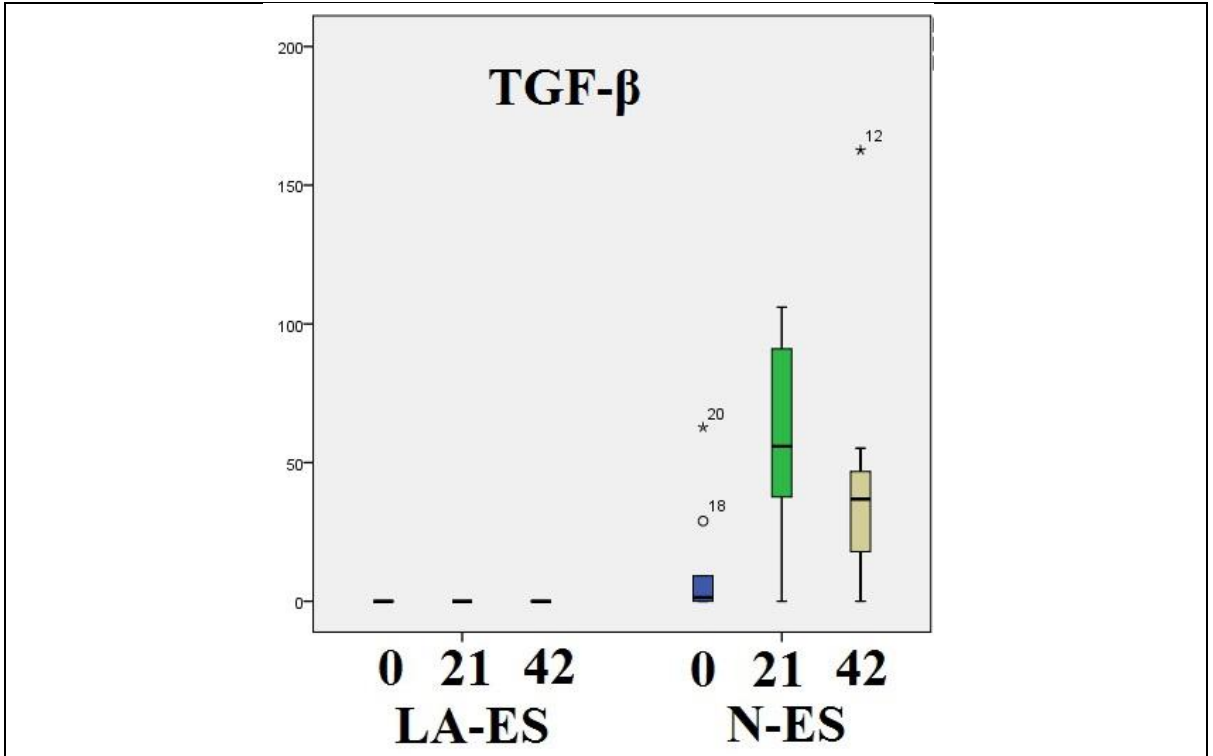
Ek-17: Depolanma sürecinde LA ve N-ES'lerde IL-17A ekspresyon düzeyleri



Ek-18: Depolanma sürecinde LA ve N-ES'lerde IL-22 ekspresyon düzeyleri



Ek-19: Depolanma sürecinde LA ve N-ES'lerde IFN- γ ekspresyon düzeyleri



Ek-20: Depolanma sürecinde LA ve N-ES'lerde TGF- β ekspresyon düzeyleri

7. KAYNAKLAR

1. VAMVAKAS EC, BLAJCHMAN MA. Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update. *Blood Reviews*, 21: 327-48, 2007.
2. BILGIN YM, BRAND A. Transfusion-related immunomodulation: a second hit in an inflammatory cascade? *Vox Sanguinis*, 95: 261-71, 2008.
3. OPELZ G, SENGAR DP, MICKEY MR, TERASAKI PI. Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplantation Proceedings*, 5: 253-9, 1973.
4. GANTT CL. Red blood cells for cancer patients. *Lancet*, 2: 363, 1981.
5. AMATO A, PESCATORI M. Perioperative blood transfusions for the recurrence of colorectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*: CD005033, 2006.
6. BLUMBERG N, HEAL JM. Effects of transfusion on immune function. Cancer recurrence and infection. *Arch Pathol Lab Med*, 118: 371-9, 1994.
7. HEISS MM, MEMPEL W, DELANOFF C, JAUCH KW, GABKA C, MEMPEL M, DIETERICH HJ, EISSNER HJ, SCHILDBERG FW. Blood transfusion-modulated tumor recurrence: first results of a randomized study of autologous versus allogeneic blood transfusion in colorectal cancer surgery. *Journal of Clinical Oncology*, 12: 1859-67, 1994.
8. MOWBRAY JF, GIBBINGS C, LIDDELL H, REGINALD PW, UNDERWOOD JL, BEARD RW. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet*, 1: 941-3, 1985.
9. PETERS WR, FRY RD, FLESHMAN JW, KODNER IJ. Multiple blood transfusions reduce the recurrence rate of Crohn's disease. *Diseases of the Colon & Rectum*, 32: 749-53, 1989.
10. BLUMBERG N, HEAL JM. Effects of transfusion on immune function. Cancer recurrence and infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 118: 371-9, 1994.
11. CHANG H, HALL GA, GEERTS WH, GREENWOOD C, MCLEOD RS, SHER GD. Allogeneic red blood cell transfusion is an independent risk factor for the development of postoperative bacterial infection. *Vox Sanguinis*, 78: 13-8, 2000.
12. HOUBIERS JG, VAN DE VELDE CJ, VAN DE WATERING LM, HERMANS J, SCHREUDER S, BIJNEN AB, PAHLPLATZ P, SCHATTENKERK ME, WOBES T, DE VRIES JE, KLEMENTSCHITSCH P, VAN DE MAAS AH, BRAND A. Transfusion of red cells is associated with increased incidence of bacterial infection after colorectal surgery: a prospective study. *Transfusion*, 37: 126-34, 1997.
13. SLOAND E, KUMAR P, KLEIN HG, MERRITT S, SACHER R. Transfusion of blood components to persons infected with human immunodeficiency virus type 1: relationship to opportunistic infection. *Transfusion*, 34: 48-53, 1994.
14. VAN DE WATERING LM, HERMANS J, HOUBIERS JG, VAN DEN BROEK PJ, BOUTER H, BOER F, HARVEY MS, HUYSMANS HA, BRAND A. Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Circulation*, 97: 562-8, 1998.
15. VAMVAKAS EC, BLAJCHMAN MA. Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction? *Blood*, 97: 1180-95, 2001.
16. BORDIN JO, HEDDLE NM, BLAJCHMAN MA. Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood*, 84: 1703-21, 1994.

