

**T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**KADAVRA VERİCİLİ BÖBREK NAKLİ İÇİN
ÇAĞIRILAN HASTALARA YAPILAN FARKLI CROSS-
MATCH TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**TOPRAK HAMDİ GÜNGÖR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç.Dr. Mustafa SOYÖZ**

2017- İZMİR

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**KADAVRA VERİCİLİ BÖBREK NAKLİ İÇİN
ÇAĞIRILAN HASTALARA YAPILAN FARKLI CROSS-
MATCH TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**TOPRAK HAMDİ GÜNGÖR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr. Mustafa SOYÖZ

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2015-TYL-SABE-0015 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2017– İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27 / 03 / 2017

Tez Danışmanı :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

Üye :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

Üye :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

Üye :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

Üye :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

(İMZA)

(Ünvanı, Adı Soyadı)

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince her türlü yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmama ışık tutan ve kendimi geliştirmemde büyük katkısı olan başta değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ'e ve değerli hocalarım Prof. Dr. İbrahim PİRİM ve Doç. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA'ya; tez çalışmamda katkılarını esirgemeyen değerli arkadaşım İsmail TOTUR ve Arş. Grv. Aslı ÖZKIZILCIK KOÇYİĞİT'e; tez uygulama ve yazım aşamasındaki desteklerinden dolayı değerli tüm Doku Tipleme Laboratuvarı ekibine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmam boyunca gösterdiği anlayış ve desteğini daima yanımda hissettiğim eşim Nihan SEÇGİN GÜNGÖR ve biricik oğlum Ferman Ege GÜNGÖR'e, hayatım boyunca benden desteğini, sevgisini ve sabrını esirgemeyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİ	3
2.1. Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)	3
2.1.2. Böbrek Nakli	4
2.2. Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)	4
2.2.1. MHC Sınıf I Molekülleri:-HLA-A,-B-ve-C-antijenleri	6
2.2.1.1. HLA-C Antijeni	8
2.2.2. MHC Sınıf II Molekülleri:-HLA-DP,-DQ-ve-DR-antijenleri.....	9
2.3. İmmün Sistem Hücreleri	10
2.3.1. Lenfositler	10
2.3.1.1. B Hücreleri	10
2.3.1.2. T Hücreleri	11
2.3.2. Doğal Öldürücü Hücreler (NK Hücreleri)	12
2.4. Transplantasyon ve HLA	12
2.4.1. Anti-HLA Antikorları	13
2.5. Transplantasyonda Antijen Sunumu	15
2.5.1. Direkt Sunum	15
2.5.2. İndirekt Sunum.....	16
2.6. Luminex xMAP Teknolojisi	16
2.7. Transplantasyon Öncesi İmmünolojik Değerlendirme	17
2.7.1. ABO kan grubu uygunluğunun sağlanması	18
2.7.2. HLA Doku Tipleme Test Yöntemleri	18
2.7.2.1. PCR-SSP (Sekans Spesifik Primer) Testi	19
2.7.2.2. PCR-SSOP (Sekans Spesifik Oligonükleotit) Testi.....	20

2.7.2.3. SBT (Nükleik Asitlerin Dizi Analizi “Sequence Based Typing”) Testi	20
2.7.3. Nakil Öncesi Anti-HLA antikor Belirleme Yöntemleri.....	21
2.7.3.1. Komplemana Bağlı Sitotoksik Cross-Match (CDC) Testi.....	21
2.7.3.2.1. T FCXM.....	23
2.7.3.3. Luminex Cross-Match (DSA; Donör Spesifik Antikor) Testi	24
2.7.3.4. PRA (Panel Reaktif Antikor) Testleri	25
2.8. Rejeksiyon Tipleri ve Mekanizmaları.....	26
2.8.1. Hiperakut rejeksiyon	26
2.8.2. Akut rejeksiyon	26
2.8.3. Kronik rejeksiyon.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Çalışma Grubu	28
3.2. Materyal	28
3.2.1. CDCXM Test Materyalleri	29
3.2.1.1. T Hücre Pozitif Kontrol	29
3.2.1.2. B Hücre Pozitif Kontrol	29
3.2.1.3. Kompleman.....	29
3.2.1.4. Dithiothreitol (DTT).....	29
3.2.1.5. Fluoroquenç Boya (Ethidium Bromide & Acridine Orange).....	30
3.2.1.6. İmmünomanyetik Yakalama Boncukları	30
3.2.1.7. Parafin Oil	30
3.2.1.8. Biocoll Ayırma Solüsyonu (Biochrom)	30
3.2.1.9. L-Sistin.....	30
3.2.1.10. Fosfat Tamponu 1X (PBS).....	31
3.2.1.11. RPMI 1640, L-Glutaminli 1X (RPMI)	31
3.2.2. FCXM Test Materyalleri.....	31
3.2.2.1. Pozitif Kontrol.....	31
3.2.2.2. Negatif Kontrol	31
3.2.2.3. CD3-PercP	31
3.2.2.4. CD19-PE	32
3.2.2.5. IgG-FITC F(ab') ₂	32
3.2.2.6. Fikol Ayırma Solüsyonu (Biochrom).....	32

3.2.2.7. Fosfat Tamponu 1X (PBS).....	32
3.2.2.8. RPMI 1640, L-Glutaminli 1X(RPMI).....	33
3.2.3. Luminex Cross-Match (DSA) Test Materyalleri	33
3.2.3.1. Yakalama Boncukları.....	33
3.2.3.2. Konjugat Çözeltisi.....	33
3.2.3.3. SAPE Çözeltisi.....	33
3.2.3.4. Lenfosit Parçalama Tamponu	34
3.2.3.5. Örnek Sulandırma Solüsyonu (Specimen Diluent).....	34
3.2.3.6. Lizat Kontrol Reaktifi	34
3.2.3.7. Boncuk karışımı	34
3.2.4. Luminex PRA Tarama Test Materyalleri.....	34
3.2.4.1. Boncuk Karışımı	34
3.2.4.2. Konsantre Konjugat	35
3.2.4.3. Yıkama Tamponu.....	35
3.2.4.4. Pozitif Kontrol Serumu	35
3.2.4.5. Negatif Kontrol Serumu.....	35
3.2.5. PCR-SSOP Test Materyalleri.....	35
3.3. Metod	36
3.3.1. Komplemana Bağlı Sitotoksik Cross-Match (CDCXM) Yöntemi	36
3.3.2. Akım Sitometri Cross-Match (FCXM) Yöntemi	38
3.3.3. Luminex Cross-Match (DSA; Donör Spesifik Antikor) Yöntemi	39
3.3.3.1. Kalite Kontrol.....	40
3.3.3.2. Sonuçların Analizi.....	41
3.3.4. Luminex PRA Tarama Yöntemi	42
3.3.4.1. Sonuçların Analizi.....	43
3.3.5. PCR-SSOP (Sekans Spesifik Oligonükleotit) Yöntemi.....	44
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	70
ÖZET.....	71
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASH	: Antijen sunan hücre
BAF	: Arkaplan ayarlama faktörü
CDCXM	: Komplemana bağımlı sitotoksik çaprazlama testi
CON	: Kontrol boncukları
CREG	: Çapraz reaktif grup
DSA	: Donöre özgü antikor
DTT	: Ditiyotreitol
F_{AB}	: Antijen bağlayıcı bölge
F_C	: Sabit Bölge
FCXM	: Flow sitometrik çaprazlama testi
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
HD	: Hemodiyaliz
HLA	: İnsan lökosit antijeni
IG	: İmmünoglobulin
IV	: İntravenöz
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
KD	: Kadavra donör
KIR	: Öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptör
LMDCR	: Kurutulmuş lenfosit kontrol lizati
LMLCR	: Lizat kontrol serumu
LMNC	: Negatif kontrol serumu
LMPC	: Pozitif kontrol serumu
Lum-DSA	: Luminex donöre spesifik antikor
MFI	: Ortalama floresans yoğunluğu
MHC	: Temel doku uyumluluk kompleksi
NK	: Doğal Öldürücü hücre
ÖSS	: Örnek sulandırma solüsyonu
PBS	: Fosfat tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PD	: Periton diyaliz

PE	: Fikoeritrin
PRA	: Panel reaktif antikor
SDBY	: Son dönem böbrek yetmezliği
SI	: Sınıf I HLA antijeni/antikoru
SII	: Sınıf II HLA antijeni/antikoru
SSO	: Sekans Spesifik Oligonükleotit
SSP	: Sekans Spesifik Primer
TCR	: T hücre reseptörü
T_H	: Yardımcı T hücre
Tx	: Transplantasyon
XM	: Çaprazlama testi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	MHC Gen Bölgesi.....	6
Şekil 2.	MHC Sınıf I ve II moleküllerin şematik yapısı.....	8
Şekil 3.	Lenfositlerin olgunlaşması	10
Şekil 4.	Lenfositlerin sınıfları farklı sınıftan lenfositler farklı tipteki antijenleri tanırlar ve antijenleri ortadan kaldıracak etkin hücrelere farklılaşmalar	12
Şekil 5.	Direkt ve indirect antijen Sunumu	15
Şekil 6.	Komplemana bağlı sitotoksik cross-match test prosedürü.....	36
Şekil 7.	Luminex metodu	42
Şekil 8.	Düzenlenmiş oranların hesaplanması.....	43
Şekil 9.	Hasta ve kadavra donör dağılımı.....	46
Şekil 10.	Kadavra donör ve hasta kan grubu oranları	47
Şekil 11.	Nakil öyküsüne sahip hastalara yapılan çaprazlama ve Son PRA Tarama test sonuçları	48
Şekil 12.	Son kan tranfüzyonu olan hastaların dağılımı.....	49
Şekil 13.	Hastalar ile kadavra donörlerinin HLA doku tiplerinin lokus temelinde oranları.....	50
Şekil 14.	Kadavra donörden nakil olmuş hastaların HLA doku tiplerinin lokus temelinde oranları	51
Şekil 15.	CDCXM ile FCXM testlerinin karşılaştırılması	52
Şekil 16.	CDCXM ile Lum-DSA çaprazlama testlerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 17.	CDCXM ile PRA Tarama testlerinin karşılaştırılması.....	56
Şekil 18.	Nakil olan hastaların son kan transfüzyonu dağılımı	58
Şekil 19.	Hastaların diyaliz tipi oranları.....	58
Şekil 20.	Çalışma grubundaki nakil olmuş hasta ile kadavra donörü arasında HLA doku tiplerinin lokus temelinde uyum oranları.....	62

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Kronik Böbrek Hastalığının Evreleri	3
Tablo 2.	Terasaki plak düzeni.....	38
Tablo 3.	Çalışmaya katılan hasta ve kadavra donörlerinin demografik özellikleri.....	47
Tablo 4.	Gebelik öyküsü olan hastaların oranları.....	49
Tablo 5.	CDCXM ile FCXM testlerinin karşılaştırılması	52
Tablo 6.	CDCXM ile Lum-DSA çaprazlama testlerinin karşılaştırılması.....	53
Tablo 7.	FCXM ile Lum-DSA çaprazlama testlerinin karşılaştırılması.....	55
Tablo 8.	CDCXM ile PRA Tarama testlerinin karşılaştırılması.....	56
Tablo 9.	Kadavra donörü ve hastaların demografik özellikleri	57
Tablo 10.	Hastaların alloimmünizasyon bilgileri	59
Tablo 11.	Çalışma grubundaki kadavra donör ile hasta doku tipleri ve aralarındaki uyum.....	60
Tablo 12.	Çalışma grubunu oluşturan nakil olmuş hastaların çaprazlama, PRA tarama ve PRA tanımlama test sonuçları	63

1. GİRİŞ

Transplantasyon antijenleri olarak da bilinen Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (MHC) antijenlerinin alıcı ve verici arasındaki uyumu doku ve organ nakillerinde son derece önemlidir. Bu bölge immün tanımada önemli olan molekülleri kodlar. İnsan Lökosit Antijeni (HLA) 6. kromozomun kısa kolu üzerine yerleşmiştir (15). HLA Sınıf I genleri tarafından kodlanan HLA Sınıf I antijenleri (HLA-A, B, C) tüm hücrelerde bulunur. HLA Sınıf II genleri tarafından kodlanan HLA Sınıf II antijenleri (HLA-DR, DQ, DP) ise özellikle B lenfositleri, makrofaj, dendritik hücre, endotel hücreleri ve aktive olmuş T hücrelerinde bulunur (15,16)

HLA antijenlerine karşı oluşan alloantikorlar, takılan organ (greft) reddi ve fonksiyon kaybı ile ilişkili en önemli antikorlardır (70). Nakil öncesi hastalarda, daha önceden oluşmuş anti-HLA antikorları bulunabilir, bunlar gebelik, kan transfüzyonu veya önceki nakil sonucu oluşabilirler. Ancak, bu önceden oluşan antikorların varlığı, potansiyel greftin hasar göreceği anlamına gelmez. Greftin kendisinin, anti-HLA antikor hedeflerine spesifik HLA moleküllerini ifade etmesi gerekir. HLA moleküllerini hedef alan bu greft reaktif antikorlara, donör spesifik alloantikorları (DSA) adı verilir. Alıcıdaki DSA varlığı, nakil gerçekleştikten sonra kısa greft yaşam süresi ile doğrudan ilişkilidir (70).

Böbrek nakli öncesi ve sonrası DSA varlığını tespit etmek için kullanılan standart çaprazlama tekniği olarak bilinen hücre temelli yöntem Komplemana Bağlı Sitotoksik Çaprazlama (CDCXM) testidir (102). 1980'lerde kadavradan böbrek nakli sonrası erken greft yetmezliği riski % 35-50 idi. Bununla birlikte 1990'dan beri bu risk dereceli olarak azalmıştır. Bu başarıda, Akım Sitometrisi Çaprazlama (FCXM) gibi non-kompleman antikorlarında ortaya koyabilen daha hassas çaprazlama tekniklerinin kullanımı önemli bir yer tutmaktadır (84). Akım sitometrinin yüksek hassasiyetinden dolayı DSA'lar CDCXM ile negatif olmasına rağmen FCXM ile saptanabilir (69).

Luminex platformunda boncuk temelli analizler sayesinde hem donöre özgü hem de panel reaktif antikorların (PRA) tespiti yapılabilmektedir. Luminex-DSA

Çaprazlama testi, donörden elde edilen HLA Sınıf I ve HLA Sınıf II proteinlerine (Antijen) bağlanan özünmüş IgG antikorlarını tespit eden Luminex tabanlı solid faz yöntemidir (72). HLA Sınıf I proteinleri ile kaplı boncuklar HLA Sınıf II proteinleri ile kaplı boncuklardan, boncukların kendi sahip olduğu farklı florasan yayılımından dolayı ayırt edilir. PRA tarama ve tanımlama testinde ise, bir antijen paneli kullanılmakta ve serumdaki anti-HLA antikorları saptanabilmektedir (103). Bu testlerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları vardır.

Bu alışmada İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'nda Ocak 2014 - Aralık 2016 tarihleri arasında kadavra donörden böbrek nakli için başvuran hastalara yapılan çaprazlama test sonuçları ve Luminex'e dayalı Panel Reaktif Antikor (PRA) tarama test sonuçları karşılaştırılarak, testler arasındaki avantaj ve/veya dezavantajların ortaya konması amaçlandı. Aynı zamanda kadavra donörden nakil olan 25 hasta ve verici çiftine rutin çalışılan HLA-A, HLA-B ve HLA-DR doku tiplerine ek olarak HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 lokusları da çalışılarak, çaprazlama test sonuçlarına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Elde edilen bulgular nakil sonrasında yaşanan rejeksiyonların engellenmesi yolunda yapılan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünölmektedir.

2 GENEL BİLGİ

2.1. Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)

Böbrekler vücut sıvılarının içeriğinin kontrolünde esas role sahip, vücudun metabolik son ürünlerinin atılımını sağlayan önemli bir organdır. Kronik böbrek hastalığı (KBH) ; sistemik ya da böbrek hastalıkları sebebiyle ortaya çıkan, üç ay ve daha uzun süreli böbrek hasarı sonucu veya glomerüler filtrasyon hızının (GFR) 60 ml/dak/1.73 m²'nin altına düşmesi ile böbrek fonksiyonlarının geri dönüşümsüz kaybı olarak tanımlanmaktadır (1). Böbrek hasarına ait veriler idrar, kan testleri ve görüntüleme teknikleri ile elde edilebilir.

Kronik böbrek hastalığının en önemli nedenleri, diabetes mellitus, kronik glomerülonefrit ve hipertansiyondur. KBH nadiren de olsa geri dönüşümlüdür. Böbrek fonksiyonlarındaki azalma ilerleyicidir, KBH'ye neden olan olay ortadan kalksa bile böbrek fonksiyonlarındaki azalma devam eder (2).

Kronik böbrek hastalığı, Amerika Ulusal Böbrek (National Kidney Foundation- NKF) sınıflamasına göre, böbrek fonksiyonlarının derecesi baz alınarak evrelerine ayrılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Kronik Böbrek Hastalığının Evreleri (Kopple ve Joel (2001) (1)'den modifiye edilmiştir).

Evre	GFR(ml/dk/1.73 m ²)	Tanımlama
1	≥90	GFR normal ya da artmış. ≥90 Böbrek hasar bulguları mevcut
2	60-89	Hafif azalmış GFR ile birlikte böbrek hasarı bulguları
3	30-59	Orta derecede azalmış GFR
4	15-29	İleri derecede azalmış GFR
5	<15/veya diyaliz	Son dönem böbrek yetmezliği

GFR: Glomerül filtrasyon oranı

2.1.1. Kronik Böbrek Hastalığı Tedavisi

Böbreklerin vücudun ihtiyaçlarını karşılayamadığı döneme, son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) denir. SDBY tanısı konulan hastalarda tedavi seçenekleri; hemodiyaliz (HD), periton diyalizi (PD) ve böbrek naklidir (3).

2.1.2. Böbrek Nakli

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların çoğunda böbrek nakli tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Böbrek nakli gerçekleşen bu hastalarda, diyaliz ile yapılan tedavi yöntemine göre yaşam kalitesi, sosyal, fiziksel rehabilitasyon ve fizyolojik olarak çok daha iyi sonuçlar sağlar (4).

Böbrek nakli, diğer tedavi yöntemleri ile kıyaslandığında hasta mortalitesi ve morbiditesinin daha düşük, aynı zamanda daha ucuz maliyette olduğu görülmektedir (5).

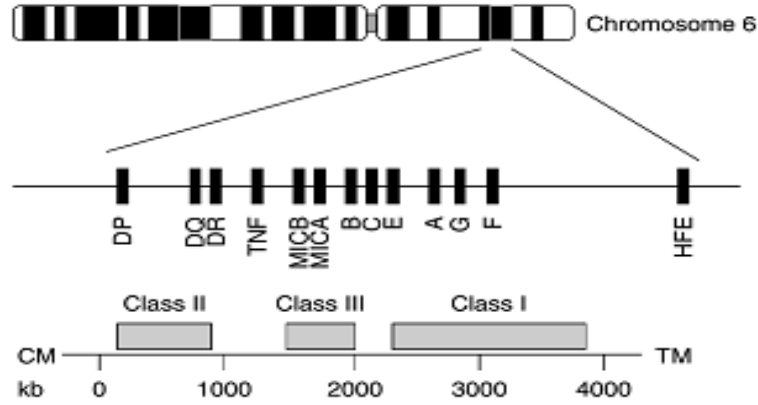
Böbrek nakli canlı verici veya kadavradan gerçekleşebilir. Nakil sonrası greft sağ kalımı, 1 yıllık canlı verici ile gerçekleşen yaklaşık %70-95 iken, kadavra vericili yapılan nakillerde bu oran %50-80'dir. 5 yıllık greft sağ kalımı, canlı vericili ile %60-90 iken, kadavra vericili nakillerde %40-60 civarındadır (6). Canlı vericili nakillerin, kadavra vericili nakillere kıyasla daha iyi bir greft yaşam ömrüne sahip olduğu görülmektedir. Ülkemizde kadavradan yapılan nakiller yaklaşık %20-30 iken, batı ülkelerinde bu oran %80 i bulmaktadır. Modern tıpta, böbrek naklinin sağladığı yüksek kalitedeki yaşam önemli bir ilerleme olarak kabul görmektedir (7).

2.2. Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)

Transplantasyon antijenleri olarak da bilinen MHC (Majör Histocompatibility Complex - Büyük Doku Uygunluk Kompleksi) antijenlerinin alıcı ve verici arasındaki uyumu doku ve organ nakillerinde son derece önemlidir. MHC 6. kromozomun kısa kolu üzerinde sentromere yakın bölgede olup (6p21.31) 3,5-4

Mbç'lik yer kaplar ve yaklaşık 4000 kilobazlık dev bir gen kompleksine sahiptir. Bu genler tüm insan genomunun %0,1'ini ve fonksiyonu tanımlanmış genlerin de %0,6'sını kapsar (8,9,10). Bu bölge immün tanımada önemli olan MHC moleküllerini ya da insanlarda İnsan Lökosit Antijenleri (Human Leukocyte Antigen - HLA) olarak ifade edilen antijenleri kodlar (11). 1958'de Dausset, Snell ve Rappaport ilk kez insanda lökositlerde doku uygunluk antijenlerini göstermişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu antijenlerin sadece lökositlerde değil, doku hücrelerinde de bulunduğu anlaşılmış olup, doku nakillerinde çok önemli rollerinin olduğu ve başarılı bir transplantasyonun gerçekleşmesinde ne kadar önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir (12,13).

MHC başlıca üç ana lokustan meydana gelir. Bunlar sentromerden telomere doğru sırasıyla, MHC Sınıf II, MHC Sınıf III ve MHC Sınıf I lokuslarıdır. MHC Sınıf II'de HLA DP, DM, DQ, DR ve TAP moleküllerini kodlayan genleri kapsar. Bunlardan HLA DP, DQ ve DR, antijen sunumundan sorumlu molekülleri kodlar (14) ve özellikle B lenfositleri, makrofaj, dendritik hücre, endotel hücreleri ve aktive olmuş T hücrelerinde bulunur (15,16). DM, TAP1 ve 2 tarafından kodlanan moleküller ise antijenin işlenmesi ve sunuma hazırlık sürecinde önemli rollere sahiptir (17). MHC Sınıf I'de ise başta HLA A, B ve C olmak üzere HLA E, F, G, H ve X molekülleri kodlanır. Bu bölge üzerindeki genler ile kodlanan HLA A, B ve C antijenleri antijen sunumundan sorumludur ve tüm hücrelerde bulunur. Diğerlerinin görevleri ise henüz tam olarak bilinmemekte olup doğal öldürücü hücrelerin (NK) fonksiyonlarında rol aldıkları düşünülmektedir. MHC Sınıf III bölgesinde ise HLA molekülleri kodlanmaz, fakat inflamasyonda çok önemli olan Tumor Necrosis Factor (TNF), kompleman 2 ve 4 (C2, 4), ısı şok proteini-70 (HSP-70) ve lenfotoksin (LT) kodlanır (11,14,17). MHC, organizmanın en polimorfik genlerini kapsayan bölgedir. Bu özelliğinden dolayı kan transfüzyonları gebelik ve daha önceki nakiller bu antijenlere karşı sensitizasyon şansını artırmaktadır. Nakilden önce bu antikorların belirlenmesi, rejeksiyon riski olan nakillerin saptanmasına yardım eder.



Şekil 1. MHC Gen Bölgesi (Cassinotti ve ark.(2009) (22)'den alınmıştır).

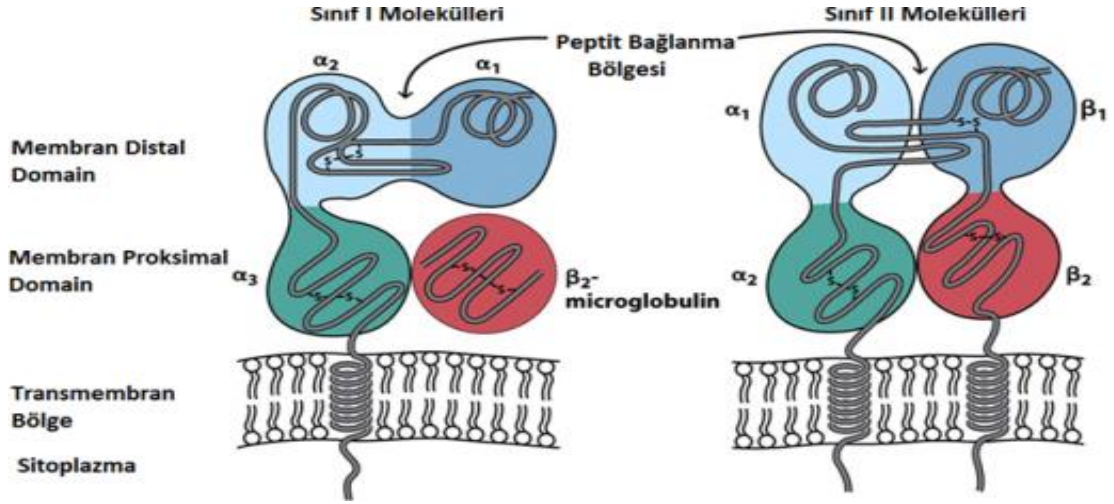
Son yapılan çalışmalar ile insan MHC gen bölgesi tamamen dizilenmiş olup 3.673.800 nükleotit, 224 gen ve 14.232 farklı allel içermektedir (18). MHC genlerinin polimorfik olmalarının yanı sıra başka bir önemli özelliği de kodominant olarak eksprese edilmeleridir. Yani normal şartlarda bir bireye anneden ve babadan geçen genlerden sadece bir tanesi aktif olarak molekül kodlayıp, diğeri ise susturulur. MHC'de ise bu durum farklıdır, hem anneden hem de babadan geçen genlerin hepsi kodlama gerçekleştirir, sonuç olarak fenotipik olarak iki ebeveynden geçen genlere ait moleküller aynı kişide üretilmiş olup, eksprese olur (20). MHC genlerinde çok sayıda farklı allel olmasının ve bunların yüksek polimorfizm ve kodominant ekspresyon özellikleri göstermelerinin temel sebebi ürettikleri MHC moleküllerindeki çeşitliliği artırmaktır. Böylece bireyler immünolojik olarak birbirlerinden tamamen farklı hale getirilmiş olup, bütün dünyayı kapsayacak olası bir ölümcül enfeksiyon epidemisi gerçekleşse bile yaşamaya devam edecek bazı bireylerin olması garanti altına alınmıştır (19,21).

