

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**BÖBREK TRANSPLANTASYONUNDA CROSS
MATCH TESTLERİNİN SONUÇLARI İLE HLA
ALLELLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mine Münevver ÖZBAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**BÖBREK TRANSPLANTASYONUNDA CROSS
MATCH TESTLERİNİN SONUÇLARI İLE HLA
ALLELLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mine Münevver ÖZBAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fahri UÇAR

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lians tezi olarak kabul edilmiştir. 26/06/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fahri UÇAR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. İbrahim KESER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR
Alladdin Keykubat Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Mine Münevver ÖZBAY

İmza



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Fahri UÇAR

İmza



TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitim-öğretimim sürecinde; teorik dersler ve tez çalışmam aşamasında bilgi ve deneyimlerini şahsımla paylaşan, çalışma azmimi artırıp bilimsel katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fahri UÇAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazımı aşamasında bilgi, beceri ve tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. İbrahim KESER, tez çalışma kapsamındaki hastaların etiyojilerine ulaşılmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Bülent AYDINLI, Sayın Prof. Dr. Hüseyin KOÇAK ve tüm organ nakli ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmaları aşamasında şahsımla tecrübelerini paylaşan Doku Tipleme Laboratuvarı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman sonsuz sevgi ve destekleri için aileme, en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Işığıyla, muhteşem enerjisiyle bana kattıkları için sevgili yeğenim Alya'ya ve bu süreçte tüm yoğunluğuna rağmen desteğini esirgemeyen biricik annesine sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Organ nakli öncesinde yapılan immunogenetik testlerden alıcı ile verici arasındaki çaprazlama testleri organ nakilleri ve özellikle de böbrek nakilleri için son derece önemlidir. Bu çalışmada kronik böbrek yetmezliği (KBY) tanısı almış hastaların HLA allel frekansları ile en duyarlı çaprazlama yöntemi kabul edilen Luminex DSA çaprazlama sonuçları arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 2015 ila 2018 yılları arasında yapılan 586 hastaya ait Luminex-DSA sonuçları ile HLA allel frekansları geriye dönük olarak analiz edilmiştir.

Yöntem: Hasta ve verici adaylarının HLA-A, B, DRB1 doku tipinin belirlenmesi PCR-SSOP -Luminex yöntemi ile (Gen-Probe) Lifecodes HLA kitleri kullanılarak yapıldı. Çaprazlama testi için Luminex DSA metodu üreticinin protokolüne göre yapıldı. İstatistiki analizler için SPSS Statistics 23.0 ve Arlequin v3.5.2.2 programları kullanıldı.

Bulgular: KBY hastalarında HLA-A*02 (%22), A*24 (%16), A*03 (%11), HLA-B*35 (%17), B*51 (%14), HLA-DRB1*11 (%22), DRB1*04 (%18) ve DRB1*03 (%11) en sık görülen alleller olarak saptanmıştır. Hastalar ile donörler arasında yapılan Lum-DSA XM testlerinin %14 (n=82)'ünün pozitif, %86 (n=502)'sının negatif olduğu görüldü. İstatistiksel analizlerin sonucuna göre, HLA-A*29 (p=0.003), HLA-B*08 (p=0.036), HLA-DRB1*01 (p=0.001) ve HLA-DRB1*03 (p=0.0384) allelleri ile Lum-DSA XM arasında pozitif ilişki bulundu.

Sonuç: Kronik böbrek hastalarından elde ettiğimiz çalışma sonuçlarımıza göre Luminex DSA- XM yöntemi ile HLA allel frekansı arasındaki pozitif ilişkili allellerin belirlenmesi literatüre katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: HLA allel frekansı, flowsitometrik cross-match, lenfosit cross-match, luminex cross-match, organ nakli

ABSTRACT

Objective: Crossmatching as part of the immunogenetical testing is very important prior to organ transplantation, particularly kidney transplantation. The aim of this study was to investigate whether there was an association between frequencies of HLA alleles in chronic kidney disease patients and the results of Luminex DSA crossmatching, considered to be most sophisticated crossmatching method. For this purpose, results of Luminex-DSA-crossmatching tests, performed between 2015 and 2018, belonging to 586 patients were retrospectively analysed.

Method: HLA typing of donor and recipient candidates were performed by using PCR-SSOP-luminex method (Gen-Probe) with Lifecodes HLA kits. For crossmatching, Luminex DSA method was performed according to manufacturer's instruction. For statistical analysis SPSS Statistics 23.0 and Arlequin v3.5.2.2 programs were used.

Results: In CKD patients, HLA-A*02 (22%), A*24 (16%), A*03 (11%), HLA-B*35 (17%), B*51 (14%), HLA-DRB1*11 22(%), DRB1*04 (18%), DRB1*03 (11%) were determined to be as the most frequent alleles. Luminex DSA XM test results between donor and recipients were determined to be 14% positive and 86% negative. Statistical analysis demonstrated a positive correlation between HLA-A*29 (p=0.003), HLA-B*08 (p=0.036), HLA-DRB1*01 (p=0.001), HLA-DRB1*03 (p=0.0384) alleles and Luminex DSA XM.

Conclusion: Positive relationship between frequency of HLA alleles and Luminex DSA XM method we observed in CKD patients will contribute to the literature.

Keywords: Frequency of HLA alleles, Lymphocyte cross match, flow cytometric cross-match, luminex cross-match, organ transplantation

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kronik Böbrek Yetmezliği	2
2.1.1. Tanım	2
2.1.2. Sınıflama	3
2.1.3. KBY Etiyolojisi	4
2.1.4. Türkiye'de Kronik Böbrek Yetmezliği	5
2.2. MHC (Majör Histocompatibility Complex)	5
2.3. MHC molekülleri HLA Sınıf I Yapısı	8
2.4. MHC molekülleri HLA Sınıf II Yapı	9
2.5. HLA Genlerinin Kalıtımı ve Hastalık İlişkileri	12
2.5.1. Kodominant Kalıtım	12
2.5.2. HLA ve Hastalık İlişkileri	13
2.6. Transplantasyon Amaçlı İmmünojenetik Testler	15
2.6.1. Kan Grubu Antijenleri	15
2.6.2. Doku Grubu Antijenleri (HLA)	16
2.6.3. Panel Reaktif Antikorlar (PRA)	16
2.6.4. Kompleman Bağımlı Sitotok Cross Match (CDCXM) Testi	16
2.6.5. Flow Sitometrik Cross Match (FCXM) Testi	16
2.6.6. Lum DSA XM (Luminex Tabanlı Donör Spesifik Antikor) Testi	16
	iii

3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Gereç	17
3.1.1. Çalışma Grupları	17
3.2. Komplemana Bağlı Sitotoksik Lenfosit Cross-Match (CDCXM) Tekniği ve Gerekli Malzemeler	17
3.2.1. CDCXM Test Metaryalleri	17
3.2.2. CDCXM Test Yöntemi	18
3.3. Flow Sitometri ile Lenfosit Crossmatch yöntemi (FCXM) ve Test Metaryalleri	19
3.3.1. FCXM Test Metaryalleri	19
3.3.2. FCXM Test Yöntemi	20
3.4. Luminex Cross-Match (Donör Spesifik Antikor=DSA) Testi ve Test Metaryalleri	21
3.4.1. Lum-DSA XM Test Materyalleri	21
3.4.2. Lum-DSA XM Test Yöntemi	22
3.4.3. Lum-DSA XM Kalite Kontrolü	24
3.4.4. Lum-DSA XM Test Analizi	24
3.5. Panel Reaktif Antikor (PRA)Testi ve Test Metaryalleri	25
3.5.1. PRA Test Metaryalleri	25
3.5.2. Panel Reaktif Antikor Tarama Yöntemi	26
3.6. HLA-A, B, DRB1 Alellerinin PCR-SSO Luminex Test Yöntemi (Hibridizasyon) ve Test Metaryalleri	27
3.6.1. PCR-SSO Luminex Yöntemi Test Metaryalleri	27
3.6.2. HLA-A, B, DRB1 Alellerinin PCR-SSO Luminex Test Yöntemi (Hibridizasyon)	28
3.7. İstatistik Analiz	29

4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	70



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.2.	Kronik böbrek hastalığının evreleri	3
Tablo 2.1.3.	2017 yılı içinde ilk RRT olarak HD'e başlayan insidan hastaların etyolojik nedenlere göre dağılımı	4
Tablo 2.1.4.	2017 yılı içinde ilk RRT olarak HD' başlayan insidan hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı.	5
Tablo 2.5.3.2.	HLA ile ilişkilendirilen çeşitli hastalıklar	14
Tablo 3.6.1.	MHC Lokusundaki HLA-A, B, DR analizi için PCR döngü program	28
Tablo 4.1.1.	Lum-DSA XM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-A allel frekansları	38
Tablo 4.1.2.	Lum-DSA XM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-B allel frekansları	39
Tablo 4.1.3.	Lum-DSA XM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-DRB1 allel frekansları	40
Tablo 4.1.4.	CDCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-A allel frekansları	41
Tablo 4.1.5.	CDCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-B allel frekansları	42
Tablo 4.1.6.	CDCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-DRB1 allel frekansları	43
Tablo 4.1.7.	FCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-A allel frekansları	44
Tablo 4.1.8.	CXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-B allel frekansları	45
Tablo 4.1.9.	FCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-DRB1 allel frekansları	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1.	Kromozom 6 HLA Gen Bölgesi	6
Şekil 2.2.2.	Fare ve İnsan Karşılaştırmalı MHC Lokusu	8
Şekil 2.3.	HLA Sınıf I Yapısı	9
Şekil 2.4.1.	HLA Sınıf II Yapısı	10
Şekil 2.4.2.	HLA ile Peptid bağlanan gölgesi	11
Şekil 2.5.1.	HLA Kodominant gen ekspresyonu	12
Şekil 4.1.1.	Lum - DSA & CDCXM çaprazlama testleri karşılaştırma tablosu	31
Şekil 4.1.2.	Lum - DSA & FCXM çaprazlama testleri karşılaştırma tablosu	32
Şekil 4.1.3.	Lum - DSA & PRA Sınıf I çaprazlama testleri karşılaştırma tablosu	33
Şekil 4.1.4	Lum - DSA & PRA Sınıf II çaprazlama testleri karşılaştırma tablosu	34
Şekil 4.1.5.	Çalışma grubunda en sık görülen HLA-A allel frekansları	35
Şekil 4.1.6.	Çalışma grubunda en sık görülen HLA-B allel frekansları	36
Şekil 4.1.7.	Çalışma grubunda en sık görülen HLA-DRB1 allel frekansları	37
Şekil 4.1.8.	Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç pozitif olan hastalarda HLA A dağılımı ve frekansları	47
Şekil 4.1.9.	Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç negatif olan hastalarda HLA-A dağılımı ve frekansları	47
Şekil 4.1.10.	Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç pozitif olan hastalarda HLA-B dağılımı ve frekansları	48
Şekil 4.1.11.	Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç negative olan hastalarda HLA-B dağılım ve frekansı	48
Şekil 4.1.12.	Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç pozitif olan hastalarda HLA DRB1 dağılımı ve frekansı	49
Şekil 4.1.13.	Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç negative olan hastalarda HLA DRB1 dağılımı ve frekansı	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

GFR	:	Glomerüler filtrasyon hızı
KBY	:	Kronik böbrek yetmezliği
TND	:	Türk Nefroloji Derneği
HD	:	Hemodiyaliz
PD	:	Periton diyaliz
RRT	:	Renal Replasman Tedavisi
HLA	:	İnsan lökosit antijeni
MHC	:	Temel doku uyumluluk kompleksi
IgG	:	İmmunoglobulin G
CDCXM	:	Komplemana bağımlı sitotoksik çaprazlama testi
FCXM	:	Flow sitometrik çaprazlama testi
DSA	:	Donöre özgü antikor
FBS	:	Fetal Bovine Serum
DTT	:	Ditiyotritol
LMDCR	:	Kurutulmuş lenfosit kontrol lizati
LMLCR	:	Lizat kontrol serumu
LMNC	:	Negatif kontrol serumu
LMPC	:	Pozitif kontrol serumu
Lum-DSA	:	Luminex donöre spesifik antikor
MFI	:	Ortalama floresans yoğunluğu
ASH	:	Antijen sunan hücre
BAF	:	Arkaplan ayarlama faktörü
Lum-DSA	:	Luminex donöre spesifik antikor
CON	:	Kontrol boncukları
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RRT	:	Renal Replasman Tedavisi

1. GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), temelinde yatan sebebe bakılmaksızın son üç aydan uzun süren objektif böbrek hasarı veya glomerüler filtrasyon hızının (GFH) 60 mL/dk/1.73 m²'nin altına inmesi olarak tanımlanmaktadır. Glomerüler filtrasyon hızı 15 mL/dakikanın altına indiği zaman son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) evresinden söz edilir (Muller DN, 2002; Lee et al., 2011). Kronik böbrek yetmezliği gelişiminde temel sorun; böbrek hastalığına yol açan patolojik neden ne olursa olsun, böbrek işlevlerinin geri dönüşümsüz bir şekilde azalması sonucunda hastalığın son dönem böbrek yetmezliği evresine ilerlemesidir. Kronik böbrek yetmezliği tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Türk Nefroloji Derneği (TND) tarafından yapılmış olan CREDIT çalışmasında Türkiye'de erişkin yaş grubunda kronik böbrek yetmezliği (KBY) prevalansı %15.7 olarak bildirilmiştir (Levey ve ark., 2007; Süleymanlar ve Serdengeçti, 2011)

KBY'nin dünyada ve ülkemizde önemli sağlık sorunu olduğu ve sıklığının giderek artmakta olduğu bilinmektedir (Akoğlu E. ve Süleymanlar G., 1996; Foley ve Collins, 2007). TND sonuçlarına göre son 10-15 yılda SDBY prevalansında beş kat, insidansında ise iki kat artış gözlenmiştir (Süleymanlar ve Serdengeçti, 2011). Hastalığın etiolojisinin bilinmesi ve erken tanısı, muhtemel komplikasyonların önlenmesi, hastalığın ileri evrelere geçmesinin geciktirilmesi ve RRT için tam zamanında hazırlık yapılması açısından çok önemli olduğu belirtilmektedir (Seyahi ve ark., 2017). Günümüzde HLA alleleri ile çeşitli hastalıklar arasındaki ilişkilerin araştırılması giderek daha fazla önem arz etmektedir. Dünyada ve ülkemizde çeşitli hastalıklar ile HLA allelleri arasındaki ilişkiyi araştıran bazı yayınlar olsa da KBY'de HLA allel frekansı ile çaprazlama testleri arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma yapılmıştır (Kopple, 2001; Chertow, 2003; Chapman ve ark., 2005; Johnson ve ark., 2013; Güngör T.H., 2017). Çalışmamızda ülkemizin en önemli organ nakil merkezlerinden birisi olan Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli merkezine başvuran kronik böbrek yetmezliği hastalarında HLA doku gruplarıyla Lenfosit Cross-Match (CDCXM), Flow Sitometrik Cross Match (FCXM) ve Luminex tabanlı Donör Spesifik Antikor (Lum DSA XM) çaprazlama test sonuçları arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Yetmezliği

2.1.1. Tanım

Kronik böbrek yetmezliği (KBY); National Kidney Foundation-Dialysis Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQI) tanımlamasına göre; sistemik veya renal hastalıklar nedeniyle oluşan, üç ay ve daha uzun süreli renal hasar sonucu veya glomerüler filtrasyon hızının (GFR) 60 ml/dk/1.73 m²'nin altına düşmesi sonucunda böbrek fonksiyonlarının geri dönüşümsüz kaybı olarak tanımlanmaktadır (Kopple, 2001).

İlerleyici böbrek hasarının oluşum mekanizması tam olarak çözülememiş, multifaktöriyel-poligenik hastalıklar grubunda yer alan kronik böbrek yetmezliği hastalığı çok nadiren de olsa geriye döndürülebilmıştır (Gröne ve ark., 1987). Vücuttaki sıvı-elektrolit dengesinin ayarlanamaması bunun yanında bozulmuş endokrin ve metabolik faaliyetlerin sonucu olarak her sistemi etkileyen klinik bir tablonun bütünü KBY'nin seyridir. Bu tabloda KBY'ne neden olan deformatif faktörler ortadan kaldırılsa dahi böbrek fonksiyonlarındaki bozulmalar daha da artarak devam eder (Foley ve Collins, 2007; McPhee ve ark., 2010). Hastalığın ilerlediği dönem süresince nefron sayısı azalır ve sağlam kalan nefronlarda da anatomik ve fonksiyonel değişimler baş gösterir (Finkelstein ve Hayslett, 1979).

Böbreklerdeki hiperfiltrasyon (artmış sıvı yükü), böbrek atardamarlarında biyolojik birtakım değişikliklere sebep olur ve bunun yanında birçok biyolojik etkenin rol aldığı böbrek dejenerasyonu süreci hızla ilerler (Brenner ve ark., 1996). Bu süreç sonunda glomerüler skleroz ve interstisyel fibrozis ile sonuçlanan bir tablo gelişir (Foley ve Collins, 2007; Johnson ve ark., 2013). Hastalığın seyri ve ortaya çıkış nedenleri arasında hasta yaşı, cinsiyeti, genetik yatkınlık gibi biyolojik faktörlerin yanı sıra, hipertansiyon, hastada proteinüri gelişmesi gibi fiziksel olaylar da sayılabilir. Litaratürde APOL1, MYH9, UMOD genleri gibi birçok genin hastalığın ortaya çıkmasından sorumlu olduğu bildiren yayınlar mevcuttur (Beckerman ve ark., 2017). Bağışıklık sisteminin de hastalığın ortaya çıkması ve mekanizmasının açıklanmasında yadsınamaz bir rolü olduğu bilinmektedir (Walker ve ark., 1992). Otoimmünite sebebiyle ortaya çıkan böbrek

hastalıkları ile HLA allelleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar mevcuttur (Simmonds ve Gough, 2007). Bu çalışmalarda ekseriyetle IgA nefropatisi, diyabet bağımlı gelişen bazı nefropatiler, yangılı bağırsak hastalıkları, glomerülonefrit gibi bazı böbrek hastalıkları ve alerjilerdir.

2.1.2. Sınıflama

Aslında böbrek yetmezliği kesin sınırlarla ayırmak mümkün değildir. Literatürde ve ders kitaplarında kesin ayrımlar daha çok öğretici olması amacıyla yapılmaktadır. Günümüzde, fonksiyonel değişiklik derecesine göre hastalığı evreleme klinikte ve tedavi planlanmasında yararlıdır (Kopple, 2001).

Tablo 2.1.2. Kronik böbrek yetmezliğinin evreleri (Goolsby, 2002'den modifiye edilmiştir)

Evre	GFR (ml/dk/1.73 m ²)	Tanımlama
1	≥ 90	GFR normal ya da artmış ≥ 90 Böbrek hasar bulguları mevcut
2	60-80	Hafif azalmış GFR ile birlikte böbrek hasarı bulguları
3	30-59	Orta derecede azalmış GFR
4	15-29	İleri derecede azalmış GFR
5	<15 / veya diyaliz	Son dönem böbrek yetmezliği

Hastalığın ilerlemesiyle GFR<15 evresine ulaşan hastalar; hemodiyaliz (HD), periton diyalizi (PD) ve böbrek nakli gibi tedavilere ihtiyaç duyarlar. Tedavi seçenekleri değişse de (diyaliz veya nakil) asıl hedef hastanın yaşam kalitesini ve süresini uzatmaktır (Chertow, 2003; Akpolat ve ark., 2007).

2.1.3. KBY Etiyolojisi

Son dönem böbrek yetmezliği hastalığının etiyolojisinde diabetes mellitus en sık rastlanan neden olup, bunu hipertansiyon izlemektedir. Ancak, yüksek hipertansiyon oranının primer hipertansif nefroskleroza mı, yoksa tespit edilmemiş başka bir nedene bağlı olarak gelişen böbrek hastalığına sekonder mi olduğu tartışmalıdır (Seyahi ve ark., 2017)

Tablo 2.1.3. 2017 yılı içinde ilk RRT olarak HD'ye başlayan insidan hastaların etiyojik nedenlere göre dağılımı (Seyahi ve ark., 2017)

	n	%
Diabetes mellitus	2226	35.87
Tip 1 DM / Type 1 DM	145	2.34
Tip 2 DM / Type 2 DM	2.081	33.53
Hipertansiyon	1.689	27.22
Glomerülonefrit	421	6.78
Polikistik böbrek hastalıkları	296	4.77
Obstrüktif nefropati	111	1.79
Amiloidoz	109	1.76
Tübülointerstisyel nefrit	85	1.37
Renal vasküler hastalık	58	0.93
Diğer	457	7.36
Etyolojisi bilinmeyen	754	12.15
Toplam	6.206	100.00

Türk Nefroloji Derneği (TND) tarafından yapılmış olan CREDİT çalışmasında Türkiye’de erişkin yaş grubunda kronik böbrek yetmezliği prevalansı %15.7 olarak bildirilmiştir (Anderson ve Glynn, 2011).

Renal replasman tedavileri arasında böbrek nakli tedavisinin hala en iyi yaşam süresine sahip tedavi şekli olduğu bilinmektedir. Toplumda görülme sıklığı 1/1000 olan kronik böbrek yetmezliğinin ortaya çıkış nedeni de ilgili ülkeye göre farklılık göstermektedir. Uluslararası Nefroloji Derneği tarafından desteklenen böbrek hastalıklarının etiyolojisine ve prevalansına yönelik çalışmalarda gelişmekte olan pek çok ülke bu konuda güvenilir

veriler sunmaktan uzaktır (Coresh ve ark., 2003). Türkiye’de 2017 yılında renal replasman tedavisine (RRT) ihtiyaç duyan -çocuk hastalar da dahil- son dönem böbrek hastalığı nokta prevalansının milyon nüfus başına 956.7 seviyesinde olduğu bildirilmiştir (Seyahi ve ark., 2017).

2.1.4. Türkiye’de Kronik Böbrek Yetmezliği

Türkiye’de yapılan ve 2010 yılında yayınlanan CREDİT çalışmasında elde edilen verilere göre KBY’nin Türkiye’deki prevalansı %15,7’dir ve hastaların yaşla birlikte KBY prevalansının da artış gösterdiği saptanmıştır. Altmış yaş altındaki hastalarda prevalans %11,5 iken altmış yaş ve üstünde %38,5’e yükseldiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, tüm ülkede yaklaşık 7,5 milyon KBY hastasının mevcut olduğu tahmin edilmektedir (Süleymanlar ve ark., 2010)

Tablo 2.1.4. 2017 yılı içinde ilk RRT olarak HD’ başlayan insidan hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı (Seyahi ve ark., 2017)

Yaş	Erkek		Kadın		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
0-19	77	0.80	54	0.56	131	1.35
20-44	664	6.86	425	4.39	1.089	11.25
45-64	2.338	24.16	1.458	15.07	3.796	39.23
65-74	1.456	15.05	1.153	11.92	2.609	26.97
≥ 75	1.052	10.87	999	10.32	2.051	21.20
Toplam	5.587	57.74	4.089	42.26	9.676	100.00

2.2. MHC (Majör Histocompatibility Complex = Büyük Doku Uyum Kompleksi)

1980 yılında Nobel’le ödüllendirilen bir buluşa imza atan Dr. George Snell ve arkadaşları, ilk olarak farelerde daha sonra da insanda immünolojik olarak yadsınamaz bir rolü olan bir gen kompleksini tanımlamış ve fonksiyonlarını göstermişlerdir. İnsanlarda ise en güçlü etkiye sahip olan bölgeye, büyük doku uyum kompleksi (majör histocompatibility complex= MHC), daha az etkiye sahip olan bölgeye ise ufak doku uyum kompleksi (minör histocompatibility complex= mHC) denilmiştir (Snell, 1981; Trowsdale, 1995).

