

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

**ALLOİMMÜNİZASYONLA OLUŞAN ANTI-HLA
ANTİKORLARININ MİKROLENFOSİTOTOKSİSİTE
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**CEREN YÜKSEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF.DR.İBRAHİM PİRİM**

2016- İZMİR

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

**ALLOİMMÜNİZASYONLA OLUŞAN ANTİ-HLA
ANTİKORLARININ MİKROLENFOSİTOTOKSİSİTE
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**CEREN YÜKSEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. İBRAHİM PİRİM**

2016- 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 : / /

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

Yüksek lisans tez çalışmam süresince her türlü yardımı sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmama ışık tutan değerli danışman hocam Prof. Dr. İbrahim PİRİM'e ve değerli hocalarım Doç. Dr. Tülay K. AYNA'ya ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ'e; Yüksek lisans eğitimim boyunca benden her türlü yardımını ve manevi desteğini esirgemeyen çok sevgili Uz. Dr. Derya GÜLEÇ'e; moral ve motivasyonumun düşmemesini sağlayan Uz. Dr. Murat KILIÇOĞLU'na; tez yazım aşamasında her konuda yardımcı olan değerli arkadaşlarım Arş.Grv. Aslı KOÇYIĞIT ve Arş.Grv. Burcu GÜRBÜZ'e; Bu tezi yazarken sabırlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Doku Tipleme Laboratuvarı ekibine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimimi ve tez çalışmalarımı sürdürdüğüm sürece her koşulda anlayışla davranıp benden sabrını, desteğini ve çok değerli sevgisini esirgemeyen sevgili eşim Op. Dr. TOLGA YÜKSEL'e sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİ	2
2.1 Kronik Böbrek Yetmezliği	2
2.2 İnsan Lökosit Antijeni Sistemi	2
2.2.1 HLA Sınıf I Molekülleri.....	3
2.2.2 HLA Sınıf II Molekülleri.....	3
2.3 İmmün Sistem Hücreleri	4
2.3.1 T Hücreleri	4
2.3.2 B Hücreleri	5
2.4 Antikor	5
2.4.1 Moleküler Yapısı.....	6
2.4.2 Antikor Sentezi.....	7
2.4.3 Antikor Çeşitleri.....	8
2.4.4 Antijen – Antikor Kompleksi.....	9
2.4.5 Anti-HLA Antikorları.....	11
2.5 Kompleman Sistemi	12
2.6 Panel Reaktif Antikor Belirleme Yöntemleri.....	15
2.6.1 Mikrolenfositotoksizite Yöntemi (Complement Dependent Cytotoxicity – CDC).....	16
2.6.2 Flow Sitometri Yöntemi	16
2.6.3 xMAP Teknolojisi	17
3 GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1 Çalışma Grubu.....	19
3.2 Plakların Haritalarının Oluşturulması.....	19
3.3 Hücre İzolasyonu.....	19
3.4 Plakların Değerlendirilmesi.....	20
4 BULGULAR	21
5 TARTIŞMA.....	53

ÖZET.....	59
ABSTRACT	60
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ	64



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASH : Antijen sunan hücreler

α : Alfa

β : Beta

CDC: Komplemana bağımlı sitotoksisite

CDR: Tamamlayıcılık belirleme bölgesi

CMV: Sitomegalovirüs

CREG: Çapraz reaktif epitop grubu

DSA: Vericiye spesifik antikor

EBV: Epstein-barr virüsü

ER: Endoplazmik retikulum

GFR: Glomüler filtrasyon hızı

HBV: Hepatit B virüsü

HCV: Hepatit C virüsü

HLA: İnsan lökosit antijeni

Ig: İmmünoglobülin - Antikor

KBY: Kronik böbrek yetmezliği

MAC: Membran atak kompleksi

MHC: Majör histokompatibilite kompleksi

PRA: Panel reaktif antikor

SAB: Tek antijenli boncuk

YOS: Yüksek oranda sensitize

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: HLA sınıf I, II ve III genlerinin yerleşimi.....	3
Şekil 2: HLA sınıf I ve sınıf II antijen yapısı.....	4
Şekil 3: İmmunoglobulin yapısı.....	6
Şekil 4: Ig G alt tipleri.....	9
Şekil 5: İmmunoglobülin CDR bölgeleri.....	10
Şekil 6: Kompleman sistemin 3 yolağı	15
Şekil 7: Tablo 6' da doku antijenleri verilen lenfosit hücrelerinin çalışma gurubumuzdaki serumlarla inkübe edilmesiyle reaksiyon oluşmuş HLA-A lokus allelerinin dağılımı ve sayıları.....	28
Şekil 8: Tablo 6'da doku antijenleri verilen lenfosit hücrelerinin çalışma gurubumuzdaki serumlarla inkübe edilmesiyle reaksiyon oluşmuş HLA-B lokus "İlelerinin dağılımı ve sayıları.....	28
Şekil 9: Tablo 6'da doku antijenleri verilen lenfosit hücrelerinin çalışma gurubumuzdaki serumlarla inkübe edilmesiyle reaksiyon oluşmuş HLA-DR lokus allelerinin dağılımı ve sayıları.....	29
Şekil 10: MİXB-4 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikoru.....	41
Şekil 11: MİXB-4 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikoru.....	42
Şekil 12: MİXB-2 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikoru.....	43
Şekil 13: MİXB-2 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikoru.....	44
Şekil 14: MİXB-6 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikoru.....	45
Şekil 15: MİXB-6 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikoru.....	46
Şekil 16: MİXB-7 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikoru.....	47
Şekil 17: MİXB-7 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikoru.....	48
Şekil 18: MİXB-8 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikoru.....	49
Şekil 19: MİXB-8 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikoru.....	50
Şekil 20: MİXB-9 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikoru.....	51
Şekil 21: MİXB-9 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikoru.....	52

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: IgG alt grupları özellikleri.....	9
Tablo 2: Mikrolenfositotoksosite yöntemi skor grafiği.....	20
Tablo 3: Serumların luminex PRA tarama-tanımlama sonuçları, antikor tipleri ve MFI değerleri.....	22
Tablo 4: Plaklarda kullanılan serumların demografik verileri ve alloimmünizasyon bilgileri.....	24
Tablo 5: İçerdikleri farklı anti-HLA antikorlarına göre guruplandırılan serumların döküldüğü plaklar ve antijen kaynağı olarak kullanılan farklı canlı lenfosit hücre sayıları.....	26
Tablo 6: HLA doku tipi tespit edilmiş lenfosit hücrelerindeki HLA sınıf I ve II alleleri....	27
Tablo 7: B27 seri no'lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları.....	30
Tablo 8: TX seri no'lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları.....	31
Tablo 9: GEB seri no'lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları.....	32
Tablo 10: MİXA seri no'lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları.....	33
Tablo 11: MİXB seri no'lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları.....	34
Tablo 12: MİXA-5, MİXB-4, 2, 6, 7, 8, ve 9 no'lu serumların luminex-SAB sonucuna göre spesifik antijen reaktivitesinin canlı hücrelerde bulunan antijeniyle gösterdiği reaksiyonlar.....	35

GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), glomerül filtrasyon hızının (GFR) kalıcı bir şekilde azaldığı, böbrek fonksiyonlarında değişikliklere neden olan durum olarak tanımlanabilir. Böbrek yetmezliğinin tedavisinde hastanın tıbbi, demografik ve psikososyal durumları göz önünde bulundurularak diyaliz tedavisine başlanır. Ancak böbrek yetmezliğinin en kesin tedavisi uzun dönem sağkalım yararları sunduğundan böbrek transplantasyonudur. Böbrek transplantasyonu dünyada ve ülkemizde canlı veya kadaverik donörlerden yapılmaktadır. Böbrek transplantasyonunda öncelikli değerlendirilen çok değişkenli parametreler bulunur. Bu parametreler Epstein-Barr virüsü (EBV), herpes virüsü, sitomegalovirüs (CMV), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) için serolojik değerlendirmeyi içermelidir. İmmünolojik açıdan önem arz eden parametreler ise alıcı-verici kan grubu uyumu, doku yani insan lökosit antijeni (Human Leukocyte Antigen-HLA) uyumudur (1).

Anti-HLA antikorları renal transplantasyonun başarısında önemli bir role sahiptir (2). Bu antikorlar kan transfüzyon öyküsü, gebelik ve önceki transplantasyonlar varlığında gelişir (3). Oluşan anti-HLA antikorlarının tespiti nakil öncesinde önem arz eder. Komplemana bağlı sitotoksikite yöntemi ile antikor tespiti yapıldığı gibi son dönemlerde akım sitometrisi ve boncuk temelli sistemlerle antikor tayini yapılmaktadır. Nakil sonrasında oluşan vericiye özgü anti-HLA antikorları greft hasarı ve kaybına yol açar. Bu nedenle nakil sonrasında da anti-HLA antikorlarının tespit edilmesi önemlidir (2,4).

HLA molekülleri çok sayıda antikor tanıma bölgesi taşır. Bu bölgeler birkaç farklı HLA antijeni tarafından paylaşılabilir. Paylaşılan bu bölgelere epitop denir. HLA antijenlerine karşı gelişen antikorlar farklı antijenlerin paylaşılan epitoplarına karşı oluşabilir. Bu yüzden HLA antijenlerine sensitize olan hastalarda bulunan antikorlar sadece tek bir antijen için değil başka antijenlere karşı da gelişmiş olabilir (5).

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda en etkili tedavi yöntemi organ transplantasyonudur (6). Yapılan böbrek nakillerinde vericinin böbreğinin alıcı immün sistemi tarafından tanınması ve organı kabul etmesi önemlidir. Yani nakil edilecek greftin üzerindeki HLA antijenlerine karşı alıcının serumunda antikor bulunmaması gerekmektedir (7). Bu antikorların vericiye karşı olanlarını taramak için çapraz uyum testleri yapılırken potansiyel vericiye karşı taranan antikorlar panel reaktif antikor (PRA) testleri ile yapılır (2,4).

GENEL BİLGİ

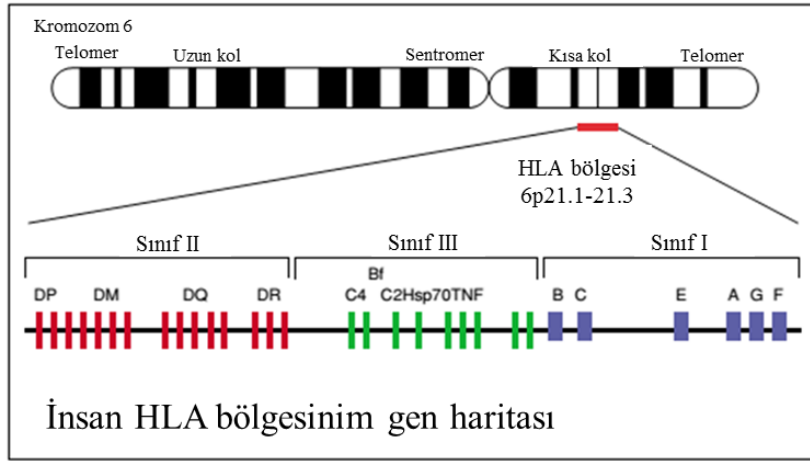
1.1 Kronik Böbrek Yetmezliği

Böbrekler vücudumuzdan fazla suyun atılmasını sağlar. Kronik böbrek yetmezliği (KBY) ise zaman içerisinde böbrek fonksiyonlarının kaybolması sonucu oluşur (8). KBY, glomerüler filtrasyon hızının (GFR) azalması sonucu, böbreğin sıvı dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik bozulma halidir (9). KBY diyabet, hipertansiyon gibi birçok sebepten dolayı gelişebilir. Kanda üre ve kreatinin düzeyinin yükselmesi veya kreatinin arınmasının azalması ile böbrek yetmezliği tanısı konulur (1). KBY, tedavi edilemezse, ilerleyen asidoz, anemi ve azotemi sonucu üremik tablo ortaya çıkar. Glomerül filtrasyon hızı % 5'in altına indiğinde ise son dönem böbrek yetmezliğinden bahsedilir. Böyle bir durumda hastalar için diyaliz tedavisi veya böbrek nakli kaçınılmaz olur (9,10).

1.2 İnsan Lökosit Antijeni Sistemi

Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi (MHC), bütün omurgalılarda geniş bir gen ailesi tarafından kodlanan bir hücre yüzey molekülüdür. Hücre içi ve hücre dışından köken alan peptidleri peptid reseptörleri gibi davranarak uygun lenfositlere sunar (10). Bu moleküller ilk kez 1937 yılında Peter Gorer tarafından farelerle yapılan transplantasyon çalışmalarında tespit edilmiştir. İnsanlarda MHC moleküllerine ilk olarak lökositlerde rastlandığı için insan lökosit antijeni (Human Leukocyte Antigen - HLA) ismi verilmiştir (11). HLA' lar genetik olarak farklı alıcılarda immün yanıtı indükleyen, doku veya hücre rejeksiyonuna neden olabilen moleküllerdir (2).

HLA kompleksi 6. kromozomun kısa kolunda, 6p21.3 bölgesinde bulunur, 200'den fazla gen içerir. Bu genlerin kodladığı hücre yüzeyinde bulunan veya çözünebilir halde bulunan proteinler, dokulardaki dağılımına, yapısına ve fonksiyonuna göre 3 sınıfa (I, II,ve III) ayrılır (Şekil 1). Sınıf I bölgesi HLA-A, HLA-B, HLA-C moleküllerini; Sınıf II bölgesi HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP moleküllerini kodlar (12,13). Sınıf III genleri kompleman sistemde rol alan çeşitli bileşenleri kodlar (2).



Şekil 1: HLA Sınıf I, II ve III genlerinin yerleşimi (Mehra ve ark.'dan (14) modifiye edilmiştir.)

1.2.1 HLA Sınıf I Molekülleri

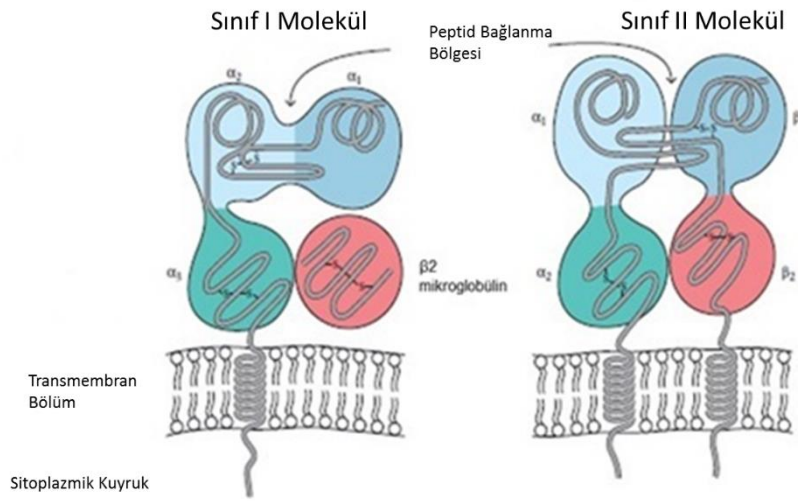
HLA Sınıf I molekülleri sınıf I genleri, tarafından kodlanan α_1 , α_2 ve α_3 domainleri ve 15.kromozomdaki bir genden kodlanan β_2 mikroglobulin molekülünden oluşur. HLA sınıf I molekülleri tüm çekirdekli hücrelerde bulunur (15). α_1 ve α_2 domainleri peptid bağlama bölgesini oluşturur. Polimorfik olmayan β_2 mikroglobulin molekülü ise transmembran olmayan bir polipeptittir. β_2 mikroglobulin molekülü sınıf I HLA molekülünün yapısal bütünlüğünü sağlamak üzere α_3 domaini ile non-kovalent etkileşimdedir (16). (Şekil 2)

Sınıf I HLA moleküllerinin temel görevi peptit antijenlerini sitotoksik T hücrelerine (T_C) sunmaktır (18). Bu molekülün sunduğu antijenik peptitler, hücre içinde sentezlenmiş olan proteinlerin parçalanmasıyla oluşmuş endojen peptitlerdir. Endoplazmik retikulumda protein sentezinden hemen sonra α -zinciri ile β_2 -mikrobulinin etkileşimde olması bütün heterodimerin hücre yüzeyine taşınması için de önemlidir (16).

1.2.2 HLA Sınıf II Molekülleri

HLA sınıf II molekülleri B lenfositleri, aktive T lenfositleri, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, endotelyum ve epitel hücrelerde eksprese olurlar (2). Bu moleküllerin bağlandığı peptitler ekzojen peptitlerdir yani fagositoz veya reseptör aracılı endositoz ile dışarıdan hücreye girmiş olan proteinlerin parçalanmasıyla oluşan peptitlerdir (16). HLA sınıf II antijenleri α_1 , α_2 , β_1 ve β_2 zincirlerden oluşur (2,16). Her iki zinciri de ekstrasellüler domain,

bir immüoglobülin (Ig)-benzeri ekstrasellüler domain, bir hidrofobik transmembran domaini ve bir kısa sitoplazmik kuyruk içerir (Şekil 2). Peptit bağlanma bölgesi α_1 ve β_1 domainlerinin N-uçlarından oluşur. α_2 ve β_2 domainleri ise globüler yapıda olup peptit bağlanmada rol oynamazlar. HLA sınıf II peptit bağlanma çukuru sınıf I molekülündekine benzerdir. Bağlanma peptit iskeleti ile HLA sınıf II amino asitlerinin yan zincirleri arasında hidrojen bağlarıyla gerçekleşir (16). β zinciri α zincirine göre daha polimorfiktir. Bu sebeple de HLA tiplmesi yapıırken genellikle β zincirinin tiplmesi yapılır (18).



Şekil 2: HLA sınıf I ve sınıf II antijen yapısı (Kindt ve ark'dan (20) modifiye edilmiştir.)

1.3 İmmün Sistem Hücreleri

İmmün sistemde rol alan hücreler lenfositlerdir. Lenfositler edinsel immüniteden sorumlu olan temel hücrelerdir. B hücreleri, T hücreleri lenfosit hücre popülasyonlarıdır (16,20).

1.3.1 T Hücreleri

Timus' ta olgunlaşan T hücrelerinde antijenler için birçok reseptörü bulunur. T-hücre reseptörü (T Cell Receptor-TCR) yapısal olarak immüoglobülininden farklı olsa da özellikle antijen bağlama bölgesi açısından immüoglobülinle benzerdir. TCR' ler serbest antijenleri tanımazlar. Bunun yerine sadece kendi moleküllerinden bazılarına tutunmuş olan antijenleri tanırlar. Bir antijenin tanınması için antijen sunan hücrelerin (ASH) veya virüsle enfekte

hücrelerin, kanser hücrelerinin ve greftlerin yüzeyindeki HLA molekülleri ile birlikte olması gerekmektedir (21).

1.3.2 B Hücreleri

B hücreleri, kemik iliğindeki kök hücrelerden oluşur ve gelişimlerini burada tamamlamaktadır. Kemik iliğini terk ettiklerinde her biri kendi membranında antijen-bağlanma reseptörü eksprese eder. Bu antijen-bağlayıcı veya B hücre reseptörü membrana bağlı bir immunoglobulin molekülüdür. B hücrelerin antijen sunma fonksiyonu vardır. Bu özellik B hücre yüzeyinde sınıf II HLA molekülleri de ifade edilmesi sayesinde olur (21).

Daha önce antijenle karşılaşmamış B hücresi, antijenle ilk defa karşılaşır ve antijenin antikora bağlanması hücrenin hafıza B hücrelerine ve plazma hücresi denen efektör hücrelere dönüşmesine sebep olur. Bellek hücreleri uzun ömürlüdür ve dolaşıma da geçerek sürekli sistemde dolaşır. Plazma hücreleri çok büyük granüllü endoplazmik retikulum (ER) içerirler ve dalağın kırmızı pulpunda, lenf nodlarının medullar kordonunda ve kemik iliğinde bulunmaktadır. Plazma hücreleri B hücrelerinin en son farklılaşmış halidir ve antikor sentezleyip sisteme salgılar. 1 veya 2 hafta içerisinde plazma hücrelerinin çoğu ölür (21).

1.4 Antikor

Antikorlar antijen bağlayabilen, B hücre yüzeyinde eksprese olan proteinlerin transmembran bölgesi değişmiş formlarıdır (21). Antikorların çoğu gama globülin yapısındadır. Bu yüzden de antikora, gama globülinlerin immunityle ilişkili kısmı anlamında immunoglobulinler (Ig) de denir (20,22).

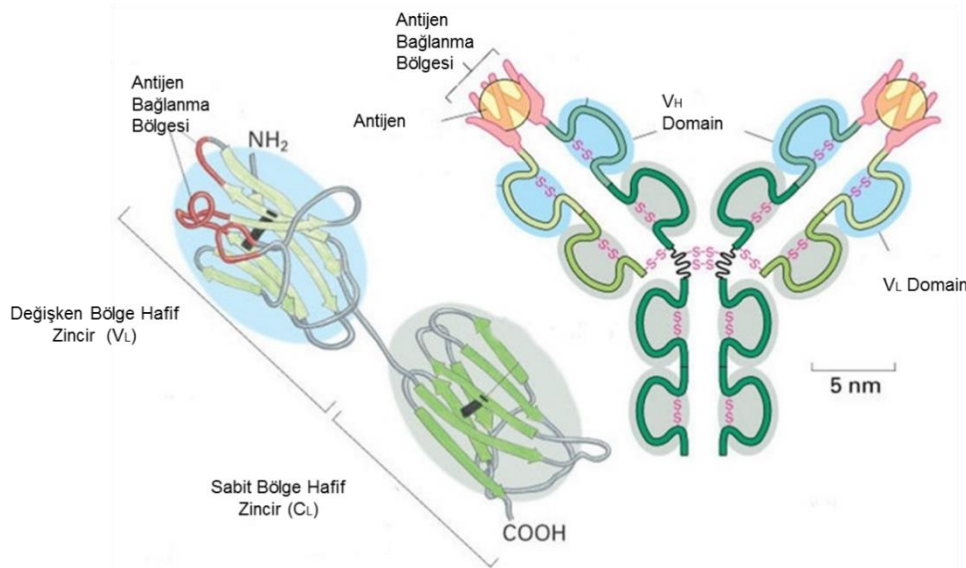
Antikorlar oldukça çeşitlidirler ve antijene özgüdürler. Membrana bağlı ve salgılanan antikorlar olmak üzere iki formda bulunurlar. B lenfositlerin yüzeyinde membrana bağlı antikorlar antijen reseptörü olarak görev alırken, salgılanan antikorlar dolaşıma katılarak toksinleri yok ederler, patojenlerin vücuda girmesini ve yayılmasını engellerler. Salgılanan antikorlar, kompleman proteinleri, fagositler ve eozinofiller gibi diğer birçok immün sistem bileşeniyle iş birliği yaparak antijenlere bağlanırlar ve etkisini ortadan kaldırırlar (20).

Tüm antikorlar aynı temel yapıya sahiptir fakat antijenlere bağlanan kısımlarında belirgin farklılıklar vardır (3). Antijen bağlanma bölgelerindeki bu çeşitlilik antikorların yapısal olarak çok çeşitli antijenlere bağlanmasını sağlar. Her bireyde bir milyon veya daha

fazla çeşitte antikor olduğu düşünülmektedir ve her biri antijen bağlanma bölgesinde birbirinden farklı aminoasit sekansı içermektedir. Antikorların fonksiyonları ve yaygın fizikokimyasal özellikleri ise antijen bağlanmayan kısımlarıyla ilgilidir (20).