17. CLARK DA, GORCZYNSKI RM, BLAJCHMAN MA. Transfusion-related immunomodulation due to peripheral blood dendritic cells expressing the CD200 tolerance signaling molecule and alloantigen. *Transfusion*, 48: 814-21, 2008.
18. BEKO KR, 2ND, TRAN HO, HEWITT CW, BLACK KS, PATEL MP, RAMSAMOOJ R, MARTIN DC. Mechanisms of prior blood transfusion-cyclosporine-induced tolerance: a potential role for immune-cellular chimerism. *Transplantation Proceedings*, 23: 147-8, 1991.
19. DZIK WH. Mononuclear cell microchimerism and the immunomodulatory effect of transfusion. *Transfusion*, 34: 1007-12, 1994.
20. NIELSEN HJ, REIMERT CM, PEDERSEN AN, BRUNNER N, EDVARDBSEN L, DYBKJAER E, KEHLET H, SKOV PS. Time-dependent, spontaneous release of white cell- and platelet-derived bioactive substances from stored human blood. *Transfusion*, 36: 960-5, 1996.
21. GHIO M, OTTONELLO L, CONTINI P, AMELOTTI M, MAZZEI C, INDIVERI F, PUPPO F, DALLEGRI F. Transforming growth factor-beta1 in supernatants from stored red blood cells inhibits neutrophil locomotion. *Blood*, 102: 1100-7, 2003.
22. HODGE G, MARKUS C, NAIRN J, HODGE S. Effect of blood storage conditions on leucocyte intracellular cytokine production. *Cytokine*, 32: 7-11, 2005.
23. KRISTIANSOON M, SOOP M, SHANWELL A, SUNDQVIST KG. Prestorage versus bedside white blood cell filtration of red blood cell concentrates: effects on the content of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptors. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 40: 379-83, 1996.
24. GHIO M, CONTINI P, NEGRINI S, MAZZEI C, ZOCCHI MR, POGGI A. Down regulation of human natural killer cell-mediated cytotoxicity induced by blood transfusion: role of transforming growth factor-beta(1), soluble Fas ligand, and soluble Class I human leukocyte antigen. *Transfusion*, 51: 1567-73, 2011.
25. SILLIMAN CC, VOELKEL NF, ALLARD JD, ELZI DJ, TUDER RM, JOHNSON JL, AMBRUSO DR. Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 1458-67, 1998.
26. SILLIMAN CC, MOORE EE, KELHER MR, KHAN SY, GELLAR L, ELZI DJ. Identification of lipids that accumulate during the routine storage of prestorage leukoreduced red blood cells and cause acute lung injury. *Transfusion*, 51: 2549-54, 2011.
27. BAUMGARTNER JM, SILLIMAN CC, MOORE EE, BANERJEE A, MCCARTER MD. Stored red blood cell transfusion induces regulatory T cells. *Journal of the American College of Surgeons*, 208: 110-9, 2009.
28. GRIMSHAW K, SAHLER J, SPINELLI SL, PHIPPS RP, BLUMBERG N. New frontiers in transfusion biology: identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells. *Transfusion*, 51: 874-80, 2011.
29. MYNSTER T, DYBKJOER E, KRONBORG G, NIELSEN HJ. Immunomodulating effect of blood transfusion: is storage time important? *Vox Sanguinis*, 74: 176-81, 1998.
30. ADAMSON JW. New blood, old blood, or no blood? *The New England Journal of Medicine*, 358: 1295-6, 2008.
31. PUPPO F, CONTINI P, GHIO M, BRENCI S, SCUDELETTI M, FILACI G, FERRONE S, INDIVERI F. Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes. *International Immunology*, 12: 195-203, 2000.

32. MAGEE CC, SAYEGH MH. Peptide-mediated immunosuppression. *Current Opinion in Immunology*, 9: 669-75, 1997.
33. BLAJCHMAN MA, BORDIN JO. Mechanisms of transfusion-associated immunosuppression. *Current Opinion in Hematology*, 1: 457-61, 1994.
34. BRUNSON ME, ALEXANDER JW. Mechanisms of transfusion-induced immunosuppression. *Transfusion*, 30: 651-8, 1990.
35. JENSEN LS, ANDERSEN AJ, CHRISTIANSEN PM, HOKLAND P, JUHL CO, MADSEN G, MORTENSEN J, MOLLER-NIELSEN C, HANBERG-SORENSEN F, HOKLAND M. Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery. *British Journal of Surgery*, 79: 513-6, 1992.
36. KAPLAN J, SARNAIK S, GITLIN J, LUSHER J. Diminished helper/suppressor lymphocyte ratios and natural killer activity in recipients of repeated blood transfusions. *Blood*, 64: 308-10, 1984.
37. NIELSEN HJ, HAMMER JH, MOESGAARD F, KEHLET H. Comparison of the effects of SAG-M and whole-blood transfusions on postoperative suppression of delayed hypersensitivity. *Canadian Journal of Surgery*, 34: 146-50, 1991.
38. WOOD ML, GOTTSCHALK R, MONACO AP. Effect of blood transfusion on IL-2 production. *Transplantation*, 45: 930-5, 1988.
39. WAYMACK JP, GALLON L, BARCELLI U, ALEXANDER JW. Effect of blood transfusions on macrophage function in a burned animal model. *Current Surgery*, 43: 305-7, 1986.
40. BLAJCHMAN MA, BARDOSSY L, CARMEN R, SASTRY A, SINGAL DP. Allogeneic blood transfusion-induced enhancement of tumor growth: two animal models showing amelioration by leukodepletion and passive transfer using spleen cells. *Blood*, 81: 1880-2, 1993.
41. GHIO M, CONTINI P, MAZZEI C, BRENCI S, BARBERIS G, FILACI G, INDIVERI F, PUPPO F. Soluble HLA class I, HLA class II, and Fas ligand in blood components: a possible key to explain the immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions. *Blood*, 93: 1770-7, 1999.
42. KIRKLEY SA. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6: 652-7, 1999.
43. TERASAKI PI. The beneficial transfusion effect on kidney graft survival attributed to clonal deletion. *Transplantation*, 37: 119-25, 1984.
44. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI, S. *Cellular and molecular immunology*, 6. baski, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
45. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI, S. *Cellular and molecular immunology*, 6. baski, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
46. NAJI A. Induction of tolerance by intrathymic inoculation of alloantigen. *Current Opinion in Immunology*, 8: 704-9, 1996.
47. PUPPO F, GHIO M, CONTINI P, MAZZEI C, INDIVERI F. Fas, Fas ligand, and transfusion immunomodulation. *Transfusion*, 41: 416-8, 2001.
48. ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-8, 1998.
49. SINGAL DP, LEBER B, HARNISH DG, FRAME B, JOSEPH S, BLAJCHMAN MA. Molecular genetic basis for the antiidiotypic antibody response associated with successful renal allograft survival in humans. *Transplantation Proceedings*, 23: 1059-61, 1991.
50. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI, S. *Cellular and molecular immunology*, 6. baski, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.