İnsanda 6. kromozomun kısa kolunda lokalize olan (6p21.31) bu bölgeye, HLA (Human Lökosit Antigen) denmiştir. Burası yaklaşık 4000 kilobazlık ardışık bir dizi geni içeren 3,5-4 Mbç'lik bir komplekstir. MHC genleri insanlarda bilinen en polimorfik gen bölgesidir (Houghton, 1994; Choo, 2007)



Şekil 2.2.1. Kromozom 6 HLA Gen Bölgesi

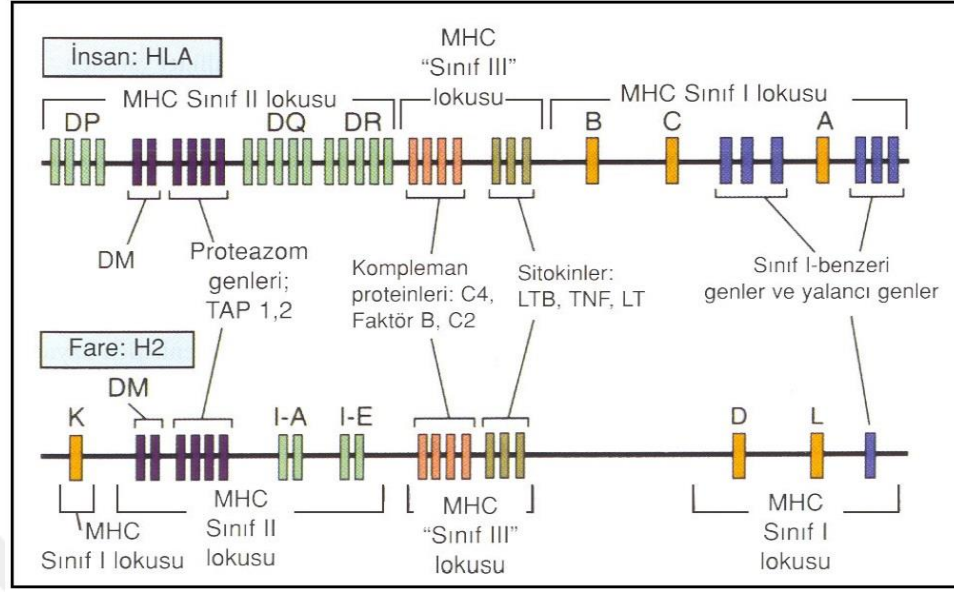
Genomun %0,1' ini temsil eden MHC, 3,8 milyon baz çifti ve yaklaşık 400 gen içerir. Bu genlerden 203 adedinin immün sistemle ilgili olduğu bilinmektedir (Trowsdale, 1995; Neefjes ve ark., 2011).

HLA genleri, immün sistemle ilgili genleri kodladığı gibi aynı zamanda immün dışı genleri de kodlar. MHC moleküllerinin (reseptörlerinin) primer görevi yabancı peptid antijenlerini T lenfositlerine sunmaktır (Robinson ve ark., 2012).

Altıncı kromozomun kısa kolunda yer alan HLA genlerinin kodladığı proteinler aslında hücre yüzeyindeki trans membran özellikli glikoprotein yapısındaki reseptörlerdir. Mendeliyen kalıtım gösteren HLA genleri, mayoz bölünme esnasında kross-overdan

(parça değişimi) kaçarlar. Yavrulara blok halinde aktarılıp kodominant olarak ifade edilirler. MHC, gen ürünlerinin yapısı ve fonksiyonlarındaki farklılığa göre üç bölgeye ayrılmıştır. Bunlar MHC Sınıf II, MHC Sınıf III ve MHC Sınıf I şeklinde sentromerden telomere doğru sıralanır (Klein ve Sato, 2000; Janeway, 2001; Uçar 2010; Uçar 2011). MHC Sınıf II bölgesi HLA DR, DQ, DP, DN, DM, DO lokuslarının yanı sıra antijen işlenmesinden sorumlu genler ile çeşitli psödogenlerini içerir. HLA-DM, TAP1 ve TAP2'den kodlanan moleküller antijenin işlenip sunulmasında görev yaparlar (Esteban ve Zhao, 2004). MHC Sınıf I bölgesi ise klasik HLA genleri olarak bilinen HLA-A, B ve C molekülleri ile HLA-E, F, G gibi klasik olmayan HLA moleküllerini, çeşitli psödogen ve gen segmentlerini kodlayan bölgedir (Houghton, 1994; Tinckam ve Chandraker, 2006). MHC Sınıf III bölgesi Sınıf I ve Sınıf II bölgeleri arasında lokalize olup klasik HLA molekülleri kodlamaz, ancak inflamasyonda son derece önemli olan C4B, C4A, Bleferidin, C2, TNF- α , TNF- β ve lenfotoksin (LT) gibi immün sistemle ilgili diğer molekülleri kodlar. Ayrıca Sınıf III bölgesinde immün sistemele hiç ilgisi olmayan 21-OH, RNA helikaz, kazein kinaz, HSP 70 ve siyalidaz gibi molekülleri de kodlarlar. MHC genlerinden sentezlenen çeşitli proteinler bağışıklık sisteminin düzenlenmesini, vücudun kendinden olanı (self) ile olmayanı (non-self) ayırt etmesini sağlar (Uçar ve ark., 2016; Karakuş B., 2017; Houghton, 1994; Daniels ve ark., 2006)

MHC genlerinde çok sayıda farklı allellerin bulunması ve bu allellerin yüksek polimorfik yapıda olmaları, MHC moleküllerindeki çeşitliliği artırır (Roberts, 2009). Bu çeşitlilik, global ve ölümcül bir enfeksiyon tehdidi durumunda bile yaşamaya devam edecek bazı bireylerin hayatta kalmasını sağlamış olur (Abbas ve Janeway, 2000; K. Abbas, 2007). HLA doku tiplleme testleri günümüzde transplantasyon amaçlı (kemik iliği nakli ve solid organ nakli) olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bundan başka hastalıkların ayırıcı tanısında, adli tıpta, tekrarlayan düşüklerde, farmokogenetik amaçlı, preimplantasyon genetik tanı, populasyon genetiği vb. alanlarda da kullanılmaktadır (Uçar F. ve ark., 2011; Uçar F. ve ark., 2012).



Şekil 2.2.2. Fare ve İnsan Karşılaştırmalı MHC Lokusu (Kumbala ve Zhang, 2013)

2.3. MHC molekülleri HLA Sınıf I Yapısı

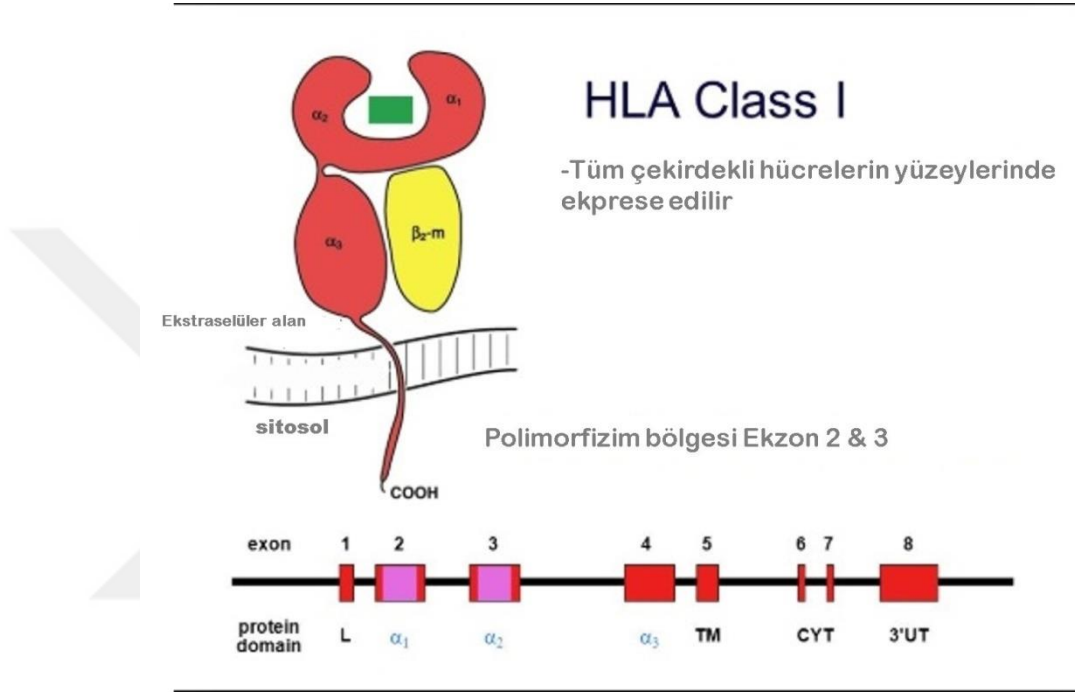
İnsanlarda ilk defa lökositlerin yüzeyinde gösterildiği için insan lökosit antijenleri (human leukocyte antigen; HLA) olarak isimlendirilmiştir (Trowsdale, 1995). MHC moleküler yapı ve fonksiyon olarak birbirlerinden farklı olup üç lokusta incelenirler. Bu lokuslardan ifade edilen moleküller tam bir doğrulukla kendinden olanı ve olmayanı ayırt etme yeteneğine sahiptirler. Kendinden olmayana karşı duyarlı olduğu, yabancı organ ve dokuların rejeksiyonunda rol aldığı bilinmektedir (Trowsdale, 1995; Choo, 2007).

Sınıf I molekülleri (HLA A, B, C) glikoprotein yapısında tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde bulunurlar. Oldukça polimorfiktirler. Monomer yapıdadırlar, 45 Kd'luk $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ alt birimlerinden meydana gelirler.

Sınıf I moleküllerinin görev yapabilmesi için aslında bir akut faz reaktantı olan 15. kromozomdan köken alan 12 Kd'luk $\beta 2$ mikroglobülin gereklidir. Sınıf I molekülleri virüs ve protozoon gibi endojen antijenleri CD8 + T_C lenfositlere sunarlar. Sınıf I molekülleri 9-11 aa'lık küçük sıkışık peptidleri tanırlar (Bjorkman ve ark., 1987; Kazansky, 2008; Van Den Elsen, 2011).

Sınıf I moleküllerinin dördüncü bölgesi ise sitoplazma içerisine giren 30 aminoasitlik intrastoplazmik kısımdır. Bu kısım bütün HLA sınıf I tiplerinde korunmuş olsa da

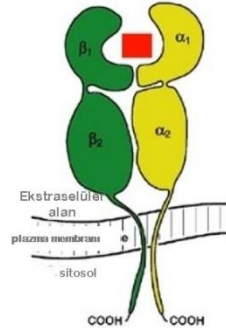
molekülün değişkenlik gösterebilen kısımlarından biridir. Bu kısmın fosforilasyonu, transpeptidasyonu molekülün diğer hücre içi proteinlerle iletişimini sağlarken, bazı kısımların delesyonu da HLA Sınıf I molekülün internalizasyonunu önler (Goldsby, 2003). Mayıs 2019 itibariyle 16.200 çeşit HLA Sınıf I allelleri belirlenmiştir.



Şekil 2.3. HLA Sınıf I Yapısı (Marsh ve ark., 2010)

2.4. MHC molekülleri HLA Sınıf II Yapısı

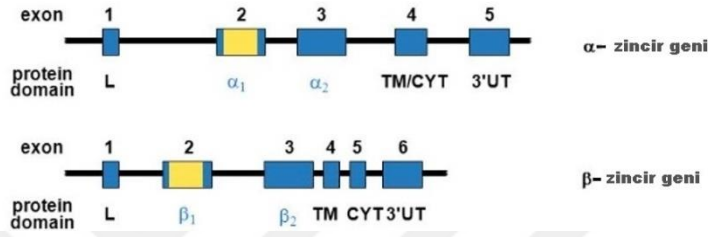
Sınıf II HLA molekülleri (reseptörleri), non-kovalent bağ yapısıyla bir arada tutulan α ve β 'dan müteşekkil iki adet transmembran glikoprotein zincirinden oluşan heterodimerik yapılardır (Janeway ve ark., 2004)



HLA Class II

- immün sistemin bazı özel hücreleriyle sınırlı

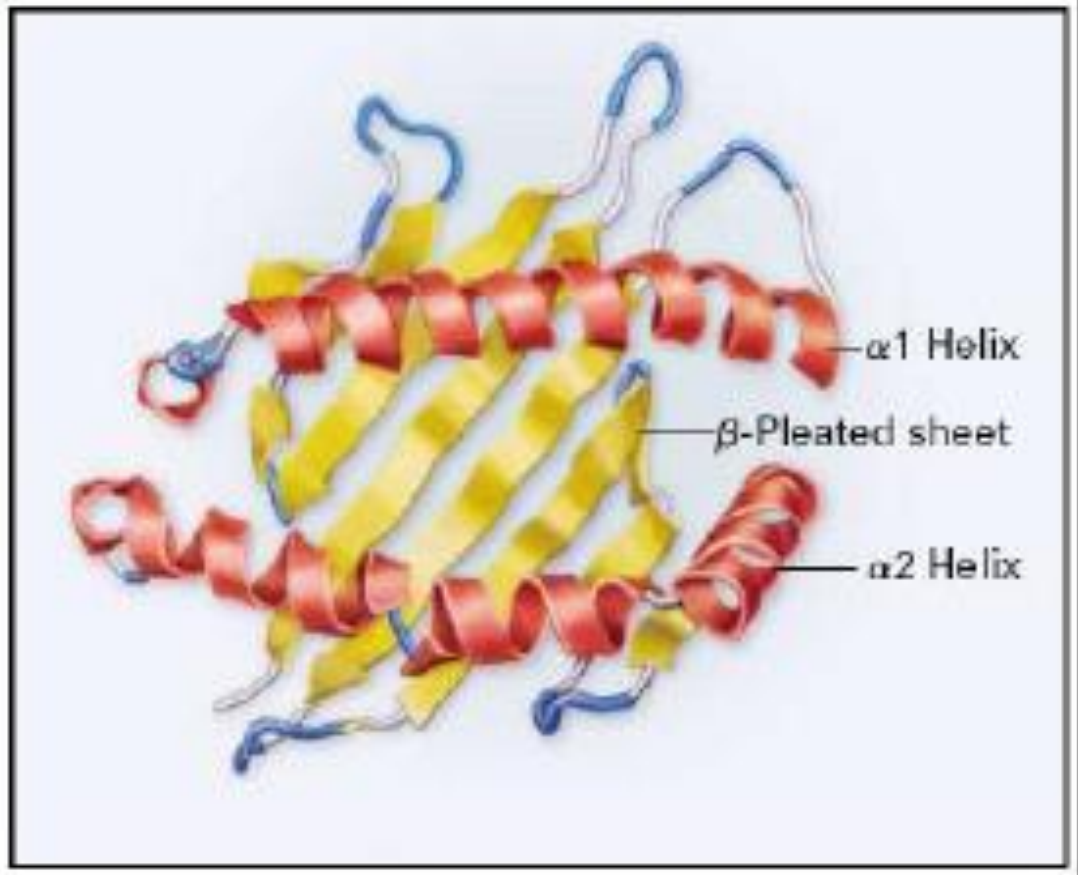
Lokasyon: Ekzon 2



Şekil 2.4.1. HLA Sınıf II Yapısı (Marsh ve ark., 2010)

Sınıf II MHC molekülleri, Sınıf I moleküllerinden farklı olarak benzer büyüklük ve yapıya sahip α (24-32 kDa) ve β (29-31 kDa) zincirlerinden oluşur. Birbirlerine non-kovalent bağlarla bağlıdırlar (Esteban ve Zhao, 2004). Bu zincirler α_1 , α_2 , β_1 , β_2 olacak şekilde her zincir birer lopludur. α_2 ve β_2 domainleri molekülün hücre membranıyla bağlantısını sağlayan globüler yapılar olup peptit bağlanmasında rol oynamazlar (Ugolini ve Vivier, 2000). α_2 kıvrımı MHC-HLA ile antijenin bağlantısını güçlendirir ve stabilize ederken, β_2 kıvrımı MHC-HLA molekülünün T hücre ko-reseptörü ile olan CD4'e bağlanma bölgesini oluşturur. Membranın distaline yerleşen ve polimorfik bir yapıya sahip olan α_1 ve β_1 ise eksojen peptidleri sunar (Consortium, 1999; Karakus, 2017). MHC II molekülleri fagosite edilen bakteri peptidlerini işleyerek CD4+ yardımcı T hücrelerine sunarlar, bunun sonucunda bir immün yanıt oluşur (Petersdorf, 2008). Sınıf II molekülleri, sınıf I moleküllerinden farklı olarak uçları açık yapıdadırlar ve bunun sayesinde de 30 aa'lık büyük peptidleri bağlayabilirler. Molekülün hücre membranını kat eden 25 aa'lık bir hidrofobik kısmı ile sitoplazma içerisine uzanan kısa bir hidrofilik uzantısı vardır. Hidrofilik bu uzantı Sınıf II moleküllerin hücre içi dağılımlarını ve diğer moleküllerle ilişkilerini belirlemede rol oynar (Piertney ve Oliver, 2006). HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ antijenleri sınıf II HLA antijenleridir. Başlangıçta HLA-D olarak adlandırılmış, daha sonra farklı antijenler bulununca D ile ilgili anlamında HLA-DR (D-related) antijeni denmiştir (Marsh ve ark., 2010). Kısaca Sınıf II molekülleri (HLA DR, DQ ve DP) de

glikoprotein yapılı B lenfosit, aktive T lenfosit, monosit, makrofaj, dentritik hücreler vb. yüzeyinde yer alırlar. Sınıf II molekülleri eksojen bakteriler, helmint ve protein kaynaklı eksojen antijenleri CD⁺ TH lenfositlere sunarlar. Fagositoz için çok önemli olan sınıf II molekülleri 10-30 aa'lık büyüklükte peptidleri sunarlar. Mayıs 2019 itibariyle 6.162 farklı HLA Sınıf II allelleri belirlenmiştir.

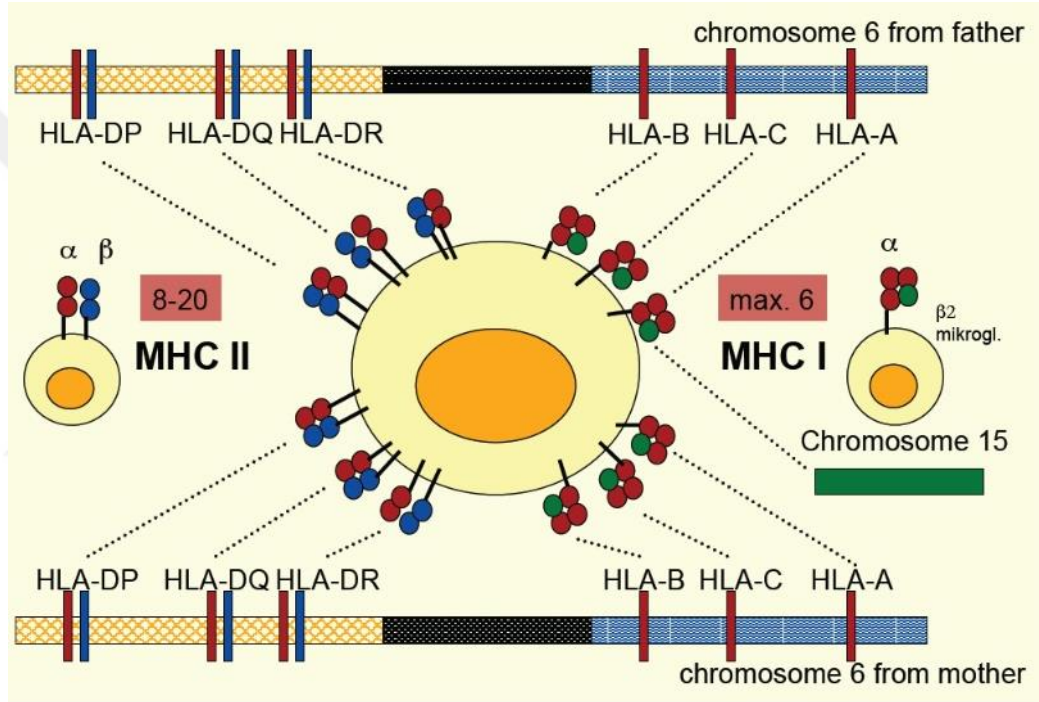


Şekil 2.4.2. HLA ile Peptid bağlanan gölgesi (Klein ve Sato, 2000)

2.5. HLA Genlerinin Kalıtımı ve Hastalık İlişkileri

2.5.1. Kodominant Kalıtım

HLA genleri kodominant olarak eksprese edilen genlerdir. Hem anneden hem de babadan gelen HLA lokusundaki her iki allel birlikte eksprese edilir. Basit Mendel kalıtımına göre 2 kardeşin 2 haplotipinin birden aynı olma şansı %25, bir haplotip ortak olma şansı %50, tamamen farklı haplotip olma şansı %25'dir (Shiina ve ark., 2009; Abbas ve ark., 2014).



Şekil 2.5.1. HLA Kodominant gen ekspresyonu (Relle ve Schwarting, 2012)

HLA Linkage Disequilibrium (bağlantı dengesiziği) enfeksiyonlarla mücadelede önem kazanmaktadır. Bazı Sınıf I ve II allelleri yabancı organ, doku ve organizmalar ile mücadelede daha etkindirler. Daha önce hiç karşılaşılmamış yeni bir patojen antijenlerine sunulma olasılığı artar ve canlının/popülasyonun yok olması önlenmiş olur. Bağlantı dengesizliği; rastlantısal olarak çiftleşme sonucu beklenen bireylerdeki HLA'nın genetik lokusunda bazı allelerin beraber bulunma sıklığının, her iki allellin popülasyonda beraber bulunma sıklığının çarpımına eşit olması durumuna verilen tanımlamadır. Bu kombinasyonların bazıları beklenen sıklıktan daha fazla gözlenmektedir (Trowsdale, 1995; Piertney ve Oliver, 2006; Uçar 2012; Uçar 2016).

2.5.2. HLA ve Hastalık İlişkileri

Toplumdaki geniş HLA gen havuzu ile ilişkili olduğu düşünölen hastalıklarla ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (Uçar 2011; Uçar 2016). Yapılan bunca çalışmaların asıl amacı tedavi planlamak için hastalığın moleköler patogenezinini aydınlatmaktır. Daha çok otoimmün hastalıkların HLA ile ilişkili olduğu çeşitli yayınlarda gösterilmiştir. Bunun yanı sıra alerji ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının da HLA ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Dausset ve Soullillou, 2004; Abbas ve ark., 2014).

Günümüzde farklı HLA allelleri, Ankilozon Spondolit (AS), Romatoid Artrit (RA), Behçet Hastalığı, Çölyak Hastalığı gibi hastalıkların tanısında sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca HLA B'den farmokogenetik olarak faydalanılmaktadır. HLA B*5701 allelini taşıyanlarda abacavir ilacı toksik etki yapar. Bu nedenle HLA-B*57:01 allelini taşıyan AIDS hastalarında HIV tedavisi için abacavir yerine başka bir antiviral ilaç kullanılır.