2.2.1. MHC Sınıf I Molekülleri:-HLA-A,-B-ve-C-antijenleri

MHC Sınıf-I bölgesi antijenleri glikoprotein yapısındadır ve vücutta bulunan bütün çekirdekli hücrelerin zarında bulunurlar. Bunlar birbirine kovalent olmayan bağlarla bağlı bir α (44-47 kD) ve bir β 2 mikroglobulin (12 kD) zincirinden meydana

gelmektedir (23). α zinciri polimorfik özellik gösterir. $\beta 2$ mikroglobulini 15. kromozom tarafından düzenlenen küçük bir proteindir. $\beta 2$ mikroglobulini, MHC dışında bir bölgede bulunan genler ile kodlanan sabit bir zincir olup, tüm MHC I moleküllerinde aynı özelliktedir. $\beta 2$ mikroglobulin, alfa zincirinden ayrılır veya konjenital olarak bulunmaz ise HLA sınıf I molekülü işlevini yitirir (24). Sınıf I moleküllerinin hücre yüzeyinde yerleşebilmesi için $\beta 2$ mikroglobuline ihtiyaçları vardır. $\beta 2$ mikroglobulinin görevi, MHC ile antijenin bağlantısını güçlendirip sabitlemek ve molekülün üç boyutlu yapısının korunmasında görev almaktır (25).

α zinciri 3 bölgeye ayrılır. Bunlar; Hücre dışı hidrofilik bölge, hücre zarını geçen hidrofobik bölge ve hücre içi hidrofilik bölgelerdir. Hücre dışı bölge, hidrofilik olup N terminali ile sonlanır. Hücre dışı bölge $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ zincirleri olarak bilinen 3 kısımdan oluşmaktadır. Molekülün N ucundaki $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ bölümlerinin amino asit dizilimindeki farklılıklar molekülün polimorfizmini meydana getirir. Bu bölge peptit bağlanan yer olup, fonksiyonel olarak molekülün en önemli yeridir. T lenfosit tanıma sürecinde T hücrelerinin $CD8+$ molekülünün bağlandığı $\alpha 3$ birimi ile hücre zarını geçen ve hücre içi bölgeler polimorfik olmayıp tüm HLA Sınıf I tiplerinde aynıdır (26,27). MHC I moleküllerinin temel görevi sitoplazmada yerleşim gösteren yabancı antijenleri $CD8+$ sitotoksik T hücrelerine sunmaktır. Sitoplazmada yerleşen antijenler tümör antijenleri ve virüslerdir. Başlangıçta, sitoplazmada antijen sunan bu hücreler (APC) tarafından internalize edilip işlenir ve yüzeylerinde bulunan MHC I ve II molekülleri vasıtasıyla komşu lenf bezlerindeki naif T hücrelerine sunulur. Bu sunum esnasında asıl olarak antijene özgün $CD8+$ sitotoksik T hücre klonu ve bir miktar da $CD4+$ yardımcı T hücre klonu aktive ve proliferasyon almış olur. Bu olaya çapraz sunum denilmektedir. Bundan sonraki aşamada ise efektör hale gelen $CD8+$ sitotoksik T hücreler, antijenin asıl olarak bulunduğu bölgeye giderek ilgili antijeni yüzeyindeki MHC I molekülleri ile eksprese eden hücreleri tespit eder ve içinde bulunan antijenle birlikte öldürür (28).



Şekil 2. MHC Sınıf I ve II moleküllerin şematik yapısı (Özbolat ve ark. (2014) (29)'dan alınmıştır).

2.2.1.1. HLA-C Antijeni

1969'da Dausset, Terasaki ve Walford'un "C" lokusundan kodlanan ilk antijenleri keşfettiği bilinmektedir. Başlangıçta HLA-C tiplmesi için kullanılan serolojik yöntemler tüm antijenler için anti serum eksikliği nedeni ile terkedilmiştir. 2010 yılından sonra HLA-C lokusu moleküler yöntem ile çalışılmaya başlanmış, "w" eki kaldırılarak "C*" şeklinde kullanılmaya başlanmıştır (81). Sınıf I HLA genlerinden HLA-C ile öldürücü İmmünoglobülin Benzeri Reseptör (KIR) polimorfizminin birbiriyle olan ilişkisi birçok çalışmada saptanmıştır. Kadaverik böbrek nakli planlanan hasta ve verici çiftlerine birçok merkezde HLA-A, HLA-B ve HLA-DR lokuslarının uyumuna bakılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda HLA-C antikorlarının böbrek nakli sonrası greft yetmezliği ve rejeksiyon ile ilişkisi gözlemlenmiş ve nakil öncesi HLA-C uyumunun önemine değinildiği görülmektedir (82).

2.2.2. MHC Sınıf II Molekülleri:-HLA-DP,-DQ-ve-DR-antijenleri

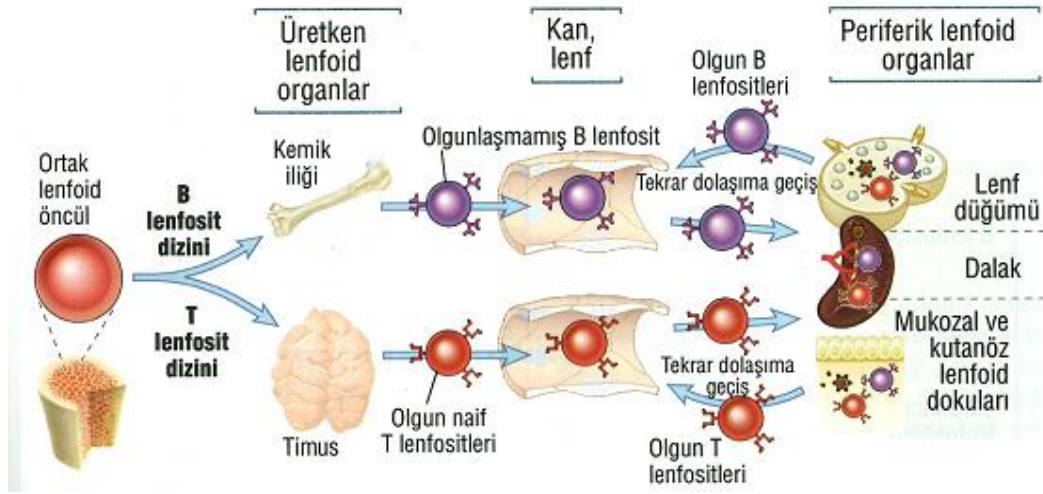
Sınıf II antijenlerine, immünite ile ilişkili antijenler de denilmektedir. Sınıf II HLA molekülleri kısıtlı bir hücresele dağılım göstermektedir. Bunlar immün sistemle ilişkili olan hücreler, B-lenfositleri, antijen sunan hücreler (makrofajlar, dentritik hücreler, kupffer hücreleri) ve insanlarda uyarılmış T hücreleri üzerinde bulunurlar. Bunun dışında normal şartlarda Sınıf II moleküllerini ifade etmeyen hücreler (istirahat halindeki T hücreleri, endotelial hücreler ve tiroit hücreleri) uyarıldıklarında Sınıf II HLA moleküllerini ifade ederler (21).

MHC II molekülleri birbirine kovalent olmayan bağlarla bağlı polimorfik bir α (32-34 kD) ve polimorfik bir β (29-32kD) zincirden meydana gelir. Bu iki zincirinde hücre zarı dışında sırasıyla $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\beta 1$, $\beta 2$ olmak üzere 2 domainleri bulunur (30). Yapısal çalışmalar, hücre membranına daha yakın olan $\alpha 2$ ve $\beta 2$ domainlerinin karakteristik Ig katlanmasına benzer bir yapı gösterdiklerini, bununla beraber membranın distaline yerleşen ve polimorfik bir yapı özelliği gösteren $\alpha 1$ ve $\beta 1$ zincirleri sınıf I moleküllerde olduğu gibi antijenlere ait peptitlerin yerleşebileceği oyuğa benzer bir yapı meydana getirirler. Bu bölgeye yerleşenler, hücre dışından kaynaklanan daha büyük peptidlerdir (31). MHC II moleküllerinin görevi fagositozla internalize edilen bakterileri CD4+ yardımcı T hücrelerine sunmaktır (19,21,28). Başlangıç olarak, vücuda giren bakterilerle karşılaşan ve onları fagosite eden APC'ler antijeni işleyip yüzeylerindeki MHC II molekülleri ile komşu lenf bezinde bulunan naif CD4+ yardımcı T hücrelerine sunarlar. Aktive ve proliferen olan yardımcı T hücre klonu ise efektör fonksiyonunu gerçekleştirmek üzere antijenin bulunduğu bölgeye gider ve aynı antijeni MHC II molekülleri aracılığı ile ekprese eden makrofajlar ve B hücrelerine yardımda bulunur. Antijeni sunan hücre makrofaj ise CD4+ yardımcı T hücresiyle, antijeni fagosite etmesi konusunda daha etkin bir hale getirir, B hücresi ise onu antikor üretmesi yönünde uyarır (28,32).

2.3. İmmün Sistem Hücreleri

2.3.1. Lenfositler

Lenfositler hematopoez ile kemik iliğinde oluşan beyaz kan hücrelerinden biri olup, edinsel immünitinin önemli araçlarından (33). B lenfositleri kemik iliğinde olgunlaşırken, T lenfositler olgunlaşmasını timus bezinde gerçekleştirir. Lenfositler, her bir antijene spesifik reseptörler üreten tek hücre grubudur. Bu hücreler, monoklonal antikor panelleri ile saptanabilen yüzey proteinleri aracılığı ile birbirilerinden ayırt edilebilmektedirler. Bu proteinler “CD” (farklılaşma kümesi-cluster of differentiation) olarak adlandırılır. Bunlar belli bir hücre tipi veya hücre başkalaşım evresini belirtmek için kullanılırlar ve bir antikor kümesi veya grubu tarafından tanınırlar (34).



Şekil 3. Lenfositlerin olgunlaşması (Abbas ve ark. (2007) (34)'den alınmıştır).

2.3.1.1. B Hücreleri

B hücreleri, humoral bağışıklığı düzenleyen, antikor üretebilen tek hücre grubudur. B hücreleri yüzeylerinde antijenleri tanıyan ve hücre aktivasyon olaylarını başlatan reseptörler olarak görevli antikorları içerirler. Naif bir B hücresi (daha önce

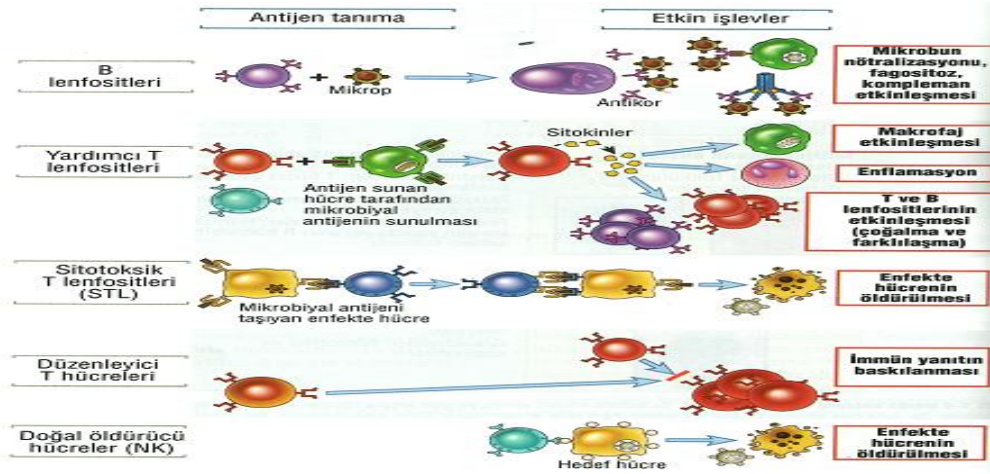
antijenle karşılaşmamış hücre) antijenle ilk karşılaştığında antijenin antikora bağlanması hücrenin hızlı bir şekilde bölünmesine ve hafıza B hücrelerine ve plazma hücresi denen efektör hücrelere dönüşmesine neden olur (35). B hücreleri en son farklılaşıp plazma hücrelerine dönüşerek antikor sentezleyip salgılar (33).

2.3.1.2. T Hücreleri

T hücreleri hücreSEL bağışıklıktan sorumludur. Olgunlaşma esnasında T hücresi membranında antijen bağlayıcı bir molekül olan T-hücre reseptörünü (TCR) eksprese eder. Çoğu T lenfositlerinin antijen reseptörleri, yalnızca protein yapısındaki antijenlerin peptid parçalarını tanır. Bu peptidler antijen sunan hücrelerdeki (ASH), MHC moleküllerine bağlı bulunurlar.

T hücrelerinin iki tane iyi tanımlanmış alt grubu bulunmaktadır: Yardımcı T (T_H) ve sitotoksik T (T_C) hücreleridir. T lenfositlerden $CD4^+$ T hücreleri yardımcı T hücreleri, $CD8^+$ T lenfositler ise sitotoksik T lenfositleri olarak adlandırılırlar. Bu iki grup birbirinden hücre yüzeylerinde CD4 veya CD8 membran glikoproteinlerinden bir tanesinin bulunmasına göre birbirinden ayrılır (35).

Bir yardımcı T hücresi antijen-MHC sınıf II molekülü kompleksini tanıyıp etkileşime geçtiğinde hücre aktif hale gelmiş olur. Efektör hücre haline gelerek sitokinler salgılar. Sitokinler B hücrelerinin, sitotoksik T hücrelerinin, makrofajların ve immün yanıtta yer alan diğer birçok hücrenin aktivasyonunda önemli role sahiptir (35).



Şekil 4. Lenfositlerin sınıfları farklı sınıftan lenfositler farklı tipteki antijenleri tanırlar ve antijenleri ortadan kaldıracak etkin hücelere farklılaşırlar (Abbas ve ark. (2007) (34)'den alınmıştır).

2.3.2. Doğal Öldürücü Hücreler (NK Hücreleri)

Lenfositlerin bir başka sınıfı ise NK (doğal öldürücü, natural killer) hücreleridir ve doğal bağışıklığın yapı taşlarından biri olup savunmanın erken evresini oluşturur. Bu hücreler enfekte konak hücrelerini öldürürler ancak yüzeylerinde klonal olarak dağılım gösteren antijen reseptörleri taşımazlar (34). NK hücreleri, viral enfeksiyonlarda, tümörlerde, otoimmün hastalıklarda, hematolojik hastalıklarda ve transplantasyonlarda önemli rol oynar. Bu lenfositler, hücre aracılı sitotoksikite ve antikor aracılı hücresel sitotoksikite ile aktivasyon gösterirler. Öncül bir immünizasyona ihtiyaç duymazlar (36).

2.4. Transplantasyon ve HLA

Doku uyumluluk antijenleri, genetik olarak birbirinden farklı alıcılarda immün yanıtı indüklemeye yeteneğine sahip yüzey antijenleridir. Bu nedenle doku veya hücre reddine sebep olabilirler (37). Transplantasyonda immün toleransın oluşabilmesi ve bu nedenle, greftin alıcıda reddedilmeden kalabilmesi için alıcı ve

vericinin MHC antijenlerinin birbirine uyması gerekir (38). HLA molekülleri oldukça polimorfik ve immunojeniktirler. Bu sebeple de HLA allo-antijenlerine maruz kalan bir bireyde allo-immün yanıt indüklenir, T lenfositlere karşı allo reaktivlik oluşur ve anti-HLA antikorları üretilir. Allogreftler açısından, humoral akut rejeksiyonu engellemek için anti-HLA antikorlarının karakterize edilmesi oldukça önemlidir (39). Transplantasyon antijenleri olarak bilinen HLA-A, -B, -DR'nin nakil öncesi yapılan doku uygunluk testlerinde HLA full match (tam uyumlu) olması için alıcı ve verici arasında 6 antijeninde aynı olması anlamına gelirken (2A, 2B, 2DR), mismatch (uyumsuzluk) terimi ise vericide olup alıcıda olmayan HLA antijenleri için kullanılır. Verici canlı yani yaşayan biri veya kadavra dediğimiz beyin ölümü tanısı konulmuş kişilerden olabilir. Transplantasyonu alıcı ve verici gruplarına göre 4 grup altında incelenir. **Otograft**; kişinin bedeninin bir bölgesinden, başka bir bölgesine yapılan doku naklidir. **Allograft (Allojenik)**; doku ve organ naklinin aynı tür canlılar arasında gerçekleşmesidir. Nakli gerçekleşmiş dokuda yabancı olarak görülen moleküllere alloantijen denir. **İzograft (Sinjenik)**; genetik olarak aynı bireyler arasında gerçekleşir. **Ksenograft (Ksenojenik)**; doku ve organ naklinin farklı türler arasında yapılmasıdır (38).

Transplantasyonda HLA uyumu, daha uzun greft canlılığı, daha az duyarlılaşma, akut rejeksiyon riskini azaltma ve immünsüpresif kullanımını azaltıcı etkisiyle çok önemlidir (40).

2.4.1. Anti-HLA Antikorları

Doğal yollarla meydana gelen AB0 antikorlarının aksine HLA antikorları, kan transfüzyonları, multipar gebeliklerde ve rejekte olmuş greftler aracılığıyla oluşan yabancı antijenlere karşı immün yanıt neticesinde oluşur. Anti-HLA antikorları IgG yapısında olup, bunlar kavşak bölgesinin boyutu, ağır zincirler arasındaki disülfid bağlarının yeri ve sayısına göre 4 alt gruba ayrılmaktadır. (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (33). Antikorum sınıfı, antikorum kompleks bir antijen ile arasındaki bağlanma kuvveti ve afinitesine, konağın immün durumu ve immün savunma esnasında hücre sunumunun tipine göre farklılık gösterir (42). Bunlardan IgG1 veya IgG3 ile antijen

birlikteliği kompleman sistemini aktive eder (54). Klasik yolda aktivasyonun başlaması kompleman proteinlerinden C1 proteininin antikorun Fc kısmındaki CH2 veya CH3 bölgesine bağlanması ile başlar. Bu olay diğer kompleman proteinlerini tetikler. Sonuçta kompleman aktivasyonu hangi yolda ilerlerse ilerlesin, hedef hücre membranında perforin porlarına benzer porlar meydana gelir ve hücrenin lizisi gerçekleşir (55).

IgG2 ve IgG4 gibi aktivasyonu komplemana bağlı olmayan antikorlarda Antikora Bağlı Hücre Sitotoksitesi (Antibody - Dependent Cell Cytotoxicity – ADCC) ile immün reaksiyonlarda rol oynar. Sitotoksik aktiviteye sahip olan bazı hücreler antikorun Fc kısmı için membran reseptörleri eksprese ederler. Antikor spesifik olarak hedef hücreye bağlandığı zaman bu reseptörleri taşıyan hücreler (NK hücreleri, makrofajlar, monositler, eosinofiller) antikorun Fc bölgesine böylece de hedef hücreye bağlanabilir. Antikora bağlanma sitotoksik hücrelerin lizozomlarında ve granüllerinde litik komponentlerin salınımı ile hedef hücrenin lizisini sağlar. Bu hücreler TNF, perforin v.b. maddeler salgırlar (56,57).

Multipar gebeliklerde; fetus normalde anne için immunojeniktir. Çünkü babadan gelen antijenler anne için yabancı sayılır. Birinci gebelikte bu antijenlere karşı IgM antikorları gelişirken, ikinci ve sonraki gebeliklerde IgG antikorları bol miktarda yapılır. IgG1, IgG3 ve IgG4 yapısındaki antikorlar plasentadan geçer ve fetüsün korunmasında önemli role sahiptirler (41).

Kan transfüzyonları; anti-HLA antikor oluşumu için en büyük risklerden biri olup, bu antikorlar IgM ve IgG sınıfındadırlar. Antikor titresinin yüksek olabilmesi için herhangi bir gebelik öyküsü yoksa ortalama 5 ünite kan transfüzyonu sonrası oluşabilir. Transplantasyon öncesi bu antikorlar tespit edilip, gerekli değerlendirilmeler yapılmalıdır (42).

Organ nakillerinde ise; antikorlar, nakil sonrası görülen rejeksiyon ile birlikte artış gösterir. Bu yüzden nakil sonrası rejeksiyon şüphesi gözlemlenen hastalarda düzenli periyotlarla anti-HLA antikorlarına bakılmalıdır. Nakledilen organın oluşan anti-HLA antikorlarını emilimi ile greft rejekte olsa bile herhangi bir komplikasyon (ateş, kanama, enfeksiyon) gelişmezse organ alıcıdan çıkarılmaz.

Transplantasyon sonrası oluşan antikorların çoğu IgG yapısında olmasının yanında, IgM yapısında antikorlara da rastlanılmaktadır (42).

2.5. Transplantasyonda Antijen Sunumu

Lenfositler HLA antijenlerini yüksek oranda eksprese eder ve Donör Spesifik Antikorların (DSA) belirlenmesi için hedef hücre olarak seçilirler. Yabancı HLA molekülü İmmün Sistem Hücrelerine iki şekilde sunulabilir. Bunlar;

2.5.1. Direkt Sunum

İşlenmemiş HLA molekülü ve alıcı HLA molekülünün yapısındaki benzerliğin sonucudur. Yolcu lökositler ve greft ile taşınan donörün Antijen Sunan Hücreleri (ASH), alıcı lenfoid sistemine geçer. T lenfositlerinin aktivasyonuna sebep olur. Böylece direkt sunum yabancı HLA moleküllerine özgü olarak gelişir. Bu sunum şekli akut rejeksiyonla ilişkilidir (43).



Şekil 5. Direkt ve indirect antijen Sunumu (Smith ve ark. (2002) (44)'den modifiye edilmiştir).

2.5.2. İndirekt Sunum

Alıcı HLA molekülleri ile bağlantılı olan allojenik HLA moleküllerinden türetilmiş peptidlerin sunumudur. Bu durumda, donör HLA molekülünün herhangi bir yabancı protein antijeni olduğu düşünülür ve öyle işlem görür. Bu sunum şekli kronik rejeksiyon ile ilişkilidir (45,46,47).

İndirekt sunum genellikle CD4+ T hücreleri tarafından oluşturulur. Çünkü alloantijen endozomal veziküler yol aracılığıyla önce konak ASH 'ler tarafından elde edilir ve sınıf II HLA molekülleri tarafından sunum sonuçlanır. Bununla birlikte fagosite edilen greft hücrelerinin bazı antijenleri, antijen sunumunun sınıf I HLA yoluna girer. CD8+ T hücreleri tarafından in direkt olarak tanınır. HLA benzerliği doku kabulünü saptamada tek faktör değildir. Doku genetik olarak farklı bireyler arasında transplante edildiği zaman, hatta onların HLA antijenleri benzese bile transplante olan dokunun rejeksiyon olma olasılığı vardır. Bu, çeşitli minör histokompatibilite lokusundaki farklılıklardan dolayıdır (47,48). HLA antijenleri direkt olarak T_H ve T_C hücrelerle tanınır. Bu olay alloreaktivite olarak isimlendirilir. Aksine minör histokompatibilite antijenleri sadece kendi HLA molekülleri ile birlikte sunulduğu zaman tanınabilir. Buna ilave olarak minör histokompatibilite farklılıklarıyla indüklenen doku rejeksiyonları majör histokompatibilite farklılığı ile indüklenenden daha zayıftır. Fakat bu minör doku farklılıklarına karşı oluşan reaksiyonlar, sıklıkla greft rejeksiyonu ile sonuçlanabilir (47,48,49).

2.6. Luminex xMAP Teknolojisi

Flow sitometri prensibinde çalışan, tek bir mikropate üzerinde 100 den fazla analizi aynı anda (multiplex) çok küçük hacimlerde örnek kullanarak yapabilen kompleks bir sistemdir. 5,6 mikron çaplı 100 farklı floresan boya ile boyanmış polistren mikroküreciklerdir. Bu kürecikler hem tanımlamada hem de testlerde solid faz yüzeyi olarak görev alırlar (59). 5,6 mikron çaplı mikrokürecikler kırmızı ve kızılötesi floroforlarla boyanmıştır. Farklı gruplar için değişik miktarlarda iki farklı boya kullanılması ile 100 farklı mikrokürecik seti elde edilmiştir. Her bir

mikrokürecik kırmızı ve kızılötesi boya ların karışımı sayesinde oluşturulmuş spektral imza diyebileceğimiz benzersiz bir yapıya sahiptir. Mikrokürecikler bu iki boyanın bilinen spesifik oranları ile doldurulmuştur. Bu sayede her bir mikrokürecik xMAP sisteminde tanınabilir. Bu sayede 100 farklı set olduğu için 100 farklı test bir reaksiyon içerisinde gerçekleştirilebilir (59).

