

**T.C. DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK NEFROLOJİ BİLİM DALI**

**PYELONEFRİT SONRASI RENAL SKAR GELİŞEN VE
GELİŞMEYEN HASTALARDA TLR-4 ASP299GLY VE
THRE399İLE POLİMORFİZM SIKLIĞININ VE BU
HASTALARDA LÖKOSİT TLR-4 EKSPRESYON
DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

PEDİATRİK NEFROLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uzm. Dr. Meral TORUN BAYRAM

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Alper SOYLU

İZMİR-2011

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1.İdrar yolu enfeksiyonu.....	7
2.2. Pyelonefrit ve renal skar ilişkisi.....	9
2.3. Renal skar patogenezi.....	9
2.4. Doğuştan ve kazanılmış bağışıklık sistemi.....	11
2.5. İdrar yolu enfeksiyonu-innate immün sistem ilişkisi.....	11
2.6.Toll-like reseptörler.....	13
2.7.Toll-like reseptör ve enfeksiyon ilişkisi.....	14
2.8.Toll-like reseptör 4, pyelonefrit ve olası renal skar ilişkisi.....	15
2.9.Toll-like reseptör 4 polimorfizmleri.....	17
2.10.Toll-like reseptör 4 ekspresyonu.....	18
3. HASTALAR VE YÖNTEM.....	19
3.1. Çalışma düzeni ve hasta seçimi.....	19
3.2. Myeloid hücrelerde TLR-4 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi.....	20
3.2.1. Periferik kan hücrelerinin lipopolisakkarit ile invitro uyarılması.....	20
3.2.2. Akım sitometrik boyama yöntemi.....	21
3.2.3. Akım sitometrik analiz.....	21
3.3. Toll-like reseptör 4 polimorfizmlerinin belirlenmesi.....	24

3.4. Çalışma sonuçlarının analizi.....	25
3.5. İstatistiksel analiz.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Grupların demografik ve klinik özellikleri.....	27
4.2. Myeloid hücrelerde TLR-4 ekspresyonu.....	30
4.2.1. Vezikoüreteral reflü olan ve olmayan olgularda TLR-4 gösterge düzeyleri.....	31
4.2.2. Tek ve birden fazla pyelonefrit geçiren olgularda TLR-4 gösterge düzeyleri.....	33
4.3. Toll-like reseptör 4 polimorfizm oranları.....	34
4.3.1. Vezikoüreteral reflü olan ve olmayan olgularda TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları.....	36
4.3.2. Tek ve birden fazla pyelonefrit geçiren olgularda TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları.....	37
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇLAR.....	44
7. KAYNAKLAR.....	45

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1** Toll-like reseptör (TLR) ailesi, ligandları, adaptör proteinleri ve aktif sinyal yolları
- Tablo 2** Hastaların değerlendirmeye alınan değişkenleri
- Tablo 3** Grupların yaş ve cinsiyet bakımından karşılaştırılması
- Tablo 4** Grup 1 ve Grup 2'deki hastaların klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulgularının karşılaştırılması
- Tablo 5** Grup 1 ve Grup 2'de renal USG bulguları
- Tablo 6** Grupların vezikoüreteral reflü sıklığı ve derecesi
- Tablo 7** Monositlerde bazal ve LPS ile uyarılmış TLR-4 ekspresyon yüzdesi (%), ortalama floresans yoğunluğu (OFY) ve TLR-4 gösterge (TLR-4_{gös}) değerleri ve uyarı indeksi (UI)
- Tablo 8** Nötrofillerde bazal ve LPS ile uyarılmış TLR-4 ekspresyon yüzdesi (%), ortalama floresans yoğunluğu (OFY) ve TLR-4 gösterge (TLR-4_{gös}) değerleri ve uyarı indeksi (UI)
- Tablo 9** Grup 1'de VUR (+) ve VUR (-) hastaların nötrofillerinde bazal ve LPS sonrası TLR-4_{gös} değerleri
- Tablo 10** Grup 1'de VUR (+) ve VUR (-) hastaların monositlerinde bazal ve LPS sonrası TLR-4_{gös} değerleri
- Tablo 11** Grup 1'de yüksek derece (≥3. derece) VUR'u olanlar ile diğer olguların (düşük derece VUR'u olanlar + VUR'u olmayanlar) nötrofillerinde bazal ve LPS sonrası TLR4_{gös} değerleri
- Tablo 12** Grup 1'de yüksek derece (≥3. derece) VUR'u olanlar ile diğer olguların (düşük derece VUR'u olanlar + VUR'u olmayanlar) monositlerinde bazal ve LPS sonrası TLR4_{gös} değerleri
- Tablo 13** Bir veya tekrarlayan pyelonefrit atağı geçiren olguların nötrofillerinde

bazal ve LPS sonrası TLR-4_{gös} değerleri

Tablo 14 Bir veya tekrarlayan pyelonefrit atağı geçiren olguların monositlerinde bazal ve LPS sonrası TLR-4_{gös} değerleri

Tablo 15 Grupların TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları

Tablo 16 VUR (+) ve VUR (-) hastalarda TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları

Tablo 17 Tek ve birden fazla pyelonefrit geçiren olgularda TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1** İdrar yolu enfeksiyonuna neden olabilen faktörler
- Şekil 2** Akut pyelonefrit sonrası renal skara neden olan patofizyolojik olaylar
- Şekil 3** İnate ve adaptif immün yanıt
- Şekil 4** Toll/IL1 reseptör (TIR) yapı ve ilişkili hücre içi yolağı
- Şekil 5** Pyelonefrit sırasındaki konak yanıtı ve sonrasında gelişen renal skar
- Şekil 6** Monosit ve granülosit hücre gruplarının belirlenmesi
- Şekil 7** Monositlerde bazal TLR-4 ekspresyon düzeyleri.
- Şekil 8** Nötrofillerde bazal TLR-4 ekspresyon düzeyleri.
- Şekil 9** TLR4 Asp299Gly polimorfizmi. NcoI restriksiyon enzim kesimlerinin %2'lik jelde yürütülmüş resmi.
- Şekil 10** TLR4 Thr399Ile polimorfizmi. HinfI restriksiyon enzim kesimlerinin %2'lik jelde yürütülmüş resmi.

KISALTMALAR

İYE	İdrar yolu enfeksiyonu
TLR	Toll-like reseptör
LPS	Lipopolisakkarit
VUR	Vezikoüreteral reflü
DMSA	Dimerkaptosüksinik asit sintigrafisi
OFY	Ortalama floresans yoğunluğu
TLR-4_{gös}	Toll-like reseptör 4 göstergesi
UI	Uyarı indeksi

ÖZET

PYELONEFRİT SONRASI RENAL SKAR GELİŞEN VE GELİŞMEYEN HASTALARDA TLR-4 ASP299GLY VE THRE399İLE POLİMORFİZM SIKLIĞININ VE BU HASTALARDA LÖKOSİT TLR-4 EKSPRESYON DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

Giriş ve Amaç: Doğuştan bağışıklık sistemi hücrelerinde eksprese olan TLR-4, Gram (-) bakterilerin LPS'lerini tanır ve inflamatuvar süreci başlatır. Pyelonefrit seyrinde bu inflamasyon renal skar oluşumuna yol açar. TLR-4 polimorfizmlerini taşıyan çocuklarda sık idrar yolu enfeksiyonu görülmektedir. Lökosit TLR-4 ekspresyonu sık tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu ve asemptomatik bakteriüri hastalarda daha düşüktür. Bu çalışmada, akut pyelonefrit geçiren hastalarda TLR-4 Asp299Gly ve Thr399İle polimorfizmlerinin sıklığı ve lökositlerde TLR-4 ekspresyon düzeyi incelenerek, renal skar gelişimi ile bu değişkenlerin ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Hastalar ve Yöntem: Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji polikliniğinde pyelonefrit tanısı ile izlenen ve primer vezikoureteral reflü (VUR) dışında üriner anomalisi olmayan hastalar alındı. Renal skar (+) hastalar Grup 1, renal skar (-) hastalar Grup 2, önceki çalışmamızda incelenen kontrol olguları ise Grup 3 olarak gruplandırıldı. Ayrıca, TLR-4 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için yeni kontrol olguları da çalışmaya alındı. Her 3 grup arasında periferik kan örneklerinden elde edilen genomik DNA'da TLR-4 Asp299Gly ve Thr399İle polimorfizm sıklıkları ve periferik kan myeloid hücrelerinde bazal ve LPS sonrası TLR-4 ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. İstatistiksel hesaplamalar için SPSS 15.0

paket programı kullanıldı.

Bulgular: Çalışmaya toplam 168 hasta (Grup 1’de 86, Grup 2’de 82) ve 120 kontrol olgu alındı. Grup 1 ve Grup 2’de myeloid hücre TLR-4 ekspresyon düzeyleri benzerdi. Ancak, her iki grupta da bazal ve LPS sonrası TLR-4 ekspresyon düzeyleri Grup 3’ten düşük saptandı. Gruplar arasında TLR-4 Asp299Gly polimorfizm sıklığı farklı değildi, ancak TLR-4 Thr399Ile polimorfizm sıklığı Grup 1 ve Grup 2’de kontrol grubundan fazla idi. Grup 1 ve Grup 2 arasında ise fark saptanmadı. Öte yandan, TLR-4 Asp299Gly ile TLR-4 Thr399Ile polimorfizm sıklıkları ve TLR-4 ekspresyon düzeyi VUR (-) vs VUR (+) ve tek pyelonefrit vs tekrarlayan pyelonefrit geçiren hastalar arasında farklı değildi.

Sonuç: Pyelonefritli hastalarda TLR-4 Thre399Ile polimorfizmi sağlıklı kontrollerden fazla, lökosit TLR-4 ekspresyon düzeyi ise düşüktür. Bu bulgular, TLR-4 Thre399Ile polimorfizmini taşıyan ve/veya lökosit TLR-4 ekspresyon düzeyi düşük olan çocuklarda, olasılıkla üriner sistemden bakteri eradikasyonunun güçleşmesine bağlı olarak, pyelonefrit gelişimine yatkınlık olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, TLR-4 polimorfizmlerinin ve TLR-4 ekspresyon düzeyinin pyelonefrit sonrası renal skar gelişimine etkisi gösterilememiştir.

Anahtar kelimeler: Pyelonefrit, renal skar, TLR-4 ekspresyonu, TLR-4 polimorfizmi

SUMMARY

EVALUATION OF THE RATE OF TLR-4 ASP299GLY AND THRE399ILE POLYMORPHISMS AND LEUKOCYTE TLR-4 EXPRESSION LEVELS IN PATIENTS WITH AND WITHOUT POSTPYELONEPHRITIC RENAL SCARRING

Background and Aim: TLR-4 is expressed in innate immune system cells, recognizes LPS of Gram (-) bacteria and initiates inflammatory cascade. This inflammatory process results in renal scarring during pyelonephritis. Children carrying TLR-4 polymorphisms have recurrent urinary tract infections. Leukocyte TLR-4 expression level is decreased in patients with recurrent urinary tract infections and in those with asymptomatic bacteriuria. In this study, we aimed to determine the rate of TLR-4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and leukocyte TLR-4 expression level in children with acute pyelonephritis in order to evaluate the association of those parameters with renal scar development.

Patients and Methods: The study was performed in children with pyelonephritis and without underlying urological anomalies other than primary vesicoureteral reflux (VUR) who have been followed up in Pediatric Nephrology Outpatient Clinic of Dokuz Eylul University Medical Faculty. Patients with and without renal scarring were classified as Group 1 and Group 2, respectively, while the control cases in our previous study were used as control group (Group 3). Furthermore, new control cases were enrolled to determine leukocyte TLR-4 expression levels. All three groups were compared for the rate of TLR-4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms determined in genomic DNA obtained from periperal blood samples, and for basal and LPS stimulated periperal blood myeloid cell TLR-4 expression levels. Statistical analyses were performed by SPSS 15.0 software.

Results: There were 168 patients (86 in Group 1, 82 in Group 2) and 120 control cases. Myeloid cell TLR-4 expression levels were similar in Groups 1 and 2. However, both groups had lower basal and LPS stimulated TLR-4 expression levels than Group 3. While the rate of TLR-4 Asp299Gly polymorphism was not different among the three groups, the rate of TLR-4 Thr399Ile polymorphism was higher in Groups 1 and 2 than in Group 3. Group 1 and Group 2 were not different. On the other hand, the rate of TLR-4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and TLR-4 expression levels were not different among VUR (-) vs VUR (+) and among single vs recurrent pyelonephritis.

Conclusion: Patients with pyelonephritis had more frequent TLR-4 Thre399Ile polymorphism and lower leukocyte TLR-4 expression level compared to healthy controls. These findings indicate that children carrying TLR-4 Thre399Ile polymorphism and/or having low level of leukocyte TLR-4 expression have a tendency to develop pyelonephritis, probably due to difficulty in eradication of bacteria from the urinary system. However, we could not show the association of TLR-4 polymorphisms and of TLR-4 expression level to postpyelonephritic renal scarring.