1.4.1 Moleküler Yapısı

Antikorların çoğu gama globülin olduğundan, moleküler yapılarından bahsederken immunglobulin G esas alınmaktadır. Antikor molekülleri dört polipeptid zincirinden oluşur. Bu yapı yaklaşık 25 kDa ağırlığa sahip polipeptidlerden oluşan iki özdeş hafif (L) zinciri, ve yaklaşık 50 kDa moleküler ağırlıktan fazla olabilen iki özdeş ağır (H) zincirden oluşur (23). Amino terminal ucun hafif ve ağır zincir kısımlarındaki ilk 110 ve daha fazla amino asit kadar kısmı değişkendir ve antikorların spesifitesini değiştirir. Yüksek değişkenlik sekansı içeren bu segmentler değişken bölgeler (variable, V bölgesi) olarak adlandırılır, bu bölgeler antijen bağlanma bölgelerini içerirler. Karboksi terminal ucundaki sabit bölgeler (constant, C bölgesi) kompleman aktivitesi gibi efektör fonksiyona sahiptir (23). İki ağır zincir birbirine disülfid bağlarıyla bağlıdır ve her bir ağır zincir bir hafif zincire yine disülfid bağıyla bağlıdır. Ayrıca zincirlerin kendi içerisinde de disülfid bağları bulunur. Bunlar zincirler içinde domainlerin oluşmasına sebep olur (24). Hafif zincirler bir değişken (V_L) ve bir sabit domain (C_L); ağır zincirler antikor sınıfına bağlı olarak bir değişken (V_H) ve 3 veya 4 sabit domain (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4}) içermektedir (25). (Şekil 3)



Şekil 3: İmmunoglobulin yapısı (Kindt ve ark'dan (26) modifiye edilmiştir.)

İmmünoglobulinler menteşe kısımlarından pepsin enzimlerince kesildiğinde iki fragment oluşur. Antijen bağlayan bölgeleri içeren fragmente antijen bağlayan fragment (Fab, 45 kDa), diğer kısma ise kristallenebilme özelliğinden dolayı kristallenebilir fragment (Fc, 55 kDa) denir. Fab kısmının antijen bağlama özelliği varken, Fc kısmının hücre yüzey reseptörlerine ve kompleman proteinlerine bağlanma gibi efektör fonksiyonları vardır (24,25). Fab ve Fc bölgelerinin arasındaki moleküle elastik özelliği kazandıran bölge menteşe bölgesi “hinge region” diye adlandırılır. Menteşe her antikor molekülünün antijen bağlayan iki Fab bölgesinin hareket edebilmesine ve farklı uzaklıklarla birbirinden ayrı duran antijen epitoplarını yakalayabilmesine olanak sağlar (27).

İmmünoglobulin molekülü, proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarından oluşur. Birincil yapı amino asit dizisi, ağır ve hafif zincirin, sabit ve değişken kısmını içerir. İkincil yapı ise uzun polipeptit zincirinin kendi üzerine doğru antiparalel β -tabaka oluşturacak şekilde katlanmasıdır (23). Çalışmalar, immünoglobulin molekülünün karakteristik bir katlanma yaptığını göstermiştir. Bu yapı iki paralel β - tabaka plağın birbiri üzerinde sandviç yapısı oluşturması şeklindedir. β -tabaka plağı amino ve karboksil gruplarının birbirlerine ve komşu alanlara hidrojen bağları ile bağlanmasıyla sabitleşmiştir. β tabakaları hangi özellikteki amino asitlerin dizilimi neredeyse ona göre karakterize edilmiştir. Örneğin; hidrofobik amino asitler iç bölgeye doğru dizilim gösterir, hidrofilik amino asitler ise dış bölgeye doğru dizilim gösterirler (23).

İmmünoglobülinlerin katlanmaları ve kuartener yapısı non kovalent bağlanmalara katkı sağlar. Bağlanmalar ağır ve hafif zincirin birbirinin aynı tipi olan bölgelerle (C_H2/ C_H2) ve birbirinden farklı tipte (V_H/V_L) bölgeler arasında olur. V_H ve V_L zincirleri değişken amino asit zincirleri içerir ve bu bölgeler antijen bağlanma bölgelerini teşkil etmektedir (23).

1.4.2 Antikor Sentezi

B lenfositler antikor moleküllerini sentezleyen tek hücre grubudur. Bir antijenle karşılaştığında B hücresi, antikor üreten plazma hücresine dönüşür (20). Plazma hücreleri saniyede 5000 molekül oranında antikor salgılayabilirler. Çoğu plazma hücresi birkaç gün sonra ölür, bazıları kemik iliğinde aylar veya yıllarca canlı kalabilir ve antikor salgılamaya devam ederek uzun soluklu korumayı sağlarlar (10).

Naif B hücresi antijenle ilk karşılaşma esnasında sadece IgM antikorunu bulunduran progenitör plazma hücresine dönüşümü sağlanır. Bununla birlikte daha sonra ihtiyaç olacak Ig

moleküllerinin klonları IgM antikorundan geliştirilir. Bu değişim, molekülün sabit bölgelerinde meydana gelen izotip dönüşümü ile meydana gelir. Bu olay IgM DNA'sında kodlanan ağır zincirin V bölgesi ile farklı C segmentlerinin farklı kombinasyonlarının sekans oluşturması ile olur. V bölgesini henüz değişime uğramamasından dolayı B hücre klonları aynı antijenik spesifiteye sahip IgG, IgE ve IgA antikorları oluşturur. İmmün sistemde az miktarda bulunan IgD molekülü, izotip dönüşümü prosesi ile oluşmaz. Hafıza ve plazma hücrelerinin her ikisi de yeni izotipler dönüştürme yeteneğine sahip hücrelerdir. (28)

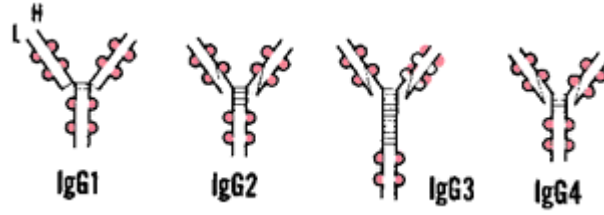
Membrana bağlı antikor moleküllerinin, karboksi terminal ucu hidrofobik α -helikal transmembran bağlayıcı bölge içerir. Bu bölge pozitif yüklü membranla proteinin bağlanmasını sağlar. Salgılanan antikor molekülü kanda ve hücreler arası sıvılarda bulunur ve bu antikorların karboksi terminal bölümleri hidrofiliktir (15).

1.4.3 Antikor Çeşitleri

Memelilerde IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM olmak üzere 5 çeşit antikor bulunmaktadır ve her biri kendi ağır zincirine sahiptir (sırasıyla $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$) IgD molekülleri az miktarda salınırlar ve özellikle antijenler için hücre yüzey reseptörü olarak görev yapar, IgA; tükürük, gözyaşı, süt, solunum ve sindirim yolu salgılarında bulunur. IgE molekülleri dokulardaki mast hücrelerinin ve kandaki bazofillerin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanırlar ve antijenler için pasif reseptörler olarak görev yaparlar (10). IgM; mikro (μ) ağır zincirine sahiptir. Gelişen B hücresinin ürettiği ve primer antikor yanıt sırasında kana salınan ilk antikordur (20). Salgılanan IgM, beş adet 4 zincirli birimden oluşan pentamer yapısındadır. 10 tane antijen bağlanma bölgesi içerir. Her pentamer, J zinciri denen başka bir polipeptit zincirin bir kopyasını içerir. J zinciri IgM salgılayan hücrelerce salgılanır ve iki komşu kuyruk bölgesinin arasında kovalent olarak sokulmuştur (20). Çoklu bağlanma bölgesine sahip bir antijen, pentamerik bir IgM molekülüne bağlandığında, pentamerin yapısı değişir, kompleman sistemini aktive eder. Kompleman aktivasyonu antijene verilen yanıtı artırır; antikor-antijen kompleksine bağlanan aktive olmuş kompleman, antijenin B hücreyi uyarıcı özelliğini binlerce kat artırır (20).

IgG; Kandaki temel Ig sınıfı dört zincirli bir monomer olan IgG'dir. Sekonder antikor yanıtta oldukça fazla miktarda üretilirler. Kompleman aktivasyonunu sağlamalarının yanı sıra, IgG molekülünün kuyruk kısmı, makrofaj ve nötrofillerin özgül reseptörlerine bağlanırlar. Fagositik hücreler bu tip reseptörler aracılığı ile IgG antikorları ile kaplı mikroorganizmaya bağlanır ve parçalarlar. IgG molekülleri kendi içerisinde γ -zincir dizisine göre ayrılıp

serumdaki azalan konsantrasyonlarına göre numaralandırılarak 4 alt gruba ayrılırlar (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (21).



Şekil 4: Ig G alt tipleri <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/immunoglobulin> (29)

IgG1, IgG3 ve IgG4 plasentadan geçer ve gelişen fetüsü korumada önemli role sahiptirler. IgG3 en etkili kompleman aktivatörüyken IgG2 daha az etkilidir. IgG4 ise kompleman yolağını aktive edemez. IgG1 ve IgG3 fagositik hücrelerin yüzeyindeki Fc reseptörlerine yüksek afiniteyle bağlanırlar ve opsonizasyona aracılık ederler. IgG4'ün Fc reseptörleri orta derecede afinitesi bulunurken IgG2'nin çok az afinitesi bulunmaktadır (23).

Tablo 1: IgG alt grupları özellikleri

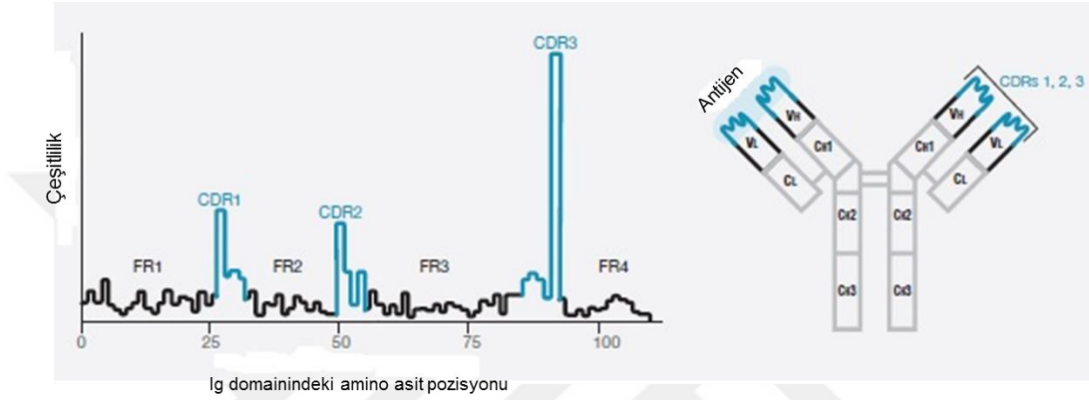
IgG alt grupları / Özellik	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Ağır zincir bileşeni	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$
Normal serum kons (mg/ml)	9	3	1	0,5
Klasik kompleman yolağı aktivasyonu	+	+/-	++	-
Plasentadan geçiş	+	+/-	+	+
Fagositlerin Fc reseptörlerine bağlanması	++	+/-	++	+

++ = yüksek; + = ortalama ; +/- = çok az ; - = yok

1.4.4 Antijen – Antikor Kompleksi

Antikorum hafif ve ağır zincirlerinin N-terminal uçları antijen-bağlanma bölgesi oluşturmak için bir araya gelir. Aminoasit sekanslarının çeşitliliği antijen bağlanma bölgelerinin yapısal çeşitliliğini sağlar ve V bölgesini oluşturur (10). Ağır ve hafif zincirlerin her bir değişken bölgesi üçer tane çok değişken bölge veya tamamlayıcılığı belirleyen

bölgeler (Complementarity Determining Region - CDR) taşır. Bu üçlülerin en değişkeni V ve C bölgelerinin birleşiminde bulunan CDR3 bölgesidir. CDR3, immünglobülin molekülünün antijen bağlanmasına en çok katılan bölümüdür (20,30,31). Protein sekans karşılaştırmaları CDR3'ün V kısmının karboksi terminal kısmı, bunu izleyen 3 aminoasitlik kısa bir 'farklılık' kısmı ve yaklaşık 13-15 aminoasit uzunluğunda daha uzun bir 'birleştirici' kısımdan oluştuğunu gösterir. Hafif zincirin kendi CDR3'ü için benzer bir düzenlemesi vardır. Antijen bağlama, ağır ve hafif zincir polipeptit zincirlerinin Ig katlanma modelinin bir fonksiyonudur. Sonuç, özgün bir antijen-antikor etkileşimidir (32).



Şekil 5: Immünglobülin CDR bölgeleri (Mak ve ark'dan (33) modifiye edilmiştir.)

Çoğu antijen kompleks yapıdadır ve çok sayıda antijenik determinant (epitop) içerir. Antijenlerde iki sınıf epitop vardır. Dizisel epitoplar kısa aminoasit dizileridir (10-18cm uzunluğunda). Solüsyonda serbest halde veya bir proteine bağlı haldeyken antikorlar tarafından tanınırlar. Konformasyonel epitoplar ise antijenik peptidin üç boyutlu yapısı sonucu oluşur. Konformasyonel epitoplar, bağlanacakları bölgedeki aminoasitlerin belirli bir sırada olmasına gerek duymazlar. Antijenlerin denatürasyonu, bu tip epitopların yapılarının bozulmasına sebep olmaktadır (34). İmmün sistem antijen üzerindeki farklı epitoplara özgü antikor üretir. Bu yanıt çok çeşitli B hücre klonu ve stoğu gerektirmektedir. Sonuçta antijen ve antikor molekülleri non- kovalent bağlarla etkileşirler (34). Bu epitoplara birkaç farklı HLA antijeni sahip olabilir ve çapraz reaksiyon veren antijenik epitop gruplarını (Cross reactive epitope groups-CREG) oluşturur. Yani HLA antijenlerine karşı gelişen antikorlar farklı antijenlerin aynı epitoplarına karşı oluşabilir. HLA antijenlerine sensitize olan hastalarda bulunan antikorlar sadece tek bir antijen için değil başka antijenlere karşı da gelişmiş olabilir (5).

Hastalarda var olan güçlü antikorlar hasta yüksek oranda sensitize olduğu durumda inhibe olabilir veya varlıkları maskelenebilir. Bu olaya prozon etkisi denmektedir. Prozon

etkisini gidermek için serumları belli oranlarda seyreltme yoluna gidilir. Seyreltilen serumda maskelenmiş HLA antikorları ortaya çıkar. Seyreltilmemiş yüksek oranda sensitize serumların sonuçlarına bu antikorların kuvvetinin tamamen yanlış yorumlanmasına neden olduğu söylenebilir (35).

1.4.5 Anti-HLA Antikorları

Bu ifade HLA'ya özgü oluşan antikorları ifade etmektedir. Panel reaktif antikor (PRA) ifadesi genel olarak bir bireyde oluşan tüm anti-HLA antikorlardan bahsedilirken kullanılmaktadır. HLA'ya karşı antikor oluşumu alloimmünizasyon olarak kabul edilmektedir (36). Anti-HLA antijenlerine duyarlılaşmayı sağlayan risk faktörleri arasında kan transfüzyonu, gebelik ve daha önceki transplantasyon bulunur. Duyarlılığın derecesi nakil uygulanabilirliğini ve böbrek transplantasyon başarısını etkiler (37). 1969 yılında Patel ve Terasaki, hasta serumlarındaki vericiye spesifik antikor (Donör spesifik antibody-DSA) varlığının transplantasyondaki hiper akut rejeksiyon ve primer nonfonksiyonunu yüksek oranda etkilediğini ilk defa göstermiştir (38). Alıcıların yüksek anti-HLA değeri yükseldikçe uygun böbrek nakli şansı azalır ve bekleme listesinde bekleme süresi uzar. (37).

Allogreft rejeksiyonundan sorumlu güçlü ve hızlı immün yanıtın en önemli sebeplerinden birisi, HLA antijenlerine spesifik anti-HLA antikorların varlığından kaynaklanmaktadır. Transplantasyon da uzun dönemde de vericinin HLA antijenlerine karşı alıcıda immün cevap oluşması söz konusudur (15).

Lökosit antijenlerine karşı antikor oluşumu alloimmünizasyon olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, verici HLA antijenlerinden başka lökosit veya trombosit spesifik antijenlere karşı da antikorların varlığı söz konusudur (36). Anti-HLA antijenlerine duyarlılaşmayı sağlayan risk faktörleri arasında kan transfüzyonu, gebelik ve daha önceki transplantasyon bulunur (37).

1.4.5.1 Gebelik

Anne ve embriyo arasındaki ilişkinin başlaması, genetik olarak farklı iki bireyin aynı anda var olması durumundan kaynaklanan problemi yaratır. Bu, gebelik boyunca annenin immün sisteminin, fetüsteki paternal alloantijenleri tolere etmesi anlamına gelmektedir. Bu açıdan, gebelik benzersiz bir immünolojik meydan okumadır ve doku veya organ nakilleri ile karşılaştırılabilir. Genetik anlamda farklı bireylerden transplante edilen hiçbir doku immün

yanıttan kaçamaz. (38). Gebelikte, HLA spesifik antikorlar üretilebilir. Bu antikor üretimi gebeliklerde, fetusla exprese edilen paternal HLA antijenlerine cevapla yapılır. Bu cevap HLA'ya spesifik antikorların oluşmasına sebep olur (39).

1.4.5.2 Kan Transfüzyonu

Anti-HLA antikor oluşumu tetikleyen risklerden kan transfüzyonlarıdır. Oluşan antikorlar IgG ve IgM sınıfındadır (40). Farklı donörlerden tekrarlayan şekilde verilen kan ürünlerindeki lökositlere alıcının maruz kalması sonucunda alıcıda birçok HLA sınıf I antijenine karşı farklı antikorlar gelişmektedir. Hücresel kan ürünlerindeki lökositler nedeniyle alloimmünizasyon geliştiği kabul edilmektedir (36).

KBY ve anemi arasındaki ilişki 1986'da son dönem böbrek yetmezliği anemisini düzeltmede eritropoetin etkili olduğu gösterilmiştir. Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda böbrekte eritropoetin üretimi veya regülasyonundan sorumlu hücrelerin hasara uğramasıyla anemi meydana gelir. Aneminin derecesi KBY'nin ağırlığıyla paralellik gösterir. Organizmada önemli bir eritropoetin deposu yoktur. Başlıca eritropoetin üretim yeri böbreklerdir. Böbrek yetmezliği anemisinde hormon tedavisinin yetersiz kaldığı durumlarda kan transfüzyonu yapılmak durumunda kalınabilir (41).

1.4.5.3 Transplantasyon

Son dönem böbrek yetmezliği varılan en son nokta olarak kabul edilir ve varılan bu noktada hastanın hayatını devam ettirebilmek için renal replasman tedavilerinden (RRT) yani hemodiyaliz, periton diyalizi veya transplantasyondan birinin kullanılması zorunlu hale gelmiştir (42). Sadece böbrek transplantasyonu KBY'nin kesin tedavi şeklidir. Ancak transplantasyonda da alıcıda vericinin uyumsuz HLA antijenlerine karşı anti-HLA antikorları gelişebilmektedir (43). Yabancı HLA antijenlerinin varlığı alıcıdaki yardımcı T hücrelerinin aktive edebilir, daha sonra bu hücreler B hücrelerini alloantikör oluşturan plazma hücrelerine dönüştürebilir (15).

1.5 Kompleman Sistemi

Karaciğer hepatositlerinden sentezlenen kompleman sistem elemanları, proteinler ve glikoproteinlerden oluşur (44). Kompleman hem doğal hem de adaptif immünite de etkin bir unsur olarak önemli rol oynar (45). Kompleman proteinleri kompleman sistemi sayesinde aktive olan immün kompleks fagositik hücrelerin aktivasyonuna destek sağlar. Aktivasyon işleminden dolayı bu moleküller ve fragmentleri hücrel immün yanıtlanabilirlik düzenlemesi açısından önemlidir (46).

Kompleman sistemi, immünolojik opsonizasyon, lizis ve istenmeyen hücreleri vücuttan temizlenmesini hızlandırmak üzere tasarlanmış moleküllerin geniş bir ağını kapsar. IgG1 ve IgG3, komplemana bağlanabilen ve tespit olabilen ve IgG antikor alttürleri olarak bilinir ve antikor bağlı hedef hücrenin lizis ve ortadan kaldırılmasına yönlendirerek kompleman kaskadını başlatır (35).

Komplemanın özgün proteinleri C1, C2, C3 şeklinde isimlendirilir. Kompleman proteinleri çoğu kez antijen antikor kompleksleriyle etkileşimler sonucu aktive edilir, fakat spesifik antikorların yokluğunda doğal mekanizmalarla da aktive edilebilirler. Kompleman proteinleri ardışık olarak reaksiyona girerek, bakteriyel hücrelerin lizisine neden olabilir veya fagositler tarafından tanınmayı arttırmak için antijen-sunucu hücreleri işaretleyerek, antijenlerin yıkımının hızlanmasına yol açabilir (45). Kompleman sisteminin aktivasyonu sonucu mikroorganizmaların hücre membranında polimerik bir protein kompleksi oluşur. Bu yapı, hücre içine su ve iyon giriş çıkışını sağlayacak bir deliğin oluşumuna neden olur ve böylece mikroorganizmaların yıkımı gerçekleşir (32).

Antijenlere bağlanan antikor izotipleri tarafından başlatılan klasik yolak, antikor yokluğunda mikroplar tarafından başlatılan alternatif ve lektin yolakları olmak üzere üç ana kompleman yolağı vardır.

C3 kompleman proteini plazmada en bol kompleman proteindir ve her üç yolakta da rol oynar. Bu üç yol izi de C3 bileşeninin parçalanmasına ve C3a ve C3b parçalarının oluşmasına yol açar. C3a histamin gibi inflamatuvar bileşenlerin aktivasyonuna ve salınmasına sebep olur. C3b kompleman kaskadının ek üyelerini aktive eder. C5b membran atak kompleksinin (Membran Attack Complex - MAC) oluşumunu başlatır. MAC, hücre lizisini aktive eden, por oluşturan lipofilik komplekstir. Hücre membranında porlar açar ve hücre ölümüne sebep olur (20).