51. MINCHEFF MS, MERYMAN HT, KAPOOR V, ALSOP P, WOTZEL M. Blood transfusion and immunomodulation: a possible mechanism. *Vox Sanguinis*, 65: 18-24, 1993.
52. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI, S. Cellular and molecular immunology, 6. bask1, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
53. GAFTER U, KALECHMAN Y, SREDNI B. Blood transfusion enhances production of T-helper-2 cytokines and transforming growth factor beta in humans. *Clinical Science (London)*, 91: 519-23, 1996.
54. HU A, LI Q, SHI H, TAI Q, WU L, XIONG J, FU B, HE X. Donor-derived bone marrow transfusion produces mixed chimerism and promotes a Th2 shift in Th1/Th2 balance in rat heterotopic small bowel transplantation. *Digestive and Liver Disease*, 44: 988-94, 2012.
55. BABCOCK GF, ALEXANDER JW. The effects of blood transfusion on cytokine production by TH1 and TH2 lymphocytes in the mouse. *Transplantation*, 61: 465-8, 1996.
56. GUO JR, XU F, JIN XJ, SHEN HC, LIU Y, ZHANG YW, SHAO Y. Impact of allogenic and autologous transfusion on immune function in patients with tumors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15: 467-74, 2014.
57. ZHU X, YU B, YOU P, WU Y, FANG Y, YANG L, XIA R. Ubiquitin released in the plasma of whole blood during storage promotes mRNA expression of Th2 cytokines and Th2-inducing transcription factors. *Transfusion and Apheresis Science*, 47: 305-11, 2012.
58. PANDEY P, CHAUDHARY R, AGGARWAL A, KUMAR R, KHETAN D, VERMA A. Transfusion-associated immunomodulation: Quantitative changes in cytokines as a measure of immune responsiveness after one time blood transfusion in neurosurgery patients. *Asian Journal of Transfusion Science*, 4: 78-85, 2010.
59. LANNAN KL, SAHLER J, SPINELLI SL, PHIPPS RP, BLUMBERG N. Transfusion immunomodulation--the case for leukoreduced and (perhaps) washed transfusions. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 50: 61-8, 2013.
60. BLUMBERG N, HEAL JM. The transfusion immunomodulation theory: the Th1/Th2 paradigm and an analogy with pregnancy as a unifying mechanism. *Seminars in Hematology*, 33: 329-40, 1996.
61. PEREZ RV, SWANSON C, MORGAN M, ERICKSON K, HUBBARD NE, GERMAN JB. Portal venous transfusion up-regulates Kupffer cell cyclooxygenase activity: a mechanism of immunosuppression in organ transplantation. *Transplantation*, 64: 135-9, 1997.
62. BETZ M, FOX BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *The Journal of Immunology*, 146: 108-13, 1991.
63. DZIK WH. Apoptosis, TGF beta and transfusion-related immunosuppression: Biologic versus clinical effects. *Transfusion and Apheresis Science*, 29: 127-9, 2003.
64. CHENG J, ZHOU L, QIN YS, WANG Y, XIE HY, FENG XW, ZHENG SS. Donor apoptotic lymphocyte transfusion-induced liver allograft tolerance by up-regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in peripheral blood. *Transplantation Proceedings*, 41: 3893-7, 2009.
65. FENG JF, CHEN F, LIU H, LIU J. Induction of immune tolerance by pre-infusion of apoptotic lymphocytes derived from peripheral blood of donor rats before liver transplantation. *Minerva Chirurgica*, 68: 183-9, 2013.
66. ATZIL S, ARAD M, GLASNER A, ABIRI N, AVRAHAM R, GREENFELD K, ROSENNE E, BEILIN B, BEN-ELIYAHU S. Blood transfusion promotes cancer progression: a critical role for aged erythrocytes. *Anesthesiology*, 109: 989-97, 2008.