Keywords: Pyelonephritis, renal scarring, TLR-4 expression, TLR-4 polimorphism

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağındaki idrar yolu enfeksiyonları (İYE) üriner sistemin anatomik anormalliklerine ve/veya mesane disfonksiyonuna bağlı olarak gelişir. Bununla birlikte, bakteriyel virülans faktörleri ve konağın bağışıklık yanıtı da İYE oluşumunda önemli rol oynar (1). Pyelonefrit böbrek parankiminin bakteriyel enfeksiyonudur. Bakterinin renal parankime inokulasyonu immün/inflamatuvar yanıtı başlatır ve renal skar oluşumu ile sonlanabilir. Renal skar ise hipertansiyon ve kronik böbrek yetmezliği gibi komplikasyonlar ile ilişkilendirilmiştir (2).

İdrar yolu enfeksiyonlarından sorumlu patojen mikroorganizmalara karşı erken konak yanıtı “doğuştan (innate) immün sistem” aracılığı ile gerçekleşir. Innate immün sistem hücreleri mikroorganizmaları “Toll benzeri” reseptörler (Toll like receptors, TLR) aracılığı ile tanırlar (3). Bugüne kadar hayvanlarda 13 tane TLR tanımlanmıştır (4). İYE ile en fazla TLR -2, -4, -5 ve -11 ilişkili bulunmuştur (5, 6). TLR-4 sıklıkla Gram (-) bakterilerin tipik lipopolisakkaritlerinin (LPS) tanınmasında rol oynar (3, 7).

TLR fonksiyonunu düzenleyen genetik polimorfizmlerin enfeksiyonlara yatkınlık ile ilişkileri üzerinde çalışılmakta olan bir konudur (8). İYE ile TLR-1,-2,-4 ve -5 polimorfizmleri arasında ilişki varlığını gösteren çalışmalar mevcuttur (9-11). Bu polimorfizmlerden en sık TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin İYE gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve değişken sonuçlar rapor edilmiştir. Çalışmaların bir kısmında bu polimorfizmin asemptomatik bakteriüri, İYE ve pyelonefrite yatkınlık yarattığı bildirilirken (9,12,13), bir çalışmada alt İYE’li hastalarda daha düşük oranda görüldüğü ve bu polimorfizmin sistite karşı koruma sağladığı ifade edilmiştir (11). TLR-4 Thr399Ile polimorfizminin ise İYE ile ilişkisinin araştırıldığı tek bir çalışma bulunmaktadır ve bu polimorfizm hastaların hiçbirinde saptanmamıştır. Öte yandan

TLR-4 ekspresyonu ile İYE arasındaki ilişki de incelenmiş, lökositlerde TLR-4 ekspresyon düzeyinin asemptomatik bakteriüri ve tekrarlayan İYE'de azaldığı bildirilmiştir (12,14).

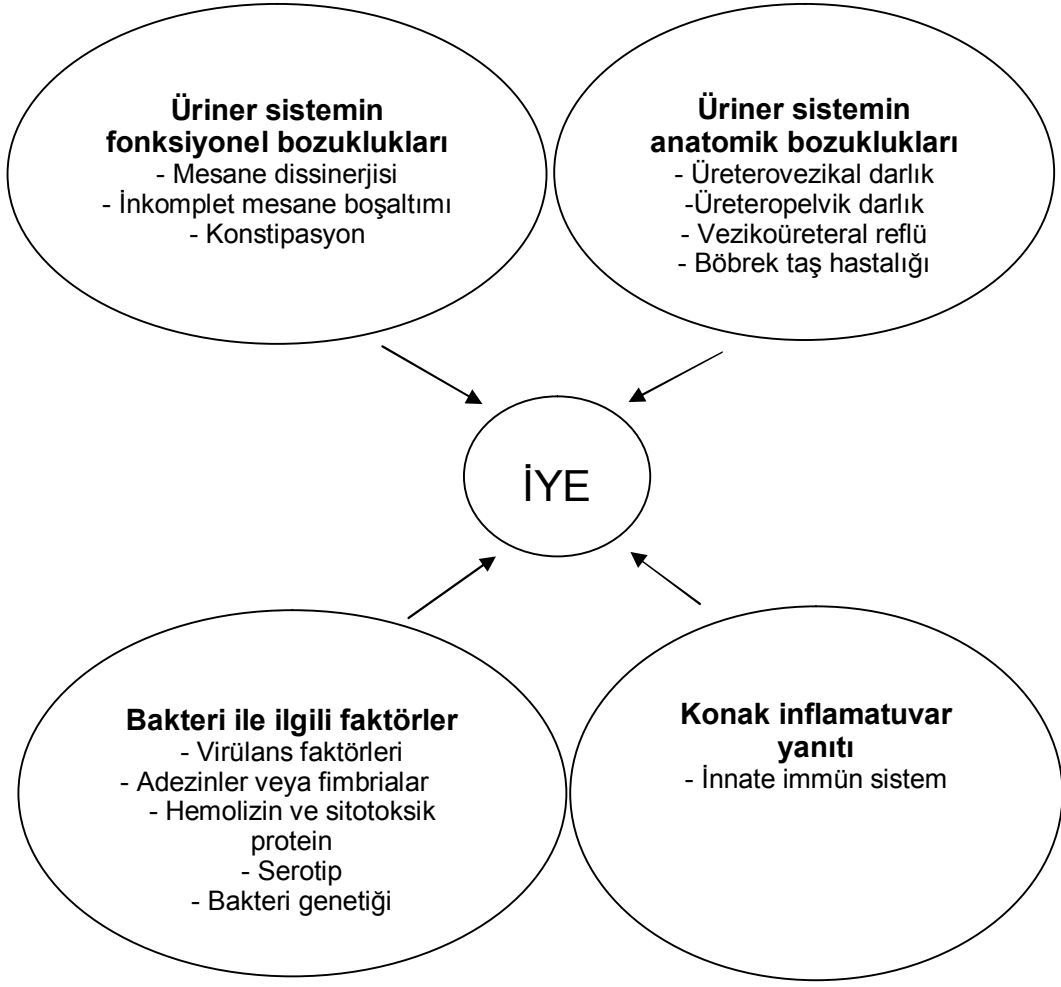
TLR-4 ve İYE arasında ilişkiye kıyasla, TLR-4'ün renal skar gelişimi ile ilişkisi daha az sayıda çalışmada incelenmiştir. Bunlardan TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin renal skar gelişimi üzerine etkisi gösterilememiştir (9,13). TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi ve TLR-4 ekspresyonu ile renal skar gelişimi arasında ilişkiyi araştıran geniş çaplı bir araştırma ise yapılmamıştır.

Bu çalışmada, akut pyelonefrit sonrası renal skar gelişen ve gelişmeyen çocuklar arasında TLR-4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerinin sıklığı ve lökositlerde TLR-4 ekspresyon düzeyi karşılaştırılarak, TLR-4 ekspresyon ve polimorfizmlerinin renal skar gelişimindeki rollerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İdrar yolu enfeksiyonu

İdrar yolu enfeksiyonu, üst solunum yolu enfeksiyonundan sonra çocuklarda en sık görülen ikinci bakteriyel enfeksiyondur. Puberte öncesi dönemde kızların %3-5'i, erkeklerin %1-2'si İYE geçirmektedirler (15). İYE sıklıkla periüretal bölgede kolonize olan bakterilerin asendan yol ile üriner sisteme ulaşması sonucunda gelişir. Tüm yaş gruplarında en sık etken enterobacteriaceae ailesinden gram negatif enterik bakterilerdir (16). Çocuklarda tüm İYE'lerin %80-85'inden *Escherichia coli* (*E. coli*) sorumludur (17). İYE, çocuklarda fonksiyonel veya yapısal üriner sistem anormalliğinin ilk bulgusu olabilir (18). Bu nedenle İYE saptanan çocuklarda bu anormalliklerin araştırılması gerekir. Bununla birlikte, İYE ile başvuran birçok çocukta bu predispozan faktörlerin hiçbiri saptanmaz. Bu hastalarda bakteriyel virülans ve/veya konağın bağışıklık sistemindeki farklılıkların İYE oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 1)



Şekil 1: İdrar yolu enfeksiyonuna neden olabilen faktörler

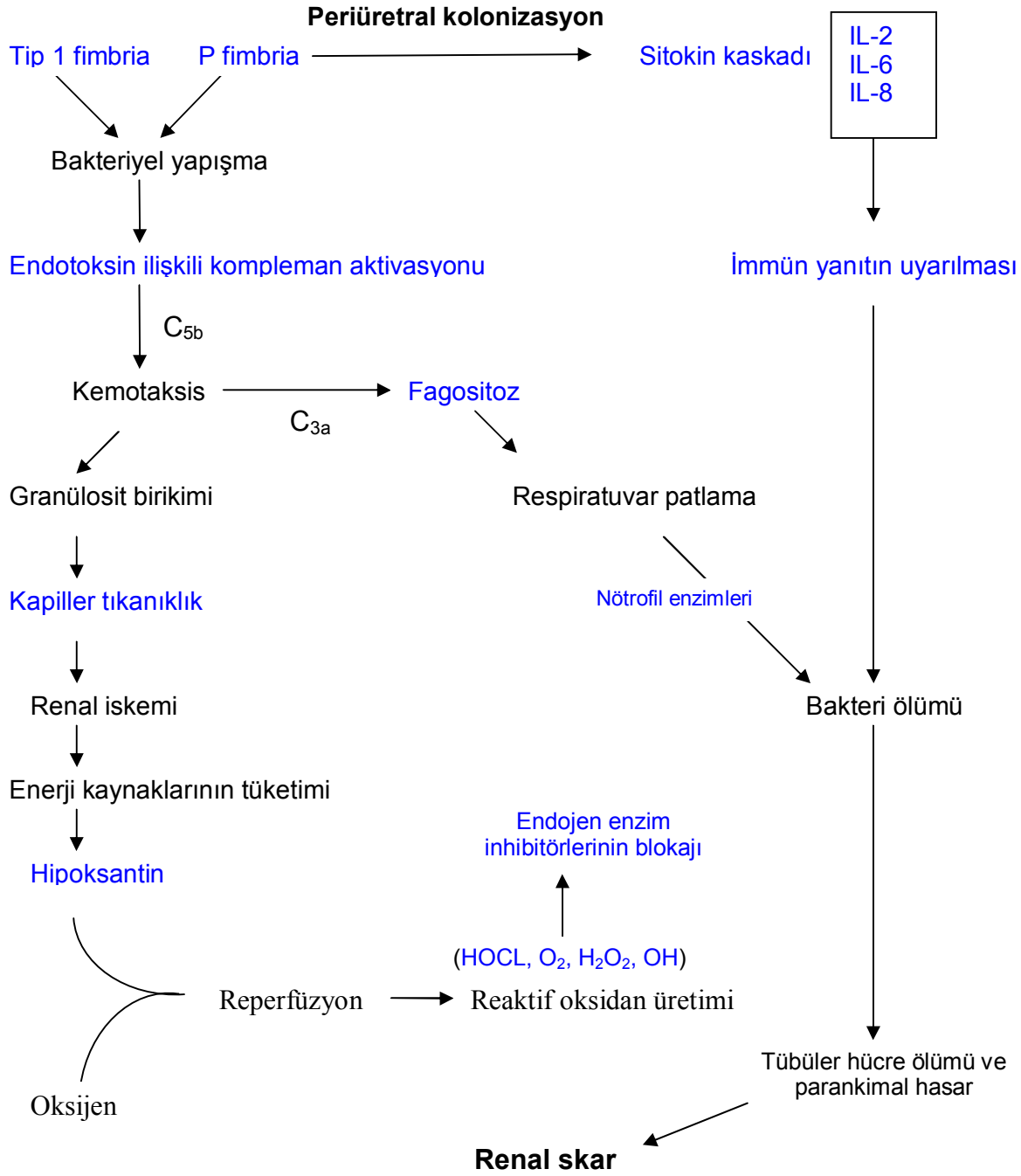
2.2. Pyelonefrit ve renal skar ilişkisi

İdrar yolu enfeksiyonunun en ağır şekli olan pyelonefrit, renal parankimin bakteriyel enfeksiyonudur. Pyelonefrit renal skar oluşturarak hipertansiyon, gebelik sırasında preeklampsi ve kronik böbrek yetmezliği gibi komplikasyonlara neden olabilir (19). Pyelonefrit tanısı görüntüleme yöntemlerinden ⁹⁹Tc-dimercaptosuccinic acid (DMSA) sintigrafisi ile konulmaktadır. Bununla birlikte, DMSA ile pyelonefrit tanısı konulan hastaların sadece %20-40'ında kalıcı renal skar gelişmektedir (20).