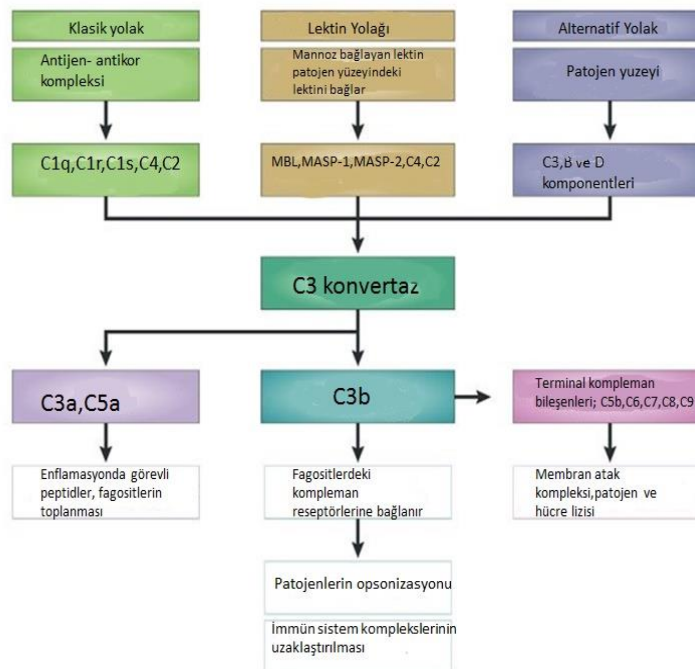
Alternatif yolak, C3' ün yıkım ürünü olan C3b' nin birikmesi ile başlar. MAC'ı aktive etmek için klasik kompleman yolu bileşenlerinden bazılarını kullanan, kompleman aktivasyonunun spesifik olmayan bir yöntemidir (45).

Lektin yolu, mannozu bağlayan lektin şeklinde tanımlanan bir plazma proteininin, mikroorganizmaların yüzey glikoproteinlerinin terminal mannoz bölgesine bağlanmasının ardından kompleman sistemi harekete geçer (32).

Klasik kompleman yolunun aktivasyonunda, antikorun asıl görevi olan, istilacı hücreleri tanımak ve saldırı için kompleman sistemini aktive etmektir. Komplemanın klasik aktivasyonu sadece IgG ve IgM sınıfı antikorlarla oluşur. Hücre yüzeylerinde, IgG ve IgM antikorları antijeni bağladığında antikorlar mevcut kompleman proteinlerini bağlar. Kompleman proteinleri kademeli bir şekilde ard arda reaksiyona girer. Antijen antikoru bağlar, C1 bileşenlerinin (C1q, C1r, C1s) antijen-antikor kompleksine bağlanması, bitişik membran bölgesinde C4-C2 bağlanmasına; C3'ün bağlanmasına ve aktivasyonuna yol açar (44).

Membrana bağlı C3 ikinci bir membran bölgesinde C5-C6-C7 kompleksinin oluşumunu katalizler; C8-C9'un kompleksle bir araya gelmesi membranda hasar ve hücrenin erimesine yol açar. C5-9 bileşenleri MAC olarak bilinir. Por oluşturmak için tek bir membranda etkileşirler (Şekil6)

Bununla birlikte antikor gelişimine sahip olan her hastada klasik yolak aktive olmaz. Antikor aracılı hasar oluşmaz, böbrek transplantasyon açısından bakacak olursak graft rejeksiyonu gerçekleşmez. Bu olayda, IgG sınıfı antikorların kompleman bağlayabilme yeteneğinin neden olduğu zararlı etki önem arz eder (44).



Şekil 6: Kompleman sistemin 3 yolağı (Lolis ve ark. 2003'ten modifiye edilmiştir.) (47)

C1q klasik kompleman yolağını başlatan temel kompleman proteini'dir. Son yıllarda anti-HLA antikorların immunolojik kapasitesini değerlendirmek amacıyla transplantasyon laboratuvarlarında C1q test uygulanmaya başlamıştır. KBY hastalarında C1q pozitif olan DSA ve graft kaybı arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bu sonuçlar de novo C1q DSA geliştiren hastalarda C1q DSA negatif olan hastalara nazaran glomerülopati gelişmesinin daha sık olduğunu ancak graft kaybının artması ile bir ilişki olmadığı yapılan son çalışmalarla doğrulanmıştır (3). Sutherland ve arkadaşları denovo C1q pozitif DSA hastalarda C4d birikmesi, graft kaybı görülmesinin C1q negatif hastalara nazaran daha yüksek olasılık olduğunu göstermiştir (48).

Crespo ve arkadaşları da sınıf I DSA'ların in vitroda C1q bağlamasa da antikor aracılı rejeksiyon başlamasıyla ilişkili olduğunu ve graft kaybına yol açtığını göstermiştir (45). Araştırmacılar kompleman bağlama yeteneğinin kliniksel açıdan önemli olduğunu vurgulamışlar (4).

1.6 Panel Reaktif Antikor Belirleme Yöntemleri

Günümüzde hem solid organ hem de kök hücre nakillerinden önce anti-HLA antikorlarını belirlemede pek çok yöntem kullanılmaktadır. Daha da önemlisi son gelişmelerle antikor belirlenmesi ve tanımlanması çok daha kolaylaşmıştır. Bu teknikler sayesinde daha detaylı bir antikor taraması yapılarak potansiyel immünolojik risk azaltılabilmektedir

Hastada vericinin HLA antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar nakledilen organın reddine sebep olacaktır. Bunu önlemek için yapılan PRA taraması, nakil listesindeki hastalarda, rastgele bir antijen paneline karşı antikorların varlığını belirlemek için yapılır. Bu antikorlar serumda sınıf I ve sınıf II HLA antijenlerine karşı oluşturulanlardır (32,49). PRA yüksek olan kişilerin düşük olanlara göre nakil başarısının daha az olduğu belirtilmektedir (49). Yüzde PRA oranı kişiye göre zaman zaman antikor titresi değişimine ve yöntemde kullanılan HLA antijenlerine göre farklılık gösterebilir (37). PRA tarama test sonucu pozitif olan hastalara anti-HLA antikorların spesifitesini saptamak için PRA tanımlama testleri yapılmaktadır. PRA tanımlama testlerinde hücre panelinin kompozisyonu önemlidir. Panel popülasyonda bulunan HLA allelerini ve frekansını içermelidir (50). Bazı KBY hastalarında ise PRA tarama test sonucu %80 veya daha üzerinde pozitif olabilir. Bu hastalar için yüksek

oranda sensize (YOS) ifadesi kullanılmaktadır. Bu hastaların anti-HLA antikor içeriğini anlamak için tek HLA antijeni ile kaplı boncuklar kullanılmaktadır. Bu sebeple de test sistemi tek antijen kaplı boncuk (Single antigen bead-SAB) olarak adlandırılır.

Son 15 yılı aşkındır, DSA testleri “altın standart” olarak adlandırılan CDC-PRA antikor analizinden sonra canlı hücre kullanımı gerektirmeyen fakat solid faz matrislere tutturulmuş çözünmüş HLA antijenlerinin kullanıldığı solid-faz analizleri geliştirilmiştir. Yeni immünolojik araştırmalar ve son klinik dataların birleşimi ile bu analizlerin artmış duyarlılık ve spesifitesi pretransplant böbrek alıcılarında DSA etkisinin daha incelikli yorumlanmasına olanak sağlar (35).

PRA testleri farklı yöntemlerle çalışılmaktadır. Laboratuvarlarda boncuk sistemine dayalı PRA testleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu testlerde kullanılan boncuklar anti-HLA antijenleri ile kaplıdır. Bu sayede serum ile inkübe edildiklerinde serumdaki antikorlar boncuk üzerindeki spesifik olduğu antijene bağlanır ve fluoresan ışımaya verir. Bu fluoresanın yoğunluğu ölçülerek sonuç alınır. Luminex PRA, flow sitometrik PRA gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır ancak hepsi prensipte aynıdır (51).

1.6.1 Mikrolenfositotoksisite Yöntemi (Complement Dependent Cytotoxicity – CDC)

Komplemana bağımlı sitotoksisite (CDC) yöntemi, anti-HLA antikor taramasında kullanılan yöntemlerin en eski ve en temel testtir. CDC-PRA tekniği sınıf I HLA antikorları için canlı T hücre ve sınıf II HLA antikorların tespiti için canlı B hücre izolasyonuna dayanır. Bu yöntemde canlı hücre izolasyonu için periferik kan kullanılır. Periferik kanda B hücre oranı daha az olduğu için Sınıf II antikor tanımlanması sınıf I antikor tanımlanması yanında da daha zordur.

Bu test sadece komplemana bağlanan antikorları tespit eder. CDC-PRA’da test serumu, HLA tipi bilinen hücrelerle inkübe edilir, kompleman olarak tavşan serumu eklenir. Hücre ölümünün derecesini belirlemek için de boya kullanılır. Duyarlılığını arttırmak için bu testte farklı değişiklikler yapılmıştır. CDC-PRA metodu her ne kadar nispeten zaman alıcı ve az duyarlı bir yöntem olsa da dithiothreitol (DTT) kullanılarak IgM ve IgG antikor izotiplerini birbirinden ayırmada kolaylık sağlaması bakımından klinik açıdan önemli sonuçlar elde edilir (52).

1.6.2 Flow Sitometri Yöntemi

Flow sitometrik yöntemde saflaştırılmış HLA partikülleri mikroboncuklara tutundurulurlar. Oldukça duyarlıdır ve en önemlisi de hücre kalitesine bağlı değildir (53).

1.6.3 xMAP Teknolojisi

xMAP Teknolojisi 5,6 µm polistren mikroboncuklara dayalı analiz yöntemidir. Bu mikroboncukların içi farklı iki florokromla boyalıdır. Bu florokromların her birinden hassas miktarda kullanılarak, spesifik 100 farklı boncuk seti oluşturulmuştur. Her boncuk seti yüzeyinde farklı bir HLA antijeni taşır. Boncuk setleri boyandıkları florokromların yaydığı ışıklara göre ayrıldığı için, tek bir reaksiyon kuyusunda 100 farklı analiti ölçebilir. Mikroboncuklar, hızla akan bir sıvı halinde tek tek geçer ve xMAP teknolojisini kullanan analiz cihazındaki iki farklı lazer tarafından tanınır. Cihazdan çıkan kırmızı lazer mikroboncuktaki iki florokromu uyarır. Diğer yeşil lazeri ise mikroboncuğun yüzeyine tutunmuş olan okuyucu florokromu uyarır. Dijital sinyal toplanır, mikroboncuğa dayalı olarak sınıflandırma yapılır ve yüzeydeki reaksiyon ölçülür (45,54). xMap teknolojisi ile antikor testinde üç tipte boncuk grubuyla farklı seviyelerde antikor tanımlaması yapılır.

1.6.3.1 xMAP Teknolojisi ile PRA Tarama

Boncuklar pozitif ve negatif sonuç verecek şekilde sınıf I veya sınıf II molekülleri ile kaplıdır. Birden fazla ve farklı etnik kökenden gelen bir donör havuzundan elde edilen HLA antijenleri polistren boncuklar üzerine tutturulurlar. Sınıf I HLA taramasında kullanılan bir boncuk üzerinde, birden fazla HLA-A, HLA-B ve HLA-C antijenleri bulunabilir. Aynı durum Sınıf II boncukları için de geçerlidir (45,54).

1.6.3.2 xMAP Teknolojisi ile PRA Tanımlama

Her bir boncuk üzerinde sadece tek bir vericiye ait HLA antijenleri bulunmaktadır. Sınıf I ve Sınıf II anti-HLA antikor tanımlaması için, taramadan farklı olarak iki ayrı boncuk karışımı pozitif ve negatif kontrol serumu vardır (54).

1.6.3.3 xMAP Teknolojisi ile Tek Antijen Boncuk Testi

Tek antijenli boncuk (Single Antigen Bead- SAB) testinde kullanılan boncukların üzerinde sadece tek antijen bulunmaktadır. Özellikle yüksek PRA' ya sahip serumlardaki antikor spesifikliği belirlenebilmektedir (55,56).

Hastada ilk olarak PRA taraması yapılarak serumunda anti-HLA antikorunun varlığına bakılır. PRA pozitif bulunan seruma PRA tanımlama testi yapılarak hangi HLA antijenine özgü antikor geliştiği saptanabilir. Birçok HLA' ya karşı oluşmuş antikorlara sahip hastalar yüksek oranda sensitize şeklinde tanımlanır (PRA>%85). Bu hastaların serumlarında sensitize olmadıkları antijenleri saptamak için SAB testi yapılır (51).



GEREÇ VE YÖNTEM

1.7 Çalışma Grubu

2014-2015 yılları arasında Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'na panel reaktif antikor taraması için gönderilen KBY hastalarının serumları çalışmamıza dahil edilmiştir. Rutin PRA tarama ve tanımlama testleri yapılan serumlardan 16'sı erkek, 36'sı kadın hastaya ait olmak üzere 52 tanesi çalışmaya dahil edildi. Tanımlama sonucuna göre yüksek oranda sensitize olduğu görülen 8 seruma ise tek antijenli boncuk (Single antigen bead-SAB) testi yapıldı.

CDC-PRA testinde kullanılan canlı hücreler ise yine TEAH Doku Tipleme Laboratuvarına doku tipleme talebi ile başvuran KBY verici aday (KBYDA) veya kemik iliği verici adaylarından (KİTDA) elde edildi. Vericilerden 14'ü kadın, 18'i erkek olmak üzere 32 kişi çalışmaya dahildi.

1.8 Plakların Haritalarının Oluşturulması

1 µl parafin eklenmiş 72 kuyulu Terasaki plaklarına Serumlar 1 , ½ ve ¼ olmak üzere PBS ile seyreltilecek şekilde her seruma ait 3 kuyu halinde, 15'er adet olmak üzere plaklar hazırlandı. Pozitif kontrol serum 1,½ ve ¼ olacak şekilde PBS ile seyreltilerek iki kuyuya (IgG, One Lambda, Hannover, Almanya) , negatif kontrol serum (NS, One Lambda, Hannover, Almanya) ise 1 kuyuya eklendi. Her bir plağa o plağa özgü isim verildi.

Anti-HLA B27 ve/veya CREG' ini bulduran 9 serumdan oluşan plaklar B27, transplantasyon öyküsü bulunan 11 hastadan elde edilmiş serumlardan oluşan plaklar Tx, gebelerin belli trimestrda alınmış olan serumları 11 adet olmak üzere Geb, PRA tanımlama sonucu elde edilmiş 11 hasta serumu MixA ve anti-HLA sınıf I veya anti-HLA sınıf II antikorları açısından yüksek oranda sentitize olan 10 hastadan oluşan son plak ise MixB olarak isimlendirilmiştir. Plaklar hazırlandıktan sonra -20°C dolapta test zamanına kadar saklandı.

1.9 Hücre İzolasyonu

Doku tipleme laboratuvarına gelen KBYDA ve KİTDA'larından heparinli kanlar alınarak eşit miktarda fosfat tamponlu tuz solüsyonu ile dilüe edildi. Dilüe edilen kan fikol (lymphocyte separated median, LONZA) üzerine yüklendikten sonra 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek oluşan polimorfonükleer hücre tabakası toplandı. Toplanan çoğunluğunu lenfositlerin oluşturduğu hücre tabakası PBS ile 1800, 1500 ve 1200 rpm olacak şekilde üç kez yıkandı. İzolasyon sonucu elde edilen lenfositler 2.10^6 hücre/ml' ye ayarlandı ve Terasaki plaklarında hasta ve kontrol serumu bulunan kuyulara 1er μ l hücre eklendi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 5 μ l kompleman (Rabbit Komplement, İnnotrain, Kronberg, Almanya) tüm kuyulara eklendi ve 1 saat inkübasyonu takiben boya (Fluoroquench, One Lambda, Hannover, Almanya) ilave edilerek sonuçlar florasan mikroskopunda değerlendirildi.

1.10 Plakların Değerlendirilmesi

Düzenlenmiş plak şeması takip edilerek önce pozitif ve negatif kontroller değerlendirildi. Ardından hasta kuyuları dilüe edilmemiş serum, $\frac{1}{2}$ serum ve $\frac{1}{4}$ serum olacak şekilde sırasıyla izlenerek hücrelerin boyayı alma yoğunluklarına göre 1-2-4-6-8 olmak üzere skorlandı. Kuyuların skorlanması tablodaki gibi yapıldı.

Tablo 2: Mikrolenfositotoksisite yöntemi skor grafiği

Boyanmış hücre oranı	CDC-PRA Skor
%0	1
%25	2
%50	4
%75	6
%100	8

BULGULAR

Çalışmamızda 2014-2015 yılları arasında Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarına PRA taraması istemiyle başvuran KBY hastalarının serumları kullanılmıştır. Çalışmaya HLA sınıf I antijen pozitif 20 serum, HLA sınıf II antijen pozitif 12 serum ve HLA sınıf I ve II antijen pozitif 20 serum olmak üzere toplam 52 serum dahil edilmiştir. Anti-HLA antikor pozitifliklerinin hangi sınıf HLA antijenine karşı olduğu PRA tanımlama ve/veya tek HLA antijen boncuk testleri yapılarak tespit edilmiştir. HLA sınıf pozitifliğine göre 21 seruma sınıf I tanımlama, 8 seruma sınıf II tanımlama, 13 seruma hem sınıf I hem sınıf II testi yapılmıştır. Testin değerlendirme kapsamındaki tüm HLA antijenleri ile reaksiyon veren serumlar yüksek oranda sensitize (YOS) olarak adlandırılmıştır. YOS olarak belirlenen 8 serum tek antijenli boncuk yöntemi kullanılarak tek bir HLA antijenine karşı olan reaksiyonu saptanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan serumların Luminex PRA tarama sonuçları, Luminex PRA tanımlama yapılmış olan serumların antikor çeşitleri ve MFI değerleri tablo 3' de verilmiştir. Antijen-Antikor ilişkisi belirlenen serumlar terasaki plaklarına döküldü ve HLA dokusu bilinen canlı lenfosit hücreleriyle CDC-PRA testi yapıldı. Çalışmamızda kullanılan serumlar tablo 5'de gösterilen plak düzenlemesiyle hazırlandı. Tablo 3' de belirtilen serumların demografik özellikleri de Tablo 4'de verildi.

Tablo 3: Serumların Luminex PRA tarama-tanımlama sonuçları, antikor tipleri ve MFI değerleri

Serum	HLA Sınıf I	HLA Sınıf II	Sınıf I antikor	MFI	Sınıf II antikor	MFI
B27-1	POZİTİF	NEGATİF	B27	2288	-	
			B37	6992	-	
			B47	2735	-	
B27-2	POZİTİF	NEGATİF	B27	3008	-	
B27-3	POZİTİF	NEGATİF	A25, A24, A23, B27		-	
B27-4	POZİTİF	NEGATİF	B7	8884	-	
B27-5	POZİTİF	NEGATİF	A11, A25, A26, B27		-	
B27-6	POZİTİF	NEGATİF	B27	1320	-	
B27-7	POZİTİF	NEGATİF	A3,B7,B27		-	
B27-8	POZİTİF	NEGATİF	A33, A25, A26,B27		-	
B27-9	POZİTİF	NEGATİF	B27	2350	-	
Tx-1	POZİTİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-2	NEGATİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-3	NEGATİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-4	POZİTİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-5	NEGATİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-6	POZİTİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-7	POZİTİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-8	POZİTİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-9	NEGATİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-10	POZİTİF	POZİTİF	-	-	-	-
Tx-11	POZİTİF	POZİTİF	-	-	-	-
Geb-1	NEGATİF	POZİTİF	-		DQ4	822
Geb-2	NEGATİF	POZİTİF	-		DQ8	4421
					DQ2	3993
Geb-3	NEGATİF	POZİTİF	-		DQ8	3290
					DQ7	748
Geb-4	NEGATİF	POZİTİF	-		DQ5	1000
					DQ7	964
Geb-5	POZİTİF	POZİTİF	A11	3182	DR4	7269
Geb-6	NEGATİF	POZİTİF	-		DR11	4389
					DR13	4670
					DR7	3263
					DQ2	4138

Tablo 3'e devam:

Tarama				Tanımlama			
SERUM	HLA Sınıf I	HLA Sınıf II	Sınıf I antikor	MFI	Sınıf II antikor	MFI	
Geb-7	POZİTİF	POZİTİF	A2	10313	-	-	
Geb-8	POZİTİF	POZİTİF	B18	5346	DR13	5035	
					DR52	3795	
					DQ6	1766	
Geb-9	POZİTİF	POZİTİF	A2	3748	DR4	10645	
			A3	2857	DQ8	6172	
Geb-10	NEGATİF	POZİTİF	-		DR7	11528	
					DR9	4144	
					DQ2	8322	
					DQ9	3996	
Geb-11	POZİTİF	POZİTİF	A23	2303	DR15	13600	
			A24	1500	DQ6	11649	
					DR1	7520	
					DQ5	6977	
MixA-1	POZİTİF	NEGATİF	A23	5591	-	-	
MixA-2	POZİTİF	POZİTİF	A2	1567	DR1	1799	
			B7	1709	DR11	1031	
					DR9	1722	
MixA-3	POZİTİF	POZİTİF	A30	3081	DR4	1557	
			A2	2666	-	-	
					-	-	
MixA-4	POZİTİF	POZİTİF	B63	1047	DQ5	3215	
					DQ6	1175	
MixA-5	POZİTİF	POZİTİF	A24	14204	DR11	4007	
			A23	16035	DQ9	9427	
MixA-6	POZİTİF	POZİTİF	A31	1445	DR1	6317	
			A33	1110	DR9	6989	
			A45	1321	DR10	4687	
MixA-7	POZİTİF	POZİTİF	A2	13053	DR1	2260	
					DQ6	8731	
					DQ5	2858	
MixA-8	POZİTİF	NEGATİF	A3	3624	-	-	
MixA-9	POZİTİF	NEGATİF	B13	1454	-	-	
MixA-10	POZİTİF	NEGATİF	A23	4191	-	-	
MixA11	POZİTİF	NEGATİF	B7	9782	-	-	
MixB-1	POZİTİF	NEGATİF	YOS	-	-	-	
MixB-2	POZİTİF	POZİTİF	YOS	-	YOS	-	
MixB-3	POZİTİF	NEGATİF	YOS	-	-	-	
MixB-4	POZİTİF	NEGATİF	YOS	-	-	-	
MixB-5	NEGATİF	POZİTİF	-	-	YOS	-	
MixB-6	POZİTİF	POZİTİF	YOS	-	YOS	-	
MixB-7	POZİTİF	NEGATİF	YOS	-	-	-	
MixB-8	POZİTİF	POZİTİF	YOS	-	YOS	-	
MixB-9	POZİTİF	NEGATİF	YOS	-	-	-	
MixB-10	NEGATİF	POZİTİF	-	-	YOS	-	

Tablo 4: Plaklarda kullanılan serumların demografik verileri ve alloimmünizasyon bilgileri

Serum No	Cinsiyet	Yaş	Kan Grubu	Kan Transfüzyonu var/yok	Alloimmünizasyon	
					Gebelik sayısı	Transplantasyon var/yok
B27-1	E	1956	ARh+	-	-	-
B27-2	E	1956	ORh+	-	-	-
B27-3	E	1957	ARh+	-	-	-
B27-4	K	1952	ARh+	+	2	-
B27-5	K	1984	ARh+	+	1	-
B27-6	E	1979	ARh+	-	-	-
B27-7	E	1961	ARh+	-	-	-
B27-8	E	1967	ABRh+	+	-	+
B27-9	K	1952	ABRh+	+	5	-
Tx-1	K	1960	ARh+	-	2	+
Tx-2	K	1975	ARh+	+	1	+
Tx-3	K	1970	ARh+	+	-	+
Tx-4	K	1976	ARh+	+	1	+
Tx-5	K	1986	ORh+	+	-	+
Tx-6	K	1978	ARh+	-	1	+
Tx-7	K	1989	ORh+	+	-	+
Tx-8	K	1966	ARh+	+	2	+
Tx-9	K	1997	ORh-	-	-	+
Tx-10	E	1969	ARh+	+	-	+
Tx-11	E	1971	BRh+	+	-	+
Geb-1	K	1991	BRh+	-	1	-
Geb-2	K	1987	ARh+	-	1	-
Geb-3	K	1989	ORh+	-	1	-
Geb-4	K	1985	BRh+	-	1	-

Tablo 4' e devam:

Serum No	Cinsiyet	Yaş	Kan Grubu	Alloimmünizasyon		
				Kan Transfüzyonu var/yok	Gebelik sayısı	Transplantasyon var/yok
Geb-5	K	1986	ARh+	-	1	-
Geb-6	K	1978	ARh+	-	3	-
Geb-7	K	1972	ORh+	-	1	-
Geb-8	K	1989	ABRh+	-	1	-
Geb-9	K	1987	ORh+	-	1	-
Geb-10	K	1985	ABRh+	-	1	-
Geb-11	K	1985	ABRh+	-	1	-
MixA-1	E	2001	ARh+	+	-	-
MixA-2	E	1970	ARh+	+	-	-
MixA-3	K	1968	ARh+	+	-	-
MixA-4	E	1977	ARh+	+	-	+
MixA-5	E	1972	ARh+	-	-	+
MixA-6	K	1958	ABRh+	+	3	-
MixA-7	K	1956	ARh+	+	4	-
MixA-8	K	1952	ARh+	-	4	-
MixA-9	K	1966	ARh-	+	2	-
MixA-10	K	1963	ABRh+	+	2	-
MixA-11	K	1981	ARh+	-	-	-
MixB-1	K	1953	ARh+	+	4	-
MixB-2	K	1977	ARh+	-	2	-
MixB-3	E	1982	ORh+	+	-	+
MixB-4	K	1957	ORh+	+	3	-
MixB-5	K	1953	BRh+	-	3	-
MixB-6	K	1965	ARh+	+	3	+
MixB-7	E	1964	BRh+	+	-	+
MixB-8	K	1970	ABRh-	+	1	+
MixB-9	K	1982	ORh+	+	1	+
MixB-10	E	1960	ARh+	+	-	+

Plakların adlandırılması kullanılan serumdaki antikorların HLA antijen sınıfına göre yapıldı. B27: plak anti-B27 antikoruna sahip serumları içerir, Tx: plak böbrek nakli olmuş kişilerden alınmış serumları içerir, Geb: Serumlar birçok gebeliği olmuş kişilerden alınanlar,

Mix-A: sınıf I ve II antijenleri pozitif olan serumlar, YOS: serumlar en az %90 ve üzeri tüm HLA antijenleriyle reaktif antikor içerir (Tablo 5).