Luminex okuyucu sisteminde kombine iki lazer, sıvı ortam ve gerçek zamanlı sinyal işleyebilen dijital işlemci vardır. Bu sistem 100 farklı renk koduna sahip mikrokürecikleri tek tek ayırabilmektedir. Sistemin sıvı ortamı (fluidics) okuyucu sistemden boncukların tek tek geçmesini sağlar ve bu sayede analiz edilebilir (PE floresan yoğunluğu). Okuyucu 532 nm yeşil lazer kullanır (test lazeri). Bu boncuk üzerinde kurgulanmış olan testte yer alan PE boyasını uyarmak içindir (streptavidin-PE fikoeritrin). 635 nm solid state lazer (kırmızı sınıflama lazer) boncuğu tanımlamak üzere boncuk içerisindeki boya ları uyarır. Okuyucunun 4 dedektörü vardır. Testin floresans değerlerini, mikroküreciklerin ayırımının yapılmasını ve son olarak tek ya da agregat haline gelmiş mikroküreciklerin belirlenmesini sağlar (59).

2.7. Transplantasyon Öncesi İmmünolojik Değerlendirme

Transplantasyon sürecinde karşılaşılan ilk engel alıcı ve verici arasındaki genetik farklılıklar olup, nakil öncesi alıcı ve verici çiftinin HLA doku tipleri belirlenir. HLA antijenlerinin birbirine uyumu böbrek nakli sonrası meydana gelebilecek immünolojik olayları belirler. Alıcı için yabancı olan greft antijenleri alıcının immün sistemini harekete geçirerek immün yanıtı başlatır ve grefte veya konağa hasar verir. Doku tipinin uyumluluğuyla birlikte eğer alıcıda önceden var olan anti-HLA antikorları mevcutsa, nakil sonrası organın çok hızlı bir şekilde kaybedilmesine yol açabilir. Bu sebeple nakil öncesi, Panel Reaktif Antikor (PRA) denilen antikor tarama testi ve Donöre Spesifik Antikor (DSA) tespiti için testler uygulanmaktadır. Hastada antikor varlığı belirlenirse desensitizasyon tedavileri başlanır ve tekrar antikor tarama testi yapılabilir. Donöre spesifik antikor tespit edilirse o donörden nakil gerçekleşmez ve başka bir donör mevcutsa tekrar çaprazlama testleri uygulanabilir. Bu tip reaksiyonların gelişmemesi veya minimize

etmek için greftin yaşam süresini uzatmak amacıyla nakil öncesi alıcı ve vericinin genetik benzerliğinin tespiti, yorumlanması ve en uygun vericinin seçimi yapılmalıdır (50). Bu amaçla yapılacak immünolojik değerlendirmeler şunlardır.

2.7.1. ABO kan grubu uygunluğunun sağlanması

Kan transfüzyonu protokollerine göre uygunluk belirlenir. ABO uyumsuzluğu, kalp ve böbrek greftlerinde hiperakut rejeksiyona yol açabilir. Bunun nedeni, ABO kan grubu antijenlerinin böbrek ve kalp greftlerinde oldukça fazla eksprese edilmesidir. Zorunlu bir durumda kan grubu uyumsuz organ transplantasyonları gerçekleştirilebilir. Ancak böyle bir durumda nakil öncesi plazmaferez, immün adsorbsiyon gibi yöntemlerle antikor titresi azaltılmalı, gerekirse splenektomi yapılmalı ve IV immünglobulin tedavisi uygulanmalıdır. Nakil sonrası dönemde ise özellikle antikor oluşumunu engelleyen immünsüpresif tedavi yöntemi seçilmelidir. İmmünsüpresif terapilerle greftin immün rejeksiyonunun önlenmesi sağlanmaya çalışılarak, ABO bariyerine karşı organ transplantasyonlarının gerçekleşmesine son zamanlarda izin verildiği görülmektedir (37).

2.7.2. HLA Doku Tipleme Test Yöntemleri

Nakil öncesi donör ile alıcının HLA antijenlerinin tespiti büyük önem taşımaktadır. HLA tiplendirmede başvurulan yöntemler serolojik ve moleküler tekniklere dayanır. Serolojik yöntem (mikrolenfositotoksosite) antikor ile kaplı plaklara bireyin lenfositlerinin eklenmesi ile yapılır veya ilerleyen teknoloji ve bilimsel gelişmelerle daha yaygın olarak kullanılan DNA dizileme seviyesinde (DNA tipleme) yöntemleri uygulanmaktadır (51).

Serolojik tiplendirme; temelde kompleman bağımlı sitotoksosite testinde, multipar gebelik öyküsü olan kişilerden alınmış antiserum paneli kullanılarak ayrılmış olan T (HLA sınıf I) ve B (HLA sınıf II) hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilmiş olan HLA moleküllerinin tespitine dayanır. Antijen-antikor etkileşimi ile

meydana gelen ölü hücrelerin oranına göre değerlendirilir. Çoğunlukla Sınıf I antijenlerin tespitinde kullanılır. Bu testte hücreler canlı olması gerekmektedir. Testin sonucu düşük çözünürlükte verilmektedir.

Moleküler teknik; moleküler yöntemlerle yapılan doku tiplendirmelerin serolojik yöntemlere göre birçok avantajı görülmektedir. Özgün, esnek olmaları, yeni aleller bulunduğunda yeni reaktiflerin geliştirilebilmesi, istenilen duyarlılıkta çalışma yapabilecek seçeneklerin mevcut olması, çalışmalarda canlı hücre ihtiyacının olmayışı, bireyin hastalık ya da tedavi durumundan etkilenmemesi, serolojik ve hücresel yöntemlere göre otomasyona daha uygun olması, eş zamanlı olarak çok sayıda örneğin çalışılabilmesi, HLA genlerindeki tüm çeşitliliklerin gösterilebilmesi, serolojik olarak tanımlanamayan alellerin tanınabilmesi olarak söylenebilir. Çalışmalar için herhangi bir çekirdekli hücreden elde edilecek DNA örneği kullanılabilir. Genellikle tercih edilen kandaki lökositlerin kullanılmasıdır (30). DNA temelli HLA tiplemeleri esasen HLA genlerindeki hedef bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Moleküler yöntemlerle yapılan HLA tipleme teknikleri, diziyeye özgü primer (SSP), diziyeye özgü oligonükleotid primer (SSOP) ve amplifiye edilmiş ürünün dizi analizi ile yapılan (SBT) yüksek çözünürlüklü testler ile yapılmaktadır (51).

2.7.2.1. PCR-SSP (Sekans Spesifik Primer) Testi

SSP yönteminin prensibi sekansa uyumlu primerlere dayanır. Primerlerin özgüllüğü 3' uçtaki tek bazlık mismatch ile non-spesifik reaksiyonların engellenmesiyle oluşur. Bunun nedeni, Taq Polimeraz 3'-5' ekzonükleaz aktivitesinden yoksun olmasıdır. Primerin uzaması sadece kalıp iplikle tamamen uyumlu ve bağlanan durumda gerçekleşir (52). Kullanılan primerler, hangi allel için hazırlanmışlar ise DNA'nın o alleli taşıyan bölgesine bağlanarak (annealing) PCR reaksiyonunu başlatır. Primerin özgün olduğu DNA segmenti mevcutsa çoğalma (amplifikasyon) meydana gelir. Bunun yanında, polimorfik bölgelere uygun primerlerin seçilmesi de spesifik amplifikasyonu artırır (30).

2.7.2.2. PCR-SSOP (Sekans Spesifik Oligonükleotit) Testi

Sıklıkla bir HLA lokusunun PCR ile çoğaltılmasıyla birlikte allellere özgü olan oligonükleotidler kullanılarak bu çoğalmış DNA segmenti ile özgün oligonükleotidlerin katı bir ortam üzerinde (ör: naylon bir membran, kuyucuklar ya da boncuklar) bağlanması (hibridleşmesi) sağlanır (30). Sekans Spesifik oligonükleotitler kullanılarak gerçekleştirilen PCR ile oluşmuş hibridizasyon ürünleri hem kolorimetrik (streptavidin-biotin), hem X-ray (digoxigenin-CSPD) hem de floresansa (FITC, PE) bağlı yöntemlerle saptanabilir. Her lokus için iki internal floresan boyalardan kaynaklı spesifik renklerle işaretli yaklaşık 100 mikrosfer bulunur. Her mikrosfer tek bir proba kaplıdır ve komplementer olduğu biyotininle işaretli ampikonla hibridize olabilir. Hibridizasyon meydana geldiğinde, boncuklar ile yakalanan işaretli ampikonlar floresans özelliğe (Streptavidin-PE) dayalı olarak ölçülebilir. SSO tüm lokusu içine alacak şekilde primerler seçilirken, SSP sadece bir allel ya da allel grubuna spesifik DNA segmentlerinin çoğaltılabileceği primerler kullanılır (53).

2.7.2.3. SBT (Nükleik Asitlerin Dizi Analizi “Sequence Based Typing”) Testi

Nükleotit dizileri analiz edilerek bir bireyin taşıdığı allellerin tespit edildiği yöntemdir. PCR-SSP ve SSOP yöntemlerinden farklı olarak SBT ile bilinen bir alleli aramak söz konusu değildir. Bu nedenle dizi analizi öncesinde lokusa ya da allel sekansına özgü primerlerin kullanıldığı bir veya birkaç PCR aşaması gerçekleştirilebilir. Hedef, çeşitliliğin kaynağı olan bölgelerdir. Yöntemin duyarlılığı PCR reaksiyonundan ziyade, daha sonra yapılan dizi analizinden kaynaklanmaktadır. Bu amaçla işaretlenmiş nükleotidler kullanılarak yapılan sentez işleminin ardından elektroforez teknikleri uygulanabildiği gibi sentez sırasında dizi analizi yapılan sistemler de (pyrosequencing) kullanılmaktadır. Başlangıç materyali (mRNA, DNA), çoğaltma yöntemleri, çoğaltılan bölgeler, dizi analizi için kullanılan kimyasal tekniklerde değişiklikler yapılarak pek çok dizi analiz yöntemi geliştirilmiştir. Dizi analizi, zahmetli ve kompleks bir işlem olmasına rağmen özellikle hematopoetik kök

hücre nakli planlanmış hastalara allel bazında denk olan vericilerin tespiti, diğer yöntemlerle elde edilen karmaşık sonuçların çözülmesi için her geçen gün daha yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA dizi analizinde, günümüzde sıklıkla kullanılan iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar, Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi ile Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemleridir (30).

2.7.3. Nakil Öncesi Anti-HLA antikor Belirleme Yöntemleri

Hastada, vericinin HLA antijenlerine karşı oluşmuş antikorların varlığında gerçekleştirilen nakillerde hiperakut rejeksiyon, vericiye spesifik olmayan antikorların varlığında da kronik rejeksiyon gelişme riski oldukça fazladır. Panel reaktif antikor (PRA) olarak da adlandırılan bu antikorlar, hasta serumunda vericinin hücrelerindeki HLA antijenlerine karşı ne kadar anti-HLA antikoruna bulunduğunu % PRA olarak gösteren değerdir. Son yıllarda solid organ ve kök hücre nakillerinden önce anti-HLA antikorlarının tespitinde birçok yöntem uygulanmaktadır (58).

2.7.3.1. Komplemana Bağlı Sitotoksik Cross-Match (CDC) Testi

Cross-match (XM), alıcı (hasta) serumunda vericinin hücrelerindeki HLA (Human Leukocyte Antigen) antijenlerine karşı antikor oluşup oluşmadığını tespit edebilmek amacıyla yapılan testlerdir. CDC cross-match testinin temeli, donör hücrelerinin (genellikle periferik kan, dalak ve lenf nodundan elde edilen lenfositler) elde edilmesi ve dışarıdan eklenen kompleman eşliğinde donör hücrelerinin alıcı serumuyla karşılaştırılması prensibine dayanır. Hasta serumunda DSA varsa, bu antikorlar donör lenfositleri tarafından eksprese edilen HLA moleküllerine bağlanır. Eğer DSA komplemana bağlı izotipse ve yeterli miktarda (titrede) varsa, donör lenfositleri komplemana bağlı hasara uğrar ve ölür (60).

Sitotoksikite testlerinde genellikle total lenfositten ayrılan T ve B hücreleri kullanılmaktadır, bu da Sınıf I ve/veya Sınıf II alloantikorların varlığının tespit edilmesine yardımcı olmaktadır. Alloantikorların tespitindeki hassasiyeti arttırmak

için yapılan en kullanışlı modifikasyon, antihuman globulin'in (AHG) eklenmesidir (61). AHG eklenmiş CDC'de (AHG-CDC), eksogen ikincil bir antikor (genellikle immünoglobulin hafif zincirine karşı), hasta serumu, donör hücreleri ve kompleman içeren reaksiyon kuyucuğuna eklenir. İkinci antikorun eklenmesi, daha yakında birden fazla antikor Fc bölgesi sağlayarak kompleman fiksasyonunun maksimum düzeyde gerçekleşmesine izin verir.

CDC ya da AHG-CDC'nin avantajlarından biri anti-HLA alloantikörlerin çeşitli izotiplerinin tespit edilebilir olmasıdır (örneğin, IgM). Donör hücrelerinin kullanımı, aynı zamanda, donör antijen repertuarına karşı alıcının allo-sensitizasyonunu sorgulamaya izin verir. Antikörün reaktivitesi antijenin üç boyutlu yapısına bağlıdır (62). Bu yüzden, bazı hedef HLA molekülleri, anti-HLA antikörleri tarafından uygun tanınması için moleküler konformasyon değişikliği gerektirebilir (63). Bununla birlikte, CDC ile HLA dışı alloantikörlerin de tespit edilebilir olması bu testin dezavantajlarından biridir. Bu antikörler, genellikle graft fonksiyon bozukluğu ile ilişkili değildir (64). HLA dışı antikörler çoğunlukla otoantikörler olduğundan, oto cross-match yapmak yararlı olabilir (65). Bunlar sıklıkla IgM'dir ve viral enfeksiyon gibi hastalıklarda ortaya çıkar. Sitotoksikite testlerinde IgM'in etkisi çeşitli uygulamalarla azaltılabilir (serumun dithiothreitol (DTT), dithioerytritol (DTE) muamelesi veya 63° de 10 dk tutulması ile).

CDC testinin sonucu pozitif ise IgG kaynaklı pozitiflik genellikle gelişmiş olup, transplantasyon gerçekleşmez ve hiperakut rejeksiyon öngörüsünde yol göstericidir.

2.7.3.2. Flow Sitometri Cross-Match (FCXM) Testi

Flow Sitometri, hızla akan bir sıvının içinde hareket eden hücrelerin birden çok özelliğini aynı anda ve tek hücre bazında ölçen bir teknolojidir. Tıbbın farklı alanlarında kullanılan Flow Sitometri, Cross-Match (XM) testleri ile transplantasyon kararının verilmesinde de son derece önemli yer tutmaktadır (66). FCXM de hedef lenfositlere bağlanan insan alloantikörlerini saptamak için indirekt immünoflorasan kullanılır. İndirekt işaretlemeye süspansiyon halindeki hücrelere ilk olarak işaretli antikor bağlanır. İşaretli antikorla birleşmiş bu hücrelerin analizi için ikinci bir işaretli antikora daha ihtiyaç vardır. Bu ikinci antikor da hücreye bağlanmış

durumda olan birinci antikora bağlanır (54). FCXM'de kullanılan ikinci antikor çok önemlidir. Tercih edilen ikinci antikor, antikorun Fc bölgesine spesifik olmalı, F (ab')₂ fragmanı olmalı, fare ve at IgG'leri ile çapraz reaksiyon vermemelidir (54).

Monoklonal antikor, araştırılması istenen hücre popülasyonunu belirlemeye yarar. Bununla birlikte çoğu solid organ ilişkili XM'lerde CD3 T hücrelerini tanımak için kullanılırken, CD19 veya CD20 B hücrelerini tanımak için kullanılır. İkincil antikorun florokrom seçimini monoklonal antikorlar için kullanılan florokromlar belirleyecektir. Genellikle ikili boyamalarda monoklonal antikorlar CD3-PE (Phycoerythrin), CD19-PE / CD20-PE ve IgG-FITC (Fluorescein isothiocyanat) kullanılır (66,54). Üçlü boyama yapılıyorsa CD3-PerCP (Peridinin chlorophyll protein), CD19-PE ve IgG-FITC tercih edilir. FCXM hem pozitif (+), hem de negatif (-) kontrol serumlarını gerektirir.

2.7.3.2.1. T FCXM

Flow Sitometrinin yüksek hassasiyetinden dolayı DSA'lar CDCXM ile negatif olmasına rağmen FC ile saptanabilir. Bu antikorların konsantrasyonları greftin hiperakut rejeksiyonunu oluşturmak için yeterli yükseklikte olmayabilir. Bununla birlikte pozitif T FCXM'li hastalar ve negatif T CDCXM'li hastalar greft kaybı açısından yüksek riske sahiptir (67).

2.7.3.2.2. B FCXM

Anti HLA Sınıf II antikorlarının transplantasyondaki rolü tartışmalıdır. Sitotoksite ile Sınıf I antijenlerinin yokluğunda düşük titrede DR, DQ antikorlarının greft sağkalımı için zararlı olmadığı ile ilgili bulgular vardır (70). Aksine yüksek titredeki antikorlar hiperakut rejeksiyon oluşturabilir. Ayrıca B FCXM pozitifliği hem Sınıf I hem de Sınıf II antikorların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. B hücre yüzeyinde Sınıf I antijenleri T hücre yüzeyinden daha yoğun olarak eksprese edilmektedir. Bu nedenle de çok düşük düzeydeki Sınıf I antikorlarının varlığı B FCXM pozitifliği ile tespit edilebilir (69,70,71).

Sonuçta, bir transplant adayı için; FCXM negatif CDCXM negatif ise nakil yapılabilir. FCXM negatif CDCXM pozitif ise nakil yapılmaz. Çünkü bu sonuç hiperakut rejeksiyon için yüksek riski ifade eder. Eğer FCXM pozitif CDCXM negatif ise daha önce transplantasyonu olmayan, gebelik geçirmemiş, kan transfüzyonu yapılmamış kişilere transplantasyon yapılabilir. Ancak hasta yukarıdaki şartları taşıyorsa ya nakil yapılmamalı ya da transplantasyon yapılıyorsa greft rejeksiyonu için yüksek risk taşıyan bir hasta olduğu göz önüne alınmalıdır (68).

2.7.3.3. Luminex Cross-Match (DSA; Donör Spesifik Antikor) Testi

Lum-DSA, donörden elde edilen HLA Sınıf I ve HLA Sınıf II proteinlerine (Antijen) bağlanan çözünmüş IgG antikorlarını tespit eden Luminex tabanlı solid faz immünassay yöntemidir (72).

Lum-DSA testinde kullanılan, yakalama boncukları her biri donörün HLA proteinlerini yakalayan HLA Sınıf I veya HLA Sınıf II'ye spesifik monoklonal antikorlar ile kovalent bağlı solid faz yüzeyi oluşturur. Yüzeyi kaplanan boncuklardan donör lizatındaki bağlanmayan proteinler yıkamayla uzaklaştırılır. Böylece bu boncuklar hasta serumunda, donörün hücrelerine karşı oluşmuş spesifik antikorların olup olmadığını tespit için prob olarak kullanılabilir hale gelir. HLA Sınıf I proteinleri ile kaplı boncuklar HLA Sınıf II proteinleri ile kaplı boncuklardan, boncukların kendi sahip olduğu farklı floresan emisyonundan dolayı ayırt edilir. CDC yöntemi ile oluşan anti-HLA antikorunun hedef hücresi (T ve B lenfositler) belirlenirken, DSA yönteminde oluşan antikorun sınıfı saptanmaktadır. Bu durum DSA yönteminin bir avantajıdır (73).

Periferik kan lökositleri, trombositler, dalak, lenf nodları donör kaynak materyali olarak kullanılabilir. Bu donör kaynak materyallerinden izole edilen hücreler, lize eden deterjanla işleme sokulur ve çözünmüş HLA proteinleri elde edilir. Santrifüjleme ile hücre fragmanları uzaklaştırılır. Elde edilen lizat hızla depolanabilir veya kullanılır (74).

Bir seri kontrol boncukları farklı flüoresan emisyonu sahiptir. Bunlar; 1) Solid matris boncuklara nonspesifik IgG bağlanma miktarlarını belirler 2) Her bir çalışma esnasında uygun konjugat uygulanır (75).

Kitin içinde PE (Fikoeritrin) ile konjuge edilmiş iki farklı molekül vardır. Konjugatın birisi human IgG'ye bağlanan PE ile işaretli anti-human IgG'dir. Diğer biotinlenmiş monoklonal antikorlara bağlanan PE ile işaretli streptavidin'dir. Bunlar yakalama boncuklarına bağlanan donör HLA Sınıf I ve II proteinlerinin miktarını belirler (76).

2.7.3.4. PRA (Panel Reaktif Antikor) Testleri

Kan transfüzyonları, rejekte olmuş greftler ve multipar gebeliklerden sonra oluşabilecek vericiye karşı anti-HLA antikorların varlığını saptayan testlerdir. Nakil bekleyen hastalarda risk oluşturabilecek bu antikorların tespiti düzenli periyotlarla yapılır. Nakilden önce yapılan PRA testleri greftin sağ kalımı ve çaprazlama testinin pozitifliği arasında fikir vermektedir. PRA testlerinin yapıldığı Luminex PRA, Flow Sitometrik PRA gibi çeşitli yöntemler uygulamada farklılık gösterse de prensipte hepsi aynıdır (77).

PRA Tarama Testi, nakil öncesi ve sonrasında anti-HLA antikor taraması için kullanılan bir yöntemdir. PRA Tarama Boncukları, HLA sınıf I ve II glikoproteinlerine karşı üretilmiş IgG antikorlarını tespit etmek için tasarlanmıştır.

Farklı bireylerden elde edilmiş HLA sınıf I ve II glikoproteinleri konjuge edilerek saflaştırılmış ve mikro boncuklara tutturulmuşlardır. Bu boncuklardan oluşan bir havuz ile serumdaki antikor yüzdesi belirlenmektedir. PRA tarama testi sonucu pozitif çıkan hastalara antikor tipini belirlemek için PRA tanımlama testi uygulanır. PRA tanımlama testi sonucu yüksek oranda sensitize (PRA>%85) ise bu hastaların sensitize olmadıkları antijenleri saptamak için daha spesifik özelliğe sahip Tek Antijen Boncuk (SAB) testi yapılır (78).

2.8. Rejeksiyon Tipleri ve Mekanizmaları

Rejeksiyon, greft yetmezliğinin en önemli sebebi olup, vücudun grefte karşı immün yanıtıdır. Genel olarak rejeksiyon tipleri, hiperakut, akut ve kronik olmak üzere 3 temel şekli ile sınıflandırılır (79).

2.8.1. Hiperakut rejeksiyon

Nakil öncesi var olan sitotoksik antikorlar aracılığıyla gerçekleşir ve bu antikorların tespiti için yapılan cross-match test sonuçları negatif olması halinde, nadir karşılaşılan bir olaydır. Vasküler anastomozlar yapıldıktan hemen sonra görülebileceği gibi nakilden sonraki 3 gün içerisinde de gözlenebilir (79).

2.8.2. Akut rejeksiyon

Bu rejeksiyon tipinde rol alan iki immünopatolojik mekanizma vardır. Bunlar; hücre aracılı immünite ve antikor-aracılı (humoral) immünitedir. Hücre aracılı akut rejeksiyon, erken rejeksiyonun en sık rastlanılan şeklidir ve tübülointerstisyel ve vasküler formları bulunmaktadır. Tübülointerstisyel hücre aracılı akut rejeksiyonda birincil anomaliler interstisyumda görülür. İnterstisyum yaygın bir şekilde ödemli, az miktarda monosit ve plazma hücresi ile birçok transforme gerçekleşmiş lenfositler aracılığıyla infiltrate olarak gözlemlenir. Vasküler rejeksiyonda, lenfositler, monositler ve köpük hücreleri arteriyel endoteli hasara uğratabilir. Endotelyal hücreler, şişkin ve çoğunlukla vakuollüdür ancak arter duvarı nekrozu bu rejeksiyon tipine özgü bir özellik değildir. Antikor aracılı akut rejeksiyon, duvarda fibrinoid nekroz ile lenfosit, monosit ve nötrofil proliferasyonunu da kapsayan nekrotizan arteritle karakterizedir. Kapillerde kompleman bileşeni olan C4d yaygın olarak bulunur (80).

2.8.3. Kronik rejeksiyon

Kronik allograft nefropati (KAN) terimi, kronik rejeksiyon yerine sıklıkla kullanılan bir terimdir. Arterler, tübüller, interstisyum ve glomerüllerde kronik değişiklikler ile diğer rejeksiyonlardan farklı seyreder. Kronik değişikliklerin çoğu immünolojik aracılı gerçekleşen ya da gerçekleşmeyen kronik organ hasarının farklı şekillerinden ortaya çıkabilir. Bunlar kronik rejeksiyon, kronik kalsinörin inhibitör toksisitesi, nefroskleroz, kısmi obstrüksiyon, reflü ve kronik enfeksiyonlardır (80).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'nda Ocak 2014 - Aralık 2016 tarihleri arasında kadavra donörden böbrek nakli için başvuran hastalara yapılan çaprazlama test sonuçları ve Luminex'e dayalı Panel Reaktif Antikor (PRA) tarama test sonuçları değerlendirmeye alındı. 113 kadavra donöre çağırılan 416 hastanın sonuçları çalışmaya dâhil edildi. Nakil öncesi değerlendirmelerde Komplemana Bağlı Sitotoksik Çaprazlama (CDCXM) testi tüm hastalara uygulanmıştı. CDCXM testine ek olarak 132 hastaya Akım Sitometrisi Çaprazlama (FCXM), 280 hastanın Luminex platformunda Donör Spesifik Antikor Çaprazlama (DSA) ve 375 hastanın Panel Reaktif Antikor (PRA) tarama test sonuçları yapılmıştı.