2.3. Renal skar patogenezi

Akut pyelonefrit sonrası gelişen renal skarın patogenezi tam olarak bilinmemektedir (21). Pyelonefritten sorumlu bakterinin eradikasyonu için konağın verdiği immün ve inflamatuvar yanıtın, erken renal parankimal hasar ve bunu izleyen renal skara neden olduğu düşünülmektedir (22).

Renal skar oluşumunda doğuştan bağışıklık sistemi anahtar bir rol oynar. Bu süreçte bakteriyel endotoksinlerin etkisi ile kompleman aktivasyonu, nötrofil kemotaksisi, fagositoz, lizozomal enzim salınımı, iskemi-reperfüzyon hasarı ve reaktif oksijen radikallerinin üretiminin etkileri tanımlanmıştır (23) (şekil 2).



Şekil 2: Akut pyelonefrit sonrası renal skara neden olan patofizyolojik olaylar (Kaynak 23'den alınmıştır)

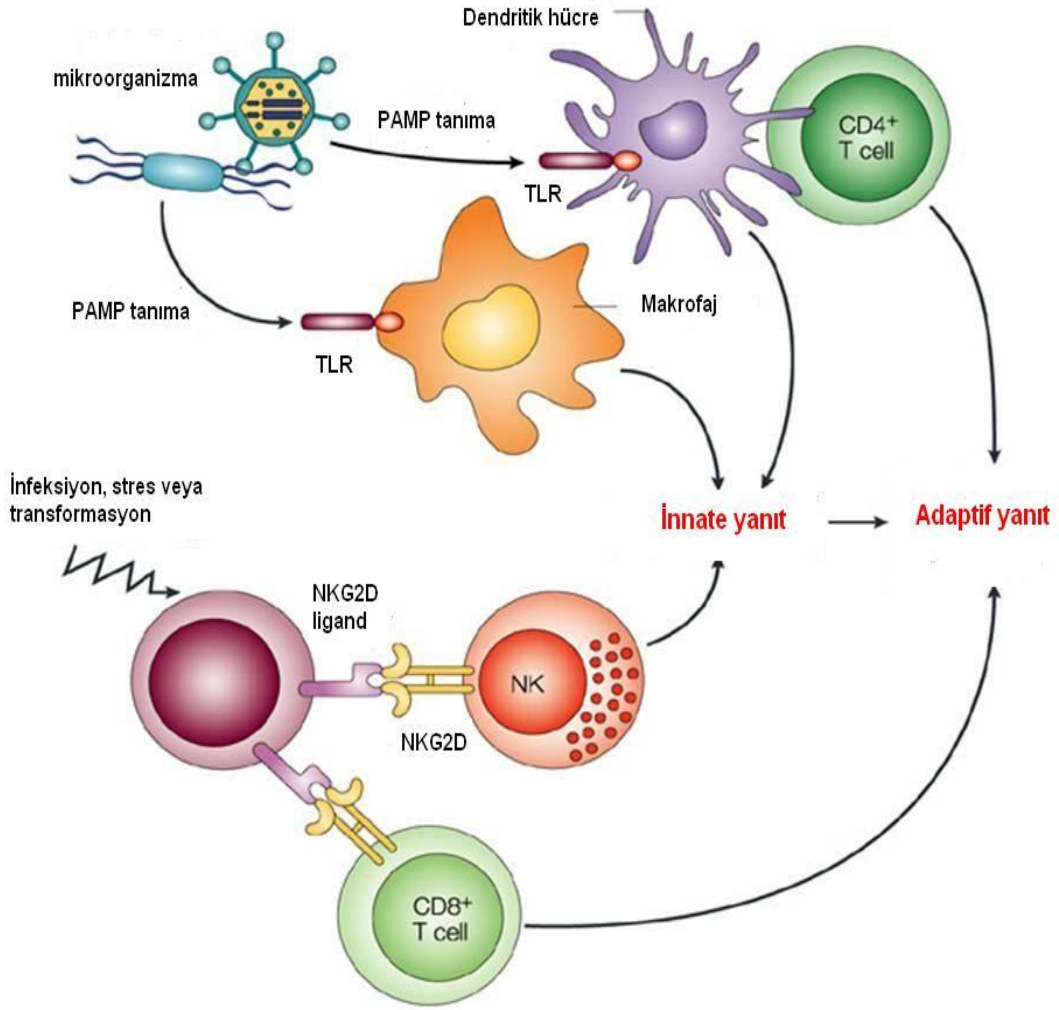
2.4. Doğuştan ve kazanılmış bağışıklık sistemi

Mikroorganizmalara karşı konak savunması bağışıklık sistemi tarafından yapılır. Bağışıklık sisteminin iki parçası vardır: Doğuştan (innate) ve kazanılmış bağışıklık. Kazanılmış bağışıklık sisteminin öğeleri olan T ve B hücreleri mikroorganizmaları immunoglobulin ve T-hücre reseptörleri gibi antijen reseptörleri aracılığı ile tanır.

Doğuştan bağışıklıktan sorumlu hücreler ise (monosit/makrofaj, granülosit, dentritik hücre) lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal yapıları membranlarında taşıdıkları PRR (Pathogen Recognition Receptor) aracılığı ile tanımaktadırlar. Bu PRR'ler arasında TLR (Toll-like receptors), NLR (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptors) ve RLR (Rig-I-like receptors) bulunmaktadır (24).

2.5. İdrar yolu enfeksiyonu – innate immün sistem ilişkisi

İYE'den sorumlu patojen mikroorganizmalara karşı erken konakçı yanıtı innate immün sistem ile sağlanır. İnnate immün sistemin birçok parçası vardır. Bunlardan tek yönlü idrar akımı, epitel hücre bariyeri, bakterinin yakalanmasını (musin gibi) ya da yapışmasını (Tamm-Horsfall gibi) engelleyen proteinler fiziksel elemanları oluştururlar. Daha spesifik elemanlar arasında sitokinler, nötrofiller, makrofajlar, kompleman sistemi ve defensinler sayılabilir (25). Ayrıca dendritik hücrelerin matürasyonu ve antijen sunum kapasitesindeki artış neticesinde, innate immün sistem adaptif immün sistemi bir tehlikeye işaret edencesine yönlendirir (26) (Şekil 3).



Şekil 3: İnnate ve adaptif immün yanıt

([http://humanphysiology.wikispaces.com/08-Immune System](http://humanphysiology.wikispaces.com/08-Immune+System))

2.6. Toll-like reseptörler

TLR'ler PRR ailesinin üyelerindendir. İlk olarak 1996 yılında, sadece doğuştan bağışıklık sistemi bulunan *Drosophila* organizmasında, fungal enfeksiyona karşı konak savunması için gerekli olan bir reseptör (Toll) olarak tanımlanmıştır (27). Bundan kısa bir süre sonra da bu reseptörün memelilerdeki homologu (TLR-4) gösterilmiş ve bunun inflamatuvar yanıtta rol oynayan genlerin ekspresyonunu uyardığı belirtilmiştir (4).

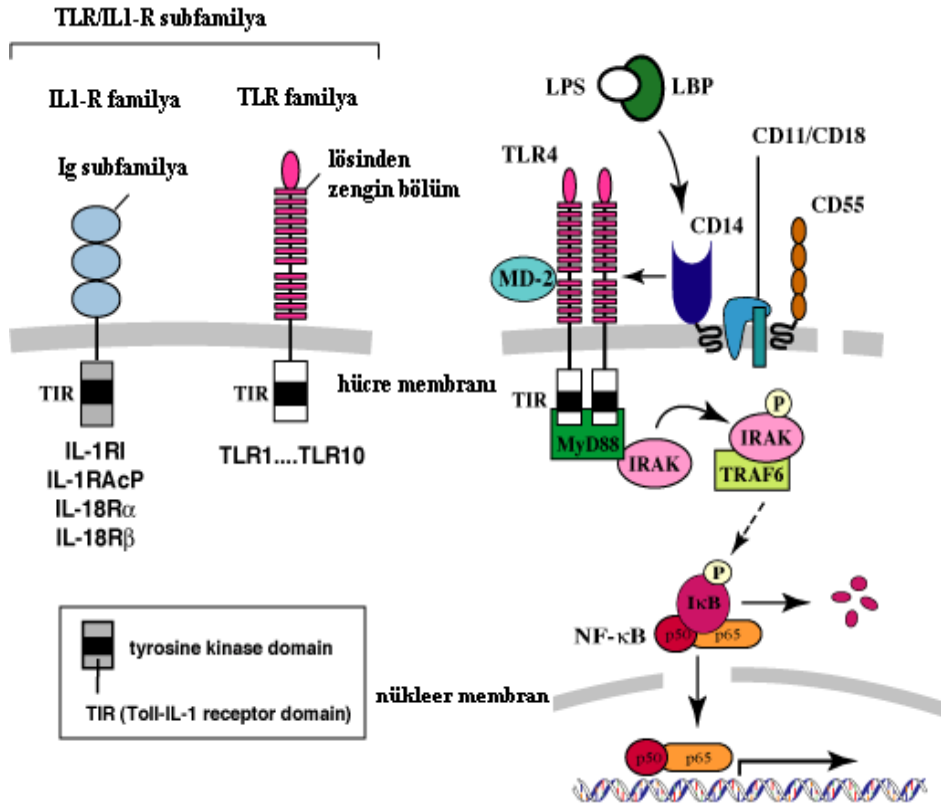
Bugüne kadar 13 tane TLR tanımlanmıştır. Bunlardan TLR-1, -2, -4, -5, -6 ve -10 hücre yüzeyinde eksprese olup LPS ve teikoik asit gibi bakteriyel molekülleri algılamakta iken, TLR-3,-7,-8,-9,-11,-12 ve 13 endozom gibi hücre içi kompartmanlarda bulunmakta ve nükleik asit yapısındaki antijenleri tanımada görev almaktadırlar (Tablo 1) (24).

Tablo 1. Toll-like reseptör (TLR) ailesi, ligandları, adaptör proteinleri ve aktif sinyal yolları

Alt Grup	Üye	Ana ligand	Adaptör protein	Sinyal yolağı
TLR1	TLR-1 TLR-2 TLR-6 TLR-10	Lipopeptidler	MyD88, Mal	NF-κB, MAPK
TLR3	TLR-3	dsDNA	TRIF	NF-κB, IRF3/7, MAPK
TLR4	TLR-4	Lipopolisakkarit	MyD88, Mal, TRIF, TRAM	NF-κB, IRF3/7, MAPK
TLR5	TLR-5	Flagellin	MyD88	NF-κB, MAPK
TLR7	TLR-7 TLR-8 TLR-9	ssRNA ssRNA CpG-DNA	MyD88 MyD88 MyD88	NF-κB, IRF3/7, MAPK
TLR11	TLR-11 TLR-12 TLR-13	Uropatojenik bakteri, profilin Veziküler stomatit virüs	MyD88 MyD88 MyD88	

2.7. Toll-like reseptör ve enfeksiyon ilişkisi

TLR bağışıklık hücreleri dışındaki hücrelerde de (mesane epiteli, renal tübül epiteli gibi parankimal hücreler) eksprese olmaktadır. TLR'lerin ekstrasellüler ve intrasellüler olmak üzere iki kısmı bulunmaktadır. TLR karakteristik olarak ekstrasellüler lösinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve intrasellüler Toll/IL-1 reseptör (TIR) bölgesinden oluşur (3,28,29). Ekstrasellüler kısım direkt veya indirekt yolla bakteri, mantar, protozoa ve virüs gibi patojenlerde bulunan evrimsel olarak korunmuş ligandlar ile etkileşime girdiğinde, intrastoplazmik TIR bölgesi aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur ve sonunda antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler oluşur (3, 28-30) (Şekil 4).



Şekil 4: Toll/IL 1 reseptör (TIR) yapı ve ilişkili hücre içi sinyal yolağı

(Kaynak: <http://www.inflammation.dk/iir/09inn/tlr.htm>)

Renal dokuda eksprese edilen TLR arasında TLR-1,-2,-3,-4,-5,-6 ve -11 bulunmaktadır. Bunlardan TLR -2,-4,-5 ve -11 İYE ile en fazla ilişkili olanlardır (5, 6).