Tablo 5: İçerdikleri farklı anti-HLA antikorlarına göre guruplandırılan serumların döküldüğü plaklar ve antijen kaynağı olarak kullanılan farklı canlı lenfosit hücre sayıları.

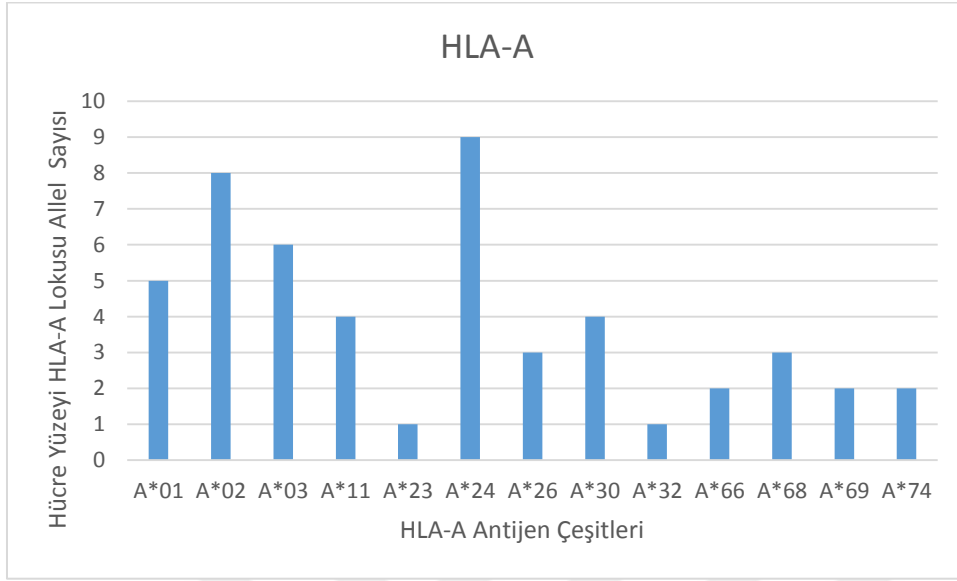
Hazırlanan Plak Adı	Plakta Kullanılan Serumların özellikleri	Plaklar İçin Kullanılan Serum Sayısı	HLA Dokusu Bilinen Hücre Sayısı
B27	Anti-HLA B27 antikoru saptanmış serumlar	9	25
Tx	Transplantasyon öyküsü bulunan serumlar	11	25
Geb	Gebelik öyküsü bulunan serumlar	11	25
Mix-A	Anti-HLA Sınıf I / II pozitif serumlar	11	25
Mix-B	Yüksek oranda sensitize serumlar	10	25
Toplam		52	25

Antijen Antikor reaksiyon özgüllüğünü belirlemek için anti HLA antikorları içeren serumların reaksiyona tabi tutulduğu hücrelerin sınıf I ve II HLA antijen dağılımları Tablo 6'da verilmiştir. Her bir HLA lokusu için en yaygın reaksiyon veren allellerin dağılımı şekil 7, 8 ve 9' da gösterilmiştir.

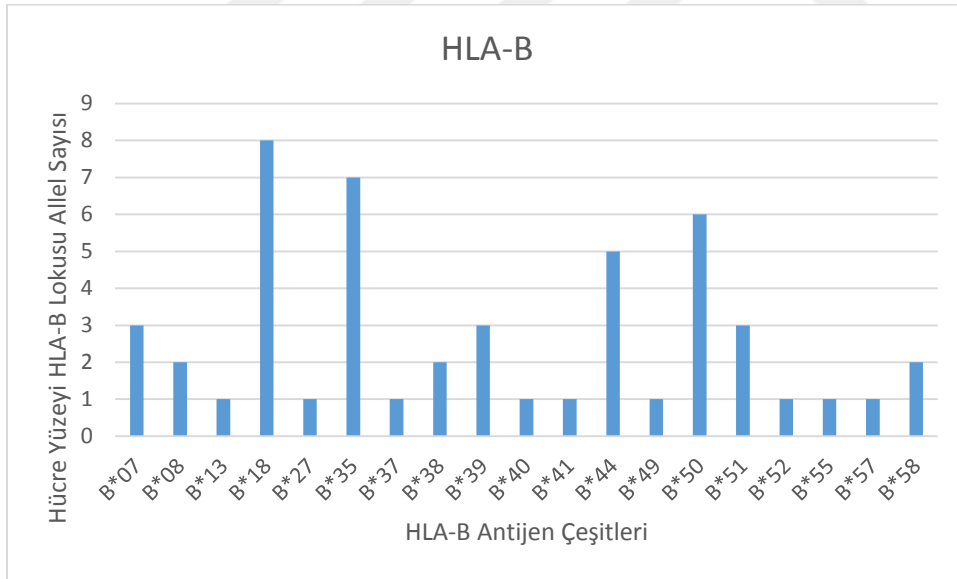
Tablo 6: HLA doku tipi tespit edilmiş lenfosit hücrelerindeki HLA sınıf I ve II alleleri

HÜCRE NO	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DRB1
CH1	A*24	A*26	B*35	B*51	DRB1*11	DRB1*11
CH2	A*23	A*24	B*18	B*41	DRB1*11	DRB1*07
CH3	A*24	A*24	B*18	B*35	DRB1*11	DRB1*03
CH4	A*03	A*32	B*18	B*50	DRB1*11	DRB1*07
CH5	A*11	A*24	B*52	B*58	DRB1*16	DRB1*15
CH6	A*66	A*66	B*40	B*50	DRB1*14	DRB1*13
CH7	A*30	A*69	B*08	B*55	DRB1*10	DRB1*11
CH8	A*03	A*03	B*07	B*44	DRB1*03	DRB1*16
CH9	A*24	A*74	B*44	B*50	DRB1*11	DRB1*03
CH10	A*30	A*74	B*13	B*50	DRB1*07	DRB1*03
CH11	A*03	A*68	B*08	B*18	DRB1*03	DRB1*11
CH12	A*02	A*02	B*44	B*58	DRB1*07	DRB1*14
CH13	A*02	A*24	B*35	B*39	DRB1*16	DRB1*09
CH14	A*01	A*11	B*50	B*57	DRB1*01	DRB1*04
CH15	A*01	A*02	B*35	B*44	DRB1*04	DRB1*15
CH16	A*03	A*11	B*35	B*51	DRB1*12	DRB1*15
CH17	A*02	A*24	B*27	B*50	DRB1*16	DRB1*03
CH18	A*11	A*26	B*07	B*51	DRB1*01	DRB1*13
CH19	A*01	A*03	B*18	B*37	DRB1*11	DRB1*16
CH20	A*26	A*68	B*35	B*38	DRB1*11	DRB1*13
CH21	A*02	A*02	B*07	B*18	DRB1*11	DRB1*07
CH22	A*02	A*30	B*18	B*49	DRB1*12	DRB1*11
CH23	A*30	A*68	B*18	B*38	DRB1*13	DRB1*14
CH24	A*01	A*69	B*39	B*44	DRB1*11	DRB1*16
CH25	A*01	A*24	B*35	B*39	DRB1*13	DRB1*16

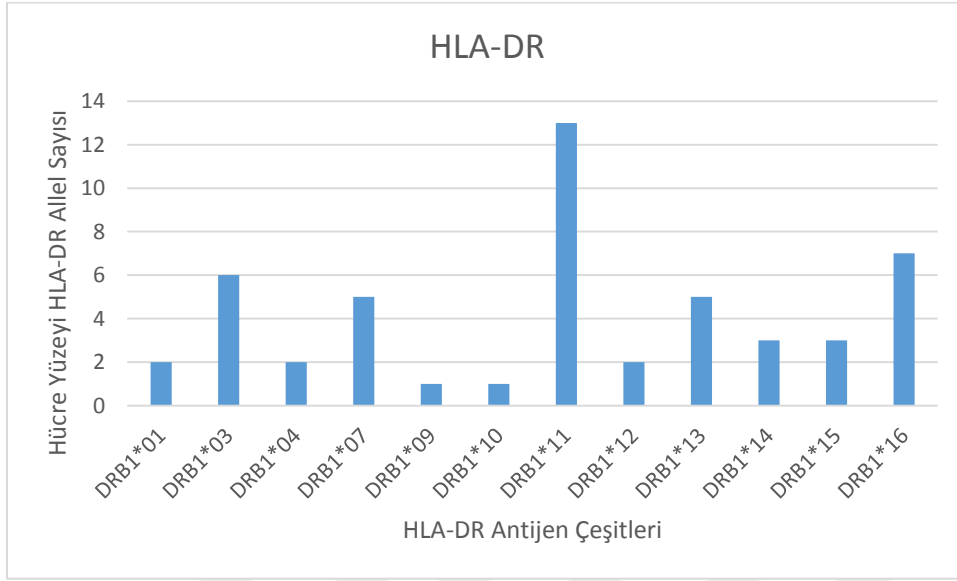
Şekil 7: Tablo 6' da doku antijenleri verilen lenfosit hücrelerinin çalışma grubumuzdaki serumlarla inkübe edilmesiyle reaksiyon oluşmuş HLA-A lokus allelerinin dağılımı ve sayıları



Şekil 8: Tablo 6' da doku antijenleri verilen lenfosit hücrelerinin çalışma grubumuzdaki serumlarla inkübe edilmesiyle reaksiyon oluşmuş HLA-B lokus allelerinin dağılımı ve sayıları



Şekil 9: Tablo 6’da doku antijenleri verilen lenfosit hücrelerinin çalışma grubumuzdaki serumlarla inkübe edilmesiyle reaksiyon oluşmuş HLA-DR lokus allelerinin dağılımı ve sayıları



Tablo 3’de verilen serumların anti-HLA antikorları içerdiği ticari kitler ile tespit edildi anti HLA antikorları, laboratuvarımızda HLA antijenleri tespit edilmiş canlı hücrelerle kompleman bağımlı sitotoksinite metodu kullanarak inkübe edildiğinde hücrelerde oluşan sitotoksinite 1 ila 8 arasında skorlanmıştır (1: sitotoksinite yok; Antijen Antikor kompleksi oluşmamış, 8: tüm hücrelerde sitotoksinite oluşmuş; Antijen Antikor kompleksi tüm hücrelerde oluşmuş) (tablo 2).

Tablo 7: B27 seri no'lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları

B27 SERİSİNDE TESPİT EDİLEN ANTİKORLAR*	B47, B37, B27	B27	A25, A24, A23, B27	B7	A11, A25, A26, B27	B27	A3,B7, B27	A33, A25, A26, B27	B27	Serumlar ile testlenen hücrelerin HLA allelleri (antijenleri)						Hücre No:
SERUM NO:	B27-1	B27-2	B27-3	B27-4	B27-5	B27-6	B27-7	B27-8	B27-9	Serumlar ile testlenen hücrelerin HLA allelleri (antijenleri)						Hücre No:
SKOR	1	1	1	8	1	1	6	2	2	A*24	A*26	B*35	B*51	DRB1*11	DRB1*11	CH1
	1	1	1	1	1	1	4	2	1	A*23	A*24	B*18	B*41	DRB1*11	DRB1*07	CH2
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*24	A*24	B*18	B*35	DRB1*11	DRB1*03	CH3
	1	1	1	1	1	1	4	1	1	A*03	A*32	B*18	B*50	DRB1*11	DRB1*07	CH4
	1	1	1	1	1	1	2	1	1	A*11	A*24	B*52	B*58	DRB1*16	DRB1*15	CH5
	1	1	1	8	4	1	6	1	1	A*66	A*66	B*40	B*50	DRB1*14	DRB1*13	CH6
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*30	A*69	B*08	B*55	DRB1*10	DRB1*11	CH7
	1	1	1	1	2	1	4	2	1	A*03	A*03	B*07	B*44	DRB1*03	DRB1*16	CH8
	1	1	1	1	2	1	4	1	1	A*24	A*74	B*44	B*50	DRB1*11	DRB1*03	CH9
	1	1	1	1	1	1	4	1	1	A*30	A*74	B*13	B*50	DRB1*07	DRB1*03	CH10
	1	1	1	1	2	1	4	2	2	A*03	A*68	B*08	B*18	DRB1*03	DRB1*11	CH11
	1	1	1	2	2	1	2	1	1	A*02	A*02	B*44	B*58	DRB1*07	DRB1*14	CH12
	1	1	1	1	1	1	4	1	1	A*02	A*24	B*35	B*39	DRB1*16	DRB1*09	CH13
	1	1	1	2	1	1	4	1	1	A*01	A*11	B*50	B*57	DRB1*01	DRB1*04	CH14
	1	1	1	1	1	1	4	2	1	A*01	A*02	B*35	B*44	DRB1*04	DRB1*15	CH15
	1	1	1	1	2	1	4	1	1	A*03	A*11	B*35	B*51	DRB1*12	DRB1*15	CH16
	1	1	1	1	2	1	4	1	1	A*02	A*24	B*27	B*50	DRB1*16	DRB1*03	CH17
	1	1	1	6	1	1	1	1	1	A*11	A*26	B*07	B*51	DRB1*01	DRB1*13	CH18
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*01	A*03	B*18	B*37	DRB1*11	DRB1*16	CH19
	1	1	1	4	1	1	1	1	1	A*26	A*68	B*35	B*38	DRB1*11	DRB1*13	CH20
	1	1	1	1	2	2	2	1	2	A*02	A*02	B*07	B*18	DRB1*11	DRB1*07	CH21
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*02	A*30	B*18	B*49	DRB1*12	DRB1*11	CH22
	1	1	1	1	2	1	4	8	1	A*30	A*68	B*18	B*38	DRB1*13	DRB1*14	CH23
	1	1	1	1	1	1	4	1	1	A*01	A*69	B*39	B*44	DRB1*11	DRB1*16	CH24
	1	1	1	1	2	1	6	1	1	A*01	A*24	B*35	B*39	DRB1*13	DRB1*16	CH25

*B27 plaklarında kullanılan serumların Luminex PRA tanımlama testi yapılarak tespit edilmiş ihtiva ettikleri anti-HLA antikorları

Tablo 8’ de renal transplantasyon öyküsü bulunan antikor taraması yapılmış 11 farklı serum (Tx-1/Tx-11), HLA antijenleri bilinen canlı hücrelerle sitotoksosite testi uygulanarak inkübe edildi, skorları tablo 8’ de gösterildi.

Tablo 8: Tx seri no’lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları

Tx Serisi													Serumlar ile testlenen hücrelerin HLA allelleri (antijenleri)						Hücre No:
Sınıf I:	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+								
Sınıf II:	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
SERUM NO:	Tx-1	Tx-2	Tx-3	Tx-4	Tx-5	Tx-6	Tx-7	Tx-8	Tx-9	Tx-10	Tx-11	Serumlar ile testlenen hücrelerin HLA allelleri (antijenleri)						Hücre No:	
SKOR:	8	1	1	1	1	1	1	1	1	6	2	A*24	A*26	B*35	B*51	DRB1*11	DRB1*11	CH1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*23	A*24	B*18	B*41	DRB1*11	DRB1*07	CH2	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*24	A*24	B*18	B*35	DRB1*11	DRB1*03	CH3	
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*03	A*32	B*18	B*50	DRB1*11	DRB1*07	CH4	
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	A*11	A*24	B*52	B*58	DRB1*16	DRB1*15	CH5	
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*66	A*66	B*40	B*50	DRB1*14	DRB1*13	CH6	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*30	A*69	B*08	B*55	DRB1*10	DRB1*11	CH7	
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	A*03	A*03	B*07	B*44	DRB1*03	DRB1*16	CH8	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*24	A*74	B*44	B*50	DRB1*11	DRB1*03	CH9	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	A*30	A*74	B*13	B*50	DRB1*07	DRB1*03	CH10	
	2	2	2	2	2	2	2	4	2	6	2	A*03	A*68	B*08	B*18	DRB1*03	DRB1*11	CH11	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*02	A*02	B*44	B*58	DRB1*07	DRB1*14	CH12	
	1	1	1	2	2	1	1	1	1	8	1	A*02	A*24	B*35	B*39	DRB1*16	DRB1*09	CH13	
	2	1	1	2	1	1	1	1	1	6	2	A*01	A*11	B*50	B*57	DRB1*01	DRB1*04	CH14	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	4	A*01	A*02	B*35	B*44	DRB1*04	DRB1*15	CH15	
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*03	A*11	B*35	B*51	DRB1*12	DRB1*15	CH16	
	2	2	1	2	1	1	1	1	1	8	4	A*02	A*24	B*27	B*50	DRB1*16	DRB1*03	CH17	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	2	A*11	A*26	B*07	B*51	DRB1*01	DRB1*13	CH18	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*01	A*03	B*18	B*37	DRB1*11	DRB1*16	CH19	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*26	A*68	B*35	B*38	DRB1*11	DRB1*13	CH20	
	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	A*02	A*02	B*07	B*18	DRB1*11	DRB1*07	CH21	
	1	1	1	2	1	1	1	1	1	8	1	A*02	A*30	B*18	B*49	DRB1*12	DRB1*11	CH22	
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*30	A*68	B*18	B*38	DRB1*13	DRB1*14	CH23	
	2	1	1	2	1	1	1	1	1	8	1	A*01	A*69	B*39	B*44	DRB1*11	DRB1*16	CH24	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*01	A*24	B*35	B*39	DRB1*13	DRB1*16	CH25	

Tablo 9’da gebelik öyküsü bulunan hastaların PRA tanımlama yapılan serumlar (11 farklı serum Geb-1/Geb-11), HLA antijenleri bilinen canlı hücrelerle sitotoksinite testi uygulanarak inkübe edildi, skorları tablo 9’ da gösterildi.

Tablo 9: Geb seri no’lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları

Geb Serisi																		
Sınıf I antikorlar:					A11		A2	B18	A2, A3	A23	A24							
Sınıf II antikorlar	DQ4	DQ2, DQ8	DQ7, DQ8	DQ5, DQ7	DR4	DR11, DR13, DR7, DQ2	DR13, DR52	DR4	DQ8	DR15	DR1, DQ5, DQ6							
SERUM NO:	Geb-1	Geb-2	Geb-3	Geb-4	Geb-5	Geb-6	Geb-7	Geb-8	Geb-9	Geb-10	Geb-11	Serumlar ile testlenen hücrelerin HLA allelleri (antijenleri)					Hücre No:	
SKOR:																		
	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	A*24	A*26	B*35	B*51	DRB1*11	DRB1*11	CH1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*23	A*24	B*18	B*41	DRB1*11	DRB1*07	CH2
	1	1	1	4	1	1	1	1	1	8	1	A*24	A*24	B*18	B*35	DRB1*11	DRB1*03	CH3
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*03	A*32	B*18	B*50	DRB1*11	DRB1*07	CH4
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*11	A*24	B*52	B*58	DRB1*16	DRB1*15	CH5
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*66	A*66	B*40	B*50	DRB1*14	DRB1*13	CH6
	1	1	2	1	1	1	4	1	1	1	1	A*30	A*69	B*08	B*55	DRB1*10	DRB1*11	CH7
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*03	A*03	B*07	B*44	DRB1*03	DRB1*16	CH8
	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	A*24	A*74	B*44	B*50	DRB1*11	DRB1*03	CH9
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*30	A*74	B*13	B*50	DRB1*07	DRB1*03	CH10
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*03	A*68	B*08	B*18	DRB1*03	DRB1*11	CH11
	1	1	2	1	1	1	4	1	1	1	1	A*02	A*02	B*44	B*58	DRB1*07	DRB1*14	CH12
	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	A*02	A*24	B*35	B*39	DRB1*16	DRB1*09	CH13
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*01	A*11	B*50	B*57	DRB1*01	DRB1*04	CH14
	1	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1	A*01	A*02	B*35	B*44	DRB1*04	DRB1*15	CH15
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*03	A*11	B*35	B*51	DRB1*12	DRB1*15	CH16
	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	A*02	A*24	B*27	B*50	DRB1*16	DRB1*03	CH17
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*11	A*26	B*07	B*51	DRB1*01	DRB1*13	CH18
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*01	A*03	B*18	B*37	DRB1*11	DRB1*16	CH19
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	A*26	A*68	B*35	B*38	DRB1*11	DRB1*13	CH20
	1	2	1	2	1	2	1	1	2	8	2	A*02	A*02	B*07	B*18	DRB1*11	DRB1*07	CH21
	1	1	2	1	1	1	8	1	1	1	1	A*02	A*30	B*18	B*49	DRB1*12	DRB1*11	CH22
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*30	A*68	B*18	B*38	DRB1*13	DRB1*14	CH23
	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	A*01	A*69	B*39	B*44	DRB1*11	DRB1*16	CH24
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*01	A*24	B*35	B*39	DRB1*13	DRB1*16	CH25

Tablo 10' da sınıf I ve sınıf II antikor tanımlaması yapılmış serumlar (11 farklı serum MixA-1/ MixA11), HLA antijenleri bilinen canlı hücrelerle sitotoksisite testi uygulanarak inkübe edildi, skorlar tablo 10' da gösterildi.