67. HOD EA, ZHANG N, SOKOL SA, WOJCZYK BS, FRANCIS RO, ANSALDI D, FRANCIS KP, DELLA-LATTA P, WHITTIER S, SHETH S, HENDRICKSON JE, ZIMRING JC, BRITTENHAM GM, SPITALNIK SL. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood*, 115: 4284-92, 2010.
68. CAIRO G, PIETRANGELO A. Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochemical Journal*, 352 Pt 2: 241-50, 2000.
69. CHAUVEAU C, REMY S, ROYER PJ, HILL M, TANGUY-ROYER S, HUBERT FX, TESSON L, BRION R, BERIOU G, GREGOIRE M, JOSIEN R, CUTURI MC, ANEGON I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*, 106: 1694-702, 2005.
70. BRUSKO TM, WASSERFALL CH, AGARWAL A, KAPTURCZAK MH, ATKINSON MA. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 174: 5181-6, 2005.
71. SAKAGUCHI S, MIYARA M, COSTANTINO CM, HAFLER DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10: 490-500, 2010.
72. YAZDANBAKHS K, BAO W, ZHONG H. Immunoregulatory effects of stored red blood cells. *American Society of Hematology Education Program*, 2011: 466-9, 2011.
73. HENDRICKSON JE, HOD EA, HUDSON KE, SPITALNIK SL, ZIMRING JC. Transfusion of fresh murine red blood cells reverses adverse effects of older stored red blood cells. *Transfusion*, 51: 2695-702, 2011.
74. HENDRICKSON JE, HOD EA, SPITALNIK SL, HILLYER CD, ZIMRING JC. Storage of murine red blood cells enhances alloantibody responses to an erythroid-specific model antigen. *Transfusion*, 50: 642-8, 2010.
75. KOCH CG, LI L, SESSLER DI, FIGUEROA P, HOELTGE GA, MIHALJEVIC T, BLACKSTONE EH. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *The New England Journal of Medicine*, 358: 1229-39, 2008.
76. OFFNER PJ, MOORE EE, BIFFL WL, JOHNSON JL, SILLIMAN CC. Increased rate of infection associated with transfusion of old blood after severe injury. *Archives of Surgery*, 137: 711-6; discussion 716-7, 2002.
77. ZALLEN G, OFFNER PJ, MOORE EE, BLACKWELL J, CIESLA DJ, GABRIEL J, DENNY C, SILLIMAN CC. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *The American Journal of Surgery*, 178: 570-2, 1999.
78. PURDY FR, TWEEDDALE MG, MERRICK PM. Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients. *Canadian Journal of Anesthesia*, 44: 1256-61, 1997.
79. BILGIN YM, VAN DE WATERING LM, EIJSMA L, VERSTEEGH MI, BRAND R, VAN OERS MH, BRAND A. Double-blind, randomized controlled trial on the effect of leukocyte-depleted erythrocyte transfusions in cardiac valve surgery. *Circulation*, 109: 2755-60, 2004.
80. LION N, CRETTEZ D, RUBIN O, TISSOT JD. Stored red blood cells: a changing universe waiting for its map(s). *Journal of Proteomics*, 73: 374-85, 2010.
81. SADALLAH S, EKEN C, SCHIFFERLI JA. Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties. *Journal of Leukocyte Biology*, 84: 1316-25, 2008.

82. KRIEBARDIS A, ANTONELLOU M, STAMOULIS K, PAPASSIDERI I. Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent-bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfusion*, 10 Suppl 2: s25-38, 2012.
83. TAYLOR DD, GERCEL-TAYLOR C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Seminars in Immunopathology*, 33: 441-54, 2011.
84. SKANBERG J, LUNDHOLM K, HAGLIND E. Effects of blood transfusion with leucocyte depletion on length of hospital stay, respiratory assistance and survival after curative surgery for colorectal cancer. *Acta Oncologica*, 46: 1123-30, 2007.
85. VAN DE WATERING LM, BRAND A, HOUBIERS JG, KLEIN KRANENBARG WM, HERMANS J, VAN DE VELDE C. Perioperative blood transfusions, with or without allogeneic leucocytes, relate to survival, not to cancer recurrence. *British Journal of Surgery*, 88: 267-72, 2001.
86. LANGE MM, VAN HILTEN JA, VAN DE WATERING LM, BIJNEN BA, ROUMEN RM, PUTTER H, BRAND A, VAN DE VELDE CJ. Leucocyte depletion of perioperative blood transfusion does not affect long-term survival and recurrence in patients with gastrointestinal cancer. *British Journal of Surgery*, 96: 734-40, 2009.
87. CATA JP, WANG H, GOTTUMUKKALA V, REUBEN J, SESSLER DI. Inflammatory response, immunosuppression, and cancer recurrence after perioperative blood transfusions. *British Journal of Anaesthesia*, 110: 690-701, 2013.
88. VAMVAKAS EC. White-blood-cell-containing allogeneic blood transfusion and postoperative infection or mortality: an updated meta-analysis. *Vox Sanguinis*, 92: 224-32, 2007.
89. NATHENS AB, NESTER TA, RUBENFELD GD, NIRULA R, GERNESHEIMER TB. The effects of leukoreduced blood transfusion on infection risk following injury: a randomized controlled trial. *Shock*, 26: 342-7, 2006.
90. BLUMBERG N, ZHAO H, WANG H, MESSING S, HEAL JM, LYMAN GH. The intention-to-treat principle in clinical trials and meta-analyses of leukoreduced blood transfusions in surgical patients. *Transfusion*, 47: 573-81, 2007.
91. VAMVAKAS EC. White-blood-cell-containing allogeneic blood transfusion and postoperative infection or mortality: an updated meta-analysis. *Vox Sang*, 92: 224-32, 2007.
92. WALLIS JP, CHAPMAN CE, ORR KE, CLARK SC, FORTY JR. Effect of WBC reduction of transfused RBCs on postoperative infection rates in cardiac surgery. *Transfusion*, 42: 1127-34, 2002.
93. VAN HILTEN JA, VAN DE WATERING LM, VAN BOCKEL JH, VAN DE VELDE CJ, KIEVIT J, BRAND R, VAN DEN HOUT WB, GEELKERKEN RH, ROUMEN RM, WESSELINK RM, KOOPMAN-VAN GEMERT AW, KONING J, BRAND A. Effects of transfusion with red cells filtered to remove leucocytes: randomised controlled trial in patients undergoing major surgery. *British Medical Journal*, 328: 1281, 2004.
94. OPELZ G, VANRENTERGHEM Y, KIRSTE G, GRAY DW, HORSBURGH T, LACHANCE JG, LARGIADER F, LANGE H, VUJAKLIJA-STIPANOVIC K, ALVAREZ-GRANDE J, SCHOTT W, HOYER J, SCHNUELLE P, DESCOEUDRES C, RUDER H, WUJCIAK T, SCHWARZ V. Prospective evaluation of pretransplant blood transfusions in cadaver kidney recipients. *Transplantation*, 63: 964-7, 1997.
95. HIESSE C, BUSSON M, BUISSON C, FARAHMAND H, BIERLING P, BENBUNAN M, BEDROSSIAN J, AUBERT P, GLOTZ D, LOIRAT C, RONDEAU E, VIRON B, BLEUX H, LANG P. Multicenter trial of one HLA-DR-matched or mismatched