2.8. Toll-like reseptör 4, pyelonefrit ve olası renal skar ilişkisi

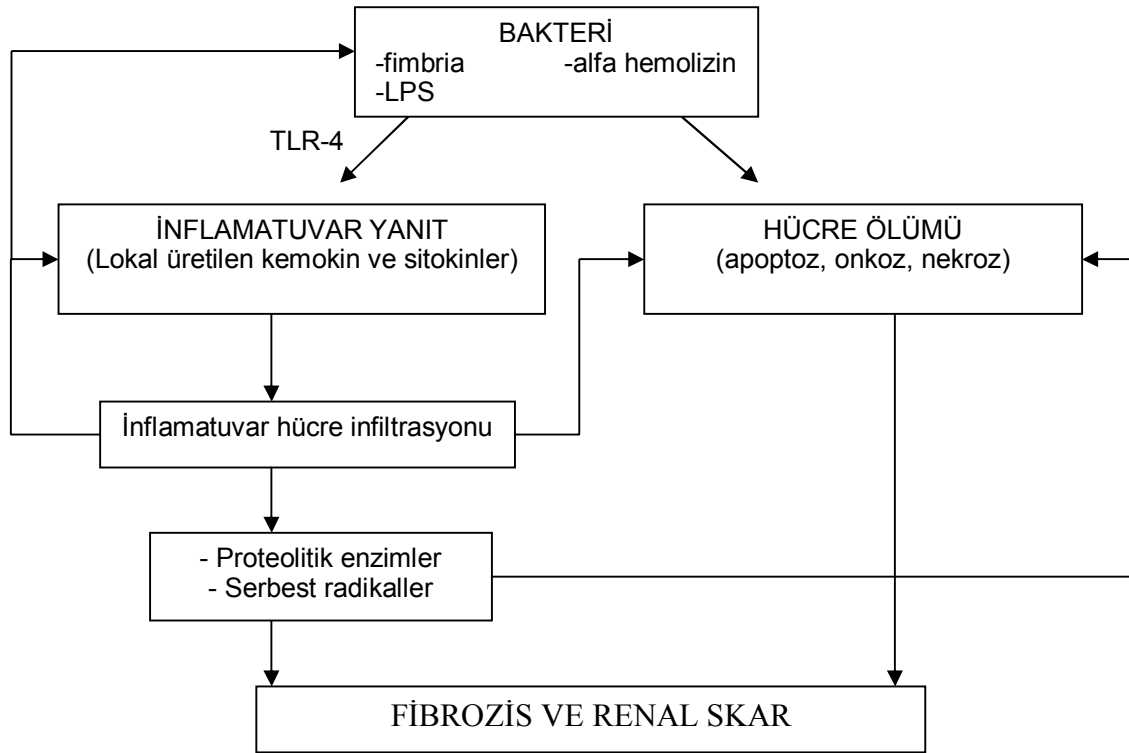
TLR-4 monosit, makrofaj, nötrofil, endotel, epitel hücreleri ve fibroblastlarda eksprese olup sıklıkla Gram (-) bakterilerin LPS'lerini tanır (31-36). Ancak LPS dışında taksol, füzyon proteini, sıcak şok proteini, fibronektin, hyalüronik asit, heparan sülfat, fibrinojen, β -defensin-2 de TLR-4 tarafından tanınmaktadır (3,8).

TLR-4 ve LPS'ler arasındaki etkileşim sonucunda MyD88 gibi bazı adaptör proteinlerin kullanıldığı intrasellüler sinyal yolları (NF- κ B, IRF3/7,MAPK) aktive olur (Tablo 1) (24). Yine TLR-4'ün LPS dışındaki ligandları tanıması da benzer yolların aktivasyonuna neden olur.

TLR-4'ün Gram (-) bakteri LPS'i ile etkileşimi sonucunda, intrasellüler sinyal yollarının aktivasyonu TNF- α , IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, adhezyon moleküllerinin ve antimikrobiyal peptidlerin oluşumuna ve bu da mikroorganizmanın temizlenmesinde kritik rol oynayan nötrofil göçüne neden olur (3,37-40). Pyelonefrit seyrinde bu inflamatuvar hücreler tübül hücrelerinin ölümüne ve parankim hasarına yol açar (Şekil 2). Ayrıca inflamatuvar hücreler yanında bakterinin kendisi de direkt renal hasara sebep olabilir.

Pyelonefrit sırasında renal tübül epitel hücre hasarından kaynaklanan defensinler ve küçük antimikrobiyal peptitler yanısıra fibronektin, hyaluronik asit veya heparan sulfat gibi ekstrasellüler matriks yıkım ürünleri de TLR-4'ü uyarır. TLR-4 uyarısı, hücre içi

sinyal yollarını aktive ederek, immün ve renal hücrelerden inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salgılanmasına ve bölgeye yeni lökosit göçüne yol açar. İnflamasyonun bu şekilde devam etmesi uzun vadede interstisyel fibrozis oluşumu ile sonuçlanabilir (37,41-44) (Şekil 5). Benzer şekilde, kronik tübülointerstisyel hasara yol açan patolojilerde, nekrotik renal hücrelerden açığa çıkan HSP ve GP96 gibi proteinlerin de TLR-4 uyarısı yaparak doku hasarının kronikleşmesine katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir (45-47).



Şekil 5: Pyelonefrit sırasındaki konak yanıtı ve sonrasında gelişen renal skar

2.9. Toll-like reseptör 4 polimorfizmleri

TLR'lerin fonksiyonunu düzenleyen genetik polimorfizmlerin enfeksiyonlara yatkınlığa sebep olup olmadığı, üzerinde çalışılmakta olan bir konudur (8). TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizmlerini taşıyanlarda osteomyelit gibi Gram (-) enfeksiyonların ve septik şokun daha sık görüldüğü ileri sürülmüştür (7,48,49). Yine bu polimorfizmler için homozigot olan donörlerden alınan monositlerde LPS yanıtının azaldığı gösterilmiştir (50). Bununla birlikte, Asp299Gly polimorfizmi için heterozigot bireylerde LPS'in tetiklediği sitokin salınımı, vahşi tip allel taşıyanlardan farklı bulunmamıştır (51-54).

İYE ile TLR -1,-2,-4 ve -5 polimorfizmleri arasında ilişki varlığına işaret eden çalışmalar mevcuttur (9-11). TLR-4 Asp299Gly taşıyıcısı olan çocuklarda, diğer üriner anormalliklerden bağımsız olarak, tekrarlayan İYE'nin de sık görüldüğü bildirilmiştir (37). Hawn ve ark. ise erişkin kadınlarda yaptıkları bir araştırmada TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin tekrarlayan İYE'den korunma sağladığını, ancak pyelonefrit için koruyucu olmadığını rapor etmişlerdir (11). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, tekrarlayan İYE'li ve sağlıklı çocuklarda TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi saptanmadığı rapor edilmiştir (55). Akil ve ark. ise TLR-4 Asp299Gly polimorfizmini alt ve üst üriner sistem enfeksiyonu geçiren çocuklarda kontrol olgularından farklı bulmamışlardır. Ancak, bu polimorfizmin pyelonefritli çocuklarda alt İYE'li çocuklardan daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir. Dahası, istatistiksel anlam taşımamakla birlikte, renal skar saptanan pyelonefritlilerde skar saptanmayanlara göre de TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin daha sık olduğunu ifade etmişlerdir (13).

2.10. Toll-like reseptör 4 ekspresyonu

Myeloid hücrelerde LPS ile temas sonrasında transmembran sinyal iletimi için TLR-4 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (56). Septik hastalarda kontrol olgularına göre monositlerde TLR-4 ekspresyonu artmış iken, granülositlerde azalmış olduğu gösterilmiştir (57).

İdrar yolu enfeksiyonu ile TLR-4 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada tekrarlayan İYE'li hastalarda tek İYE atağı geçiren hastalara ve sağlıklı kişilere göre monositlerde TLR-4 ekspresyonunun daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır (12). Öte yandan, asemptomatik bakteriüri hastalarda da kontrol grubuna göre nötrofillerde TLR-4 ekspresyon düzeyinin düşük bulunduğu bildirilmiştir (14).

TLR-4 ekspresyonunun TLR-4 polimorfizmleri ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, TLR-4 Asp299Gly polimorfizmi taşıyanlarda LPS teması sonrası hava yolu epitel hücreleri ve alveolar makrofajlarda TLR-4 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (32, 50). Ancak TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi ile TLR-4 ekspresyonu arasında ilişkiyi araştıran bir çalışma yapılmamıştır.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Çalışma düzeni ve hasta seçimi

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji polikliniğinde izlenen ve klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları ile pyelonefrit tanısı konulan hastalar arasından gönüllü olanlarda gerçekleştirildi. Obstrüktif üropatisi ve nörojen mesanesi olanlar çalışma dışı tutulurken, primer vezikoüreteral reflüsü olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Akut pyelonefrit ateş (≥ 38.5 °C), anlamlı bakteriüri ($>10^5$ cfu/ml) ve C-reaktif protein yüksekliği (>8 mg/L) olarak tanımlandı. Hastalar, akut pyelonefrit atağından en az altı ay sonra yapılan ^{99m}Tc -DMSA böbrek sintigrafisinde saptanan hipoaktif alan ve/veya kontur düzensizliği varlığına göre renal skar (+) (Grup 1) ve renal skar (-) (Grup 2) olarak gruplandırıldı. Kontrol grubunu (Grup 3) ise daha önceki çalışmamızda kullanılan 100 sağlıklı olgu oluşturdu (58). Buna ek olarak, TLR-4 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için hastalar ile benzer yaşta 20 yeni kontrol olgusu çalışmaya alındı. Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Komitesi tarafından onaylandıktan sonra, hastalardan ve kontrol olgularından bilgilendirilmiş onam alındı. Tüm hastalarda Tablo 2’te görülen değişkenler kaydedildi.

Tablo 2. Hastaların değerlendirmeye alınan değişkenleri

Yaş
Tanı yaşı
Cinsiyet
Pyelonefrit sayısı
Serum kreatinin düzeyi
Glomerüler filtrasyon hızı
Batın Ultrasonografi
Voiding Sistoüretrografi
⁹⁹ Tc- Dimerkaptosüksinik asit sintigrafisi

3.2. Myeloid hücrelerde TLR-4 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi

3.2.1. Periferik kan hücrelerinin lipopolisakkarit ile in vitro uyarılması

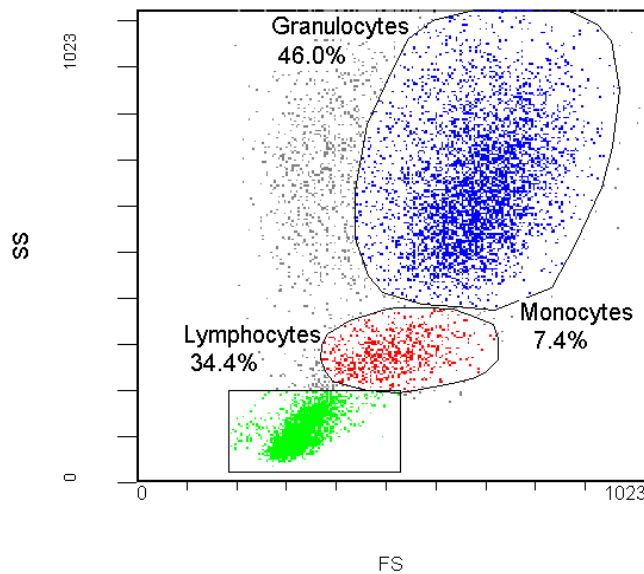
Hastalardan alınan venöz kan örnekleri steril lityum-heparin içeren tüplere (Vacutainer[®], BD-Plymouth, UK) aktarıldı ve yarım saat içinde işleme alındı. Bu amaçla 1 ml venöz kan örneğine 1 µg/ml konsantrasyonda *Salmonella enterica serotype minnesota*'dan elde edilen LPS (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA) eklenerek steril doku kültür tüplerinde (Greiner bio-one, Germany) 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübe edildi (uyarılmış TLR-4 ekspresyon tayini için). Aynı işlemler her hasta için LPS yerine steril serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye) kullanılarak tekrarlandı (bazal TLR-4 ekspresyon tayini için).

3.2.2. Akım sitometrik boyama yöntemi

TLR-4 ekspresyon analizi HTA125 klonundan elde edilen phycoerythrin (PE) işaretli monoklonal antikor (Thermo Scientific, USA) kullanılarak yapıldı. Negatif kontrol olarak fluorokrom işaretli izotipik fare IgG1 antikorları kullanıldı (Thermo Scientific, USA). Bütün antikorlar yeterli antikor konsantrasyonunu saptamak için sağlıklı kontrol ve pyelonefrit hastalarının LPS ile uyarılmış hücrelerinde titre edildi. Hücreler, ilgili antikor ile buzdolabında 20 dakika inkübe edildi. Kırmızı kan hücreleri üretici firmanın önerisi doğrultusunda BD FACS™ solüsyonu (BD Biosciences, San Jose, USA) kullanılarak parçalandı. Eritrosit lizatları ve bağlanmayan antikorlar fosfat tamponu (PBS) ile 3 defa yıkanarak (1200/dk hızında 5 dakika santrifüj edilerek) uzaklaştırıldı.