Tablo 10: MixA seri no'lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları

MixA Serisi																		
Sınıf I antikorlar	A23	A2,B7	A30,A2	B63	A24,A23	A31,A33, A45	A2	A3	B13	A23	B7							
Sınıf II antikorlar		DR1 ,DR11, DR9	DR4	DQ5, DQ6	DR11, DQ9	DR1 ,DR9, DR10	DR1, DQ6											
SERUM NO:	MixA-1	MixA-2	MixA-3	MixA-4	MixA-5	MixA-6	MixA-7	MixA-8	MixA-9	MixA-10	MixA-11	Serumlar ile testlenen hücrelerin HLA allelleri (antijenleri)						Hücre No:
SKOR:	1	1	1	1	6	1	1	1	1	4	1	A*24	A*26	B*35	B*51	DRB1*11	DRB1*11	CH1
	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	A*23	A*24	B*18	B*41	DRB1*11	DRB1*07	CH2
	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	A*24	A*24	B*18	B*35	DRB1*11	DRB1*03	CH3
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*03	A*32	B*18	B*50	DRB1*11	DRB1*07	CH4
	1	1	1	1	6	1	1	1	1	6	1	A*11	A*24	B*52	B*58	DRB1*16	DRB1*15	CH5
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*66	A*66	B*40	B*50	DRB1*14	DRB1*13	CH6
	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	4	A*30	A*69	B*08	B*55	DRB1*10	DRB1*11	CH7
	1	1	1	1	8	1	1	1	1	6	1	A*03	A*03	B*07	B*44	DRB1*03	DRB1*16	CH8
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*24	A*74	B*44	B*50	DRB1*11	DRB1*03	CH9
	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	6	A*30	A*74	B*13	B*50	DRB1*07	DRB1*03	CH10
	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	A*03	A*68	B*08	B*18	DRB1*03	DRB1*11	CH11
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*02	A*02	B*44	B*58	DRB1*07	DRB1*14	CH12
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*02	A*24	B*35	B*39	DRB1*16	DRB1*09	CH13
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*01	A*11	B*50	B*57	DRB1*01	DRB1*04	CH14
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*01	A*02	B*35	B*44	DRB1*04	DRB1*15	CH15
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*03	A*11	B*35	B*51	DRB1*12	DRB1*15	CH16
	1	1	1	1	6	1	1	1	1	2	1	A*02	A*24	B*27	B*50	DRB1*16	DRB1*03	CH17
	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	4	A*11	A*26	B*07	B*51	DRB1*01	DRB1*13	CH18
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*01	A*03	B*18	B*37	DRB1*11	DRB1*16	CH19
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*26	A*68	B*35	B*38	DRB1*11	DRB1*13	CH20
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	A*02	A*02	B*07	B*18	DRB1*11	DRB1*07	CH21
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*02	A*30	B*18	B*49	DRB1*12	DRB1*11	CH22
	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*30	A*68	B*18	B*38	DRB1*13	DRB1*14	CH23
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A*01	A*69	B*39	B*44	DRB1*11	DRB1*16	CH24
	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	A*01	A*24	B*35	B*39	DRB1*13	DRB1*16	CH25

Tablo 11’de yüksek oranda sensitize olduğu tespit edilmiş serumlar (10 farklı serum MixB-1/ MixB-10), HLA antijenleri bilinen canlı hücrelerle sitotoksinite testi uygulanarak inkübe edildi, skorlar tablo 11’ de gösterildi.

Tablo 11: MixB seri no’lu plaklarda organize edilen serumların CDC-PRA skorları

MixB Serisi	YOS	POZİTİF	YOS	YOS	NEGATİF	YOS	YOS	YOS	YOS	NEGATİF						
Sınıf I:	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF	NEGATİF	YOS	YOS	NEGATİF	YOS	NEGATİF	YOS						
Sınıf II:	MixB-1	MixB-2	MixB-3	MixB-4	MixB-5	MixB-6	MixB-7	MixB-8	MixB-9	MixB-10	Serumlar ile testlenen hücrelerin HLA allelleri (antijenle					Hücre No:
SERUM NO:	1	8	1	8	1	8	8	8	8	4	A*24	A*26	B*35	B*51	DRB1*11DRB1*11	CH1
SKOR:	1	8	1	1	1	8	1	4	8	1	A*23	A*24	B*18	B*41	DRB1*11DRB1*07	CH2
	1	6	1	1	1	6	1	6	8	1	A*24	A*24	B*18	B*35	DRB1*11DRB1*03	CH3
	1	8	1	4	1	1	1	1	1	1	A*03	A*32	B*18	B*50	DRB1*11DRB1*07	CH4
	1	8	1	8	1	8	8	8	8	1	A*11	A*24	B*52	B*58	DRB1*11DRB1*15	CH5
	1	8	1	1	1	8	1	8	1	1	A*66	A*66	B*40	B*50	DRB1*14DRB1*13	CH6
	2	8	1	4	1	1	1	1	2	2	A*30	A*69	B*08	B*55	DRB1*11DRB1*11	CH7
	1	8	1	6	1	8	1	8	8	1	A*03	A*03	B*07	B*44	DRB1*03DRB1*16	CH8
	1	8	2	2	1	8	1	4	1	1	A*24	A*74	B*44	B*50	DRB1*11DRB1*03	CH9
	1	8	1	1	1	6	1	1	1	1	A*30	A*74	B*13	B*50	DRB1*07DRB1*03	CH10
	2	6	1	2	1	8	1	2	8	1	A*03	A*68	B*08	B*18	DRB1*03DRB1*11	CH11
	1	8	1	6	1	6	1	2	2	1	A*02	A*02	B*44	B*58	DRB1*07DRB1*14	CH12
	1	8	1	8	1	8	1	8	8	1	A*02	A*24	B*35	B*39	DRB1*11DRB1*09	CH13
	1	8	1	4	1	6	8	8	1	1	A*01	A*11	B*50	B*57	DRB1*01DRB1*04	CH14
	1	8	1	8	1	6	8	8	2	1	A*01	A*02	B*35	B*44	DRB1*04DRB1*15	CH15
	1	8	1	8	1	4	8	8	2	1	A*03	A*11	B*35	B*51	DRB1*12DRB1*15	CH16
	1	8	1	6	1	8	1	4	8	2	A*02	A*24	B*27	B*50	DRB1*11DRB1*03	CH17
	1	8	1	6	1	8	8	8	2	2	A*11	A*26	B*07	B*51	DRB1*01DRB1*13	CH18
	1	8	1	1	1	1	8	2	2	1	A*01	A*03	B*18	B*37	DRB1*11DRB1*16	CH19
	1	1	1	4	1	1	4	8	1	1	A*26	A*68	B*35	B*38	DRB1*11DRB1*13	CH20
	2	8	2	8	1	8	1	2	2	2	A*02	A*02	B*07	B*18	DRB1*11DRB1*07	CH21
	1	8	1	8	1	4	1	4	2	1	A*02	A*30	B*18	B*49	DRB1*12DRB1*11	CH22
	1	4	1	1	1	2	1	2	2	1	A*30	A*68	B*18	B*38	DRB1*11DRB1*14	CH23
	1	8	1	8	1	1	8	4	1	1	A*01	A*69	B*39	B*44	DRB1*11DRB1*16	CH24
	1	8	1	4	1	6	8	8	8	8	A*01	A*24	B*35	B*39	DRB1*11DRB1*16	CH25

%90 üzerinde HLA sınıf I (Serum no: MixA-5; MixB-4; 2; 6; 7; 8; ve 9) antijenleriyle reaksiyon veren serumlar HLA antijenlerini allelik temelde belirleyen tek antijen boncuk yöntemiyle (Luminex SAB) analiz edildi. Serumların SAB sonuçları, serumların CDC-PRA ile testlenen canlı hücre HLA tipleri ve her bir hücre ile gösterdiği reaksiyonlar Tablo 12’de gösterildi.

Tablo 12: MixA-5, MixB-4, 2, 6, 7, 8, ve 9 no’lu serumların Luminex-SAB sonucuna göre spesifik antijen reaktivitesinin CDC-PRA ile gösterdiği reaksiyonlar.

Serum No:	SAB ile tespit edilen antikor	MFI	CDC-PRA kullanılan canlı hücre doku tipi	CDC-PRA kullanılan canlı hücre sayısı	CDC-PRA pozitif reaksiyon gösteren hücre sayısı	CDC-PRA negatif reaksiyon gösteren hücre sayısı
MixA-5						
	A*23:01	9261	A*23	1	1	0
	A*24:02	8470	A*24	8	5	3
	A*24:03	3887	A*24			
	A*01:01	1923	A*01	5	1	4
MixB-4						
	A*02:03	18443	A*02	6	6	0
	A*02:05	18037				
	A*02:02	16798				
	A*02:01	16061				
	A*68:02	15364	A*68	3	1	2
	A*69:01	13229	A*69	2	2	0
	A*24:03	12798	A*24	8	5	3
	A*23:01	10068	A*24	1	0	1
	B*18:01	3938	B*18	8	2	6
	B*27:03	6170	B*27	1	1	0
	B*27:05	12967				
	B*35:01	15206	B*35	7	4	3
	B*35:08	15334				
	B*37:01	10092	B*37	1	0	1
	B*38:01	10367	B*38	2	1	1
	B*40:01	2079	B*40	1	0	1
	B*41:01	4391	B*41	1	0	1
	B*44:02	10242	B*44	6	4	2
	B*44:03	12223				
	B*49:01	14641	B*49	1	1	0
	B*50:01	13574	B*50	6	2	4
	B*51:01	6967	B*51	3	3	0
	B*52:01	5765	B*52	1	1	0
	B*55:01	2434	B*55	1	1	0
	B*57:01	15262	B*57	1	1	0
	B*58:01	10074	B*58	2	2	0

Tablo 12'ye devam

Serum No:	SAB ile tespit edilen antikor	MFI	CDC-PRA kullanılan canlı hücre tipi	CDC-PRA kullanılan canlı hücre sayısı	CDC-PRA pozitif reaksiyon gösteren hücre sayısı	CDC-PRA negatif reaksiyon gösteren hücre sayısı
MixB-2						
	A*02:03	18363	A*02	8	8	0
	A*02:05	18283				
	A*02:02	18185				
	A*02:01	17818				
	A*01:01	17796	A*01	5	5	0
	A*03:01	16495	A*03	6	6	0
	A*24:02	15075	A*24	8	8	0
	A*24:03	14619				
	A*66:01	13213	A*66	2	2	0
	A*11:01	11079	A*11	4	4	0
	A*11:02	11758	A*11			
	A*23:01	11376	A*23	1	1	0
	A*26:01	11093	A*26	3	2	1
	A*69:01	9838	A*69	2	2	0
	A*66:02	9062	A*66	2	2	0
	A*74:01	8304	A*74	2	2	0
	A*30:01	6626	A*30	4	4	0
	B*07:02	18118	B*07	3	3	0
	B*07:03	14321	B*07			
	B*27:08	17942	B*27	1	1	0
	B*27:05	18088	B*27			
	B*27:03	7370	B*27			
	B*41:01	17492	B*41	1	1	0
	B*55:01	16315	B*55	1	1	0
	B*49:01	15726	B*49	1	1	0
	B*50:01	17996	B*50	6	6	0
	B*39:01	12276	B*39	3	3	0
	B*35:01	9679	B*35	7	6	1
	B*35:08	11262	B*35			
	B*40:02	11072	B*40	1	1	0
	B*08:01	11035	B*08	2	2	0
	B*44:02	9094	B*44	5	5	0
	B*51:01	7294	B*51	3	3	0
	B*58:01	4004	B*58	2	2	0

Serum No:	SAB ile tespit edilen antikor	MFI	CDC-PRA kullanılan canlı hücre tipi	CDC-PRA kullanılan canlı hücre sayısı	CDC-PRA pozitif reaksiyon gösteren hücre sayısı	CDC-PRA negatif reaksiyon gösteren hücre sayısı
MixB-6						
	A*01:01	12285	A*01	5	3	2
	A*02:01	12250	A*02	8	8	0
	A*02:02	18480	A*02			
	A*02:03	18545	A*02			
	A*02:05	18253	A*02			
	A*03:01	2814	A*03	6	4	2
	A*23:01	17015	A*23	1	1	0
	A*24:02	15544	A*24	9	0	0
	A*24:03	16877	A*24			
	A*26:01	1967	A*26	3	2	1
	A*32:01	20253	A*32	1	0	1
	A*66:02	1650	A*66	2	2	0
	A*69:01	7356	A*69	2	0	2
	B*07:02	16148	B*07	3	3	0
	B*07:03	10145	B*07			
	B*08:01	7522	B*08	2	1	1
	B*13:02	13160	B*13	1	1	0
	B*27:03	10946	B*27	1	1	0
	B*27:05	13341	B*27			
	B*27:08	19767	B*27			
	B*37:01	15359	B*37	1	0	1
	B*38:01	13858	B*38	2	1	1
	B*40:01	8805	B*40	1	1	0
	B*40:02	4197	B*40			
	B*41:01	6344	B*41	1	1	0
	B*44:02	13758	B*44	5	4	1
	B*49:01	16110	B*49	1	1	0
	B*50:01	2840	B*50	6	5	1
	B*51:01	10179	B*51	3	3	0
	B*52:01	8376	B*52	1	1	0
MixB-7						
	A*01:01	15468	A*01	5	5	0
	A*03:01	16605	A*03	6	2	4
	A*11:01	10960	A*11	4	4	0
	A*26:01	11705	A*26	3	3	0
	A*68:01	2471	A*68	3	1	0
	A*68:02	8146	A*68			
	A*74:01	10224	A*74	2	0	2

Tablo 12'ye devam



Serum No:	SAB ile tespit edilen antikor	MFI	CDC-PRA kullanılan canlı hücre tipi	CDC-PRA kullanılan canlı hücre sayısı	CDC-PRA pozitif reaksiyon gösteren hücre sayısı	CDC-PRA negatif reaksiyon gösteren hücre sayısı
	B*08:01	12137	B*08	2	0	2
	B*44:02	4806	B*44	5	0	5
	B*44:03	6274	B*44			
MixB-8						
	A*01:01	15634	A*01	5	4	1
	A*03:01	15393	A*03	6	3	3
	A*11:01	15924	A*11	4	4	0
	A*11:02	17008	A*11			
	A*26:01	13394	A*26	3	3	0
	A*30:01	18445	A*30	4	1	3
	A*32:01	5475	A*32	1	0	1
	A*66:01	10065	A*66	2	2	0
	A*66:02	12237	A*66			
	A*68:02	1337	A*68	3	1	2
	A*74:01	18470	A*74	2	1	1
	B*07:02	17603	B*07	3	2	1
	B*07:03	12688	B*07			
	B*08:01	12711	B*08	2	0	2
	B*13:02	3027	B*13	1	0	1
	B*18:01	11934	B*18	8	5	3
	B*35:01	18207	B*35	7	7	0
	B*35:08	17092	B*35			
	B*37:01	10578	B*37	1	0	1
	B*38:01	2527	B*38	2	1	1
	B*39:01	3138	B*39	3	3	0
	B*40:01	11876	B*40	1	1	0
	B*40:02	1146	B*40			
	B*41:01	11380	B*41	1	1	0
	B*44:02	7544	B*44	5	4	1
MixB-9						
	A*01:01	8183	A*01	5	1	4
	A*11:01	9341	A*11	4	1	3
	A*11:02	4192	A*11			
	A*23:01	17772	A*23	1	1	0
	A*24:02	17472	A*24	8	7	1
	A*24:03	16391	A*24			

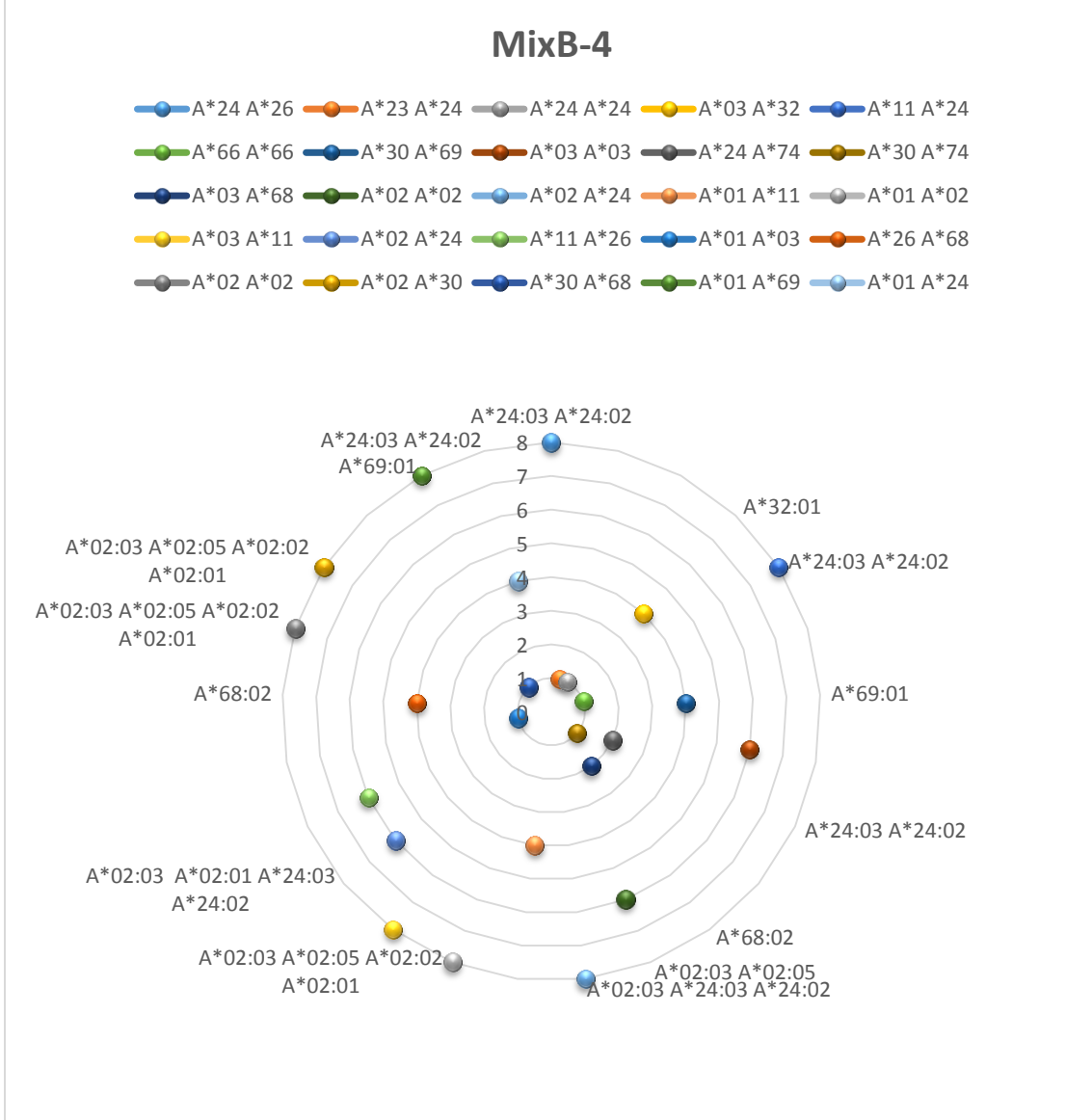
Tablo 12'ye devam

Tablo 12'ye devam

Serum No:	SAB ile tespit edilen antikor	MFI	CDC-PRA kullanılan canlı hücre tipi	CDC-PRA kullanılan canlı hücre sayısı	CDC-PRA pozitif reaksiyon gösteren hücre sayısı	CDC-PRA negatif reaksiyon gösteren hücre sayısı
	A*26:01	8612	A*26	3	1	2
	A*66:01	7405	A*66	2	0	2
	B*08:01	4166	B*08	2	0	2
	B*35:01	5721	B*35	7	4	3
	B*35:08	6423	B*35			
	B*37:01	3849	B*37	1	0	1
	B*57:01	8203	B*57	1	0	1
	B*58:01	5686	B*58	2	1	1

Tablo 12 'de gösterilen serumların reaksiyonları MixB-4 no'lu serum için Şekil 10 ve 11, MixB-2 no'lu serum için Şekil 12 ve 13, MixB-6 no'lu serum için Şekil 14 ve 15 'da gösterildi.