- blood transfusion prior to cadaveric renal transplantation. *Kidney International*, 60: 341-9, 2001.
96. COLLIER AC, KALISH LA, BUSCH MP, GERNESHEIMER T, ASSMANN SF, LANE TA, ASMUTH DM, LEDERMAN MM, MURPHY EL, KUMAR P, KELLEY M, FLANIGAN TP, MCMAHON DK, SACKS HS, KENNEDY MS, HOLLAND PV. Leukocyte-reduced red blood cell transfusions in patients with anemia and human immunodeficiency virus infection: the Viral Activation Transfusion Study: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 285: 1592-601, 2001.
 97. MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136: 2348-57, 1986.
 98. WAN YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, 130: 166-71, 2010.
 99. ZHU J, YAMANE H, PAUL WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology*, 28: 445-89, 2010.
 100. LÜLEYAP HÜ. Moleküler genetiğin esasları, 6. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, Adana, 2008.
 101. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI, S. Cellular and molecular immunology, 6. baskı, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007.
 102. ROMAGNANI S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual review of immunology*, 12: 227-57, 1994.
 103. NOELLE RJ, NOWAK EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nature Reviews Immunology*, 10: 683-7, 2010.
 104. HIRAHARA K, POHOLEK A, VAHEDI G, LAURENCE A, KANNO Y, MILNER JD, O'SHEA JJ. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131: 1276-87, 2013.
 105. BRADLEY LM, DALTON DK, CROFT M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *The Journal of Immunology*, 157: 1350-8, 1996.
 106. YAMANE H, PAUL WE. Memory CD4+ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69: 1577-83, 2012.
 107. JAGER A, KUCHROO VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 72: 173-84, 2010.
 108. PULENDRAN B, ARTIS D. New paradigms in type 2 immunity. *Science*, 337: 431-5, 2012.
 109. PARRONCHI P, DE CARLI M, MANETTI R, SIMONELLI C, SAMPOGNARO S, PICCINNI MP, MACCHIA D, MAGGI E, DEL PRETE G, ROMAGNANI S. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *The Journal of Immunology*, 149: 2977-83, 1992.
 110. LIOTTA F, FROSALI F, QUERCI V, MANTEI A, FILI L, MAGGI L, MAZZINGHI B, ANGELI R, RONCONI E, SANTARLASCIO V, BIAGIOLI T, LASAGNI L, BALLERINI C, PARRONCHI P, SCHEFFOLD A, COSMI L, MAGGI E, ROMAGNANI S, ANNUNZIATO F. Human immature myeloid dendritic cells trigger a TH2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121: 1000-5 e8, 2008.
 111. YAMANE H, PAUL WE. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological Reviews*, 252: 12-23, 2013.

112. CONSTANT SL, BOTTOMLY K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annual review of immunology*, 15: 297-322, 1997.
113. YAMANE H, ZHU J, PAUL WE. Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *The Journal of Experimental Medicine*, 202: 793-804, 2005.
114. USUI T, PREISS JC, KANNO Y, YAO ZJ, BREM JH, O'SHEA JJ, STROBER W. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *The Journal of Experimental Medicine*, 203: 755-66, 2006.
115. ZHU J, COTE-SIERRA J, GUO L, PAUL WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, 19: 739-48, 2003.
116. ZHU J, YAMANE H, COTE-SIERRA J, GUO L, PAUL WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Research*, 16: 3-10, 2006.
117. ANNUNZIATO F, ROMAGNANI S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Research & Therapy*, 11: 257, 2009.
118. COSMI L, MAGGI L, SANTARLASCI V, LIOTTA F, ANNUNZIATO F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry part A*, 85: 36-42, 2014.
119. VELDHORN M, HOCKING RJ, ATKINS CJ, LOCKSLEY RM, STOCKINGER B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24: 179-89, 2006.
120. SCHMITT E, GERMAN T, GOEDERT S, HOEHN P, HUELS C, KOELSCH S, KUHN R, MULLER W, PALM N, RUDE E. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *The Journal of Immunology*, 153: 3989-96, 1994.
121. EYERICH S, EYERICH K, PENNINO D, CARBONE T, NASORRI F, PALLOTTA S, CIANFARANI F, ODORISIO T, TRIDL-HOFFMANN C, BEHRENDT H, DURHAM SR, SCHMIDT-WEBER CB, CAVANI A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, 119: 3573-85, 2009.
122. CHANG HC, SEHRA S, GOSWAMI R, YAO W, YU Q, STRITESKY GL, JABEEN R, MCKINLEY C, AHYI AN, HAN L, NGUYEN ET, ROBERTSON MJ, PERUMAL NB, TEPPER RS, NUTT SL, KAPLAN MH. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature Immunology*, 11: 527-34, 2010.
123. NOWAK EC, WEAVER CT, TURNER H, BEGUM-HAQUE S, BECHER B, SCHREINER B, COYLE AJ, KASPER LH, NOELLE RJ. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 206: 1653-60, 2009.
124. ELYAMAN W, BRADSHAW EM, UYTENHOVE C, DARDALHON V, AWASTHI A, IMITOLA J, BETTELLI E, OUKKA M, VAN SNICK J, RENAULD JC, KUCHROO VK, KHOURY SJ. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 12885-90, 2009.
125. SCHMIDT-WEBER CB, AKDIS M, AKDIS CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120: 247-54, 2007.
126. HARRINGTON LE, HATTON RD, MANGAN PR, TURNER H, MURPHY TL, MURPHY KM, WEAVER CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells

- develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6: 1123-32, 2005.
127. MANGAN PR, HARRINGTON LE, O'QUINN DB, HELMS WS, BULLARD DC, ELSON CO, HATTON RD, WAHL SM, SCHOEB TR, WEAVER CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441: 231-4, 2006.
 128. BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, KORN T, STROM TB, OUKKA M, WEINER HL, KUCHROO VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441: 235-8, 2006.
 129. SOROOSH P, DOHERTY TA. Th9 and allergic disease. *Immunology*, 127: 450-8, 2009.
 130. KORN T, BETTELLI E, GAO W, AWASTHI A, JAGER A, STROM TB, OUKKA M, KUCHROO VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 448: 484-7, 2007.
 131. CUA DJ, SHERLOCK J, CHEN Y, MURPHY CA, JOYCE B, SEYMOUR B, LUCIAN L, TO W, KWAN S, CHURAKOVA T, ZURAWSKI S, WIEKOWSKI M, LIRA SA, GORMAN D, KASTELEIN RA, SEDGWICK JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421: 744-8, 2003.
 132. MCGEACHY MJ, CHEN Y, TATO CM, LAURENCE A, JOYCE-SHAIKH B, BLUMENSCHEN WM, MCCLANAHAN TK, O'SHEA JJ, CUA DJ. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology*, 10: 314-24, 2009.
 133. PECK A, MELLINS ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*, 129: 147-53, 2010.
 134. YANG Y, XU J, NIU Y, BROMBERG JS, DING Y. T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17. *The Journal of Immunology*, 181: 8700-10, 2008.
 135. GUO S, COBB D, SMELTZ RB. T-bet inhibits the in vivo differentiation of parasite-specific CD4+ Th17 cells in a T cell-intrinsic manner. *The Journal of Immunology*, 182: 6179-86, 2009.
 136. TANAKA K, ICHIYAMA K, HASHIMOTO M, YOSHIDA H, TAKIMOTO T, TAKAESU G, TORISU T, HANADA T, YASUKAWA H, FUKUYAMA S, INOUE H, NAKANISHI Y, KOBAYASHI T, YOSHIMURA A. Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads. *The Journal of Immunology*, 180: 3746-56, 2008.
 137. NAKAE S, IWAKURA Y, SUTO H, GALLI SJ. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *Journal of Leukocyte Biology*, 81: 1258-68, 2007.
 138. YANG XP, GHORESCHI K, STEWARD-THARP SM, RODRIGUEZ-CANALES J, ZHU J, GRAINGER JR, HIRAHARA K, SUN HW, WEI L, VAHEDI G, KANNO Y, O'SHEA JJ, LAURENCE A. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature Immunology*, 12: 247-54, 2011.
 139. MOLINERO LL, MILLER ML, EVARISTO C, ALEGRE ML. High TCR stimuli prevent induced regulatory T cell differentiation in a NF-kappaB-dependent manner. *The Journal of Immunology*, 186: 4609-17, 2011.
 140. ZHOU L, LOPES JE, CHONG MM, IVANOV II, MIN R, VICTORA GD, SHEN Y, DU J, RUBTSOV YP, RUDENSKY AY, ZIEGLER SF, LITTMAN DR. TGF-beta-

- induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature*, 453: 236-40, 2008.
141. DUHEN T, GEIGER R, JARROSSAY D, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*, 10: 857-63, 2009.
 142. HONDA K. IL-22 from T cells: better late than never. *Immunity*, 37: 952-4, 2012.
 143. AUJLA SJ, CHAN YR, ZHENG M, FEI M, ASKEW DJ, POCIASK DA, REINHART TA, MCALLISTER F, EDEAL J, GAUS K, HUSAIN S, KREINDLER JL, DUBIN PJ, PILEWSKI JM, MYERBURG MM, MASON CA, IWAKURA Y, KOLLS JK. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Journal of Natural Medicines*, 14: 275-81, 2008.
 144. FRITZSCHING E, KUNZ P, MAURER B, POSCHL J, FRITZSCHING B. Regulatory T cells and tolerance induction. *Clinical Transplantation*, 23 Suppl 21: 10-4, 2009.
 145. JAGER A, KUCHROO VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol*, 72: 173-84, 2010.
 146. WING K, ONISHI Y, PRIETO-MARTIN P, YAMAGUCHI T, MIYARA M, FEHERVARI Z, NOMURA T, SAKAGUCHI S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322: 271-5, 2008.
 147. SURI-PAYER E, FRITZSCHING B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Seminars in Immunopathology*, 28: 3-16, 2006.
 148. SEDDIKI N, SANTNER-NANAN B, MARTINSON J, ZAUNDERS J, SASSON S, LANDAY A, SOLOMON M, SELBY W, ALEXANDER SI, NANAN R, KELLEHER A, FAZEKAS DE ST GROTH B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203: 1693-700, 2006.
 149. KANG SM, TANG Q, BLUESTONE JA. CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects. *American Journal of Transplantation*, 7: 1457-63, 2007.
 150. BANHAM AH. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends in Immunology*, 27: 541-4, 2006.
 151. LIU W, PUTNAM AL, XU-YU Z, SZOT GL, LEE MR, ZHU S, GOTTLIEB PA, KAPRANOV P, GINGERAS TR, FAZEKAS DE ST GROTH B, CLAYBERGER C, SOPER DM, ZIEGLER SF, BLUESTONE JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203: 1701-11, 2006.
 152. O'SHEA JJ, PAUL WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, 327: 1098-102, 2010.
 153. ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, MAGGI E, ROMAGNANI S. Type 17 T helper cells-origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 5: 325-31, 2009.
 154. ANNUNZIATO F, COSMI L, SANTARLASCI V, MAGGI L, LIOTTA F, MAZZINGHI B, PARENTE E, FILI L, FERRI S, FROSALI F, GIUDICI F, ROMAGNANI P, PARRONCHI P, TONELLI F, MAGGI E, ROMAGNANI S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204: 1849-61, 2007.
 155. COSMI L, MAGGI L, SANTARLASCI V, CAPONE M, CARDILICCHIA E, FROSALI F, QUERCI V, ANGELI R, MATUCCI A, FAMBRINI M, LIOTTA F, PARRONCHI P, MAGGI E, ROMAGNANI S, ANNUNZIATO F. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: 222-30 e1-4, 2010.