Tablo 2.5.3.2. HLA ile ilişkilendirilen çeşitli hastalıklar

Hastalık	HLA alleli	Relatif Risk
Ankilozan spondilit	B*27	87.4
Rheumatoid arthrit	DRB1*04	4.2
Behçet hastalığı	B*51	3.8
Systemic lupus erythematosus	DRB1*03	5.8
Insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus	DRB1*03, DRB1*04, DQB1*02	6.4
Narcolepsy	DRB1*02, DQB1*06	5.3
Coeliac hastalığı	DQB1*02, QB1*03, DRB1*03	10.8
Multiple sclerosis	DRB1*02	4.1
Birdshot retinochoroidopathy	A*29	109.0
Hodgkin's hastalığı	A*01	1.4
İdiopatik hemokromatoz	A*03, B*14	8.2
Konj. Adrenal hiperplazi	B*47	15.4
Subakut thyroiditis	B*35	13.7
Myasthenia gravis	DRB1*03	2.5
Graves hastalığı	DRB1*03	3.7
İdiyopatik addison	DRB1*03	6.3
Psoriasis vulgaris	C*06	13.3
Dermatitis herpetiformis	DRB1*03	15.4

2.6. Transplantasyon Amaçlı İmmünojenetik Testler

Organ nakillerinde öncelikli hedef alıcı ve verici arasında immün bir reaksiyon sonucu greft reddinin yaşanmamasıdır. Greft reddinde etkin olan hücreye ve immün yanıtın mekanizmasına göre;

1. Hücresel İmmün Yanıt
2. Hümorale İmmün Yanıt şeklinde iki farklı immün yanıt söz konusudur.

Bu yanıtlar neticesinde organ reddinin klinik seyri ve süresi göz önüne alınarak;

- 1) Hiperakut rejeksiyon
- 2) Akut Rejeksiyon
- 3) Kronik Rejeksiyon olarak üç alt başlıkta değerlendirilir.

Muhtemel bir organ reddi riskinin taranması ve nakil kliniğine ön bilgi vermesi açısından organ nakli öncesi alıcı ve vericisi arasında immünolojik ve genetik farklılığın ve bu farklılığın derecesinin ortaya konması için çeşitli immünolojik ve genetik testler yapılır. Bunlar; Kan Grubu Antijenleri, Doku Grubu Antijenleri (HLA), Panel Reaktif Antikor (PRA), Lum DSA XM (Luminex tabanlı Donör Spesifik Antikor), Cross-match testleri (Kompleman bağımlı sitotoksikite (CDC) ve Flow Sitometrik Cross Match (FCXM)' dir.

2.6.1. Kan Grubu Antijenleri

Alıcı-verici arasındaki ABO uyumsuzluğu kalp ve böbrek greftlerinde hiperakut rejeksiyona yol açabilir. Bu antijenler sadece eritrositler üzerinde değil damar endotel hücreleri üzerinde de eksprese olduğundan böbrek ve kalp greftlerinde oldukça fazla eksprese edilirler. Endotelyumda ekspresyonu olmayan Rh faktörü ise ABO kan grubu antijenleri kadar önemli değildir.

2.6.2. Doku Grubu Antijenleri (HLA)

Böbrek transplantasyonunda alıcı-verici arasındaki MHC uyumu uzun dönemde organ-greft fonksiyonu ve sağ kalımı için gereklidir. Büyük doku uygunluk kompleksi (MHC) genleri, transplant antijenleri HLA-A, B, DR'yi kodlar. Sınıf II antijenleri böbrek naklinde uzun greft yaşamı açısından Sınıf I antijenlerine göre daha önemlidir (Lamb ve ark., 2011).

2.6.3. Panel Reaktif Antikorlar (PRA)

Daha önce kan transfüzyonu, gebelik veya önceki nakiller gibi etmenlerle vericinin antijenlerine karşı alıcıda oluşan antikorlardır. Nakil öncesi alıcının verici antijenlerine olan bu duyarlanma belirlenip oranı saptanır. Yüksek duyarlanma oranı organ nakli alıcı adaylarının daha uzun süre kadavra listesinde beklemeleri demektir (Jordan ve ark., 2004).

2.6.4. Kompleman Bağımlı Sitotoksik Cross Match (CDCXM) Testi

Lenfosit cross-match, DSA'yı belirlemek için kullanılan en eski temel immünogenetik yöntemdir. Daima vericinin lenfositleriyle hastanın (alıcı) serumu arasında bir reaksiyon oluşup oluşmayacağına floresan mikroskopta gözlendiği ve naklin başarısını artıran en temel parametredir. Kompleman bağımlı sitotoksiste, elde edilen donör lenfosit (T, B) hücreleri ve alıcı serumu karşılaştırma sonucunda oluşan sitotoksisteyi eklenen kompleman ilavesiyle tesbit etme prensibine dayanır.

2.6.5. Flow Sitometrik Cross Match (FCXM) Testi

FCXM, sıvı faz bir ortamda vericinin T ve B lenfositlerin ayrılarak alıcının serumu ile muamele edilerek, hastada vericinin antijenlerine karşı IgG tipi anti-HLA antikorunun olup olmadığının belirlendiği indirekt immünofloresan işaret kullanan çapraz karşılaştırma testidir.

2.6.6. Lum DSA XM (Luminex Tabanlı Donör Spesifik Antikor) Testi

Donör Spesifik Antikorlar; vericinin antijenlerine karşı alıcının serumunda daha önceden oluşmuş anti-HLA antikorlarıdır. HLA doku grubu uyumsuz trasplantasyonlarda vericiye özgü donör spesifik antikorların gelişimiyle sonuçlanan bir süreçtir. Organ nakli öncesi donör spesifik antikor tarama testi oluşabilecek bir hiperakut rejeksiyonu öngörmemizi sağlar.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Grupları

Tez konusu olan çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (588/2018) onaylanmıştır. 2015-2018 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı ve Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Merkezi polikliniklerinde KBY tanısı almış 586 hastanın EDTA'lı periferik kan örneklerinden izole edilen DNA'larından HLA doku tiplendirme testleri yapıldı. Ayrıca hastaların organ nakli hazırlık testleri luminex ortamında Panel reaktif tarama ve tanımlama antikor testleri çalışıldı. Vericiler ile hastalar arasında en az iki farklı cross-match testi (CDCXM, FCXM ve Lum-DSA XM) yapıldı. HLA alleleri ile ilişkinin olup olmadığının belirlenmesinde kontrol grubu olarak her bir cross-match testinin negatif sonuçlu olanları seçildi. Çalışmalar, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Doku Tiplendirme Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışma grubunda değerlendirilen hastaların Akdeniz Üniversitesi Nefroloji bilim dalı ve organ nakli biriminde bulunan öğretim üyeleri tarafından klinik tetkik ve muayeneleri yapılmıştır. Kronik böbrek hastaları için bilgilendirme dosyaları oluşturularak, yaş, cinsiyet, aile ve akrabaları ile ilgili demografik bilgiler uzman hekimler tarafından dosyalarına kaydedildi.

3.2. Komplemana Bağımlı Sitotoksik Lenfosit Cross-Match (CDCXM) Tekniği ve Gerekl Malzemeler

3.2.1. CDCXM Test Materyalleri

RPMI 1640, L-Glutaminli 1X (RPMI) Stemcell, Lonza: Hücre besi ortamıdır. Şeker, amino asit, tuz Kalsiyum ve Magnezyum gibi maddeleri içerir. Ürün stabilite şartları üretici firma tarafından belirlenir. Orijinal rengi olan gül kurusu renginde herhangi bir değişiklik veya solüsyonda bir bulanıklık oluşmuş ise bu malzemenin kontamine olduğunu gösterir. Kullanılmaması ve yenisiyle değiştirilmesi gerekir. 2-6 °C' de buz dolabında saklanır.

Fosfat Tamponu 1X (PBS) Sigma Aldrich: 50 mL 10X'lik (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) PBS'e 450 mL dH₂O eklenir. Optimum pH 7,4 olmalıdır. 2-6 °C'de 6 aya kadar saklanabilir.

Histopaque-1077 Hücre Ayırma Solüsyonu (Biochrom): Lenfosit izolasyonunda kullanılan ayırma solüsyonudur. 2-8 °C'de saklanır.

Parafin Oil: Steril gelen terasaki plaklarında test kuyularının içini kaplayarak Cross-match reaksiyonu için uygun bir havasız askı ortamı oluşturur. Bu işlemle aynı zamanda reaktiflerin de uçması engellenmiş olur. Malzeme oda ısısında saklanabilir.

Fluoroquench Boya (Ethidium Bromide & Acridine Orange) One Lambda: Ticari olarak firmadan temin edilir. Kompleman aktivitesi sonucu membranlarında delik açılan lenfosit hücrelerinin içine girerek nükleer metaryali boyar. Karanlıkta ve 2-8°C'de saklanabilir.

Dithiothreitol (DTT) Sigma: 0,3086 g DDT'ye 10 mL 1X PBS ilave edilir ve pH 7-8'e ayarlanır. 200 µL'lik alikotlara ayrılarak -80°C'de saklanır. 4 aya kadar kullanılabilir.

Tavşan Komplemanı (Bio-Rad): Liyofilize gelen tavşan komplemanı hızlıca 37 °C su banyosunda hafifçe döndürülerek çözündürülmeli ve çözünür çözünmez hemen kullanılmalı veya alikodlanarak firmanın önerdiği şartlarda sıcaklık şartlarında saklanmalıdır.

Negatif Kontrol Serumu: Sağlıklı AB kan grubu bireylerin serumundan panel reaktif taraması yapılarak veya PRA sonucu negatif hasta serumlarından negatif kontrol için ayırdığımız serumları kullanırız.

Pozitif Kontrol Serumu: Bu serum HLA antijenlerine karşı alloimmünizasyon gösteren farklı bireylerden alınıp toplanmış serum karışımıdır. PRA'sı > %85 serum örneklerinden karışım yapılarak alınır, 2-8°C arasında saklanır.

3.2.2. CDCXM Test Yöntemi

Komplemana Bağımlı Sitotoksik Lenfosit Cross-match yönteminde kullanılacak Terasaki plakları sıvı parafin oil'le kaplanarak ve plaklar daha sonra süzülerek plaktaki fazla parafin alındı. Çalışma için pozitif ve negatif kontroller eklendi. Hamilton pipetleriyle 1'er

mikrolitre hasta serumları ve hasta DTT'li serumları plaklara dağıtıldı. Daha önce cross-match için kullanılacak verici hücreleri periferal kan, lenf nodu veya dalaktan histopaque-1077 veya fikol ile prosedürüne uygun olarak izole edildi. Elde edilen T ve B lenfositler 3 kere 2500 rpm de yıkandıktan sonra 1640 RPMI solüsyonu içindeki lenfosit süspansiyonları hasta serum/hasta DTT'li serum içeren kuyuların her birine 1µl dağıtıldı. Plaklardaki hasta serumu ve verici hücreleri oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Tüm kuyucuklara kompleman solüsyonundan 5'er µl dağıtıldı ve 60 dk inkübe edildi. Sonra her kuyucuğa hamilton pipet yardımıyla 5 µl Ethidium Bromide/Acridine Orange boya karışımından dağıtıldı, 10 dakikalık inkübasyondan sonra Floresans inverted mikroskopta plaklar incelenerek sonuçlar analiz edilip yorumlandı.

3.3. Flow Sitometri ile Lenfosit Crossmatch yöntemi (FCXM) ve Test Metaryalleri

3.3.1. FCXM Test Metaryalleri

Negatif Kontrol Serumu: Sağlıklı AB kan grubu bireylerin serumundan panel reaktif taraması yapılarak veya PRA sonucu negatif hasta serumlarından negatif kontrol için ayrılan serum örnekleri kullanıldı.

Pozitif Kontrol Serumu: Bu serum farklı bireylerden alınmış HLA antijenlerine karşı alloimmünizasyon gösteren serum karışımıdır. PRA>%85 serum örneklerinden alınır, 2-8 °C arasında saklanır.

CD3-PerCP Monoklonal antikor (Biosciences): Tam kandan izole edilen lenfositlerde T hücrelerinin membranında bulunan CD3 antijenine özgü monoklonal antikorlardır. Floresan PerCP işaretini taşır. Üretici firmanın önerdiği sıcaklıkta ve karanlıkta saklanır.

CD19-PE Monoklonal Antikor (Biosciences): Tam kandan izole edilen lenfositlerde B hücrelerinin membranında bulunan CD antijenine özgü monoklonal antikorlardır. Floresan PE (Fikoeritrin) işaretini taşır. Üretici firmanın önerdiği sıcaklıkta ve karanlıkta saklanır.

IgG-FITC F(ab')₂ (Jackson Immuno Research): Membrana spesifik antikorlara bağlanarak total lenfosit solübl ortamından T lenfosit-B lenfosit popülasyonunu ayırmamızı sağlar. Floresan FITC işaretini taşır. Üretici firmanın önerdiği sıcaklıkta ve karanlıkta saklanır.

Fikol-Histopaque 1077 Ayırma Solüsyonu (Biochrom): Tam kandan lenfosit izolasyonunda kullanılır. Gradient esasına göre partikülleri ayrıştırıcı solüsyondur. Ticari olarak satın alınır. Üretici Firmanın önerdiği sıcaklıkta saklanır.

Fosfat Tamponu 1X (PBS) Sigma Aldrich: Kimyasallarını kullanarak stok solüsyonlar şeklinde hazırlanır Ph 7,4 olarak ayarlanır veya ticari olarak hazır toz şeklinde alınıp 1 litre suda çözerek kullanılır. Hücre canlılığının korunması amacıyla yıkama aşamalarında kullanılır. 2-6 °C 'de 6 aya kadar saklanabiliriz.

RPMI 1640, L-Glutaminli 1X(RPMI) Gibco-Lonza: 2-6 °C 'de saklanır. Stabilité üretici tarafından belirtilir. Solid doku (dalak, lenf nodu) izolasyonunda kullanılır.

FBS (Fetal Bovine Serum) Biological Industries: Yıkama aşamasında belli bir oranda yıkama solüsyonuna ilave edilerek kullanılır. Ticari olarak temin edilir. Alikodlanarak, -20 °C 'de sıcaklıkta saklanır.

Cell Wash Solüsyonu (BD): Testin yıkama aşamalarında kullanılır. Ticari olarak satın alınır. Oda ısısında saklanır.

3.3.2. FCXM Test Yöntemi

FCXM için kullanılacak hücreler, tam kandan lenfosit izolasyonu işlemine göre PBS ile 1/1 oranında seyreltilmiş heparinize kan, 3 ml lik fikol bulunan polistiren konik tüplere yavaşça yüklendi. Tüplerin 1600 rpm de 30 dk veya 1800 rpm'de 20dk santrifüj sonrası oluşan bulanık halka şeklindeki lenfosit tabakası pastör pipet yardımıyla yeni tüplere alındı. Bu hücreler 2500 rpm de total hacim 9cc olacak şekilde PBS ile yıkandıktan sonra %10'luk FBS ile sayısı ayarlandı, daha sonra multiwell plate'a her bir hasta negatif, pozitif, oto, cross ve dilüsyon örnekleri için ilgili lenfosit solüsyonundan 100'er µl ilgili kuyulara eklendi. 3 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi. Multiwell plate hızla dökülerek dipte çökmüş olan hücrelerin üzerine ilgili serumlar eklenerek 4 °C 'de 30 dk inkübe edildi.

Bu arada her bir hasta için

15 µl CD3

15 µl CD19

3.5 µl F(ab')₂

155 µl Cell Wash

Hesaplanarak bir master mix hazırlandı. Kullanılacağı test adımına kadar karanlıkta saklandı. İnkübasyondan sonra hücreler, 1 kez 100 µl FBS'li yıkama solüsyonuyla yıkandıktan sonra 2 kez daha 200 µl FBS'li yıkama solüsyonuyla bir önceki adım tekrar edildi. Toplam üç yıkamanın sonunda hazırlanan ve karanlıkta bekletilen antikor master mixten her bir kuyuya 185 µl olarak dağıtıldı. 4 °C 'de 20 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plate 3 dk 3000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Plate tekrar 200 µl yıkama solüsyonu ekleyerek bir önceki işlem aynen tekrarlandı. Daha sonra örnek kuyularına 150 µl FBS'li yıkama solüsyonu eklendi. Önceden 450 µl FBS'li yıkama solüsyonu eklenmiş ve test etiketi oluşturulmuş ilgili flow tüplerine alındı. Flow Sitometri cihazında okuma yapılarak kanal kaymasına göre sonuçlar yorumlandı.

3.4. Luminex Cross-Match (Donör Spesifik Antikor=DSA) Testi ve Test Materyalleri

3.4.1. Lum-DSA XM Test Materyalleri

Yakalama Boncukları: Sınıf I glikoprotein veya sınıf II glikoprotein için spesifik monoklonal antikorlar ile konjuge edilen bead karışımını ve 5 kontrol boncuğu içerir. Boncuk saklama tampon solüsyonu NaCl, Tween 20, Na azide, BSA içeren fosfat tabanlı bir tampondur. Tamponun 3 saatten fazla ışığa maruz kalmamasına özen gösterilmelidir. Karanlıkta 2°C-8°C'de saklanmalıdır.

Konsantre Konjugat: 10X tampon çözeltisi şeklinde keçi anti human IgG-PE'dir. NaCl, Tween 20, ProClin 300, BSA içerikli fosfat tabanlı tamponda saklanır.

SAPE Çözeltisi: 10X stok solüsyonu şeklinde; NaCl, Tween 20, ProClin 300, BSA içeren fosfat tabanlı tamponda PE ile konjuge edilmiş streptavidin'dir. Tamponun 3 saatten fazla ışığa maruz kalmamasına özen gösterilmelidir. Karanlıkta 2°C -8 °C'de saklanmalıdır.

Lenfosit Lysis Solüsyonu: 10X stok solüsyonu şeklindedir. Non-iyonik deterjan ve Na azid içeren tristampon solüsyon 2°C-8°C’de saklandı.

Specimen Diluent (Sulandırma Solüsyonu): BSA, fare serumu ve Na azid içeren PBS solüsyonudur. Kullanım anında hazırlanmalı ve karanlıkta 2°C-8°C’de saklandı.

Lizat Kontrol Reaktifi: 10X stok solüsyon şeklindedir. Sınıf I ve II HLA antijenlerine spesifik biotin’le işaretli insan antikordur.

Boncuk karışımı: Kontrol boncuklarını içerir. Asıl hedefi test arka plan kirliliğini görüntülemek ve uygun konjugatın kullanıldığını teyit etmektir.

3.4.2. Lum-DSA XM Test Yöntemi

Deney için gerekli yıkama solüsyonları buz dolabından oda sıcaklığına çıkarılarak (20-24°C) deney hazırlığına başlandı. Her bir test kuyusu için 8 µl lizat ve 5 µl boncuk gereklidir. Total deney için; kurutulmuş Lenfosit Kontrol Lizatı (LMDCR) için; 1 kuyu Lizat Kontrol Reaktifi’ne (LMLCR), 1 kuyu Pozitif Kontrol Serumu (LMPC)’na ve 1 kuyu da Negatif Kontrol Serumu (LMNC) şeklinde kontrol kuyuları hazırlandı. Hasta test serumları için ise; 1 kuyu Lizat Kontrol Reaktifi (LMLCR)’ine ve 1 kuyu da lizat ile test edilecek her bir serum için ayrıldı. Lizat ve boncukları eklendikten sonra karanlıkta, oda sıcaklığında 200 rpm hızla dönen bir rotator üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Test kuyuları hesaplanarak gerekli toplam hacimde seyreltilen LMLCR hazırlandı. Her bir test kuyusu için 50 µl seyreltilmiş LMLCR gereklidir; (her verici ve kontrol lizatı 1 tane). Seyreltilmiş LMLCR’yi hazırlamak için kullanılan her kuyu başına 5 µl LMLCR’yi 45 µl kitle gelen sulandırma solüsyonu eklendi. Hazırlanan bu konjugat karışımı kullanılabildiği kadar oda ısısında karanlıkta tutuldu. Sonraki test adımı için kullanılacak filtreli plaktan test için ayrılan kuyular 100-300 µl distile su ile ıslatılarak 2-5 dakika sonra vakumlandı.

30 dakikalık inkübasyon sonrasında kuyulardaki örnekler ve kontroller üzerine Wash Buffer (yıkama solüsyonu) Boncuk/Lizat karışımına eklendi. Her bir test kuyusu ve olası kayıplar için bir fazladan 42 µl yıkama solüsyonu hesaplandı. Karışım 30 saniye vortekslendikten sonra, o lizat için ayrılmış kuyulara dilue edilmiş ilgili Boncuk/Lizat

süspansiyonundan 55 µl dağıtıldı. Üzerlerine her kuyu için 100 µl yıkama solüsyonu eklendi. Plakta hava kabarcığı varsa hafifçe yandan vurularak alındı ve daha sonra aspire edildi. Sonraki yıkama işlemi 250 µl yıkama solüsyonu eklenip aspire edildi. Bu 250 µl yıkama basamağı 2 kez daha tekrarlandı. Önceden hazırlanıp karanlıkta bekletilen dilue edilmiş LMLCR 50 µl plak dizilim çizelgesine göre kararlaştırılan kuyulara eklendi. Filtreli plağın her test kuyusuna 38 µl örnek sulandırma solüsyonu eklendikten sonra, üzerine 12 µl hasta serumu ve kontrol serumu eklendi. Plağın üzerini yapışkanlı plastik kaplayıcı ile kapatılıp karanlıkta 200 rpm’de rotator üzerinde oda ısısında (20- 24°C) karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu arada gerekli toplam hacimde seyreltilmiş SA-PE hazırlandı. Bu aşamada öncelikle testin her bir kuyusu için 5 µl LMSA’yı 45 µl yıkama solüsyonu eklendi. Gerekli toplam hacim hesaplanırken konjugat stoktan 5 µl LMCJS’yi 45 µl yıkama solüsyonu eklendi. Kullanılmaya kadar oda ısısında karanlıkta saklandı. 30 dakikalık inkübasyon sonrası test plağı dikkatle yapışkanlı yüzeyden ayrılarak yıkama aşamasına geçildi. İlk yıkama hacmi her kuyuya 100 µl yıkama solüsyonu eklendi ve vakum pompası ile aspire edildi. Daha sonra hacim 250 µl yapılarak yıkama ve aspirasyon işlemi üç kez daha tekrar edildi. Bu yıkama işlemlerinde hava kabarcığı olamamasına özellikle dikkat edildiği için her aspirasyondan önce plak yan yüzeyine hafifçe vurularak hava kabarcığı varsa alındı.

Daha sonra önceden dilue edilmiş LMLCR içeren kuyulara 50 µl seyreltilmiş SAPE, seyreltilmiş hasta serumları ya da kontrol serumları içeren kuyuların üzerine ise 50µl seyreltilmiş konjugat eklendi. Test plağının üzeri yapışkanlı plastik kaplayıcı ile kapatılarak, 200 rpm hızla dönen bir rotator üzerinde karanlıkta oda sıcaklığında (20-24°C) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her kuyuya 150 µl yıkama solüsyonu eklenerek plak luminex cihazına yerleştirildi.

Lum-DSA XM testi her bir lizat ile çalışılan kontrol reaktifini kapsar. HLA’nın yakalandığından emin olmak için her bir hasta serumu, lizat kontrol reaktifıyla paralel test edilir. LCR biotinlenmiş monoklonal HLA antikor karışımıdır. Bu monoklonal antikorlar Sınıf I ve II için spesifiktir. Biotinle işaretlenmiş monoklonal antikorlar dilue edilmiş streptavidin-PE konjugatı ile tespit edilir.

Lum-DSA XM kontrol kuyuları her test için mutlaka çalışılan kurutulmuş lenfosit kontrol, negatif kontrol serumu, pozitif kontrol serumudur. HLA sınıf I ve sınıf II 'ye karşı antikorlar içeren kurutulmuş lenfosit kontrol için karşılaştırıldı.