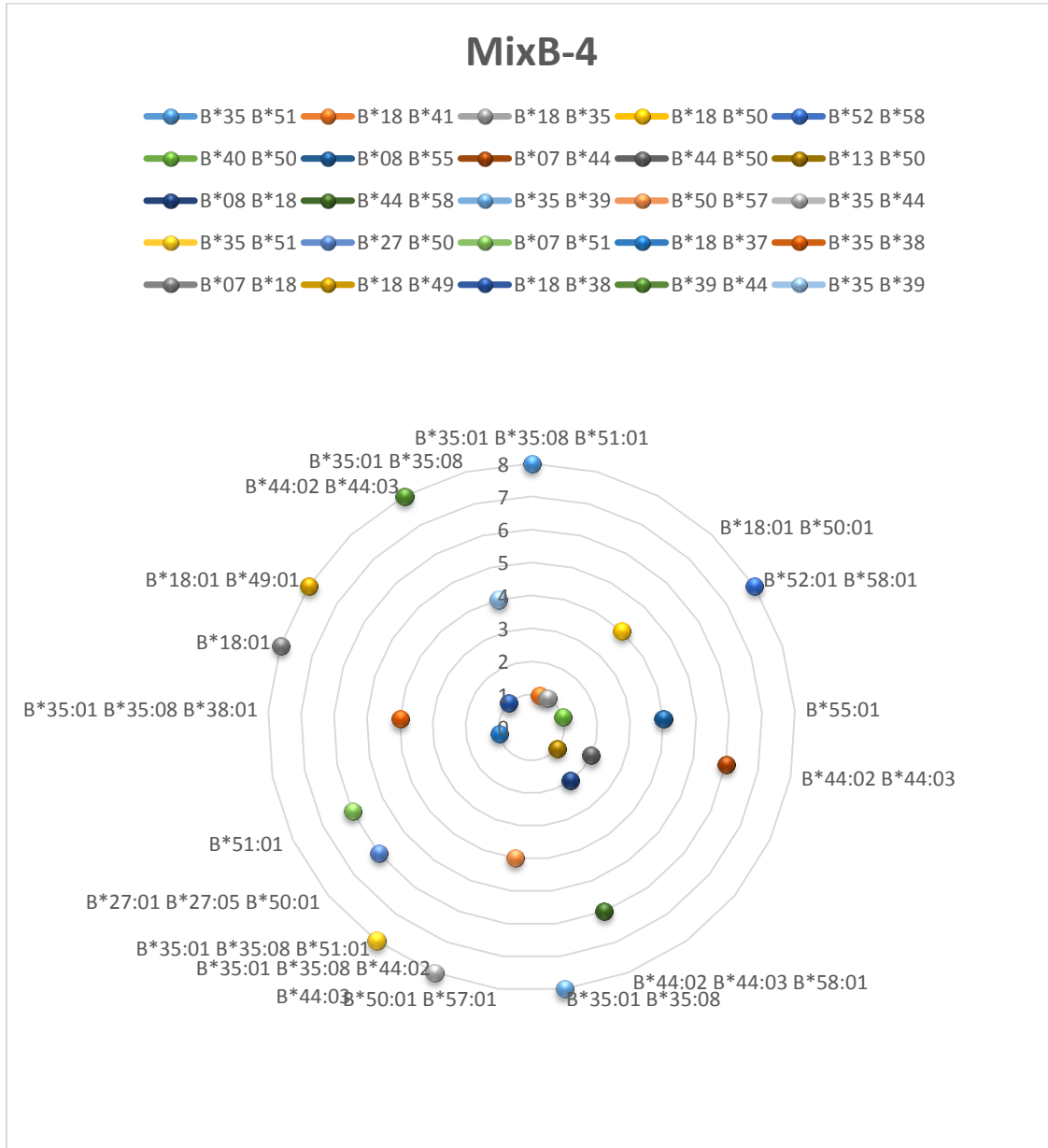
Şekil 10: MixB-4 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikorları



Şekil 10 'da MixB-4 no'lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-A antikorları bakımından gösterilmiştir. Radyan grafiğin en dış halkası CDC-PRA tekniğinde skorlamasındaki en yüksek pozitif değer olan 8 skorunu, en iç halka negatif değer olan 1 skorunu temsil eder. Her biri farklı renkte olan boncuklar serumun üzerine eklenen antijen tiplerini ifade eder. Boncukların radyan grafiğin

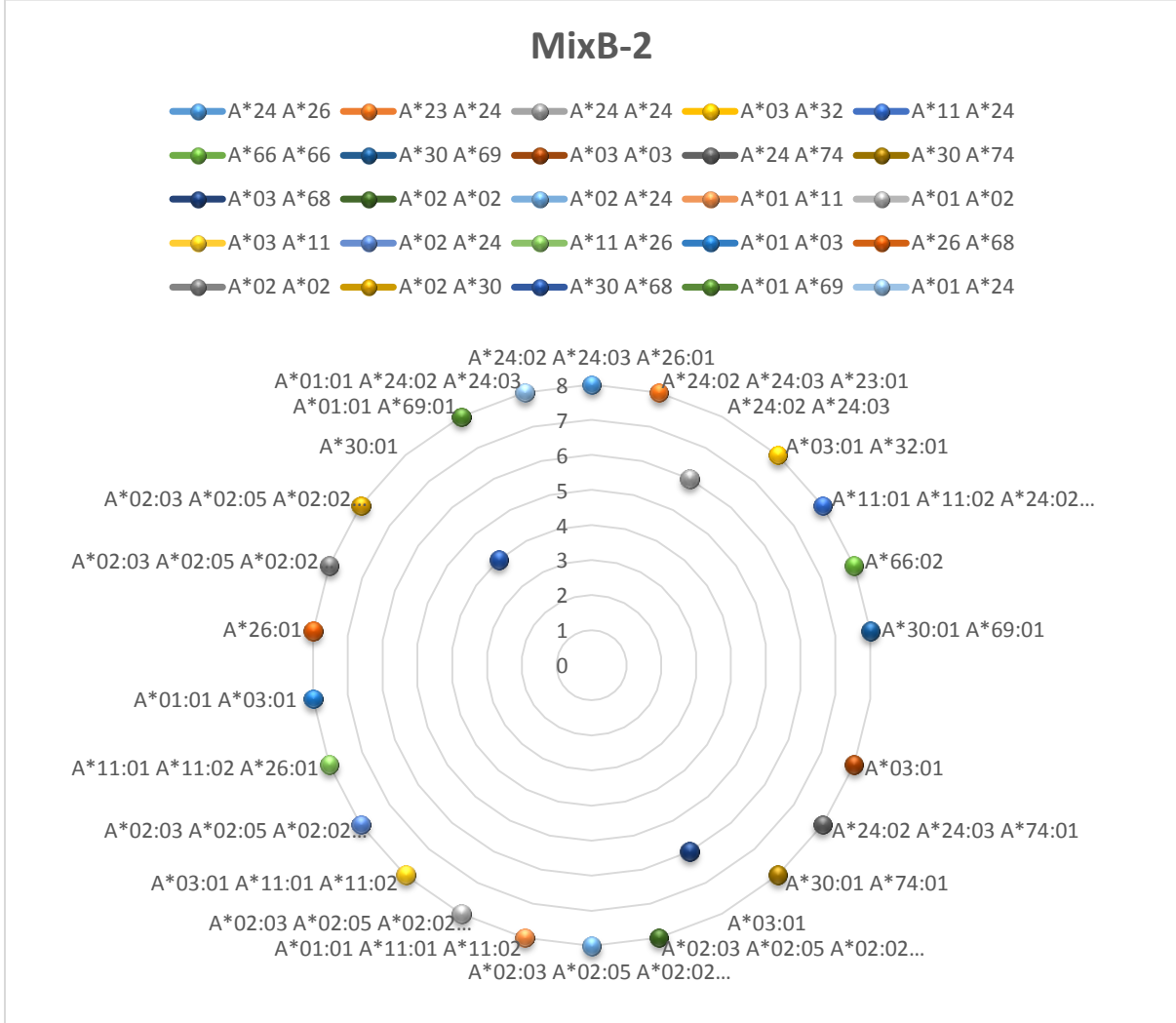
etrafındaki hizasında belirtilen antikorlar ise serumda SAB testi ile tespit edilen antikor tipleridir.

Şekil 11: MixB-4 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikorları



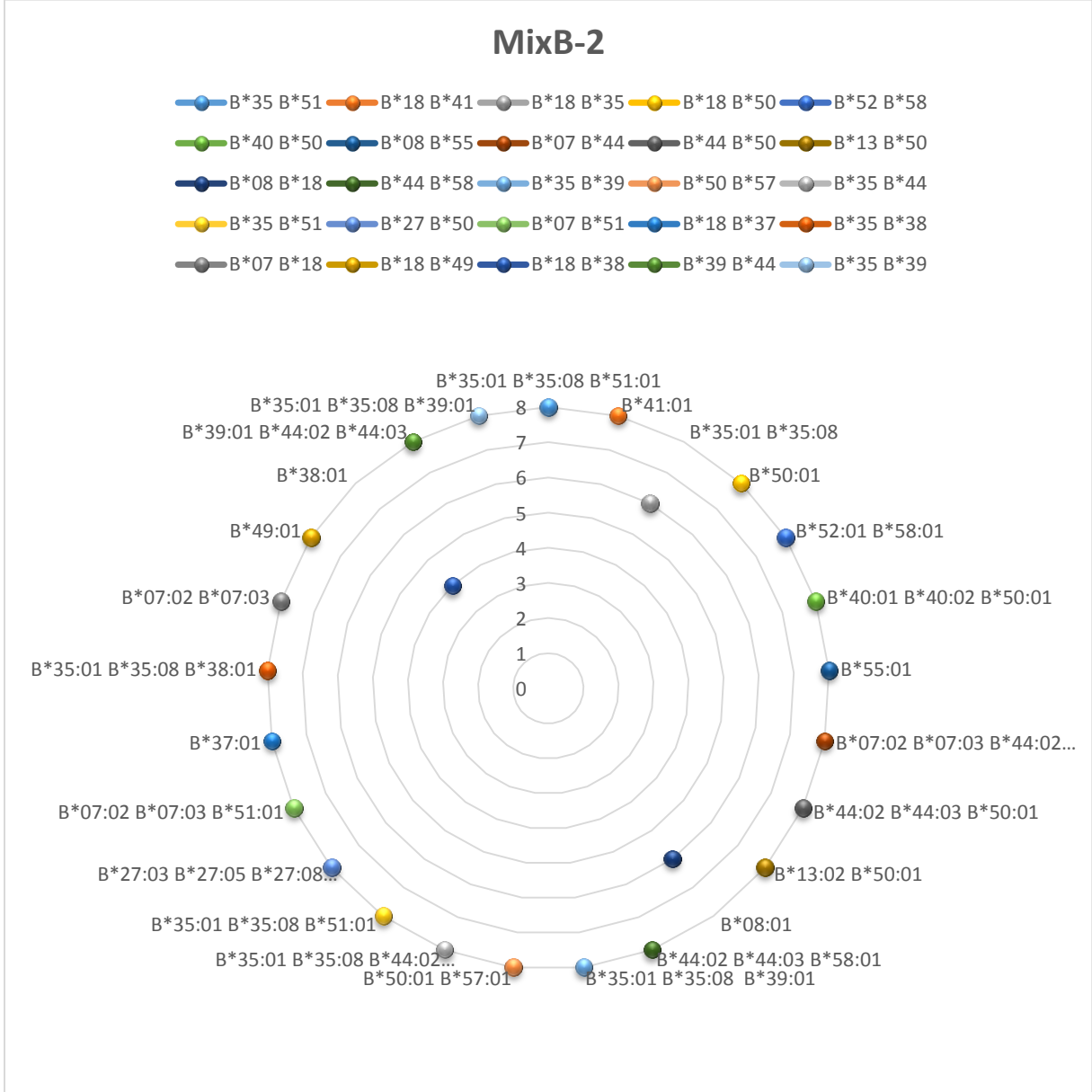
Şekil 11’de MixB-4 no’lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-B antikorları bakımından gösterilmiştir.

Şekil 12: MixB-2 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikorları



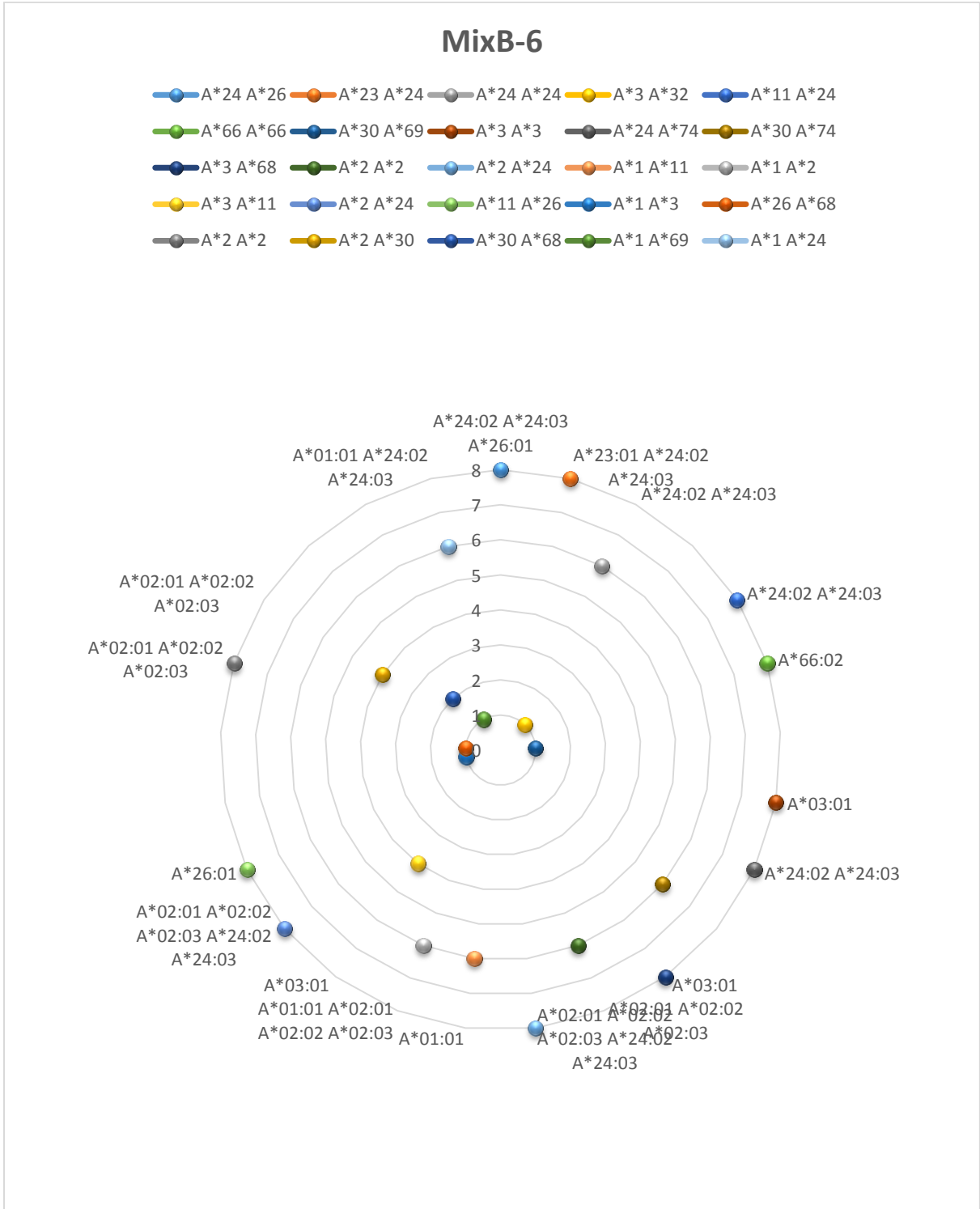
Şekil 12’de MixB-2 no’lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-A antikorları bakımından gösterilmiştir. MixB-2 serumu her antijen ile reaksiyon göstermiştir.

Şekil 13: MixB-2 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikorları



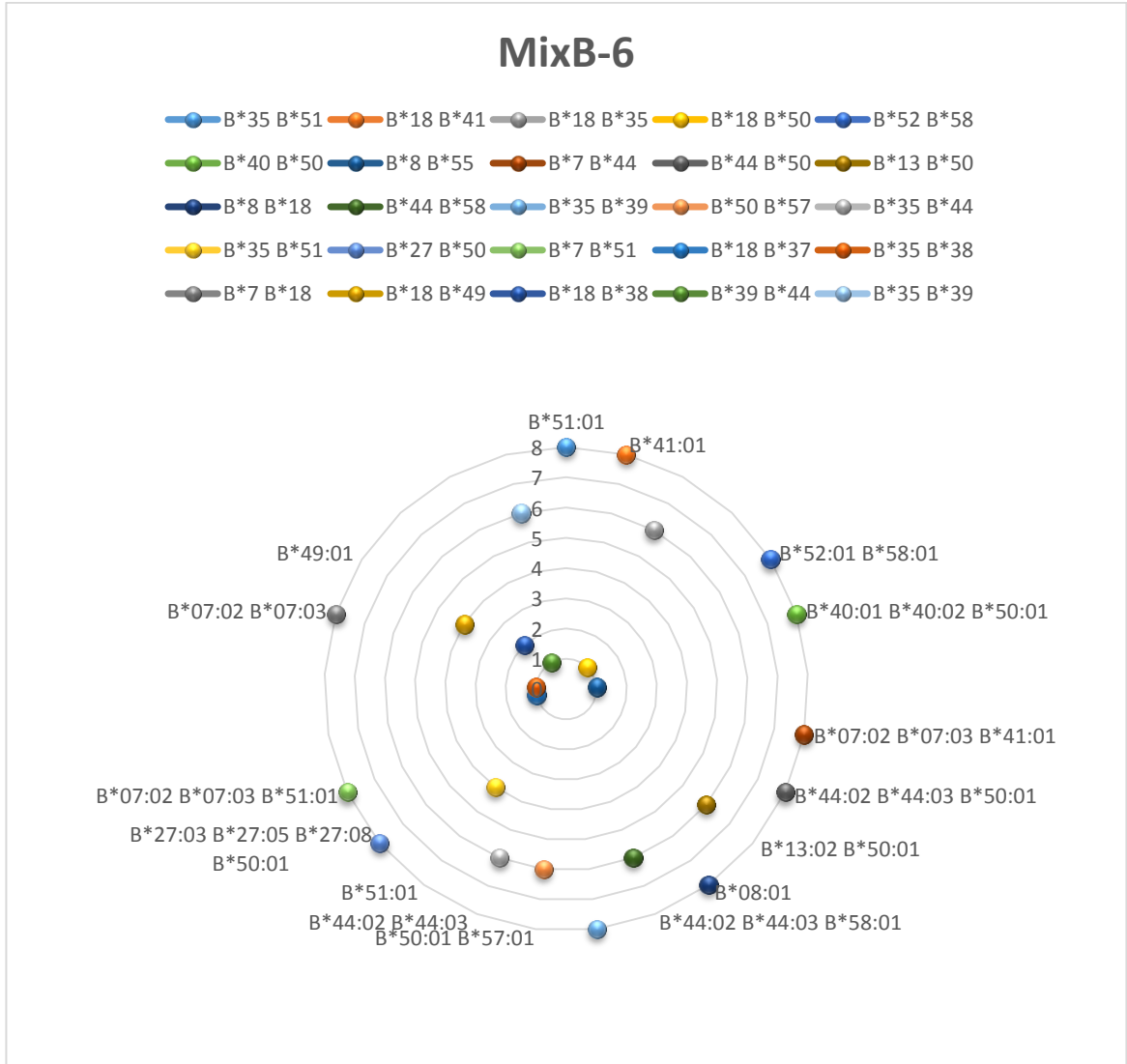
Şekil 13'te MixB-2 no'lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-B antikorları bakımından gösterilmiştir. MixB-2 serumu her antijen ile reaksiyon göstermiştir.

Şekil 14: MixB-6 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikorları



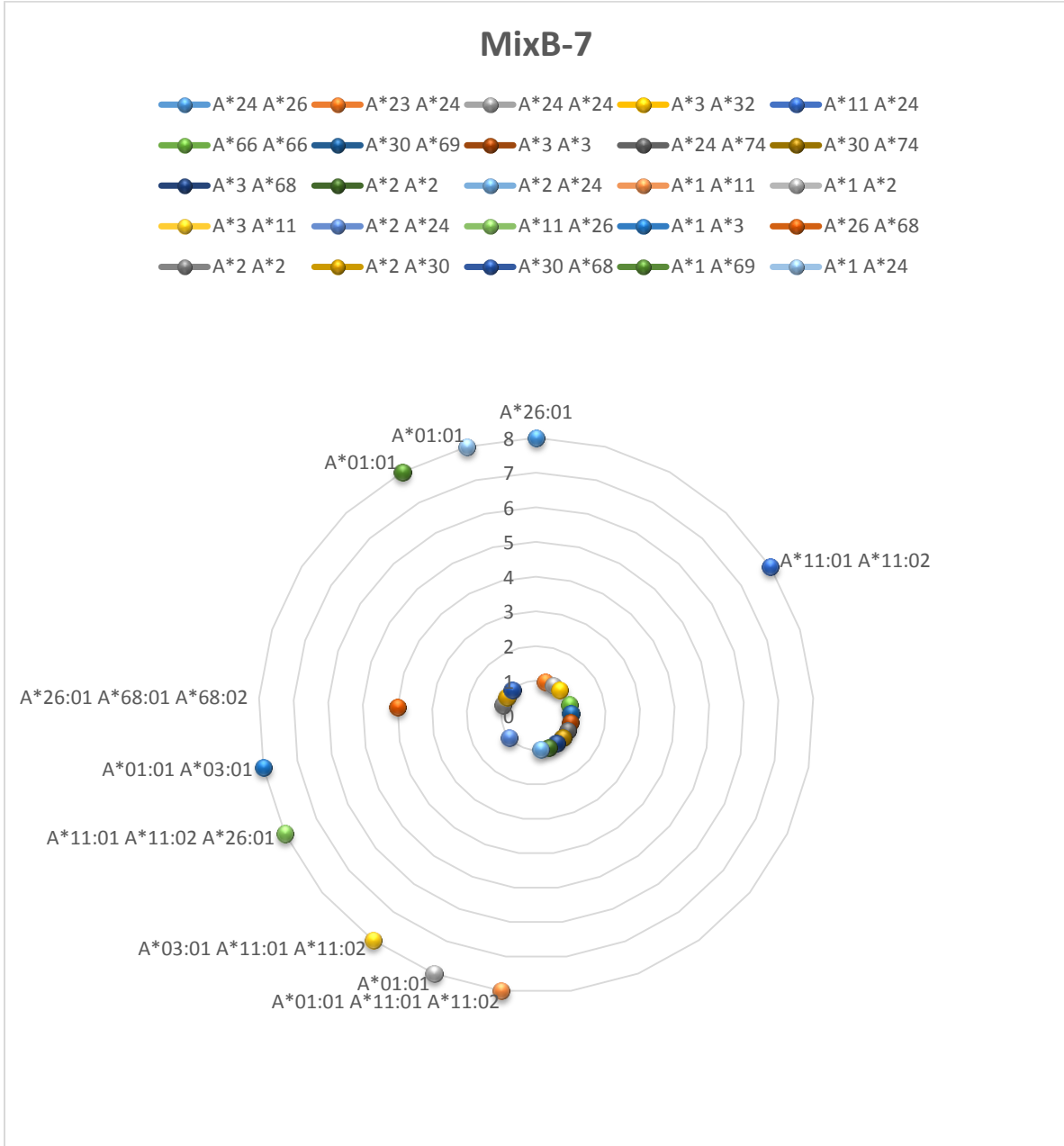
Şekil 14’de MixB-6 no’lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-A antikorları bakımından gösterilmiştir.

Şekil 15: MixB-6 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikorları



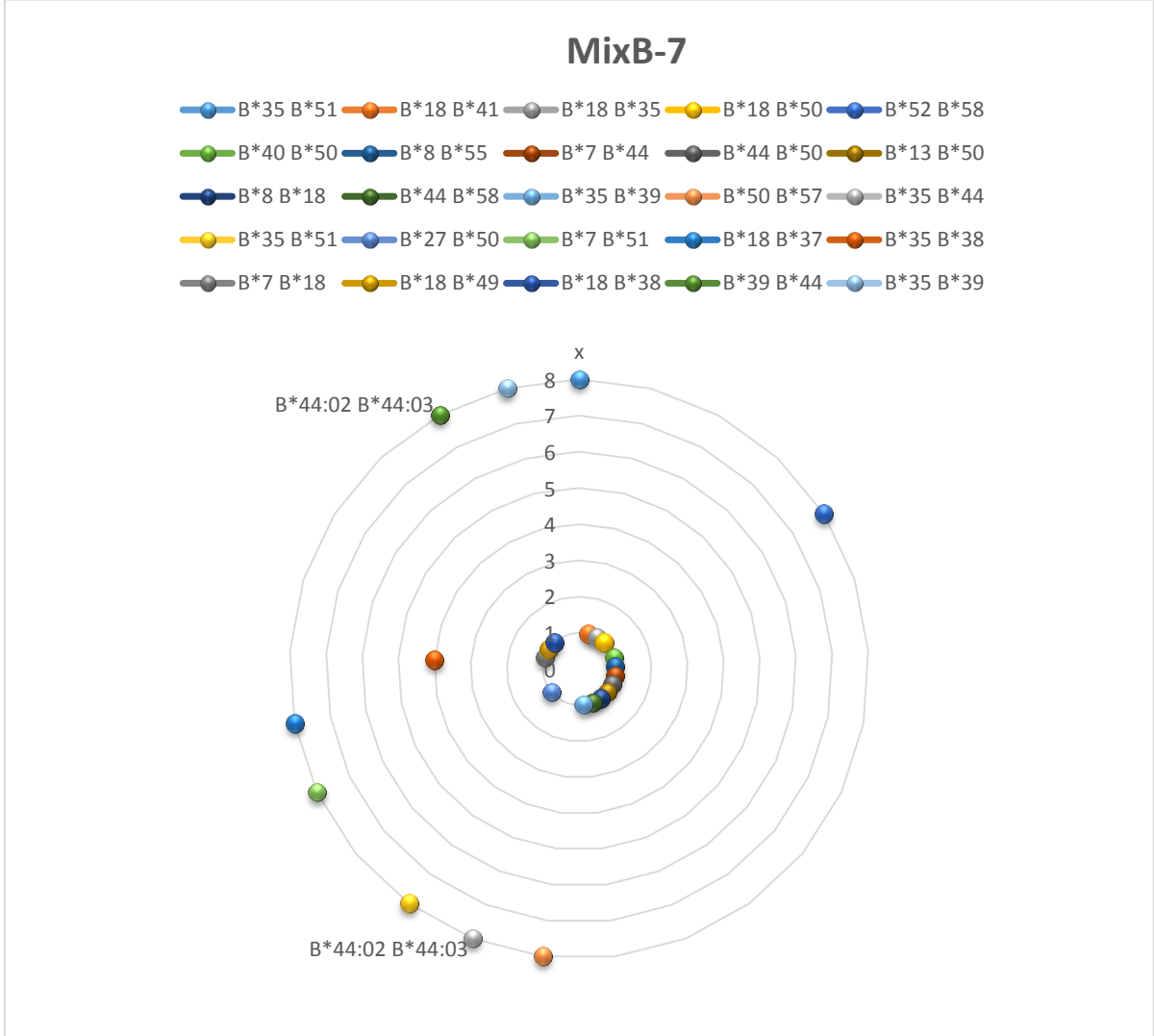
Şekil 15'de MixB-6 no'lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-B antikorları bakımından gösterilmiştir.