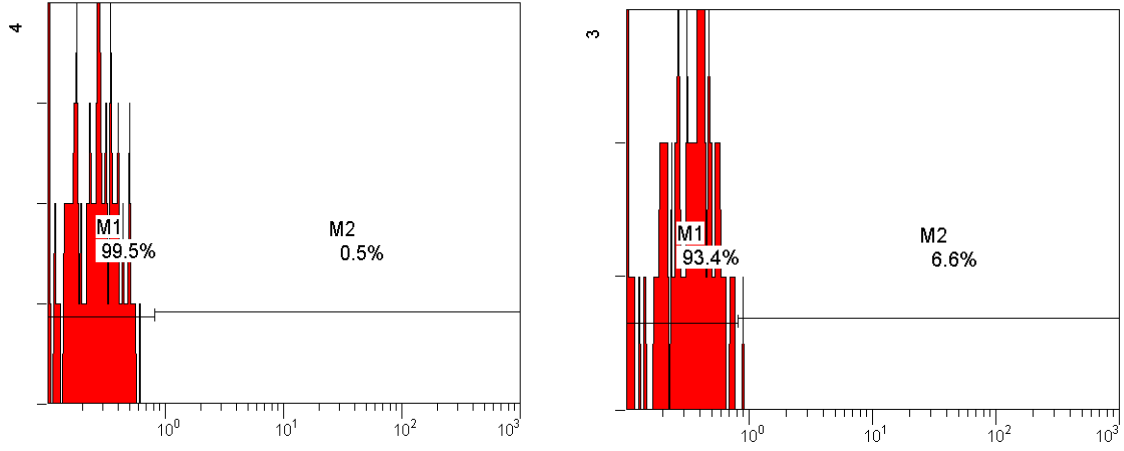
3.2.3. Akım sitometrik analiz

TLR-4 hücre yüzey ekspresyon ölçümü BD FACSCalibur™ akım sitometri cihazı ile (BD Biosciences, San Jose, USA) yapıldı. Monositler ve nötrofiller forward scatter (FSC, ön saçılım) ve side scatter (SSC, yan saçılım) detektörlerinin dot plot görüntüsünde ayrı ayrı kapılandırılarak tanımlandı (Şekil 6).

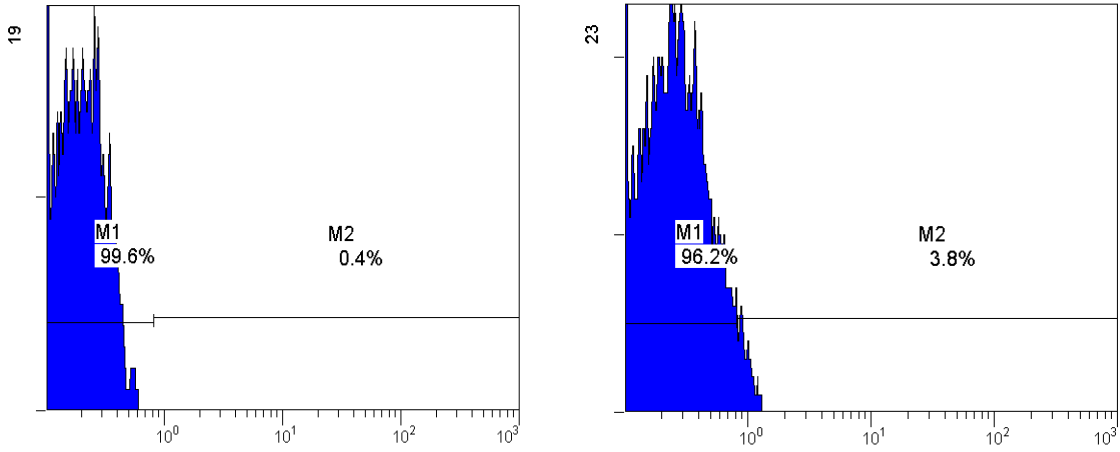


Şekil 6: Monosit ve granülosit hücre gruplarının belirlenmesi

PE işaretli TLR-4 antikollarının fluoresansı 10^3 'lük logaritmik bir skala üzerinde ölçüldü. TLR ekspresyonu negatif ve pozitif değerler logaritmik histogram üzerinde sırasıyla M1 ve M2 markerleri ile ayırt edildi. İzotipik antikolar ile ölçülen fluoresans ölçümün üzerindeki değerler, TLR ekspresyonu pozitif olarak değerlendirildi ve “%” (TLR ekspresyonu pozitif olan hücre yüzdesi) olarak ifade edildi. İzotipik antikolar ile aynı ya da daha düşük fluoresans ölçümleri ise negatif olarak kabul edildi (Şekil 7,8). Ölçümlere ait istatistiksel değerlendirme BD CellQuest™ Pro Software kullanılarak elde edildi. Hücre başına “ortalama fluoresans yoğunluğu” (OFY), eşit eriyebilir fluorokrom moleküllere dönüştürüldü. M2 değeri ile kaydedilen hücrelerin yüzdesi değişken olduğu için, her bir denek için TLR4-göstergesi ($TLR4_{gös}$) “OFY x M2 (%)” olarak belirlendi. TLR-4 ekspresyonu hem bazal şartlarda, hem de LPS uyarısı sonrası değerlendirildiğinden, LPS ile uyarı sonrası TLR4-göstergesinin bazal TLR4-göstergesine oranı “uyarı indeksi” olarak hesaplandı: $UI = (OFY \times \%)_{LPS} / (OFY \times \%)_{Bazal}$ (59).



Şekil 7: Monositlerde bazal TLR-4 ekspresyon düzeyleri. Solda izotipik kontrol ile boyanma, sağda PE ile işaretli TLR-4 ile boyanma.



Şekil 8: Nötrofillerde bazal TLR-4 ekspresyon düzeyleri. Solda izotipik kontrol ile boyanma, sağda PE ile işaretli TLR-4 ile boyanma.

3.3. Toll-like reseptör 4 polimorfizmlerinin belirlenmesi

Genomik DNA, periferik tam kandan Genomik DNA Purifikasyon Kiti (Roche, Germany) kullanılarak elde edildi. TLR-4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) tekniği ile belirlendi. TLR-4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerinin belirlenmesinde RFLP analizi için, uygun primerler (sırasıyla; 5'-gatagcatacttagactactactacctcctccatg-3', 5'-gatcaacttctgaa aaagcattcccac-3', 5'-ggttgctggtttctcaaaaggtggattttggggaagaa-3', 5'-acctgaaaggac ctggaggaagtgagtttaaattgct-3') (Metabion, Germany) seçilerek PCR yapıldı.

PCR reaksiyonu, "thermal cycler" da (MJ Research, USA) 100 ng genomik DNA'nın her birinden 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 50 pmol/µl primer, 1.0 U/µl Taq polimeraz (Roche, Germany) ve PCR tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, %0.1 Triton-X 100) içeren 50 µl'lik reaksiyon karışımında, 94°C'de 5 dakika (1 döngü), 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika (36 döngü) ve son olarak 72°C'de 5 dakika (1 döngü) tutularak gerçekleştirildi (60).

PCR ürünleri (TLR-4 Asp299Gly polimorfizmi için 250 baz çifti büyüklüğüne ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi için 406 baz çifti büyüklüğüne denk gelen bantlar) etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jel ile kontrol edildi (61). Baz değişikliği olan allel ile baz değişikliği olmayan allel'i ayırmak için NcoI ve HinfI (MBI Fermentas) isimli restriksiyon enzimleri ile PCR ürünü kesilerek 37°C'de bir saat inkübe edildi. Restriksiyon enzim ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra UV transluminator altında DNA moleküler ağırlık belirteci ile değerlendirildi. Asp299Gly genotipi için, nükleotid değişimini taşımayan normal bireylerde 250 baz çiftlik tek bant, heterozigot bireylerde 250 ve 220, 30 baz çiftlik üç bant, homozigot mutant bireylerde 220 ve 30 baz çiftlik iki bant görüldü. Thr399Ile genotipi için, nükleotid

değişimini taşımayan normal bireylerde 406 baz çiftlik tek bant, heterozigot bireylerde 406 ve 376, 30 baz çiftlik üç bant, homozigot mutant bireylerde 376 ve 30 baz çiftlik iki bant görüldü.

3.4. Çalışma sonuçlarının analizi

Çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda aşağıdaki değerlendirmeler yapıldı:

1. Renal skar (+) hastalar, renal skar (-) hastalar ve kontrol olguları arasında
 - a. TLR-4 Asp299Gly polimorfizm oranı
 - b. TLR-4 Thre399Ile polimorfizm oranı
 - c. Periferik kan granülosit ve monositlerinde bazal koşullarda TLR-4 ekspresyon düzeyi
 - d. Periferik kan granülosit ve monositlerinde LPS uyarısı sonrası TLR-4 ekspresyon düzeyi karşılaştırıldı.
2. TLR-4 Asp299Gly vs TLR-4 Thre399Ile polimorfizm sıklığı
 - a. Renal skar (+) hastalarda ve
 - b. Renal skar (-) hastalarda karşılaştırıldı.
3. VUR (+) ve VUR (-) hastalar arasında TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thre399Ile polimorfizm oranları ve TLR-4 ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı.
4. TLR-4 Asp299Gly ve/veya TLR-4 Thre399Ile polimorfizm taşıyanlar ile bu polimorfizmleri taşımayanlarda pyelonefrit atak sayısı karşılaştırıldı.

3.5. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel işlemler SPSS 15.0 istatistik programında yapıldı. Çoklu grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis ve sonrasında ikili grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U veya Wilcoxon signed rank testleri, ki-kare testi, gruplar arası korelasyonlar Spearman korelasyon testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Grupların demografik ve klinik özellikleri

Grupların demografik özellikleri ve Grup 1 ve 2'nin klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo 3 ve 4'de görülmektedir. Grup 1 ve Grup 2 arasında cinsiyet ve tanı yaşı bakımından fark saptanmadı. Ancak, Grup 3'te bu gruplara göre erkek oranı daha yüksek idi. Grup 3A'da hastaların yaşı diğer gruplardan büyük idi (Tablo 3). Grup 1 ve 2 arasında pyelonefrit sayısı, VUR oranı ve GFH düzeyleri farklı değildi. Serum kreatinin düzeyi Grup 1'de daha yüksek olmakla birlikte, ortalama düzeyler her iki grupta da normal aralıkta bulundu. Grup 1'de toplam 3 hastanın serum kreatinin düzeyi normal sınırların üstünde (ortalama 1.18 ± 0.36), GFH ise düşük (69.88 ± 24.47) bulundu.

Tablo 3. Grupların yaş ve cinsiyet bakımından karşılaştırılması

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	
	Renal skar (+)	Renal skar (-)	Kontrol	
	(n=86)	(n=82)	Grup 3A¹	Grup 3B²
			(n=100)	(n=20)
Yaş (yıl) ³	8.9 ± 4.3	7.4 ± 2.9	35.5±20.4	8.5 ± 6.3
Tanı yaşı (yıl) ⁴	3.0 ± 2.8	2.9 ± 2.9		
Cinsiyet (E/K) ⁵	13 / 73	18 / 64	48/52	10/10

1. TLR polimorfizmi taranan kontrol hastaları
2. TLR ekspresyonu belirlenen kontrol hastaları
3. Grup 1, Grup 2'den büyük ($p=0.024$). Grup 3A diğer gruplardan daha büyük ($p<0.001$)
4. Grup 1 ve 2 arasında fark yok ($p=0.770$)
5. Grup 1 ile 2 arasında fark yok ($p=0.173$). Grup 3, Grup 1 ve 2'den farklı ($p<0.001$)

Tablo 4. Grup 1 ve Grup 2'deki hastalarının klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulgularının karşılaştırılması

	Grup 1 (n=86)	Grup 2 (n=82)	p
Pyelonefrit sayısı	2.7 ± 2.7	1.9 ± 1.02	0.080
Vezikoüreteral reflü oranı (%)	56	43	0.084
Serum kreatinin (mg/dL) ¹	0.56 ± 0.17	0.51 ± 0.11	0.033
Glomerüler filtrasyon hızı ²	129.1 ± 26.7	128.2 ± 20.4	0.833

1. Son kontrollerde alınan değerler

2. Shwartz formülü kullanılarak hesaplanmıştır

Tablo 5'de Grup 1 ve Grup 2'deki patolojik renal USG bulguları gösterilmiştir.

Tablo 5. Grup 1 ve Grup 2'de renal USG bulguları

USG bulgusu	Grup 1 (n)	Grup 2 (n)
Atrofi	15	-
Hipoplazi	-	1
Ekojenite artışı	3	-
Çift toplayıcı sistem (inkomplet)	-	2
Multikistik displastik böbrek		1

Grup 1 ve Grup 2'deki VUR oranı farklı değildi (sırası ile 45/83 ve 29/67, p=0.084). Ancak Grup 1'de ağır reflü (\geq grade 3) oranı Grup 2'ye göre fazla bulundu (sırası ile 34/83 ve 16/67, p=0.036). Tablo 6'da Grup 1 ve 2'deki VUR dereceleri gösterilmiştir.

Tablo 6. Grupların vezikoüreteral reflü sıklığı ve derecesi

	Vezikoüreteral reflü derecesi						Toplam
	Yok	1. derece	2. derece	3. derece	4. derece	5. derece	
Grup1 [skar (+)]	38	2	9	22	10	2	83
Grup 2 [skar (-)]	38	5	8	13	2	1	67
Toplam	76	7	17	35	12	3	150

4.2. Myeloid hücrelerde TLR-4 ekspresyonu

Bazal şartlarda ve LPS ile uyarı sonrasındaki TLR-4 ekspresyonları Tablo 7 (monositler için) ve Tablo 8'de (nötrofiller için) görülmektedir. Grup 2 ve Grup 1'de bazal ve LPS ile uyarılmış monosit ve nötrofil TLR-4 ekspresyon yüzdesi (%), OFY ve TLR4_{gös} değerleri benzerdi. Öte yandan, Grup 3'de Grup 1 ve 2'ye göre bazal ve LPS uyarısı sonrası nötrofil ve monositlerde TLR-4 ekspresyonu anlamlı düzeyde daha fazla idi. Monosit ve nötrofillerdeki LPS teması sonrası TLR-4 ekspresyon artışı her 3 grupta anlamlı düzeyde bulundu.

Tablo 7. Monositlerde bazal ve LPS ile uyarılmış TLR-4 ekspresyon yüzdesi (%), ortalama floresans yoğunluğu (OFY), TLR-4 gösterge (TLR4_{gös}) değerleri ve uyarı indeksi (UI)

Grup	Bazal			LPS sonrası			UI ³
	% ¹	OFY ¹	TLR4 _{gös} ^{1,2}	% ¹	OFY ¹	TLR4 _{gös} ^{1,2}	
1	7.2±5.2	30.6±10.2	2.5±2.7	13.6±6.9	34.2±10	4.8±3.2	3.5±3.8
2	11.5±10.2	32.6±14.5	4.2±4.4	17.9±8.7	38.1±16.3	7.2±5.1	3.5±4.9
3	20±13.9	68±15.2	14±11.8	28.2±11.4	71.4±13.7	20.5±10.1	1.9±0.9

1 Grup 3'de Grup 1 ve 2'ye göre anlamlı yüksek (p<0.05)

2 Grup 1, 2 ve 3'te LPS sonrası anlamlı artış mevcut idi (sırası ile p<0.001, p<0.001 ve p=0.002)

3 Her 3 grup arasında anlamlı bir fark yok (p>0.05)

Tablo 8. Nötrofillerde bazal ve LPS ile uyarılmış TLR-4 ekspresyon yüzdesi (%), ortalama floresans yoğunluğu (OFY), TLR-4 gösterge (TLR4_{gös}) değerleri ve uyarı indeksi (UI).

Grup	Bazal			LPS sonrası			UI ³
	% ¹	OFY ¹	TLR4 _{gös} ^{1,2}	% ¹	OFY ¹	TLR4 _{gös} ^{1,2}	
1	2.7±3.0	31.9±13.4	0.9±1.1	5.0±3.3	32.3±11.9	1.8±2.3	3.1±3.1
2	3.1±3.1	35.1±15.7	1.3±1.9	5.8±3.9	33.6±10.2	2.1±1.9	3.0±3.0
3	6.7±4.6	70.5±15.4	4.8±3.3	11.5±5.4	72.9±17.6	8.3±4.8	2.3±1.6

1 Grup 3'de Grup 1 ve 2'ye göre anlamlı yüksek (p<0.05)

2 Grup 1, 2 ve 3'te LPS sonrası anlamlı artış mevcut idi (sırası ile p<0.001, 0.003 ve 0.003).

3 Her üç grup arasında anlamlı fark yok (p>0.05)

4.2.1. Vezikoüreteral reflü olan ve olmayan olgularda TLR4_{gös} düzeyleri

Vezikoüreteral reflü varlığı renal skar gelişimi açısından risk faktörü olmakla birlikte, VUR (-) olgularda da skar oluştuğu bilinmektedir (20). Bu nedenle renal skar (+) grupta (Grup 1) VUR (-) olguların lökosit TLR4_{gös} düzeylerinin VUR (+) olgulardan farklı olup olmadığı da araştırıldı. VUR (-) ve VUR (+) olgular arasında bazal ve LPS sonrası nötrofil TLR4_{gös} düzeyleri ile bazal monosit TLR4_{gös} düzeyleri farklı bulunmadı. Sadece LPS sonrası monosit TLR4_{gös} düzeyleri VUR (-) olgularda daha yüksek bulundu (Tablo 9 ve 10). Öte yandan, Grup 1'de yüksek derece (≥3. derece) VUR'u olanlar ile diğer olgular (düşük derece VUR'u olanlar + VUR'u olmayanlar) karşılaştırıldığında, TLR4_{gös} düzeylerinin farklılık göstermediği belirlendi (Tablo 11 ve 12). Benzer şekilde, Grup 1 ve 2'deki tüm olgular dikkate alındığında yüksek derece VUR'u olanlar ve diğer olgular arasında TLR4_{gös} düzeyleri de farklı bulunmadı (veriler gösterilmemiştir).

Tablo 9. Grup 1’de VUR (+) ve VUR (-) hastaların nötrofillerinde bazal ve LPS sonrası TLR4_{gös} değerleri

TLR4_{gös}	VUR (+) (n = 16)	VUR (-) (n = 8)	p
Bazal	0.9 ± 1.3	0.7 ± 0.4	0.834
LPS sonrası	1.9 ± 2.8	1.4 ± 0.7	0.697

Tablo 10. Grup 1’de VUR (+) ve VUR (-) hastaların monositlerinde bazal ve LPS sonrası TLR4_{gös} değerleri

TLR4_{gös}	VUR (+) (n = 16)	VUR (-) (n = 8)	p
Bazal	2.3 ± 3.1	2.9 ± 1.6	0.093
LPS	4.2 ± 3.7	6.1 ± 1.6	0.011

Tablo 11. Grup 1’de yüksek derece (≥3. derece) VUR’u olanlar ile diğer olguların (düşük derece VUR’u olanlar + VUR’u olmayanlar) nötrofillerinde bazal ve LPS sonrası TLR4_{gös} değerleri

TLR4_{gös}	VUR (≥3. derece) (n = 15)	VUR(<3.derece) (n = 24)	p
Bazal	0.9 ± 1.4	1.2 ± 1.8	0.371
LPS sonrası	2.1 ± 2.9	1.7 ± 1.5	0.977

Tablo 12. Grup 1’de yüksek derece (≥ 3 . derece) VUR’u olanlar ile diğer olguların (düşük derece VUR’u olanlar + VUR’u olmayanlar) monositlerinde bazal ve LPS sonrası TLR4_{gös} değerleri

TLR4 _{gös}	VUR (≥ 3 . derece) (n = 15)	VUR(<3.derece) (n = 24)	p
Bazal	2.7 \pm 3.1	3.8 \pm 4.0	0.326
LPS sonrası	5.4 \pm 4.8	6.4 \pm 4.1	0.091

4.2.2. Tek ve birden fazla pyelonefrit atağı geçiren olgularda TLR4_{gös} düzeyleri

Sadece 1 pyelonefrit atağı geçiren olgular ile tekrarlayan (>1) pyelonefrit atağı geçiren olgular arasında lökosit TLR4_{gös} düzeylerinin farklı olup olmadığı da araştırıldı. Ancak, TLR4_{gös} düzeylerinin bu iki grup hasta arasında farklılık göstermediği belirlendi (Tablo 13 ve 14).

Tablo 13. Bir ve tekrarlayan pyelonefrit atağı geçiren olguların nötrofillerinde bazal ve LPS sonrası TLR4_{gös} değerleri

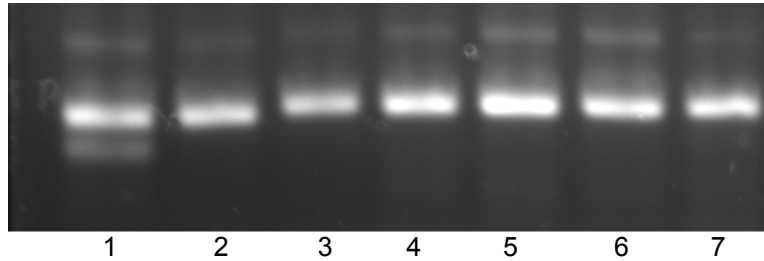
TLR4 _{gös}	1 pyelonefrit (n = 8)	≥ 1 pyelonefrit (n = 11)	p
Bazal	0.8 \pm 0.9	1.0 \pm 1.4	0.657
LPS	1.7 \pm 1.2	2.1 \pm 3.4	0.272

Tablo 14. Bir ve tekrarlayan pyelonefrit atağı geçiren olguların monositlerinde bazal ve LPS sonrası TLR4_{gös} değerleri

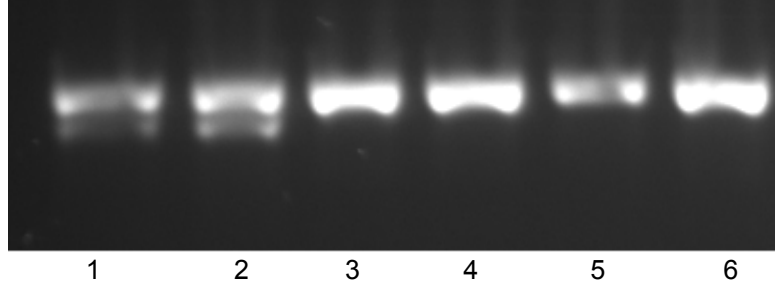
TLR4 _{gös}	1 pyelonefrit (n = 8)	≥ 1pyelonefrit (n = 11)	p
Bazal	3.6 ± 4.2	2.8 ± 3.6	0.545
LPS	7.4 ± 4.9	5.3 ± 4.0	0.351

4.3. Toll-like reseptör 4 polimorfizm oranları

TLR-4 Asp299Gly polimorfizmi kontrol vakalarında %3 sıklıkta saptanır iken renal skarlı pyelonefritli olgularda %3.5, renal skarı olmayan pyelonefritli hastalarda ise %8.5 sıklıkta saptandı. TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi ise kontrol vakalarında %2, renal skarlı pyelonefritli olgularda %14, renal skarı olmayan pyelonefritli hastalarda ise %12 sıklıkta mevcut idi. Polimorfizm saptanan tüm olgular, bu polimorfizmler için heterozigot idi (Şekil 9-10).



Şekil 9: TLR-4 Asp299Gly polimorfizmi. NcoI restriksiyon enzim kesimlerinin %2'lik jelde yürütülmüş resmi. Birinci vaka heterozigot TLR4 Asp299Gly polimorfizmi taşıyor, diğerleri homozigot normal.



Şekil 10: TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi. Hinfl restriksiyon enzim kesimlerinin %2'lik jelde yürütülmüş resmi. Bir ve ikinci vakalar heterozigot TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi taşıyor, diğerleri homozigot normal.

Gruplar arasında TLR-4 Asp299Gly polimorfizm sıklığı farklı değildi. Ancak, TLR-4 Thr399Ile polimorfizm sıklığı pyelonefritli olgularda (Grup 1 ve Grup 2) kontrol vakalarına göre daha fazla idi (Tablo 15).

Tablo 15. Grupların TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları.

GRUP	TLR4 Asp299Gly ¹		TLR4 Thr399Ile ²	
	n	%	N	%
Grup 1 (skar [+]) (n=86)	3	3.5	12	14
Grup 2 (skar [-]) (n=82)	7	8.5	10	12.2
Grup 3 (kontrol) (n=100)	3	3	2	2

1 Gruplar arasında fark yok (p>0.05)

2 Grup 1 ve Grup 2'de Grup 3'e göre daha sık (sırası ile p=0.004, p=0.015)

4.3.1. Vezikoüreteral reflü olan ve olmayan olgularda TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları

VUR (+) ve VUR (-) hastalar arasında, TLR-4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizm sıklıkları farklı değil idi. Ancak TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi hem VUR olan hem de VUR olmayan grupta kontrol grubuna göre fazla saptandı (Tablo 16). Ayrıca Grup 1 ve Grup 2 ayrı ayrı değerlendirildiğinde de VUR(+) ve VUR (-) olgular arasında her iki polimorfizm sıklığı farklı değildi (veriler gösterilmemiştir). Öte yandan, Grup 1 ve 2'deki VUR (+) hastalar arasında TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm sıklığı farklı bulunmadı. Benzer şekilde Grup 1 ve 2'deki VUR (-) hastalar arasında da her iki polimorfizm sıklığı benzerdi (veriler gösterilmemiştir).

Tablo 16: VUR (+) ve VUR (-) hastalarda TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları.