3.4.3. Lum-DSA XM Kalite Kontrolü

Test kendi içinde reaksiyonun düzgün bir şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden bir sistem barındırır. Bunlardan kontrol boncukları (CON), çalışma esnasındaki arka planı belirler ve çalışma performansını görselleştirerek ekranda anlamlandırılacak hale getirilmesine yardımcıdır. Arka plan düzenleme faktörü (BAF) elde etmek için 30 donör lizatı/30 daha önce duyarlanmamış bireyden elde edilen negatif serumları üretici firma tarafından her bir lot için test edilmiş ve onaylanmış olarak temin eder. BAF, her bir lizat/serum kombinasyonu için arka plan kirliliğini dengelemekte kullanılan MFI değeri verir. Bu değer her yeni lot BAF'lar için kitle birlikte verilen Recording Sheetlerde gösterilen lot-spesifik eşitlikler kullanılarak hesaplanır. Prob 77 ile konjuge olur ve kuyulara eklenen konjugat belirlenir. Prob 78 biotinlenmiş proteinle konjuge olur ve SAPE ile belirlenir. Test kontrolünün amacı teknikten ve kit yetersizliğinden oluşabilecek hataları tespit etmektir. Prob 77 MFI değeri ≥ 10000 , Prob 78 değeri ≥ 8000 olarak belirlenir.

3.4.4. Lum-DSA XM Test Analizi

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

Negatif Adjusted MFI Değeri;

Örnek:

CON1 için Sınıf I HLA BAF = 49.465(CON1)0,5312

CON2 için Sınıf I HLA BAF = 34.622(CON2)0,5673

CON3 için Sınıf I HLA BAF = 29.615(CON3)0,6532

Örnek:

Sınıf I HLA Capture Bead MFI - (CON1 için BAF) = Adjusted MFI 1

Sınıf I HLA Capture Bead MFI - (CON2 için BAF) = Adjusted MFI 2

Sınıf I HLA Capture Bead MFI - (CON3 için BAF) = Adjusted MFI 3

3.5. Panel Reaktif Antikor (PRA) Testi ve Test Metaryalleri

3.5.1. PRA Test Metaryalleri

HLA Tarama Boncukları (bead): HLA sınıf I ve II moleküllerine IgG antikorlarını tayin etmek için saf HLA sınıf I ve II glikoproteinlerinden ve bunlara ilave olarak 4 kontrol boncuğundan oluşan fosfat tamponu içinde süspanse formda karışım.

HLA Sınıf I Tanımlama Boncukları (bead): HLA sınıf I glikoproteinlerine IgG antikorlarını saptamak için değişik bireylerden elde edilen sınıf I glikoproteinlerinden ve 4 kontrol boncuğundan oluşan karışım.

HLA Sınıf II Tanımlama Boncukları: HLA sınıf II glikoproteinlerine IgG antikorlarını saptamak için değişik bireylerden elde edilen sınıf II glikoproteinlerinden 4 kontrol boncuğundan oluşan karışım.

Konsantre Konjugat: goat anti-human IgG kaplanmış fikoeritin, NaCl, Tween-20, sığır serum albumin, fosfat tabanlı bir tampon içindedir. Kullanılmadan önce yıkama solüsyonunda 1/10 oranında seyreltilerek kullanılır. 2-8 °C arasında saklanır. Işığa karşı hassastır, karanlıkta muhafaza edilmelidir.

Yıkama Solüsyonu: NaCl, Tween-20, sığır serum albumin, fosfat tabanlı solüsyondur. 2-8 °C sıcaklık aralığında saklanır. Test kurumu sırasında kullanılmadan önce oda ısısına getirilerek kullanılır.

Pozitif Kontrol Serumu: Bu serum farklı bireylerden alınmış HLA antijenleri karşı alloimmünizasyon gösteren serum karışımıdır. PRA>%85 serum örneklerinden alınır, 2-8 °C arasında saklanır.

Negatif Kontrol Serumu: Bu serum farklı bireylerden alınmış olup, HLA antijenlerine karşı antikor içermez (PRA<%10). 2-8°C arasında sıcaklıkta saklanır.

3.5.2. Panel Reaktif Antikor Tarama Yöntemi

Hasta bireylerin jelli tüplere alınan kan örnekleri laboratuvarında 2.500 rpm de 7 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ependorf tüplere alındı. Ependorf tüplere alınan serumlar 2 dakika vortexlendikten sonra 2.500 rpm de 5 dakika santifüj edildi. Lifecodes PRA tarama kitinden çıkan yıkama solüsyonu +4 °C den çıkarılıp oda sıcaklığına bekletildi. Çalışılacak hasta sayısı ve test kontrol kuyuları hesaplanarak Millipore multiwell filtreli plaklar üzerinde gerekli numaralandırmalar yapıldı. Kullanılmayan kuyucukların üzeri yapışkan plastik kaplayıcı ile kapalı bırakıldı. Test için açık bırakılan kuyulara 300 µl distile su eklenerek 5 dakika bekletildi. Daha sonra emilmeyen fazla su vakum cihazı ile kuyucuklardan çekilerek uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 40 µl yıkama solüsyonu eklendi. Her bir hasta serum örneğinden ve pozitif negatif kontrol serum örneklerinden 12,5 µl ilgili kuyulara konuldu. Olası bir kontaminasyonu önlemek amacıyla plate yönü ters çevrilerek Lifecodes PRA tarama kitinden çıkan PRA tarama beadleri kısa bir vortex yapıldıktan sonra 5 µl olacak şekilde her bir kuyuya eklendi. Multiwell plate kapağı kapatılarak ve ışık almayan bir ortam içerisinde 20-24 °C de dakikada 200 rotasyon olacak şekilde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında her bir kuyu için 100 µl yıkama solüsyonu eklenerek, multiwell'in yanlarına hafifçe vurarak hava kabarcığı varsa alındı ve sonrasında plak, vakum cihazı ile aspire edildi. Ardından, her kuyu için 250 µl yıkama solüsyonu eklenerek bir önceki yıkama adımı 2 kez tekrar edildi. 1/ 10 oranında (her hasta için 5 µl konjugat, 45 µl yıkama solüsyonu) seyreltilip karanlık bir ortamda saklanan konjugattan her kuyuya 50'şer µl eklendi.

Plate uygun kapakla kapatılıp, ışığa maruz kalmaması için kapalı bir kutuya konulup 30 dakika ve dakikada 200 rotasyon olacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her bir kuyuya 150 µl yıkama solüsyonu eklenip karışması sağlandı. Test plate Luminex 200 cihazına yüklenip, sonuçlar LifeCodes programıyla değerlendirildi.

3.6. HLA-A, B, DRB1 Alellerinin PCR-SSO Luminex Test Yöntemi (Hibridizasyon) ve Test Metaryalleri

3.6.1. PCR-SSO Luminex Yöntemi Test Metaryalleri

DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden QIAGEN EZ 1 DNA Blood Kit kullanılarak otomatize magnetik bead yöntemi ile her bir hasta ve kontrol örneğinden 200 µl kan kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı.

HLA-A, B, DRB1 Alellerinin PCR-SSO Luminex Yöntemi

Lifecodes HLA-A, B, DRB1 eRES SSO (Immuncor, Stanford, USA) ticari kiti kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu ve hibridizasyonu aşamaları için gerekli metaryaller;

Lifecodes Taq DNA Polimeraz

Distile Su

Streptavidin

Biotin primer, dNTPs ve tampon içeren bir master karışımı (kit temin edilen ticari şirketçe temin edilir)

Pre-Bound oligonükleotidler ile DNA tüpleri ticari kitle birlikte temin edilir.

1-10 µl, 10-200 µl, 200-1000 µl lik mikropipetler

Mikrotite trayler ve üzerini kapatmak için yapışkanlı plastik kaplayıcı

Thermocycler

Verileri analiz etmek için bilgisayar ve software programı

Hasta ve donörlerden elde edilen DNA örneklerinin HLA tiplendirilmesi Doku Tipleme Laboratuvarında kullanılan PCR-SSO Luminex yöntemi ile ve LIFECODES HLA-SSO Typing Kit kullanılarak aşağıda verilen standardize test prosedürüne göre PCR amplifikasyonu hazırlandı;

DNA amplifikasyonu (PCR);

DNA amplifikasyonu 1X 50µl için aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

	<u>1X</u>
DNA (30 ng/µl)	4 µl
Master miks (+4°C)	16 µl
dH ₂ O	9.8 µl
Taq polimeraz (2.5U/µl)	<u>0,2 µl</u>
Toplam 30 µl	

Çalışılan test sayısı kadar tüp tablo 3.6.1’de verilen PCR döngü programına uygun olarak amplifiye edildi.

Tablo 3. 6. 1. MHC Lokusundaki HLA-A, B, DR analizi için PCR döngü program

Başlangıç denatürasyonu	95 ⁰ C	3 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 ⁰ C	15 saniye	12 döngü
Bağlanma	60 ⁰ C	30 saniye	
Uzama	72 ⁰ C	30 saniye	
Denatürasyon	95 ⁰ C	15 saniye	28 döngü
Bağlanma	60 ⁰ C	30 saniye	
Uzama	72 ⁰ C	30 saniye	
Son uzama	72 ⁰ C	1 dakika	1 döngü
Bekleme	4 ⁰ C	5 dakika	1 döngü

3.6.2. HLA-A, B, DRB1 Alellerinin PCR-SSO Luminex Test Yöntemi

(Hibridizasyon)

PCR amplifikasyon tüpünden 5 µl PCR ürünü Costar plate ilgili kuyucuğa uygun eklendi. Her bir kit için ayrı ayrı tasarlanan Bead mix, ısı bloğunda 55 °C de 7dk ısıtıldı. 15 sn. sonike edilip vortekslendikten sonra 15 µl si PCR ürününün üzerine eklendi. Platelere üzeri yapışkan yüzeyli bir plastik kapakla kapatıldı.

PCR cihazından hibridizasyon için uyarlanan program seçilerek reaksiyon başlatıldı. Hibridizasyon işlemi 97°C'de 2 dk, 47°C'de 10 dk. 56°C'de 8 dk ve 56°C'de 10 dk olacak şekilde planlandı.

SA-PE reaksiyonu;

Reaksiyonun ikinci 56 °C'lik kısmına gelindiğinde cihaz açılarak, 1360 ml dilüsyon solüsyonu + 6.8 µl SA-PE (1X) karışımı örnekler üzerine eklendi.

Analiz için Quick-Type for LifeMatch programı kullanıldı.

3.7. İstatistik Analiz

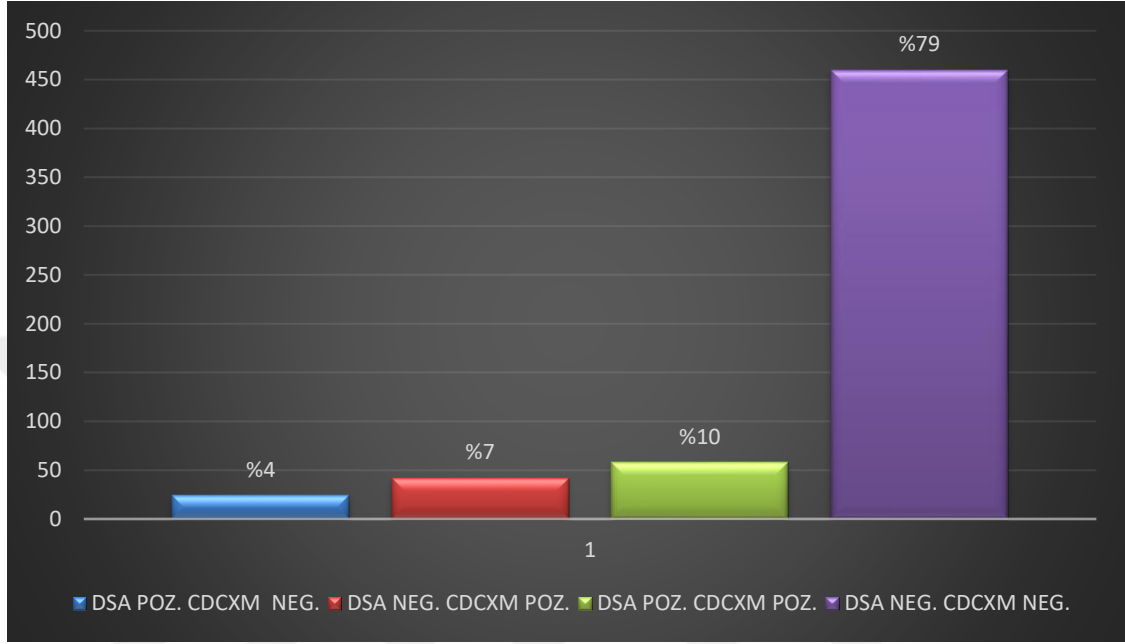
Bir popülasyon genetiği istatistik programı olan Arlequin v3.5.2.2 ile MHC gen lokusunda bulunan HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allellerinin çeşitli çapraz karşılaştırma testi yapılan hastaların pozitif ve negatif sonuç verenlerin gruplarındaki dağılımı hesaplandı (Excoffier ve Lischer, 2010). Elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar ayrı ayrı gruplandı ve allel frekanslarına ki-kare testi yapıldı, $P < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi. P değerinin anlamlı çıkmasına sebep olan pozitif sonuçlu hasta grubu yüzdesi yüksek olanlar pozitif ilişkili, negatif sonuçlu kontrol grubunun yüksek pozitif sonuçlu hasta grubunun düşük yüzde de olması ise negatif ilişkili olarak değerlendirildi. Ayrıca Lum-DSA XM, CDCXM ve FCXM sonuçları araştırma kapsamına uygun olarak hazırlanan excel dosyalarına kayıt edilip, veri analizi için SPSS Statistics 23.0 programı kullanılarak analiz edildi.

4. BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (588/2018) onaylanan çalışmada, Ocak 2015-Kasım 2018 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı ve Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Merkezine başvuru yapmış hastalar değerlendirmeye alındı. Retrospektif araştırma kapsamına uygun olarak Akdeniz Üniversitesi Hastanesi hasta sonuç ve arşiv tarama programı Mia-Med kullanılarak Doku Tipleme Laboratuvarı test sonuçları incelendi. Tarama ve çalışmaların sonucunda araştırma kapsamına uyan hastaların HLA, PRA, Lum-DSA XM, CDCXM ve FCXM sonuçları excel dosyalarına kayıt edildi. Veri analizi için SPSS Statistics 23.0 ve Arlequin 3.5.2.2 programları kullanıldı. Test sonuçları değerlendirilen 586 hastanın yaş ortalaması $42.4 \pm$ dir. Hastaların %35'i kadın, %65'i erkek cinsiyetine sahipti.

Çalışmamızda, hastaların %14 (n=82)'ünde PRA Sınıf I tanımlama testi pozitif iken, PRA Sınıf II tanımlama testi ise %20,4 (n=119)'ünde pozitif sonuç verdiği görüldü. Çalışılan CDCXM testlerinde tüm hastaların %17,1 (n=100)'i pozitif, %82,9 (n=484)'unun negatif tespit edildiği görüldü. FCXM testlerinde 586 hastanın %19,3 (n=113) pozitif sonuç vermiş ve %80,7 (n=471) negatif olduğu görülmüştür. Lum-DSA XM testlerinin de %14 (n=82)'ünün pozitif sonuç verirken %86 (n=502)'sının negatif olduğu görüldü (Testlerin ikişerli analizlerinde hasta sayısı $\pm 1, 2$ farkı dikkate alınmıştır). Burada da farklı çaprazlama testlerinin farklı sonuçlar verdiğini gözlemleyip literatür ile uyumlu olduğu kanaatine vardık.

Hastaların CDCXM ve Lum-DSA XM iki farklı yöntem ile elde edilen sonuçları aşağıda yazılı ve görsel olarak verilmiştir (Şekil 4.1.1.).



Şekil 4.1.1. Lum – DSA XM & CDCXM çaprazlama testleri karşılaştırma tablosu

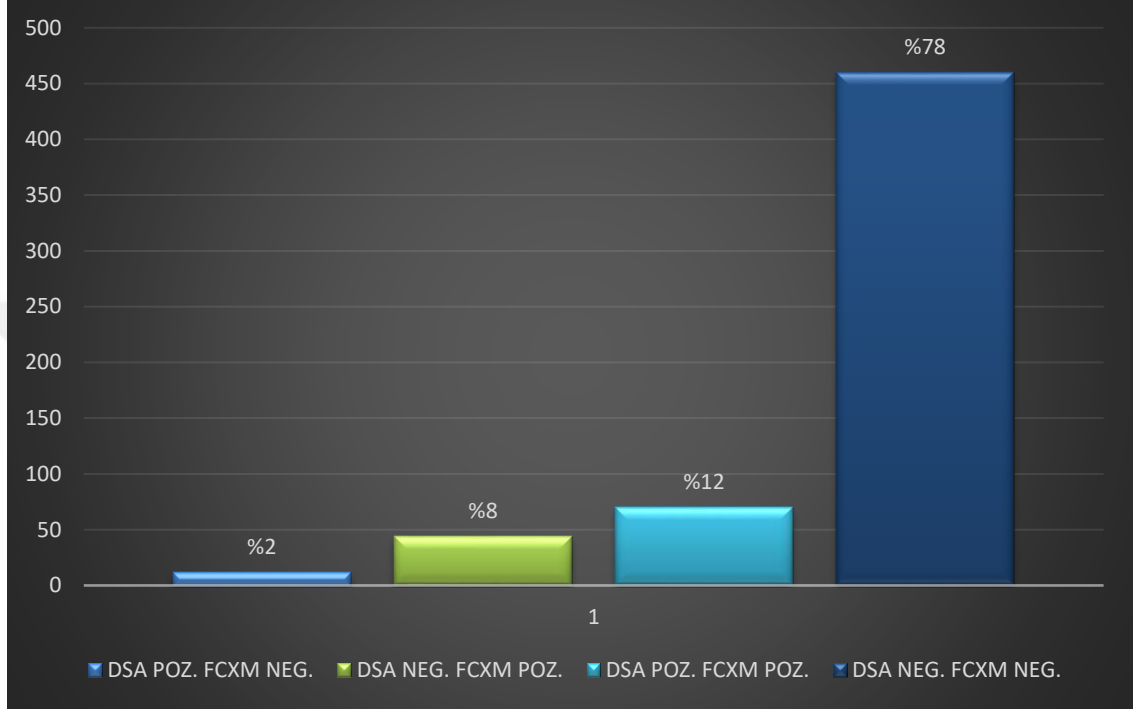
CDCXM pozitif/Lum-DSA XM pozitif olan hasta sayısı 58 (%10)'dir.

CDCXM negatif/Lum-DSA XM negatif olan hasta sayısı 462 (%79)'dir.

CDCXM negatif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 24 (%4)'tür.

CDCXM pozitif/Lum-DSA XM negative hasta sayısı 42 (%7)'dir.

Hastaların FCXM ve Lum-DSA XM iki farklı yöntem ile elde edilen sonuçları aşağıda yazılı ve görsel olarak verilmiştir (Şekil 4.1.2).



Şekil 4.1.2. Lum - DSA & FCXM çaprazlama testleri karşılaştırma tablosu

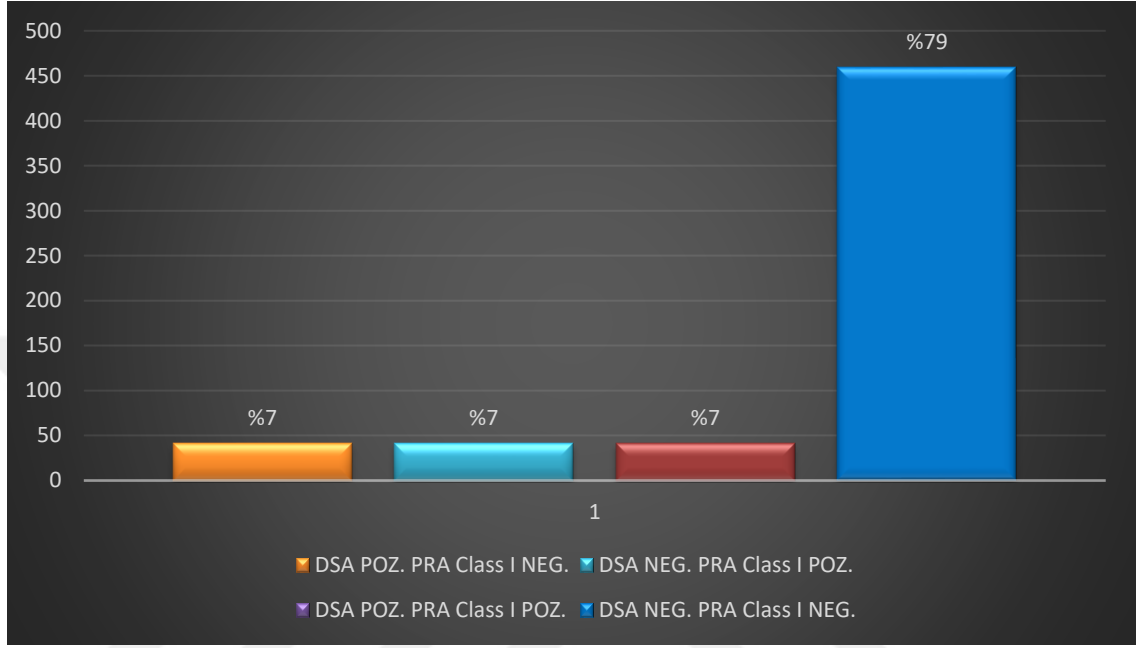
FCXM pozitif/Lum-DSA XM pozitif olan hasta sayısı 70 (%12)'dir.

FCXM negatif/Lum-DSA XM negatif olan hasta sayısı 460 (%79)'dir.

FCXM negatif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 12 (%2)'dir.

FCXM pozitif/Lum-DSA XM negative hasta sayısı 44 (%8)'dür.

Hastaların PRA sınıf I değerleri ile Lum-DSA XM sonuçları incelendiğinde aşağıdaki değerler elde edilmiştir (Şekil 4.1.3)



Şekil 4.1.3. Lum - DSA & PRA Sınıf I çaprazlama testleri karşılaştırma tablosu

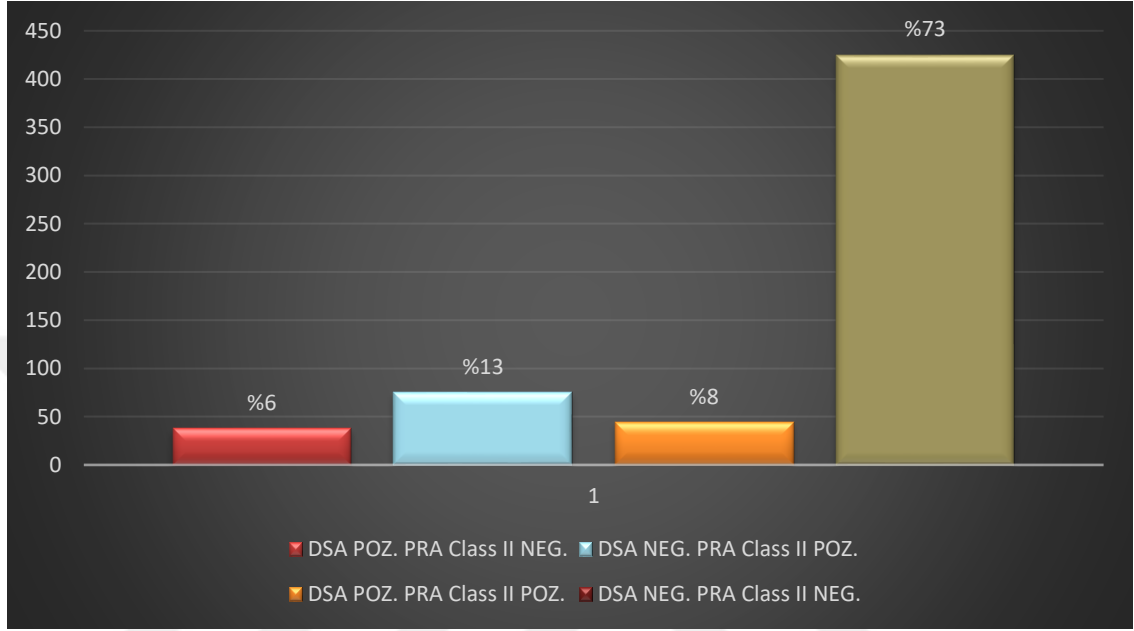
PRA sınıf I pozitif/Lum-DSA XM pozitif olan hasta sayısı 41 (%7)'dir.