Şekil 16: MixB-7 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikorları



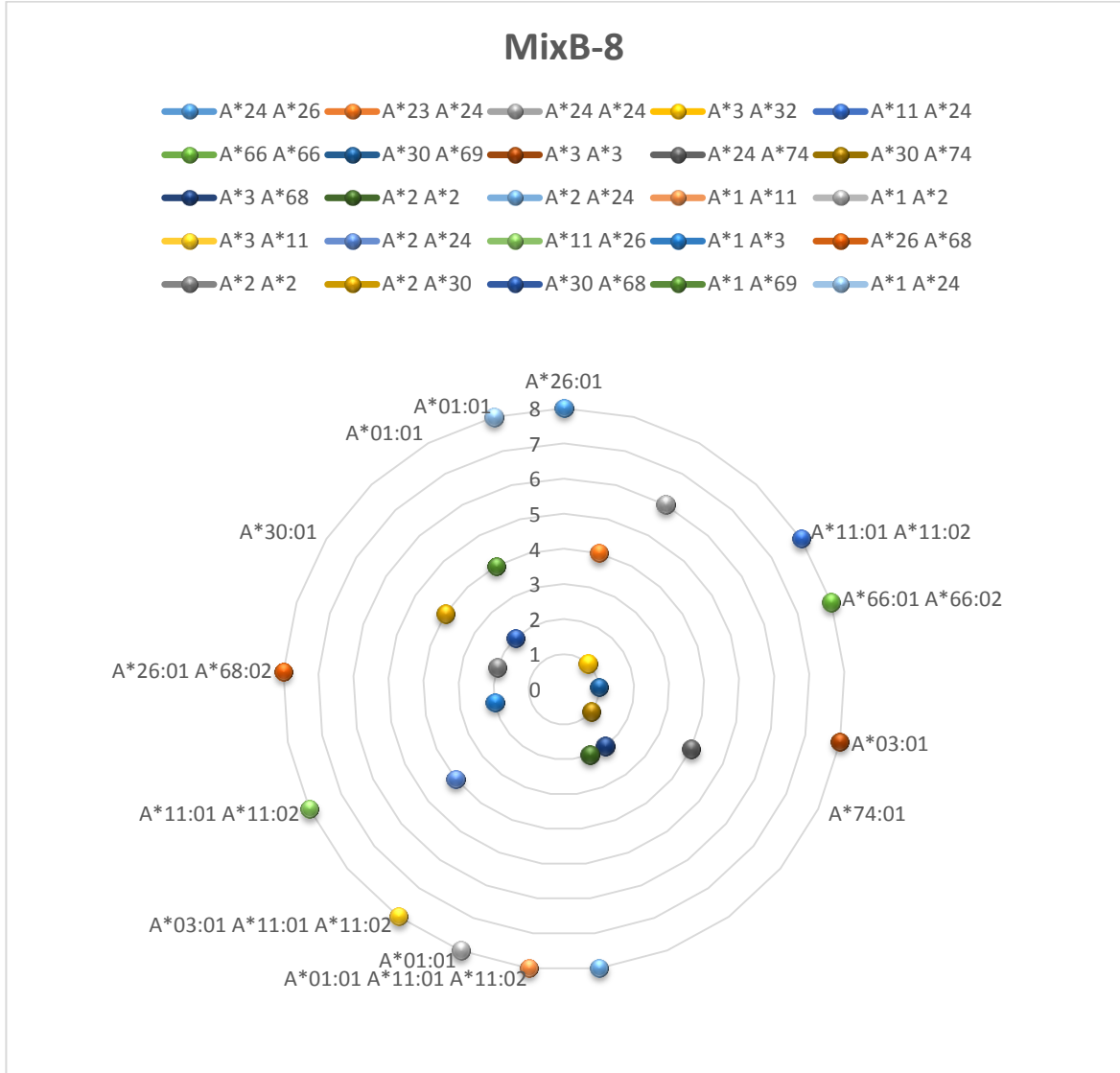
Şekil 16'da MixB-7 no'lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-A antikorları bakımından gösterilmiştir.

Şekil 17: MixB-7 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikorları



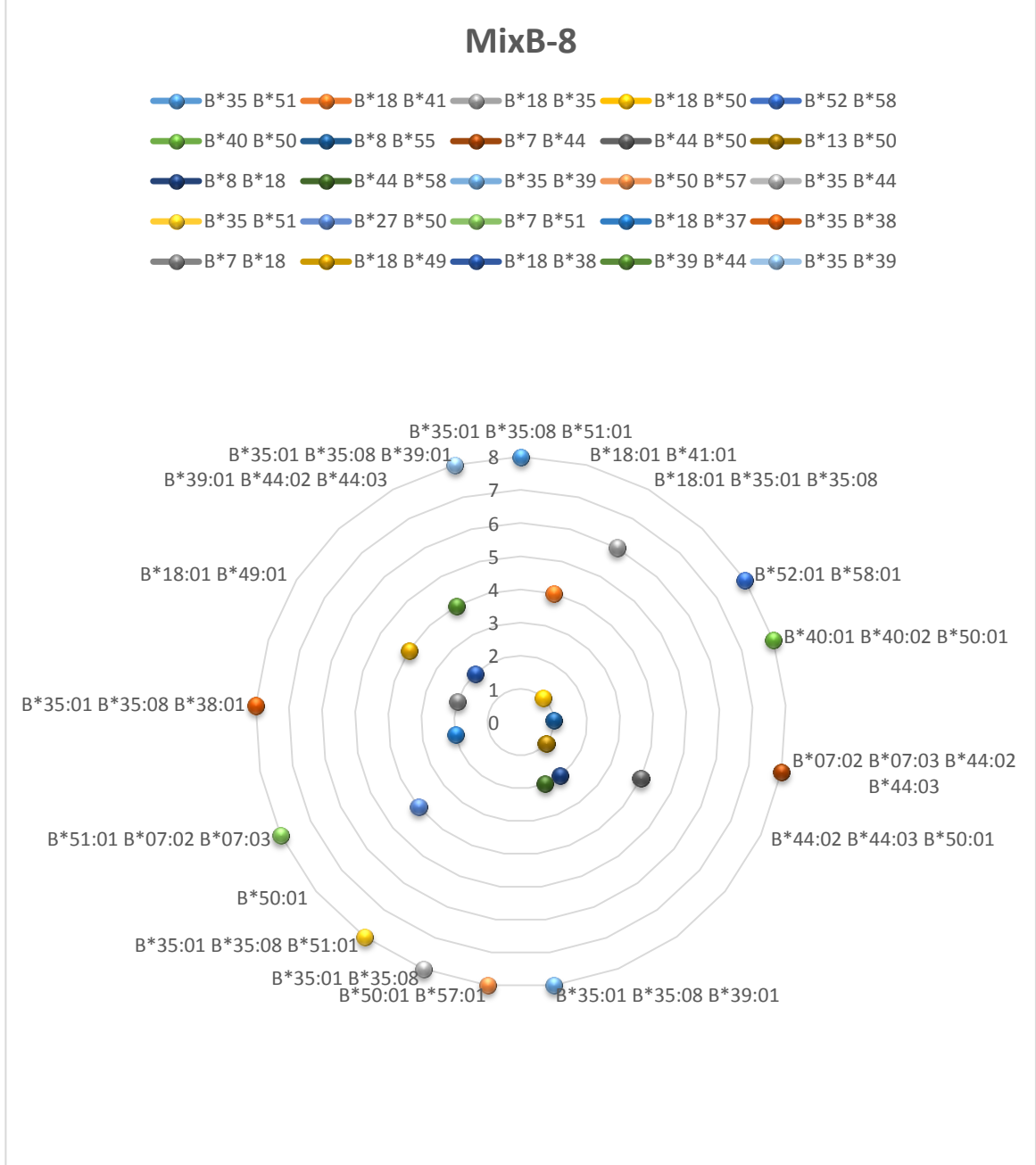
Şekil 17’de MixB-6 no’lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-B antikorları bakımından gösterilmiştir.

Şekil 18: MixB-8 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikorları



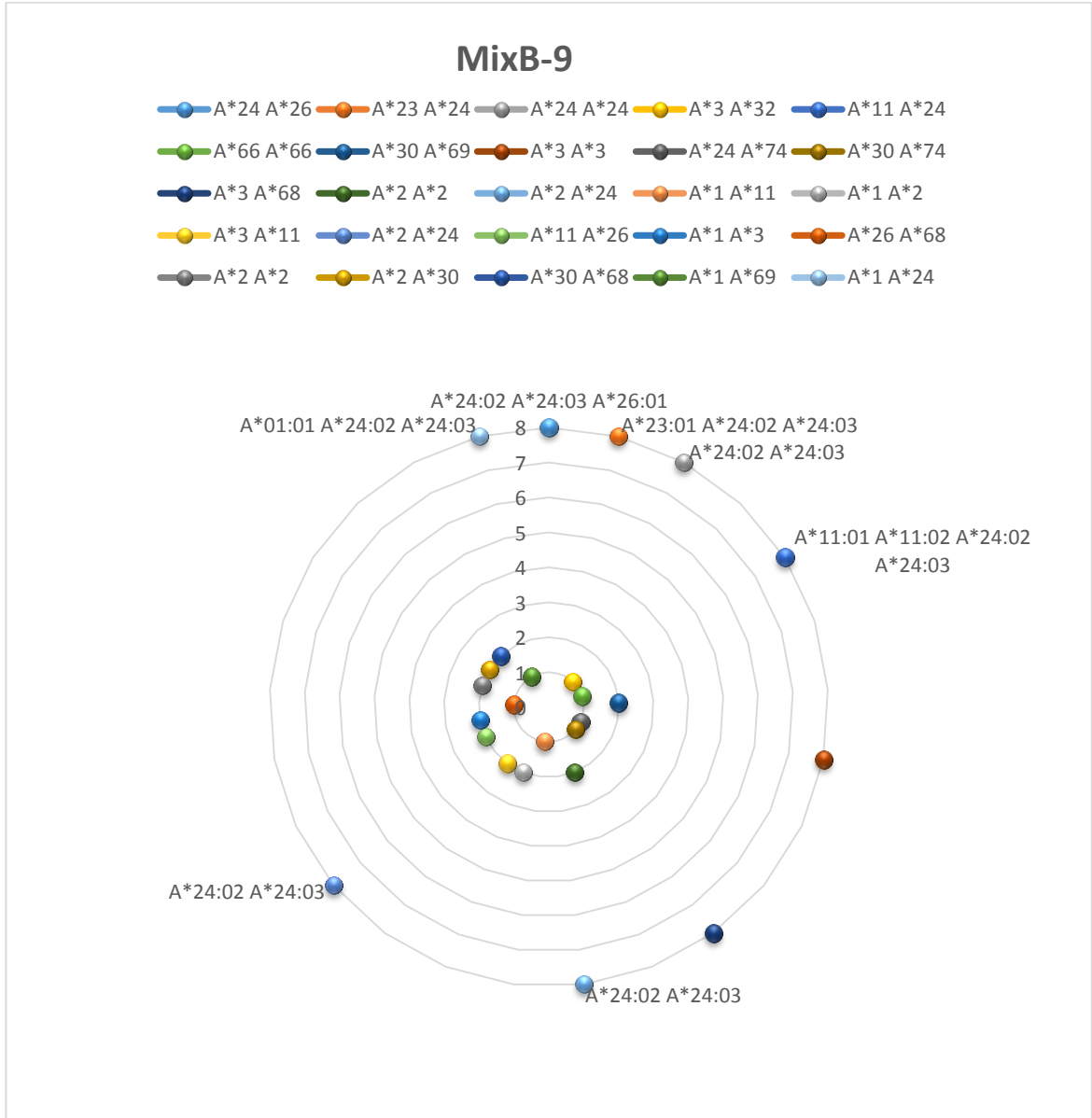
Şekil 18’de MixB-8 no’lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-A antikorları bakımından gösterilmiştir.

Şekil 19: MixB-8 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikorları



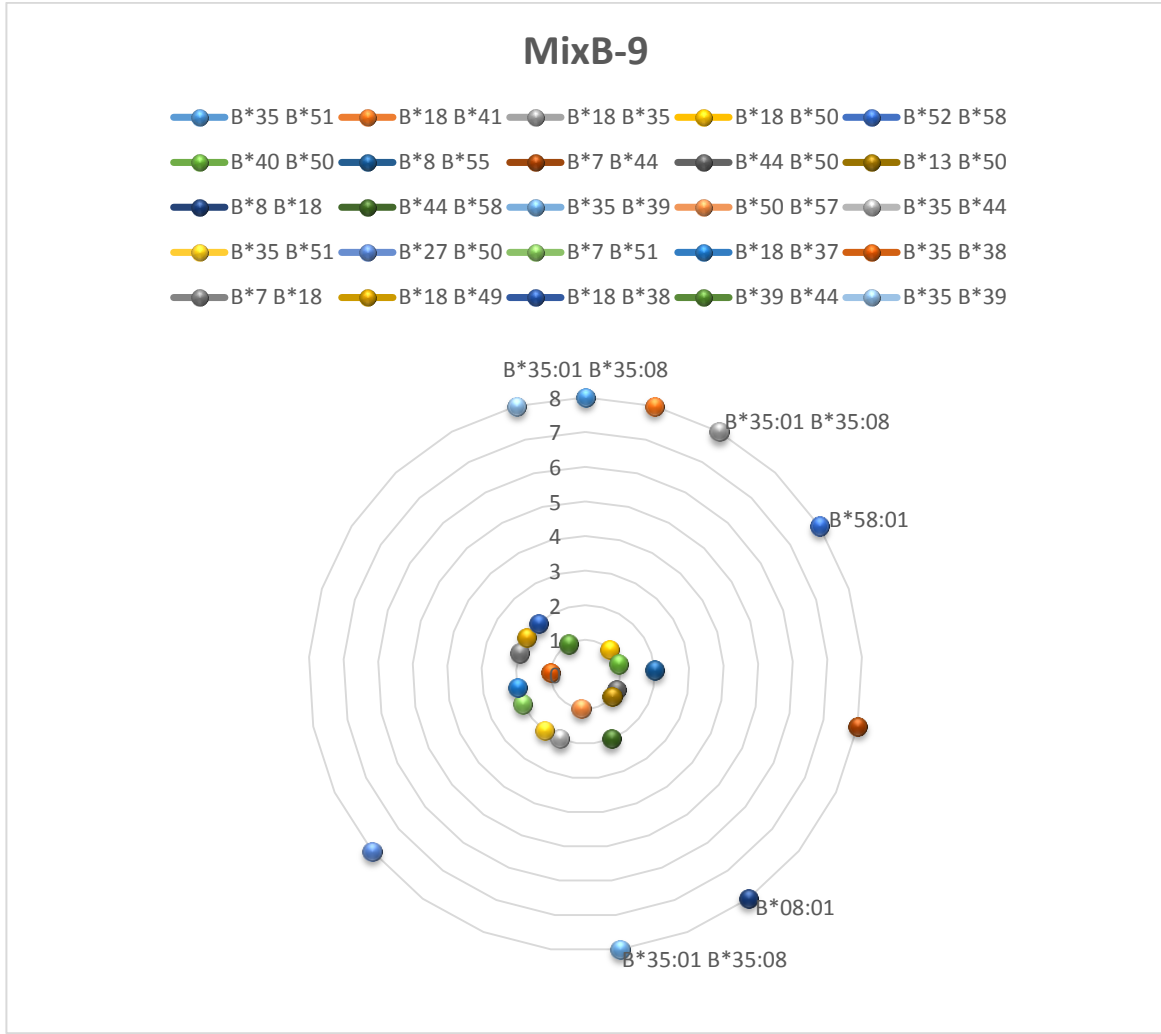
Şekil 19'da MixB-8 no'lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-B antikorları bakımından gösterilmiştir.

Şekil 20: MixB-9 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA A antikorları



Şekil 21'de MixB-9 no'lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-A antikorları bakımından gösterilmiştir.

Şekil 21: MixB-9 no'lu serumda CDC-PRA ile saptanan anti-HLA B antikorları



Şekil 21’de MixB-9 no’lu serumun SAB testi ile tespit edilen antikorlar ile CDC-PRA testi ile antikor taramasının karşılaştırılması HLA-B antikorları bakımından gösterilmiştir.

TARTIŞMA

HLA antijen molekülünün en dış bölgelerinde konumlanan aminoasit dizileri antikor tanıma bölgesini yani epitop bölgesini oluştururlar. HLA epitoplarının anti-HLA antikorlarını tanımasıyla ilişkili en temel ve en küçük bölgeler epletleri oluşturur (57). Paul Terasaki 2003 yılında HLA antikorlarının allograft rejeksiyonuna neden olduğunu ve organ transplantasyonundaki başarısızlığı etkilediğini kanıtlamıştır. Daha sonra HLA antikorlarının epitop denen aminoasit bölgelerini tanıdığını rapor etmiş, HLA uyumundaki epitop seviyesine dikkat çekmiştir. (58). HLA antijenlerindeki epitop yapısının varlığı serolojik düzeyde Terasaki tarafından gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya konmuş ve serolojik reaktivite ile belirlenen bu bölgeler ilerleyen teknolojiyle birlikte artık aminoasit dizileri ile haritalandırılabilir duruma gelmiştir (42).

Birkaç farklı HLA antijeninin tek bir antikor tarafından tanınması HLA antijenleri arasındaki çapraz reaksiyonlar olarak bilinir. Çapraz reaksiyonlar, çapraz reaktif grup (cross reaktive group-CREG) antijenler arasındaki aminoasit sekanslarındaki ortak bölgelerden kaynaklanır. İki antijen benzer epitoplara sahip olabilir veya benzer aminoasit polimorfizmine sahip olabilir. Bir antikor, aynı eplete sahip allellerle farklı MFI değerleri gösterebilir. Bu farklılığın, aminoasit konfigürasyonundaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı eplete sahip allellerdeki MFI değerleri arasındaki farklılıktan dolayı peptite bağımlı HLA antikorları tanıma gündeme gelmektedir (59,60,61).

Resse et al. yaptıkları bir çalışmada, hasta ve verici arasındaki çapraz uyum testlerinin negatif olmasına rağmen PRA seviyesinin pozitif olarak değerlendirildiği durumda, hasta ve verici arasındaki uyumsuz doku allelleri için epitop analizini gerçekleştirmiştir. Buna göre sadece uyumsuz olan HLA antijenlerine karşı değil, hasta-donör çiftinin her ikisinde de bulunmayan antijenlere karşı da antikor geliştirildiği belirlenmiştir. Epitop analizinde ise, MFI değeri düşük bile olsa, donörün antijenleri ile aynı epitopa sahip HLA antijenlerine karşı da antikor üretilebileceğini bildirmişlerdir (59).

Antikorları oluşturan B hücresi gelişimi esnasında VH ve VL antikor genlerinde yeniden düzenlenme meydana gelir. Bu yeniden düzenlenen antikor genleri B hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin repertuarlarının kendilerine özgü HLA epitoplarını tanımasını sağlar. Bu reseptörlerin üç ağır üç hafif zinciri vardır (CDR). CDR bölgeleri yüzeyde bulunan epitop bölgeleri ile temas kurar. Ağır zincirin üçüncü CDR bölgesi (CDR3)

en fonksiyonel ve değişken olan aminoasit kompozisyonuna sahiptir ve yapısal olarak en etkili epitop bölgelerini tanımada etkili rol oynar (62).

Anti-HLA antikorlarının gelişmesi gebelik, kan transfüzyonu ve transplantasyon öyküleri ile oluşur. Hastada nakil öncesinde vericinin HLA antijenlerine karşı antikorların varlığı organ transplantasyonunda graft sağkalımı açısından önemlidir. Nakil öncesinde vericinin HLA antijenlerine karşı HLA antikorunun saptanması cross match testinin pozitif olmasıdır ve organ nakli yapılamaz (42,63). Nakil öncesinde yapılan anti-HLA antikorunun tespit yöntemleri komplemana bağlı olarak reaksiyon gözlemlenen CDC-PRA, akım sitometri yöntemi olan Flow-PRA veya yüzlerce HLA antijeni veya antijenleri ile kaplı mikro boncuğu çok kısa sürede çift lazer sisteminden geçirip değerlendiren Luminex-PRA ile yapılır (3,35). CDC-PRA yönteminde kompleman bağımlı antikorların tespit edilebilirken Luminex-PRA yönteminde kompleman kullanılmadığından komplemana bağımlı ve bağımsız antikorların topluca tespit edilir. CDC-PRA metodu ile antikor analizi; popülasyondaki yaygın HLA antijenine sahip olan vericilerin periferik kanlarından lenfositler elde edilip ve potansiyel organ nakli alıcı hastaların serumları ile karıştırılır. Vericiye spesifik antikorların varsa uygun antijen ile birleşmesi beklenir. Kompleman eklendiğinde komplemanı aktive edici antikorların aktivasyonu ile membran atak kompleksi oluşur ve antikor bağlanan hücrenin plazma zarında geniş por kompleksleri oluşur. Por kompleksi oluşmuş hücreler moleküler ağırlığı büyük olan kırmızı boyayı porlardan içeri alır, kırmızı boya por kompleksi oluşmamış hücre zarından geçemez. Antijen-Antikor reaksiyonu oluşmamış durumda kompleman bağlanamayacağından hücre zarında por kompleksleri oluşmayacaktır bu durumda kırmızı boya hücreye giremeyecek onun yerine moleküler ağırlığı düşük hücre zarından geçebilen yeşil boya ile hücre sitoplazması boyanacaktır. Mikroskop altında kırmızı ya da yeşil boya oranları skorlanarak HLA antijenine karşı oluşmuş kompleman ile bağlanabilen anti-HLA antikorları tespit edilir. Kırmızı boya alan hücreleri barındıran kuyular göz önünde bulundurularak total kuyulara göre yüzdesi alınır ve paneldeki reaktif antikor düzeyi belirlenmiş olur (22, 40,42).