156. WANG YH, VOO KS, LIU B, CHEN CY, UYGUNGIL B, SPOEDE W, BERNSTEIN JA, HUSTON DP, LIU YJ. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, 207: 2479-91, 2010.
157. GAVIN MA, RASMUSSEN JP, FONTENOT JD, VASTA V, MANGANIELLO VC, BEAVO JA, RUDENSKY AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, 445: 771-5, 2007.
158. WAN YY, FLAVELL RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*, 445: 766-70, 2007.
159. YANG XO, NURIEVA R, MARTINEZ GJ, KANG HS, CHUNG Y, PAPPU BP, SHAH B, CHANG SH, SCHLUNS KS, WATOWICH SS, FENG XH, JETTEN AM, DONG C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 29: 44-56, 2008.
160. XU L, KITANI A, FUSS I, STROBER W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *The Journal of Immunology*, 178: 6725-9, 2007.
161. PROVOOST S, MAES T, VAN DURME YM, GEVAERT P, BACHERT C, SCHMIDT-WEBER CB, BRUSSELLE GG, JOOS GF, TOURNOY KG. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy*, 64: 1539-46, 2009.
162. WEI G, WEI L, ZHU J, ZANG C, HU-LI J, YAO Z, CUI K, KANNO Y, ROH TY, WATFORD WT, SCHONES DE, PENG W, SUN HW, PAUL WE, O'SHEA JJ, ZHAO K. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity*, 30: 155-67, 2009.
163. ZENG WP, CHANG C, LAI JJ. Immune suppressive activity and lack of T helper differentiation are differentially regulated in natural regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 183: 3583-90, 2009.
164. DARDALHON V, AWASTHI A, KWON H, GALILEOS G, GAO W, SOBEL RA, MITSDOERFFER M, STROM TB, ELYAMAN W, HO IC, KHOURY S, OUKKA M, KUCHROO VK. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology*, 9: 1347-55, 2008.
165. HODGE GL, HODGE SJ, NAIRN J, TIPPETT E, HOLMES M, REYNOLDS PN. Poststorage leuko-depleted plasma inhibits T-cell proliferation and Th1 response in vitro: characterization of TGFbeta-1 as an important immunomodulatory component in stored blood. *Transplantation*, 80: 95-101, 2005.
166. KARAM O, TUCCI M, TOLEDANO BJ, ROBITAILLE N, COUSINEAU J, THIBAUT L, LACROIX J, LE DEIST F. Length of storage and in vitro immunomodulation induced by prestorage leukoreduced red blood cells. *Transfusion*, 49: 2326-34, 2009.
167. SILLIMAN CC, CLAY KL, THURMAN GW, JOHNSON CA, AMBRUSO DR. Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 124: 684-94, 1994.
168. JACOBI KE, WANKE C, JACOBI A, WEISBACH V, HEMMERLING TM. Determination of eicosanoid and cytokine production in salvaged blood, stored red blood cell concentrates, and whole blood. *Journal of Clinical Anesthesia*, 12: 94-9, 2000.
169. WALKER EM, JR., WALKER SM. Effects of iron overload on the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30: 354-65, 2000.

170. SCHAIBLE UE, KAUFMANN SH. Iron and microbial infection. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 946-53, 2004.
171. THEURL I, FRITSCH G, LUDWICZEK S, GARIMORTH K, BELLMANN-WEILER R, WEISS G. The macrophage: a cellular factory at the interphase between iron and immunity for the control of infections. *Biometals*, 18: 359-67, 2005.
172. MULLIGAN JK, ROSENZWEIG SA, YOUNG MR. Tumor secretion of VEGF induces endothelial cells to suppress T cell functions through the production of PGE2. *Journal of Immunotherapy*, 33: 126-35, 2010.
173. BARATELLI F, LEE JM, HAZRA S, LIN Y, WALSER TC, SCHAUE D, PAK PS, ELASHOFF D, RECKAMP K, ZHANG L, FISHBEIN MC, SHARMA S, DUBINETT SM. PGE(2) contributes to TGF-beta induced T regulatory cell function in human non-small cell lung cancer. *American Journal of Translational Research*, 2: 356-67, 2010.
174. BAUMGARTNER JM, NYDAM TL, CLARKE JH, BANERJEE A, SILLIMAN CC, MCCARTER MD. Red blood cell supernatant potentiates LPS-induced proinflammatory cytokine response from peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29: 333-8, 2009.
175. CARAMALHO I, LOPES-CARVALHO T, OSTLER D, ZELENAY S, HAURY M, DEMENGEOT J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*, 197: 403-11, 2003.
176. STACK G, BARIL L, NAPYCHANK P, SNYDER EL. Cytokine generation in stored, white cell-reduced, and bacterially contaminated units of red cells. *Transfusion*, 35: 199-203, 1995.
177. WEISBACH V, WANKE C, ZINGSEM J, ZIMMERMANN R, ECKSTEIN R. Cytokine generation in whole blood, leukocyte-depleted and temporarily warmed red blood cell concentrates. *Vox Sanguinis*, 76: 100-6, 1999.
178. SHANWELL A, KRISTIANSSON M, REMBERGER M, RINGDEN O. Generation of cytokines in red cell concentrates during storage is prevented by prestorage white cell reduction. *Transfusion*, 37: 678-84, 1997.
179. PHELAN HA, EASTMAN AL, ALDY K, CARROLL EA, NAKONEZNY PA, JAN T, HOWARD JL, CHEN Y, FRIESE RS, MINEI JP. Prestorage leukoreduction abrogates the detrimental effect of aging on packed red cells transfused after trauma: a prospective cohort study. *The American Journal of Surgery*, 203: 198-204, 2012.
180. HEBERT PC, FERGUSSON D, BLAJCHMAN MA, WELLS GA, KMETIC A, COYLE D, HEDDLE N, GERMAIN M, GOLDMAN M, TOYE B, SCHWEITZER I, VANWALRAVEN C, DEVINE D, SHER GD. Clinical outcomes following institution of the Canadian universal leukoreduction program for red blood cell transfusions. *The Journal of the American Medical Association*, 289: 1941-9, 2003.
181. FRIESE RS, SPERRY JL, PHELAN HA, GENTILELLO LM. The use of leukoreduced red blood cell products is associated with fewer infectious complications in trauma patients. *The American Journal of Surgery*, 196: 56-61, 2008.
182. PHELAN HA, SPERRY JL, FRIESE RS. Leukoreduction before red blood cell transfusion has no impact on mortality in trauma patients. *Journal of Surgical Research*, 138: 32-6, 2007.
183. VAMVAKAS EC, BLAJCHMAN MA. Prestorage versus poststorage white cell reduction for the prevention of the deleterious immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusion. *Transfusion Medicine Reviews*, 14: 23-33, 2000.