PRA sınıf I negatif/Lum-DSA XM negatif olan hasta sayısı 463 (%79)'dir.

PRA sınıf I negatif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 41 (%7)'dir.

PRA sınıf I pozitif/Lum-DSA XM negative hasta sayısı 41 (%7)'dir.

Hastaların PRA sınıf II değerleri ile Lum-DSA XM sonuçları incelendiğinde aşağıdaki değerler elde edilmiştir. (Şekil 4.1.4)



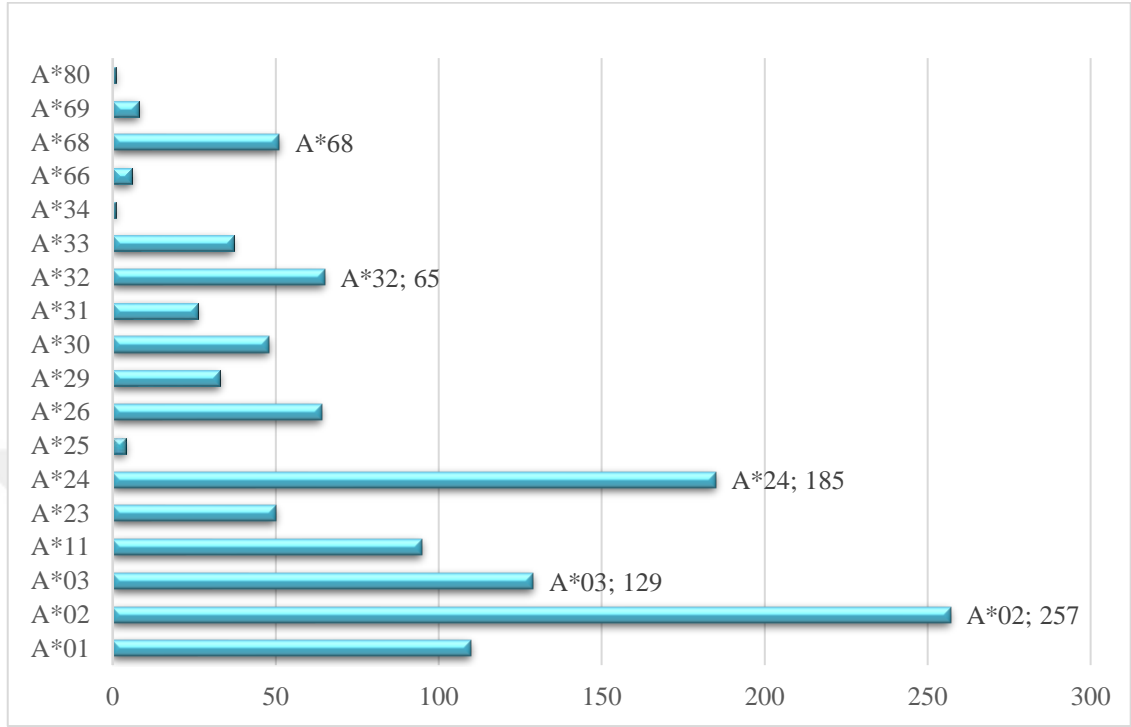
Şekil 4.1.4. Lum - DSA & PRA Sınıf II çaprazlama testleri karşılaştırma tablosu

PRA sınıf II pozitif/Lum-DSA XM pozitif olan hasta sayısı 44 (%8)'dür.

PRA sınıf II negatif/Lum-DSA XM negatif olan hasta sayısı 429 (%73)'dur.

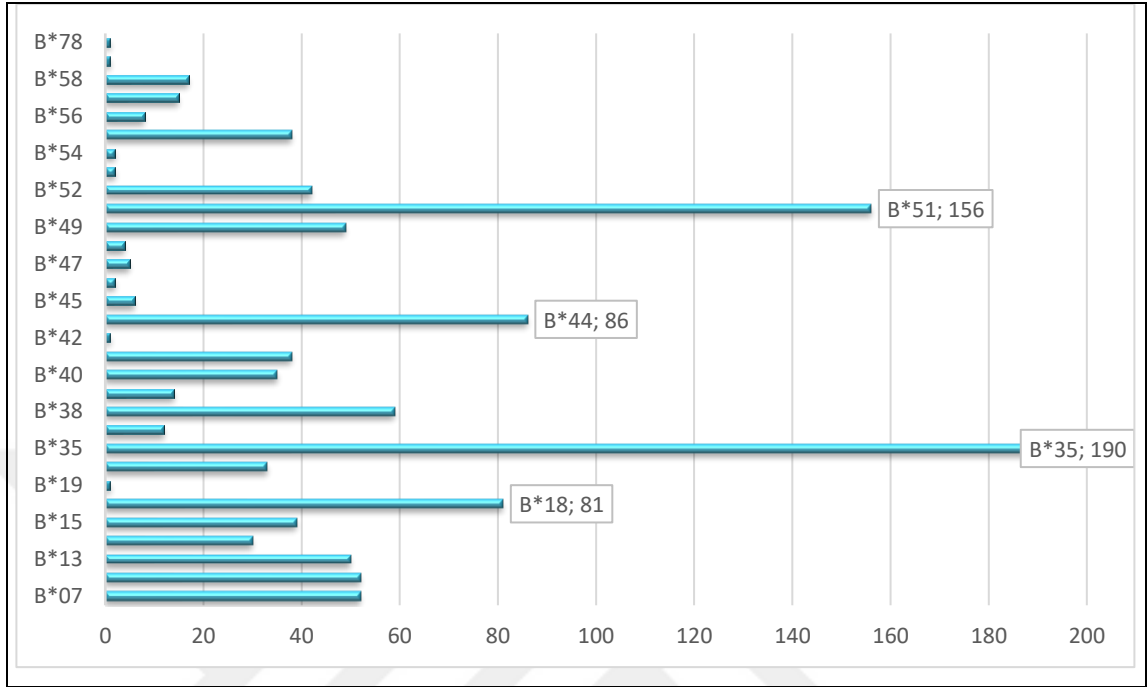
PRA sınıf II negatif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 38 (%6)'dır.

PRA sınıf II pozitif/Lum-DSA XM negative hasta sayısı 75 (%13)'dir.



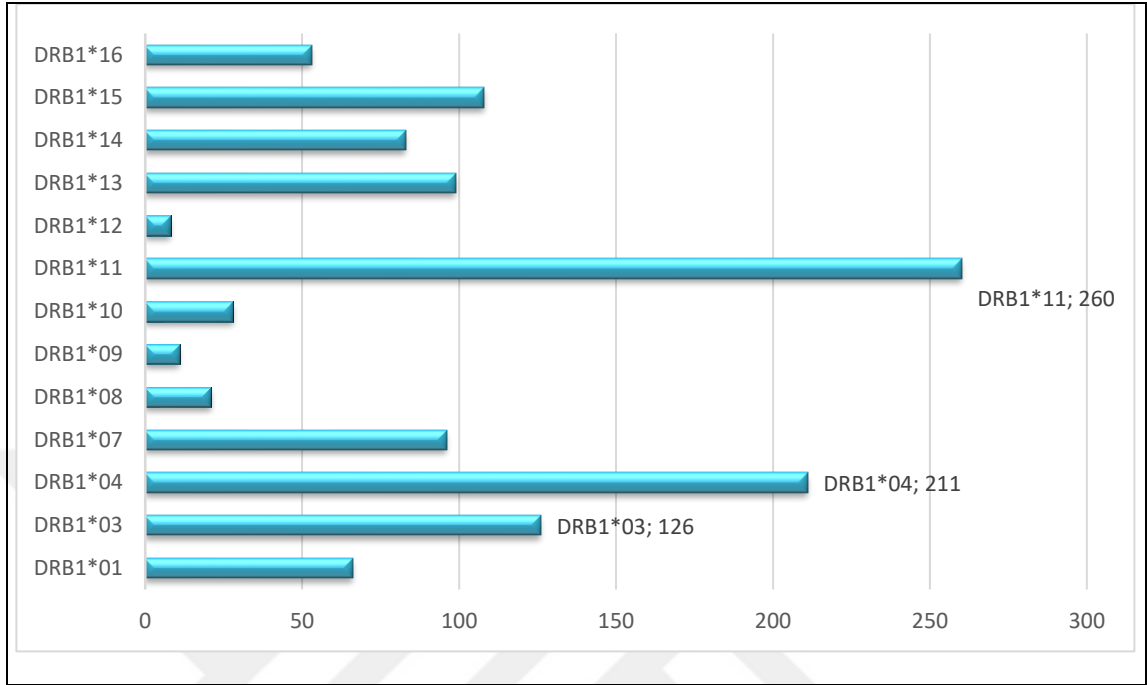
Şekil 4.1.5. Çalışma grubunda en sık görülen HLA-A allel frekansları

Hastaların HLA doku tiplene sonuçlarına göre en sık görülen HLA-A grubunda en yüksek frekanslar sırasıyla HLA-A*02 %22 (n=257), A*24 %16 (n=185) ve A*03 %11 (n=129) olarak saptanmıştır (Şekil 4.1.5.).



Şekil 4.1.6. Çalışma grubunda en sık görülen HLA-B allel frekansları

Hastaların HLA doku tipleme sonuçlarına göre en sık görülen HLA-B grubunda en yüksek frekanslar sırasıyla HLA-B*35 %17 (n=190), B*51 %14 (n=156) ve B*44 %8 (n=86) olarak saptanmıştır (Şekil 4.1.6.)



Şekil 4.1.7. Çalışma grubunda en sık görülen HLA-DRB1 allel frekansları

Hastaların HLA doku tiplleme sonuçlarına göre en sık görülen HLA-DRB1 grubunda en yüksek frekanslar sırasıyla HLA-DRB1*11 %22 (n=260), DRB1*04 %18 (n=211) ve DRB1*03 %11 (n=126) olarak saptanmıştır (Şekil 4.1.7.).

Lum-DSA XM testi yapılan 586 hastanın 503'ü negatif, 83'üde pozitif sonuç vermiştir. Lum-DSA XM pozitif hastaların HLA doku tiplene sonuçlarına göre; HLA-A*02 (%21,68), A*01 (%13,85), A*24 (%13,85), HLA-B*35 (%19,87), B*51 (%12,65), HLA-DRB1*01 (%11,44), DRB1*03 (%15,66), DRB1*04 (%15,66), DRB1*11 (%19,27) ve DRB1*15 (%10,2) en sık gözlenen alleller olarak tespit edilmiştir. Lum-DSA XM negatif hastaların (kontrol grubu) HLA doku tiplene sonuçlarına göre HLA-A*02 (%21,96), A*24 (%16,1), A*03 (%11,82), HLA-B*35 (%15,37), B*51 (%13,41), HLA-DRB1*11 (%22,66), HLA-DRB1*04 (%18,38) en sık gözlenen alleller olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1.1). Lum-DSA XM pozitif ve negative hastaların HLA gruplarına yapılan istatistiksel analizlerin sonucuna göre, HLA-A*29 (p=0.003), HLA-B*08 (p=0.036) ve HLA-DRB1*01 (p=0.001) ve DRB1*03 (p=0.0384) allelleri hastalıkla pozitif ilişkili olarak bulunmuştur.

Tablo 4.1.1. Lum-DSA XM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-A allel frekansları

Hasta (Lum-DSA XM Pozitif)			Kontrol (Lum-DSA XM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 166			2n = 1006			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
A*01	23	13,85	88	8,74	1.68(0.99-2.81)	0.052
A*02	36	21,68	221	21,96	0.98(0.65-1.49)	0.984
A*03	11	6,62	119	11,82	0.53(0.26-1.04)	0.065
A*11	12	7,22	83	8,25	0.87(0.44-1.68)	0.769
A*23	6	3,61	44	4,37	0.82(0.31-2.05)	0.809
A*24	23	13,85	162	16,1	0.84(0.51-1.37)	0.534
A*25	1	0,6	3	0,29	2.03(-)	0.457
A*26	6	3,61	58	5,76	0.61(0.23-1.51)	0.344
A*29	11	6,62	22	2,18	3.17(1.41-7.02)	0.003
A*30	6	3,61	42	4,17	0.86(0.32-2.16)	0.899
A*31	4	2,4	22	2,18	1.10(0.32-3.44)	0.778
A*32	8	4,81	57	5,66	0.84(0.36-1.87)	0.795
A*33	8	4,81	29	2,88	1.71(0.70-3.99)	0.279
A*34	-	-	1	0,09	-	-
A*66	2	1,2	4	0,39	3.05(0.39-19.49)	0.203
A*68	7	4,21	44	4,37	0.96(0.39-2.27)	0.909
A*69	2	1,2	6	0,59	2.03(0.28-11.20)	0.316
A*80	-	-	1	0,09	-	-

F: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

Tablo 4.1.2. Lum-DSA XM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-B allel frekansları

Hasta (Lum-DSA XM Pozitif)			Kontrol (Lum-DSA XM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 166			2n = 1006			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
B*07	9	5,42	43	4,27	1.28(0.57-2.80)	0.644
B*08	13	7,83	39	3,87	2.11(1.04-4.19)	0.036
B*13	3	1,8	47	4,67	0.38(0.09-1.27)	0.137
B*14	6	3,61	24	2,38	1.53(0.55-4.03)	0.421
B*15	6	3,61	33	3,28	1.11(0.41-2.82)	0.991
B*18	10	6,02	72	7,15	0.83(0.39-1.71)	0.714
B*19	-	-	1	0,09	-	-
B*27	3	1,8	30	2,98	0.60(0.14-2.08)	0.610
B*35	33	19,87	158	15,7	1.33(0.86-2.06)	0.216
B*37	1	0,6	11	1,09	0.55(0.03-4.12)	1
B*38	4	2,4	55	5,46	0.43(0.13-1.25)	0.139
B*39	3	1,8	11	1,09	1.66(0.36-6.51)	0.433
B*40	3	1,8	32	3,18	0.56(0.14-1.94)	0.462
B*41	5	3,01	33	3,28	0.92(0.31-2.50)	0.955
B*42	-	-	1	0,09	-	-
B*44	9	5,42	77	7,65	0.69(0.32-1.46)	0.389
B*45	2	1,2	4	0,39	3.05(0.39-19.49)	0.203
B*46	-	-	2	0,19	-	-
B*47	-	-	5	0,49	-	-
B*48	-	-	4	0,39	-	-
B*49	8	4,81	41	4,07	1.19(0.51-2.70)	0.814
B*50	7	4,21	42	4,17	1.01(0.41-2.39)	0.853
B*51	21	12,65	135	13,41	0.93(0.55-1.56)	0.883
B*52	9	5,42	33	3,28	1.69(0.74-3.77)	0.250
B*53	-	-	2	0,19	-	-
B*54	-	-	2	0,19	-	-
B*55	3	1,8	35	3,47	0.51(0.12-1.76)	0.373
B*56			8	0,79		
B*57	4	2,4	11	1,09	2.23(0.59-7.69)	0.250
B*58	4	2,4	13	1,29	1.89(0.51-6.30)	0.284
B*73	-	-	1	0,09	-	-
B*78	-	-	1	0,09	-	-

F: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

Tablo 4.1.3. Lum-DSA XM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-DRB1 allel frekansları

Hasta (Lum-DSA XM Pozitif)			Kontrol (Lum-DSA XM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 166			2n = 1006			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
DRB1*01	19	11,44	49	4,87	2.52(1.39-4.55)	0.00148
DRB1*03	26	15,66	100	9,94	1.68(1.03-2.74)	0.0384
DRB1*04	26	15,66	185	18,38	0.82(0.51-1.32)	0.460
DRB1*07	8	4,8	88	8,74	0.53(0.23-1.15)	0.119
DRB1*08	4	2,4	17	1,68	1.44(0.40-4.61)	0.523
DRB1*09	3	1,8	8	0,79	2.30(0.48-9.60)	0.195
DRB1*10	3	1,8	25	2,48	0.72(0.17-2.54)	0.786
DRB1*11	32	19,27	228	22,66	0.81(0.53-1.25)	0.383
DRB1*12	-	-	8	0,79	-	-
DRB1*13	16	9,63	83	8,25	1.19(0.65-2.14)	0.656
DRB1*14	6	3,61	77	7,65	0.45(0.17-1.10)	0.086
DRB1*15	17	10,2	91	9,04	1.15(0.64-2.04)	0.727
DRB1*16	6	3,6	47	4,67	0.77(0.29-1.90)	0.684

F: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

CDCXM testi yapılan 586 hastanın 481'i negatif 105'i pozitif sonuç vermiştir. CDCXM pozitif hasta grubunda; HLA-A*02 (%21.9), A*01 (%14.28), A*24 (%12.85), HLA-B*35 (%18.57), B*51 (%12.38) HLA-DRB1*04 (%20), DRB1*11(17.14), DRB1*03 (%11.9) ve DRB1*15 (%10.47) allelleri diğerlerine göre daha yüksek sıklıkta bulunmuştur. CDCXM negatif hasta grubunda ise; HLA-A*02 (%22.24), A*03 (%12.05), A*24 (%16.32), HLA-B*35 (%15.69), B*51 (%13.72), HLA-DRB1*03 (%10.49), DRB1*04 (17.74) ve DRB1*11 (%23.18) allelleri diğerlerine göre daha yüksek sıklıkta bulunmuştur (Tablo 4.1.4-6). CDCXM pozitif ve negatif hastaların HLA gruplarına yapılan istatistiki analize göre; HLA-A*01 (p=0.000025), A*02 (p=0.0305), A*25 (p=0,0428), A*29 (0.0454), HLA-B*08 (p=0.004), B*35 (p=0.001) ve B*52 (p=0.005) alelleri pozitif ilişkili olarak tespit edilmiştir. HLA-DRB1 grubunda istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir.

Tablo 4.1.4. CDCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-A allel frekansları

Hasta (CDCXM Pozitif)			Kontrol (CDCXM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 210			2n = 962			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
A*01	30	14,28	80	8,31	2.67(1.74-4.11)	0.0000025
A*02	46	21,9	214	22,24	1.46(1.03-2.07)	0.0305
A*03	15	7,14	116	12,05	0.77(0.45-1.30)	0.357
A*11	18	8,57	78	8,1	1.46(0.87-2.43)	0.158
A*23	10	4,76	41	4,26	1.60(0.82-3.11)	0.189
A*24	27	12,85	157	16,32	1.10(0.72-1.65)	0.721
A*25	2	0,95	2	0,2	6.96(0.94-59.73)	0.0428
A*26	9	4,28	53	5,5	1.04(0.52-2.05)	0.961
A*29	8	3,8	23	2,39	2.26(1.01-4.94)	0.0454
A*30	7	3,33	40	4,15	1.03(0.46-2.25)	0.915
A*31	6	2,85	19	1,97	1.97(0.78-4.82)	0.125
A*32	14	6,66	52	5,4	1.74(0.97-3.10)	0.065
A*33	8	3,8	31	3,22	1.66(0.77-3.51)	0.222
A*34	-	-	1	1,15	-	-
A*66	1	0,47	4	0,41	1.15(-)	1
A*68	7	3,33	43	4,46	0.96(0.43-2.08)	0.946
A*69	2	0,95	7	0,72	1.98(0.40-8.54)	0.397
A*80	-	-	1	0,1	-	-

AF: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

Tablo 4.1.5. CDCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-B allel frekansları

Hasta (CDCXM Pozitif)			Kontrol (CDCXM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 210			2n = 962			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
B*07	7	3,33	45	4,67	0.91(0.41-1.97)	0.949
B*08	14	6,66	39	4,05	2.35(1.28-4.30)	0.004
B*13	7	3,33	44	4,57	0.93(0.42-2.03)	0.999
B*14	5	2,38	24	2,49	1.35(0.52-3.34)	0.653
B*15	6	2,85	34	3,53	1.08(0.45-2.48)	0.991
B*18	15	7,14	65	6,75	1.45(0.83-2.52)	0.209
B*19	-	-	1	0,1	-	-
B*27	6	2,85	27	2,8	1.37(0.57-3.22)	0.582
B*35	39	18,57	151	15,69	1.81(1.25-2.63)	0.00135
B*37	2	0,95	10	1,03	1.38(0.30-5.48)	0.713
B*38	8	3,8	50	5,19	1.01(0.49-2.04)	0.882
B*39	3	1,42	10	1,03	1.85(0.48-6.47)	0.293
B*40	5	2,38	30	3,11	1.07(0.42-2.60)	0.954
B*41	7	3,33	31	3,22	1.34(0.59-3.00)	0.576
B*42	-	-	1	0,1	-	-
B*44	10	4,76	74	7,69	0.86(0.45-1.60)	0.714
B*45	1	0,47	5	0,51	0.92(-)	1
B*46	-	-	2	0,2	-	-
B*47	-	-	5	0,51	-	-
B*48	1	0,47	3	0,31	1.53(-)	0.547
B*49	10	4,76	39	4,05	1.69(0.86-3.29)	0.142
B*50	9	4,28	40	4,15	1.40(0.68-2.82)	0.419
B*51	26	12,38	132	13,72	1.26(0.82-1.92)	0.318
B*52	12	5,71	31	3,22	2.48(1.27-4.80)	0.00599
B*53	-	-	2	0,2	-	-
B*54	-	-	2	0,2	-	-
B*55	6	2,85	33	3,43	1.11(0.47-2.56)	0.949
B*56	-	-	8	0,83	-	-
B*57	4	1,9	11	1,14	2.11(0.63-6.64)	0.183
B*58	6	2,85	12	1,24	3.14(1.16-8.35)	0.016
B*73	1	0,47	-	-	-	-
B*78	-	-	1	0,1	-	-

AF: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

Tablo 4.1.6. CDCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-DRB1 allel frekansları

Hasta (CDCXM Pozitif)			Kontrol (CDCXM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 210			2n = 962			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
DRB1*01	17	8,09	50	5,19	1.61(0.87-2.94)	0.140
DRB1*03	25	11,9	101	10,49	1.15(0.70-1.88)	0.636
DRB1*04	42	20	171	17,77	1.16(0.78-1.71)	0.510
DRB1*07	18	8,57	80	8,31	1.03(0.58-1.81)	0.986
DRB1*08	5	2,38	16	1,66	1.44(0.46-4.25)	0.562
DRB1*09	4	1,9	7	0,72	2.65(0.65-10.17)	0.116
DRB1*10	5	2,38	24	2,49	0.95(0.32-2.67)	0.881
DRB1*11	36	17,14	223	23,18	0.69(0.46-1.03)	0.068
DRB1*12	-	-	8	0,83	-	-
DRB1*13	16	7,61	83	8,62	0.87(0.48-1.57)	0.734
DRB1*14	11	5,23	71	7,38	0.69(0.34-1.38)	0.340
DRB1*15	22	10,47	84	8,73	1.22(0.72-2.06)	0.424
DRB1*16	9	4,28	44	4,57	0.93(0.42-2.03)	0.999

AF: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

Flow Sitometrik Cross Match çalışılan 583 hastadan, 469 hasta negatif, 114 hastanın sonucu pozitif sonuç vermiştir. FCXM pozitif olan hastalarda HLA-A*02 (% 18.85), A*24 (%15.35), A*01 (%10.96), A*11 (%10.08), HLA- B*35 (%18.85), B*51 (%10.08), HLA-DRB1*04 (%19.73), DRB1*11 (%18.85) DRB1*03 (%12.28) ve DRB1*15 (%10.52) en sık görülen alleller olarak belirlenmiştir. FCXM sonucu negatif olan hastalarda HLA-A*02 (%22.81), A*03 (%11.62), A*24 (%15.77), HLA-B *35 (%15.67), B*51 (%14.07), HLA-DRB1*03 (%10.44), DRB1*04 (%17.69) ve DRB1*11 (%22.92) en sık görülen alleller olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1.7-9). FCXM pozitif ve negatif hastaların HLA gruplarına yapılan istatistiksel analizlerin sonucuna göre HLA-A*29 (p=0.0246) ve HLA-DRB1*01 (p=0.0046) KBY ile pozitif ilişkili olarak anlamlı bulunmuştur. HLA-B grubunda istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir.