Kadavra donörden nakil olan 25 hasta ve verici çiftine rutin çalışılan HLA-A, HLA-B ve HLA-DR doku tiplerine ek olarak HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 lokusları da çalışıldı.

Çalışmamız için İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi etik kurulundan 29 Temmuz 2015 tarih ve 8 nolu kararı ile onay alındı.

3.2. Materyal

Bu çalışmada nakil öncesi yapılan çaprazlama testlerinden CDCXM, FCXM ve DSA yöntemlerinden en az iki tanesi aynı anda uygulandı. Çalışmada nakil için başvuran hastalara Luminex metodu ile PRA taraması yapıldı. Ayrıca, kadavra donörden nakil olmuş hasta ve verici çiftlerinden oluşturduğumuz çalışma grubuna, Lifecodes HLA-C eRES SSO (Immucor, Stanford, USA, LOT: 06024A), Lifecodes HLA-DQA1/B1 SSO (Immucor, Stanford, USA, LOT: 07065B) kitleri kullanılarak, PCR-SSOP (Sekans Spesifik Oligonükleotit) yöntemi ile HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 tiplemesi yapıldı.

3.2.1. CDCXM Test Materyalleri

3.2.1.1. T Hücre Pozitif Kontrol

Tüm HLA-A, HLA-B ve HLA-C moleküllerindeki monomorfik determinantlara spesifik monoklonal antikor ya da kompleman bağımlı durumda T lenfositlerle sitotoksositeye neden olduğu bilinen herhangi antikor kullanılır.

3.2.1.2. B Hücre Pozitif Kontrol

HLA-DR moleküllerindeki monomorfik determinantlara spesifik monoklonal antikor ya da kompleman bağımlı durumda B lenfositlerle sitotoksositeye neden olduğu bilinen herhangi antikor kullanılır.

3.2.1.3. Kompleman

Toplanmış olan tavşan serum komplemanı değişme eğilimindedir. Aktivasyon kaybını minimize etmek için, stok şişesi (firmadan gelen) hızlıca 37 °C su banyosunda hafifçe döndürülerek çözündürülmeli ve çözünür çözünmez banyodan çıkarılmalıdır.

3.2.1.4. Dithiothreitol (DTT)

0,3086 g DDT'ye 10 mL 1X PBS eklenir ve pH 7-8'e ayarlanır. Süzülür ve 200 µL'lik alikotlara ayrılır, -80 °C'de saklanır. 4 ay stabil kalabilir. Toz DTT desikatörde -20 °C'de saklanabilir.

3.2.1.5. Fluoroquençh Boya (Ethidium Bromide & Acridine Orange)

Ticari olarak firmadan alınmaktadır (One Lambda, Inc.) İçeriğinde acridine orange, EDTA, Sodium Azide, Ethidium bromide, bulunmaktadır. Karanlıkta ve 2-8°C’de saklanmalıdır.

3.2.1.6. İmmünomanyetik Yakalama Boncukları

Ticari olarak firmadan alınmaktadır (FluoroBeads T ve B, One Lambda, Inc.). T ve B hücrelerinin ayrılması için kullanılan yakalama boncuklarıdır.

3.2.1.7. Parafin Oil

Terasaki plağındaki kuyucukların içerisinde gerçekleşecek olan CDC reaksiyonunun üzerini kaplayarak hem reaktiflerin buharlaşmasını engeller hem de reaktiflerin kuyucuğun dibine itilmesini sağlayarak uygun ortamı oluşturur.

3.2.1.8. Biocoll Ayırma Solüsyonu (Biochrom)

50 mL’lik falconlara alikotlanarak 2-8°C’de stoklanabilir. Lenfosit izolasyonunda kullanılır.

3.2.1.9. L-Sistin

Ticari olarak firmadan alınmaktadır. Alikotlanarak -20 °C’de stoklanır.

3.2.1.10. Fosfat Tamponu 1X (PBS)

50 mL 10X'lik (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) PBS'e 450 mL dH₂O eklenir. pH 7,4'e ayarlanır. 2-6°C'de 6 aya kadar saklanabilir.

3.2.1.11. RPMI 1640, L-Glutaminli 1X (RPMI)

Kalsiyum ve Magnezyum içerir. 2-6°C'de saklanır. Stabilité üretici tarafından belirtilir. Renkteki herhangi bir değişiklik ve bulanıklık oluşumu besiyeri ortamının kontamine olduğunu gösterir.

3.2.2. FCXM Test Materyalleri

3.2.2.1. Pozitif Kontrol

Sınıf I ve II HLA antikorundan yüksek oranda sensitize (PRA >80) hasta grubundan bir serum havuzu oluşturularak elde edilir.

3.2.2.2. Negatif Kontrol

Herhangi bir sensitizasyonu bulunmayan HLA Sınıf I ve II antikorlarından tamamen negatif bulunmuş bireyin serumu kullanılır.

3.2.2.3. CD3-PercP

Bu monoklonal antikorlar T hücrelerinin yüzeyindeki CD3 antijenlerine özgüdür. Uçlarında -PercP flüoresan boyasıyla işaretlidir. Aynı tüpteki hücre süspansiyonunda T hücrelerinin ayırt edilmesini sağlar. Ticari olarak alınmakta olup karanlıkta saklanır.

3.2.2.4. CD19-PE

Bu monoklonal antikorlar B hücrelerinin yüzeyindeki CD19 antijenlerine özgüdür. Uçlarında –PE (Fikoeritrin) flüoresan boyasıyla işaretlidir. Aynı tüpteki hücre süspansiyonunda B hücrelerinin ayırt edilmesini sağlar. Ticari olarak alınmakta olup karanlıkta saklanır.

3.2.2.5. IgG-FITC F(ab')₂

Bu sekonder antikorlar oluşan antijen-antikor kompleksinde antikorun Fc kısmına özgüdür. Uçlarında -FITC flüoresan boyasıyla işaretlidir. Ortamda oluşan antijen-antikor komplekslerinin ayırt edilmesini sağlar. Ticari olarak alınmakta olup karanlıkta saklanır.

3.2.2.6. Fikol Ayırma Solüsyonu (Biochrom)

50 mL'lik falkonlara alikotlanarak 2-8°C'de stoklanabilir. Lenfosit izolasyonunda, lenfositlerin gradient farkına bağlı olarak tüpün ortasında hücre tabakası oluşturmasını sağlar.

3.2.2.7. Fosfat Tamponu 1X (PBS)

50 mL 10X'lik (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) PBS'e 450 mL dH₂O eklenir. pH 7,4'e ayarlanır. 2-6°C'de 6 aya kadar saklanabilir. Hücre izolasyonunda ve diğer yıkama basamaklarında hücrelerin canlılığını yitirmemesi için tampon solüsyon olarak kullanılmaktadır.

3.2.2.8. RPMI 1640, L-Glutaminli 1X(RPMI)

2-6°C’de saklanır. Stabilite üretici tarafından belirtilir.

3.2.3. Luminex Cross-Match (DSA) Test Materyalleri

3.2.3.1. Yakalama Boncukları

Sınıf I glikoprotein veya sınıf II glikoprotein için spesifik monoklonal antikorlar ile konjuge edilen boncuk karışımı ve 5 kontrol boncuğu içerir. Boncukların saklama tamponu NaCl, Tween 20, Na azide, BSA içeren fosfat tabanlı bir tampon solüsyondur. Işığa hassastır. 3 saatten fazla ışığa maruz kalmamalıdır. Karanlıkta 2-8 °C’de saklanmalıdır.

3.2.3.2. Konjugat Çözeltisi

10X keçi anti human IgG-PE’dir. NaCl, Tween 20, ProClin 300, BSA içeren fosfat tabanlı tamponda saklanır.

3.2.3.3. SAPE Çözeltisi

10x stok solüsyonu. NaCl, Tween 20, ProClin 300, BSA içeren fosfat tabanlı tamponda PE ile konjuge edilmiş streptavidindir. Işığa hassastır. 3 saatten fazla ışığa maruz kalmamalıdır, karanlıkta 2-8°C’de saklanmalıdır.

3.2.3.4. Lenfosit Parçalama Tamponu

10x stok solüsyonu. Noniyonik deterjan ve Na azid içeren tristampon solüsyonudur. 2-8⁰C'de saklanmalıdır.

3.2.3.5. Örnek Sulandırma Solüsyonu (Specimen Diluent)

BSA ve fare serumu ve Na azid içeren PBS. Kullanım anında hazırlanmalı ve karanlıkta 2-8⁰C'de saklanmalıdır.

3.2.3.6. Lizat Kontrol Reaktifi

10X stok solüsyonu. Sınıf I ve II HLA antijenlerine spesifik biotinle işaretli human antikordur.

3.2.3.7. Boncuk karışımı

Çalışmadaki arka plan kirliliğini görüntülemek için, çalışmada uygun konjugatın kullanıldığından emin olmak için kontrol boncuklarını kapsar.

3.2.4. Luminex PRA Tarama Test Materyalleri

3.2.4.1. Boncuk Karışımı

HLA Sınıf I ve II glikoproteinleriyle tutturulan boncuklardan ve 4 kontrol boncuğundan meydana gelen karışım fosfat tamponunda süspansiyon formunda bulunur.

3.2.4.2. Konsantre Konjugat

Fikoeritrin ile işaretli keçiden elde edilen anti-human IgG'nin 10x stoğundan oluşur ve kullanmadan önce 1/10 oranında seyreltilmesi gerekmektedir.

3.2.4.3. Yıkama Tamponu

Kullanıma hazır fosfat taponundan oluşur.

3.2.4.4. Pozitif Kontrol Serum

HLA antijenlerine karşı duyarlılaştığı saptanan bireylerden toplanan serum karışımıdır.

3.2.4.5. Negatif Kontrol Serum

HLA antijenlerine karşı antikor içermeyen bireylerden toplanan serum karışımıdır.

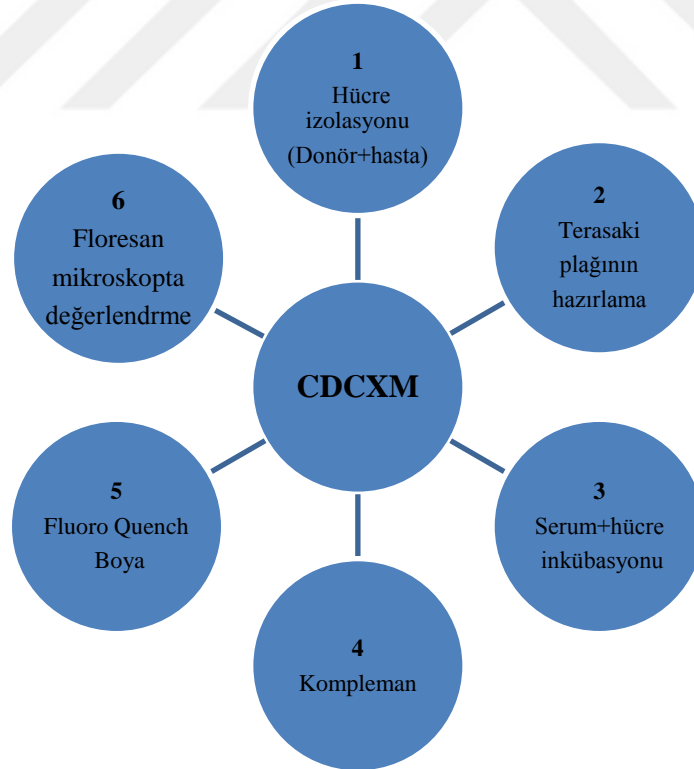
3.2.5. PCR-SSOP Test Materyalleri

- Lifecodes HLA-C eRES SSO (Immucor, Stanford, USA, LOT: 06024A) kiti ve Lifecodes HLA-DQA1/B1 SSO (Immucor, Stanford, USA, LOT: 07065B) kiti
- Lifecodes Taq DNA Polimeraz
- Distile Su
- Streptavidin

- Biotin primer, dNTPs ve tampon içeren bir master karışımı (ticari kitlerle temin edilir)
- Pre-Bound oligonükleotidler ile DNA tüpleri ticari kitlerle sağlanır
- 1-10 µ, 10-200 µ, 200-1000 µ lik mikropipetler
- Mikrotite trayler ve üzerini kapatmak için yapışkanlı plastik kaplayıcı
- Thermocycler
- Verileri analiz etmek için bilgisayar ve software programı

3.3. Metod

3.3.1. Komplemana Bağlı Sitotoksik Cross-Match (CDCXM) Yöntemi



Şekil 6. Komplemana bağlı sitotoksik cross-match test prosedürü

Komplemana Bağlı Sitotoksik Cross-match yönteminde çalışacağımız Terasaki plağının her kuyusuna yaklaşık 13µL parafin oil dağıtıldı. Pozitif kontroller ve negatif kontroller eklendi. Serum ve dilüsyonlardan 1'er µL dağıtıldı. İlgili kuyulara 1'er µL DTT eklendi. Cross-match için kullanılacak donör hücreleri periferel kandan, lenf nodu ve dalaktan hazırlanabilir. Eğer tüm kandan hazırlanacaksa; 15mL'lik polistiren konik tüplere 5mL fikol üzerine 10mL hücre süspansiyonu dağıtılır. Tüpler 2500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan bulanık halka şeklindeki lenfosit tabakası Pastör pipet yardımı yeni tüplere aktarıldı. Bu hücreler 3 kere sırasıyla 1800 rpm, 1500 rpm ve 1200 rpm'de santrifüj ile yıkamaları yapıldı. T ve B hücrelerini ayırmak için immünomanyetik boncuklar kullanıldı. 2 adet parmak tüpten birine 50 µL T, diğerine 50 µL B boncuk koyuldu. Üzerlerine hücre solüsyonu eşit miktarda dağıtıldı. Parmak tüpler 3 dk manyetik karıştırıcıda bekletildi. Tüpler 2-3 dk mıknatısta bekletildi, süpernatant atıldı. Üzerine 0,5 ml PBS eklenip 2. basamak tekrarlandı. Tüplerin üzerine Pasteur pipet ile 3-4 damla PBS eklendi. İyice karıştırılmış, boncukla izole edilmiş lenfosit süspansiyonları serum içeren kuyuların her birine 1µL dağıtıldı. Plak oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. DTT'li serum içeren kuyulara 1µL L-sistin dağıtılıp 10 dk inkübe edildi. Tüm kutulara 6'lı Hamilton pipet kullanılarak kompleman solüsyonundan 5'er µL dağıtıldı. 60 dk karanlıkta inkübe edildi. Flüoresans inverted mikroskop ile sitotoksik sonuçları tespit etmek için her kuyuya 6'lı Hamilton pipet yardımıyla 1 µL fluoroquenç boya dağıtıldı. Plak ışıktan mümkün olduğu kadar korunup 1 saat içinde okundu.

Tablo 2. Terasaki plak düzeni

	A	B	C	D	E	F
1	Neg k	Pos k IgG	Oto	Oto	Oto	Oto
2	Neg k	Pos k IgM	Oto	Oto	Oto	Oto
3	Neg k -DTT	Pos k -DTT IgG	Oto-DTT	Oto-DTT	Oto-DTT	Oto-DTT
4	Neg k -DTT	Pos k -DTT IgM	Oto-DTT	Oto-DTT	Oto-DTT	Oto-DTT
5	Neg k	Pos k IgG	PBL	PBL	PBL	PBL
6	Neg k	Pos k IgM	PBL	PBL	PBL	PBL
7	Neg k-DTT	Pos k-DTT IgG	PBL-DTT	PBL-DTT	PBL-DTT	PBL-DTT
8	Neg k-DTT	Pos k-DTT IgM	PBL-DTT	PBL-DTT	PBL-DTT	PBL-DTT
9	Neg k	Pos k IgG	B-CELL	B-CELL	B-CELL	B-CELL
10	Neg k	Pos k IgM	B-CELL	B-CELL	B-CELL	B-CELL
11	Neg k-DTT	Pos k-DTT IgG	B-DTT	B-DTT	B-DTT	B-DTT
12	Neg k-DTT	Pos k-DTT IgM	B-DTT	B-DTT	B-DTT	B-DTT

3.3.2. Akım Sitometri Cross-Match (FCXM) Yöntemi

Akım Sitometri Cross-match yönteminde ilk olarak 12x75 mm flow tüplerinin üzerine Negatif kontrol (NK), Pozitif kontrol (PK), Otolog (OTO) ve cross-match (XM) isimlendirmeleri yazıldı. OTO tüpünün dışındaki bütün tüplere donör hücre süspansiyonundan 25 µl aktarıldı. OTO tüpüne ise hasta hüresinden aktarıldı. NK tüpüne negatif kontrol serumundan, PK tüpüne pozitif kontrol serumundan, OTO ve XM tüplerine de hasta serumundan 25 µl aktarıldı. Tüpler hafifçe vortekslenerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüplere dispenser ile 500 µl 1X PBS aktarılıp hafifçe vortekslendi. Tekrar 500 µl 1X PBS eklenip hafifçe vortekslenerek 1900 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Yıkama işleminden sonra bütün tüplere 5'er µl CD3-PercP ve CD19-PE monoklonal antikorları eklendi. En son olarak 50'şer µl IgG-FITC eklendi. Tüpler hafifçe vortekslenip karanlıkta 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1900 rpm'de 5 dk. iki kez yıkama yapıldı. En son yıkamadan sonra tüplere 500'er µl 1X PBS eklenerek FacsCalibur Flow Sitometri cihazında okuma ve analiz yapıldı.

3.3.3. Luminex Cross-Match (DSA; Donör Spesifik Antikor) Yöntemi

Yıkama solüsyonu ve Örnek Sulandırma Solüsyonu'nu (ÖSS) oda sıcaklığına çıkarıldı (20-24°C). Plak dizilim şeması kullanılarak filtreli plakta bir pozisyon belirlendi. Kurutulmuş Lenfosit Kontrol Lizatı (LMDCR) için; 1 kuyu Lizat Kontrol Reaktifine (LMLCR), 1 kuyu Pozitif Kontrol Serum (LMPC)'na ve 1 kuyu da Negatif Kontrol Serum (LMNC)'na ayrıldı. Her bir test lizatı için; 1 kuyu Lizat Kontrol Reaktif (LMLCR)'ine ve 1 kuyu da lizat ile test edilecek her bir serum için ayrıldı. Testin her bir kuyusu için 8 µl lizat ve 5 µl boncuk gereklidir. Lizat ve boncukları karanlıkta, oda sıcaklığında (20-24°C) 200 rpm hızla dönen bir rotator üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

Gerekli toplam hacimdeki dilue edilmiş LMLCR'yi hazırlandı. Testin her bir kuyusu için 50µl dilue edilmiş LMLCR gereklidir; (her verici ve kontrol lizatı 1 tane). Dilue edilmiş LMLCR'yi hazırlamak için kullanılan her kuyu başına 5 µl LMLCR'yi 45 µl ÖSS eklendi. Kullanılana kadar oda ısısında karanlıkta tutuldu. Plak dizilim çizelgesine göre kullanılmayan kuyuların üzerine yapışkanlı plastik kaplayıcı kapatıldı. Kullanılacak kuyulara 100-300µl distile su eklendi. 2-5 dakika sonra vakum manifoldu kullanarak plaktaki suyu aspire edildi. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında doğru miktardaki yıkama solüsyonu Boncuk / Lizat karışımına eklendi. Her bir test kuyusu için 42 µl yıkama solüsyonu gereklidir. Karışım 30 saniye vortekslendi. Plak dizilim çizelgesine göre plakta o lizat için ayrılmış kuyulara dilue edilmiş ilgili Boncuk / Lizat süspansiyonundan 55 µl dağıtıldı. Her kuyuya 100 µl yıkama solüsyonu eklendi. Plağın yan tarafına hafif hafif vurarak karıştırılıp plak aspire edildi. Her kuyuya 250 µl yıkama solüsyonu eklenip aspire edildi. Bu işlem 250 µl ile yapılan toplam 3 yıkama olacak şekilde 2 kez daha tekrarlandı. Dilue edilmiş LMLCR 50 µl plak dizilim çizelgesine göre kararlaştırılan kuyulara eklendi. Filtreli plağın her test kuyusuna 38 µl ÖSS eklenip, daha sonra üzerine 12 µl ya hasta serumu ve kontrol serumu eklendi. Plağın üzerini yapışkanlı plastik kaplayıcı ile kapatılıp güneş ışığından korumak için bir kutuya koyuldu. Oda sıcaklığında (20-24°C) karanlıkta 200 rpm hızla dönen bir rotator üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Gerekli toplam hacimdeki dilue edilmiş SA-PE hazırlandı. Dilue edilmiş SA-PE'yi hazırlarken testin her bir kuyusu için 5 µl

LMSA'yı 45µl yıkama solusyonu eklendi. Gerekli toplam hacimdeki konjugat seyreltilerek hazırlandı. Konjugat seyreltilirken testin her bir kuyusu için 5 µl LMCJS'yi 45 µl yıkama solusyonu eklendi. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında dikkatli bir şekilde yapışkanlı plastik kaplayıcıyı plaktan çıkarıldı. Her kuyuya 100 µl yıkama solusyonu eklendi. Plağın yan tarafına hafif hafif vurarak karıştırılıp plak aspire edildi. Her kuyuya 250 µl Yıkama solüsyonu eklenip aspire edildi. Bu işlem 250 µl ile yapılan toplam 3 yıkama olacak şekilde 2 kez daha tekrarlandı. Daha önceden dilue edilmiş LMLCR içeren kuyulara 50 µl dilue edilmiş SAPE eklendi. Daha önceden dilue edilmiş hasta serumları ya da kontrol serumları içeren kuyuların üzerine 50µl dilue edilmiş Konjugat eklendi. Plağın üzerini yapışkanlı plastik kaplayıcı ile kapatılıp güneş ışığından korumak için bir kutuya konuldu. Oda sıcaklığında (20-24°C) karanlıkta 200 rpm hızla dönen bir rotator üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

30 dakikalık inkübasyon sonrasında her kuyuya 150 µl yıkama solüsyonu eklendi. Çalışma plağı luminex cihazına yerleştirildi. DSA her bir lizat ile çalışılan kontrol reaktifini kapsar. HLA'nın yakalandığından emin olmak için lizat kontrol reaktifi, serum örnekleri ile paralel test edilir. LCR biotinlenmiş monoklonal antikor karışımıdır. Bu monoklonal antikorlar Sınıf I ve II için spesifiktir. Biotinlenmiş monoklonal antikorlar dilue edilmiş streptavidin-PE konjugatı ile saptanır. DSA; tüm çalışmanın uygun şekilde yapıldığını doğrulamak için kontrol sistemini kapsar. Bunlar; kurutulmuş lenfosit kontrol, negatif kontrol serumu, pozitif kontrol serumudur.

Hem sınıf I hem de sınıf II HLA 'ya karşı antikor içeren kurutulmuş lenfosit kontrol için karşılaştırılır. Kontrol sistemi her çalışmada çalışılır.

3.3.3.1. Kalite Kontrol

Boncuklar çalışma performansını monitorize etmek için kontrol boncukları (CON) içerir. CON boncukları çalışma esnasındaki arka planı belirler. Boncukların her bir lotu, arka plan düzenleme faktörü (BAF) elde etmek için 30 donör lizatı /30

nonsensitize bireyden elde edilen negatif serumları üretici tarafından test edilmiştir. BAF, her bir lizat/serum kombinasyonunda arka plan kirliliğini dengelemek için kullanılan bir Ortalama Floresans Yoğunluğu (MFI) değeridir. Her bir örnek için BAF'lar her bir kitle verilen kayıt sayfası gösterilen lot-spesifik eşitlikler kullanılarak hesaplanır. Prob 77 Human IgG ile bağlanmıştır ve kuyulara eklenen Konjugat ile belirlenir. Prob 78 biotinlenmiş proteinle bağlanmıştır ve kuyulara eklenen SAPE ile belirlenir. Bu kontroller teknik hataları veya kit yetersizliklerini tespit eder. Prob 77 MFI değeri ≥ 10000 , Prob 78 değeri ≥ 8000 olmalıdır.

3.3.3.2. Sonuçların Analizi

Yakalama boncuklarının MFI değerlerini bulmak için her üç CON için bulunan cutt-off değeri ile (BAF) karşılaştırılır. Her bir testte CON boncuklarının MFI değeri ölçülür ve kayıt sayfasında verilen lot spesifik HLA Sınıf I ve HLA Sınıf II yakalama boncukları için denklemden BAF değerleri bulunur. Her bir yakalama boncuğu için bulunan MFI değerinden BAF değeri çıkarılır. 2 ya da daha fazla Adjusted MFI (düzenlenmiş MFI) değeri pozitif ise sonuç pozitif, 2 ya da daha fazla Adjusted MFI değeri negatif ise sonuç negatiftir.