184. VAMVAKAS EC. Meta-analysis of randomized controlled trials investigating the risk of postoperative infection in association with white blood cell-containing allogeneic blood transfusion: the effects of the type of transfused red blood cell product and surgical setting. *Transfusion Medicine Reviews*, 16: 304-14, 2002.
185. YILMAZ M, SALMAN F. Akan hücre ölçerin kullanım alanları. Editörler: ERTEN G, DEMİREL GY, DENİZ G. Akan hücre ölçer ve uygulama alanları, İstanbul, 7-11, 2009.
186. GAZİOĞLU S. Akan hücre ölçer çalışma prensipleri. Editörler: ERTEN G, DEMİREL GY, DENİZ G. Akan hücre ölçer ve uygulama alanları, İstanbul, 12-16, 2009.
187. DENİZ G. Floresan boyama teknikleri. Editörler: ERTEN G, DEMİREL GY, DENİZ G. Akan hücre ölçer ve uygulama alanları, İstanbul, 17-25, 2009.
188. MANTEL PY, KUIPERS H, BOYMAN O, RHYNER C, OUAKED N, RUCKERT B, KARAGIANNIDIS C, LAMBRECHT BN, HENDRIKS RW, CRAMERI R, AKDIS CA, BLASER K, SCHMIDT-WEBER CB. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLOS Biology*, 5: e329, 2007.
189. LAGAAIJ EL, RUIGROK MB, VAN ROOD JJ, HENDRIKS GF, VAN DER WOUDE F, WEIMAR W, VAN HOUWELINGEN HC, GOULMY E. Blood transfusion induced changes in cell-mediated lympholysis: to immunize or not to immunize. *The Journal of Immunology*, 147: 3348-52, 1991.
190. ROELEN DL, VAN ROOD JJ, BRAND A, CLAAS FH. Immunomodulation by blood transfusions. *Vox Sanguinis*, 78 Suppl 2: 273-5, 2000.

8. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılabilmesi için bana önemli katkılar sağlayan çok sayıda kişi oldu. Bu kişilerin bazıları çalışmam sırasında önemli destekler sağlarken, bazıları da akademik anlamda var oluşumun temellerini attılar. Hepsine teşekkürü borç bilirim. Ancak fırsat bulmuşken her birine ayrı ayrı teşekkür etmek bana mutluluk verecek.

Tüm yüksek lisans ve doktora süreçlerimin temel kurgulayıcısı olan değerli hocam Prof. Dr. Okan TÖRE'ye, tez danışmanım ve her türlü zorluk anında işleri kolaylaştıran hocam-abim Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL'a, her zaman yanımda olan, sevgisini ve desteğini eksiksiz hissettiğim hocam-ablam Doç. Dr. Yasemin HEPER'e, tıp fakültesi öğrencilik yıllarımdan beri büyük bir sevgi ve saygı duyduğum, kırılma noktalarımda desteğini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Güher GÖRAL'a, dostluğu ve laboratuvar çalışmalarındaki desteği için sevgili arkadaşım Doç. Dr. Ferah BUDAK'a ve 10 yıldır kader birliği yaptığım aziz dostum Dr. Levent Tufan KUMAŞ'a akademik hayatımın şekillenmesinde gösterdikleri her türlü destek için teşekkür ederim.

Çalışmam için kanlarını bağışlayan değerli kan bağışçısı kardeşlerim Ercan DÖNMEZ, Özgür Devrim TUNCEROĞLU, Barış DEMİR, Halil YAŞBEY, Engin KÖSE, Metin ÖNCÜ, Leyla GÖZLER, Ali SORUCU, Faruk ATEŞ ve Rahmi Mert TURAN'a, bağışçılardan kanların alınması, işlenmesi, testlere hazırlanması aşamalarında yardımlarını esirgemeyen başta sevgili Metin ÖNCÜ ve Özlem ÖZVAROL olmak üzere tüm kan merkezi çalışanı dostlarıma, akım-sitometre, RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR çalışmalarında büyük emek harcayan başta sevgili Figen AYMAK ve Göknur ALTINDİŞ olmak üzere tüm İmmünoloji laboratuvarı çalışanı dostlarıma, ELISA testlerinin çalışılmasında yoğun iş yüküne rağmen yanımda olan başta sevgili Raziye Maviş ÜLKER olmak üzere ELISA laboratuvarı çalışanı dostlarıma ve sevgili Furkan GÜVENÇ'e, istatistiksel değerlendirme sürecindeki destekleri için Prof. Dr. İlker ERCAN ve Dr. Gökhan OCAKOĞLU'na teşekkür ederim. Takım ruhunun enerjisini, paylaşımın gücünü ve fedakarlığın büyüklüğünü yaşattınız.

Son olarak da aileme teşekkür ederim. Her zaman sonsuz bir güveni ve huzuru hissettirdikleri ve var oldukları için.

SAYGILARIMLA...

9. ÖZGEÇMİŞ

09.07.1971 tarihinde Kütahya’da dünyaya geldim. İlkokul eğitimimi Kütahya’nın Tavşanlı ilçesinde Moymul İlkokulu’nda (1978-1982), ortaokul ve lise eğitimimi Tavşanlı Atatürk Lisesi’nde (1982-1988) tamamladım. 1989 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi’ni kazandım ve 1997 yılında tıp doktoru oldum. 1998-2004 yılları arasında Sağlık Bakanlığı’na bağlı pratisyen hekim olarak sırasıyla Bitlis, Yalova ve Bursa illerinde görev yaptım. 2003 yılı Eylül ayında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde “Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı” yüksek lisans programına başladım. Mart 2004 tarihinde kadrom ile birlikte Sağlık Bakanlığından Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezine geçiş yaptım ve halen bu merkezde görevime devam etmekteyim. 2006 yılında tamamladığım “Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı” yüksek lisans programının ardından 2008 yılı Eylül ayında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde “İmmünoloji” doktora programına başladım. Bu tez çalışması ile de doktora sürecimi tamamlamış olacağım.