Gelişen teknolojiyle birlikte CDC-PRA yöntemi ile antikor analizinin yerini boncuk temelli solid faz teknikleri ile antikor tayini almıştır. CDC-PRA yönteminde kullanılan hücrelerin canlılığını koruma gereksinimi analizde problemlere yol açmaktaydı. Boncuk temelli solid faz yöntemleri bu sorunun önüne geçilmiş oldu (42, 43, 51).

Çalışmamızda göstermek istediğimiz, CDC lenfosit hücre paneli ile kompleman bağımlı sitotoksitate testini kullanıp taramada pozitif olan PRA'ların hücre yüzeyindeki HLA antijenlerinin hangi epitoplarını tanıdığı fizyolojik şartlarda göstermektir.

Anti-HLA antikoru varlığını tespit ettikten sonra (n=52) antikor tanımlaması yaptığımız (n=41) serumları terasaki plaklarına yerleştirdik. Antikor tanımlaması yapılmış serumlardan 8 tanesi YOS serum olarak belirlendiğinden bir ileri tetkik olan SAB testi ile mevcut antikorlarının antijenleri belirlendi. Laboratuvarımıza doku tiplendirmesi istemi ile başvurmuş gönüllü verici adayların periferal kanlarını alarak canlı hücre elde ettik. Lenfositlerin yüzeyinde bulunan HLA antijenlerini tespit ettiğimiz her vericinin lenfositleri plaklarda haritalanmış serumlarla muamele edildi ve reaksiyonlar gözlemlenip değerlendirildi.

B27-4 no'lu serumda, Luminex PRA ile MFI değeri 8884 olarak belirlenen B7 antikoru olduğu bilinmektedir. Bu serum CDC-PRA ile testlendiği 25 hücreden 3'ü ile (CH1; B*35 B*51,CH6; B*40 B*50,CH18; B*07 B*51,CH20; B*35 B*58) yüksek pozitiflikte reaksiyon verdi. Reaksiyon görmeyi beklediğimiz ancak reaksiyon vermeyen hücre grupları ise CH8; B*07 B*44, CH21 B*07 B*18 şeklindedir. Reaksiyon gözlenmesinin nedeni; serumun sahip olduğu antikorun alt tipiyle, serumun üzerine eklediğimiz antijenin gurubunun alttipleri farklılığından, serumdaki antikor ve hücredeki epitop farklılığından veya serumdaki antikorun komplemana bağımlı bir antikor olmaması ile açıklanabilir. Dolayısıyla kompleman bağımlı sistemi kullandığımız CDC-PRA testinde reaksiyonu gözlemleyemeyebiliriz. Örneğin; B27-4 serumunu böbrek alıcı adayı, eklenen hücreleri de böbrek verici adayı olarak düşündüğümüzde ve B*07 HLA antijenine sahip verici adaylarından CH8 ve CH21 ile B27-4 serumuna sahip alıcı adayının doku tiplerinin transplantasyon için uygun olduğu durumda; B27-4 serumunda Luminex PRA testi ile B7 antikoru varlığı görülmesine rağmen, çalışmamızdaki verilere göre bu iki verici adayının lenfositleri ile alıcı adayının serumu arasında bir nevi çapraz uyum testi gibi işlev gören CDC-PRA testinde reaksiyon gözlenmediği için bu hücre tipine sahip verici adaylarından transplantasyon yapılabilir. Ancak yine B*07 antijenine sahip CH18 verici adayından CDC-PRA testinde reaksiyon varlığından dolayı böbrek transplantasyonu düşünülemez. Aynı durum A2, DR13,DR52 antikorları olduğu bilinen Geb-7 serumunda da görüldü. A*02 HLA antijenine sahip CH21 ile yapılan CDC-PRA testinde serum reaksiyon vermedi. Diğer HLA A*02 antijenine sahip hücreler ile yüksek reaksiyon verdiği görüldü (Tablo 9).

Tx-2, 3, 4, 5, 6, 9 numaralı serumlarda PRA pozitifliği olduğu bilinmesine rağmen bu serumlar hiçbir hücre grubu ile reaksiyon vermedi (Tablo 8). Bu durumda PRA tarama

metodundaki MFI değerlerinin CDC-PRA ile antikor tarama yapılacak kadar yüksek olmadığı düşünölebilir.

MixB-2 no'lu serumda bulunan antikorlar çok çeşitli ve yüksek MFI değerindedir (Tablo12). YOS olarak adlandırılan en az %90 HLA antijenleriyle reaksiyon verdiği için laboratuvarımızda PRA pozitif kontrol serumu olarak da kullanılabilir.

CDC- PRA yöntemi canlı hücre izolasyonu temeline dayanır. Çalışmada kullanılan canlı hücreler gönüllülerin periferal kanlarından elde edildi. Sınıf I anti- HLA antikorlarını tanımlamak için yeterli miktarda canlı T hücre, Sınıf II anti-HLA antikorlarını tanımlamak için ise canlı B hücre gerekmektedir (52). Çalışmamızda B ve T hücre ayırımı yapılmamış olup total lenfosit olarak kullanıldı. Periferal kandaki lenfositlerin %70-80'ini T, %10-15'ini B hücre oluşturur (22). MixB-5 ve 11 no'lu serumların sadece sınıf II PRA'ları luminex PRA tanımlama testi ile YOS olarak tanımlandı, sınıf I PRA'ları negatifti. Bu iki serum CDC-PRA yöntemiyle de çalışıldığında kullandığımız hücrelerle reaksiyon gözlenmedi. Sebebi B ve T lenfosit ayırımı yapılmamasına bağlandı.

Tablo 12' de SAB yöntemi ile antikor tanımlaması yapılan serumların antikor tipleri ve karşılarında MFI değerleri belirtilmiştir. Tabloda bu serumlarla testlenen hücre tipleri her bir antikorun tanınması gereken antijenler ile eşleştirilerek verilmiş ve testlenen antijenin sayısı, testlenen antijen ile antikorların verdiği pozitif reaksiyon sayısı ve reaksiyon gözlenmeyen antijen sayıları detayları ile verilmiştir. Pozitif reaksiyon vermesi beklenen yani antijen antikor kompleksi gerçekleşmiş olduğu yorumu yapılırken, reaksiyon gözlenmesi beklenirken reaksiyon vermeyen durumlarda serumlarda var olan antikorların alt tipleri ile serumun testlendiği aynı antijenlerin alt tipleri arasında farklılık olabileceğinden kaynaklanan antikor bağlanma bölgesi değişiklikleri antijen antikor kompleksi oluşmasını engellemiş olabileceği şeklinde değerlendirilir. CDC, Flow ve luminex yöntemleri ile antikor analizi esnasında yanlış negatif sonuç gözlemlenmesinin çeşitli sebepleri olabilir; düşük hassasiyette üretilmiş kitler, serumdaki antikor seviyesinin düşük olması, antijen bakımından yetersiz temsil edilen ticari kitler veya hücre panelleri, bir diğer sebep olarak aşırı serum seyreltilmesidir (64,65). HLA antijenleri polimorfik moleküllerdir bu antijenlere karşı oluşturulan HLA antikorları da çeşitlidir. Bazı HLA antijenleri diğerlerine göre daha antijeniktir, bu sebeple de bu antijenlere karşı gelişen antikorların daha çok tanımlandığı düşünölmektedir (66).

Hücre membranı yüzeyinde yer alan HLA antijenleri moleküler olarak büyük proteinlerdir. Bu sebepten ihtiva ettiği aminoasitlere bağlı olarak protein katlanması

gerçekleşir. Yabancı ortamda alıcının immün sistemi bu proteinin değişik bölgelerini tanımlayabilir. Yani bir proteine karşı birçok antikor üretilebilir. Büyük bir molekülde aynı moleküle karşı oluşmuş farklı antikorlar ve epitoplar vardır. Çalışmamızda alloimmünizasyon neticesi oluşmuş anti-HLA antikorlarını sentetik bir boncuğa yerleştirilmiş küçük HLA fragmentleri eklenmiş tek epitoplu proteinin sadece tek bir kısmını içeren antijenler olarak sunulmuştur. Oluşan antikor eğer kullanılan bu epitopa karşı değil proteinin farklı yüzeyindeki epitopa karşı oluşmuş ise antikor tanımlanamayacaktır. Duqensoy ve ark. yaptıkları bir vaka çalışmasında yüksek çözünürlükte yapılan doku tiplemesiyle B*44:03 antijeni belirlenmiş alıcı ile C*07:04 antijenine sahip olduğu bilinen vericiden organ transplantasyonu gerçekleştirilmiş. B*44:03 antijenin B*44:02 antikoru ile reaksiyon gösterdiği bilinmekteydi. C*07:04 antijeninin ise 156DA epletine sahip olduğu ve B*44:02 ve bir grup HLA-B allelini (B*08:01, B*37:01, B*41:01, B*42:01, B*44:02) içeren alleler ile bu epleti paylaştığı bilinmekteydi. Dolayısıyla alıcının serumunda tüm bu antikorlara karşı reaksiyon gerçekleşmiştir (58).

Bu durum benzer çalışmamızdaki Luminex SAB yöntemi ile içeriğindeki antikorlar belirlenmiş MixA-5, MixB-2, MixB-4, MixB-6, MixB-7, MixB-8, MixB-9 serumlarında gözlemlendi. (Tablo10, Tablo 11) MixA-5 serumunda Luminex SAB yöntemi ile A*24:02 ve A*24:03 antikoru yüksek MFI ile tespit edildi. Düşük çözünürlükte tespit edilmiş HLA-A*24 antijeni içeren 8 farklı hücre ile CDC-PRA yöntemi ile testlenen bu serum 5'i ile reaksiyon gösterirken 3'ü ile göstermedi. Bu durumda reaksiyon gözlenmeyen diğer A*24 antijenlerinin eplet bölgelerinin bu antikorlarla ortak olmadığı düşünülebilir.

Aynı şekilde Luminex SAB yöntemi ile anti-HLA A*01:01 antikoru tespit edilmiş MixB-8 serumunun toplamda testlenen 5 farklı HLA A*01 antijenine karşı 1 doğru pozitif ve 4 yanlış negatif göstermesi A*01 antijenlerinin eplet bölgelerinin farklarından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızdaki sonuçlardan elde ettiğimiz veriler fizyolojik olarak hücre ve hücre yüzeyinde tam bir protein olarak antijeni kullanmanın antikoru hangi epitopa karşı veya aynı proteinin gerçekte hiçbir epitopa karşı reaksiyon vermediği fakat oluşan antikorum epitop benzerliğinden dolayı başka HLA allelleriyle reaktif olduğu gösterilmiştir. Ayrıca solid faz tekniklerle tespit edilmiş anti-HLA antikoru olmasının, o antikorum antijenini barındıran lenfositler ile yapılan komplemana bağımlı testlerde de reaksiyon vereceği anlamına gelmediği görülmüştür.

CDC yöntemi ile antikor tanımlaması için güvenilir ve ekonomik test olan CDC-PRA yönteminin halen laboratuvarlarda kullanılamamasının nedeni yöntemin gerektirdiği canlı hücrelerin canlılığını korumadaki sorunlar tespit edilen tüm HLA antijenlerini içeren hücre gruplarını bulmaktaki zorluklar ana sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. korumadaki sorunlardır. CDC-PRA yönteminin anti-HLA antikorunun HLA proteindeki epitopu tanımasını fizyolojik şartlarda gösterilmesi antikorun antijene spesifitesi ve aviditesi için altın standart test olabileceği, maliyetin de diğer metodlara göre düşük olması transplantasyona hizmet veren doku tipleme laboratuvarlarında yerel ya da bölgesel olarak hazırlanabilecek bir test olduğunu gösterdik.



ÖZET

ALLOİMMÜNİZASYONLA OLUŞAN ANTI-HLA ANTİKORLARININ MİKROLENFOSİTOTOKSİSİTE YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Bu çalışmada anti-HLA antikor oluşum sebeplerinden kan transfüzyonu, gebelik ve transplantasyon öyküsüne sahip olan KBY hastalarından alınan serum örneklerinin fizyolojik şartlara yakın ortamda antikor antijen etkileşimi gözlemlenebilen mikrolenfositotoksosite yöntemi ile panel reaktif antikor taraması yapıldı. Bunun için laboratuvarımıza rutin anti-HLA antikor taraması için başvuran KBY hastalarının arasından Luminex PRA tarama sonuçlarındaki HLA sınıf I ve HLA sınıf II pozitifliğine göre hastalar seçildi. Ardından 21 seruma sınıf I tanımlama, 8 seruma sınıf II tanımlama, 13 seruma hem sınıf I hem sınıf II Luminex PRA tanımlama testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 5 farklı temada terasaki plakları düzeninde serumlar laboratuvarımıza başvuran doku tipi bilinen verici adaylarından elde edilen lenfositler serumların üzerine eklenerek mikrolenfositotoksosite yöntemi ile testlendi. Sentetik boncukların üzerine HLA fragmentlerinin yerleştirilmesi ile antikor tanımlaması yapılan Luminex PRA yönteminin fizyolojik şartlarda gerçek hücre üzerindeki HLA antijenleri ile antikor birleşmesi sağlayan mikrolenfositotoksosite yöntemi ile her zaman aynı antikorları saptamadığı görüldü.

Anahtar sözcükler: Anti-HLA antikorları, mikrolenfositotoksosite, PRA

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ANTI-HLA ANTIBODIES PRODUCED BY ALLOIMMUNIZATION BY MICROLYMPHOCYTOTOXICITY METHOD

In this study, panel reactive antibodies were screened in Chronic Kidney Disease (CKD) patient sera samples who had blood transfusion, pregnancy, and previous transplantation history by microlymphocytotoxicity method which was performed under conditions similar to physiological conditions. For this purpose, the samples were selected from the patients, who applied to our laboratory for routine anti-HLA antibody screening test, according to their Luminex PRA class I and II positive results. 21 sera samples were identified for class I PRA, 8 samples were identified for class II PRA, and 13 samples were identified for both class I and class II PRA by Luminex PRA identification method. These sera were then added on the wells of Terasaki plates which were designed in 5 different theme according to the identification results. The lymphocytes obtained from donors, whose HLA tissue types were known, were tested by adding on the sera samples on Terasaki plate for microlymphocytotoxicity method. In conclusion, it was determined that the results obtained from antibody identification by HLA fragments attached to synthetic beads for Luminex PRA identification method were not always the same as the results obtained from identification under physiological conditions.

Keywords: Anti-HLA antibodies, microlymphocytotoxicity, PRA

KAYNAKLAR

1. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol* 2009;125 (2): 324-335
2. Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, Gebel HM. Evolution of HLA antibody detection. *Immunologic Research* 2004; 29(1): 41-53
3. Picascia, Antonietta, et al. "Lights and shadows of anti-HLA antibodies detected by solid-phase assay." *Immunology letters* 162.1 (2014): 181-187.
4. Kupiec-Weglinski JW. Graft rejection in sensitized recipients. *Ann Transplant.* 1996; 1(1): 34-40.
5. Yalçın AU, Akpolat T. Kronik Böbrek Yetmezliği. Türk Nefroloji Derneği, http://www.tsn.org.tr/folders/file/kronik_bobrek_yetmezligi.pdf (01.03.2015)
6. Halloran PF, The clinical importance of alloantibody mediated rejection. *Am JTransplant.* 2003; 3: 639-640.
7. Medline Plus. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000471.htm> (01.03.2015)
8. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 1998; 2:54-58
9. Tanrıverdi, M. H. "Kronik böbrek yetmezliği." *Konuralp Tıp Dergisi* 2010.2 (2010): 27-32.
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell* (5th ed), Garland Science, New York, 2008: 1524-1561
11. Mak TW, Saunders ME. *Primer to the immun response.* Academic Press, Burlington, 2008: 104-107
12. Stavropoulos-Giokas C, Dinou A, Papassavas A. The Role of HLA in Cord Blood Transplantation. *Bone Marrow Research* 2012;1-9
13. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens* 2012; 80: 1–11
14. Mehra KN, Kaur G. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003; 5.
15. Mak TW, Saunders ME. *The Major Histocompatibility Complex.* Elsevier, Oxford, UK, 2008:p283-289
16. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology* (5th ed), W. H. Freeman & Company, 2002: 2-53
17. Dyer P, McGilvrayb R, Robertsona V, Turnera D. Status report from ‘double agent HLA’: Health and disease. *Molecular Immunology* 2013; 55: 2–7
18. Bontadini A. HLA techniques: Typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. *Methods* 2012; 56: 471–476
19. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology* (5th ed), W. H. Freeman & Company, 2002: 166
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology* (7th ed), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012: 89-136
21. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology* (5th ed), W. H. Freeman & Company, 2002: 36-39
22. Karp G. *Cell and Molecular Biology* (6th ed), John Wiley&Sons, USA, 2010: 693
23. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology* (5th ed), W. H. Freeman & Company, 2002: 76-87
24. Peakman M and Vergani Diego. *Basic and Clinical Immunology.* New York, Churchill Livingstone, 1997: 33-39

25. Lashley EELO, Meuleman T, Claas FHJ. Beneficial or Harmful Effect of Antipaternal Human Leukocyte Antibodies on Pregnancy Outcome? A Systematic Review and Meta-Analysis. *American J of Repro Imm* 2013; 70: 87-103
26. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology* (5th ed), W. H. Freeman & Company, 2002: 53
27. Abbas K ve ark. *Temel İmmünoloji*, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2012.
28. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P and Marsh SGE. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research* 2013; 41: 1222–1227
29. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/immunoglobulin>
30. Duquesnoy RJ. The antibody response to an HLA mismatch: a model for nonself–self discrimination in relation to HL A epitope immunogenicity. *Int J Immunogenetics* 2011; 39: 1-9
31. Murphy, Kenneth M. "Comprar Janeway's Immunobiology 8th Ed.| Kenneth M. Murphy| 9780815342434| Garland Science." *Janeway's Immunobiology 8th Ed.*-9780815342434-63, 60 (2012).
32. Madigan MT, Martinko JM. *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson Prentice Hall, 2006: 727-778
33. Mak TW, Saunders ME. *Primer to the immun response*. Academic Press, Burlington, 2008: 63
34. Actor JK. *Immunology and Microbiology* (2nd ed), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012: 33-38)
35. Haarberg, Kelley MK, and Anat R. Tambur. "Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation." *British medical bulletin* 110.1 (2014): 23-34.
36. FEN, Turgay, et al. "Kan ve Kan Ürünü Transfüzyonlarında Lökositlerin Neden Olduğu Komplikasyonlar."
37. Bostock, I. C., et al. "Probability of deceased donor kidney transplantation based on% PRA." *Transplant immunology* 28.4 (2013): 154-158.
38. Zheng J. *Recent Advances in Research on the Human Placenta*, Intech, Rijeka, 2012: 211-232
39. Reed, Elaine, et al. "The alloantibody response of pregnant women and its suppression by soluble HLA antigens and anti-idiotypic antibodies." *Journal of reproductive immunology* 20.2 (1991): 115-128.
40. Choo SY. Immunogenetics of the HLA system. *Yonsei Med J.* 1991; 32,
41. Kronik Böbrek Yetmezliğinde Anemi Ve Eritropoetin Kullanımı Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 1998; 2:54-58
42. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi I Official Journal of the Turkish Society of Nephrology 2003;12 (1) 52-60
43. Karahan, Gonca Emel, Fatma Sevcan OĞUZ, and Mahmut N. ÇARİN. "Renal re-transplantasyona hazırlanan hastaların anti-HLA antikor durumları ile ilgili yaklaşımlar." *Gaziantep Medical Journal* 15.3 (2009): 36-41.
44. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology* (5th ed), W. H. Freeman & Company, 2002: 300 - 318
45. Dunbar SA, Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta*, 2006;1-2:71-82
46. Cruse, Julius M., and Robert E. Lewis. *Atlas of immunology*. CRC Press, 2010.
47. Lolis, Elias, and Richard Bucala. "Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock." *Nature reviews Drug discovery* 2.8 (2003): 635-645. Şekil 6 için
48. Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* 2012;16:12–7
49. Nwakanma LU, Williams JA et al. Influence of Pretransplant Panel-Reactive Antibody on Outcomes in 8,160 Heart Transplant Recipients in Recent Era. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 1556-1563
50. Cruse JM, Lewis RE. *Atlas of Immunology* (2nd ed), CRC Press, Florida, 2004: 579-610

51. Pirim I, Soyoz M, Ayna TK, Kocyigit AO, Gurbuz BC, Tugmen C, Kurtulmuş Y, Ozyılmaz 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
52. Howell, W. M., V. Carter, and B. Clark. "The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques." *Journal of clinical pathology* 63.5 (2010): 387-390.
53. Altermann WW, Seliger B, Sel S et al. Comparison of the established standard complement-dependent cytotoxicity and flow cytometric crossmatch assays with a novel ELISA-based HLA crossmatch procedure. *Histol Histopathol* 2006; 21: 1115-1124
54. Dalva K, Beksac M. HLA Typing with Sequence –Specific oligonucleotide Primed PCR(PCR-SSO) and Use of the Luminex Technology. *Methods in Molecular Medicine*, vol134, 61-69.
55. Eng HS, Bennett G, Bardy P at al. Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Human Immunology* 2009; 70: 595-599
56. Tait BD, Hudson F, Cantwell L et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology* 2009;14: 247-254
57. Duquesnoy, R. J. "Update of the HLA class I eplet database in the website based registry of antibody-defined HLA epitopes." *Tissue antigens* 83.6 (2014): 382-390.
58. Duquesnoy, Rene J. "HLA matching at the epitope level: The way to go." *Clinical transplants* (2013): 441-451.
59. Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC) to Detect Anti-HLA Antibodies: Old but Gold Patricia Keiko Saito,¹ Roger Haruki Yamakawa,¹ Lucieni Christina Marques da Silva Pereira,¹ Waldir Ver'issimo da Silva Junior,² and Sueli Donizete Borelli^{1*}
60. Resse M et al. Epitope specificities of HLA antibodies: The effect of epitope structure on luminex technique dependent antibody reactivity. *Human Immunology* 2015;76(4): 297-300
61. Duquesnoy RJ. HLA Epitope based matching for transplantation. *Transplant immunology*, 2014; 31(1):1-6.
62. Duquesnoy, R. J. "The Antibody Response to HLA Mismatch: Putting Together the Pieces of a Puzzle." *American Journal of Transplantation* 15.12 (2015): 3019-3020.
63. Tinckam, Kathryn J., and Anil Chandraker. "Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 1.3 (2006): 404-414.
64. Wade JA et al. HLA mismatching within or outside of cross-reactive groups (CREGs) is associated with similar outcomes after unrelated hematopoietic stem cell transplantation *Blood* 2007; 109(9): 4064-4070.
65. Methodologies for Anti-HLA Antibody Screening in Patients Awaiting Kidney Transplant: A Comparative Study
66. Pirim ve ark. Kronik Böbrek Yetmezliği Olan Hastalarda Anti-HLA Antikorlarının Tanımlanması. *Türkiye Klinikleri*, 2016

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Bursa' da doğdum. 2008 yılında Bursa Osmangazi Lisesi'nden mezun olup, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım. 2013 yılında mezun olup aynı yıl İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.