Negatif Adjusted MFI Değeri;

Örnek:

$$\text{CON1 için Sınıf I HLA BAF} = 49.465(\text{CON1})^{0,5312}$$

$$\text{CON2 için Sınıf I HLA BAF} = 34.622(\text{CON2})^{0,5673}$$

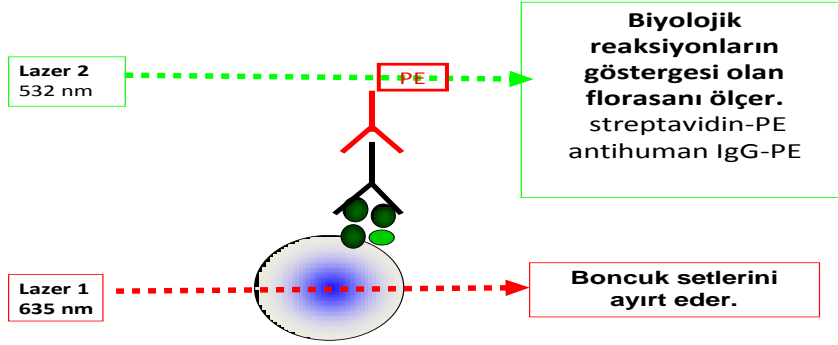
$$\text{CON3 için Sınıf I HLA BAF} = 29.615(\text{CON3})^{0,6532}$$

Örnek:

$$\text{Sınıf I HLA Capture Bead MFI} - (\text{CON1 için BAF}) = \text{Adjusted MFI 1}$$

$$\text{Sınıf I HLA Capture Bead MFI} - (\text{CON2 için BAF}) = \text{Adjusted MFI 2}$$

$$\text{Sınıf I HLA Capture Bead MFI} - (\text{CON3 için BAF}) = \text{Adjusted MFI 3}$$



Şekil 7. Luminex metodu

3.3.4. Luminex PRA Tarama Yöntemi

Luminex PRA Tarama testi nakil öncesi ve sonrasında anti-HLA antikor taraması için kullanılan bir yöntemdir. Hasta serumları 3500 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi (Amaç; fibrilleri ve debrileri uzaklaştırmak). PRA plak çalışma formu (plak bu düzene göre sıralanır) hasta serum numaraları kaydedildi. 300 µl. distile su kullanılacak boş kuyulara eklenerek ısıtıldı. 2-5 dk. sonra vakumlandı (Amaç; filtrenin doygun hale gelip, sonraki aşamalarda eklenen sıvıların aşağıya tamamen inmesini sağlamak). Bu sırada boncuklar 30 saniye santrifüj sonrasında vortekslendi. Her bir kuyuya sırasıyla aşağıdakiler eklenir:

40 µl. Yıkama Tamponu	}	Kuyulara eklendi.
12,5 µl. Serum Örneği		
5 µl. HLA I/II Boncukları		

Plak kapağı kapatılıp, ışıktan uzak oda ısısında rotatorda 30 dk. inkübasyona bırakıldı (Ortalama 200-400 rpm hız aralığında bırakıldı). İnkübasyon esnasında Konjugat hazırlandı.

(Örnek sayısı + 1) x 5 = Konjugat
(Örnek sayısı + 1) x 45 = Yıkama solüsyonu } Tek bir ependorf tüpüne aktarılıp, karanlıkta saklandı.

İnkübasyon bitiminde kullanılan kuyulara 100 µl. yıkama solüsyonu eklenip, karıştırıldı ve aspire edildi. Kullanılan tüm kuyulara, 250 µl. yıkama solüsyonu eklendi ve 3 kez yıkayıp aspire edildi. Hazırlanan Konjugat + Yıkama Solüsyonu karışımı kullanılan tüm kuyulara 50 µl. eklendi. Plak kapağı kapatılıp, ışıktan uzak oda ısısında rototorda 30 dk. inkübasyona bırakıldı (Ortalama 200-400 rpm hız aralığında bırakıldı). İnkübasyon sonunda tüm kuyulara 150 µl yıkama solüsyonu eklenip, plak Luminex cihazına yüklendi.

3.3.4.1. Sonuçların Analizi

Bir örneğin pozitif veya negatif olarak değerlendirilmesi için her bir boncuğun MFI değeriyle, üç farklı kontrol boncuklarının (CON) sinyal yoğunluğu ile karşılaştırılır. Boncuk karışımındaki her bir boncuk için 3 farklı oran bulunur. BAF, boncuk/CON oranından çıkartılarak, her boncuk/CON oranı için düzenlenmiş oran (adjusted ratio) bulunur. BAF değeri, her lot için önceden belirlenmiştir ve yöntemdeki arka planın kompenzasyonu için kullanılır. HLA Sınıf I için 7 sınıf I boncuğundan biri pozitifse, sınıf II için 5 boncuktan biri pozitifse sonuç pozitifdir.

$$\frac{\text{Boncuk MFI değeri}}{\text{Negatif Kontrol Boncuğu 1}} \text{ -BAF} = \text{Düzenlenmiş oran 1}$$

$$\frac{\text{Boncuk MFI değeri}}{\text{Negatif Kontrol Boncuğu 2}} \text{ -BAF} = \text{Düzenlenmiş oran 2}$$

$$\frac{\text{Boncuk MFI değeri}}{\text{Negatif Kontrol Boncuğu 3}} \text{ -BAF} = \text{Düzenlenmiş oran 3}$$

Şekil 8. Düzenlenmiş oranların hesaplanması

3.3.5. PCR-SSOP (Sekans Spesifik Oligonükleotit) Yöntemi

Bu yöntem için Lifecodes HLA SSO (Immucor, USA) kiti kullanılarak, her bir lokus için farklı kitlerle çalışma yapılmasını sağlamaktadır. Kitlerin içerisinde lokusa spesifik olarak belirlenmiş olan master mix ile probe mix bulunmaktadır. Çalışma prosedürü, üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmıştır. HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 tiplemesi, amplifikasyon ve hibridizasyon aşamalarından oluşan polimeraz zincir reaksiyonu tabanlı sekans spesifik oligonükleotid prob (PCR-SSO) yöntemi ile yapılmıştır. Bu testi sırasıyla; DNA izolasyonu, Amplifikasyon (PCR aşaması), Hibridizasyon, Streptavidin ve Luminex basamakları ile yapılmıştır.

DNA izolasyonunda; EZ1 DNA Blood 200 µl kit kullanıldı. QIAGEN GenoM6 marka cihaz ile DNA'lar izole edildi. DNA izolasyonundan sonra Nanodropta ölçüm yapılarak, konsantrasyon <50 ng/µl ve saflığı 1.70 ile 2.00 arasında olan DNA'lar ile çalışılması uygun görüldü.

DNA'lar ve Master Mix oda sıcaklığında 3-5 dakika bekletildi. DNA'lar izolasyondan kalan boncukları dibe çöktürmek için 15-20 saniye miknatista tutuldu. Her bir lokus için çalışacağımız örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik PCR tüpü hazırlanıp, her örnek için 4 µl DNA (kuyuların dibine), PCR tüplerine pipetlendi. Örnek sayısı +1 olacak şekilde reaktifler hesaplanarak Mix hazırlandı. Bir hasta için 6 µl Master mix, 10 µl dH₂O ve 0,2 µl Taq Polimeraz karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan Mix karışımdan 16 µl PCR tüplerinde bulunan DNA'lar üzerine eklendi. Thermal cycler cihazı kullanım talimatına uygun bir şekilde, 95 °C'de 5 dk.; Döngü sayısı: 1, 95 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 45 saniye; Döngü sayısı: 8, 95 °C'de 30 saniye, 63 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 45 saniye; Döngü sayısı: 32, 72 °C'de 15 dakika; Döngü sayısı: 1, 4 °C'de 5 dakika; Döngü sayısı 1 protokolüyle çalıştırıldı.

PCR basamağından sonra hibridizasyon basamağına geçilip, 5 µl PCR ürünü Costar Plate'e alıktlandı. Boncuk karışımı (Probe Mix) (Her lokusa özgü ayrı siyah tüplerde bulunur, kit kutusunun içinde +4°C'de saklanır), ısı bloğunda 55 C'de 7 dakika ısıtıldı. 15 saniye boyunca sonike edildikten sonra 15 saniye vortekslendi. 15 µl Boncuk karışımı ilgili testin tüm kuyularına dağıtıldı. Her 8-12 kuyudan sonra boncuk karışımı vortekslendi. Tüm kuyulara boncuk mix dağıtıldıktan sonra çalışma

plağı üzeri yapışkanlı plastik kaplayıcı ile kaplanıp, thermal cyclers cihazına konuldu. 97 C’de 5 dakika, 47 C’de 30 dakika, 56 C’de 10 dakika ve 56 C’de 10 dakika protokolüne dayanarak thermal cyclers cihaz kullanım talimatına uygun bir şekilde çalıştırıldı. İlk 56 derecelik protokolün 3/4 aşamasına gelindiğinde her kuyu için “170 l Dilüsyon solüsyonu + 0,85 l Streptavidin” (+1 kuyu olarak hesaplandı) solüsyon hazırlandı. Son 56 derecelik protokolün 4/4 aşaması bitir bitmez thermal cyclers kapağı açılıp yapışkanlı plastik kaplayıcı çıkarılıp streptavidin solüsyonu konuldu. Dilüsyon mutlaka 56 C’de yapılmalıdır.

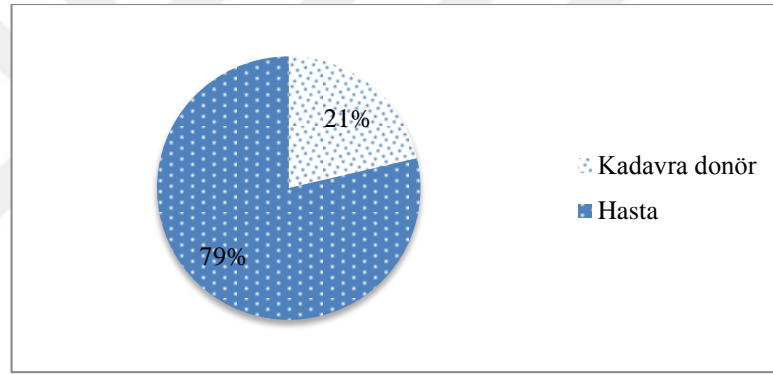
Solüsyon eklendikten hemen sonra test sonuçlarının analizi Luminex Fluoroanalyzer 200 cihazında Luminex cihazı kullanım talimatında da belirtildiği gibi uygulandı. Sonuçların değerlendirilmesi Match IT programı allel v3.21 veritabanı ile yapıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Microsoft Windows uyumlu Statistical Package for Social Sciences Version 21.0 (SPSS 21.0 Inc, Chicago, USA) kullanıldı. Demografik analizlerde tanımlayıcı testler kullanıldı. Veriler frekans ve yüzde değerleri şeklinde ifade edildi. Verilerin analizi, Pearson Ki-kare testi ile yapıldı ve $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4 BULGULAR

Bu çalışmada Ocak 2014 - Aralık 2016 tarihleri arasında İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tiplendirme Laboratuvarı arşivi ve Probel Hasta sonuç sistemi kullanılarak kadavra donörden böbrek nakli için başvuran hastalara yapılan çaprazlama test sonuçları ve Luminex'e dayalı Panel Reaktif Antikor (PRA) tarama test sonuçları incelendi. Taramalar ve çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, araştırma kapsamına uygun olarak hazırlanan excel dosyalarına kayıt edilip, bu veriler istatistiksel program SPSS ile değerlendirildi. 113 kadavra donöre çağrılan 416 hastanın sonuçları çalışmaya dâhil edildi (Şekil 9).



Şekil 9. Hasta ve kadavra donör dağılımı

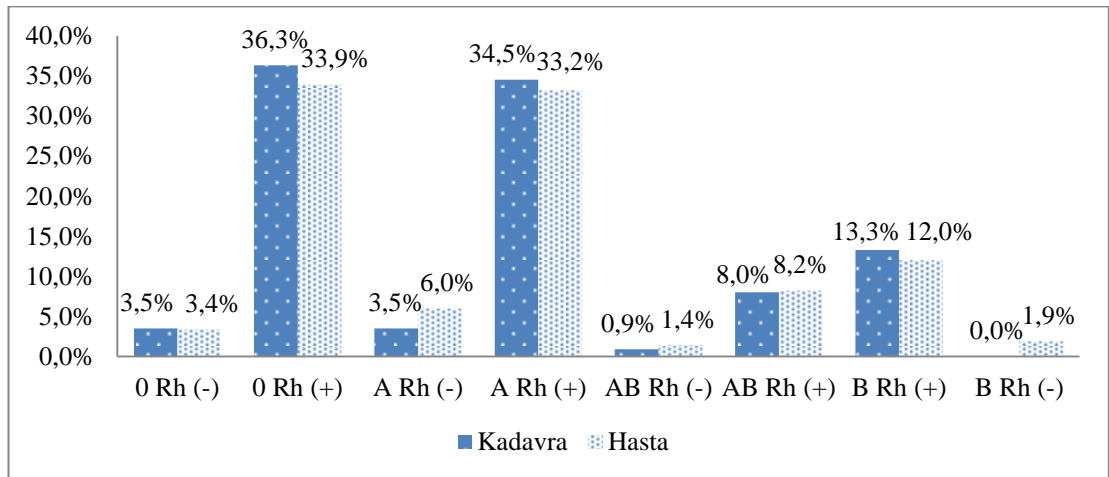
Kadavra donörlerinin yaş ortalaması $46,08 \pm 16,09$, hastaların yaş ortalaması $46,12 \pm 12,44$ 'dir. Kadavra donörlerinin ortalama kreatin değeri $1,20 \pm 0,81$ (mg/dL) olarak bulunmuştur. Hastalardan %58,9'u erkek (n=245), %41,1'i kadındır (n=171). Kadavra donörlerden %66,4 erkek (n=75), %33,6 kadındır (n=38). Kadavra donörden böbrek nakli için başvuran hastalardan %93'ü hemodiyaliz (n=293) hastası, %7'si periton diyalizi (n=22) hastasıydı. Hasta ve kadavra donörlerinin demografik özellikleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmaya katılan hasta ve kadavra donörlerinin demografik özellikleri

Parametreler	Hasta	Kadavra donör
Yaş (Ortalama \pm SD)	46,12 \pm 12,44	46,08 \pm 16,09
Cinsiyet		
Erkek (n, %)	245 (%58,9)	75 (%66,4)
Kadın (n, %)	171 (%41,1)	38 (%33,6)
Diyaliz		
HD (n, %)	293 (%93)	0
PD (n, %)	22 (%7)	0
Kreatin (Ortalama \pm SD)	0	1,20 \pm 0,81

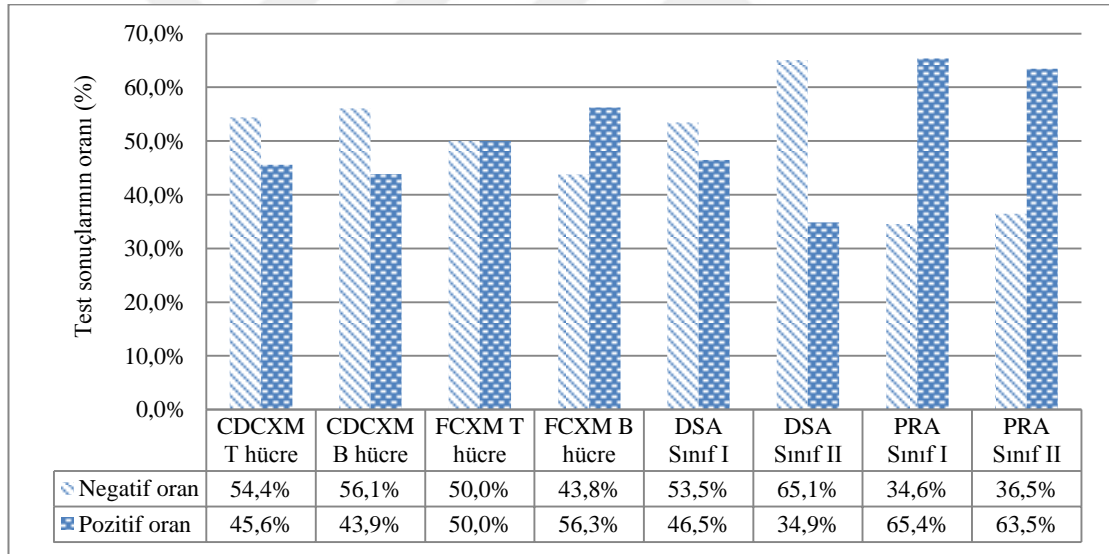
HD: Hemodiyaliz, PD: Periton diyaliz

Kadavra donörlerin ve hastaların kan grubu oranları Şekil 10’da gösterilmiştir. Çalışma grubumuzdaki, kadavra donörler ve hastalarda en sık 0 Rh (+), en az AB Rh (-) saptanmıştır. Kadavra donörlerin %36,3’nün (n=41), hastaların %33,9’u (n=141) 0 Rh (+) kan grubuna sahiptir. Kadavra donörlerin %0,9’nun (n=1), hastaların %1,4’ü (n=6) AB Rh (-) kan grubuna sahiptir.



Şekil 10. Kadavra donör ve hasta kan grubu oranları

Ocak 2014-Aralık 2016 yılları arası kadavra donörden böbrek nakli olmak için başvuran 416 hastadan %14'ünün (n=60) önceden böbrek nakil öyküsü bulunmaktaydı. Bu hastalardan, %55'i (n=33) canlıdan, %45'i (n=27) kadavra donörden nakil öyküsüne sahipti. Nakil öyküsü olan 60 hastanın %18'i (n=11) rejeksiyon sonucu böbreğin çıkarıldığı belirlendi. Nakil öyküsüne sahip bu hastalar, Ocak 2014-Aralık 2016 yılları arası kadavra donörden nakil olmak için tekrar başvurup, böbrek nakli öncesi çaprazlama testleri ve son PRA taramaları yapılmıştır (Şekil 11). Bu testler sonucu 10 hastaya, Ocak 2014-Aralık 2016 yılları aralığında kadavradan tekrar nakil gerçekleşmişti. Önceki nakil geçmişinde canlıdan nakil olan hastalardan birinde, böbrek 11 yıl işlevini korurken, kadavra nakillerinde ise en uzun 13 yıl bir hastada kaldığı saptandı. Önceki nakil geçmişinde 2014 yılında kadavra donörden nakil olan bir hastanın hiperakut red sebebi ile böbreğin çıkarıldığı tespit edildi.



Şekil 11. Nakil öyküsüne sahip hastalara yapılan çaprazlama ve Son PRA Tarama test sonuçları

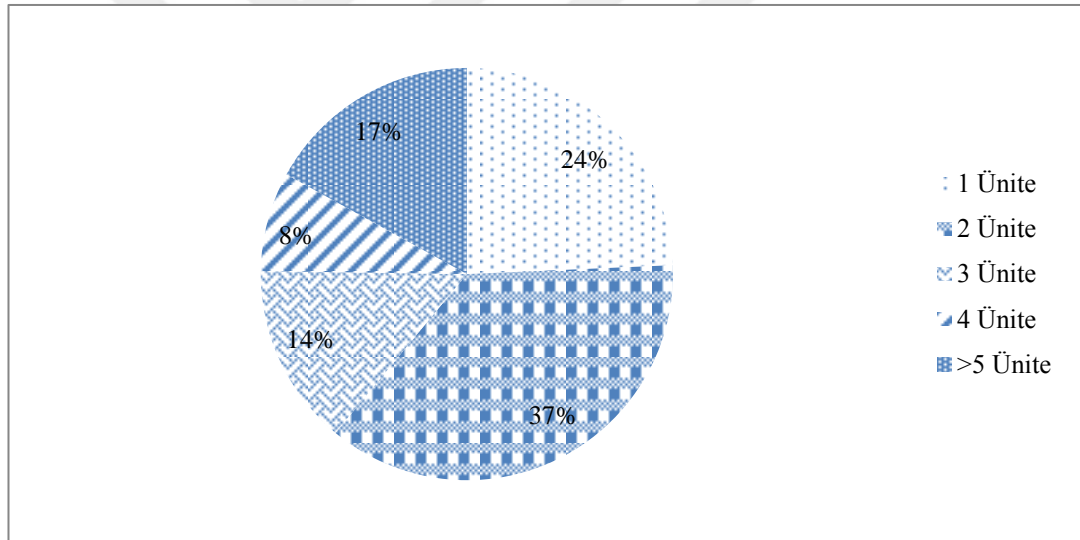
Ocak 2014-Aralık 2016 yılları arası kadavra donörden böbrek nakli olmak için başvuran 416 hastanın %43,8'nin (n=182) gebelik öyküsü vardı. Gebelik öyküsü olan hastalardan, %58,2'nin (n=106) doğum öyküsü, %21,4'nün (n=39) düşük öyküsü ve %20,3'nün (n=37) kürtaj öyküsü vardı. Gebelik öyküsü olan bu hastaların

kaç defa doğum, düşük ve kürtaj geçirdiği oranları ile birlikte Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Gebelik öyküsü olan hastaların oranları

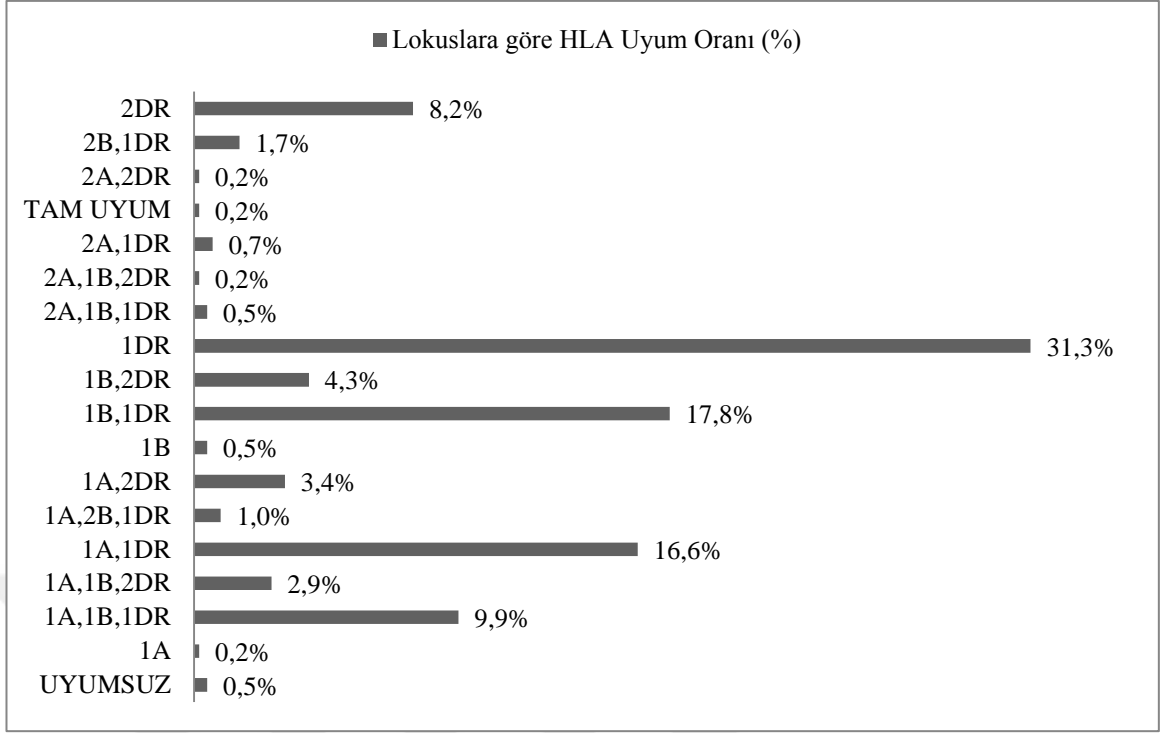
Toplam	Doğum (n, %)	Düşük (n, %)	Kürtaj (n, %)
1	14 (%13,2)	23 (%59,0)	18 (%48,6)
2	35 (%33,0)	8 (%20,5)	12 (%32,4)
3	23 (%21,7)	5 (%12,8)	4 (%10,8)
>4	34 (%32,1)	3 (%7,7)	3 (%8,2)

Ocak 2014-Aralık 2016 yılları arası kadavra donörden böbrek nakli olmak için başvuran 416 hastanın %52,4’nün (n=218) kan transfüzyonu öyküsü vardı. Hastaların son kan transfüzyonu dağılımı Şekil 12’de verilmiştir.



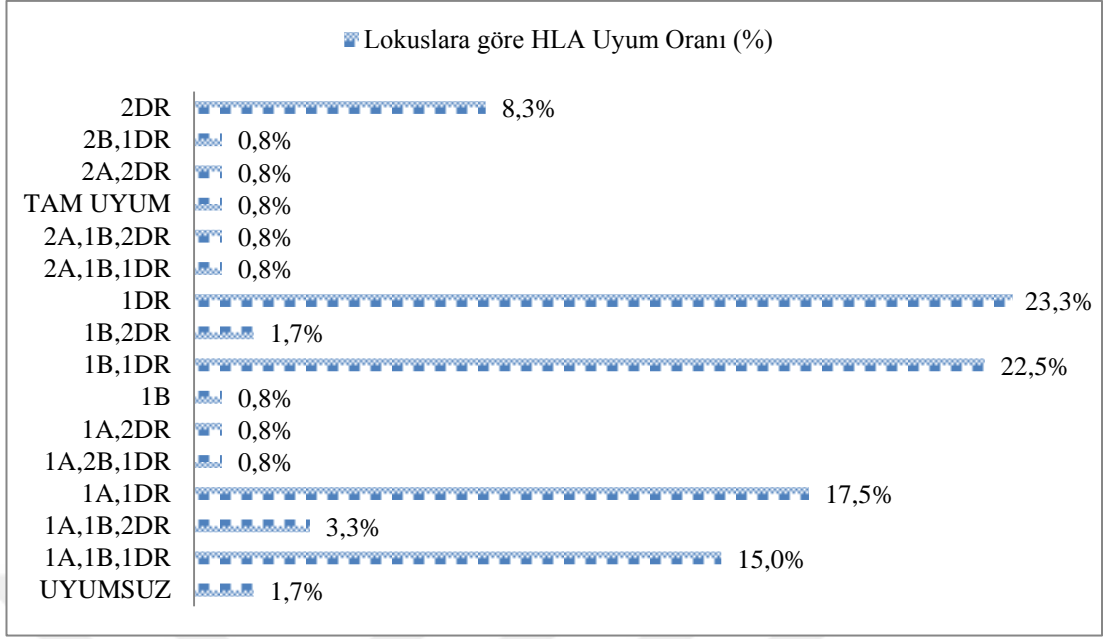
Şekil 12. Son kan tranfüzyonu olan hastaların dağılımı

Hasta ile kadavra donörleri arasındaki HLA doku uyumlarının dağılımı Şekil 13’de verilmiştir. Bu hastalardan kadavra donörü ile en çok görülen uyum 1DR (%31,3; n=130) olarak belirlenirken, uyumsuz (%0,5; n=2) olarak bulundu. Yalnızca bir hastada kadavra donörün dokusu ile tam uyum (2A2B2DR) gözlemlendi (%0,2; n=1).