Vezikoüreteral reflü	TLR-4 Asp299Gly ¹		TLR-4 Thr399Ile ²	
	n	%	n	%
VUR (+)	6	8	10	13
VUR (-)	3	4	10	13
Kontrol	3	3	2	2

1 Gruplar arasında fark yok ($p>0.05$)

2 Kontrol grubunda VUR (+) ve VUR (-) gruba göre sıklık az (sırası ile $p=0.013$, $p=0.007$)

4.3.2. Tek ve birden fazla pyelonefrit geçiren olgularda TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm oranları

Sadece 1 pyelonefrit atağı geçiren olgular ile tekrarlayan (>1) pyelonefrit atağı geçiren olgular arasında TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thr399Ile polimorfizm sıklıkları da karşılaştırıldı. Ancak, bu polimorfizm sıklıklarının her iki grup arasında farklılık göstermediği belirlendi (Tablo 17).

Tablo 17: Tek ve birden fazla pyelonefrit geçiren olgularda TLR-4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizm oranları

Pyelonefrit sıklığı	TLR-4 Asp299Gly ¹		TLR-4 Thr399Ile ²	
	n	%	n	%
Tek	2	5	5	12
Tekrarlayan	4	7	7	12
Kontrol	3	3	2	2

1 Gruplar arasında fark yok ($p>0.05$)

2 Kontrol grubunda 1 ve >1 pyelonefrit geçirenlerden daha az (sırası ile $p=0.026$, $p=0.012$)

5. TARTIŞMA

Pyelonefrit sonrası gelişen renal skarin patofizyolojisi halen tam olarak açıklanamamıştır. Ancak pyelonefrit geçirme yaşı ve sıklığı, antimikrobiyal tedaviye başlama zamanı, bakteriyel virülans ve konağın genetik yapısının pyelonefrit sonrası gelişen renal skarda önemli faktörler olduğu daha önce belirtilmiştir (62-67). Genetik faktörler, mikroorganizmanın renal dokuya invazyonundan, pyelonefrit ve sonrasında gelişen renal skara kadar olan süreçteki herhangi bir basamağı etkileyerek, bu süreci kolaylaştırabilir veya önleyebilir (20).

İYE sırasında veya sonrasında sitokinler, reseptörler ve adezyon molekülleri gibi çeşitli gen ürünlerinin farklı konsantrasyonları inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rol oynarlar. Bu nedenle, çalışmalar bu genlerin polimorfizmleri veya polimorfizm kombinasyonları üzerinde odaklanmıştır (67). Gram (-) mikroorganizmaların renal epitel ve innate immün sistem hücreleri tarafından tanınmasında TLR-4'ün rolü bilinmektedir. Bu nedenle, İYE olgularında TLR-4 gen polimorfizmleri araştırılmıştır.

TLR-4 polimorfizmi ile İYE arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, sıklıkla TLR-4 A(896)G genotipi (TLR-4 Asp299Gly polimorfizmi) üzerinde durulmuştur. İdrar yolu enfeksiyonu olan 103 çocuk ve 235 sağlıklı kontrol olgu ile yapılan bir çalışmada, tekrarlayan alt ve üst İYE'li çocuklarda renal anormalliklerden bağımsız olarak kontrollere göre TLR-4 (896)AG genotipinin ve TLR-4 (896)G allelinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (sırası ile genotip için %15 vs %8, allel için %8 vs %4) (9). Erişkin İYE'li hastalarda da TLR-4 A(896)G genotipi ve TLR-4 (896)G allel sıklığı kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur (sırası ile genotip için %16 vs %9, allel için %8 vs %4). Ancak, bu çalışmada akut üretrit ve sistitli olgular kontrollerden farklı iken, akut pyelonefritli hastalarda kontrollere göre fark saptanmamıştır (12). Öte

yandan, erişkin kadınlarda yapılan bir çalışmada TLR-4 A896G genotip ve allel sıklığı sistit (n=431) vakalarında kontrollerden (n=430) daha az, pyelonefrit (n=400) vakalarında ise kontrollerden daha yüksek bulunmuştur. Yazarlar TLR-4 A896G genotipinin sistitten koruyucu olduğu, pyelonefritten ise koruyucu olmadığı sonucuna varmışlardır (11). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, TLR-4 A896G genotip ve allel sıklığı İYE'li çocuklarda (n=112) sağlıklı çocuklardan (n=93) farklı bulunmamış, ancak üst İYE'li çocuklarda alt İYE'li çocuklara göre daha fazla saptanmıştır (13). Çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak sadece pyelonefrit geçirmiş olan çocuklarda ve sağlıklı olgularda TLR-4 Asp299Gly polimorfizm sıklığı incelenmiş ve iki grup arasında fark saptanmamıştır (%6 vs %3).

Vezikoüreteral reflü, özellikle yüksek derece olanlar, İYE için bir risk faktörüdür (68). Ancak, pyelonefrit atağı geçiren hastaların yarısından fazlasında VUR olmadığı da bilinmektedir (25). VUR (-) olduğu halde pyelonefrit geçiren hastalarda TLR-4 polimorfizmlerinin daha sık görülmesi öngörülebilir. Nitekim TLR-4 A896G polimorfizminin VUR ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada VUR (-) hastalarda TLR-4 A896G allelinin sıklığı VUR (+) hastalardan yüksek olma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (%13 vs %2). Yazarlar İYE'ye predispozan anatomik anormalliği olmayan hastalarda TLR-4 polimorfizmi gibi genetik faktörlerin öneminin daha fazla olabileceğini öne sürmüşlerdir (9). Ancak, bizim hasta grubumuzda VUR (-) ve VUR (+) hastalar arasında her iki TLR-4 polimorfizminin sıklığı farklı bulunmamıştır (TLR-4 Asp299Gly için %4 vs %8; TLR4 Thr399Ile için %13 vs %13).

TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin İYE'deki rolüne ilişkin çok sayıda çalışma olmasına karşın, literatürde TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi ile İYE arasındaki ilişkinin araştırıldığı

sadece bir çalışma bulunmaktadır. Ülkemizde gerçekleştirilen bu çalışmada, sağlıklı (n=30) ve İYE'li (n=30) çocukların hiçbirinde TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi saptanmamıştır (55). Bizim çalışma grubumuzdaki 168 hastanın 22 tanesinde (%13) ise TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi belirlenmiştir. Bu oran kontrol olgulardakine göre (%2) anlamlı ölçüde yüksektir. Önceki çalışmada hasta ve kontrol olgularının sayısının yetersiz olması, TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi sıklığını etkilemiş olabilir.

Myeloid hücrelerde LPS ile temas sonrasında transmembran sinyali için TLR-4 ekspresyonu artmaktadır (56). Bu nedenle, Gram (-) bakteri enfeksiyonu ve sepsisli olgularda TLR-4 ekspresyon düzeyleri daha önce araştırma konusu olmuş, septik hastalarda kontrol olgularına göre monositlerde TLR-4 ekspresyonunun arttığı, granüositlerde ise azaldığı gösterilmiştir (57). Lökositlerde TLR-4 ekspresyon düzeyi ile İYE ilişkisinin araştırıldığı 2 çalışma bulunmaktadır. Birinde asemptomatik bakteriürlü çocuklarda (n=17) kontrol (n=24) olgulara göre nötrofillerde TLR-4 ekspresyonunun daha az olduğu gösterilmiştir (14). Diğer çalışmada ise tekrarlayan pyelonefritli hastalarda, tek pyelonefrit geçiren hastalara ve kontrol olgularına göre monositlerde TLR-4 ekspresyonu daha düşük düzeyde bulunmuştur (12). Çalışmamızda, hem nötrofil hem de monositlerde TLR-4 ekspresyon düzeyleri pyelonefritli olgularda kontrol grubundan düşük bulundu. Bununla birlikte, tekrarlayan pyelonefrit ile tek pyelonefritli hastalar arasında ekspresyon düzeyi farklı bulunmadı. Öte yandan, çalışmamızda VUR (+) ve VUR (-) hastaların lökosit TLR-4 ekspresyon düzeyleri de araştırılmıştır. Literatürde verilerimizi karşılaştıracak veri olmamakla birlikte bu iki grup hastanın lökositlerindeki bazal ve LPS sonrası TLR-4 ekspresyon düzeyleri birbirinden farklı bulunmamıştır.

İdrar yolu enfeksiyonlarında TLR-4 polimorfizmi ve ekspresyonlarının rolü üzerinde

çok sayıda çalışma yapılmış olmakla birlikte, pyelonefrit sonrası renal skar oluşumuna TLR-4 polimorfizmlerinin ve ekspresyon düzeylerinin etkisi üzerinde fazla durulmamıştır. Bu alanda yapılan çalışmalardan birinde, TLR-4 (896)G allel sıklığı renal skar (+) pyelonefritlilerde, renal skar (-) pyelonefritli olgulardan ve kontrol grubundan farklı bulunmamıştır (sırası ile %7, %8 ve %4) (9). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise skar (+) pyelonefritli çocuklarda (%11) skar (-) pyelonefritli çocuklara (%5) göre TLR-4 (896)G allel sıklığı daha fazla bulunmakla birlikte, anlamlı bir fark olmadığı rapor edilmiştir. Dahası, bu iki grup ile sağlıklı kontroller (%7) arasında da fark saptanmamıştır (13). TLR-4 299AspGly polimorfizm sıklığı bizim skar (+) ve skar (-) pyelonefritli olgularımızda ve kontrol vakalarında benzer idi (sırası ile %3.5, %8.5 ve %3). Öte yandan, diğer çalışmalardan farklı olarak hastalarımızda TLR-4 Thr399Ile polimorfizm sıklığı da araştırılmış ve skar (+) ile skar (-) pyelonefritli hastalar arasında farklı bulunmamıştır (sırası ile %14 ve %12.2).

Lökositlerde TLR-4 ekspresyon düzeyi ile renal skar gelişimi arasındaki ilişkiyi araştıran geniş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda nötrofil ve monositlerde bazal ve LPS sonrası TLR-4 ekspresyon düzeyleri skar (+) pyelonefritli ve skar (-) pyelonefritli olgularda kontrol olgularından düşük bulundu. Ancak, skarlı ve skarsız pyelonefritli hastalar arasında fark saptanmadı.

Literatürde TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin İYE ve renal skar gelişimi üzerindeki etkilerine yönelik değişken sonuçlar rapor edilmiştir. Çalışmaların bir kısmında bu polimorfizmin asemptomatik bakteriüri, İYE ve pyelonefrite yatkınlık yarattığı bildirilirken (9,12,13), Hawn ve ark.'nın çalışmasında alt İYE'li hastalarda daha düşük oranda görüldüğü ve bu polimorfizmin sistite karşı koruma sağladığı ifade edilmiştir (11). Çalışmamızda elde edilen veriler TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin pyelonefrit ve renal skara eğilimi etkilemediği yönündedir. Öte yandan, daha önce TLR-4 Thr399Ile polimorfizminin İYE ile ilişkisinin araştırıldığı tek bir çalışma bulunmaktadır ve olgu sayısının çok düşük olduğu çalışmada bu polimorfizm hastaların hiçbirinde saptanmamıştır. Bizim çalışma grubumuzda ise TLR-4 Thr399Ile polimorfizmi pyelonefritli hastalarda %13 gibi yüksek bir oranda saptanmıştır ve pyelonefrit atağı geçirme eğiliminin bu polimorfizmi taşıyanlarda daha belirgin olarak arttığı görülmektedir (OR 7.4). Bununla birlikte, pyelonefrit sayısı ve renal skar gelişimine adı geçen polimorfizmin etkisi gözlenmemiştir. Çalışmamızda renal skar gelişimini etkileyen temel faktör yüksek derece VUR varlığı olarak saptanmıştır. Karoly ve ark. TLR-4 Asp299Gly polimorfizminin VUR (-) hastalarda VUR (+) olanlara göre yüksek sıklıkta görüldüğünü bildirmişler ve İYE'ye predispozan anatomik anormalliği olmayan hastalarda genetik faktörlerin hastalık oluşumundaki öneminin arttığını vurgulamışlardır (9). Bununla birlikte, bizim hastalarımızdan VUR (-) ve VUR (+) olanlar arasında ne TLR-4 Asp299Gly ne de TLR-4 Thr399Ile polimorfizm sıklığı farklı bulunmamıştır.

Lökositlerde TLR-4 ekspresyon düzeyinin asemptomatik bakteriüri ve tekrarlayan İYE'de azaldığı bildirilmiştir (12,14). Ragnarsdottir ve ark. asemptomatik bakteriüri hastalarda azalmış TLR-4 ekspresyonunun üriner sistemi inflamasyonun

sekellerinden koruduğunu ileri sürmüşlerdir. Bizim hasta grubumuzda ise skar varlığından bağımsız olarak pyelonefritli hastalarda sağlıklı kontrollere göre monosit ve nötrofil TLR-4 ekspresyon düzeyleri düşük bulunmuştur. Bu veriler lökositlerde azalmış TLR-4 ekspresyon düzeyinin pyelonefrite yatkınlığı arttırdığını, ancak pyelonefrit atağı geçirenlerde renal skar gelişimini değiştirmedığini göstermektedir.