Tablo 4.1.7. FCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-A allel frekansları

Hasta (FCXM Pozitif)			Kontrol (FCXM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 228			2n = 938			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
A*01	25	10,96	85	9,06	1.24(0.75-2.03)	0.449
A*02	43	18,85	214	22,81	0.74(0.54-1.15)	0.228
A*03	20	8,77	109	11,62	0.73(0.43-1.24)	0.266
A*11	23	10,08	72	7,67	1.35(0.80-2.27)	0.289
A*23	9	3,94	41	4,37	0.90(0.40-1.96)	0.919
A*24	35	15,35	148	15,77	0.97(0.64-1.47)	0.954
A*25	2	0,87	2	0,21	4.14(0.42-41.23)	0.173
A*26	10	4,38	53	5,65	0.77(0.36-1.59)	0.552
A*29	12	5,26	21	2,23	2.43(1.11-5.26)	0.0246
A*30	7	3,07	41	4,37	0.69(0.28-1.64)	0.483
A*31	5	2,19	21	2,23	0.98(0.32-2.78)	0.835
A*32	12	5,26	53	5,65	0.93(0.46-1.83)	0.946
A*33	9	3,94	28	2,98	1.34(0.58-3.01)	0.594
A*34	-	-	1	0,1	-	-
A*66	2	0,87	4	0,42	2.07(0.26-13.14)	0.333
A*68	11	4,82	39	4,15	1.17(0.55-2.41)	0.792
A*69	3	1,31	5	0,53	2.49(0.47-12.00)	0.192
A*80	-	-	1	0,1	-	-

AF: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

Tablo 4.1.8. FCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-B allel frekansları

Hasta (FCXM Pozitif)			Kontrol (FCXM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 228			2n = 938			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
B*07	10	4,38	42	4,47	0.98(0.45-2.06)	0.905
B*08	14	6,14	38	4,05	1.55(0.78-3.02)	0.233
B*13	7	3,07	43	4,58	0.66(0.27-1.55)	0.406
B*14	9	3,94	21	2,23	1.79(0.75-4.19)	0.219
B*15	6	2,63	33	3,51	0.74(0.28-1.88)	0.643
B*18	22	9,64	59	6,29	1.59(0.92-2.73)	0.1001
B*19	-	-	1	0,1	-	-
B*27	8	3,5	25	2,66	1.33(0.54-3.14)	0.641
B*35	43	18,85	147	15,67	1.25(0.84-1.85)	0.285
B*37	1	0,43	11	1,17	0.37(0.02-2.78)	0.479
B*38	7	3,07	51	5,43	0.55(0.23-1.28)	0.192
B*39	4	1,75	10	1,06	1.66(0.43-5.80)	0.493
B*40	4	1,75	31	3,3	0.52(0.15-1.57)	0.310
B*41	7	3,07	31	3,3	0.93(0.37-2.24)	0.976
B*42			1	0,1		
B*44	11	4,82	74	7,88	0.59(0.29-1.17)	0.145
B*45	1	0,43	5	0,53	0.82(-)	1
B*46	-	-	2	0,21	-	-
B*47	-	-	5	0,53	-	-
B*48	-	-	4	0,42	-	-
B*49	11	4,82	37	3,94	1.23(0.58-2.56)	0.678
B*50	11	4,82	38	4,05	1.20(0.57-2.48)	0.735
B*51	23	10,08	132	14,07	0.69(0.42-1.12)	0.138
B*52	11	4,82	31	3,3	1.48(0.69-3.13)	0.364
B*53	-	-	2	0,21	-	-
B*54	-	-	2	0,21	-	-
B*55	6	2,63	32	3,41	0.77(0.28-1.95)	0.698
B*56	1	0,43	7	0,74	0.59(0.03-4.73)	1
B*57	4	1,75	11	1,17	1.50(0.40-5.16)	0.510
B*58	6	2,63	11	1,17	2.28(0.74-6.73)	0.119
B*73	1	0,43	-	-	-	-
B*78	-	-	1	0,1	-	-

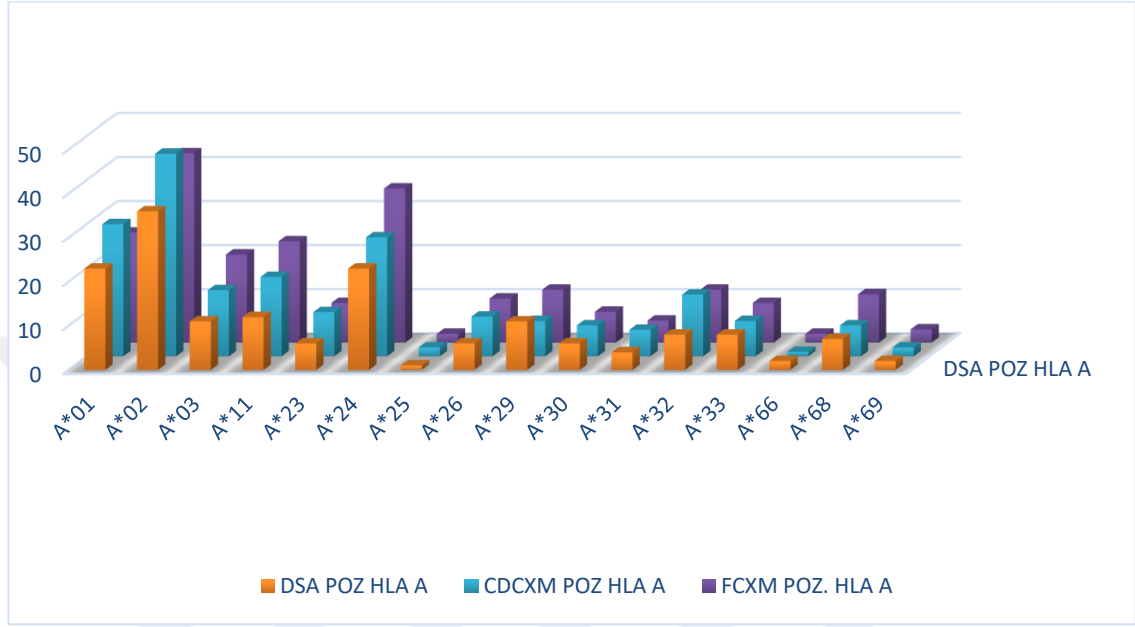
AF: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

Tablo 4.1.9. FCXM pozitif ve negatif hasta grubunda HLA-DRB1 allel frekansları

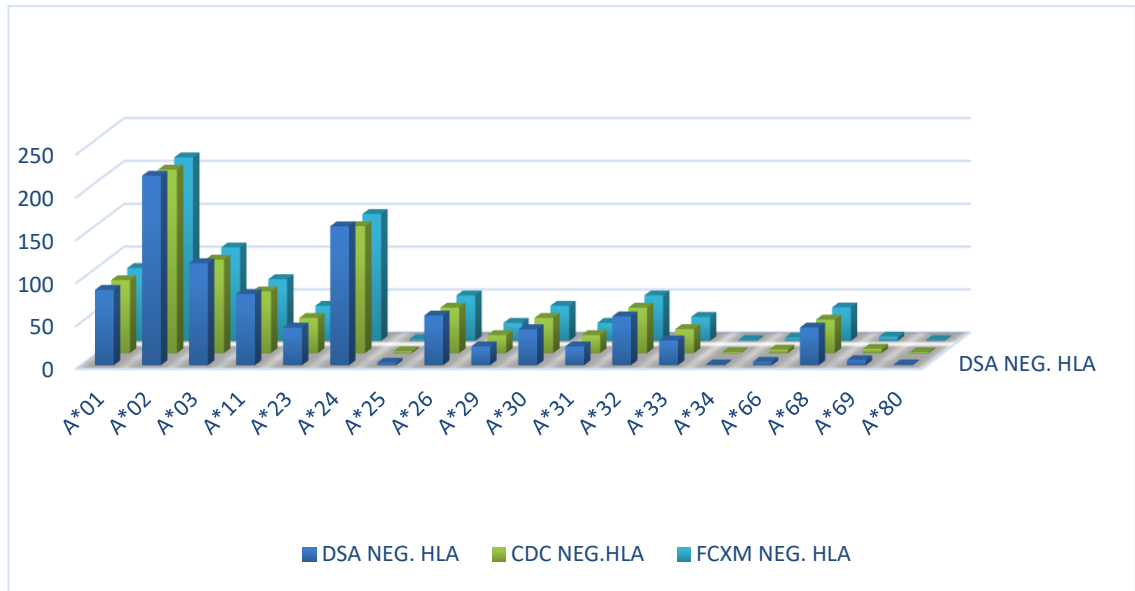
Hasta (FCXM Pozitif)			Kontrol (FCXM Negatif)		İstatistik Analiz	
2n = 228			2n = 938			
HLA	n	AF (%)	n	AF (%)	OR (% 95 CI)	p
DRB1*01	22	9,64	43	4,58	2.22(1.26-3.91)	0.0046
DRB1*03	28	12,28	98	10,44	1.20(0.75-1.92)	0.496
DRB1*04	45	19,73	166	17,69	1.14(0.78-1.68)	0.534
DRB1*07	14	6,14	82	8,74	0.68(0.36-1.26)	0.251
DRB1*08	5	2,19	16	1,7	1.29(0.41-3.80)	0.582
DRB1*09	4	1,75	7	0,74	2.38(0.58-9.10)	0.240
DRB1*10	5	2,19	23	2,45	0.89(0.29-2.51)	0.990
DRB1*11	43	18,85	215	22,92	0.78(0.53-1.14)	0.216
DRB1*12	1	0,43	7	0,74	0.59(0.03-4.73)	1
DRB1*13	17	7,45	82	8,74	0.84(0.47-1.49)	0.622
DRB1*14	10	4,38	72	7,67	0.55(0.26-1.13)	0.110
DRB1*15	24	10,52	84	8,95	1.20(0.72-1.98)	0.544
DRB1*16	10	4,38	43	4,58	0.95(0.44-2.01)	0.961

F: Allel frekansı, CI: Confidence interval, OR: Odd ratio, 2n: Allel sayısı

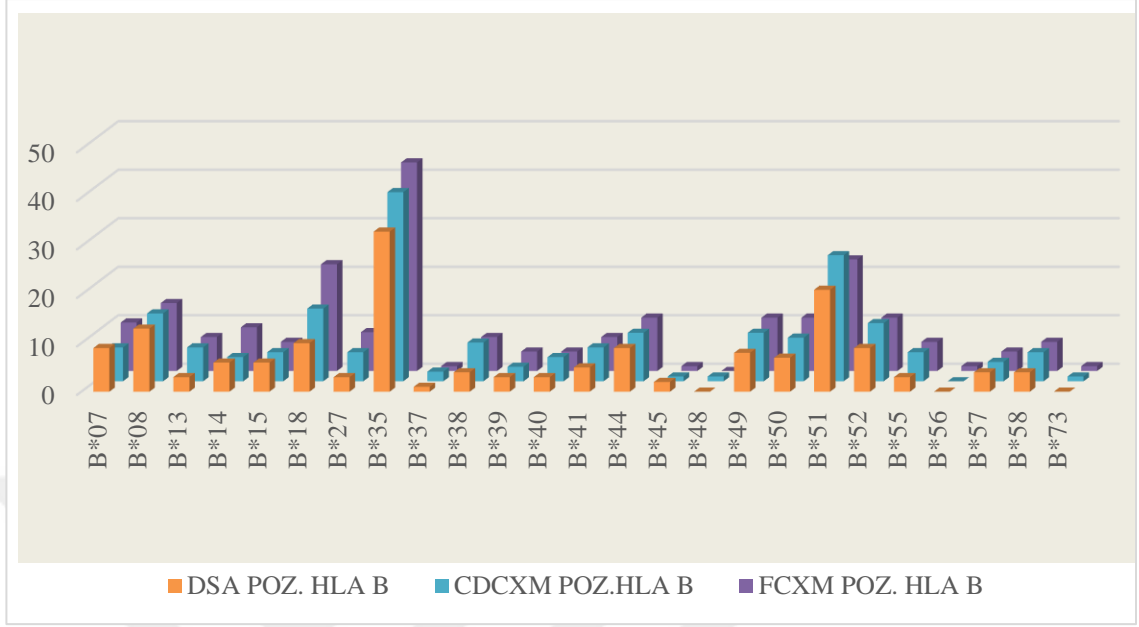
Çalışmamızda uygulanan tüm çaprazlama yöntemleri ile HLA allel frekanslarını içeren tablolar aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1.8).



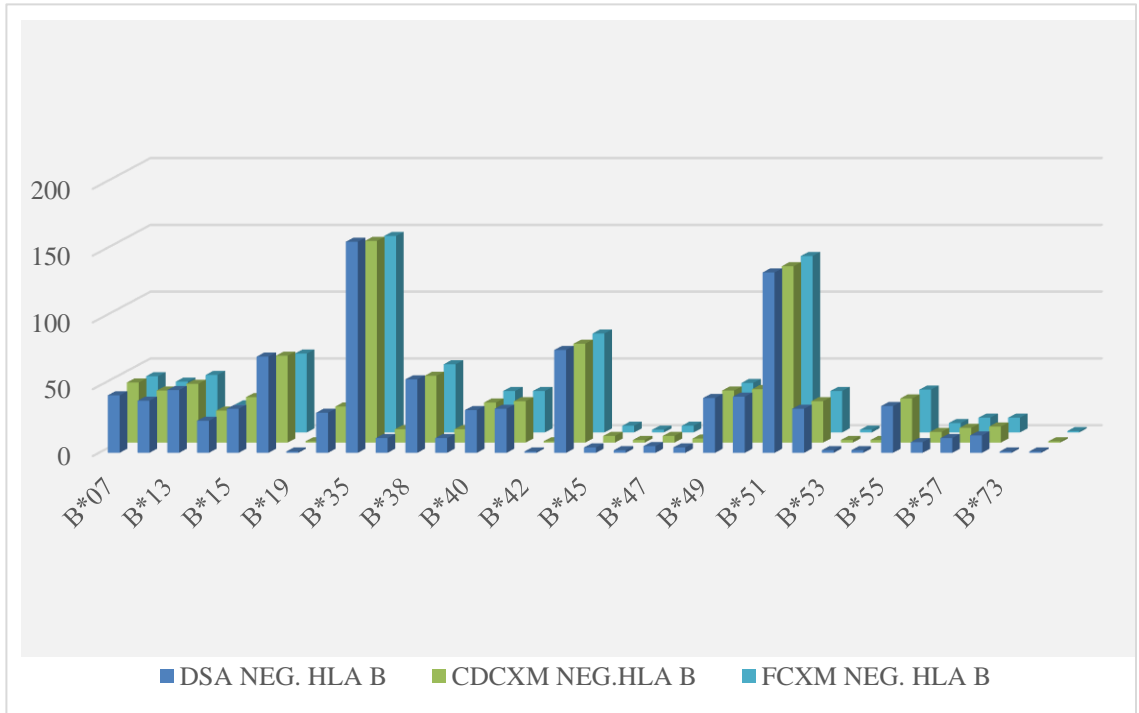
Şekil 4.1.8. Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç pozitif olan hastalarda HLA A dağılımı ve frekansları



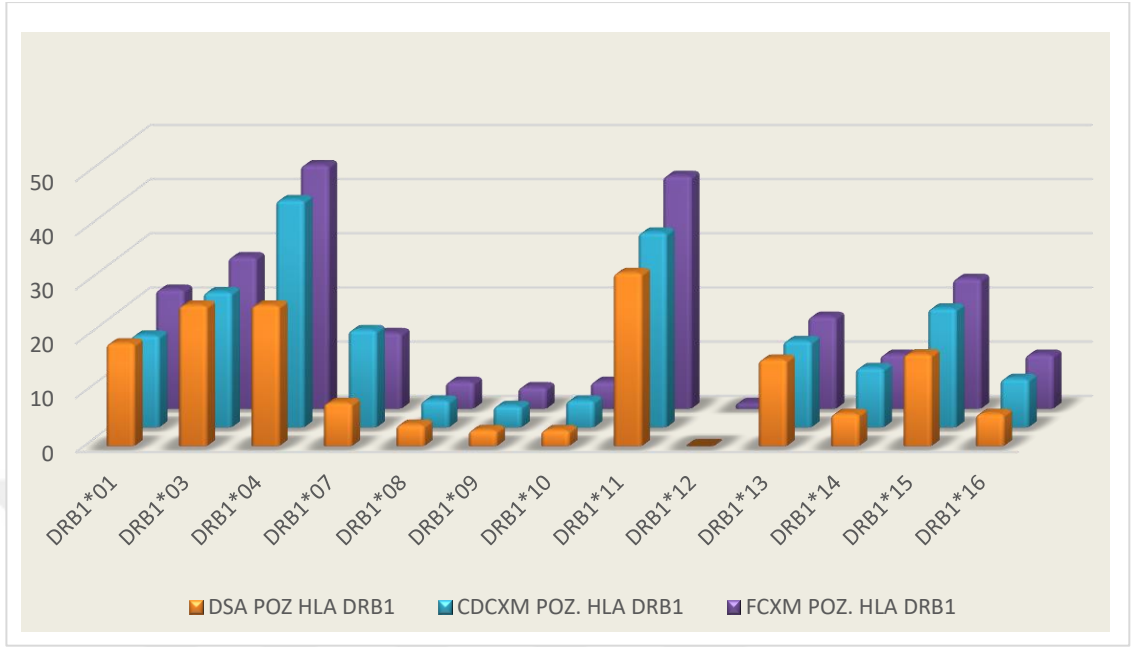
Şekil 4.1.9. Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç negatif olan hastalarda HLA-A dağılımı ve frekansları



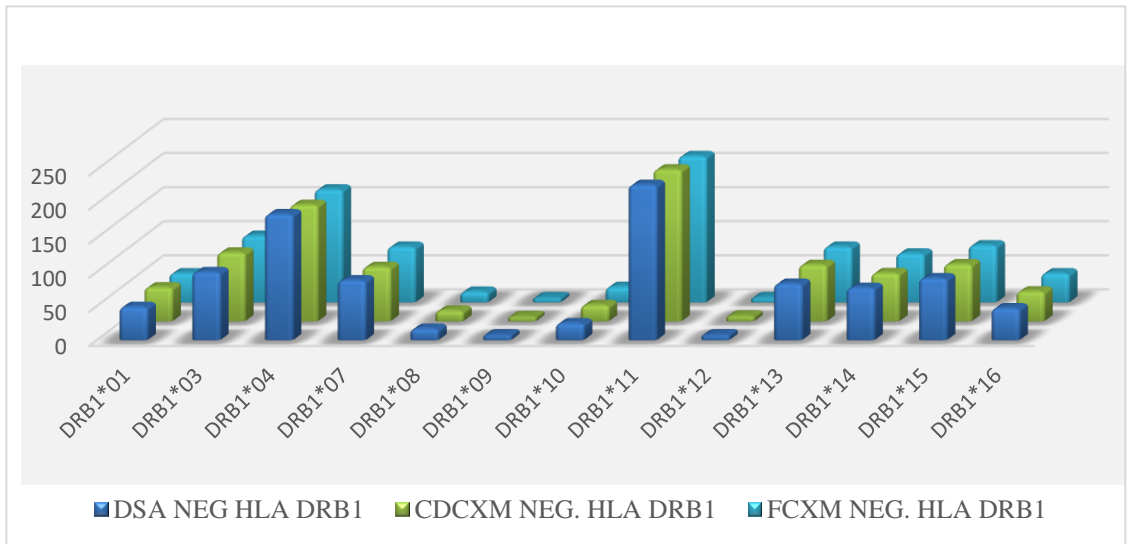
Şekil 4.1.10. Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç pozitif olan hastalarda HLA-B dağılımı ve frekansları



Şekil 4.1.11. Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç negative olan hastalarda HLA-B dağılım ve frekansı



Şekil 4.1.12. Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç pozitif olan hastalarda HLA DRB1 dağılımı ve frekansı



Şekil 4.1.13. Lum -DSA ve CDCXM – FCXM sonuç negative olan hastalarda HLA DRB1 dağılımı ve frekansı

5. TARTIŞMA

Türk Nefroloji Derneği (TND) tarafından ülkemizde kronik böbrek yetmezliği (KBY) ile ilgili kapsamlı olarak yapılan araştırmalarda; hastalığın en önemli sebebinin diyabet ve hipertansiyon olduğu, diğer sebeplerin daha geri sıralarda yer aldığı belirlenmiştir (Seyahi ve ark., 2014; Hill ve ark., 2016). Multifaktöriyel-poligenik kalıtmı olan KBY'nin dünyada ve ülkemizde insidansının giderek arttığı, sosyo-ekonomik maliyetinin de yüksek olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Son dönem böbrek yetmezliği hastalarına (SDBH) hayati tehlike oluşturan üremiden kaçınmak ve yaşam kalitesini artırmak için böbrek nakli önerilmektedir (Van Dijk ve ark., 2001). İnsan genomunda bilinen en polimorfik gen bölgesi olan MHC-HLA ile hastalıklar arasındaki ilişkilerin araştırılması son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (Uçar ve ark., 2012). SDBH'da organ-doku naklinde alıcı ve vericilerinin doğru seçiminde kritik olan HLA doku tiplene ve cross-match (çaprazlama) testleri önem kazanmaktadır. Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Organ Nakli birimine başvuran 586 KBY'nin ülkemizin her coğrafi bölgesinden başvurması nedeniyle ülke ortalamasına yakın HLA allel profilini yansıtacağından, Luminex-DSA XM sonuçları ile (pozitif, negatif) HLA allel dağılımı arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığını belirlemeyi hedefledik.