Şekil 13. Hastalar ile kadavra donörlerinin HLA doku tiplerinin lokus temelinde oranları

416 hastanın %28,8'ine (n=120) nakil gerçekleşmişti. Nakil olan bu hastaların kadavra donörü ile 1 DR uyumu en çok görüldü (%23,3; n=28). %1,7'si (n=2) uyumsuz, %0,8'i (n=1) tam uyum olarak belirlendi (Şekil 14). Bunlardan 2 gebelik öyküsü olan, kadavra donörü ile haploidentik (1A1B1DR) uyumu belirlenen, çaprazlama test sonuçları ve son PRA tarama test sonuçları negatif olan bir hasta hiperakut red sonucu böbreğin çıkarıldığı belirlendi.



Şekil 14. Kadavra donörden nakil olmuş hastaların HLA doku tiplerinin lokus temelinde oranları

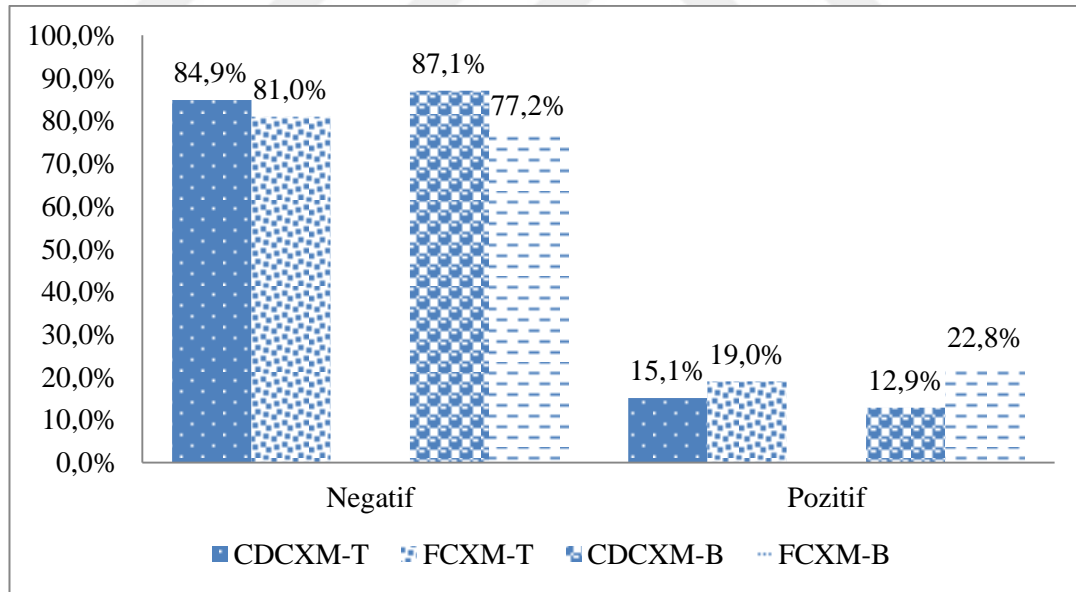
416 hastanın tamamına CDCXM testi, %32'sine (n=132) FCXM testi ve %68'ine (n=281) Luminex platformda DSA çaprazlama testi yapılmıştı. Bu testlere ek olarak, %90'nının (n=376) son PRA tarama test sonuçlarına ulaşıldı. Çalışma grubumuzdaki hastaların kadavra donörleri ile yapılan çaprazlama test sonuçları, testlerin duyarlılık ve özgüllüklerini değerlendirebilmek amacıyla karşılaştırıldı.

İlk olarak; CDCXM ile FCXM testleri karşılaştırıldı (Tablo 5 ve Şekil 15). CDCXM T hücre yönteminde sonuçlardan 112'si (%84,9) negatif, 20'si (%15,1) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM T hücre yönteminde 112 negatif sonucun 106'sı (%80,3) FCXM T hücre yönteminde de negatif, 6'sı (%4,6) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM T hücre yönteminde pozitif 20 sonucun 1'i (%0,7) FCXM T hücre yönteminde negatif, 19'u (%14,4) pozitif olarak görülmüştür. Toplamda FCXM T hücre yöntemi 25 (%19,0) pozitif sonuç verirken, CDCXM T hücre 20 (%15,1) pozitif sonuç verdiği ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). CDCXM B Hücre ile FCXM B Hücre çaprazlama testleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemin aynı anda yapıldığı 132 test sonucuna ulaşıldı (Tablo 5 ve Şekil 15). CDCXM B Hücre yönteminde sonuçlardan 115'i (%87,1)

negatif, 17'si (%12,9) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM B Hücre yönteminde 115 negatif sonucun 102'si FCXM B Hücre yönteminde de negatif, 13'ü (%9,9) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM B Hücre yönteminde 17 (%12,9) pozitif sonucun 17'si (%12,9) FCXM B Hücre yönteminde de pozitif olarak gözlenirken, negatif sonuç bulunamamıştır. Toplamda FCXM B Hücre yöntemi 30 (%22,8) pozitif sonuç verirken, CDCXM B Hücre yöntemi 17 (%12,9) pozitif sonuç verdiği ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 5. CDCXM ile FCXM testlerinin karşılaştırılması

	CDCXM		FCXM		
	T hücre	B hücre	T hücre	B hücre	
Negatif	112 (%84,9)	115 (%87,1)	107 (%81,0)	102 (%77,2)	p<0,05
Pozitif	20 (%15,1)	17 (%12,9)	25 (%19,0)	30 (%22,8)	



Şekil 15. CDCXM ile FCXM testlerinin karşılaştırılması

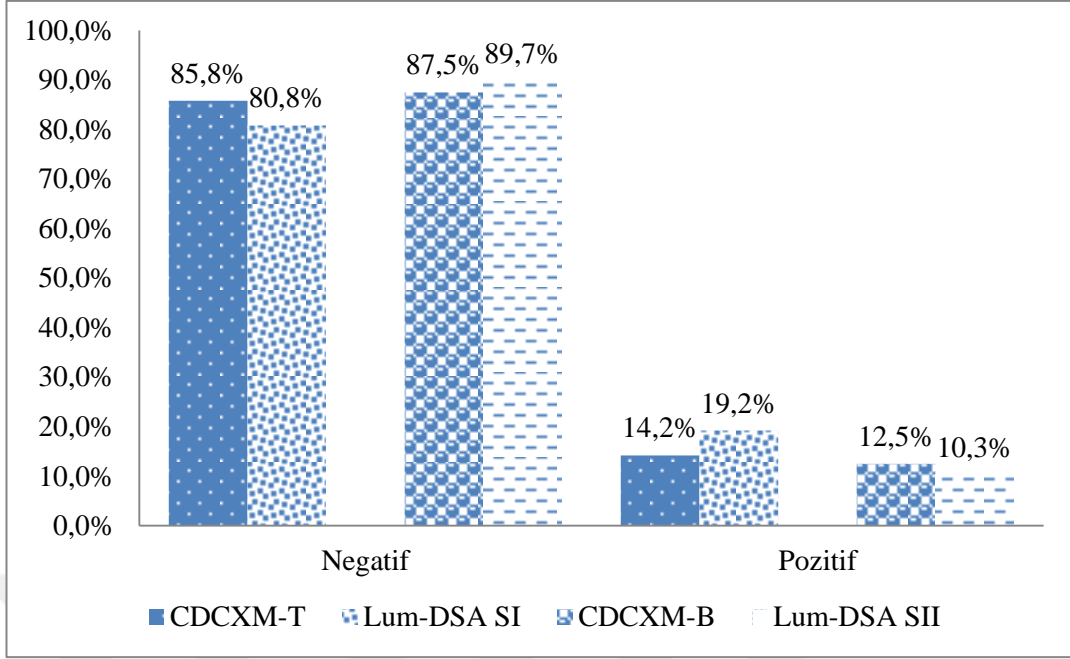
CDCXM ile Lum-DSA çaprazlama testleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemin aynı anda yapıldığı 281 test sonucuna ulaşıldı (Tablo 6 ve Şekil 16). CDCXM T Hücre yönteminde sonuçlardan 241'i (%85,8) negatif, 40'ı (%14,2)

pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM T Hücre yönteminde 241 negatif sonucun 227'si (%80,8) Lum-DSA Sınıf I yönteminde de negatif, 14'ü (%5,0) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM T Hücre yönteminde pozitif 40 sonucun 0'ı Lum-DSA Sınıf I yönteminde negatif, 40'ı (%14,2) pozitif olarak görülmüştür. Toplamda Lum-DSA Sınıf I yöntemi 54 (%19,2) pozitif sonuç verirken, CDCXM T Hücre 40 (%14,2) pozitif sonuç verdiği ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,05$). CDCXM B Hücre ile Lum-DSA Sınıf II çaprazlama testleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemin aynı anda yapıldığı 281 test sonucuna ulaşıldı (Tablo 6 ve Şekil 16). CDCXM B Hücre yönteminde sonuçlardan 246'sı (%87,5) negatif, 35'i (%12,5) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM B Hücre yönteminde 246 negatif sonucun 237'si (%84,3) Lum-DSA Sınıf II yönteminde de negatif, 9'u (%3,2) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM B Hücre yönteminde 35 (%12,5) pozitif sonucun 20'si (%7,1) Lum-DSA Sınıf II yönteminde de pozitif, 15'i (%5,4) negatif olarak görülmüştür. Toplamda Lum-DSA Sınıf II yöntemi 29 (%10,3) pozitif sonuç verirken, CDCXM B Hücre 35 (%12,5) pozitif sonuç verdiği ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0,05$).

Tablo 6. CDCXM ile Lum-DSA çaprazlama testlerinin karşılaştırılması

	CDCXM		Lum-DSA		
	T hücre	B hücre	Sınıf I	Sınıf II	
Negatif	241 (%85,8)	246 (%87,5)	227 (%80,8)	252 (%89,7)	* $p<0,05$ **AD
Pozitif	40 (%14,2)*	35 (%12,5)**	54 (%19,2)*	29 (%10,3)**	

**AD: Anlamlı değil



Şekil 16. CDCXM ile Lum-DSA çaprazlama testlerinin karşılaştırılması

FCXM testi ile Lum-DSA testleri karşılaştırıldığında her iki yöntemin aynı anda yapıldığı 5 test sonucuna ulaşıldı (Tablo 7). FCXM T hücre test yönteminde 3 (%60) negatif test sonucu, aynı zamanda Lum-DSA Sınıf I çaprazlama testinde de negatif olarak görüldü. FCXM T hücre test yönteminde 2 (%40) pozitif test sonucu, aynı zamanda Lum-DSA Sınıf I çaprazlama testinde de pozitif olarak görüldü. FCXM B hücre çaprazlama testi ile Lum-DSA Sınıf II çaprazlama testleri karşılaştırıldığında her iki yöntemin aynı anda yapıldığı 5 test sonucuna ulaşıldı (Tablo 7). FCXM B hücre test yönteminde 3 (%60) negatif test sonucu, aynı zamanda Lum-DSA Sınıf II çaprazlama testinde de negatif olarak görüldü. FCXM B hücre test yönteminde 2 (%40) pozitif test sonucu, aynı zamanda Lum-DSA Sınıf II çaprazlama testinde de pozitif olarak görüldü. FCXM testi ile Lum-DSA yöntemlerinin aynı anda yapıldığı 5 çalışma birbirleri ile uyumlu olup, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0,05$).

Tablo 7. FCXM ile Lum-DSA çaprazlama testlerinin karşılaştırılması

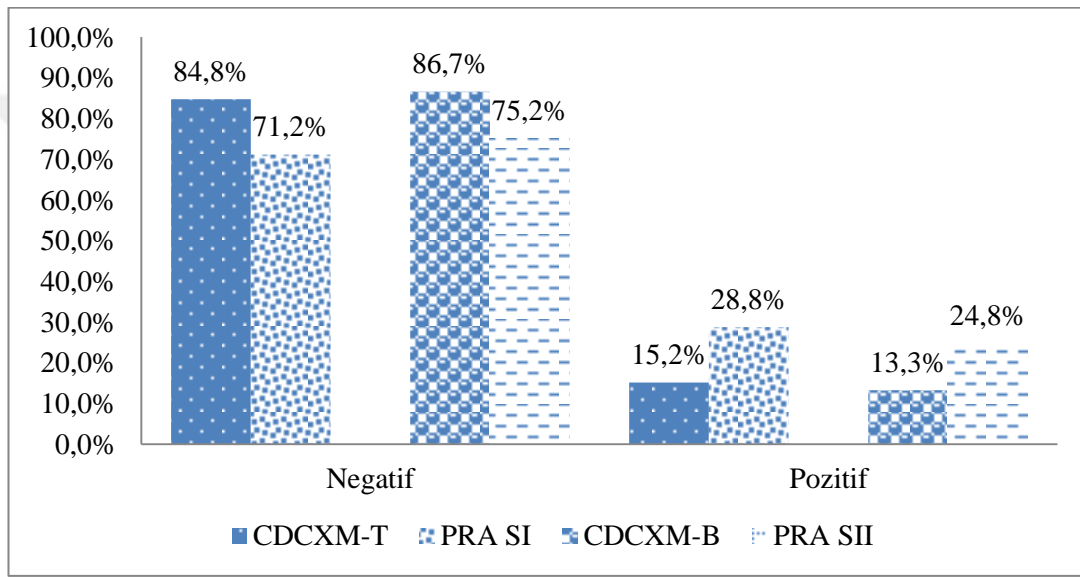
	FCXM		Lum-DSA		
	T hücre	B hücre	Sınıf I	Sınıf II	
Negatif	3 (%60,0)	3 (%60,0)	3 (%60,0)	3 (%60,0)	AD
Pozitif	2(%40,0)	2(%40,0)	2(%40,0)	2(%40,0)	

AD: Anlamli değil

CDCXM ile PRA Tarama testleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemin aynı anda yapıldığı 376 test sonucuna ulaşıldı (Tablo 8 ve Şekil 17). CDCXM T Hücre yönteminde sonuçlardan 319'u (%84,8) negatif, 57'si (%15,2) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM T Hücre yönteminde 319 negatif sonucun 260'ı (%69,1) PRA Tarama Sınıf I yönteminde de negatif, 59'u (%15,7) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM T Hücre yönteminde 57 (%15,2) pozitif sonucun 49'u (%13,1) PRA Tarama Sınıf I yönteminde pozitif, 8'i (%2,1) negatif olarak görülmüştür. Toplamda PRA Tarama Sınıf I yöntemi 108 (%28,8) pozitif sonuç verirken, CDCXM T Hücre 57 (%15,2) pozitif sonuç verdiği ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,05$). CDCXM B Hücre ile PRA Tarama Sınıf II testleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemin aynı anda yapıldığı 376 test sonucuna ulaşıldı (Tablo 8 ve Şekil 17). CDCXM B Hücre yönteminde sonuçlardan 326'sı (%86,7) negatif, 50'si (%13,3) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM B Hücre yönteminde 326 negatif sonucun 270'i (%71,8) PRA Tarama Sınıf II yönteminde de negatif, 56'sı (%14,9) pozitif olarak sonuçlanmıştır. CDCXM B Hücre yönteminde 50 (%13,3) pozitif sonucun 37'si (%9,9) PRA Tarama Sınıf II yönteminde de pozitif, 13'ü (%3,4) negatif olarak görülmüştür. Toplamda PRA Tarama Sınıf II yöntemi 93 (%24,8) pozitif sonuç verirken, CDCXM B Hücre 50 (%13,3) pozitif sonuç verdiği ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 8. CDCXM ile PRA Tarama testlerinin karşılaştırılması

	CDCXM		PRA Tarama		
	T hücre	B hücre	Sımf I	Sımf II	
Negatif	319 (%84,8)	326 (%86,7)	268 (%71,2)	283 (%75,2)	p<0,05
Pozitif	57 (%15,2)	50 (%13,3)	108 (%28,8)	93 (%24,8)	



Şekil 17. CDCXM ile PRA Tarama testlerinin karşılaştırılması

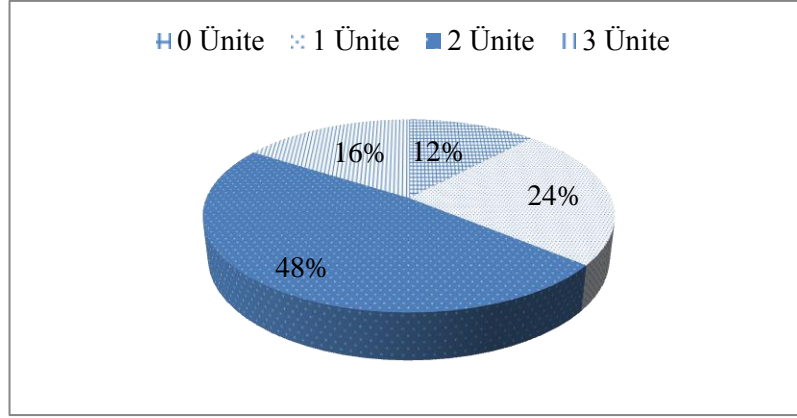
Ocak 2014 - Aralık 2016 tarihleri arasında İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tiplendirme Laboratuvarında, kadavra donörden nakil olan 25 hasta ve verici çiftinin bilgilerinin olduğu bir çalışma grubu oluşturuldu. Çalışma grubundaki bu hasta ve verici çiftlerine, rutin çalışılan HLA-A, HLA-B ve HLA-DR doku tiplerine ek olarak, HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 tiplerini yapıldı. Çalışma grubu demografik özellikleri Tablo 9’ da gösterilmiştir.

Tablo 9. Kadavra donörü ve hastaların demografik özellikleri

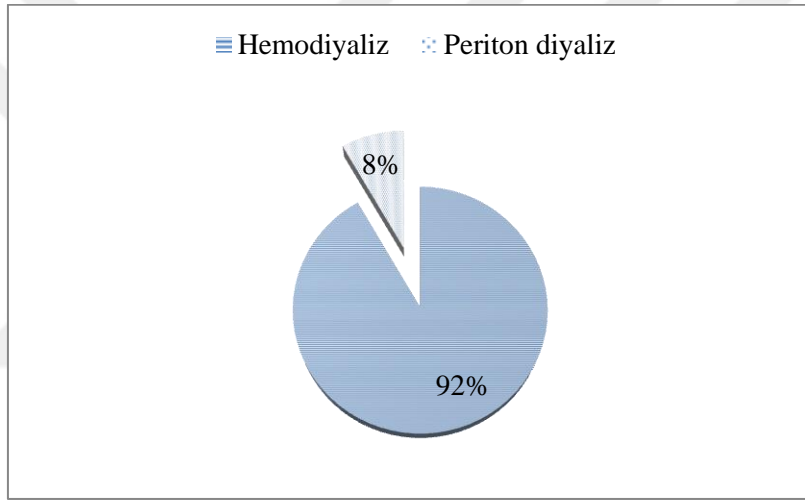
KADAVRA	KADAVRA YAŞI	KADAVRA KAN GRUBU	HASTA	HASTA YAŞI	HASTA KAN GRUBU	HASTA DİYALİZ TİPİ
KD-1	50	A Rh(+)	H-1	44	A Rh(-)	HD
KD-2	43	A Rh(+)	H-2	52	A Rh(+)	PD
KD-3	50	A Rh(+)	H-3	48	A Rh(+)	HD
KD-4	48	B Rh(+)	H-4	40	B Rh(+)	HD
KD-5	51	0 Rh(+)	H-5	28	0 Rh(+)	HD
KD-6	36	A Rh(+)	H-6	42	A Rh(+)	HD
KD-7	48	B Rh(+)	H-7	34	B Rh(+)	HD
KD-8	53	0 Rh(+)	H-8	62	0 Rh(+)	PD
KD-9	59	A Rh(+)	H-9	57	A Rh(+)	HD
KD-10	50	A Rh(+)	H-10	42	A Rh(+)	HD
KD-11	46	B Rh(+)	H-11	59	B Rh(+)	HD
KD-12	59	A Rh(+)	H-12	57	A Rh(+)	HD
KD-13	3	0 Rh(+)	H-13	9	0 Rh(+)	HD
KD-14	46	A Rh(+)	H-14	41	A Rh(+)	HD
KD-15	38	0 Rh(-)	H-15	51	0 Rh(+)	HD
KD-16	46	A Rh(+)	H-16	17	A Rh(-)	HD
KD-17	36	A Rh(+)	H-17	54	A Rh(+)	HD
KD-18	39	A Rh(+)	H-18	46	A Rh(+)	HD
KD-19	20	0 Rh(+)	H-19	51	0 Rh(+)	HD
KD-20	56	0 Rh(+)	H-20	59	0 Rh(+)	HD
KD-21	51	0 Rh(+)	H-21	38	0 Rh(+)	HD
KD-22	53	A Rh(+)	H-22	32	A Rh(+)	HD
KD-23	51	0 Rh(+)	H-23	53	0 Rh(+)	HD
KD-24	56	B Rh(+)	H-24	33	B Rh(+)	HD
KD-25	66	AB Rh(-)	H-25	52	AB Rh(+)	PREEMPTİF

KD: Kadavra donör, H: Hasta, PD: Periton diyaliz, HD: Hemodiyaliz

Çalışma grubundaki kadavra donörlerinin %52'si (n=13) erkek, %48'i (n=12) kadındı. Hastalarında aynı şekilde %52'si (n=13) erkek, %48'i (n=12) kadındı. Kadavra donörlerinin yaş ortalaması 46,16±12,93, hastaların yaş ortalaması 44,04±13,20'di. Kadavra donörlerinin ortalama kreatin değeri 1,13±0,65 (mg/dL) iken, hastaların 1,62±0,59'du. Çalışma grubundaki hastaların %88'nin (n=22) kan transfüzyonu öyküsü vardı (Şekil 18). Bu hastaların %92'si hemodiyaliz (n=22) hastası, %8'i periton diyalizi (n=2) hastasıydı (Şekil 19).



Şekil 18. Nakil olan hastaların son kan transfüzyonu dağılımı



Şekil 19. Hastaların diyaliz tipi oranları

Çalışma grubundaki hastaların gebelik öyküsü incelendiğinde, %12'si (n=3) düşük, %19'u (n=5) doğum ve %12'sinin (n=3) kürtaj öyküsü vardı. Hastaların, %19'nun (n=5) önceden nakil öyküsü vardı. Nakil öyküsü olan hastaların 3'ü kadavra donörden, 2'si ise canlı donörden nakil olmuştu (Tablo 10).

Tablo 10. Hastaların alloimmünizasyon bilgileri

HASTA	SON KAN TRANSFÜZYONU	GEBELİK			TX GEÇMİŞİ		
		DÜŞÜK	DOĞUM	KÜRTAJ	TX TARİHİ	REJEKSİYON TARİHİ	YAKINLIK
H-1	2	0	4	0	0	0	0
H-2	2	0	0	0	0	0	0
H-3	2	1	3	0	0	0	0
H-4	0	0	0	0	0	0	0
H-5	2	0	0	0	0	0	0
H-6	2	0	0	0	2006	2008	KADAVRA
H-7	3	0	0	0	2011	2015	CANLI
H-8	0	0	0	0	0	0	0
H-9	1	0	2	4	0	0	0
H-10	1	0	0	0	0	0	0
H-11	2	4	3	2	0	0	0
H-12	2	0	4	0	2009	2016	CANLI
H-13	1	0	0	0	0	0	0
H-14	3	0	0	0	0	0	0
H-15	2	0	0	0	2009	2015	KADAVRA
H-16	2	0	0	0	0	0	0
H-17	0	0	0	0	0	0	0
H-18	2	0	0	0	0	0	0
H-19	2	0	0	0	0	0	0
H-20	1	0	0	0	0	0	0
H-21	1	0	0	0	2010	2012	KADAVRA
H-22	3	1	0	1	0	0	0
H-23	2	0	0	0	0	0	0
H-24	3	0	0	0	0	0	0
H-25	1	0	0	0	0	0	0

Tx: Transplantasyon

Çalışma grubumuzdaki 25 hasta ve verici çiftlerine, rutin çalışılan HLA-A, HLA-B ve HLA-DR doku tiplerine ek olarak, PCR-SSOP (Sekans Spesifik Oligonükleotit) yöntemi ile HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 tiplerleri yapıldı (Tablo 11).