Sonuç olarak, TLR-4 Thre399ile polimorfizmi pyelonefritli hastalarda sağlıklı kontrollerden fazla görölmektedir. Öte yandan, pyelonefritli hastalarda lökosit TLR-4 ekspresyon düzeyi de kontrol grubundan düşüktür. Bu durum, TLR-4 Thre399ile polimorfizmini taşıyan ve/veya TLR-4 ekspresyon düzeyleri düşük olan çocuklarda, olasılıkla üriner sistemden bakteri eradikasyonunun güçleşmesine bağlı olarak, pyelonefrit gelişimine yatkınlık olması ile açıklanabilir.

6. SONUÇLAR

1. Grup 2'de Grup 1'e göre bazal ve LPS ile uyarılmış monosit ve nötrofil TLR-4 ekspresyon düzeyi daha yüksek, ancak istatistiksel olarak anlamlı değil idi. Ancak, TLR-4 ekspresyon düzeyi Grup 1 ve 2'de Grup 3'e göre anlamlı ölçüde düşük saptandı. Her üç grupta, bazal düzeylere göre LPS sonrası monosit ve nötrofil TLR-4 ekspresyonunda anlamlı artış belirlendi.

2. TLR-4 Asp299Gly polimorfizm sıklığı her üç grup arasında farklı değil iken, TLR-4 Thr399Ile polimorfizm sıklığı Grup 1 ve 2'de (pyelonefritli hastalar) Grup 3'e (sağlıklı kontroller) göre fazla bulundu. Grup 1 (skar olan) ve Grup 2 (skar olmayan) arasında fark saptanmadı.

3. Hem Grup 1'de hem de Grup 2'de VUR (+) ve VUR (-) hastalar arasında ne TLR-4 polimorfizm sıklıkları ne de lökosit TLR-4 ekspresyon düzeyleri bakımından fark saptanmadı.

4. Tek İYE ve tekrarlayan İYE geçiren hastalar arasında TLR-4 ekspresyon düzeyleri ve TLR-4 polimorfizm sıklıkları farklı bulunmadı.

7. KAYNAKLAR

1. Orellana P, Baquedano P, Rangarajan V, Zhao JH, Eng ND, Fettich J, Chaiwatanarat T, Sönmezoğlu K, Kumar D, Park YH, Samuel AM, Sixt R, Bhatnagar V, Padhy AK. Relationship between acute pyelonephritis, renal scarring and vesicoureteral reflux. Results of a coordinated research Project. *Pediatr Nephrol* 2004; 19:1122-1126.
2. Roberts JA. Mechanisms of renal damage in chronic pyelonephritis. *Curr Top Pathol* 1995; 88:265-287.
3. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-376.
4. Vandewalle A. Toll- like receptors and renal bacterial infections. *Chang Gung Med J*. 2008; 31:525-537.
5. Mak RH, Kuo HJ. Pathogenesis of urinary tract infection:an update. *Curr Opin Pediatr*. 2006 Apr;18:148-152.
6. Gluba A, Banach M, Hanam S, Mikhailidis DP, Sakowicz A, Rysz J. The role of Toll-like receptors in renal diseases. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6:224-235.
7. Agnese DM, Calvano JE, Hahm S, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186:1522-1525.
8. Anders HJ, Patole PS. Toll-like receptors recognize uropathogenic *Escherichia coli* and trigger inflammation in the urinary tract. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:1529-1532.
9. Karoly E, Fekete A, Banki NF, Szebeni B, Vannay A, Szabo AJ, Tulassay T, Reusz GS. Heat shock protein 72 (HSPA1B) gene polymorphism and Toll-like

- receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Res.* 2007; 61:371-374.
10. Tabel Y, Berdeli A, Mir S. Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *Int J Immunogenet.* 2007; 34:399-405.
 11. Hawn TR, Scholes D, Li SS, Wang H, Yang Y, Roberts PL, Stapleton AE, Janer M, Aderem A, Stamm WE, Zhao LP, Hooton TM. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *Plos One.* 2009 22; 4:e5990.
 12. Yin X, Hou T, Liu Y, Chen J, Yao Z, Ma C, Yang L, Wei L. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphism and expression with urinary tract infection types in adults. *Plos One.* 2010; 5:e14223.
 13. Akil I, Ozkinay F, Canda E, Onay H, Gumuser G, Kavukcu S. Assessment of effects of toll-like receptor-4 gene polymorphism on pyelonephritis and irreversible renal scar formation. 3rd Southeast European pediatric nephrology working group meeting. 9-12 November 2008, Kapadokya, PP19.
 14. Ragnarsottir B, Samuelsson M, Gustafsson MC, Leijonhufvud I, Karpman D, Svanborg C. Reduced toll-like receptor 4 expression in children with asymptomatic bacteriuria. *J Infect Dis.* 2007 ;196:475-84.
 15. Hoberman A, Wald ER. Urinary tract infections in young febrile children. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16:11–17.
 16. Winberg J, Andersen HJ, Bergstrom T, Jacobsson B, Larson H, Lincoln K. Epidemiology of symptomatic urinary tract infection in childhood. *Acta Paediatr Scand* 1974;(Suppl.):1–20.
 17. Ronald A. The etiology of urinary tract infection. Traditional and emerging pathogens. *Dis Mon.* 2003; 49:71–82.

18. Lidfeldt KJ, Erasmie U, Bollgren I. Residual urine in children with acute cystitis and in healthy children: assessment by sonography. *J Urol*. 1989;141:916–917.
19. Merguerian PA, Sverrisson EF, Herz DB, McQuiston LT. Urinary tract infections in children: recommendations for antibiotic prophylaxis and evaluation. An evidence-based approach. *Curr Urol Rep* 2010; 11:98–108.
20. Jahnukainen T, Chen M, Celsi G. *Pediatr Nephrol* 2005; 20:1043-1053.
21. Mattoo TK, Mathews R. Vesicoureteral Reflux and Renal Scarring. In: *Pediatric Nephrology*, 6th edn, Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009, pp1311-1336.
22. Roberts JA. Etiology and pathophysiology of pyelonephritis. *Am J Kidney Dis* 1991;17:1–9.
23. Pohl HG, Ruhton HG. Urinary tract infections in children. In: *The Kelalis–King–Belman Textbook of Clinical Pediatric Urology*, 5th edn, Docimo SG, Canning DA, Khoury AE (eds). Mortimer Street, London 2009, pp103-1166.
24. Heine H. TLRs, NLRs and RLSs: Innate sensors and their impact on allergic diseases- A current view. *Immunol Lett*. 2011; 139:14-24.
25. Turul T, Ersoy F. Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll-like reseptörler (TLR). *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35:114-118.
26. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. Toll-like receptor mediates lipopolysaccharide induced cellular signalling. *Nature*. 1998; 395: 284-288.
27. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86:973-983.
28. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:499-511.

29. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domaincontaining adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:353-364.
30. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 2007; 164:5998-6004.
31. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.* 2000; 25:187-191.
32. Faure EO, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates NF- κ B through Toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells: differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:11058- 11063.
33. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J. Immunol.* 2000; 164:966-972.
34. Mokuno Y, Matsuguchi T, Takano M, Nishimura H, Washizu J, Ogawa T, Takeuchi O, Akira S, Nimura Y, Yoshikai Y. Expression of Toll-like receptor 2 on T cells bearing invariant V 6/V1 induced by *Escherichia coli* infection in mice. *J. Immunol.* 2000;165:931-940.
35. Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steintraesser L, Alarcon WH, Remick DG, Wang SC. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and Toll like receptor 4. *Hepatology.* 2000; 31:932-936.

36. Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. Signaling danger: Toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:854-67.
37. Fredeus B, Wachtler C, Hedlund M, Fischer H, Samuelsson P, Svensson M, Svanborg C. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol Microbiol.* 2001; 40:37–51.
38. Shahin RD, Engberg I, Hagberg L, Svanborg-Eden C. Neutrophil recruitment and bacterial clearance correlated with LPS responsiveness in local Gram-negative infection. *J. Immunol.* 1987;138:3475-3480.
39. Haraoka M, Hang L, Fredeus B, Godaly G, Burdick M, Strieter R, Svanborg C. Neutrophil recruitment and resistance to urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* 1999; 80:1220-1229.
40. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2002; 168: 5233–5239.
41. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd: The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001; 276: 10229–10233.
42. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2001; 167: 2887–2894.
43. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 2002; 195: 99–111.
44. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol.* 2000; 164: 558–561.

45. Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Kirschning CJ, Da Costa C, Rammensee HG, Wagner H, Schild H. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277: 20847–20853.
46. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK: Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002; 277: 15028–15034.
47. Montes AH, Asensi V, Alvarez V, Valle E, Ocaña MG, Meana A, Carton JA, Paz J, Fierer J, Celada A. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143:404-413.
48. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med.* 2002; 162:1028-1032.
49. Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem.* 2002; 48:1661-1667.
50. Calvano JE, Bowers DJ, Coyle SM, Macor M, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF. Response to systemic endotoxemia among humans bearing polymorphisms of the Toll-like receptor 4 (hTLR4). *Clin Immunol.* 2006; 121:186-190.
51. Imahara SD, Jelacic S, Junker CE, O'Keefe GE. The TLR4 +896 polymorphism is not associated with lipopolysaccharide hypo-responsiveness in leukocytes. *Genes Immun.* 2005; 6:37-43.

52. Heesen M, Bloemeke B, Kunz D. The cytokine synthesis by heterozygous carriers of the Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism does not differ from that of wild type homozygotes. *Eur Cytokine Netw.* 2003; 14:234-237.
53. Von Aulock S, Schröder NW, Gueinzus K, Traub S, Hoffmann S, Graf K, Dimmeler S, Hartung T, Schumann RR, Hermann C. Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. *J Infect Dis.* 2003; 188:938-943.
54. Ertan P, Berdeli A, Yilmaz O, Gonulal DA, Yuksel H. LY96, UPKIB mutations and TLR4, CD14, MBL polymorphisms in children with urinary tract infection. *Indian J Pediatr.* 2011; 78:1229-1233
55. Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjala H, Svanborg1 C. Toll-Like Receptor 4 Expression and Cytokine Responses in the Human Urinary Tract Mucosa. *Infection and Immunity.* 2004; 3179–3186.
56. Poland DC, Drenth JP, Rabinovitz E, Livneh A, Bijzet J, van het Hof B, van Dijk W. Specific glycosylation of alpha (1)-acid glycoprotein characterises patients with familial Mediterranean fever and obligatory carriers of MEFV. *Ann Rheum Dis.* 2001; 60:777-780.
57. Soylu A, Kizildağ S, Kavukçu S, Cingöz S, Türkmen M, Demir BK, Sakizli M. TLR-2 Arg753Gln, TLR-4 Asp299Gly, and TLR-4 Thr399Ile polymorphisms in Henoch Schonlein purpura with and without renal involvement. *Rheumatol Int.* 2010; 30:667-70.
58. Brandl K, Gluck T, Huber C, Salzberger B, Falk W, Hartmann P. TLR-4 surface display on human monocytes is increased in septic patients. *Eur J Med Res,* 2005; 10:319-324.
59. Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *Biotechniques,* 2001: 31:22–24.

60. Schröder NW, Hermann C, Hamann L, Gobel UB, Hartung T, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med.* 2003; 81:368-372.
61. Ditchfield MR, de Campo JF, Nolan TM, Cook DJ, Grimwood K, Powell HL, Sloane R, Cahil S. Risk factors in the development of early renal cortical defects in children with urinary tract infection, *AJR Am J Roentgenol.* 1994; 162:1393-1397.
62. Piepsz A, Tamminen-Mobius T, Reiners C, Heikkila J, Kivisaari A, Nilsson NJ, Sixt R, Risdon RA, Simellie JM, Söderborg B. Five year study of medical or surgical treatment in children with severe vesico-ureteral reflux dimercaptosuccinic acid findings. International Reflux Study Group in Europe, *Eur J Pediatr.* 1998; 157:753-758.
63. Miller T, Phillips S. Pyelonephritis: the relationship between infection, renal scarring and antimicrobial therapy, *Kidney Int.* 1994;19:654-662.
64. Jakobsson B, Berg U, Svensson L. Renal scarring after acute pyelonephritis, *Arch Dis Child.* 1994; 70:111-15.
65. Ozen S, Alikasifoglu M, Saatci U. Implications of certain genetic polymorphisms in scarring in vesicoureteric reflux: importance of ACE polymorphism, *Am J Kidney Dis.* 1999; 34:140-145.
66. Zaffanello M, Tardivo S, Cataldi L, B,ban P, Malerba G. Genetic susceptibility to renal scar formation after urinary tract infection: a systematic review and meta-analysis of candidate gene polymorphisms. *Pediatr Nephrol.* 2011; 26: 1017-1029.
67. Conway PH, Cnaan A, Zaoutis T, Henry BV, Grundmejer RW, Keren R. Recurrent urinary tract infections in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials. *JAMA.* 2007; 298:179-86.