HLA allel polimorfizminin birçok otoimmün hastalıkların, yaygın inflamatuvar bağırsak hastalıklarının, bazı nefropati ile glomerülo nefrit gibi böbrek hastalıklarının ve de alerjilerin patogenezi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Dai ve ark., 2015). Bazı Asya ülkelerinde yapılan bir çalışmada SDBH ile HLA-A*24, HLA-B*55, HLA-B*54, HLA-B*40, HLADRB1*04 allelleri pozitif ilişkilendirilmiştir (Cao ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise HLA-DRB1*11 ve HLA-DRB1*03 allelleri KBY ile pozitif ilişkili olarak bulunmuşken, HLA-DRB1*08 allelinin hastalıkla negatif ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Dai ve ark., 2015). Yapılan araştırmalara göre Amerika'da Afrika, İspanyol, Hindistan ve Asya kökenlilerde Tip 2 diyabetten dolayı KBY riski daha yüksektir (<https://www.kidney.org/atoz/content/diabetes>, Erişim tarihi: 13 Mayıs 2019). Henüz moleküler tekniklerin gelişip kullanılmadığı bir dönemde, Türkiye'de serolojik yöntem ile yapılan bir çalışmada, KBY'li hastalar ile HLA arasında bir ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır (Yasavul ark., 1993). Günümüzde insanlarda, gelişmiş moleküler teknikler ile

belirlenmiş 20.000'den fazla HLA sınıf I ve II alleli bulunmaktadır. (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>, erişim tarihi 17 Mayıs 2019). Türkiye'de KBY ile HLA ilişkisine yönelik ilk kapsamlı araştırmada, 2010 yılında Karahan ve ark. en sık rastlanan HLA alellerinin sırasıyla HLA-A*02, HLA-DRB1*11 ve HLA-B*35 olduğu tespit edilmiştir (Karahan ve ark., 2009; Karahan ve ark., 2010). Karadeniz Teknik Üniversitesi ve Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dallarında 2014 ve 2017 yıllarında yapılan iki farklı tez çalışmasında sırasıyla Trabzon'da KBY olan bireylerde en sık HLA-A*02, HLA-B*35 ve HLA-DRB1*11 allelleri tespit edilmiştir. Fakat bu allellerin kontrol grubunda da sık görülmesi nedeniyle KBY ile HLA allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Cansız A., 2014). Antalya'da ise KBY'de en sık görülen HLA allelleri HLA-A*03, HLA-B*35, HLA-DRB1*12 olarak bulunmuştur. Bu allellerden HLA-A*03 ve HLA-B*35 sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir. Pozitif ilişkili allellerin aksine; HLA-A*24, A*26, HLA-B*07, -B*08, B*51, HLA-DRB1*13, DRB1*11, DRB1*03 allelleri hastalıkla negatif ilişkili olarak bulunmuştur (Karakus B., 2017). Membranöz ve diyabetik nefropatinin gelişmesinde, HLA-DR3 allelinin pozitif ilişkili olduğu, buna karşın idiopatik IgA nefropati gelişiminde koruyucu etkisi olduğu İngiltere, Fransa, Çin ve Güney Amerika'da yapılan serolojik çalışmalarla gösterilmiştir (Watts ve ark., 1992; Chevrier ve ark., 1997; Doxiadis ve ark., 2001). Bu bilgiye ilave olarak ayrıca, Mısır popülasyonunda diyabetik nefropati ile HLA-DRB1*03 ve HLA-DRB1*11'in ilişkili olduğu kanaatine varılmıştır (El-Gezawy ve ark., 2011). Meksika'da Tip 2 diyabete bağlı SDBH ile HLA-DRB1*15 ve DQB1*05 allelleri hastalığa yatkınlık gösterirken, Meksika ve ABD'de HLA-DRB1*04 allelinin negatif ilişkili (koruyucu) olduğu bildirilmiştir (Ruiz-Morales ve ark., 2004; Alaez ve ark., 2008). Türkiye'de İstanbul, Trabzon ve Antalya'da yapılan yayın ve tez çalışmalarında yapılan istatistiksel analizlerin sonucunda, HLA-A*25, A*66 A*69, HLA-B*08, B*55 B*58, HLA-DRB1*03 ve DRB1*04 allelleri diyabetik nefropati ile pozitif ilişkili olarak tanımlanmıştır. HLA-DRB1*03 ve DRB1*07 allellerinin ise koruyucu (negatif ilişkili) olduğu gösterilmiştir. (Karahan ve ark., 2009; Karakus B., 2017; Cansız A., 2014).

İtalya, Amerika Birleşik Devletleri, Çin ve diğer ülkelerde popülasyonlarında yapılan çalışmalarda, immün kompleks aracılı glomerülonefrit HLA-DRB1*04 ile ilişkilendirilmiştir (Yang ve ark., 2009; Chang ve ark., 2012; Jiyun ve ark., 2012). Ramanathan ve ark. 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada ise nefrotik sendrom ile DRB1*07, DQB1*02 alleleri arasında kuvvetli pozitif ilişkili bulunmuşken, DRB1*10, DQB1*05, DQB1*06 alleleri hastalığa karşı koruyucu olarak tespit edilmiştir (Ramanathan ve ark., 2016). Türkiye’de Trabzon’da yapılan bir çalışmada HLA-B*08 alleli, glomerülonefrit ile pozitif ilişkili, HLA-DRB1*04 alleli ise negatif ilişkili olarak bulunmuştur (Cansız A., 2014). Antalya’da ise HLA-A*24 alleli glomerülonefrit ile pozitif ilişkili olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar, Antalya-Trabzon farkının HLA polimorfizimden kaynaklanabileceği kanaatine varmışlardır (Karakuş B., 2017).

Hipertansiyon ve KBY arasındaki ilişkiyi araştıran literatürdeki nadir çalışmalarda; ABD’de HLA-B*35 ve HLA-DRB1*03 allellerini taşıyan bireylerde hipertansif nefropatiye bağlı KBY görülen bireylerde allel frekansları istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Freedman ve ark., 1991). Türkiye’de Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik programında yapılan bir tez çalışmasında hipertansiyon etiyolojili KBY hastalarında HLA-A*02, HLA-DRB1*01 ve HLA-DRB1*03 alleleri hastalıkla pozitif ilişkili olarak tespit edilmiş, HLA-DRB1*13 alleli ise hastalıkla negatif ilişkili (koruyucu) olarak değerlendirilmiştir (Karakuş B., 2017). Yukarıda sadece KBY etiyolojilerine göre HLA ilişkisi arasında bulunmuş allel frekansları ile ilgili literatürdeki bilgi ve bulgular paylaşılmıştır. Daha önce çalışma grubumuzun Antalya ve Trabzon’daki etiyolojilere göre KBY ve HLA ilişkisi verilerine bağlı kalınmıştır. Bu çalışmada daha çok Lum-DSA XM başta olmak üzere farklı çaprazlama yöntemlerinin sonuçları ile HLA ilişkisine önem verilmiştir.

Panel reaktif antikor (PRA) pozitifliği ile HLA allel frekansı arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Kreisler ve ark. tarafından HLA-DRB1*02 alleleline sahip kişilerin artmış PRA pozitifliği ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kreisler ve ark., 1988). Fuller ve ark. ise DRB1*01 ve DRB1*03'ün PRA pozitifliği ile korele olduklarını (Fuller ve Fuller, 1999), Heise ve ark. ile Karakuş B. HLA-B*44, B*53 ve A*02 ile birlikte HLA-DR*02 pozitifliğinin yüksek PRA pozitifliği ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir (Heise ve ark., 2001; Karakuş B., 2017). Türkiye'de üç farklı çalışmada, PRA ile HLA allelleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Karahan ve ark., PRA negatif hastalara göre PRA pozitif hastalarda HLA-A*03, HLA-A*66 ve HLA-B*18 allellerinin frekansının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (Karahan ve ark., 2010). 2015 yılında yapılan bir çalışmada PRA'sı pozitif olan hastalar ile PRA'sı negatif olan hastaların HLA allel frekansları belirlenerek, PRA pozitif olan hasta grubunda HLA-A*24, HLA-B*50, HLA-DRB1*01 allel frekansları negatif olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Uygun F.D.K., 2015). Antalya'da Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik programında yapılan bir yüksek lisans tez çalışmasında ise hem PRA sınıf I hem de sınıf II pozitif olan KBY hastalarında sırasıyla HLA-A*02, A*24, HLA-B*35 ve HLA-DRB1*11 en sık görülen alleller olarak tanımlanmıştır. PRA sınıf I pozitif, sınıf II negatif olan KBY hastası bireylerde HLA-A*03 ve HLA-DRB1*04 en sık görülen alleller olarak belirlenmiştir. PRA sınıf II pozitif, PRA sınıf I negatif olan KBY görülen bireylerde en sık görülen allellerin HLA-A*02, A*24 ve HLA-B*35 olduğu saptanmıştır (Karakuş B., 2017).

İnsanların ebeveynlerinden kalıtılıp hücre yüzeylerinde ko-dominant eksprese ettiği HLA moleküllerinin birinci vazifesi kendine genetik olarak yabancı olanı büyük bir doğrulukla tanımaktır. Vücut nakledilen organlardaki HLA moleküllerini tanıyıp yabancılik oranına göre özel antikorlar oluşturur. Her nakil öncesinde hasta ve vericilerin immunogenetik olarak değerlendirilmesi için; ABO kan grupları, HLA doku grupları, anti-HLA antikorları (Panel Reaktif Antikor = PRA) ve CDCXM, FCXM veya Lum-DSA XM testlerinin rutin olarak yapılması gerekir (Anasetti ve ark., 1990; Gebel ve ark., 2003). Vericiye özgü PRA (donor spesifik antikor-DSA veya Single antijen) saptandığında, saptanan antikorun IgG, IgM tipinde mi olduğu, T veya B hücresine mi özgü olduğunun önceden bilinmesi, rejeksiyon riskinin derecesini belirleyip ona göre önlem alınmasına

yardımcı olur (Bray, 1994; Güngör, 2017). Hastalarda PRA gelişmesinde daha önceki nakil, kan transfüzyonu ve gebeliğin rol oynadığı bilinmektedir (Dickstein ve ark., 2008). Solid organ nakli sonrasında de nova DSA oluşma olasılığının en yüksek olduğu durum 'nakil geçmişi olan hastalar' olarak tespit edilmiş, bunu sırasıyla 'kan transfüzyonu ve gebeliğin' takip ettiği belirtilmiştir (Jordan ve Vo, 2014).

Çalışmamızda, hastaların %14 (n=82)'ünde PRA Sınıf I tanımlama testi pozitif iken, PRA Sınıf II tanımlama testi ise %20,4 (n=119)'ünde pozitif sonuç verdiği görüldü. Ayrıca çalışmamızda böbrek nakli için önemli olan kan grubu uyumuna azami ölçüde dikkat edilmiştir.

Böbrek nakli öncesinde immunogenetik değerlendirme testlerinden bir diğeri de Cross-match testleri olup; vericideki HLA moleküllerine karşı, alıcıda anti-HLA antikörlerinin saptanması amacıyla yapılan testlerdir. Testin yapılmasının asıl faydası antikör aracılı hiperakut organ reddinin engellenmeye çalışılmasıdır. Terasaki ve ark. (Patel ve Terasaki, 1969) yaptığı çalışmada CDCXM test sonucu pozitif olan hastaların akut greft kaybı için yüksek risk taşıdığını göstermişlerdir. CDCXM testi eğer pozitif ise nakilden vazgeçilmelidir. Anti-HLA (PRA) dışındaki diğer bazı antikörlerin klinik olarak ilişkili olup olmadığı halen tartışmalıdır (Koçyiğit ve ark., 2019) Laboratuvarımızda da uyguladığımız çaprazlama testlerinin başlıcaları; CDCXM, FCXM ve Luminex çaprazlama (Lum-DSAXM)'dir. Bu çalışmada 586 hastaya yapılan farklı çaprazlama (CDCXM, FCXM ve Lum-DSA XM) test sonuçları incelendi ve HLA ile ilişkisinin olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi. İlk elde ettiğimiz bulgulara göre, CDCXM testlerinde tüm hastaların %17,1 (n=100)'i pozitif, %82,9 (n=484)'unun negatif tespit edildiği görüldü. FCXM testlerinde 586 hastanın %19,3 (n=113) pozitif sonuç vermiş ve %80,7 (n=471) negatif olduğu görülmüştür. Lum-DSA XM testlerinin %14 (n=82)'ünün pozitif sonuç verirken, %86 (n=502)'sının negatif olduğu görüldü. Bu bulgulara göre çeşitli literatürlerde de belirtildiği gibi en hassas gelişmiş metodun Lum-DSA XM olduğu görülmektedir.

Böbrek nakillerinde, hasta ile vericisi arasında HLA doku uyumu oranının yüksek olması daima avantaj teşkil eder. Çünkü, hücreler yüzeylerindeki HLA molekülleri ile kendinden olmayana yüksek doğrulukta tanırlar ve farklı olan HLA molekülleri edinsel immün cevabı

aktifleştirerek rejeksiyona neden olurlar (Güleç ve ark., 2019). Çalışma grubunda nakil öncesi yapılan farklı çaprazlama ve HLA doku grubu testleri ile hasta ve verici lehine en uygun immunogenetik tercih yapılmıştır. Çalışmamızda, hastaların HLA doku tipleme sonuçlarına göre en sık görülen HLA-A grubunda en yüksek frekansları sırasıyla HLA-A*02 %22 (n=257), A*24 %16 (n=185) ve A*03 %11 (n=129) olarak saptanmıştır.

HLA-B grubunda ise HLA-B*35 %17 (n=190), B*51 %14 (n=156) ve B*44 %8 (n=86) olarak saptanmıştır. HLA-DRB1 grubunda da HLA-DRB1*11 %22 (n=260), DRB1*04 %18 (n=211) ve DRB1*03 %11 (n=126) olarak saptanmıştır.

Literatürdeki üç farklı araştırma sonucuna göre; CDCXM testinde negatif sonuç veren hasta örneklerinin FCXM testinde pozitif olarak belirlemişler (sırasıyla %3,4'ü %8,7 ve %19,1). CDCXM testi, organ nakli sonrası saatler/günler içerisinde meydana gelen çok düşük seviyedeki DSA'ları belirleyebilecek kadar yüksek hassasiyette değildir (Gebel ve ark., 2003; Koktathong ve ark., 2005). İmmunogenetik riskleri belirlemek için daha gelişmiş XM test yöntemlerine ihtiyaç vardır (Wang ve ark., 2008). Böbrek nakli adayı için bilimsel verilerin ışığında; hem FCXM hem de CDCXM sonucu negatif ise düşük immünolojik risk grubuna girer ve nakil düşünülebilir. FCXM negatif, DTT ilaveli CDCXM pozitif ise nakil yapılması uygun değildir. Çünkü bu sonuç hiperakut red için yüksek risk anlamına gelir. Eğer FCXM pozitif, CDCXM negatif ise daha önce de nakil öyküsü yok, kan transfüzyonu yapılmamış, gebelik geçirmemiş kişilere orta risk grubunda olduğundan uygun tedavi yöntemleriyle birlikte nakil düşünülebilir (Scornik ve ark., 1994). Son yıllarda geliştirilen Luminex teknolojisi sisteminin (katı faz yöntemleri, akış esaslı boncuk analizleri) CDCXM yönteminden çok daha hassas olduğu kanıtlanmış ve diğer yöntemler tarafından belirlenemeyen HLA antikorlarının saptanabileceği gösterilmiştir (Tait ve ark., 2009). Luminex DSA XM, sadece HLA ya karşı oluşmuş antikorların (komplemanı fikse eden ya da etmeyen) varlığını saptar ve oluşan antikorun hangi sınıf HLA'ya karşı oluştuğunu verir (Boldt ve ark., 2006). Bu durum DSA yönteminin diğer yöntemlere karşı bir avantajıdır. Yaptığımız çalışmada farklı çaprazlama testi uyguladığımız hastalardan elde ettiğimiz HLA allel frekansları bulgular kısmında yazılı metin, tablo ve grafikler ile yansıtılmıştır. CDCXM testi yapılan 586 hastanın 105'i pozitif, 481'ide negatif sonuç vermiştir. CDCXM pozitif ve CDCXM negatif (kontrol

grubu) HLA allelleri arasında yapılan istatistiki analiz sonuçlarına göre; HLA-A*01 (p=0.000025), A*02 (p=0.0305), A*25 (p=0,0428), A*29 (0.0454), HLA-B*08 (p=0.004), B*35 (p=0.001), B*52 (p=0.005) alelleri pozitif ilişkili olarak tespit edilmiştir. FCXM çalışılan 583 hastadan, 114'ü pozitif, 469 hasta ise negatiftir. FCXM pozitif ve FCXM negatif hastaların HLA allelleri istatistiksel olarak incelendiğinde; HLA-A*29 (p=0.0246) ve HLA-DRB1*01 (p=0.0046) KBY ile pozitif ilişkili olarak anlamlı bulunmuştur. HLA-B grubunda istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir. Lum-DSA XM testi yapılan 586 hastanın 83'ü pozitif, 503'ünde negatif sonuç vermiştir. Lum-DSA XM pozitif ve Lum-DSA XM negatif (kontrol grubu) hastaların HLA allelleri arasında yapılan istatistiksel analizlerin sonucuna göre, HLA-A*29 (p=0.003), HLA-B*08 (p=0.036) ve HLA-DRB1*01 (p=0.001), DRB1*03 (p=0.0384) allelleri hastalıkla pozitif ilişkili olarak bulunmuştur. Henüz literatürde çaprazlama yöntemleri ile HLA allel frekansları arasında ilişkiyi gösteren veri olmayışı bizim önceliğimizi oluşturmaktadır.

Sonuçta farklı çaprazlama test yöntemlerini kıyaslarsak, Lum-DSA XM testi; çok düşük miktardaki antikor titresini tespit edebilirken, FCXM; orta düzeyde antikor titresini, CDCXM; donöre spesifik antikorları saptayabilmesi için serumda yüksek miktarda antikor olması gerekmektedir. Çaprazlama testleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, sensitivitesi en yüksek test solid faz yöntemine dayalı Lum-DSA XM iken, FCXM orta düzeyde, CDCXM'in sensitivesinin ise en düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir Lum-DSA XM > FCXM > CDCXM). Literatürde, Luminex teknolojisi sırasıyla CDC ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırılmış ve Luminex teknolojisinin en duyarlı olduğu belirtilmiştir (Süsal ve ark., 2013). Muhtemel kötü üzücü sonuçlar ile yüzleşmemek için önceki serumlarında PRA pozitifliği olan hastaların, CDCXM ve FCXM sonucu negatif olsa bile Lum-DSA XM ile donöre spesifik antikor varlığı açısından araştırılmaları hatta LSA ve C1q gibi diğer testlerin de yapılması, olası immünolojik risklerin tam anlamı ile değerlendirilmesine olanak sağlar (Crespo ve ark., 2013; Koçyiğit ve ark., 2019). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, bütünüyle değerlendirildiğinde literatürdeki diğer çalışmaların sonuçları ile oldukça uyumlu olduğu görülmektedir.

Ülkemizde birçok merkezde Sağlık Bakanlığının da kabulü ile böbrek nakli için HLA-A, -B ve -DRB1 uyumu incelenmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda HLA-C, -DQA1 ve -DQB1 uyumunun da böbrek nakli öncesi rolü ve greft sağ kalım süresindeki etkisinin önemli olduğu öne sürülmüştür (Heise ve ark., 2001; Duquesnoy ve Marrari, 2011). İmmunogenetik değerlendirme testlerinde, PRA pozitifliği olan hastalara yaptığımız Luminex yöntemli katı faz boncuk temelli single antijen testlerinde (LSA) bu yorumu rahatça gözlemekteyiz. Alıcı ve vericideki farklı HLA molekülleri doku veya hücre redlerine sebep olabilirler (Chinen ve Buckley, 2010). Hsia ve ark. yaptığı bir çalışmada, hasta ve donörlerde HLA-DQ uyumunun sağ kalıma fayda sağladığını belirtmişlerdir (Hsia ve ark., 1993). Rene J. Duquesnoy ve ark. ise yaptıkları çalışma ile, HLA-C doku tipi uyuşmayan hastalarda gelişen HLA-C antikorlarının, böbrek nakli başarısızlıklarına katkıda bulunduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalar ışığında böbrek naklinde, HLA-C, DQB1 ya da DQA1 doku tiplerinden yararlanılması gerektiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Choo, 2007; Duquesnoy ve Marrari, 2011; Picascia ve ark., 2012). Laboratuvarımızda, PRA pozitifliği olan hastalara uyguladığımız LSA (Luminex Single Antijen) testi sonucunda HLA-C, DQB1 veya DQA1 allelerine karşı antikor tespit edilmesi durumunda, hasta ve vericilerin bu HLA doku grupları ilave olarak sekans bazlı tiplendirme yöntemiyle (SBT) çalışılmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. KBY hasta ve donör adaylarına yapılan farklı çaprazlama test sonuçlarına göre;
 - a. CDCXM pozitif %17,1 (n=100) /CDCXM negatif %82,9 (n=484).
 - b. FCXM pozitif %19,3 (n=113) /FCXM negatif %80,7 (n=471).
 - c. Lum-DSA XM pozitif %14 (n=82) /Lum-DSA XM negatif %86 (n=502).
2. KBY hastalarının anti-HLA antikorları (PRA) tanımlama test sonuçlarına göre;
 - a. PRA Sınıf I tanımlama testi %14 (n=82)'ünde pozitif iken,
 - b. PRA Sınıf II tanımlama testi %20,4 (n=119)'sinde pozitif bulundu.
3. Hastaların CDCXM ve Lum-DSA XM iki farklı yöntem ile elde edilen sonuçları aşağıdaki gibidir.
 - a. CDCXM pozitif/Lum-DSA XM pozitif olan hasta sayısı 58 (%10)'dir.
 - b. CDCXM negatif/Lum-DSA XM negatif olan hasta sayısı 462 (%79)'dir.
 - c. CDCXM negatif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 24 (%4)'tür.
 - d. CDCXM pozitif/Lum-DSA XM negative hasta sayısı 42 (%7)'dir.
4. Hastaların FCXM ve Lum-DSA XM iki farklı yöntem ile elde edilen sonuçları aşağıda verilmiştir.
 - a. FCXM pozitif /Lum-DSA XM pozitif olan hasta sayısı 70 (%12)'dir.
 - b. FCXM negatif/Lum-DSA XM negatif olan hasta sayısı 460 (%79)'dir.
 - c. FCXM negatif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 12 (%2)'dir.
 - d. FCXM pozitif/Lum-DSA XM negative hasta sayısı 44 (%8)'dür.
5. Hastaların PRA sınıf I değerleri ile Lum-DSA XM sonuçları aşağıda verilmiştir.
 - a. PRA sınıf I pozitif/Lum-DSA XM pozitif olan hasta sayısı 41 (%7)'dir.
 - b. PRA sınıf I negatif/Lum-DSA XM negatif hasta sayısı 463 (%79)'dir.
 - c. PRA sınıf I negatif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 41 (%7)'dir.
 - d. PRA sınıf I pozitif/Lum-DSA XM negative hasta sayısı 41 (%7)'dür.

6. Hastaların PRA sınıf II değerleri ile Lum-DSA XM sonuçları aşağıdaki verilmiştir.
 - a. PRA sınıf II pozitif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 44 (%8)'dür.
 - b. PRA sınıf II negative/Lum-DSA XM negatif hasta sayısı 429 (%73)'dur.
 - c. PRA sınıf II negatif/Lum-DSA XM pozitif hasta sayısı 38 (%6)'dır.
 - d. PRA sınıf II pozitif/Lum-DSA XM negative hasta sayısı 75 (%13)'dir.
7. Hastaların tamamının (n=586) HLA doku tipleme sonuçlarına göre HLA-A*02 %22 (n=257), A*24 %16 (n=185), A*03 %11 (n=129), HLA-B*35 %17 (n=190), B*51 %14 (n=156), HLA-DRB1*11 %22 (n=260), DRB1*04 %18 (n=211) ve DRB1*03 %11 (n=126) en sık görülen alleller olarak saptanmıştır.
8. CDCXM pozitif hasta grubunda; HLA-A*02 (%21.9), A*01 (%14.28), A*24 (%12.85), HLA-B*35 (%18.57), B*51 (%12.38) HLA-DRB1*04 (%20), DRB1*11(17.14), DRB1*03 (%11.9) ve DRB1*15 (%10.47) allelleri diğerlerine göre daha yüksek sıklıkta bulunmuştur.
9. CDCXM negatif hasta grubunda HLA-A*02 (%22.24), A*03 (%12.05), A*24 (%16.32), HLA-B*35 (%15.69), B*51 (%13.72), HLA-DRB1*03 (%10.49), DRB1*04 (17.74) ve DRB1*11 (%23.18) allelleri diğerlerine göre daha yüksek sıklıkta bulunmuştur.
10. CDCXM pozitif ve negative hastaların HLA gruplarına yapılan istatistiki analizinin ışığında; HLA-A*01 (p=0.000025), A*02 (p=0.0305), A*25 (p=0,0428), A*29 (0.0454), HLA-B*08 (p=0.004), B*35 (p=0.001) ve HLA-B*52 (p=0.005) allelleri pozitif ilişkili olarak tespit edilmiştir. HLA-DRB1 grubunda istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir.
11. FCXM pozitif olan hastalarda HLA-A*02 (% 18.85), A*24 (%15.35), A*01 (%10.96), A*11 (%10.08), HLA- B*35 (%18.85), B*51 (%10.08), HLA-DRB1*04 (%19.73), DRB1*11 (%18.85) DRB1*03 (%12.28) ve DRB1*15 (%10.52) en sık görülen alleller olarak belirlenmiştir.
12. FCXM sonucu negatif olan hastalarda HLA-A*02 (% 22.81), A*03 (%11.62), A*24 (%15.77), HLA-B *35 (%15.67), B*51 (%14.07), HLA-DRB1*03 (%10.44), DRB1*04 (%17.69) ve DRB1*11 (%22.92) en sık görülen alleller olarak belirlenmiştir.