Tablo 11. Çalışma grubundaki kadavra donör ile hasta doku tipleri ve aralarındaki uyum

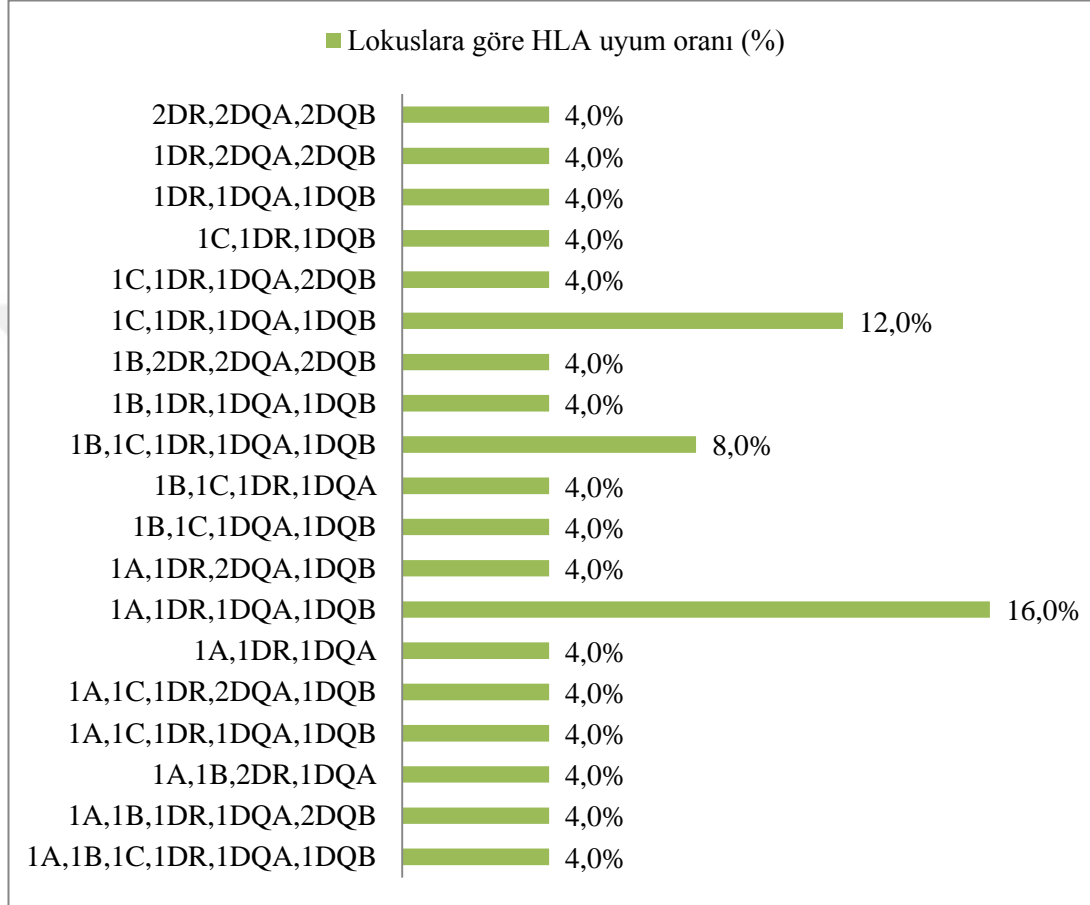
HASTA KODU	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-B*	HLA-C*	HLA-C*	HLA-DRB1*	HLA-DRB1*	HLA-DQA1*	HLA-DQA1*	HLA-DQB1*	HLA-DQB1*	DOKU UYUM
KD-1	24		7	49	7		3	11	5		2	3	1A,1DR,1DQA
H-1	2	24	51		16	14	11	15	1	5	6		
KD-2	24		27	51	15		11		5		3		1B,2DR,2DQA,2DQB
H-2	2		50	51	17	6	11		5		3		
KD-3	3	24	35	38	4		13		1		6		1B,1C,1DR,1DQA
H-3	1	2	35	44	2	4	13	16	1	5	3	5	
KD-4	3	32	35	44	16	4	4	14	1	3	3	5	1DR,2DQA,2DQB
H-4	2	24	18	75	12	1	4	16	1	3	3	5	
KD-5	2	32	40	51	15	2	11	16	1	5	3	5	1A,1DR,1DQA,1DQB
H-5	2		60		15		11	15	1	5	3	6	
KD-6	3	29	7	44	16	7	7	15	1	2	2	6	1DR,1DQA,1DQB
H-6	2		13	15	14	6	12	7	2	5	2	3	
KD-7	2	24	35	51	15	4	13	14	1	5	3	5	1A,1B,1DR,1DQA,2DQB
H-7	2	25	8	51	7	16	3	14	5	3	3	5	
KD-8	2	24	39	51	14	7	13	11	5		3		1A,1B,2DR,1DQA
H-8	3	24	15	51	15	4	11	13	1	5	6		
KD-9	3	24	13	35	4	6	7	11	2	5	2	3	1B,1C,1DQA,1DQB
H-9	1	31	35		3	4	1	14	1	5	3	5	
KD-10	2		35	51	14	4	4	14	1	3	3	5	1C,1DR,1DQB
H-10	29	68	27	58	3	14	4		2		3		
KD-11	2	24	35	51	15		11		1	5	3	5	1A,1DR,2DQA,1DQB
H-11	2		44	55	1	5	11	13	1	5	3	6	
KD-12	2	26	13	40	12	6	7		2		2		1A,1DR,1DQA,1DQB
H-12	2	24	18	51	14	7	7	13	1	2	2	6	
KD-13	11	29	7	51	14	7	11	15	1	5	3	6	1C,1DR,1DQA,1DQB
H-13	3	32	8	49	7		3	11	5		2	3	
KD-14	2	3	13	44	16	6	4	7	2	3	2	3	1A,1DR,1DQA,1DQB
H-14	2	33	65	51	1	8	4		3		4	3	
KD-15	11	68	35	44	14	4	11	15	1	5	3	6	1B,1C,1DR,1DQA,1DQB
H-15	2	24	35	51	3	4	11		5		3		

Tablo 11. Çalışma grubundaki kadavra donör ile hasta doku tipleri ve aralarındaki uyum (devamı)

HASTA KODU	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-B*	HLA-C*	HLA-C*	HLA-DRB1*	HLA-DRB1*	HLA-DQA1*	HLA-DQA1*	HLA-DQB1*	HLA-DQB1*	DOKU UYUM
KD-16	2	3	13	44	16	6	4	7	2	3	2	3	2DR,2DQA,2DQB
H-16	30	69	49		7	2	4	7	2	3	2	3	
KD-17	3	29	7	44	7	2	7	15	1	2	2	6	1C,1DR,1DQA,2DQB
H-17	11	30	42	52	7		3	15	1	5	2	6	
KD-18	2	24	51		14	16	10	14	1		5		1B,1DR,1DQA,1DQB
H-18	26	29	51	38	12	15	7	14	1	2	3	5	
KD-19	2	23	44	57	5	6	4	11	3	5	3		1A,1C,1DR,2DQA,1DQB
H-19	2		8	50	6		4	3	3	5	3	5	
KD-20	24	26	40	56	1	7	4	11	3	5	3		1A,1DR,1DQA,1DQB
H-20	24	29	37	58	3	6	4	10	1	5	3	5	
KD-21	23	32	49	55	3	7	11		5		3		1C,1DR,1DQA,1DQB
H-21	24		35	49	14	7	11	14	5	3	6	3	
KD-22	2	11	49	51	14	7	10	15	1		5	6	1A,1B,1C,1DR,1DQA,1DQB
H-22	2	31	18	51	7		11	15	1	5	3	5	
KD-23	11	23	14	15	7	8	16	11	1	5	3	5	1C,1DR,1DQA,1DQB
H-23	2	24	18		2	7	11		5		3		
KD-24	1	2	50	52	12	6	8	15	1	6	3	6	1B,1C,1DR,1DQA,1DQB
H-24	11	29	40	52	12	2	15	16	1		5	6	
KD-25	1	24	40	58	3	7	4	13	1	3	3	6	1A,1C,1DR,1DQA,1DQB
H-25	3	24	8	44	16	7	3	4	3	5	2	3	

Çalışma grubu düşük çözünürlükte Sekans Spesifik Oligonükleotid Metodu ile çalışıldığından dolayı homozigot çıkan gruplar tek allel olarak girilmiştir.

Çalışma grubumuzdaki nakil olmuş 25 hasta ve kadavra donörlerinin lokuslarına göre HLA uyum oranları Şekil 20’de verilmiştir. Bu hastalardan kadavra donörü ile en fazla uyum % 16 ile (n=4) 1A,1DR,1DQA,1DQB’dir.



Şekil 20. Çalışma grubundaki nakil olmuş hasta ile kadavra donörü arasında HLA doku tiplerinin lokus temelinde uyum oranları

Çalışma grubunu oluşturan 25 hasta ile kadavra donörleri arasında çaprazlama test sonuçları, PRA tarama ve PRA tanımlama test sonuçları Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. Çalışma grubunu oluşturan nakil olmuş hastaların çaprazlama, PRA tarama ve PRA tanımlama test sonuçları

HASTA KODU	CDCXM		FCXM		DSA		PRA TARAMA		PRA TANIMLAMA	
	T Hücre	B Hücre	T Hücre	B Hücre	Sınıf I	Sınıf II	Sınıf I	Sınıf II	Sınıf I	Sınıf II
H-1	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-3	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-4	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	DR1, DR10, DR15, DR16
H-5	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-6	NEG	NEG			NEG	NEG	POZ	POZ	A24, A23	DR4, DR9, DQ8
H-7	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	A29, A1, A24, A23, CW4, CW16	DR11, DR7, DQ9, DQ7, DR13, DR11
H-8	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-10	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-11	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-12	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-13	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-14	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-16	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-17	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-18	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-19	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POZ	NEG	DQ2
H-21	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-22	NEG	NEG			NEG	NEG	POZ	NEG	A3, A25, B81	NEG
H-23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POZ	POZ	NEG	NEG
H-24	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H-25	NEG	NEG			NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

NEG: Negatif, POZ: Pozitif

5. TARTIŞMA

Her insanın anne ve babasından kalıtılan kendine has özel bir HLA (İnsan lökosit antijeni) yapısı vardır. Böbrek nakli vakalarında vücut nakledilen organ üzerindeki HLA antijenlerini tanır. Kendisine ait olmadığını tespit eder ve bu HLA antijenlerine karşı spesifik antikorlar oluşturur. Nakil öncesinde hasta ve vericinin immunolojik açıdan değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ABO kan gruplarının, HLA antijenlerinin belirlenmesi ve hastada verici (donör) HLA antijenlerine karşı oluşmuş anti-HLA antikorlarının saptanması gerekmektedir (83,84). Eğer vericiye özgü antikor (donöre spesifik antikor- DSA) saptanırsa; bunların IgG kaynaklı mı yoksa IgM kaynaklı mı olduğu, hangi hedef hücreye (T, B) spesifik olduğunun bilinmesi önemlidir. Nakilden önce bu antikorların saptanması, rejeksiyon riskinin belirlenmesine yardımcı olur. Çünkü lenfositler HLA antijenlerini yüksek oranda eksprese eder ve DSA'ların belirlenmesi için hedef hücre olarak seçilirler (54).

Böbrek nakli öncesi ve sonrasında hastada grefte karşı herhangi bir anti-HLA antikorunun olup olmadığını saptamak için PRA tarama ve tanımlama testleri yapılmaktadır. PRA testi ile birlikte, donöre spesifik antikor varlığının tespiti için çaprazlama testleri yapılmaktadır. Çaprazlama testleri; vericideki HLA antijenlerine karşı alıcıda bulunan anti-HLA antikorlarının saptanması amacıyla yapılan testlerdir. Böbrek naklinden önce yapılan çaprazlama testleri ile antikor aracılı hiperakut organ reddi engellenmeye çalışılır. Terasaki et al. (70) yaptığı çalışmada sitotoksik çaprazlama test sonucu pozitif olan 30 hastanın 2 gün ve sonrasında %80'i (n=24) böbrek reddi gerçekleştiği görülmüştür. Çaprazlama test sonucu negatif olan 195 test sonucunun %4,1'inde (n=8) böbrek reddi görülmüştür. Burada görüldüğü üzere pozitif çaprazlama test sonucu akut greft kaybı için yüksek risk ifade etmektedir. Çaprazlama test sonucu pozitif olan bir hastaya nakil gerçekleştirilmemelidir. Bazı antikorlar (anti-HLA dışındakiler) direkt donör lenfositlerine karşı olmakla birlikte klinik olarak ilişkisiz olduğu tartışmalıdır. Böbrek nakli öncesi yapılan çaprazlama testlerinin başlıcaları; CDCXM, FCXM ve Luminex çaprazlama (DSA)'dır.

Bu çalışmada 113 kadavra donörden böbrek nakli için başvuran 416 hastaya yapılan çaprazlama test sonuçları ve Luminex'e dayalı Panel Reaktif Antikor (PRA) tarama test sonuçları incelendi. Kadavra donörden böbrek nakli için başvuran hastalardan %93'ü hemodiyaliz (n=293) hastası, %7'si periton diyalizi (n=22) hastası idi. Nakil öncesinde uygulanan diyaliz tedavisinin tipinin nakil sonrasında greft ömrü üzerindeki etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalardan birinde diyaliz tipinin greft ömrü üzerinde etkisinin olmadığı belirtilmiştir (86).

Çalışma grubumuzdaki hasta ve kadavra donörlerinde en sık görülen kan grupları 0 Rh (+) ve A Rh (+)'tir. 0 Rh (+) kan grubuna sahip hasta ve donörlerinde sırasıyla (%33,9, %36,3) görülürken, A Rh (+) (%33, %34,5) görülmüştür. Yapılan araştırmalarda ülkemizde en sık %39 ile A Rh (+) kan grubu görülmüştür (104). Çalışma grubunda hasta ile donör arasındaki kan grupları birebir uyumludur. Kan grupları ile HLA antijenleri ifadesi arasındaki ilişki ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda, HLA ve ABO kan grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Erikoğlu ve ark. (87) 2011'de yaptıkları çalışmada HLA antijenleri ve kan grupları arasındaki ilişkiyi saptamaya çalışmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bulamamışlardır. Soyöz ve ark. (105) 2016'da yaptıkları çalışmada HLA-B ve HLA-DRB1 lokuslarında HLA ve ABO kan grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamışlardır.

Anti-HLA antikorlarının gelişmesinde, nakil öyküsü, transfüzyon ve gebeliğin rol oynadığı bilinmektedir (85). Çalışma grubumuzdaki hastaların nakil öncesi, %52,4'nün (n=218) kan transfüzyonu, %43,8'nin (n=182) gebelik ve %14'ünün (n=60) böbrek nakli öyküsü vardı. Nakil öyküsüne sahip hastalarda PRA pozitifliği daha fazla görüldü (%30; n=20). Son yıllarda yapılan bir çalışmada alloimmünizasyon öykülerinin nakil sonrasında de novo DSA oluşma ihtimalinin en yüksek nakil geçmişi olan hastalarda tespit edilip, bunu sırasıyla kan transfüzyonu ve gebeliğin izlediği belirtilmiştir (88). Pirim ve ark. (85) yaptıkları çalışmada, anti-HLA antikor üretme yüzdeleri incelendiğinde gebelik öyküsü olan hastaların %54'ünün panel reaktif antikor tarama sonucu pozitif olarak saptamışlardır.

HLA antijenleri yüksek derecede immünojenik olduklarından nakilde alıcı ve verici arasında farklı olan HLA antijenleri edinsel immün cevabı aktifleştirerek

rejeksiyona neden olur. HLA moleküllerinin polimorfik özellikleri ve yaygın ekspresyonlarından dolayı bu antijenlere karşı anti-HLA antikorları oluşabilmektedir. Böbrek nakillerinde, hasta ile vericisi arasında HLA doku uyumu aranmaktadır. Hastalar ile donörleri arasında en çok 1DR uyumu görüldü (%31,3; n=130). Tam uyum (2A2B2DR) (%0,2; n=1) iken, uyumsuz (%0,5; n=2) olarak belirlendi. 1DR uyumu olan hastaların %19,2'sinin çaprazlama ve PRA sonuçları pozitif bulunmuştu. 416 hastanın %28,8'ine (n=120) böbrek nakli gerçekleşmişti. 1DR uyumu olan hastaların % 21,5'ine nakil gerçekleşmişti.

CDCXM T hücre ve FCXM T hücre çaprazlama test sonuçları sırasıyla şu pozitif sonuçları vermiştir (%15,1, %19,0). Bu karşılaştırmalarda CDCXM T hücresinin %3,9 negatif sonucu FCXM T hücre testinde pozitif olarak saptanmıştır. CDCXM B hücre ve FCXM B hücre çaprazlama sonuçları ise sırasıyla şu pozitif sonuçları vermiştir (%12,9, %22,8). Burada CDCXM B hücrenin %9,9 negatif sonucu FCXM B hücre testinde pozitif olarak saptanmıştır. Herczyk et al. (89) yaptıkları çalışmada CDCXM testinde % 32 negatif sonucu FCXM testinde pozitif olarak saptamıştır. Koktathong et al. (90) yaptıkları çalışmada CDCXM testinde % 3,4 negatif sonucu FCXM testinde pozitif olarak saptamıştır. Gebel et al. (91) yaptıkları çalışmada CDCXM testinde % 8,7 negatif sonucu FCXM testinde pozitif olarak saptamıştır. Kılıçaslan-Ayna ve ark. (106) yaptıkları çalışmada CDCXM testinde % 19,1 negatif sonucu FCXM testinde pozitif olarak saptamıştır. Dolayısıyla bu çalışmalardaki veriler ile elde ettiğimiz veriler desteklenmektedir. CDCXM nakil sonrası saatler/günler içerisinde meydana gelen ve allogreft reddi ile greft kaybı açısından artmış risk ile ilişkili olan düşük seviyedeki DSA'ları tespit etmek için yeterli hassasiyete sahip değildir (91). İmmünolojik risk (doğum, kan nakli, daha önceki böbrek nakli) taşıyan hastalarda CDCXM testinin yanı sıra FCXM testinin de yapılması önerilmekte ve daha düşük düzeyde saptanabilen antikorların klinik anlamlı olabileceği düşünülmelidir (92). Böbrek nakli adayı için; FCXM sonucu negatif CDCXM sonucu negatif ise nakil düşünülebilir. FCXM negatif CDCXM pozitif ise nakil uygun değildir. Çünkü bu sonuç hiperakut red için yüksek riski ifade eder. Eğer FCXM pozitif, CDCXM negatif ise daha önce nakil öyküsü olmayan, gebelik geçirmemiş, kan transfüzyonu yapılmamış kişilere nakil düşünülebilir. Ancak hasta yukarıdaki şartları taşıyorsa ya nakil yapılmamalı ya da nakil

yapılıyorsa greft reddi için yüksek risk taşıyan bir hasta olduğu göz önüne alınarak ilgili tedavi yöntemleri uygulanmalıdır (68).

Çalışmamızda CDCXM T hücrelerinin %5 negatif sonucu Lum-DSA Sınıf I testinde pozitif olarak bulunurken, Lum-DSA Sınıf II hücrelerinin %2,2 negatif sonucu CDCXM B hücre testinde pozitif olarak saptanmıştır. Yine aynı çalışma grubunda yapılan testlerden FCXM testi ile Lum-DSA çaprazlama testinin aynı anda yapıldığı 5 test sonucuna ulaşıp testler aynı sonuçları vermiştir. Son yıllarda katı faz yöntemleri gelişmekte olup, akış esaslı boncuk analizleri Luminex teknolojisi sisteminin CDCXM yönteminden çok daha hassas olduğu kanıtlanmıştır ve böbrek nakli bekleyen alıcılarda HLA antikorunun diğer yöntemleri tarafından saptanamayan ön duyarlılığı ortaya çıkarmıştır (93).

CDCXM T hücrelerinin %13,6'lık kısmı PRA Sınıf I testinde pozitif olarak bulunurken, CDCXM B hücrelerinin %11,5'lik kısmı PRA Sınıf II testinde pozitif olarak saptanmıştır. Böbrek nakli öncesi sağlık bakanlığının nakil tercihi çaprazlama ve PRA test sonuçlarının negatif olan hasta gruplarıdır. Bu testlerin hepsinin negatif sonuç vermesi DSA varlığının olmayışı yorumu yapılabilir. Çaprazlama ve PRA test sonuçlarının pozitif olması alıcıda DSA varlığı düşünülebilir. Nakil sonrası greft sağ kalımı için belirli aralıklarla PRA bakılmalıdır. Nakil sonrası PRA sonucunun pozitif çıkması alıcıda de novo antikor oluşmuş olabileceği düşündürür. Bu antikorların hangi HLA antijenine karşı oluştuğunu belirlemek için PRA tanımlama veya tek antijen boncuk (SAB) testleri yapılabilir. Böbrek nakli öncesinde ölçülen yüksek PRA düzeylerinin erken ve geç dönemde oluşan greft fonksiyon kaybı için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (91). Anti-HLA antikorların; akut rejeksiyon, rejeksiyon sayısı, kronik rejeksiyon, greft kaybı, hatta yeni yayınlanan kesitsel bir çalışmada belirtildiği üzere kanser ve tüm nedenlere bağlı mortalite riskini artırdığı gösterilmiştir (91,95). Her ne kadar teorik olarak solid faz teknikleri ile saptanan donöre spesifik antikor olması durumunda FCXM sonucu pozitif olması beklenirse de, bu her zaman olağan bir durum değildir. FCXM sonucu negatif iken donöre spesifik antikorların pozitif olması solid faz çalışmaların daha sensitif olmasından kaynaklanabilir, mikro boncukların üzerinde bulunan saflaştırılmış HLA antijenleri donöre spesifik antikorların erişimini kolaylaştırıyor olabilir. Patel and al. (96)

yaptıkları çalışmada nakil öncesi dönemde donör spesifik antikor pozitif olan, CDCXM ve FCXM sonucu negatif hastalarda antikor aracılı rejeksiyon riskinin anlamlı düzeyde artmış olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda bu hastaların %75' inde nakil öncesi PRA pozitifliği saptanmıştır. Nakil öncesi dönemde PRA yöntemi ile saptanmış HLA Sınıf II antikoru olan hastalar CDCXM ve/veya FCXM yöntemlerle çalışılan lenfosit çapraz karşılaştırma testlerinin sonuçları negatif olsa bile allogreft rejeksiyonu ve azalmış greft sağ kalımı riski taşırlar. Bu nedenle tarihsel olarak PRA pozitifliği olan hastaların, CDCXM/ FCXM sonucu negatif olması durumunda bile Luminex solid faz çalışmaları ile donöre spesifik antikor varlığı açısından araştırılmaları olası immünolojik risklerin tam anlamı ile değerlendirilebilmesi için gereklidir (97).

Bu çalışmamda ayrıca kadavra donörden nakil olmuş 25 hasta ve verici çiftini kapsayan bir çalışma grubu oluşturup HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 lokusları da çalışıldı. Nakil olmuş bu hastaların donörleri ile çaprazlama test sonuçlarının hepsi negatiftir. Bekleme listesindeki hastalara nakil kararı verilebilmesi için çaprazlama test sonuçlarının negatif olması gereklidir. HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 lokuslarının greft sağ kalımı süresine etkilerinin görülebilmesi için uzun süreli nakil sonrası takip gereklidir. Çalışmamıza dâhil ettiğimiz hastaların takibi devam etmektedir. Doku uyumluluk antijenleri, genetik olarak birbirine benzemeyen alıcılarda immün yanıtı indüklemeye yeteneğine sahip yüzey antijenleridir. Dolayısıyla doku veya hücre redlerine sebep olurlar (98). Bushell et al. (99) yaptığı çalışmada, 62 hastadan oluşan çalışma grubunda, 25 HLA-DQ uyumsuz hasta ve donörünü karşılaştırmış, sonucu bağımsız bularak HLA-DQ uyumunun greft sağ kalımı ile arasında ilişki olmadığını saptamıştır. Ancak Hsia et al. (100) yaptığı çalışmada ise, 63 hasta ve donöründen oluşan bir çalışma grubunda HLA-DQ sonuçlarını kıyaslayıp, HLA-DQ uyumunun sağ kalıma fayda sağladığını tespit etmişlerdir.

Rene J. Duquesnoy et al. (82) 2011'de yaptığı çalışmada, HLA-C doku tipi uyumsuz 45 olgudan alınan post-allogreft nefrektomi serumlarını inceledi. HLA-C antikorları, başarısız böbrek grefti olan hastalarda nakil başarısızlıklarına katkıda bulunduğu rapor edildi. Hasta ve verici arasında HLA-C uyumsuzluklarının, % 60 oranında antikorlara neden olduğunu göstermişlerdir. HLA-C antikorları, başarısız

böbrek grefti olan hastaların hangilerini primer olarak etkilediği tam olarak bilinmemektedir. HLA-C epitoplarının nakil öncesi yapılan hasta ve verici çifti arasındaki çaprazlama sonuçlarına etkisi halen araştırılmakta olup, bu bilginin eksikliği nakil adaylarına yapılan çalışmalarda etkilediği görülmüştür. Yapılan son çalışmalar neticesinde, böbrek naklinde, HLA-C tiplemesinden yararlanılıp ve duyarlı hastalarda uyumsuzluğu daha iyi değerlendirmenin ne kadar önemli olduğunu göstermiştir (101). Gelecekteki çalışmalarımızda bu konu ayrıca değerlendirilecektir. Birçok farklı birimden yapılmış nakillerden elde edilen verilerle bir havuz oluşturulup hasta sayısı artırılarak daha kapsamlı bir çalışmaya ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir. Şimdiye kadar elde edilen verilerle HLA-C, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1 tiplendirmenin önemi anlaşılmaya başlanmış ve HLA-A, HLA-B ve HLA-DR tiplendirmelerine ek olarak rutin çalışmalara entegre olması ve bu sayede hastaların greft sağ kalım sürelerine olumlu katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Böbrek nakli öncesi yapılan çaprazlama testlerinin avantaj ve dezavantajları ele alındığında; herhangi bir hücre antijenine karşı oluşmuş kompleman fikse eden antikor (Ig1,Ig3,IgM) aracılığı ile meydana gelen hücre ölümünü saptaması, CDCXM testinin en önemli avantajını gösterir ve hiperakut rejeksiyon öngörüsünde önemli bir yöntemdir. Testin dezavantajı, komplemanı aktive etmeyen antikorları tayin edememesi, canlı hücre gerektirmesi, duyarlılığının düşük olması ve HLA için spesifik olmayışıdır. FCXM testinin avantajı, tüm IgG alt sınıflarını saptaması (Ig1, Ig2, Ig3, Ig4) ve bütün antikorları tayin edebilmesidir. FCXM testinin dezavantajı, reaktif ve donanımlarının pahalı olması ve yanlış +/- sonuç verebilmesidir. FCXM tarafından saptanan antikorların klinik önemi ile ilgili tartışmalar vardır. Hücre yüzeyi antikorları spesifik olmayan şekilde bağlanmayla yanlış pozitifliğe neden olabilir. CDCXM ve FCXM testleri ile oluşan anti-HLA antikorunun hedef hücresi (T ve B lenfositler) belirlenirken, Luminex çaprazlama (DSA) testi ise sadece HLA ya karşı oluşmuş antikorların (komplemanı fikse eden ya da etmeyen) varlığını saptar ve oluşan antikorun hangi sınıf HLA'ya karşı oluştuğunu vermesi ile yüksek duyarlılık ve özgüllüğü sağlar (94). Canlı hücreye gereksinim duymayışı, az serum ile çalışıyor olması da bu testin avantajlarından. Luminex çaprazlama (DSA) testinin dezavantajı, birçok serum faktöründen etkilenebilmesi, epitop yapısı değişimi olabilmesi ve non-HLA antikorlarını tayin edememesidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Luminex çaprazlama (DSA) testi; çok düşük miktardaki antikor titresini saptayabilirken, FCXM; orta düzeyde antikor titresini, CDCXM; donöre spesifik antikorları saptayabilmesi için serumda yüksek miktarda antikor olması gerekmektedir. Nakil öncesi çaprazlama testlerinin karşılaştırılması ile ilgili yapılan çalışmalarda, testleri içerisinde sensitivitesi en yüksek olan solid faz yöntemine dayalı luminex çaprazlama (DSA) verilirken, CDCXM'in sensitivesi en düşük olduğu sonucu belirtilir. Çalışmamızdaki sonuçlar, diğer çalışmaların sonuçları ile uyumludur ve bunu desteklemektedir.

Bu çalışmada testlerin duyarlılık, özgüllük, avantajları ve dezavantajları ele alınarak böbrek nakli öncesi ve sonrası uygunlukları hakkında diğer çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu testlerin önceliği merkezlerin imkânları doğrultusunda belirlense de kadavra donörden yapılacak nakiller öncesinde fizyolojik şartlara uygunluğu nedeniyle CDCXM altın standart test olarak yapılmasını, bunun yanında FCXM veya Lum-DSA çaprazlama testlerinden birinin de yapılarak sonuçların birlikte değerlendirilmesini öneriyoruz. Günümüzde nakil öncesi yapılan ve naklin başarısını öngörebilen immünolojik testler sayesinde nakilden sonraki dakikalar veya saatler içerisinde ortaya çıkan hiperakut rejeksiyonun görülme oranı azalmış olsa da, akut ve kronik rejeksiyon allogreft nakillerin önünde aşılması gereken önemli bir engel olarak durmaktadır.

ÖZET

Kadavra Vericili Böbrek Nakli İçin Çağırılan Hastalara Yapılan Farklı Cross-match Testlerinin Karşılaştırılması

HLA antijenlerine karşı oluşan alloantikörler, organ (greft) reddi ve fonksiyon kaybı ile ilişkili en önemli antikörlerdir. Nakil öncesi hastalarda, daha önceden oluşmuş anti-HLA antikörlerinin tespit edilmesi ve grefte karşı oluşacak immün reaksiyonun çaprazlama testlerinde belirlenmesi greft yaşam süresinde önemli bir yer tutar. Bu çalışmada İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde kadavra vericili böbrek nakli için çağırılan hastalara nakil öncesinde yapılan farklı çaprazlama test sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Ocak 2014 - Aralık 2016 tarihleri arasında, 113 kadavra vericili böbrek nakli için çağırılan 416 hastanın komplemana bağlı sitotoksik (CDCXM), akım sitometri (FCXM), luminex donöre spesifik antikör (DSA) çaprazlama ve panel reaktif antikör tarama (PRA) sonuçları çalışmaya dâhil edildi. Kadavra vericilerinin yaş ortalaması $46,08 \pm 16,09$ olup, ortalama kreatin değeri $1,20 \pm 0,81$ (mg/dL) olarak bulundu. Nakil öncesi çaprazlama test sonuçlarına göre FCXM T hücre pozitiflik oranının CDCXM T hücreye göre daha fazla olduğu görüldü (sırasıyla %19,0, %15,1; $p < 0.05$). FCXM B hücre sonucunun ise CDCXM B hücre pozitifliğinden anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (sırasıyla %22,8, %12,9; $p < 0.05$). Lum-DSA Sınıf I pozitiflik oranının CDCXM T hücreye göre daha fazla olduğu görülürken (sırasıyla %19,2, %14,2; $p < 0.05$), Lum-DSA Sınıf II ile CDCXM B hücre pozitifliği arasında anlamlı bir fark bulunamadı (%10,3, %12,5). FCXM testi ile Lum-DSA yöntemlerinin aynı anda yapıldığı 5 testin sonuçları uyumluydu.

Bu testlerin önceliği merkezlerin imkânları doğrultusunda belirlense de kadavra donörden yapılacak nakiller öncesinde CDCXM'in mutlaka altın standart test olarak yapılmasını, bunun yanında Flow veya Lum-DSA çaprazlama testlerinden birinin de yapılarak sonuçların birlikte değerlendirilmesini öneriyoruz.

Anahtar Sözcükler: Böbrek nakli, Cross-match, CDCXM, FCXM, DSA

ABSTRACT

(Comparison of different cross-matching assays in deceased-donor renal transplant candidates)

The alloantibodies to HLA antigens are the most important antibodies associated with rejection of the organ (grafts) and loss of function. Detection of previously formed anti-HLA antibodies in the pre-transplant patients and determination of the immunological reaction against the graft in the cross-match tests have an important place in the graft life. In this study, it was aimed to compare the results of different cross-match tests performed at the İzmir Tepecik Training and Research Hospital before cadaveric kidney transplantation.

Complement-dependent cytotoxicity (CDCXM), flow cytometry (FCXM), luminex donor specific Antibody (DSA) cross-match and panel-reactive antibody screening (PRA) results of 416 patients who were invited for 113 cadaveric transplantation between January 2014 and December 2016 were included in the study. The mean age of the deceased donors was 46.08 ± 16.09 and the mean creatinine level was 1.20 ± 0.81 (mg / dL). According to pre-transplant cross-match test results, FCXM T cell positivity ratio was found to be higher than CDCXM (19.0% and 15.1%, respectively; $p < 0.05$). FCXM B cell results were found to be significantly higher than CDCXM B cell positivity (22.8% and 12.9%, respectively; $p < 0.05$). Lum-DSA Class I positivity was found to be higher than CDCXM T cells (19.2% and 14.2%, respectively; $p < 0.05$). No significant difference was found between CDCXM B cell positivity and Lum-DSA Class II result (10.3% and 12.5%, respectively; $p > 0.05$). Five studies where the FCXM test and Lum-DSA methods were performed simultaneously were compatible.

We recommend to perform CDCXM as a gold standard test, and to evaluate the results together with simultaneously performed one of the Flow or Lum-DSA cross-match tests before cadaveric transplantation, although the priority of these tests is determined by the facilities of the centers.

Keywords: Renal transplantation, Cross-match, CDCXM, FCXM, DSA

KAYNAKLAR

1. Kopple, Joel D. "National kidney foundation K/DOQI clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure." American journal of kidney diseases 37,1 (2001): S66-S70.
2. Watnick S, Morrison G. Böbrek Hastalıkları. In: McPhee SJ, Papadakis MA, th editors. Current Medical Diagnosis and Treatment. 49 ed. Adana: Nobel Kitapevi, 2010; 816-49.
3. Akoglu E, Süleymanlar G. Kronik Böbrek Yetersizliği, Temel İç Hastalıkları, 1996; 769-776, Günes Kitapevi.
4. Budak D. Renal Transplant Alıcılarında Greft Fonksiyon Belirteci Olarak Serumda TNF- α , sTNFR I, sTNFR II, IL-18, IL-6, sVCAM-1, sICAM-1, CRP, Sirtatin C ve Kreatinin Düzeylerinin Karşılaştırılması, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Antalya 2012.
5. Erek E, Süleymanlar G, Serdengeçti K. Nephrology, dialysis and transplantation in Turkey. Nephrol Dial Transplant 2002; 17(12): 2087-93.
6. Malho A, Malheiro J, Fonseca I, Martins LS, Pedroso S, Almeida M, Dias L, Castro Henriques A, Cabrita A. Advantages of Kidney Transplant Precocity in Graft Long-Term Survival. Transplant Proc 2012; 44(8): 2344-7.
7. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. N Engl J Med 1999; 341(23): 1725-30.
8. Trowsdale J. Both Comparative organization of MHC. Immunogenetics. 1995;41,1-17.
9. Gruen JR, Weissman SM. Evolving views of the major histocompatibility complex. Blood.1997;90,4252-65.
10. Browning M, Mc Michael A. MHC and HLA: Genes, Molecules and Function, 2th Edition. New York, Bios Scientific Publishers, 1996.

11. Trowsdale J: The MHC, disease and selection. *Immunol Lett* 2011;137:1-8.
12. Bender K. The HLA system medical services industry and investment Ltd, Biotest Diagnostics 1991;19.
13. Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS.: The Major histocompatibility complex. *Cellular and Molecular Immunology*, third edition, 1997; 103.
14. Pross S. Major Histocompatibility Complex. *xPharm: Compr Pharmacol Ref*, 2007;1-7.
15. Kubly J. Major Histocompatibility complex. *Immunology* third edition,1997 USA;224-246.
16. Tinckam KJ, Chandraker A. Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006 May;1(3):404-14. Epub 2006 Apr 19.
17. Schulze MS, Wucherpennig KW: The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol* 2012;24.105-11.
18. The IMGT/HLA Database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> Erişim tarihi:27.03.2014.
19. Roth DB: T cell receptors and MHC molecules. *Immunology*. Ed. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I: 8'inci baskı. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2012; 89-106.
20. Roberts SC: Complexity and context of MHC-correlated mating preferences in wild populations. *Mol Ecol* 2009;18,3121-3.
21. Abbas KA, Andrew HL, Pillai S: *Cellular and Molecular Immunology*: 6'ncı baskı. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007; 97-111.
22. Cassinotti A, Birindelli S, Clerici M, Trabattoni D, Lazzaroni M, Ardizzone S, Colombo R, Rossi E, and Bianchi Porro G. HLA and Autoimmune Digestive Disease: A Clinically Oriented Review for Gastroenterologists. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:195 – 217.
23. Yalçın B. Major doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülleri: genel özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi. *Türkderm* 2013;47(Özel Sayı 1): 12-7.
24. Van den Elsen PJ. Expression regulation of major histocompatibility complex class II encoding genes. *Front Immunol*. 2011;2.48.

25. Deakin J, Papenfuss A, Belov K, Cross JGR, Coggill P, Palmer S, Sims S, Speed TP, Beck S, Graves J.A.M. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region. *BMC Genomics*. 2006;7:281.
26. Gülmezoglu E, Ergüven S. Doku uygunluk antijenleri. *İmmünoloji*. 1994;29-40.
27. Oğuz FS, Çarın M. MHC genlerinin organizasyonu. *Sendrom*. 1999;11:126-7.
28. Campbell EC, Antoniou AN, Powis SJ: The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. *Immunol* 2012;136:380-4.
29. Özbolat, Gülüzar, Ebru Dünder Yenilmez, and Abdulah Tuli. "İnsan Lökosit Antijenleri, Yapı ve İşlevleri." *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 23.3 (2014).
30. Davla K. Her Yerde Karsında; Nedir Bu HLA Tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu Antalya. 2004.
31. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*. 1999;401:921-3.
32. De Almeida DE, Holoshitz J: MHC molecules in health and disease: At the cusp of a paradigm shift. *Self Nonself* 2011;2:43-8.
33. Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J. Major Histocompatibility Complex. In Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J, *Immunology* (5th ed). W.H. Freeman and Company, New York, 2003:p24-56.
34. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji. İstanbul, Türkiye, *İstanbul Tıp Kitabevi*, 2007;1-35.
35. Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A., Kuby J. *Kuby Immunology*. 6th Edt, *W. H. Freeman*, 2007; 1-273.
36. Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol*. 2002; 10:147-64.
37. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol* 2009;125 (2): 324-335.
38. Kılıç turgay K, İmmünoloji. Motif Matbaacılık. Nobel & Güneş Tıp Kitapevi. 2003;261-288.
39. Congy-Jolivet N, Drocourt D, Portet S, Tiraby G, Blancher A. Production and characterization of chimeric anti-HLA monoclonal antibodies targeting public

- epitopes as tools for standardizations of the anti-HLA antibody detection. *Journal of Immunological Methods* 2013; 390: 41–51
40. Thorsby E. On the future of HLA. *Tissue Antigens* 2011; 78: 229–240.
 41. Pollack MS, Trimarchi HM, Riley DJ, Casperson PR, Manyari LE, Suki WN. Shared cadaver donor-husband HLA class I mismatches as a risk factor for renal graft rejection in previously pregnant women. *Hum Immunol.* 1999; 60(11): 1150-5.
 42. Choo SY. Immunogenetics of the HLA system. *Yonsei Med J.*1991;32,1
 43. Nankivell BJ and Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med* 2010; 363:1451-62.
 44. Smith, S. "Immunologic aspects of organ transplantation." *Organ Transplantation, Medscape* (2002).
 45. Tinckam KJ, Chandraker A. Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 May;1(3):404-14. Epub 2006 Apr 19.
 46. S. Thiru, H. Waldman, MS Dalman. Immunobiology of graft rejection. *Pathology and Immunology of Transplantation and Rejection* 2000;1-27.
 47. Martin S, Dyer PA, Mallick NP, et al. Posttransplant antidonor lymphocytotoxic antibody production in relation to graft outcome. *Transplantation* 1987; 44: 50 - 53.
 48. Piazza Antonina, Poggi Elvira, Borrelli Loura, Servetti Simona, Monaco Palmina, Buonomo Oreste, Valeri Maurizio, Torlone Nikola, Adorno Domenico, Casciani Carlo. Impact of donor specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: post transplant analysis using flow cytometric techniques, *Transplantation* 2001;71: 1106 - 1112.
 49. Margeret J. Dalman; Immunobiology of graft rejection: Pathology and immunology of transplantation and rejection; USA: 2001.
 50. Somasundaran M. and Quiroga I. Principles in Transplantation: immunology. *Surgery* 2011; 29:295-300.

51. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA System: immunology, Hla typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol* 2010; 63:387-390.
52. Bontadini A. 2012, HLA techniques: Typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics, *Methods* 56 471–476.
53. Dalva K, Beksac M, HLA Typing with Sequence-Specific Oligonucleotide Primed PCR (PCR-SSO) and Use of the Luminex™ Technology. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 134.
54. RA Bray, *ku Cytometry Cross Matching For Solid Organ Transplantation*, *Methods in Cell Biology*, 1994; 41:103-119.
55. Kuby J. The Complement system, *Immunology*. Third Edition USA 1997; 335-356.
56. Kuby J. Cell mediated and humoral effector responses. *Immunology Third Edition*, USA 1997; 379 - 409.
57. CA Janeway, P. Travers, M. Walport, Sd Capra. Humoral immun response, *Fourth Edition*, 2000; 307-358.
58. O’Gorman MRG, Donnenberg AD. *Handbook of Human Immunology (2nd ed)*, CRC Press, Boca Raton, 2008: 63-107.
59. Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta* 2006; 363: 71-82.
60. Zachary AA, Leffell MS. *Transplantation immunology, methods an protocols*, Second Ed. Humana Press 2014. 257-284.
61. Zachary AA, Klingman L, Thorne N et al. (1995) Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplantation* 60(5):498–503.
62. Akkoc N, Scornik JC (1991) Intramolecular specificity of anti-HLA alloantibodies. *Hum Immunol* 30(2):91–98.
63. Taylor CJ, Chapman JR, Ting A et al (1989) Characterization of lymphocytotoxic antibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation. Relationship to primary and regraft outcome. *Transplantation* 48(6):953–958.

64. Cross DE, Greiner R, Whittier FC (1976) Importance of the autocontrol crossmatch in human renal transplantation. *Transplantation* 21(4):307–311.
65. Scornik JC, Bray RA, Pollack MS et al (1997) Multicenter evaluation of the flow cytometry T-cell crossmatch: results from the American society of histocompatibility and immunogenetics- college of American pathologists proficiency testing program. *Transplantation* 63(10):1440–1445.
66. Juan C. Scornik. Detection of alloantibodies by flow cytometry: relevance to clinical transplantation *Cytometry (Communications In Clinical Cytometry)* 1995; 22: 259-263.
67. Ogura K. Terasaki PI. Johnson C. The significant of a positive cross match test in primary kidney transplantation. *Transplantation* 1992; 56: 294 – 298.
68. JC Scornik, ME Brunson, B Schaub, RJ. Howard, WW. Pfaff. The crossmatch in renal transplantation, *Transplantation* 1994; 57: 621- 625.
69. JC Scornik, RA Bray, MS Pollack, DJ Cook, M. Marrari, R, Duquensoy, JW Langley. Multicenter evaluation of the flow cytometry T-cell crossmatch; *Transplantation* 1997; 63: 1440 -1445.
70. Patel, Ramon, and Paul I. Terasaki. "Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation." *New England Journal of Medicine* 280,14 (1969): 735-739.
71. M. Kotb, W. Russuel, M. Ohman, D. Hathaway and AO Gaber: Clinical implacations of flow cytometry B crossmatching in renal transplantation. *Transplantation Proceedings* 1997; 29: 1430-1432.
72. Accurate, rapid characterization of HLA-specific antibody using luminex technology. Pretl, K., Chesterton, K.A., Scholander, J.T., Leffell, M.S., and Zachary, A.A. *Hum Immunol* (2003); 64: S108.
73. Hennessy, P, Adams, P, Orosz, C, Crossmatches using solubilized alloantigens, *ASHI Procedure Manual, serology I.D.1*, pgs 1-4.
74. Adams, P, Orosz, C, A Donor-Specific Solid-Phase Immunoassay for the Detection of Anti-MHC Class I and MHC-Class II Alloantibodies, *ASHI Procedure Manual, serology I.D.1,2*, pgs 1-5.

75. Boldt, B, Ladvienka, K, Clarke, M, Chance, S, Donor-Specific Antibody Detection by Luminex, 20th EFI Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Oslo, Norway, June 8-11, 2006.
76. Billen, E, Voorter, C, Christiaans, M, and van den Berg-Loonen, Luminex Donor- Specific Crossmatches, *Tissue Antigens* 71, 507-513, 2008.
77. Pirim I, Soyoz M, Ayna TK, Kocyigit AO, Gurbuz BC, Tugmen C, Kurtulmuş Y, Ozyilmaz B. De novo Produced Anti-Human Leukocyte Antigen Antibodies Relation to Alloimmunity in Patients with Chronic renal Failure. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015; 19: 335-8.
78. Tait BD, Hudson F, Cantwell L et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology* 2009;14: 247-254.
79. Nankivell BJ and Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med* 2010; 363:1451-62.
80. Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17: 541–545.
81. Marsh, E. D. Albert, W. F. Bodmer et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 75, 291–455.
82. Duquesnoy, Rene J. and Marilyn Marrari. "Detection of antibodies against HLA-C epitopes in patients with rejected kidney transplants." *Transplant immunology* 24,3 (2011): 164-171.
83. Christiaans MH, Overhof-de Roos R, Nieman F, van Hooff JP, van den Berg-Loonen EM. Donor-specific antibodies after transplantation by flow cytometry: relative change in fluorescence ratio most sensitive risk factor for graft survival. *Transplantation* 1998; 15:427-433.
84. Christopher FB, Karen AB, Paul WN, Alan ML, John M, George EP, Gilbert R, Charles FS, III. Bradley AW, Mark IA, Thomas SH, And Nic M. Long term graft survival is improved in cadaveric renal retransplantation by flow cytometric crossmatching. *Transplantation* 1998; 66:1827-1832.
85. Pirim İ, Öncel G Z, Eyerci N, Eroğlu A; Validation of Anti-HLA Antibodies in Serum of Blood Transfused or Organ Transplanted Patients. *Eurasian J Med* 2007;39:181-184.

86. Coronel F, Sanchez-Fructuoso A, conesa J, Prats D, Barrientos A. Pre-Transplant Treatment Modality and Renal Transplant Outcomes. *Dial Transplant* 2006; 35: 1-4.
87. Erikoğlu M, Büyükdoğan M, Cora T. The relationship between HLA antigens and blood groups. *Eur J Gen Med* 2011; 8(1):65-68.
88. Jordan SC and Vo AA. Donor-specific antibodies in allograft recipients: etiology, impact and therapeutic approaches. *Curr Opin Organ Transplant* 2014; 19: 591-597.
89. Herczyk, Walter F. et al. "Identification of unacceptable antigens using flow cytometric bead techniques to significantly reduce unnecessary crossmatches for sensitive patients." *Human Immunology* 64.10 (2003): S35.
90. Kockathong, K. Vejbaesya, S. Bejrachandra, S. & Pattanapanyasat, K. (2005). Flow cytometric crossmatch for kidney transplantation. *J Med Assoc Thai*, 88(6), 769-74.
91. Gebel, Howard M., Robert A. Bray, and Peter Nickerson. "Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk." *American Journal of Transplantation* 3.12 (2003): 1488-1500.
92. ŞENGÜ, Şule, Funda YAIÇIN, and Hüseyin TUTKAK. "Vericiye Özgü Antikor Pozitif Olgularda Böbrek Nakli: Tek Merkez Deneyimi Renal Transplantation in Donor Specific Antibody Positive Sensitized Patients: Single Center Experience."
93. Tait, Brian D., et al. "Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation." *Nephrology* 14,2 (2009): 247-254.
94. Boldt, B, Ladvienka, K, Clarke, M, Chance, S, Donor-Specific Antibody Detection by Luminex, 20th EFI Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Oslo, Norway, June 8-11, 2006.
95. Lim WH, Chapman JR, Wong G: Peak panel reactive antibody, cancer, graft, and patient outcomes in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2015;99,1043-1050.

96. Patel AM, Pancoska C, Mulgaonkar S, Weng FL: Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches. *Am J Transplant* 2007;7,2371-237.
97. RUHİ, Çağlar, et al. "Pretransplant Gelişmiş Hla Sınıf I ve II Panel Reaktif Antikorların Böbrek Allogrefti Üzerine Klinik ve Patolojik Düzeyde Etkileri The Influence of Preformed HLA Class I and II Panel Reactive Antibodies on Clinical and Pathological Outcomes of Kidney Allograft."
98. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol* 2009;125 (2): 324-335.
99. Bushell A, Higgins RM, Wood KJ. HLA-DQ mismatches between donor and recipient in the presence of HLA-DR compatibility do not influence the function or outcome of renal transplants. *Hum Immunol*1989; 26(3): 179.
100. Hsia S, Tong JY, Parris GL, et al. Molecular compatibility and renal graft survivalVthe HLA DRB1 genotyping. *Transplantation*1993; 55(2): 395.
101. Duquesnoy, R. J., & Marrari, M. (2011). Detection of antibodies against HLA-C epitopes in patients with rejected kidney transplants. *Transplant immunology*, 24(3), 164-171.
102. Stites DP, Terr AI, Parslow TG.: Histocompatibility testing, Basic and Clinical Immunology, eighth edition. 1994; 237-255.
103. Picascia A, Infante T, Napoli C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clin Exp Nephrol* 2012;16: 373-381.
104. Galip, A. K. I. N. & Dostbil, N. (2017). Türkiye'de Kan Grubu Araştırmaları. *DTCF Dergisi*, 45(2).
105. Soyöz M, Akman B, Totur İ, Topçu S, Özkızılcık-Koçyiğit A, Çerçi-Gürbüz B, Yüksel C, Güngör TH, Memon A, Güleç D, Kılıçoğlu M, Kılıçaslan-Ayna T, Pirim İ (2016). Human Leukocyte Antigen Class I-II Allele Frequencies and Association Between Human Leukocyte Antigen Alleles and AB0 Blood Group Antigens. *Turkish Journal of Immunology*, 4(1); 14-18.
106. Kılıçaslan-Ayna T, Soyöz M, Kurtulmuş Y, Doğan SM, Özyılmaz B, Tuğmen C, Pirim İ. (2013). Comparison Of Complement Dependent Cytotoxic Cross-Match And Flow-Cytometry Cross-Match Results Before Cadaveric Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 45, 878–880.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimi Elazığ'da tamamladım. 2005 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında ayrılıp aynı yıl Trakya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Anestezi programını kazandım. 2010 yılında Anestezi programını bitirip aynı yıl tekrar Fırat Üniversitesi Fen -Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2012 yılında Biyoloji lisans eğitimimi tamamlayıp mezun oldum. 2014 yılında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.