13. FCXM pozitif ve negative hastaların HLA gruplarına yapılan istatistiksel analizlerin sonucuna göre HLA-A*29 (p=0.0246) ve HLA-DRB1*01 (p=0.0046) KBY ile pozitif ilişkili olarak anlamlı bulunmuştur. HLA-B grubunda istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir.
14. Lum-DSA XM pozitif hastaların HLA doku tiplene sonuçlarına göre; HLA-A*02 (%21,68), A*01 (%13,85), A*24 (%13,85), HLA-B*35 (%19.87), B*51 (%12.65), HLA-DRB1*01 (%11.44), DRB1*03 (%15.66), DRB1*04 (%15.66), DRB1*11 (%19.27) ve DRB1*15 (%10.2) en sık gözlenen alleller olarak tespit edilmiştir.
15. Lum-DSA XM negatif hastaların (kontrol grubu) HLA doku tiplene sonuçlarına göre HLA-A*02 (%21,96), A*24 (%16,1), A*03 (%11,82), HLA-B*35 (%15.37), B*51 (%13.41), HLA-DRB1*11 (%22.66), HLA-DRB1*04 (%18.38) en sık gözlenen alleller olarak tespit edilmiştir.
16. Lum-DSA XM pozitif ve negative hastaların HLA gruplarına yapılan istatistiksel analizlerin sonucuna göre, HLA-A*29 (p=0.003), HLA-B*08 (p=0.036) ve HLA-DRB1*01 (p=0.001), HLA-DRB1*03 (p=0.0384) allelleri hastalıkla pozitif ilişkili olarak bulunmuştur.
17. Böbrek nakli öncesi yapılan çaprazlama testlerinin birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları vardır. Testlerin tek başına değil altın standart kabul edilen CDCXM'e en az bir tanesinin ilavesiyle (FCXM veya Lum-DSA XM) iki farklı testin birlikte rutin yapılması daima organ nakli risklerini belirlemede avantajdır. Organ ve doku nakillerinin başarısını artırmak için 4 basamaklı (digit) yüksek çözünürlüklü HLA-A, B, DRB1'in yanı sıra HLA-C, DQ, DP ve Luminex Single Antijen gibi daha ileri testlerin yapılmasından kaçınmamak gerekir.

KAYNAKLAR

Abbas, A. K., & Janeway, C. A. Immunology: Improving on nature in the twenty-first century. *Cell*. 2000; 100 (1): 129-138.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. Cellular and molecular immunology e-book: Elsevier Health Sciences; 2014, p:

Akoğlu E., Süleymanlar G.,Kronik Böbrek Yetersizliđi, Temel İç hastalıkları. Güneş Kitapevi. 1996; 769: 776.

Akpolat, T., Utaş, C., & Süleymanlar, G. Nefroloji el kitabı. 4. Baskı. Nobel Tıp Kitapevi. 2007.

Alaez, C., Lin, L., Flores-A, H., Vazquez, M., Munguia, A., Mignot, E., . . . Gorodezky, C. Association of narcolepsy-cataplexy with hla-drb1 and dqbl in mexican patients: A relationship between hla and gender is suggested. *BMC medical genetics*. 2008; 9 (1): 79.

Anasetti, C., Beatty, P. G., Storb, R., Martin, P. J., Mori, M., Sanders, J. E., . . . Hansen, J. A. Effect of hla incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Human immunology*. 1990; 29 (2): 79-91.

Anderson, J., & Glynn, L. G. Definition of chronic kidney disease and measurement of kidney function in original research papers: A review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011; 26 (9): 2793-2798.

Beckerman, P., Bi-Karchin, J., Park, A. S. D., Qiu, C., Dummer, P. D., Soomro, I., . . . Hu, C.-A. A. Transgenic expression of human apol1 risk variants in podocytes induces kidney disease in mice. *Nature medicine*. 2017; 23 (4): 429.

Bjorkman, P. J., Saper, M., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. t., & Wiley, D. Structure of the human class i histocompatibility antigen, hla-a2. *Nature*. 1987; 329 (6139): 506.

Boldt, B., Ladvienka, K., Clarke, M., & Chance, S. Donor-specific antibody detection by luminex: P-248. *Tissue Antigens*. 2006; 67 (6): 554-555.

Bray, R. A. (1994). Flow cytometry crossmatching for solid organ transplantation. In *Methods in cell biology* (Vol. 41, pp. 103-119): Elsevier.

Brenner, B. M., Lawler, E. V., & Mackenzie, H. S. The hyperfiltration theory: A paradigm shift in nephrology. *Kidney international*. 1996; 49 (6): 1774-1777.

Cansız A. Kronik Böbrek Hastalığının Etiyolojilerine Göre HLA Doku Tiplerinin Araştırılması. K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, TRABZON (Danışman: Prof. Dr. Uçar F.)

Cao, Q., Xie, D., Liu, J., Zou, H., Zhang, Y., Zhang, H., . . . Chen, P. Hla polymorphism and susceptibility to end-stage renal disease in cantonese patients awaiting kidney transplantation. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e90869.

Chang, D.-y., Luo, H., Zhou, X.-j., Chen, M., & Zhao, M.-H. Association of hla genes with clinical outcomes of anca-associated vasculitis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2012; 7 (8): 1293-1299.

Chapman, J. R., O'Connell, P. J., & Nankivell, B. J. Chronic renal allograft dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005; 16 (10): 3015-3026.

Chertow, G. M. Slowing the progression of vascular calcification in hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003; 14 (suppl 4): S310-S314.

Chevrier, D., Giral, M., Perrichot, R., Latinne, D., Coville, P., Muller, J., . . . Bignon, J. Idiopathic and secondary membranous nephropathy and polymorphism at tap1 and hla-dma loci. *Tissue antigens*. 1997; 50 (2): 164-169.

Chinen, J., & Buckley, R. H. Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125 (2): S324-S335.

Choo, S. Y. The hla system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal*. 2007; 48 (1): 11-23.

Consortium, M. S. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*. 1999; 401: 921-923.

Coresh, J., Astor, B. C., Greene, T., Eknoyan, G., & Levey, A. S. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult us population: Third national health and nutrition examination survey. *American journal of kidney diseases*. 2003; 41 (1): 1-12.

Crespo, M., Torio, A., Mas, V., Redondo, D., Pérez-Sáez, M. J., Mir, M., . . . Checa, M. D. Clinical relevance of pretransplant anti-hla donor-specific antibodies: Does c1q-fixation matter? *Transplant immunology*. 2013; 29 (1-4): 28-33.

Dai, C.-S., Chu, C.-C., Chen, S.-F., Sun, C.-Y., Lin, M., & Lee, C.-C. Association between human leucocyte antigen subtypes and risk of end stage renal disease in taiwanese: A retrospective study. *BMC nephrology*. 2015; 16 (1): 177.

Daniels, M. A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., . . . Palmer, E. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of ras/mapk signalling. *Nature*. 2006; 444 (7120): 724.

Dausset, J., & Souillou, J. An interview with Jean Dausset. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004; 4 (1): 4.

Dickstein, K., Members, A. T. F., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J. J., Ponikowski, P., . . . Atar, D. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008†: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *European journal of heart failure*. 2008; 10 (10): 933-989.

Doxiadis, I., De Lange, P., De Vries, E., Persijn, G., & Claas, F. Protective and susceptible HLA polymorphisms in IGA nephropathy patients with end-stage renal failure. *Tissue Antigens*. 2001; 57 (4): 344-347.

Duquesnoy, R. J., & Marrari, M. Detection of antibodies against HLA-C epitopes in patients with rejected kidney transplants. *Transplant immunology*. 2011; 24 (3): 164-171.

El-Gezawy, E., Baset, H., Nasif, K., Osama, A., AbdelAzeem, H., Ali, M., & Khalil, R. Human leukocyte antigens as a risk factor for the primary diseases leading to end stage renal disease in Egyptian patients. *The Egyptian journal of immunology*. 2011; 18 (2): 13-21.

Esteban, O., & Zhao, H. Directed evolution of soluble single-chain human class II MHC molecules. *Journal of molecular biology*. 2004; 340 (1): 81-95.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 2010; 10 (3): 564-567.

Finkelstein, F. O., & Hayslett, J. P. Structural and functional adaptation after reduction of nephron population. *The Yale journal of biology and medicine*. 1979; 52 (3): 271.

Foley, R. N., & Collins, A. J. End-stage renal disease in the United States: An update from the United States Renal Data System. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007; 18 (10): 2644-2648.

Freedman, B. I., Espeland, M. A., Heise, E. R., Adams, P. L., Buckalew Jr, V. M., & Canzanella, V. J. Racial differences in HLA antigen frequency and hypertensive renal failure. *American journal of hypertension*. 1991; 4 (5_Pt_1): 393-398.

Fuller, T. C., & Fuller, A. The humoral immune response against an HLA class I allodeterminant correlates with the HLA-DR phenotype of the responder. *Transplantation*. 1999; 68 (2): 173-182.

Gebel, H. M., Bray, R. A., & Nickerson, P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, hla-specific antibodies in renal transplantation: Contraindication vs. Risk. *American Journal of Transplantation*. 2003; 3 (12): 1488-1500.

Gröne, H.-J., Weber, K., Gröne, E., Helmchen, U., & Osborn, M. Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. *The American journal of pathology*. 1987; 129 (1): 1.

Güleç, D., Soyöz, M., Koçyiğit, A. Ö., Pirim, İ., & Ayna, T. K. (2019). *Comparison of single antigen bead-based, cell-based, and solid phase-based crossmatch methods*. Paper presented at the Transplantation Proceedings; 51: 1016-1020.

Güngör, T. H. Kadavra vericili böbrek nakli için çağrılan hastalara yapılan farklı cross-match testlerinin karşılaştırılması. İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2017, İZMİR (Danışman: Yrd. Doç. Dr. M. SOYÖZ)

Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J. Major Histocompatibility Complex. In Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J, *Immunology* (5th ed). W.H. Freeman and Company, New York, 2003: p161-184

Heise, E., Manning, C., & Thacker, L. Hla phenotypes of esrd patients are risk factors in the panel-reactive antibody (pra) response. *Clinical transplantation*. 2001; 15: 22-27.

Hill, N. R., Fatoba, S. T., Oke, J. L., Hirst, J. A., O'Callaghan, C. A., Lasserson, D. S., & Hobbs, F. R. Global prevalence of chronic kidney disease—a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016; 11 (7): e0158765.

Houghton, A. N. Cancer antigens: Immune recognition of self and altered self. *Journal of Experimental Medicine*. 1994; 180 (1): 1-4.

Hsia, S., Tong, J. Y., Parris, G. L., Nghiem, D., Cottington, E. M., Rudert, W. A., & Trucco, M. Molecular compatibility and renal graft survival--the hla drb1 genotyping. *Transplantation*. 1993; 55 (2): 395-399.

Janeway, C. *Immunobiology five*: Garland Pub.; 2001, p: 553-554.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. *Immunobiology*. Garland science. New York. 2004.

Jiyun, Y., Guisen, L., Li, Z., Yi, S., Jicheng, L., Fang, L., . . . Ying, L. The genetic variants at the hla-drb1 gene are associated with primary iga nephropathy in han chinese. *BMC medical genetics*. 2012; 13 (1): 33.

Johnson, S. C., Rabinovitch, P. S., & Kaeberlein, M. Mtor is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*. 2013; 493 (7432): 338.

Jordan, S. C., Tyam, D., Stablein, D., McIntosh, M., Rose, S., Vo, A., . . . Adey, D. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: Report of the nih ig02 trial. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004; 15 (12): 3256-3262.

Jordan, S. C., & Vo, A. A. Donor-specific antibodies in allograft recipients: Etiology, impact and therapeutic approaches. *Current opinion in organ transplantation*. 2014; 19 (6): 591-597.

K. Abbas, M. v. A. H. L., MD, PhD Temel İmmünoloji İmmün sistemin İşlev ve bozuklukları: İstanbul Medikal Yayıncılık. İstanbul Tıp Kitapevi; 2007, p: 41-61.

Karakuş B. Kronik Böbrek Yetmezliği Hastalarının Etiyolojilerine Göre HLA Doku Tipinin Belirlenmesi ve Antikor Düzeylerinin Araştırılması. Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Tezi, 2017, Antalya (Danışman: Prof. Dr. F. UÇAR)

Karahan, G. E., Kekik, C., Oguz, F. S., Onal, A. E., Bakkaloğlu, H., Çalışkan, Y. K., . . . Sever, M. S. Association of hla phenotypes of end-stage renal disease patients preparing for first transplantation with anti-hla antibody status. *Renal failure*. 2010; 32 (3): 380-383.

Karahan, G. E., Seyhun, Y., Oguz, F. S., Kekik, C., Onal, A. E., Yazici, H., . . . Eldegez, U. Impact of hla on the underlying primary diseases in turkish patients with end-stage renal disease. *Renal failure*. 2009; 31 (1): 44-49.

Kazansky, D. B. Mhc restriction and allogeneic immune responses. *Journal of immunotoxicology*. 2008; 5 (4): 369-384.

Klein, J., & Sato, A. The hla system. *New England Journal of Medicine*. 2000; 343 (10): 702-709.

Koçyiğit, A. Ö., Güngör, T. H., Ayna, T. K., Pirim, İ., & Soyöz, M. A comparative study: Flow cytometry, complement-dependent cytotoxicity, and luminex methods. *Transplantation Proceedings*. 2019; 51: 1027-1028.

Koktathong, K., Vejbaesya, S., Bejrachandra, S., & Pattanapanyasat, K. Flow cytometric crossmatch for kidney transplantation. *J Med Assoc Thai*. 2005; 88 (6): 769-774.

Kopple, J. D. National kidney foundation k/doqi clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. *American journal of kidney diseases*. 2001; 37 (1): S66-S70.

Kreisler, J. M., Rementeria, M. C., & Moreno, M. Hla-dr2, a marker for class i antigen sensitization. *Transplantation*. 1988; 45 (6): 1071-1074.

Kumbala, D., & Zhang, R. Essential concept of transplant immunology for clinical practice. *World journal of transplantation*. 2013; 3 (4): 113.

Lamb, K., Lodhi, S., & Meier-Kriesche, H. U. Long-term renal allograft survival in the united states: A critical reappraisal. *American journal of transplantation*. 2011; 11 (3): 450-462.

Levey, A., Atkins, R., Coresh, J., Cohen, E., Collins, A., Eckardt, K.-U., . . . Levin, A. Chronic kidney disease as a global public health problem: Approaches and initiatives—a position statement from kidney disease improving global outcomes. *Kidney international*. 2007; 72 (3): 247-259.

Marsh, S. G., Albert, E., Bodmer, W., Bontrop, R., Dupont, B., Erlich, H., . . . Hurley, C. Nomenclature for factors of the hla system, 2010. *Tissue antigens*. 2010; 75 (4): 291-455.
McPhee, S. J., Papadakis, M. A., & Rabow, M. W. *Current medical diagnosis & treatment* 2010: McGraw-Hill Medical New York; 2010, p:

Neefjes, J., Jongstra, M. L., Paul, P., & Bakke, O. Towards a systems understanding of mhc class i and mhc class ii antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11 (12): 823.

Patel, R., & Terasaki, P. I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1969; 280 (14): 735-739.

Petersdorf, E. W. Optimal hla matching in hematopoietic cell transplantation. *Current opinion in immunology*. 2008; 20 (5): 588-593.

Picascia, A., Infante, T., & Napoli, C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clinical and experimental nephrology*. 2012; 16 (3): 373-381.

Piertney, S., & Oliver, M. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*. 2006; 96 (1): 7.

Ramanathan, A. S. K., Senguttuvan, P., Chinniah, R., Vijayan, M., Thirunavukkarasu, M., Raju, K., . . . Krishnan, J. I. Association of hla-dr/dq alleles and haplotypes with nephrotic syndrome. *Nephrology*. 2016; 21 (9): 745-752.

Roberts, S. C. Complexity and context of mhc-correlated mating preferences in wild populations. *Molecular Ecology*. 2009; 18 (15): 3121-3123.

Robinson, J., Halliwell, J. A., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., & Marsh, S. G. The imgt/hla database. *Nucleic acids research*. 2012; 41 (D1): D1222-D1227.

Ruiz-Morales, J., Vargas-Alarcon, G., Flores-Villanueva, P., Villarreal-Garza, C., Hernandez-Pacheco, G., Yamamoto-Furusho, J., . . . Cardiel, M. Hla-drb1 alleles encoding the “shared epitope” are associated with susceptibility to developing rheumatoid arthritis whereas hla-drb1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the β -chain are protective in mexican mestizos. *Human immunology*. 2004; 65 (3): 262-269.

Scornik, J. C., Brunson, M. E., Schaub, B., Howard, R. J., & Pfaff, W. W. The crossmatch in renal transplantation. Evaluation of flow cytometry as a replacement for standard cytotoxicity. *Transplantation*. 1994; 57 (4): 621-625.

Seyahi, N., Altıparmak, M. R., & Süleymanlar, G. Türkiye’de renal replasman tedavilerinin güncel durumu: Türk nefroloji derneği kayıt sistemi 2013 yılı özet raporu current status of renal replacement therapy in turkey: A summary of turkish society of nephrology 2013 annual registry report. Süleymanlar, Gültekin–Ateş, Kenan–Seyahi, Nurhan (2015), Türkiye’de Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon-Registry. 2014.

Seyahi, N., Ates, K., & Suleymanlar, G. Current status of renal replacement therapies in turkey: Turkish society of nephrology registry 2015 summary report. *Turkish Nephrology Dialysis and Transplantation Journal*. 2017; 26 (2): 154-160.

Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., & Kulski, J. K. The hla genomic loci map: Expression, interaction, diversity and disease. *Journal of human genetics*. 2009; 54 (1): 15.

Simmonds, M., & Gough, S. The hla region and autoimmune disease: Associations and mechanisms of action. *Current genomics*. 2007; 8 (7): 453-465.

Snell, G. D. *Studies in histocompatibility*. Science. 1981; 213 (4504): 172-178.

Süleymanlar, G., & Serdengeçti, K. Türkiye’de renal replasman tedavilerinin güncel durumu: Türk nefroloji derneği kayıt sistemi 2009 yılı rapor özeti current status of renal replacement therapy in turkey: A summary of turkish society of nephrology 2009 annual registry report. 2011.

Süleymanlar, G., Utaş, C., Arinsoy, T., Ateş, K., Altun, B., Altıparmak, M. R., . . . Başçı, A. A population-based survey of chronic renal disease in turkey—the credit study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010; 26 (6): 1862-1871.

Süsal C, Opelz G, Morath C. Role and Value of Luminex-Detected HLA Antibodies before and after Kidney Transplantation. *Transfus Med Hemother*. 2013 Jun;40(3):190-5.

Tait, B. D., Hudson, F., Cantwell, L., Brewin, G., Holdsworth, R., Bennett, G., & Jose, M. Luminex technology for hla antibody detection in organ transplantation. *Nephrology*. 2009; 14 (2): 247-254.

Tinckam, K. J., & Chandraker, A. Mechanisms and role of hla and non-hla alloantibodies. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2006; 1 (3): 404-414.

Trowsdale, J. "Both man & bird & beast": Comparative organization of mhc genes. *Immunogenetics*. 1995; 41 (1): 1-17.

Uçar, F., Karkucak, M., Alemdaroğlu, E., Çapkin, E., Yücel, B., Sönmez, M., Karaca, A. HLA-DRB1 allele distribution and its relation to rheumatoid arthritis in eastern black sea turkish population. *Rheumatology international*. 2012; 32 (4): 1003-1007.

Uçar F, Capkin E, Karkucak M, Yücel B, Sönmez M, Alver A, Kaklıkkaya N, Tosun M, Alemdaroğlu E, Solak M. Associations of HLA-DRB1 alleles with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in northern east part of Turkey. *International Journal of Rheum Dis*. 2012; 15: 538–545.

Sonmez M, Erkut N, Ucar F, Buruk K, Cobanoglu U, Bahce M, Ural AU. Familial Hodgkin's lymphoma from the perspective of HLA. *Intern Med*. 2010; 49(6): 607-10.

Uçar F, Sönmez M, Erkut N, Balcı M, Yücel B, Yılmaz M, Erduran E, Ovalı E. The Relation of HLA-A, B, DRB1 Alleles and Haplotypes in Patients with Acute Leukemia: A case control study. *Arch Med Res*. 2011; 42(4): 305-310.

Uçar F, Sönmez M, Ermantaş N, Özbaş HM, Cansız A, Balci M, Yılmaz M. The associations of HLA-A, -B, DRB1 alleles and haplotypes in Turkish lymphoma patients. *Gene*. 2016; 586: 263–267.

Ugolini, S., & Vivier, E. Regulation of t cell function by nk cell receptors for classical mhc class i molecules. *Current opinion in immunology*. 2000; 12 (3): 295-300.

Uygun D. F. K., Yegin O, Ozbay M., Sallakcı N., Kılınç Y., Filiz S., Human Leukocyte Antigen Frequencies in Highly Sensitized Patients *Turk J Immunol* 2015;3(1):11-14

Van Den Elsen, P. J. Expression regulation of major histocompatibility complex class i and class ii encoding genes. *Frontiers in immunology*. 2011; 2: 48.

van Dijk, P. C., Jager, K. J., de Charro, F., Collart, F., Cornet, R., Dekker, F. W., Simpson, K. Renal replacement therapy in europe: The results of a collaborative effort by the era–edta registry and six national or regional registries. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2001; 16 (6): 1120-1129.

Walker, W. G., Neaton, J. D., Cutler, J. A., Neuwirth, R., & Cohen, J. D. Renal function change in hypertensive members of the multiple risk factor intervention trial: Racial and treatment effects. *Jama*. 1992; 268 (21): 3085-3091.

Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothe, B., Sette, A., & Peters, B. A systematic assessment of mhc class ii peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput. Biol*. 2008; 4 (4): e1000048.

Watts, G., Taub, N., Gant, V., Wilson, I., & Shaw, K. The immunogenetics of early nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus: Association between the LA-A2 antigen and albuminuria. *QJM: An International Journal of Medicine*. 1992; 83 (3): 461-471.

Yasavul Ü, Erdem Y, Oymak O, Hayran M, Turgan Ç, Çağlar Ş. HLA haplotype and tissue type in live related and unrelated donors and renal transplant patients. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi*.1993; 4. 1W..i.v7-M.

Yang, R., Cui, Z., Zhao, J., & Zhao, M.-H. The role of hla-drb1 alleles on susceptibility of chinese patients with anti-gbm disease. *Clinical Immunology*. 2009; 133 (2): 245-250.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mine Münevver	Uyruğu	T.C.
Soyadı	ÖZBAY	Tel no	507 341 14 79
Doğum tarihi	21.02.1979	e-posta	ozbaymm@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Gaziantep Kız Lisesi	1998
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı	Devam Ediyor
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Akdeniz.Üniversitesi Hastanesi Doku Tipleme Lab.	2010 -2019

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayımlar ve Bildiriler: