



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TİBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BÖBREK NAKLİ OLAN HASTALARDA BK VİRÜS VE
İNSAN LÖKOSİT ANTİJENLERİ (HLA) ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Bio. Miray KAVUZLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2019



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÖBREK NAKLİ OLAN HASTALARDA BK VİRÜS VE
İNSAN LÖKOSİT ANTİJENLERİ (HLA) ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bio. Miray KAVUZLU

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK

ANKARA, 2019



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Miray Kavuzlu tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/02/2019

Tez Konusu: "Böbrek Nakli Olan Hastalarda BK Virüs ve İnsan Lökosit Antijenleri (HLA) Arasındaki İlişkinin Araştırılması"

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Bilkay Baştürk

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşe Kevser Pişkin Özden

Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma Belgin Ataç

Başkent Üniversitesi

B. Baştürk
K. Pişkin
F. Ataç

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 11/02/2019 tarih ve 9-11 Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

F. Ataç
Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ
Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 08/02/2019

Öğrencinin Adı, Soyadı : Miray KAVUZLU

Öğrencinin Numarası : 21520237

Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Programı : Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK

Tez Başlığı: Böbrek Nakli olan Hastalarda BK Virüs ve İnsan Lökosit Antijenleri (HLA) Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin, 08/02/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %14'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası: .....

Onay

08/02/2019



Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad,

Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK

TEŞEKKÜR

Doku Tipleme Laboratuvarında çalışmaya başladığım günden itibaren hem bilimsel hem de kişisel gelişimimde desteğini hep üzerimde hissettiğim, yüksek lisans eğitimim sırasında beni sürekli destekleyen ve yüreklendiren tez danışmanım İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen, bilgi ve birikimleri ile katkı sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ'a,

Başkent Üniversitesi Kurucusu Prof. Dr. Mehmet HABERAL başta olmak üzere Başkent Üniversitesi Organ Nakli Ekibine,

Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi yönetimine,

Destekleri için Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Sorumlusu Prof. Dr. H. Eda ALIŞKAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabrını ve desteğini benden esirgemeyen, her anında yanımda olan, bir iş arkadaşından fazlası olan sevgili dostum Doku Tipleme Laboratuvarı Sorumlu Biyoloğu Bircan KANTAROĞLU'na,

Her zaman birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Doku Tipleme Laboratuvarı çalışanlarına,

Hayat yolculuğum boyunca beni hep destekleyen, hep en iyisi için teşvik eden başta canım annem ve babam olmak üzere aileme

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) olan hastalarda tercih edilen tedavi yöntemi böbrek naklidir. Altıncı kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan insan lökosit antijeninin (Human Leukocyte Antigen: HLA) temel görevi antijeni T lenfositlerine sunmak ve spesifik immün cevabı başlatmaktır. HLA moleküllerinin doku ve organ nakillerindeki öneminin yanı sıra otoimmün, viral, alerjik ve nörolojik kökenli hastalıklarla da ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Böbrek naklinde immün sisteminin ana hedefi, verici hücrelerinin yüzeyinde yer alan HLA molekülleridir. Ayrıca HLA'nın viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık cevabının oluşmasında rol oynadığı bilinmektedir. BK virüs (BKV) enfeksiyonu böbrek nakli sonrası önemli problemlerden birisidir. Nakil sonrası verilen immünsüpresif tedaviler BKV gibi fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Çalışmanın amacı böbrek nakli olan hastalarda HLA ile BKV arasında ilişki olup olmadığının araştırılmasıdır.

Çalışma retrospektif olarak planlanmış olup, çalışma grubundaki hastalara nakil öncesinde HLA A, B, DR doku tiplleme testi çalışılmıştır. Hastalara ait EDTA'lı tam kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. Moleküler olarak PCR temelli olan SSO (Sequence Specific Oligonucleotides) ve / veya SSP (Sequence Specific Priming) yöntemi ile doku tiplleme testleri çalışılmıştır. Nakil sonrasında ise hastalara BKV testi çalışıldı. Hastalara ait idrar ve / veya plazma örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen örneklerden Real-time PCR yöntemiyle kantitatif olarak BKV testi çalışılmıştır.

Sonuçlar SPSS programı ile istatistiksel olarak analiz edildi. Yapılan analizlere göre HLA B*13 allelinin BKV'ye karşı koruyucu faktör, HLA DRB1*03 allelinin ise BKV'ye karşı risk faktörü olabileceği belirlendi. Analiz edilen diğer HLA alleleri ile BKV arasında ise anlamlı bir ilişki belirlenemedi.

Sınıf I HLA moleküllerinin sitotoksik T hücre yardımı ile virüslere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda HLA sınıf I molekülleri içerisinde

yer alan HLA B*13 allelinin BKV'ye karşı koruyucu faktör olarak belirlenmesi bunu desteklemektedir. HLA sınıf II ise immün sistemin sitokin salgılayarak yardımcı olan CD4⁺ T hücreleri ile ilişkilidir ve hem immün sistemi uyaran hem de baskılayabilen bir rol oynar. Bizim çalışmamızda HLA DRB1*03 allelinin ise BKV'ye karşı risk faktörü olabileceği belirlendi. Bu allelin immün sistemi baskılayıcı sitokin salgılayan bir sitokin salınımıyla ilişkili olduğu düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek nakli, İnsan lökosit antijenleri, HLA, BK virüs, BKV



ABSTRACT

The best treatment modality in patients with end-stage renal disease (ESRD) is renal transplantation. The main function of the human leukocyte antigen, located on the short arm of the sixth chromosome, is to present antigens to T lymphocytes and initiate the specific immune response. In addition to the importance of human leukocyte antigen (HLA) molecules in tissue and organ transplants, autoimmune, viral, allergic and neurological diseases have been found to be related. The main target of the recipient immune system in renal transplantation is the HLA molecules on the surface of donor cells. It is also known that HLA plays a role in the development of an immune response to viral infections. BK virus (BKV) infection is one of the major problems after kidney transplantation. Immunosuppressive therapies after transplantation cause opportunistic infections such as BKV.

The aim of the study was to investigate whether there is a relationship between HLA and BKV in patients with renal transplantation.

The study was planned retrospectively and HLA A, B, and DR tissue typing were studied before transplantation in the study group. DNA was isolated from whole blood samples of EDTA patients. Tissue typing tests were performed by Sequence-Specific Oligonucleotides (SSO) and / or Sequence-Specific Priming (SSP) method based on PCR. After transplantation, patients were tested for BKV. DNA was isolated from urine and / or plasma samples of patients. Isolated samples were quantitatively evaluated for BKV by the Real-time PCR method.

Results were analyzed statistically with SPSS program. According to the analysis, it was determined that HLA B*13 allele was protective against BKV and HLA DRB1*03 allele could be risk factor against BKV. No significant relationship was found between the other HLA alleles analyzed and BKV.

HLA class I molecules are known to be effective against viruses with the help of cytotoxic T cells. In our study, HLA B*13 alleles within the HLA class I molecules were identified as protective factors against BKV. HLA class II is

associated with CD4⁺ T cells that help secrete the cytokines of the immune system and plays a role in stimulating and suppressing the immune system. Here, we demonstrated that HLA DRB1*03 allele could be a risk factor against BKV. This allele may be considered to be associated with a cytokine-secreting cytokine secretion of the immune system.

Keywords: Kidney transplantation, Human leukocyte antigens, HLA, BK virus, BKV



İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
ORJİNALLİK RAPORU	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
GRAFİKLER DİZİNİ	xviii
RESİMLER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kronik Böbrek Hastalığı	3
2.1.1. Kronik böbrek hastalığı belirteçleri	4
2.1.2. Epidemiyoloji.....	6
2.1.3. Risk faktörleri.....	6
2.1.4. Ölüm oranı	9
2.1.5. Korunma	10
2.1.6. Yönetim	11
2.1.7. Böbrek replasman tedavisi	12
2.1.8. Böbrek replasman tedavisi hazırlığı.....	13
2.1.9. Hemodiyaliz ve periton diyalizi.....	13
2.2. Böbrek Nakli.....	14
2.2.1. Böbrek hakkında genel bilgiler	15
2.2.2. Nefron kaybı	16
2.2.3. Böbrek naklinin tarihçesi	17
2.2.4. Türkiye'de böbrek nakli	17
2.2.5. Böbrek naklinde alıcı ve verici seçimi	20

2.3.	İnsan Lökosit Antijenleri.....	20
2.3.1.	HLA A, B ve C antijenlerinin yapısı.....	23
2.3.2.	HLA DP, DQ ve DR antijenlerinin yapısı	25
2.3.3.	Nakilde HLA'nın önemi.....	26
2.3.4.	HLA tiplemesinde kullanılan yöntemler	26
2.4.	Anti-HLA Antikorları.....	28
2.4.1.	Anti-HLA antikorları saptama yöntemleri.....	29
2.4.2.	Anti-HLA antikorları testleri.....	30
2.5.	Lenfosit Çapraz Karşılaştırma Testleri	31
2.5.1.	Hücre temelli çapraz karşılaştırma testleri	31
2.5.2.	Sanal çapraz karşılaştırma testi.....	33
2.6.	BK Virüs	33
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1.	HLA -A, -B, -DR Doku Tipleme Testi.....	36
3.1.1.	DNA izolasyonu	36
3.1.2.	SSP yöntemi ile HLA -A, -B, -DR doku tipleme testi.....	38
3.1.3.	SSO yöntemi ile HLA -A, -B, -DR doku tipleme testi	42
3.2.	Real Time PCR Yöntemiyle Kantitatif BK Virüs Testi.....	49
3.2.1.	DNA izolasyonu	49
3.2.2.	BK virüs testi	51
4.	BULGULAR	54
5.	TARTIŞMA	61
6.	KAYNAKLAR.....	64

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devleti
AHG	Anti Human Globulin
APC	Antigen Presenting Cells
BKM	Bölgesel Koordinasyon Merkezi
BKV	Bk Virüs
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
CREDIT	Chronic Renal Disease in Turkey
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
DSA	Donör Spesifik Antikor
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DYOB	Diyaliz Bilgi Sistemi
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GFH	Glomerüler Filtrasyon Hızı
HD	Hemodiyaliz
HLA	Human Leukocyte Antigens
HSP	Heat Shock Protein
IgG	İmmüoglobülin G
JCV	JC Virüs
KBH	Kronik Böbrek Hastalığı
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KİBS	Kemik İliği Bilgi Sistemi

LCM	Lymphocyte Cross Match
LT	Lenfotoksin
MFI	Median Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Naturel Killer
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Periton Diyalizi
PML	Progresif Multifokal Lökoensefalopati
PRA	Panel Reaktif Antikor
SA	Single Antigen
SA-PE	Streptavidin-Pikoeritrin
SDBY	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
SSO	Sequence Specific Oligonucleotides
SSP	Sequence Specific Priming
TBE	Tris Buffer Edta
TCR	Transcriptional Control Region
TDİS	Transplantasyon, Diyaliz ve İzlem Sistemleri
TND	Türk Nefroloji Derneği
TNF	Tumor Necrosis Factor
TODBS	Türkiye Organ ve Doku Bağış Sistemi
TODS	Türkiye Organ ve Doku Nakli Sistemi
UKM	Ulusal Koordinasyon Merkezi
USRDS	United States Renal Data Systems
UV	Ultraviyole
YOBİS	Yoğun Bakım Bilgi Sistemi

SİMGELER DİZİNİ

\$	Dolar
μL	Mikrolitre
cm	Santimetre
Da	Dalton
dk	Dakika
gr	Gram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
m^2	Milimetrekare
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.: 2012 yılı KDIGO'ya göre kronik böbrek hastalığında GFH sınıflandırması.....	3
Tablo 2.2.: 2012 yılı KDIGO'ya göre kronik böbrek hastalığında albüminüri sınıflandırması.....	4
Tablo 2.3.: 2012 yılı KDIGO'ya göre kronik böbrek hastalığının evreleri.....	5
Tablo 2.4.: Kronik böbrek hastalığı başlangıcı için risk faktörleri.....	8
Tablo 2.5.: 2016 sonu itibariyle kronik hemodiyaliz/peritondiyalizi programında veya fonksiyonel greftle izlenmekte olan tüm hastaların böbrek replasman tedavisi tipine göre dağılımı	13
Tablo 2.6.: HLA allel frekansları.....	21
Tablo 3.1.: SSP HLA ABDR kit içeriği	38
Tablo 3.2.: SSP master mix hazırlama tablosu	39
Tablo 3.3.: SSP PCR döngüsü	40
Tablo 3.4.: SSO HLA A kit içeriği	43
Tablo 3.5.: SSO HLA B kit içeriği	43
Tablo 3.6.: SSO HLA DRB1 kit içeriği	43
Tablo 3.7.: SSO master mix hazırlama tablosu	44
Tablo 3.8.: SSO amplifikasyon PCR döngüsü	45
Tablo 3.9.:SSO hibridizasyon PCR döngüsü.....	47
Tablo 3.10.: BK Virüs RG PCR Kit İçeriği	51
Tablo 3.11.: BK Virüs master mix tablosu	52
Tablo 4.1.: Hastaların plazma örnekleri ile çalışılan BKV testi sonuçları	54
Tablo 4.2.: Hastaların idrar örnekleri ile çalışılan BKV testi sonuçları.....	54
Tablo 4.3.: Hastaların plazma ve idrar örnekleri ile çalışılan BKV testi sonuçları	54
Tablo 4.4.: Hastalara ait HLA A ve BKV sonuçları	55
Tablo 4.5.: Hastalara ait HLA B ve BKV sonuçları.....	57
Tablo 4.6.: Hastalara ait HLA DRB1 ve BKV sonuçları.....	59
Tablo 4.7.: BKV'de cinsiyete göre ilişki	59
Tablo 4.8.: BKV'de verici tipine göre ilişki	60

Tablo 4.9.: BkV'de yaş grubuna göre ilişki.....	60
Tablo 4.10.: BkV'de HLA uyumuna göre ilişki.....	60



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.3.: HLA'nın yapısı.....	23
Şekil 2.4.: Sınıf I HLA yapısı.....	24
Şekil 2.5.: Sınıf II HLA yapısı	26



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 2.1.: Yıllara göre yapılan canlı ve kadaverik nakillerin dağılımı.....	20
Grafik 4.1.: Hastalara ait HLA A yüzdeleri	55
Grafik 4.2.: Hastalara ait HLA B yüzdeleri	56
Grafik 4.3.: Hastalara ait HLA DRB1 yüzdeleri.....	58



RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1.: DNA izolasyonu aşaması.....	37
Resim 3.2.: SSP ekim aşaması.....	39
Resim 3.3.: PCR cihazına yerleştirme	40
Resim 3.4.: Jele yükleme aşaması	41
Resim 3.5.: HLA ABDR SSP jel görüntüsü	42
Resim 3.6.: Master mix hazırlama aşaması	44
Resim 3.7.: Ekim aşaması.....	45
Resim 3.8.: Hibridizasyon aşaması.....	47
Resim 3.9.: Streptavidin aşaması.....	48
Resim 3.10.: Luminex cihazında okutma aşaması	49
Resim 3.11.: DNA izolasyon cihazı	50
Resim 3.12.: BK virüs master mix aşaması.....	52
Resim 3.13.: Real time PCR aşaması.....	53
Resim 3.14.: Software programında analiz aşaması.....	53

1. GİRİŞ

Böbrek nakli, son dönem böbrek hastalığı olan hastalarda, diyalize kıyasla hayatta kalma oranını ve yaşam kalitesini arttırdığı için hala en iyi tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir (1). Çok sayıda çalışma HLA uyumunu, böbrek naklinde hasta sonuçlarını iyileştirmek için bir anahtar olarak belirlemiştir. HLA antijenleri, ABO kan grubu ile uyumlu organ naklinde konakçı immün sistem tarafından tanınan birincil alloantijenlerdir (2). HLA uyumu tam olan kardeşlerden yapılan böbrek nakillerinin greft sağ kalımının HLA uyumu daha az olan akrabalara ya da HLA uyumu eşleşmiş kadaverik vericilere kıyasla daha uzun sürdüğü kabul edilmiştir (3). Modern immünsüpresif rejimlerle böbrek nakli sonrası greft sağ kalımı iyileşmiştir. Bununla birlikte yoğunlaştırılmış immünsüpresif tedaviler, BKV gibi fırsatçı enfeksiyonlarda artışa neden olmaktadır (4).

HLA, 6. kromozomun kısa kolunda yer alan, 3,6 milyon bp'lik bir genomik bölge içerir (3). HLA, viral enfeksiyonlara karşı oluşan immün yanıtta önemlidir. Viral peptidler, CD8⁺ T hücreleriyle ilişkili olan HLA sınıf-I molekülleriyle sunulur. Bu sunum virüs spesifik hafıza T hücrelerinin oluşmasında etkilidir. HLA sınıf-II molekülleri CD4⁺ T hücreleriyle ilişkide olup efektör T hücre oluşumunda etkilidir. Efektör T hücreleri hem CD8⁺ T hücrelerinin daha etkin hale gelmesini sağlar hem de B hücrelerini virüs spesifik antikor üretimi için uyarır. CD8⁺ T hücreleri birçok virüs enfeksiyonuna karşı oluşan immün yanıtta etkili olmasına rağmen CD4⁺ T hücrelerinin de insan BK virüs enfeksiyonunda etkileri gösterilmiştir (5).

BKV enfeksiyonu böbrek nakli sonrası önemli problemlerden biridir. Polyomavirüs ailesinden olan BKV'ler, dairesel çift iplikli DNA genomuna sahip, zarfsız, küçük (~45 nm) virüslerdir. Bu genom % 88 protein ve % 12 DNA içeren yaklaşık 5000 baz çiftinden oluşur (6).

BKV enfeksiyonu genelde popülasyonda yaygın olarak bulunur. BKV ile birincil enfeksiyon BKV seroprevalansındaki artışın % 90 ve daha fazlası ile yaşamın ilk 10 yılında ortaya çıkar (7). Birincil enfeksiyondan sonra, BKV bir latent faza girer. BKV'nin latent faza girdiği en yaygın bölge böbrek tübüler epitelyal

hücrelerdir. Primer enfeksiyon genellikle asemptomatiktir. Asemptomatik virüsü, hem sağlıklı hem de immün sistemi baskılanmış hastalarda görülmektedir (6). BKV immün sistemi baskılanmış konakçıda yeniden aktifleşebilir (8).

Bu bilgilerin ışığı altında yapmayı planladığımız çalışma retrospektif yöntemle böbrek nakli olan hastalarda HLA doku grupları ile nakil sonrası klinik olarak şüphelenilip bakılan BKV reaktivasyonu arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik Böbrek Hastalığı (KBH) böbrek yapısında ve / veya işlevinde kalıcı değişikliklerle seyreden, sağlığı bozan bir hastalıktır (9).

Böbrek Hastalığı: Küresel Sonuçların İyileştirilmesi(Kidney Disease Improving Global Outcomes: KDIGO) tarafından hazırlanan ve 2012 yılında yayınlanan “Kronik Böbrek Hastalığında Kan Basıncı Yönetimi için KDIGO Klinik Uygulama Kılavuzu” na göre KBH:

- Glomerüler filtrasyon hızında (GFH) azalma olsun veya olmasın, böbrekte üç ay veya daha uzun süre devam eden yapısal veya fonksiyonel anormallikler olması,
- Böbrek hasarı olsun ya da olmasın üç ay veya daha uzun süreyle $GFH < 60 \text{ ml/dk/1.73 m}^2$ olarak tanımlanmıştır.

KDIGO'ya göre KBH'yi sınıflandırmak için GFH ve albüminüri kullanılır. GFH böbrek boşaltım fonksiyonunun iyi bir belirleyicisidir ve albüminüri böbrek bariyer disfonksiyonunun bir göstergesidir (glomerüler yaralanma) (Tablo: 2.1.- 2.2.) (10).

Tablo 2.1.: 2012 yılı KDIGO'ya göre kronik böbrek hastalığında GFH sınıflandırması

GFH EVRELERİ	GFH (ml/dk/1.73 m ²)	TANIMLAR
G1	≥90	Normal veya yüksek
G2	60-89	Hafif azalmış
G3a	45-59	Hafif orta derecede azalmış
G3b	30-44	Orta şiddetli derecede azalmış
G4	15-29	Şiddetli azalmış
G5	<15	Böbrek Yetmezliği

Tablo 2.2.: 2012 yılı KDIGO'ya göre kronik böbrek hastalığında albüminüri sınıflandırması

ALBÜMİNÜRİ EVRELERİ	AER (mg/gün)	TANIMLAR
A1	<30	Normal / yüksek normal
A2	30-300	Yüksek
A3	>300	Çok yüksek

2.1.1. Kronik böbrek hastalığı belirteçleri

KBH'yi belirlemek için kullanılan biyolojik belirteçler arasında kreatin ve sistatin C gibi filtrasyon belirteçleri; idrar tortu anormallikleri ve albüminüri gibi böbrek hasarı belirteçleri bulunur.

Kreatin

GFH'nin bir göstergesi olarak kreatin kullanımı 1920'lere kadar uzanmaktadır. Kas yapısında bulunan kreatin, enzimatik olmayan bozulma ürünü olan bir 113-Da aminoasit türevidir. Protein bağlı değildir, böbrekte metabolize edilmez ve glomerül içinde serbestçe süzülür, bu da glomerüler filtrasyonun mükemmel bir göstergesidir.

Kreatin değeri GFH'nin hesaplanmasında ve böylece kronik böbrek hastalığının evresinin belirlenmesinde kullanılır (Tablo: 2.3.)(10).

Tablo 2.3.: 2012 yılı KDIGO'ya göre kronik böbrek hastalığının evreleri

EVRE	TANIMI	GFH (ml/dk/1.73 m²)
1	Normal veya artmış GFH ile birlikte böbrek hasarı	≥90
2	Hafif GFH azalması ile birlikte böbrek hasarı	60-89
3	Orta derecede böbrek yetmezliği	30-59
4	Şiddetli böbrek yetmezliği	15-29
5	Son dönem böbrek yetmezliği	<15

Sistatin C

Sistatin C, GFH'nin markırı olan bir 13-kDa sistein proteaz inhibitörüdür. Sistatin C tüm çekirdekli hücreler tarafından eksprese edilir ayrıca hücre dışı proteolizin kontrol edilmesi ve bağışıklık sisteminin modülasyonu dahil olmak üzere çoklu biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Böbrek fonksiyonunun belirlenmesinde glomerüllerdeki süzülme önemlidir. Süzülme sonrası degrade olacağı tübüllerden emilir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, GFH'nin belirlenmesinde kreatin ve sistatin C düzeylerinin birlikte değerlendirilmesinin kreatin bazlı denklemlerden daha üstün olduğu ve KBH için doğrulayıcı bir test olarak yararlı olabileceğini ileri sürmüştür.

Albüminüri

Proteinüri uzun zamandan beri böbrek hasarının bir sonucu olarak kabul edilmiştir. Üriner protein ve idrar albüminin ölçümü KBH için tarama ve takipte kullanılmaktadır. Glomerül, gözenek büyüklüğü ve yük seçiciliğinden dolayı filtrelemeye karşı bir bariyer görevi görürken, çoğu filtrelenmiş albümin, proksimal tübül içinde yeniden emilir. Bu nedenle, albüminürinin saptanması genellikle filtrasyon bariyerindeki hasarı gösterirken, aynı zamanda proksimal tübüler disfonksiyonunun bir sonucu olabileceği de bilinmelidir. Çoklu çalışmalar

albüminürinin genel popülasyonda mortalite için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Albüminüri ayrıca diyabetik ve diyabetik olmayan KBH'nin ilerlemesi için bağımsız bir risk faktörüdür.

Klinik çalışmalarda kabul edilebilir son nokta olmamasına rağmen, albüminüride azalma KBH'de yaygın olarak kabul edilen bir tedavi hedefidir (11).

2.1.2. Epidemiyoloji

KBH'nin tüm evrelerinin yaygınlığı dünyanın farklı bölgelerinde % 7-12 arasında değişmektedir (12). Yetişkinlerde G3 ve G5 evreleri arasında KBH yaygınlığı dünya genelinde değişmekte olup, değerler Çin'de % 1,7 (13), Kanada'da % 3,1 (14), Avustralya'da % 5,8 (15) ve Amerika Birleşik Devleti(ABD)'nde % 6,7 (16) olarak bildirilmiştir. KBH'nin Avrupa'da yaygınlığı ise Almanya'da % 2,3 (17), Finlandiya'da % 2,4 (18), İspanya'da % 4,0 (18) ve İngiltere'de % 5,2'dir (19). Bu çalışmaların yıllara göre dağılımı farklılık göstermektedir. Ülkemizde ise Türk Nefroloji Derneği (TND) tarafından yapılan; Türkiye'de Kronik Böbrek Hastalığı (Chronic Renal Disease in Turkey; CREDIT) çalışmasına göre genel yetişkin nüfusta tüm evrelerde KBH oranı % 15,7 olarak saptanmıştır (20). Düşük ve orta gelirli ülkelerde KBH epidemiyolojisi, toplum temelli çalışmaların eksikliği, böbrek fonksiyonunun tutarsız değerlendirilmesi ve standartlaştırılmamış veya kalibre edilmemiş yaklaşımlar nedeniyle kötü karakterize edilir. Bununla birlikte, Güneydoğu Asya'da, bazı Latin Amerika ülkelerinde (Meksika gibi) ve Afrika'da değerlendirildiğinde, KBH yaygınlığı % 10-16 olarak tahmin edilmektedir (21). Özellikle, yaygınlık verilerinin çoğu, 2002 yılında bildirilen ilk KBH sınıflandırma sistemi ile uyumlu olarak, albüminüri göz önüne alınmadan sadece GFH'ye dayanmaktadır (9).

2.1.3. Risk faktörleri

KBH'ye bakıldığında 65 yaşın üstündeki insanlarda görülmesi çok yaygındır, ancak KBH olan genç insanlarda (≤ 65 yaş) SDBY'ye ilerleme olasılığı daha yüksektir. İlginçtir ki, KBH yaygınlığı kadınlarda erkeklerden daha yüksek olmasına rağmen, erkeklerin SDBY'ye ilerlemesi daha olasıdır.

KBH ile ilişkili en yaygın altta yatan hastalıklar, özellikle yüksek gelirli ve orta gelirli ülkelerde diyabet ve hipertansiyondur (12). Diğer altta yatan risk faktörleri ise tablo: 2.4.'de tanımlanmıştır (9).



Tablo 2.4.: Kronik böbrek hastalığı başlangıcı için risk faktörleri

Kronik Böbrek Hastalığı Başlangıcı için Risk Faktörleri	
Monogenik Böbrek Hastalığı	Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı Steroid dirençli nefrotik sendroma neden olan podositopatiler Fabry hastalığı Alport sendromu Atipik hemolitik-üremik sendrom Kanser tedavisi için kemoterapi Proton pompa inhibitörleri
Nefrotoksinlere Uzun Süreli Maruz Kalma *	Steroid olmayan anti inflamatuvar ilaçlar (NSAID) Antimikrobiyal ajanlar Kontamine otlar ve bitkisel gıdalar Tarım kimyasalları Ağır metaller Işın tedavisi
Enfeksiyonlar ve Kronik İnflamasyon *	HIV Hepatit virüsü Sıtma Bakteriyel enfeksiyonlar Otoimmün hastalıklar
Doğuştan Gelen Anormallikler	Böbrek ve idrar yolunun doğuştan gelen anomalileri Veziko-üreteral reflü
Doğumda Düşük Nefron Kaynağı	Düşük doğum ağırlığı nedeniyle Fetal düzensizlik nedeniyle
Diyabet*	Tip 1 veya Tip 2 Diabetes Mellitus
Obezite *	
Hipertansiyon *	Kötü kontrollü arteriyel hipertansiyon
Akut böbrek hasarı bölümleri *	
İklim	Aşırı ısıya maruz kalma ve dehidrasyon
Obstrüktif Üropati	
Malignite *	Multipl miyelom

*Arteriyel hipertansiyon, proteinüri, obstrüktif üropati, sigara kullanma, hiperhomosisteinemi ve hiperürisemi de dahil olmak üzere kronik böbrek hastalığı ilerlemesini etkileyen risk faktörlerini gösterir.

Kronik böbrek hastalığının patogenezinde katkıda bulunan diğer nedenler (9):

- Prematüre ve düşük doğum ağırlığı
- Kalıtsal faktörler
- Şişmanlık

- Gebelik
- Şeker hastalığı
- Akut böbrek hasarı
- Yaşlanma
- KBH'nin sistemik komplikasyonları
- Sıvı ve elektrolit anormallikleri
- Anemi
- Mineral kemik bozukluğu
- Hiperürisemi
- Arteriyel hipertansiyon
- Metabolik asidoz
- Dislipidemi
- Kardiyovasküler hastalık
- Endokrin disfonksiyonu

2.1.4. Ölüm oranı

Ölüm oranı (mortalite), azalan GFH ve artan albüminüri (22) ile artmakta olup böbrek replasman tedavisi gören hastalarda en yüksektir; diyalizde 5 yıllık sağ kalım oranı, hemodiyaliz (HD) ve periton diyalizi (PD) (23) arasında benzer sağ kalım ile % 40-50'dir (24). Böbrek nakli olan hastalarda, 5 yıllık sağ kalım kadaverik vericiden nakil yapıldıysa % 85, canlı vericiden nakil yapıldıysa % 93'tür. Diyalizde olanlar için yaşam beklentisi (modalite), aynı yaş ve aynı cinsiyette genel popülasyonun üçte biri kadardır; böbrek nakli olanlarda ise genel nüfusun % 45-85'i kadardır (24).

Ülkemizde tamamı devlet tarafından karşılanmakla birlikte, dünyada diyalizin böbrek nakline göre daha yüksek maliyetli oluşu dünya çapında kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır ve böbrek yetmezliği olan birçok hasta tedavi edilmeden ölmektedir. 2008 USRDS (United States Renal Data Systems) Yıllık Veri Raporuna göre

ABD'de Medicare ödemeleri kişi başına yılda hemodiyaliz için 77.506 \$, periton diyalizi için 57.639 \$ ve böbrek nakli için 26.668 \$ olmuştur (16).

Ülkemizde Cengiz Utaş tarafından 2008 yılında yapılan analize göre hemodiyalizin hasta başına yıllık maliyeti 15.917 \$, ilaçlar dahil 24.242 \$; periton diyalizinin hasta başına yıllık maliyeti ise 15.143 \$, ilaçlar dahil 18.418 \$'dir (25). Buna göre, ülkemizde diyaliz tedavilerinin yıllık yaklaşık maliyeti 1,5 milyar dolardır. Buna hastaneye yatışlar, paket dışı tetkikler ve diğer ilaç kullanımları dahil edilirse maliyetin çok daha yüksek olacağı aşıkardır. Böbrek nakli ilk 2 yıl diyalize eş değer bir maliyete sahip olmakla beraber, ikinci yıldan sonraki maliyeti yarıya düşmektedir. Tedavi maliyetlerini azaltmanın bir diğer yolu periton diyalizinin teşvik edilmesidir. Cengiz Utaş'ın yaptığı analiz, ülkemizde periton diyalizinin hasta başına yıllık maliyetinin hemodiyalizden 5.800 \$ daha düşük olduğunu göstermiştir (25, 26).

2.1.5. Korunma

KBH oluşmadan birincil önlemler belirlenir ve KBH oluşuktan sonra ilerlemesini yavaşlatmak ikincil önlemler (veya ilişkili komorbiditeleri veya komplikasyonları ortadan kaldırmak) olarak düşünülebilir. Birincil korunma, KBH'nin temel nedenlerini hedefler ve nefrotoksik ajanlara ve olaylara maruziyetin hafifletilmesini içerir (9).

Bulaşıcı hastalıkların yükünü azaltmak KBH oranlarını düşürebilir, ancak bulaşıcı olmayan hastalıklara yönelik müdahaleler ile KBH prevalansını azaltma arayışında birçok zorluk devam etmektedir. Örneğin, obezite ve ilişkili tip 2 diabetes mellitusun önlenmesi küresel bir problemdir, ancak obezitede şeker ve fruktoz alımının ve metabolizmanın merkezi rolünün keşfedilmesi, birincil korunmada yer almasını sağlamış olup iyi bir örnektir. Gerçekten de, daha iyi glisemik kontrol aynı zamanda KBH'yi ve ilerlemesini de önleyebilir (27).

Diğer diyet faktörleri, birincil korunma için hedeflenecek değiştirilebilir risk faktörleri olabilir. Örneğin, hipertansiyonu olan hastalarda aşırı sodyum alımı, kan basıncı kontrolünü etkileyebilir ve belki de glomerüler hiperfiltrasyonu arttırabilir.

Diyabette aşırı protein alımı, hiperfiltrasyona ve KBH'ye yatkınlığa neden olabilir.

Düşük diyetsel asit yüküne sahip vejeteryan diyetler, gözlemsel retrospektif çalışmalarda daha düşük KBH yükü ile ilişkilendirilmiştir ve önleyici stratejiler olarak yararlı olabilir (28).

Bununla birlikte, diyet kalitesi ve bileşimin KBH insidansı üzerindeki etkisine ilişkin gözlemsel çalışmalar tutarsızdır (29-32). Büyük prospektif kohort çalışmaları, “sağlıklı” diyet kalıplarının daha az böbrek ölümü ve daha düşük SDBY insidansı ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür, ancak nedeni kanıtlanmamıştır (33). Sınırlı kırmızı et tüketimi ile artan sebze ve meyve alımı, kontrol kohort çalışmalarında daha düşük KBH insidansı ile ilişkilendirilmiştir, ancak bu çalışmaların neden sonuç ilişkisi tam olarak kanıtlanamadığı için sonuçlar tartışmalıdır (34).

Dikkat edilmesi gereken nokta, KBH'nin gelişimi ve ilerlemesiyle ilişkili asit baz homeostazisinin etkisi üzerinde olmuştur (35). Bu çalışmalar öncelikle, KBH'nin önlenmesinden ziyade, yerleşik KBH'nin (SDBY'nin ikincil önlenmesi) ilerlemesi üzerindeki metabolik asidozun zararlı etkisini incelemiştir (36).

Düşük doğum ağırlığından kaynaklanan düşük nefron donanımı, fetal malnütrisyon ve / veya dismatüritenin önemi göz önüne alındığında, fetal malnütrisyon ve dismatüritenin azaltılması ana amaçtır (37).

2.1.6. Yönetim

KBH'yi yönetirken, ilerleyici nefron hasarını kontrol etmek, KBH ile ilişkili komplikasyonları kontrol eden tek nefron hiperfiltrasyonunu normale döndürmek ve

böbrek replasman tedavisi için hastayı hazırlamak da dahil olmak üzere birçok yönden göz önünde bulundurulmalıdır.

Bunların özünde, SDBY'ye ilerlemeyi azaltma ve böbrek sonuçlarını optimize etme çabası olan “erken, daha iyi” ilkesi yatmaktadır.

2.1.7. Böbrek replasman tedavisi

Genellikle KBH'ye sahip olan hastaların sayısı tam olarak bilinmez, ancak böbrek replasman tedavilerinin kullanımı hakkında elde edilen veriler KBH hastaların sayısını tahmin etmek için kullanılabilir (38).

Böbrek replasman tedavisinde ilk basamak diyalizdir, pre-emptive transplantasyon ileri dönemde planlanmaktadır (24). SDBY safhasına gelen hastalar, hemodiyaliz, periton diyalizi ve böbrek naklini içeren renal replasman tedavilerinden biriyle hayatlarını idame ettirebilmektedirler (39). Hemodiyaliz en yaygın yapılan diyaliz türüdür (24). Hemodiyaliz ve periton diyalizi, SDBY hastalarında etkili bir tedavi seçeneği olmakla birlikte, bu tedavi seçenekleri ile böbreklerin tüm işlevleri yerine getirilemediği için böbrek nakli, bu hasta grubunda tercih edilmesi gereken esas tedavi seçeneğini oluşturmaktadır (39).

Böbrek nakli diğer tedavi seçenekleri ile karşılaştırıldığında hem daha ucuz, hem de hasta mortalite ve morbiditesi açısından daha avantajlıdır (39). Böbrek naklinin beklenen sayılara ulaşamaması nedenleri arasında kültürel tercihler, dini inanışlar, sosyo-ekonomik faktörler ve sağlık altyapısı eksiklikleri (örneğin cerrahi eksiklikler, yeterli biyopsi yapılamaması veya doku tipleme laboratuvarlarına ait eksiklikler vb.) yer almaktadır (9).

T.C. Sağlık Bakanlığı ve Türk Nefroloji Derneği 2016 yılı ortak raporuna göre Türkiye'de 2016 yılındaki hemodiyaliz, periton diyalizi ve böbrek nakli olan hastaların sayıları tablo 2.5.'te verilmiştir (26).

Tablo 2.5.: 2016 sonu itibariyle kronik hemodiyaliz/peritondiyalizi programında veya fonksiyonel greftle izlenmekte olan tüm hastaların böbrek replasman tedavisi tipine göre dağılımı

	n	%
Hemodiyaliz	56.687	76.12
Periton diyalizi	3.508	4.71
Transplantasyon**	14.280	19.17
Toplam	74.475	100.00

** Yaklaşık sayı

2.1.8. Böbrek replasman tedavisi hazırlığı

SDBY evresine ulaşıldığında, genellikle sınırlı yaşam süresi olan yaşlı erişkinlerde konservatif tedavi alternatif bir seçenek olmasına rağmen, böbrek replasman tedavisi genellikle gereklidir. Seçenekler hakkında danışmanlık (böbrek nakli, hemodiyaliz, periton diyalizi veya diyaliz yapılmaması) nefrolog tarafından koordine edilmeli ve pratisyen hekimi içeren multidisipliner bir ekiple çalışmalıdır. Erken danışmanlık önemlidir, bilinçli hastalar böbrek yetmezliği ile karşılaşmaya daha hazırlıklıdır. SDBY'nin geç fark edilmesi, böbrek replasman tedavisi başlaması sırasında sağlık durumunun daha kötü olması, diyaliz başladıktan sonra daha yüksek mortaliteye neden olmakta ve nakillere erişimi azaltmaktadır (40).

KDIGO, böbrek yetmezliği belirtileri veya bulguları belirlediğinde diyaliz başlangıcını önerir (tipik olarak GFH 10-5 ml/dk/1,73 m² olduğunda). GFH<20 ml/dk/1.73 m² olan bireylerde ve 6-12 ay öncesine göre progresif KBH kanıtı olan bireylerde canlı verici böbrek nakli düşünülmelidir (10).

2.1.9. Hemodiyaliz ve periton diyalizi

Hemodiyaliz, kandan üremik toksinleri temizlemek için pompalar, membranlar ve diyalizatlar kullanılarak damar yolunda açılan girişler ile yapılırken (41), periton diyalizi kandan üremik toksinleri temizlemek için bir değişim ara yüzeyi olarak peritoneal membran kullanır. Bunun için, her gün drene edilebilen ve diyalizat sıvısını yeniden doldurmak için kullanılan bir transkütanöz kateter periton

boşluğuna implante edilir. Üremik kan ve taze diyalizat arasında bir miktar dengeye ulaştıktan sonra, her birinin aşırı sıvı ve üre toksik de dahil olmak üzere metabolik atık ürünleri tahliye etmesi beklenir.

Periton diyalizi ile başlanan hastalarda ilk 2 yılda daha iyi başlangıç sonuçları ve rezidüel böbrek fonksiyonun korunmasını gösterirken, hemodiyaliz hastaları ile karşılaştırıldığında, bu farklar 2 yıl sonra normale döner (42).

2.2. Böbrek Nakli

Böbrek nakli, 5. evre kronik böbrek hastalığı olan hastaların çoğu için en iyi renal replasman tedavisi türüdür çünkü hasta yaşam kalitesini ve sağ kalım oranını iyileştirir ve uygun maliyetlidir (43).

Nakil için hazırlık aşamasında, böbrek nakli için uygunluk, yaş ve komorbiditelere göre değerlendirilmelidir, ancak tamamlanması aylar sürebilir (44). Kanser, kronik enfeksiyonlar, kardiyak veya periferik vasküler hastalık gibi komorbiditeler ve tıbbi uygunsuzluk riski bu süreçte dikkatle değerlendirilir.

Bekleme listelerinde her ülkenin kendi kurallarına göre bir puanlama ve dağıtım söz konusudur. Organ paylaşımının daha kolay yapılabildiği Avrupa ülkelerinde bekleme süresi daha kısa olabilir. Ancak diğer yerlerde bu süre uzadıkça sıkıntılar artmaktadır. Bu durumda canlı verici adaylarının değerlendirilmesi gündeme gelebilir (9).

Uygunluğu test etmek için, potansiyel bağışçıların kan grubu ve HLA uyumluluğu, GFH ölçümleri, böbreklerin görüntülenmesi ve üriner sistem, kardiyak testler ve tıbbi öyküye bağlı olarak diğer testler de dahil olmak üzere kapsamlı bir sağlık değerlendirmesi yapılmalıdır. Bağıştan sonra vericinin sağlıklı bir şekilde yaşamını sürdürebilmesi ilgili tüm testlerin yapılıp karar verilmesi gereklidir. Pre-emptive nakil SDBY hastalarına çeşitli faydalar sağlayabilir, ancak iyi değerlendirilmelidir (45).

Nakledilen böbreğin yarı ömrü <20 yıldır ve bu hastalar yaşamları boyunca KBH tedavileri için potansiyel aday olurlar (46). Örneğin, tekrarlayan glomerülonefrit, greft sonucu üzerinde olumsuz bir etki yaratabilecek öngörülemeyen bir komplikasyondur (47).

2.2.1. Böbrek hakkında genel bilgiler

Böbrekler boşaltım sisteminin bir parçası olup kanı filtre eden bir sistem olarak çalışmaktadır. Her iki böbrek karın arka duvarında psoas kasının dış yanında oblik pozisyonda ve retroperitoneal yerleşimlidir. Karaciğer ile komşuluğundan dolayı sağ böbrek sol böbreğe nazaran biraz aşağıdadır. Uzun eksenini boyunca ortalama 12-14 cm boyunda olup ortalama ağırlığı 140-170 gr'dır. Böbrek uzun eksenini boyunca kesildiğinde dışta korteks, ortada medulla ve içte kaliksler ile pelvis görülmektedir (48). Korteks ve medulla damarlar, sinirler, lenfler ve nefronlardan oluşmaktadır Böbrek dokusu en dıştan kalın ve dayanıklı bir zar olan böbrek kapsülü ile sarıdır. Ayrıca böbreklerin etrafı retroperitoneal yağ dokusu ile sarılmış olup bu böbrekleri travmalardan korur. Korteks; böbreğin en dış kısmında yerleşen ve daha koyu renkli görünen alandır. Burada glomerül adı verilen kapiller yumaklar yerleşmiştir. Glomerüller kapillerler, Bowman kapsülü denilen ve proksimal tübülün genişlemiş son kısmı olan yapıya gömülü halde olup, Bowman kapsülü ve glomerüller kapiller kompleksine Malpighi cisimciği adı verilmektedir. Her bir böbrekte ortalama olarak 1 milyon adet glomerül mevcuttur. Medulla ise 12-18 adet piramid şeklinde yapılar olarak görülür. Pyramis adı verilen bu yapılar 8-20 adet minör kaliks açılır. Pyramislerin minör kalikslere açıldığı yere papilla adı verilir. Piramid şeklindeki bu medulla alanlarının arasına uzanan korteks kısımlarına Bertini kolonları denir. Medulla, esasen glomerüllerin uzantısı olan tübüllerden oluşmuştur ve glomerül bulunmaz. Medullanın kan dolaşımı kortekse göre çok daha zayıf olup iskemik hasara oldukça duyarlıdır (49).

Böbrekler; yabancı maddelerin ve metabolik artıkların atılması, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi, asit - baz dengesinin düzenlenmesi, arteriyel kan basıncının düzenlenmesi, hormonların salgılanması, metabolize edilmesi ve atılması, eritrosit yapımının uyarılması gibi görevleri gerçekleştirirler (48).

Böbrekler nefron adı verilen ve böbreğin fonksiyonel en küçük ünitesi olarak bilinen yapılardan oluşur. Her böbrekte kabaca 1 milyon adet nefron bulunur. Böbrekte üç tip nefron vardır: Süperfisiyal, midkortikal ve jugstaglomerüler nefronlar. Nefronların %80-85'inin glomerülü korteksin orta ve dış katmanlarında yer alır. Bu nefronların henle kulpları daha kısadır. Nefronların %15 kadarının glomerülü ise korteks-medulla birleşim yerine yakın yerleşmiştir. Bu nefronlara jugstameduller nefronlar denir ve bu nefronların henle kulpları daha uzundur. Nefronlar başlıca iki kısımdan oluşur: Glomerül ve tübüler sistem. Glomerül; afferent arteriol ile efferent arteriol arasında bulunan özelleşmiş bir kapiller yumaktır. Glomerül, tübüler sistemin başlangıcı olan ve Bowman kapsülü denilen yapıya gömülü haldedir. Bu yapı bir balona gömülmüş bir topa benzetilebilir. Afferent arteriyol Bowman kapsülüne girdikten hemen sonra 3-5 adet dala ayrılır ve bu dallar glomerülün segmenter yapısını temsil eder. Bu dallar da karmaşık bir kapiller ağ olan glomerülü oluşturur. Afferent arteriyoller daha glomerülden ayrılmadan Bowman kapsülü içinde birleşerek efferent arteriyolu oluşturur ve kısa bir süre bu şekilde seyrettikten sonra Bowman kapsülünü terk eder. Afferent ve efferent arteriyol, duvarlarındaki düz kas hücreleri sayesinde çeşitli vazoaaktif uyarılara cevap vererek kasılma özelliği gösterirler. Ayrıca lokal myojenik mekanizmalarla özellikle afferent arteriyol otonomik olarak kasılma yeteneğine sahiptir (49).

2.2.2. Nefron kaybı

Nefronlar insanlarda gebeliklerinin 12 ila 36. haftalarında üretilir (50). Bu dönemden sonra yeni nefronlar üretilmez. Büyüme sırasında, mevcut nefronlar artan böbrek ihtiyacını karşılamak için boyutsal olarak büyürler. Ayrıca, GFH yaşla birlikte azalır. Her ne kadar nefronlar yapısal değişiklikler olmadan geçici olarak GFH'yi artırarak filtrasyon yükündeki geçici artışlarla başa çıkabilse de, vücut kütleindeki daha uzun veya kalıcı artışlar (hamilelik ve ya obezite gibi) telafi edici mekanizma olarak nefron hipertrofisini teşvik eder. Örneğin böbreklerden birinin yaralanması veya bağışlanması nedeniyle oluşan nefron kaybı, kalan nefronlar üzerinde aynı hipertrofik etkiye sahip olabilir. Ağır böbrek hasarı veya yaşlanma ile ilgili nefron kayıpları ve yaralanmalar, özellikle zayıf nefron donanımına ve / veya

obeziteye sahip bireylerde, GFH'yi artırır ve kalan nefron kaybının hızlanmasına neden olur.

Nefron hipertrofisi, bozulmuş glomerüler filtrasyon ve fibrozis nefron kaybı nedenleri arasındadır (9).

2.2.3. Böbrek naklinin tarihçesi

İnsan hayatında çok önemli yeri olan kan, insandan insana nakli konusunda ilk ve en yoğun olarak düşünülen dokudur. İlk belgelenmiş insan kan transfüzyonunun tarihi 22 Aralık 1818'dir. İlk başarılı kan transfüzyonu, üç saat boyunca Blundell'in asistanından sekiz ons kan aldıktan sonra şiddetli doğum sonrası kanamadan kurtulan bir kadındı (51).

Böbrek nakli hayvandan ya da insandan insana denenmesine rağmen rejeksiyon nedeni ile uzun yıllar başarılı olamamıştır. Boston şehri böbrek nakli gelişiminde önemli bir rol oynamıştır. İlk uzun dönem başarılı allograft böbrek nakli 1954 yılında Boston'da tek yumurta ikizleri arasında Murray, Harrison ve Merrill tarafından yapılmıştır. Hasta nakil sonrası 8 yıl yaşamını sürdürmüştür. Çift yumurta ikizleri arasındaki ilk başarılı allograft böbrek nakli 1959 yılında, kadaverik bir vericiden ilk başarılı allograft böbrek nakli ise 1962 yılında yapılmıştır (52).

Türkiye'de organ nakli tarihinden söz açıldığında şüphesiz ki bu alanda öncü bilim adamlarımız Prof. Dr. Mehmet HABERAL ve ekibi büyük farkla öne çıkmaktadır. 3 Kasım 1975 tarihinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Bölümü'nde, Türkiye'de ilk kez annesinden 12 yaşındaki bir çocuğa, akrabalar arası böbrek naklini gerçekleştirdi. 10 Ekim 1978'de Avrupa Trasplantasyon Birliği'nden (Eurotransplant) sağlanan ölü böbrek ile Türkiye'de ilk defa kadavradan böbrek naklini gerçekleştirdi (53).

2.2.4. Türkiye'de böbrek nakli

Ülkemizde yapılan bu başarılı ilk organ naklinden sonra yine Prof. Dr. Mehmet HABERAL öncülüğünde 29.05.1979 tarihinde yürürlüğe giren 2238 sayılı

“Organ ve Doku Alınması, Saklanması ve Nakli Hakkında Kanun” ile ülkemizde organ naklinin hukuki altyapısı da hazırlanmış oldu. Daha sonra bu kanun temel alınarak 01.02.2012 tarihli ve 28191 sayılı Resmi Gazetede “Organ ve Doku Nakli Hizmetleri Yönetmeliği” yayınlandı.

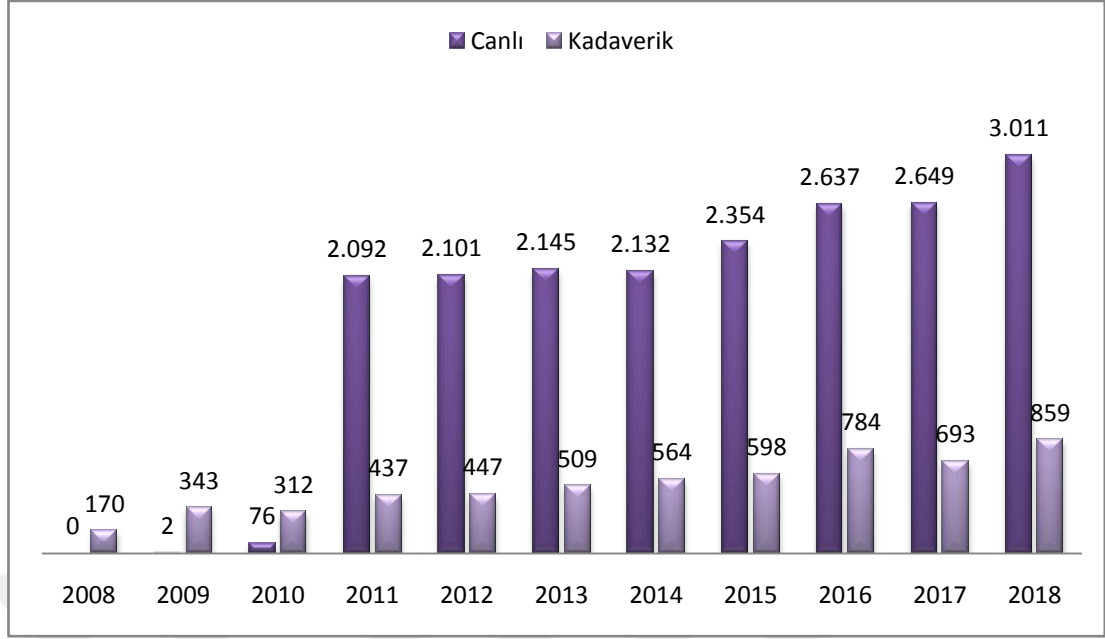
Kadaverik organ nakillerinde beyin ölümü gerçekleşen kişilerin organlarının bağışlanması 2238 Sayılı “Organ Ve Doku Alınması, Saklanması, Aşılması Ve Nakli Hakkındaki Kanun” ile düzenlenmiştir. Burada yer alan Madde 14’e göre; Bir kimse sağlığında vücudunun tamamını veya dokularını, tedavi, teşhis ve bilimsel amaçlar için bıraktığını resmi veya yazılı bir vasiyetle belirtmemiş veya bu konudaki isteğini iki tanık huzurunda açıklamamış ise sırayla eşi, reşit çocukları, ana veya babası veya kardeşlerinden birisinin; bunlar yoksa yanında bulunan herhangi bir yakınının muvafakatiyle ölüden organ ve doku alınabilir. Aksine bir vasiyet ibraz edilmedikçe kornea gibi ceset üzerinde bir değişiklik yapmayan dokular alınabilir. Ölü, sağlığında kendisinden ölümünden sonra organ veya doku alınmasına karşı olduğunu belirtmişse organ ve doku alınmaz.

01.02.2012 tarihli ve 28191 sayılı Resmi Gazetede “Organ ve Doku Nakli Hizmetleri Yönetmeliği” ne göre organ ve doku nakli merkezlerine nakil amacıyla başvuran hastalar için nakil türlerine göre ilgili Bilimsel Danışma Kurulunun önerileri doğrultusunda Bakanlık tarafından hazırlanan formatlara uygun olarak hasta bekleme listelerini oluşturulmaktadır. Organ ve doku nakli merkezlerinin hasta bekleme listelerini hazırlayarak Ulusal Koordinasyon Merkezi (UKM)’ne gönderir. Hasta bekleme listelerinde yer alan ve belirtilen hastalara ilişkin acil organ ve doku taleplerini Bölge Koordinasyon Merkezi (BKM)’ne ve UKM’ye bildirirler. Hasta bekleme listelerini sürekli güncelleştirerek, yeni başvuruları ve listeden çıkan hastaları en fazla bir iş günü içinde UKM’ye bildirirler.

Aile puanı sistemi ile beyin ölümü tanısı almış ve Ulusal Koordinasyon Sistemine organ bağışında bulunmuş kişinin bekleme listesindeki eşi ile ikinci dereceye kadar olan (ikinci derece dahil) kan hısımlarına verilen ek puanla öncelik sağlanmaktadır.

Canlı vericiden organ naklinde, alıcının en az 2 yıldan beri resmen birlikte yaşadığı resmi nikâhlı eşi, dördüncü dereceye kadar kan ve kayın hısımlarından yapılabilmektedir. Yukarıda belirtilen canlı verici olabileceklerin dışında, canlı vericiden nakil yapılabilmesi için; naklin yapılacağı şehirde oluşturulacak bir “Akraba Dışı Canlıdan Organ Nakli Karar Komisyonu”nun verici kişi ile alıcı kişi arasında, ilgili yönerge ve diğer ilgili mevzuatta yasaklanmış herhangi bir hususun bulunmadığını onaylaması sonucunda yapılabilmektedir (54).

Transplantasyon, Diyaliz ve İzlem Sistemleri (TDİS) web programı 1 Haziran 2016 tarihi itibarı ile kullanıcıların hizmetine açılmıştır. TODBS (Türkiye Organ ve Doku Bağış Sistemi), TODS (Türkiye Organ ve Doku Nakli Sistemi), YOBİS (Yoğun Bakım Bilgi Sistemi), DYOB (Diyaliz Bilgi Sistemi), KİBS (Kemik İliği Bilgi Sistemi) olarak, Organ Doku Nakli ve Diyaliz Hizmetleri Daire Başkanlığı tarafından daha önceden yürürlüğe konmuş beş ayrı sistem, TDİS sisteminde ana sistem olarak yerini almıştır (55). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre TDİS'e (T.C. Sağlık Bakanlığı Transplantasyon, Diyaliz ve İzlem Sistemleri) kayıtlı 2008-2018 yılları arasında 19.199 böbrek nakli canlı vericiden, 5.716 böbrek nakli kadaverik vericiden yapılmıştır. 1994-2018 yılları arasında toplam 9 bölge koordinasyon merkezine kayıtlı 22.484 kişi bekleme listesinde bulunmaktadır (56, 57).



Grafik 2.1.: Yıllara göre yapılan canlı ve kadaverik nakillerin dağılımı

2.2.5. Böbrek naklinde alıcı ve verici seçimi

Nakilde alıcı verici arasında doku uyumu ne kadar fazla olursa nakil sonrası erken dönemde akut rejeksiyonlar ve geç dönemde kronik rejeksiyon gelişme ihtimali o kadar düşük olmakta ve hasta nakledilen böbrek ile daha uzun ve konforlu bir yaşam sürdürmektedir (58). Birden fazla verici adayı olduğu durumlarda diğer ölçütler eşit düzeydeyse uyumun en fazla olanının seçilmesi başarıyı artıracaktır (59).

Nakil öncesi immünolojik değerlendirme kapsamında HLA doku grubu tiplmesi, ABO kan grubu uyumu, Panel Reaktif Antikor (PRA) testi ve Lenfosit Çapraz Karşılaştırma (Lymphocyte Cross Match: LCM) testi günümüzde rutin uygulamada olan çalışmalardır (59).

2.3. İnsan Lökosit Antijenleri

Bağışıklık sisteminin kendinden olanı ve olmayanı tanıması için gerekli olan “doku antijenleri” ni kodlayan gen bölgesi, Büyük Doku Uyum Kompleksi (Major Histocompatibility Complex: MHC) olarak adlandırılır (60). 1930'larda farelerde ilk büyük doku uyum antijeni tanımlandı fakat Dausset'in HLA-A2'yi tanımladığı 1952

yılına kadar insanda MHC keşfedilmedi (3). İlk olarak kemirgenlerde tanımlanan bu bölgenin insandaki karşılığı, 6 kromozomun kısa kolunda (6p21) yerleşmiş olup (3, 60); ilk olarak beyaz kan hücrelerinde gösterilen bu genler, HLA bölgesi olarak da adlandırılır. Çok sayıda genin yer aldığı yaklaşık 4000 kilobaz (kb) büyüklüğündeki bu bölgede immün yanıtla ilgisi tanımlanamamış bazı genler de yer alır (60). Fonksiyonu tanımlanmış genlerin yüzde 0,6'sını oluşturan bu genler aynı zamanda tüm insan genomunun binde 1'ini meydana getirirler (61).

HLA sisteminin nomenklatürü Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün denetiminde HLA nomenklatür komitesi tarafından düzenlenmektedir. Ocak 2019 itibariyle son bildirilen allel sayısı HLA sınıf I için 15.586, HLA sınıf II için 5.913 olmak üzere toplam 21.499'dur (62).

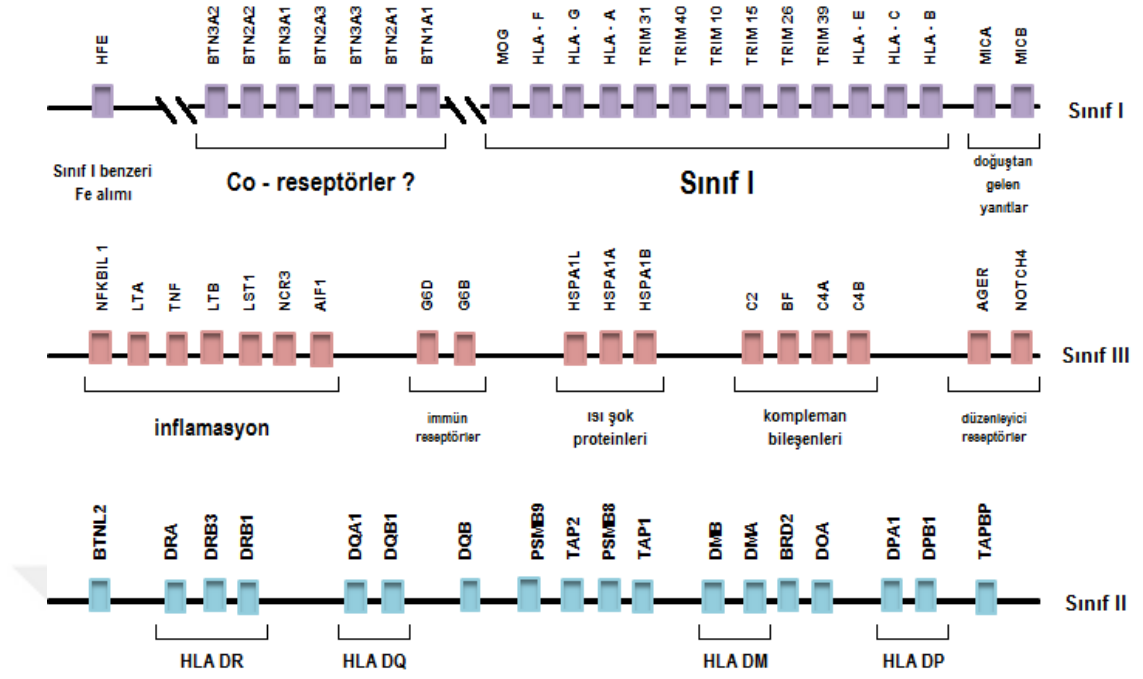
Ülkemizde HLA frekansının belirlenmesi için bölgesel çalışmalar yapılmaktadır. 2010-2015 yılları arasında Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesini kapsayan HLA allel frekanslarının belirlenmesi için yaptığımız çalışma sonuçlarına göre en sık görülen alleller tablo 2.5.'te belirtilmiştir (63).

Tablo 2.6.: HLA allel frekansları

Allel	n	%
A*01	831	17,7
A*02	1587	33,7
A*03	1068	22,7
A*24	1277	27,1
B*18	507	10,8
B*35	1475	31,3
B*44	604	12,8
B*51	1108	23,5
DRB1*01	1403	29,8
DRB1*04	1382	29,4
DRB1*11	2171	46,1
DRB1*15	1027	21,8

HLA molekülleri HLA sınıf-I, HLA sınıf-II ve HLA sınıf-III olmak üzere 3 grupta incelenmektedir. HLA sınıf-I'de HLA -A, -B, -C gibi klasik; -E, -F, -G gibi

non klasik moleküller olup -H, -X ise pseudo moleküller olarak kodlanır. HLA -A, -B, -C molekülleri antijen sunumu görevini üstlenmiştir. HLA-G immün modülatör rol oynayan bir molekül olup özellikle gebelikle ilişkilendirilmiştir. Diğerlerinin görevleri ise tam olarak açıklanamamıştır. HLA sınıf-II'de nakillerde daha önemli rol oynayan ve antijen sunum görevini üstlenen HLA -DQ, -DR, -DP, ve -DM, TAP moleküllerini kodlayan genler bulunur. TAP 1, TAP2 ve DM tarafından kodlanan moleküller, antijen işlenmesi ve sunuma hazırlanmasında görev yaparlar. HLA sınıf-III'te ise immün sistemin savunma mekanizmalarının en önemli parçası olan inflamasyonda yer alan tümör nekroz faktörü (TNF), kompleman 2 ve kompleman 4 (C2, C4), lenfotoksin (LT) ve ısı şok proteini-70 kodlanır. HLA, organizmanın en polimorfik genlerinin bulunduğu bölgedir (63,64). Nokta mutasyonları, parça değişimleri gibi yöntemlerle HLA genlerinde sürekli yeni polimorfizmler meydana gelmektedir. Polimorfik noktalar hangi HLA moleküllerinin hangi peptidleri bağlayacağını belirlediği için fazla sayıda allelin bulunması popülasyonda belirli antijenleri sunabilen bireylerin varlığını meydana getirir. HLA sınıf-III lokusu da sınıf I ve sınıf II gibi yüksek polimorfizme sahip genlerden meydana gelir. HLA'nın diğer bir özelliği ise ko-dominant olarak eksprese edilmeleridir. HLA molekülleri kodlanırken anne ve babadan geçen genlerin hepsi kodlama işlemine katılır. Bu sayede fenotipik olarak ebeveynlerden geçen genler o kişide üretilir ve ilişkili moleküller eksprese olur (65). HLA genlerinde fazla miktarda farklı allel olmasının ve bunların oldukça polimorfik yapıda olmaları ve eş ağırlıklı olarak hücre yüzeyinde taşınmaları sonucunda HLA molekül çeşitliliği artmaktadır. Bu yolla immünolojik açıdan farklı bireylerin oluşması sağlanmıştır (64). Şekil 2.3.'te HLA'nın yapısı verilmiştir (61).



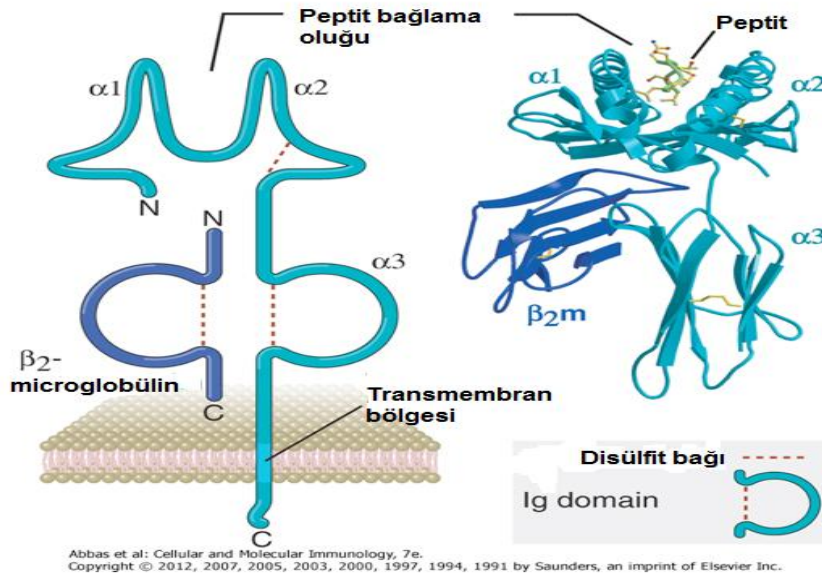
Şekil 2.1.: HLA'nın yapısı

HLA sınıf-I antijenleri, çekirdekli hücrelerin hepsinin yüzeyinde eksprese edilirlerken sınıf-II antijenler ise dendritik hücreler, aktive makrofajlar ve B lenfositler gibi, antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde eksprese edilirler. HLA moleküllerinin görevi antijenik peptidlerin T lenfositlere sunulmasıdır ve doku tipinin belirlenmesidir (66).

2.3.1. HLA A, B ve C antijenlerinin yapısı

Sınıf-I HLA molekülleri α ve β 2 mikroglobulin zincirinden oluşur. Bunlar birbirlerine kovalen olmayan bağlarla bağlıdır. Polimorfik özellik gösteren α zinciridir. Sabit zincir olan β 2 mikroglobulin polimorfik özellik göstermez ve HLA dışında bir bölgede bulunan genler tarafından kodlanır. β 2 mikroglobulin bütün HLA sınıf-I moleküllerinde aynıdır. α zinciri α 1, α 2 ve α 3 olmak üzere üç yerde kıvrım yapar. α 1 ve α 2 kıvrımlarının uç kısımları, polimorfik olan bölgelerdir. Bu iki kıvrımın arasında oluşan oluğa yalnızca 8-11 aminoasitten oluşan küçük peptid yapıdaki antijen bağlanabilir. Daha büyük peptidler bağlanamaz. α 3 kıvrımı polimorfik olmayan bölgedir. Bu bölge HLA molekülünün T hücre ko-reseptörlerinden birisi olan CD8'e bağlanma bölgesidir. HLA sınıf-I molekülünün α zinciri hücre yüzeyine bağlıdır, hücre içerisinde ise küçük bir uzantısı vardır. β 2

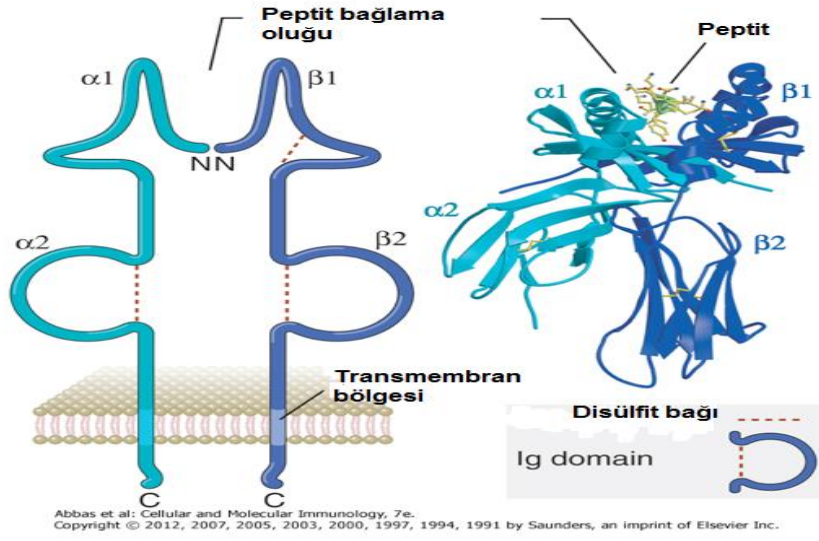
mikroglobulin zinciri membrana doğrudan bağlantılı değildir. β_2 mikroglobulin, α zinciri ile kovalen olmayan bağlarla bağlanır. Bu sayede HLA ile oluğa yerleşmiş olan antijenin bağlantısını güçlendirir. Bir insanda ebeveynlerden geçen 6 tane farklı HLA sınıf-I molekülü bulunur. HLA Sınıf-I moleküllerinin görevi sitoplazma içinde yer alan yabancı antijenleri $CD8^+$ sitotoksik T hücrelerine sunmaktır. Bu antijenler genellikle virüsler ve tümör antijenleridir. Hücre içinde sitoplazmada antijen içeren bu hücreler Antijen Sunan Hücreler (Antigen Presenting Cells: APC) tarafından fagositozla alınıp işlenir ve yüzeylerinde bulunan HLA sınıf-I, -II molekülleri aracılığıyla lenf bezlerindeki antijenle hiç karşılaşmamış T hücrelerine sunulur. Bu sunum sırasında antijene özgün $CD8^+$ sitotoksik T hücre klonu sayıca artar ve aktive olur. $CD4^+$ yardımcı T hücre klonu da bu sunum sırasında daha düşük seviyede sayıca artar ve aktive olur. Bu mekanizma çapraz sunum için en iyi örnektir. Daha sonraki aşamada ise aktive olmuş $CD8^+$ sitotoksik T hücreleri, antijenin bulunduğu bölgeye gelir. $CD8^+$ T hücreleri sitoplazmalarında bulundurdukları perforin ve granzim etkisiyle HLA sınıf-I molekülleri ile antijen sunan hücreyi öldürürler (64).



Şekil 2.2.: Sınıf I HLA yapısı

2.3.2. HLA DP, DQ ve DR antijenlerinin yapısı

HLA sınıf-II polimorfik bir α (32-34 kD) ve polimorfik bir β (29-32kD) zincirden oluşur. Bunlar birbirlerine sınıf I moleküllerinde olduğu gibi kovalanmayan bağlarla bağlanmıştır. Bu zincirlerin her biri $\alpha 1$, $\beta 1$ ve $\alpha 2$, $\beta 2$ olacak şekilde iki bölgede kıvrım yapar. $\alpha 1$ ve $\beta 1$ kıvrımlarının uç bölgeleri polimorfik bölgelerdir ve bunların arasında oluşan oluğa antijen bağlanır. Antijen bağlanma yarığı, HLA sınıf-I molekülüne göre daha esnektir. Bu nedenle 10-30 rezidüden oluşan daha büyük peptitler bu yarığa yerleşebilir. $\alpha 2$ kıvrımı HLA ile antijenin bağlantısını güçlendirir ve sabitler. $\beta 2$ kıvrımı ise HLA molekülünün T hücre eş-reseptörü olan CD4'e bağlanma bölgesidir. HLA sınıf-II moleküllerinin görevi fagositozla hücre içine alınan mikroorganizmaları işleyip, antijenleri CD4⁺ yardımcı T hücrelerine sunmaktır. Başlangıçta, vücuda giren bakterilerle karşılaşan ve onları fagosit eden APC'ler antijeni işleyip yüzeylerindeki HLA sınıf-II molekülleri ile komşu lenf bezinde bulunan antijenle hiç karşılaşmamış olan CD4⁺ yardımcı T hücrelerine sunarlar. Sayıca artan ve aktive olan yardımcı T hücre klonu ise efektör fonksiyonunu gerçekleştirmek üzere antijenin bulunduğu bölgeye gider ve aynı antijeni HLA sınıf-II molekülleri aracılığı ile eksprese eden makrofajlar ve B hücrelerine sitokin salgılayarak yardımda bulunur. Antijeni sunan hücre makrofaj ise CD4⁺ yardımcı T hücresi, antijeni fagositozunu arttırarak daha etkin bir hale getirir, B hücresini ise salgıladığı sitokinlerle antikor üretmesi yönünde uyarır (63,64).



Şekil 2.3.: Sınıf II HLA yapısı

2.3.3. Nakilde HLA'nın önemi

Transplantasyonda HLA A, B, DR antijenlerindeki uyumun önemini kanıtlayan pek çok çalışma vardır. HLA C ve HLA DQ için de benzer yayınlar bulunsa da bu iki grubun sırası ile B ve DR antijenleri ile gösterdikleri birliktelikler (linkage disequilibrium) objektif bir değerlendirmeyi güçleştirmektedir. Böbrek nakillerinde graft yaşamında HLA DR uyumunun HLA B ve A uyumundan daha belirleyicidir. Organ/doku nakli planlanan alıcı-vericiler için HLA A, B ve DR lokus allellerinin tiplendirilmesi gerekir. HLA C, DQ ve / veya DP için yapılan tiplendirme bazı durumlarda yardımcı olsa da zorunlu değildir. Adı geçen antijen/allellerin tiplendirilmesi mutlaka ruhsatlandırılmış laboratuvarlarda yapılmalıdır (60).

2.3.4. HLA tiplemesinde kullanılan yöntemler

Solid organ nakli için antijen seviyesinde HLA tiplemesi yapılır. Hastalar, belirli bir HLA lokusunda sadece belirli allellere antikor oluşturabileceğinden, kesin HLA allelinin tanımlanması gereklidir. Moleküler tipleme, alıcının sahip olduğu antikorlarına karşı spesifik allelleri olan vericilerin nakil için göz ardı edilmesini sağlayabilir (67).

Sekansa özgü primer yöntemiyle HLA tiplemesi

Sekansa özgü primer (Sequence Specific Priming: SSP) bazlı tiplemde yalnızca sınırlı sayıda alleli çoğaltan primerleri kullanır. SSP ile HLA tiplemesi ilk olarak HLA-DR lokusunu belirlemek için kullanılmıştır, daha sonra geriye kalan HLA sınıf-I ve sınıf-II lokuslarını belirlemek içinse hızlı bir şekilde ilerlemeler kaydedilmiştir. Sadece spesifik HLA allel dizileri veya 3' ucundaki bir kalıp HLA allelini tamamlayıcı primerler kullanılır; belirlenen amplifikasyon koşulları altında, bir DNA uyuşmazlığı varsa bunlar Taq polimeraz kullanılarak uzatılmaz. SSP testlerinde, hazırlanan primer setleri plaklar halinde kullanılmak üzere planlanmıştır. DNA, hasta numunesinden izole edilir, bir tampon, nükleotitler (dNTP'ler) ve polimeraz karışımına eklenir ve SSP plaklarına ekilir. Reaksiyonun uygun şekilde gerçekleştiğini görmek için internal kontrol primerleri, primer setinde mevcuttur. Amplifikasyon için SSP plağı PCR'a konur. Daha sonra, amplifikasyon ürününün varlığını tanımlamak için jel elektroforezi yapılır. Jel sisteminde akıma bağlı ilerleyen DNA ürünlerinin DNA Size Marker'a göre uzunluğu saptanır ve doğru uzunlukta olup olmadığı kitapçıkta yada software programında değerlendirilir. Daha sonra DNA ürünlerinin değerlendirilmesi yapılarak HLA doku tipi belirlenir. Belirli alleller için ticari olarak hazırlanmış çok sayıda SSP plak mevcuttur. Uygun olmayan test koşulları spesifik olmayan primer bağlanmasına veya spesifik bağlanma eksikliğine neden olabileceğinden, SSP testi, test koşullarındaki değişikliklerin neden olduğu hatalara karşı daha duyarlı olma eğilimindedir (68).

Sekansa özgü oligonükleotit yöntemiyle HLA tiplemesi

Sekansa özgü oligonükleotit (Sequence Specific Oligonucleotides: SSO) yönteminde sınırlı sayıda bilinen HLA alleleline tamamlayıcı kısa probalar (yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda) kullanılır (68). Genel olarak PCR amplifikasyonunu, hibridizasyonu, streptavidin-pikoeritrin (SA-PE) reaksiyonunu ve analitlerin ölçümünü içeren Luminex metodu ile HLA genotiplemesi yapılır. Amplifikasyon aşamasında hedef DNA, HLA genlerinin bazı sekanslarına oldukça spesifik olan 5'-biotin işaretli primerleri kullanarak PCR ile çoğaltılır. Hedef DNA, spesifik SSO problemleriyle muamele edilmiş floresan işaretli boncuklarla çoğaltılır ve inkübe edilir.

Hibridizasyon aşamasında 95 °C'de denatüre edildikten sonra, çoğaltılmış DNA mikro boncuklara bağlı tamamlayıcı DNA problemlerine hibridize olur (69). Hedef DNA, prob dizisine tamamlayıcıysa, boncuklara bağlanır (68). SA-PE reaksiyonu sırasında ise, oligo boncuklar üzerindeki hibritleştirilmiş PCR ürünü, SA-PE ile işaretlenir. (69). Luminex cihazı, biotin işaretli PCR ürünü ile hibritlenen her kodlanmış oligo boncuk üzerindeki PE'nin floresan yoğunluğunu tanımlar (69). SSO testinin en yaygın kullanımı, akış sitometri boncuk yöntemidir (68). SSO yönteminde kullanılan Luminex cihazı bu yöntem baz alınarak tasarlanmıştır. XMAP teknolojisinin temel bileşeni olarak oligonükleotit bağlanma problemleri ile işaretlemek için yaklaşık 5.5 µm çapında farklı polistiren renk kodlu mikro boncuk setleri kullanılır. Her bir boncuk seti, boncuklar içine gömülmüş iki farklı floresan boya (kırmızı ve kırmızı) oranıyla üretici tarafından renklendirilmiş ve kodlanmıştır. Her bir florokromun konsantrasyonlarını ayarlayarak, Luminex 100 akış sitometresinde 100 farklı floresan etiketli mikro boncuk kodlanabilir ve tanımlanabilir. Luminex 100 üzerinde bulunan çift lazerlerden biri, boncukların içine yerleştirilmiş iç boyaları uyarır ve iç boyaların önceden belirlenmiş oranını belirleyerek floresan mikro boncukların tam kod numarasını belirler. Bu şekilde HLA tiplemesi yapılır (69).

Bu yöntem çeşitli nedenlerden dolayı avantajlıdır. Çok sayıda ticari kit mevcuttur. Geri dönüş süreleri, sekansa dayalı testlerle karşılaştırıldığında nispeten kısadır. SSO tek seferde çok sayıda hastanın HLA doku tipini test etmek için kullanılır. Önceki SSO kitleri sadece düşük çözünürlüklü tipleme sağlasa da, günümüzde yüzlerce prob içeren kitler mevcuttur. Bunlar, orta veya yüksek çözünürlüklü HLA doku tiplemesini güvenilir bir şekilde belirleyebilir(68).

2.4. Anti-HLA Antikorları

Anti-HLA verici reaktivitesi, böbrek nakil sonucunu etkileyen bir faktördür (70). Allograft reddinde antikorların varlığı kritik bir rol oynamaktadır ve humoral rejeksiyonun ana nedeni olarak kabul edilmektedir (71). Hastanın kan transfüzyonu, gebelik veya organ naklinden kaynaklanan "kendine ait olmayan" HLA moleküllerine maruz kalması, anti-HLA antikorlarının gelişimine yol açabilir ve böbrek transplantasyonunda önemli immünolojik engeller oluşturur. Bu sebeple nakil

için bekleyen hastalar, anti-HLA antikorlarının varlığı ve özgüllüğü açısından test edilmektedir (72, 73). Donör spesifik antikorlar (DSA) vericinin HLA yapısına karşı oluşmuş antikorlardır. DSA'lar nakil öncesi görülebildikleri gibi nakil sonrasında yabancı grefte karşı oluşan ve “de novo” yani sonradan oluşan DSA olarak da saptanabilirler (74). Donöre spesifik anti-HLA antikorlarının nakil sonrası üretimi, aktif bir bağışıklık tepkisinin göstergesidir ve bu nedenle organın reddedilme riskinin artmasına neden olur (75).

2.4.1. Anti-HLA antikorları saptama yöntemleri

Organ reddi oranını azaltmak ve sağ kalımı artırmak için anti-HLA antikorlarının saptanması için şu anda birkaç teknik kullanılmaktadır: Kompleman bağımlı sitotoksikite (Complement Dependent Cytotoxicity : CDC) testi, enzim bağımlı immünosorbent testi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)ve boncuk bazlı analizler (Luminex ve FlowPRA)(70).

CDC testi, uzun yıllardır anti-HLA antikor tespiti için altın standart bir teknik olmuştur (76). Son yıllarda, ELISA testi ve HLA antijen kaplı boncuk (Luminex) yöntemleri gibi yeni katı faz teknikleri, anti-HLA antikorlarının organ reddindeki rolünün daha iyi anlaşılmasını sağladı (77, 78). Daha hassas ve spesifik katı-faz yaklaşımlarının geliştirilmesi, anti-HLA antikorlarının tespitinde tamamen devrim yarattı. Ancak, bu tekniklerle tanımlanan anti-HLA antikorlarının klinik önemi henüz tam olarak anlaşılmamıştır (79). Katı faz teknolojisinin, anti-HLA antikorlarını saptamak için CDC'den daha hassas ve spesifik olduğu ve Luminex yaklaşımının ELISA'dan kesinlikle daha duyarlı olduğu iyi bilinmektedir (78).

Günümüzde, anti-HLA antikor tespiti için en çok kullanılan yöntem, Luminex teknolojisine sahip floresan boncuklara dayanmaktadır (70).

Boncuk bazlı analizler (Luminex teknolojisi)

Luminex teknolojisi, akışa dayalı bir boncuk analizinden oluşan anti-HLA'ya özgü antikor tespiti için yüksek verimli bir platformdur (78). Antikor taraması,

spesifik veya farklı HLA molekülleri ile kaplanmış, farklı florokromları içeren bir dizi polistiren mikroküresi ile gerçekleştirilir. Alıcı serumu, boncuk karışımına eklenir ve varsa anti-HLA antikorları, mikro küreler üzerinde kaplanmış spesifik antijene bağlanır. Daha sonra birincil anti-HLA antikoruna bağlanan ikinci bir PE işaretli anti-insan immünoglobülin G (IgG) antikoru eklenir. Tüm boncuk karışımı, IgG ile kaplı bir pozitif kontrol boncuk ve HLA molekülleri içermeyen bir negatif kontrol boncuk içerir. Her boncuk için arka plan oluşturmak üzere her testte bir negatif kontrol serumu uygulanır. Luminex sistemi tespit, toplama ve veri analizi için kullanılır. Luminex analizörü, iki lazer içeren bir uyarma sistemine sahip bir akış sitometresidir. Kırmızı lazer boncuklardaki florokromları uyarır, yeşil lazer ise her boncuktaki anti-HLA antikorlarına bağlı PE moleküllerinin floresansını uyarır. İki sinyalin kombinasyonu antikor spesifikliğini tanımlar. PE işaretli floresan sinyali, bir ortalama floresan ışması (Median Fluorescence Intensity: MFI) boncuk değeri olarak ifade edilir. Serum reaktivitesi, negatif kontrol boncuğuna spesifik olmayan bağlanma için düzeltmeden sonra her boncuk için floresan ışma sinyali ile değerlendirilebilir. Tüm veriler negatif kontrol serumu ile normalleştirilmiştir (70).

2.4.2. Anti-HLA antikorları testleri

Anti-HLA antikor testleri üç ayrı aşamada değerlendirilebilir: Panel Reaktif Antikor (PRA) tarama sınıf I-II testi, PRA tanımlama sınıf I-II testi ve tek antijen (Single Antigen: SA)sınıf I-II testi.

PRA tarama sınıf I-II testi, çok sayıda saflaştırılmış sınıf I ve II HLA antijenine bağlı boncuklar ile pozitif ve negatif olduğu bilinen serum örneklerinin çalışılmasıyla oluşur. PRA tanımlama sınıf I-II testinde ise pozitif olan PRA seviyesi, bir hücrenin fenotip eşdeğeri ile kaplanmış boncuklar kullanılarak anti-HLA antikorunun spesifikliği belirlenir. SA sınıf I-II testi ise, transfekte edilmiş insan hücre hatlarından tek rekombinant antijenler boncuklarla kaplanarak anti-HLA antikor spesifikliklerinin doğru tanımlanmasına olanak verir(70).

Luminex teknolojisinin, anti-HLA antikor tespitinde, özellikle SA analizinin kullanılmasındaki en büyük avantajı, antikor spesifitesini tanımlamanın ve bu

nedenle uyumlu bir verici bulmanın çok zor olduğu yüksek derecede bağışıklanmış hastalardan gelen kompleks serumların doğru değerlendirilmesini sağlamasıdır (80, 81). Her bir anti-HLA antikoru, yapısal olarak birkaç sınıf I ve II HLA moleküllerinde ortak olan birkaç amino asit kalıntısı ile tanımlanmış çoklu epitoplara bağlayabilir (82). Luminex SA testi, sınıf I ve II anti-HLA antikorumları arasında kesin bir ayırım sağlar. SA testinin bir bağka büyük avantajı, spesifik HLA allellerine karđı antikorumları tespit edebilmesidir (70).

2.5. Lenfosit apraz Karşılaştıırma Testleri

1960'ların sonunda, HLA'lara karđı antikorumlar, allogreft reddinin bir nedeni olarak tanındı. 1970'lerde CDC testi, spesifik bir böbrek allogreft için uygunluğu belirlemek için standart protokol haline geldi. HLA antijenleri arasındaki çapraz reaktivitenin, farklı HLA molekülleri arasında paylaşılan epitoplara bağlı olduğu gösterilmiştir ve HLA eşleşmesinin, greft sağ kalımını arttırdığı ve gelecekte ek bir nakil gerektirebilecek hastalarda sensitizasyonu sınırladığı gösterilmiştir (3).

2.5.1. Hücre temelli çapraz karşılaştıırma testleri

Hücre temelli çapraz karşılaştıırma testleri, potansiyel bir donörün lenfositini ile hastanın antikorumların reaktivitesinin doğrudan bir değerlendirmesini sağlar. Bu testler HLA antikorumları için spesifik değildir ve canlı hücreler gerektirir. HLA dığı antijenlere karđı sitotoksik antikorumlar, transplant sonuçları ile ilişkili olmayan pozitif hücre temelli çapraz eşleşme sonuçlarıyla sonuçlanabilir. Bu nedenle, bir çapraz karşılaştıırma testi sonucunun klinik önemini belirlemek için antikor karakterizasyonu gereklidir. Otoantikorumların varlığı, DSA'ların yokluğunda pozitif bir çapraz eşleşme ile sonuçlanabileceğinden, verici çapraz eşleştirmeye pozitif sonuçlar elde edildiğinde her zaman bir otolog çapraz karşılaştıırma yapılmalıdır. Verici lenfositleri ve eşzamanlı negatif otolog çapraz karşılaştıırmayı içeren pozitif bir çapraz eşleşme, alıcı serumda DSA'ların varlığını düşündürmektedir(3).

Kompleman bağımlı sitotoksitate çapraz karşılaştırma testi

Uyumsuz verici saptamak için kullanılabilen hızlı ve ucuz bir testtir. CDC analizi akımsitometri yöntemiyle yapılan çapraz karşılaştırma testine göre daha spesifiktir. Bu test için kullanılan teknikler, reaktifler, kullanılan aletler ve sonuçların yorumlanması laboratuvarlar arasında değişmektedir. Çapraz karşılaştırma test sonuçlarının doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için laboratuvar içi değişkenlik en aza indirilmelidir ve yayınlanan veriler değerlendirilirken laboratuvarlar arası değişkenlik göz önünde bulundurulmalıdır. Verici hücrelerin bir HLA laboratuvarına aktarılması ve hücre temelli çapraz karşılaştırma testleri birkaç saat sürebilir, ölen (verici) organlar için soğuk iskemi sürelerini uzatabilir ve bölgesel veya ulusal organ paylaşımını sınırlayabilir. Bu sorun çoğu vakada organ çıkarılmadan önce çapraz karşılaştırma testleri yapılarak engellenebilmesine rağmen, coğrafi olarak uzak merkezler arasında organ paylaşımı durumunda, doğru bir sanal karşılaştırma, soğuk iskemik zamanı önemli ölçüde azaltacaktır.

Alıcı serumu ve kompleman, verici lenfositleri üzerine eklenir. Alıcı serumda donör spesifik anti HLA antikorları mevcutsa, verici lenfositlerin yüzeyindeki HLA moleküllerine bağlanır ve hücre lizisine yol açan komplemanı aktive eder. Parçalanmış hücreler acreditedine orange boyası ile boyanır ve immünfloresan invert mikroskop kullanılarak tespit edilir. Çapraz eşleşmenin gücü parçalanmış hücrelerin oranına göre derecelendirilir. T hücreleri ve B hücreleri, sınıf I ve sınıf II HLA moleküllerinin diferansiyel ekspresyonuna sahip olduğundan, hem T hücresi hem de B hücresi ile çapraz karşılaştırma testleri yapılır. Çapraz karşılaştırma testinin duyarlılığı çok nadir olarak kullanılan anti insan globülin (Anti Human Globulin: AHG) ilavesiyle artırılabilir. Çoklu AHG molekülleri, HLA'ya bağlı her bir DSA'ya bağlanır(3).

Akım sitometri yöntemiyle çapraz karşılaştırma

Akımsitometri yöntemi ile çapraz karşılaştırma testi CDC testinden daha duyarlıdır. Alıcı serum verici lenfositlere eklenir. Alıcı serumda DSA varsa, verici T ve B hücrelerinin yüzeyinde HLA moleküllerine bağlanır. Florokrom içeren anti

insan IgG ile inkübasyonunun ardından HLA'ya bağlı anti HLA antikorları akım sitometri cihazı kullanılarak tespit edilebilir. Akım sitometri yöntemiyle çapraz karşılaştırma gücü kontrol numunesinin üzerinde “kanal kayması” sayısı olarak ölçülür(3).

2.5.2. Sanal çapraz karşılaştırma testi

Antikorlar için SA, boncuk temelli akış sitometrik ekranların sonuçları HLA sınıf I ve sınıf II antijenlerine karşı yöneltilen, bir klinik senaryoda hücre bazlı bir eşleşmenin sonucunu tahmin etmek ve bir sanal çapraz eşleşme sonucu elde etmek için 4 basamaklı HLA tiplene teknikleri ile birlikte kullanılabilir. Bir verici antijene bir alıcı antikorun, bireysel nakil programı tarafından kabul edilebilir veya yönetilebilir kabul edilen seviyeden daha büyük bir güce sahip olması durumunda sanal bir çapraz eşleşme pozitif kabul edilir.

Sanal çapraz karşılaştırma, kalp, akciğer ve böbrek transplantasyonundaki alıcılara organ dağıtımının zamanlamasını iyileştirmek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, eksik donör antikor profilleri genellikle bu yaklaşımın doğruluğunu ve güvenilirliğini engeller. Gelecekteki ilerlemelerin katı-faz testindeki bu zorluğu ele alması ve sanal çapraz eşleştirmeden gerçekten pratik olarak faydalanmayı beklemektedir. Önemli olarak, alıcıda anti HLA antikorları bulunmadıkça, sanal çapraz eşleşme analizi, fiziksel bir çapraz eşleşme testinin yerine geçmez (3).

2.6. BK Virüs

İnsan polyomavirüsleri Papovaviridae familyasına ait bir polyomavirüs alt grubudur. İlk polyomavirüs 1952'de keşfedilmiş ve murin K virüsü olarak tanımlanmıştır. Farelere enjekte edildiğinde adenokarsinom ve lösemi gibi tümörlere neden olduğu bulunmuştur (83).

BK Virüs (BKV) ilk olarak Gardner ve arkadaşları tarafından 1971 yılında böbrek nakli yapılmış bir hastanın idrarından, JC Virüs (JVC) ise yine 1971 yılında Padgett ve Walker tarafından progresif multifokal lökoensefalopati (PML) gelişmiş Hodgkin's lenfoma hastasının beyin dokusunun otopsi örneklerinden izole edilmiştir.

Tanımlanan bu virüsler izole edildikleri hastaların isimlerinin baş harfleri kullanılarak adlandırılmıştır (84).

Polyomavirüsler, dairesel çift iplikli DNA genomuna sahip, zarfsız, küçük (40-45 nm) virüslerdir. Bu genom, ~5000 bp'den oluşur ve bunun % 88 protein ve % 12 DNA içerir. Virüs, ikozahedral simetriye sahip 72 viral kapsomer yapısındadır (83). BKV fonksiyonel olarak üç ana bölgeye ayrılır: erken bölge, geç bölge ve transkripsiyonel kontrol bölgesi (Transcriptional Control Region: TCR) Erken bölge enfeksiyonda ve küçük tümör antijeninde (t antijen) rol oynayan büyük tümör antijenini (T antijen) kodlar. Erken bölge DNA replikasyonundan önce kopyalanır. DNA replikasyonu meydana geldikten sonra geç bölge kopyalanır (83) ve bu bölge viral kapsid proteinleri VP1-VP2-VP3 ve agno proteinini kodlar ve son bölge (TCR) hem erken hem de geç bölge gen ekspresyonu için transkripsiyonel kontrol faktörlerini içerir. Viral replikasyon için birincil transkriptler gereklidir, özellikle T-Ag, çift sarmalın gevşemesini ve DNA sentezi için gerekli hücre proteinlerinin alımını desteklerken, izin vermeyen hücrelerde neoplastik transformasyonda rol oynar. Geç transkriptler, viral gen ekspresyonu ve replikasyonunun düzenlenmesinde ve hücre döngüsü ilerlemesi ve DNA onarımı dahil olmak üzere bazı önemli konakçı hücre fonksiyonlarının modülasyonunda kritik bir role sahip olan viral kapsid proteinleri ve agnoproteini kodlamaktadır. TCR, replikasyonun kaynağını içerir ve P, Q, R ve S alfabetik olarak belirlenmiş dört kutuya bölünür. Bu dizi blokları, regülatör bölgeler veya viral transkripsiyonun modülasyonunda rol oynayan birkaç transkripsiyon faktörü bağlanma sahası içerdiğine inanılan güçlendirici elementler olarak işlev görür (85).

İnsan polyomavirüsleri diğer polyomavirüsler ile benzer homolojiler gösterirler. İnsanlarda hastalıklara sebep olan simian polyomavirus (SV40) ile %69-75 arasında benzer DNA homolojisine sahiptir. BK virüsü, JC virüsü ile yaklaşık olarak %70, SV40 ile yaklaşık olarak %75 genom homolojisine sahiptir (83).

İnsanlar yaşamlarının ilk 10 yılında BKV veya JCV ile yada her ikisiyle birden karşılaşmaktadırlar. Polyomavirüsler toplumda yaygın olup, antikor

pozitifliğinin % 70-90 arasında olduğu belirtilmektedir. Ancak bu virüslerin vücuda girişi ile primer enfeksiyonları birbirinden bağımsızdır (84).

Primer BKV enfeksiyonu sıklıkla erken çocukluk döneminde üst solunum yolu enfeksiyonu klinik bulguları ile görülmekte ve genellikle asemptomatik seyretmektedir. Primer enfeksiyon sonrasında virüs ürogenital kanal (84, 86), böbrek epitelyal hücreleri, lenfoid sistem hücreleri ve santral sinir sistemini de içine alan çeşitli dokularda, JC virüs ise B lenfositlerinde latent hâle geçmektedir (84)

Sağlıklı insanda yaşam boyu semptomsuz olarak latent kalan BK ve JC virüsün immünsüpresyon durumunda aktif hâle gelerek enfeksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Ancak BK virüsün sağlıklı insanların %5-20'sinde immünsüpresyon görülmeden kendiliğinden reaktive olabildiği de bildirilmiştir (84).

Toplumlarda 5-9 yaşlarında BKV seropozitifliğinin %70-90; JCV seropozitifliğinin 25 yaşından sonra %50-72 oranında olduğu belirtilmektedir (84). Hastalığın immün sistemi bağışıklanmış kişilerde, üriner traktusta reaktivasyonu %5-10 iken, bu oran immünsuprese hastalarda %20-60'lardadır ve idrarda decoy hücreleri sık gözlenir (86).

Günümüzde BKV'ye özgü T hücre immünitesinin BKV replikasyonunun kontrolünde çok önemli olduğu kanıtlanmıştır (4).HLA, viral enfeksiyonlara karşı oluşan immün yanıtta önemlidir. Viral peptidler, CD8⁺ T hücreleriyle ilişkili olan HLA sınıf-I molekülleriyle sunulur. Bu sunum virüs spesifik hafıza T hücrelerinin oluşmasında etkilidir. HLA sınıf-II molekülleri CD4⁺ T hücreleriyle ilişkide olup efektör T hücre oluşumunda etkilidir. Efektör T hücreleri hem CD8⁺ T hücrelerinin daha etkin hale gelmesini sağlar hem de B hücrelerini virüs spesifik antikor üretimi için uyarır. CD8⁺ T hücreleri birçok virüs enfeksiyonuna karşı oluşan immün yanıtta etkili olmasına rağmen CD4⁺ T hücrelerinde insan BK virüs enfeksiyonunda etkileri gösterilmiştir(5).

BKV enfeksiyonunun seyrini etkileyen insan lökosit antijenlerinin belirlenmesi, hastalarda risklerin belirlenmesine izin verecektir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi nefroloji bölümüne kronik böbrek yetmezliği ile başvuran ve 2010 ve 2018 (Ekim) yılları arasında böbrek nakli olan 232 böbrek nakli alıcı ve vericileri retrospektif olarak yürütülen proje grubuna dahil edilmiştir. Bu hastalara ve vericilerine merkezimizde nakil öncesi HLA A, B ve DR lokusları ve nakil sonrası klinik olarak şüphelenilen hastalara ise BK virüs testi rutin olarak çalışılmıştır. Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmıştır (Proje no: KA18/296). Çalışma verileri SPSS istatistik programı kullanılarak ki-kare yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.1. HLA -A, -B, -DR Doku Tipleme Testi

HLA -A, -B, -DR doku tipleme testi moleküler olarak PCR temelli olan SSO ve SSP olmak üzere 2 farklı yöntemle çalışılmıştır.

3.1.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için hasta ve vericilerine ait kan örnekleri EDTA'lı kan tüpüne alınmıştır. Kadaverik vericilerde tam kan örneğinin olmadığı koşullarda vericiye ait dalak örneğinden izole edilen lenfositten DNA izolasyonu yapılmıştır.

DNA izolasyonu otomatize GENO-VISION GENO MTM-6 cihazında yapılmaktadır. Bunun için ticari olarak temin edilen EZ1 DNA Blood 200 µl Kit (QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA) kullanılmıştır.

Bu cihaz özel bir kart sistemiyle çalışır. Kartın değiştirilmesi durumunda virüs ya da bakteri izolasyonu da yapmak mümkündür. Çalışmanın yapılması için iki ayrı çalışma tablasına uygun tüplerin ve kartuşun yerleştirilmesi ile olur. Bunun için cihaz açılmadan cihazın kabini açılır ve tablalar dışarı alınır ve aşağıdaki adımlar uygulanır.

1. Cihaz arkasındaki “POWER” düğmesinden açılır. Açılır açılmaz çalışmaya hazırdır.
2. Cihazın kartuş tablasına hasta sayısı kadar DNA izolasyon kartuşu yerleştirilir.
3. Cihazın tüp tablasının
 - 1. sırasına 1,5 ml'lik steril elution tüpleri yerleştirilir.
 - 2. sırasına tip holder ve içine filter tip yerleştirilir.
 - 3. sırası mutlaka boş bırakılmalıdır.
 - 4. sırasına 2 ml'lik ependorf tüpler yerleştirilir.
4. 2ml'lik ependorf tüplere 200 µl hasta tam kanı eklenir.
5. Cihaz kabini kapatılır.
6. Ekrandaki yönergeleri takip ederek uygun protokol seçilir.
7. DNA izolasyonu 16 dakika sürer.
8. İzolasyon bittiğinde 1. sıradaki elution tüplerde hasta DNAları bulunur.



Resim 3.1.: DNA izolasyonu aşaması

Elde edilen DNAların ölçümü Maestrogen Nano marka otomatik spektrofometre cihazı ile yapılır ve 1,6 ng / μ L - 2,0 ng / μ L referans aralığında ve DNA konsantrasyonu 200 ng/ μ l olan DNA örnekleri çalışmaya alınır.

İzole edilen DNA örnekleri çalışma yapılacağı zaman kadar -20 °C dondurucuda etiketlenerek saklanır.

3.1.2. SSP yöntemi ile HLA -A, -B, -DR doku tiplene testi

Bu test için “A-B-DR SSP Combi Tray” (Olerup SSP AB, Stockholm, İSVİÇRE) ticari kiti kullanılmıştır. Kitin içerisinde HLA allellerinin ve insan büyüme hormonu geninin PCR amplifikasyonu için kurutulmuş ve önceden optimize edilmiş diziye özgü primerler içeren 96 kuyuluk plak ve PCR master mix bulunur.

Tablo 3.1.: SSP HLA ABDR kit içeriği

A-B-DR SSP Combi Tray Kit İçeriği		
Primer plak	96 kuyu	Kullanıma hazırdır. -18 ile -20 °C'de saklanır.
PCR master mix	312 μ l	Kullanıma hazırdır. -18 ile -20 °C'de saklanır.

1. DNA Amplikasyonu (PCR)
 - 1.1. Hazırlık aşaması
 - 1.1.1. İzole edilen DNA örnekleri -20 °C dondurucudan çıkarılarak oda ısısına (20-25 °C) gelmesi sağlanır.
 - 1.1.2. Hasta sayısına göre primer plate, Taq polimeraz ve PCR master mix - 20 °C dondurucudan çıkarılarak oda ısısına (20-25 °C) gelmesi sağlanır.
 - 1.1.3. DNA örnekleri, PCR master mix ve Taq polimeraz buz aküsü üzerinde tutulmalıdır.
 - 1.1.4. Tablo 3.2.'deki miktarlara göre PCR master mix içerisine Taq polimeraz, distile su ve DNA eklenerek vortekslenir.

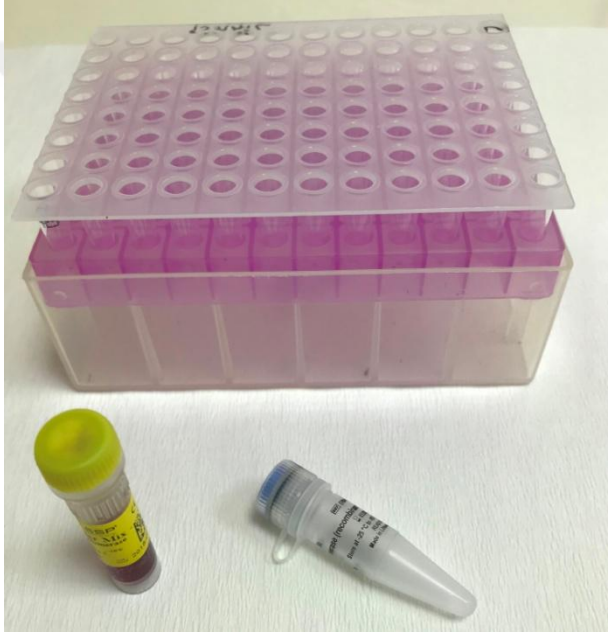
Tablo 3.2.: SSP master mix hazırlama tablosu

HLA-SSP OLERUP PCR Kiti	Master Mix (μ l)	Taq Polimeraz (μ l)	dH ₂ O (μ l)	DNA (μ l)
HLA-ABDR	312	8,3	506	206

1.2. Ekim aşaması

1.2.1. Hazırlanan master mix karışımından tüm kuyulara 10 μ l pipetlenir.

1.2.2. PCR plak ısıya dayanıklı kapaticıyla kapatılır.



Resim 3.2.: SSP ekim aşaması

1.3. PCR aşaması

1.3.1. PCR plak “Thermal Cycler PCR” cihazına yerleştirilir.



Resim 3.3.: PCR cihazına yerleştirme

1.3.2. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda tablo 3.3.'e göre hazırlanan SSP programı başlatılır.

1.3.3. Program 1 saat 20 dakika sürer.

Tablo 3.3.: SSP PCR döngüsü

Basamak	Isı	İnkübasyon süresi	Döngü
1	94 °C	2 dk.	1
2	94 °C	10 sn.	10
	65 °C	60 sn.	
3	94 °C	10 sn.	20
	61 °C	50 sn.	
4	72 °C	45 sn.	1
5	4 °C	∞	1

1.4. Elektroforez aşaması

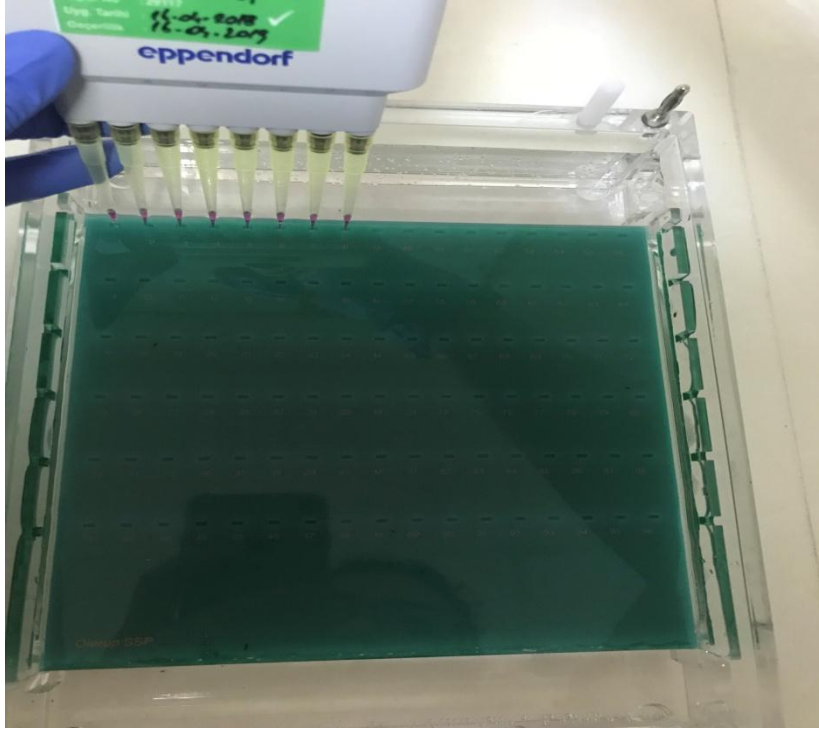
PCR aşamasından sonra çoğalan PCR ürünü Agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yürütülür.

1.4.1. 50 ml 10x Tris Buffer EDTA (TBE)'ya, 950 ml distile su ilave edilir. 0,5x TBE elde edilir.

1.4.2. Hassas terazi kullanılarak 2 gr. agaroz tartılır.

1.4.3. 0,5x TBE'de %2'lik agaroz ile jel için karışım hazırlanır (2gr. Agaroz + 100ml 0,5x TBE).

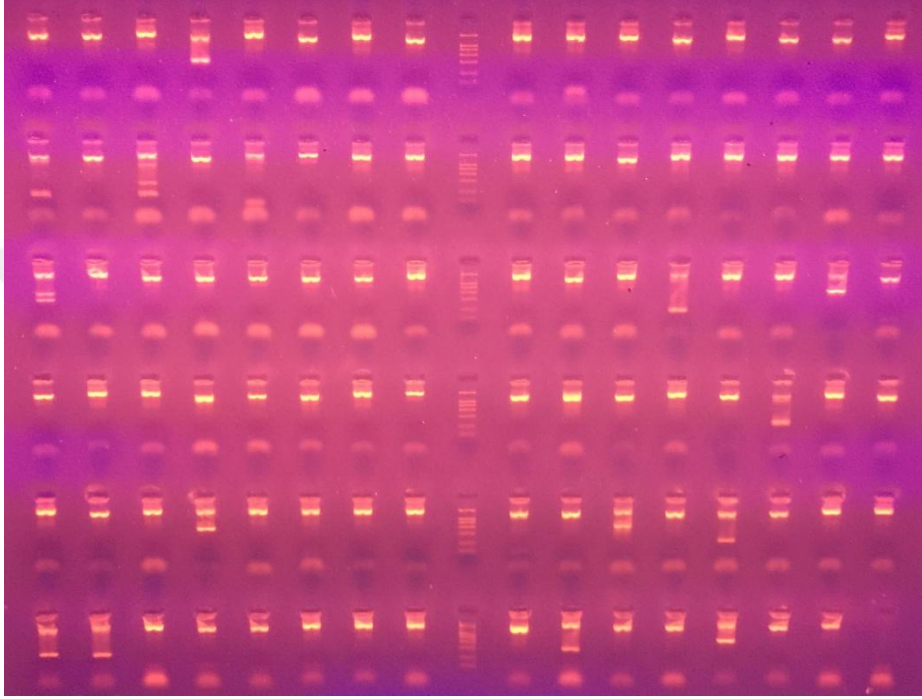
- 1.4.4. Jel tepsinin tarafları yerleştirilerek hazır hale getirilir.
- 1.4.5. Hazırlanan agaroz karışımı mikrodalga fırında 35 W'da 5 dakika eritilir.
- 1.4.6. Sıvı haldeki agarozu 4 damla Gel Red eklenir.
- 1.4.7. Karışım jel tepsisine dökülür.
- 1.4.8. 15 dakika beklenerek agarozun katılaşıp jel haline gelmesi beklenir.
- 1.4.9. Jel hazır olduktan sonra içerisinde 0,5x TBE solüsyonu bulunan elektroforeze bağlı kuvvet içerisinde yerleştirilerek tarafları çıkarılır.
- 1.5. Agaroz jele PCR ürünlerinin yüklenmesi
- 1.5.1. PCR ürünleri jelde kendileri için oluşturulan kuyulara, her kuyuya 10 µl olacak şekilde yüklenir.



Resim 3.4.: Jele yükleme aşaması

- 1.5.2. Uygun kuyulara 10 µl DNA Size Marker yüklenir.
- 1.5.3. 0,5x TBE Buffer içerisinde 160 Volt'ta 16 dakika yürütülür.
- 1.6. Görüntüleme aşaması
- 1.6.1. Süre sonunda agaroz jel UV transluminatöre konur.

- 1.6.2. UV ışık altında ilgili bölgelerde çoğalan pozitif olarak değerlendirilen DNA bantları görüntülenir.
- 1.6.3. Saptanan pozitif bantlar kit içinden çıkan değerlendirme formu kullanılarak veya üretici firmanın kurduğu SCORE software programı kullanılarak değerlendirilmesi yapılır.



Resim 3.5.: HLA ABDR SSP jel görüntüsü

3.1.3. SSO yöntemi ile HLA -A, -B, -DR doku tiplene testi

HLA -A, -B, -DR testi için; LIFECODES HLA-AeRES SSO TYPING KIT, LIFECODES HLA-B eRES SSO TYPING KIT, LIFECODES HLA-DRB1 eRES SSO TYPING KIT (IMMUCOR, Dreieich, ALMANYA) ticari kitleri kullanılmıştır.

Tablo 3.4.: SSO HLA A kit içeriği

LIFECODES HLA-A eRES SSO Typing Kit İçeriği		
HLA-A Master Mix	870 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de saklanır.
HLA-A Probe Mix	810 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de, karanlıkta saklanır.
HLA-A eRES Probe Mix	810 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de, karanlıkta saklanır.
Seyreltme solüsyonu	19,7 ml	Kullanıma hazırdır. 18 ile 30 °C’ de saklanır.
Taq polymerase	25 µl	-10 ile -30 °C’de saklanır.

Tablo 3.5.: SSO HLA B kit içeriği

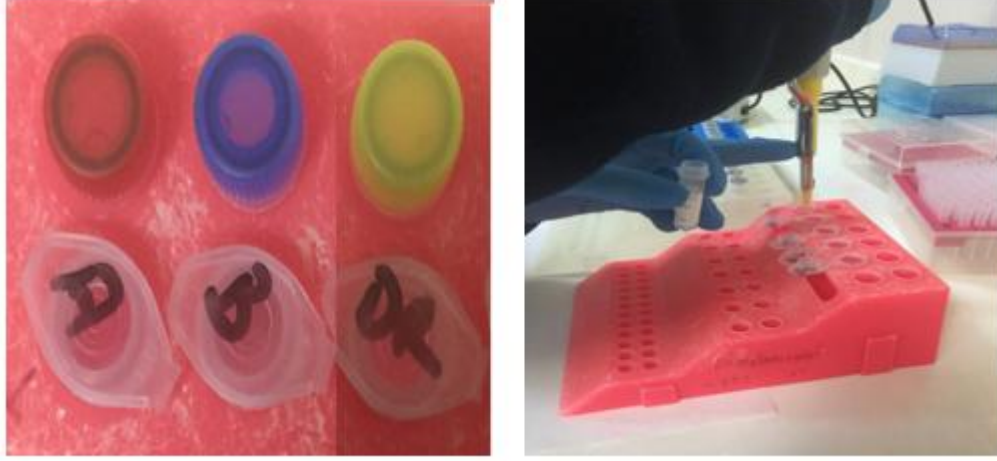
LIFECODES HLA-B eRES SSO Typing Kit İçeriği		
HLA-B Master Mix	870 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de saklanır.
HLA-B Probe Mix	810 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de, karanlıkta saklanır.
HLA-B eRES Probe Mix	810 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de, karanlıkta saklanır.
Seyreltme solüsyonu	19,7 ml	Kullanıma hazırdır. 18 ile 30 °C’ de saklanır.
Taq polymerase	25 µl	-10 ile -30 °C’de saklanır.

Tablo 3.6.: SSO HLA DRB1 kit içeriği

IFECODES HLA-DRB1 eRES SSO Typing Kit İçeriği		
HLA-DRB1 Master Mix	870 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de saklanır.
HLA-DRB1 Probe Mix	810 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de, karanlıkta saklanır.
HLA-DRB1 eRES Probe Mix	810 µl	Kullanıma hazırdır. 2 ile 8 °C’de, karanlıkta saklanır.
Seyreltme solüsyonu	19,7 ml	Kullanıma hazırdır. 18 ile 30 °C’ de saklanır.
Taq polymerase	25 µl	-10 ile -30 °C’de saklanır.

1. DNA çoğaltılması (PCR)
 - 1.1. Hazırlık aşaması

- 1.1.1. İzole edilen DNA örnekleri -20°C dondurucudan çıkarılarak oda ısısına ($20-25^{\circ}\text{C}$) gelmesi sağlanır.
- 1.1.2. Taq polimeraz ve master mix -20°C dondurucudan çıkarılarak oda ısısına ($20-25^{\circ}\text{C}$) gelmesi sağlanır.
- 1.1.3. DNA örnekleri, master mix ve Taq polimeraz buz aküsü üzerinde tutulmalıdır.
- 1.1.4. Tablo 3.7.'ye göre n (test sayısı) + 1 olacak şekilde çalışılacak örnek sayısına göre HLA -A, -B ve -DRB1 lokusları için ayrı ayrı master mix, Taq polimeraz ve distile su ile reaktif hazırlanır.



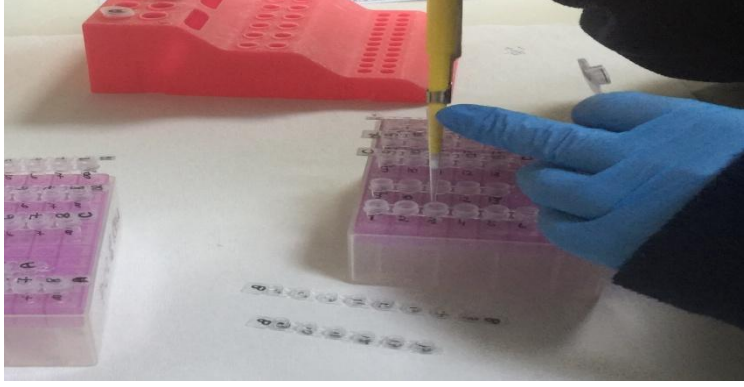
Resim 3.6.: Master mix hazırlama aşaması

- 1.1.5. Hazırlanan reaktif vortekslenir.

Tablo 3.7.: SSO master mix hazırlama tablosu

SSO Typing Kit	Master Mix (μl)	Taq Polimeraz (μl)	dH ₂ O (μl)	Toplam (μl)
HLA-A	6	0,2	10	16,2
HLA-B	6	0,2	10	16,2
HLA-DR	6	0,2	10	16,2

- 1.2. Ekim aşaması
 - 1.2.1. 0,2 ml'lik PCR tüplerine 4 μl DNA pipetlenir.
 - 1.2.2. HLA -A, -B ve -DRB1 lokusları için ayrı olarak hazırlanan reaktiflerden ilgili PCR tüplerine 16 μl pipetlenir.



Resim 3.7.: Ekim aşaması

- 1.2.3. PCR tüplerinin kapakları kapatılır.
- 1.2.4. PCR tüpleri vortekslenir.
- 1.3. PCR aşaması
 - 1.3.1. PCR tüpleri “Thermal Cycler PCR” cihazına yerleştirilir.
 - 1.3.2. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda Tablo 3.8.'e göre hazırlanan ve 1. aşama olan SSO PCR amplifikasyon programı başlatılır.
 - 1.3.3. Program 1 saat 38 dakika sürer.

Tablo 3.8.: SSO amplifikasyon PCR döngüsü

Basamak	Isı	İnkübasyon süresi	Döngü
1	95 °C	3 dk.	1
2	95 °C	15 sn.	12
	60 °C	30 sn.	
	72 °C	10 sn.	
3	95 °C	10 sn.	28
	63 °C	30 sn.	
	72 °C	30 sn.	
4	72 °C	2 dk.	1
5	4 °C	∞	1

- 1.4. Agaroz Jel Elektroforezi aşaması

Hibridizasyon aşaması öncesi örneklerin çoğaldığından emin olmak için agaroz jel elektroforezi yapılır.

- 1.4.1. 50 ml 10x Tris Buffer EDTA (TBE)'ya, 950 ml distile su ilave edilir. 0,5xTBE elde edilir.
- 1.4.2. Hassas terazi kullanılarak 2 gr. agaroz tartılır.
- 1.4.3. 0,5x TBE'de %2'lik agaroz ile jel için karışım hazırlanır (2gr. Agaroz + 100ml 0,5x TBE).
- 1.4.4. Jel tepsinin tarafları yerleştirilerek hazır hale getirilir.
- 1.4.5. Hazırlanan agaroz karışımı mikrodalga fırında 35 W da 5 dakika eritilir.
- 1.4.6. Sıvı haldeki agarozu 4 damla Gel Red eklenir.
- 1.4.7. Karışım jel tepsinine dökülür.
- 1.4.8. 15 dakika beklenerek agarozun katılaşıp jel haline gelmesi beklenir.
- 1.4.9. Jel hazır olduktan sonra içerisinde 0,5xTBE solüsyonu bulunan elektroforeze bağlı kuvvet içerisinde yerleştirilerek tarafları çıkarılır.
- 1.4.10. PCR ürünleri jelde kendileri için oluşturulan kuyulara, her kuyuya 10 µl olacak şekilde yüklenir.
- 1.4.11. Uygun kuyulara 10 µl DNA Size Marker yüklenir.
- 1.4.12. 0,5x TBE Buffer içerisinde 160 Volt'ta 16 dakika yürütülür.
- 1.4.13. Süre sonunda agaroz jel UV transluminatöre konur.
- 1.4.14. UV ışık altında amplifiye olan DNA örnekleri görüntülenir.

- 1.5. Hibridizasyon aşaması
- 1.5.1. 96 kuyuluk costar plate'e 5 µl PCR ürünleri pipetlenir.
- 1.5.2. HLA A, B ve DRB1 lokuslarına özgü Probe mix kuru ısı bloğunda 56 °C'de 10 dakika ısıtılır.
- 1.5.3. Ardından 15 saniye sonikatöre konur ve süre sonunda vortekslenir.
- 1.5.4. Her bir Probe mix kendi lokus spesifik PCR ürününe 15 µl pipetlenir.



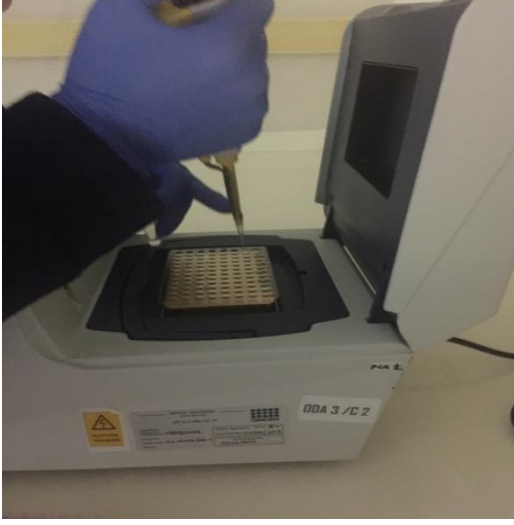
Resim 3.8.: Hibridizasyon aşaması

- 1.5.5. Costar plate'in üzeri ısıya dayanıklı kapatici ile kapatılır.
- 1.6. PCR aşaması
 - 1.6.1. Costar Plate Thermal Cycler PCR cihazına yerleştirilir.
 - 1.6.2. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda tablo 3.9.'a göre hazırlanan ve 2. aşama olan SSO PCR hibridizasyon programı başlatılır.

Tablo 3.9.:SSO hibridizasyon PCR döngüsü

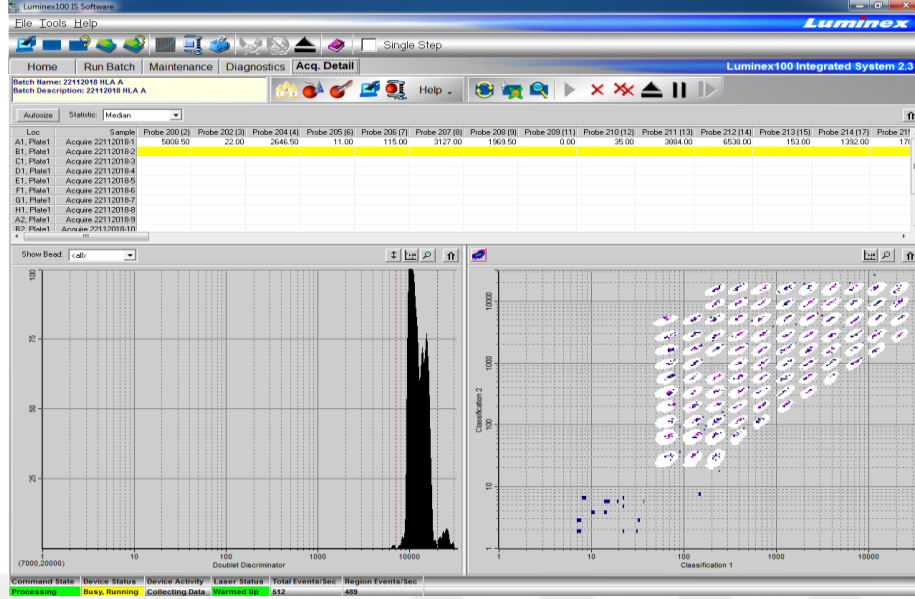
Basamak	Isı	İnkübasyon süresi	Döngü
1	97 °C	2 dk.	1
2	47 °C	10 dk.	1
3	56 °C	8 dk.	1
4	56 °C	∞	1

- 1.7. Stretavidin Aşaması
 - 1.7.1. Örneklerin hibridizasyonu sırasında kuyu sayısına göre 200:1 seyreltilmiş Stretavidin karışımı hazırlanır. (Her kuyu için = 170 µl seyreltme solusyonu + 0.85 µl 1 mg/ml Stretavidin [n+1 toplam hacimde])
 - 1.7.2. Hazırlanan karışım karanlıkta ve oda ısısında saklanır.
 - 1.7.3. Hibridizasyonun 56 °C sonsuz aşamasında, PCR'in kapağı açılır, plate üzerindeki silikon yapışkan kapatici dikkatlice çıkarılır.



Resim 3.9.: Streptavidin aşaması

- 1.7.4. Hazırlanan karışımdan her bir kuyuya 170 μ l eklenir.
- 1.7.5. Tüm kuyular 5 dakika içinde seyreltilmelidir.
- 1.8. LUMINEX aşaması
 - 1.8.1. Luminex cihazı hibridizasyon aşamasının başında açılarak 30 dakika ısınması sağlanır.
 - 1.8.2. Streptavidin pipetlendikten sonra costar plate dikkatlice PCR cihazından alınır.
 - 1.8.3. Luminex cihazına verilen costar plate üretici firmanın talimatları doğrultusunda okutulur.



Resim 3.10.: Luminex cihazında okutma aşaması

1.8.4. MATCH IT DNA software programında HLA doku tiplene analizi yapılır.

3.2. Real Time PCR Yöntemiyle Kantitatif BK Virüs Testi

Bu test hastaların kan ve / veya idrar örneklerinden çalışılabilir.

3.2.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu otomatize EZ1 Advanced XL cihazında yapılmaktadır. Bunun için ticari olarak temin edilen EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA) kullanılır.

DNA izolasyonu için nakil sonrası alıcılardan alınan EDTA lı tam kan örneklerinden ve / veya idrardan elde edilir.

1. Hazırlık aşaması

1.1. EDTA'lı tam kan örnekleri 4000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek plazması elde edilir. İdrar herhangi bir ön işleme gerek duyulmadan kullanılır.

- 1.2. Cihaz arkasındaki “POWER” düğmesinden açılır. Açılır açılmaz çalışmaya hazırdır.
- 1.3. Cihazın kartuş tablasına hasta sayısı kadar BK Virüs kartuşu yerleştirilir.
- 1.4. Cihazın tüp tablasının
 - 1. sırasına 1,5 ml’lik steril elution tüpleri yerleştirilir.
 - 2. sırasına tip holderve içine filter tip yerleştirilir.
 - 3. sırasına 1,5 ml’lik ependorf tüpler yerleştirilir.
 - 4. sırasına 2 ml’lik ependorf tüpler yerleştirilir.
- 1.5. 2 ml’lik ependorf tüplere 400 µl hasta örneği eklenir.
- 1.6. 1,5 ml’lik ependorf tüplere ise 50µl AVE, 6µl internal kontrol ve 4µl carrier RNA ilave edilir.
- 1.7. Cihaz kabini kapatılır.EZ1 Advanced Virus Card v2.0 cihaza yerleştirilir.



Resim 3.11.: DNA izolasyon cihazı

- 1.8. Ekrandaki yönergeleri takip ederek uygun protokol seçilir (400 µl örnek ve 60 µl eluat).
- 1.9. Protokolü başlat seçilir.

1.10. DNA izolasyonu 43 dakika sürer

1.11. İzolasyon bittiğinde 1. sıradaki elution tüplerde BK Virüs DNAları bulunur.

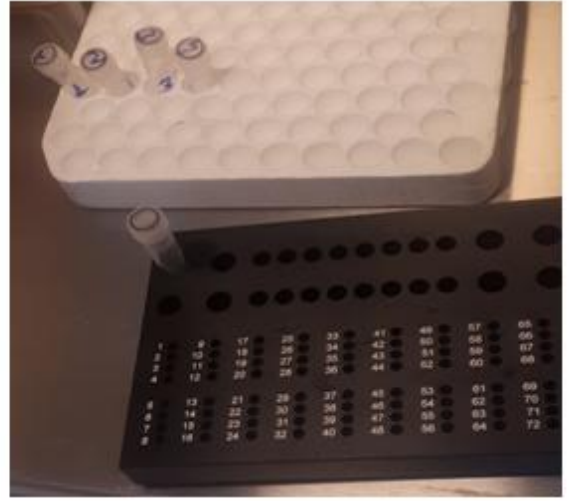
3.2.2. BK virüs testi

İnsan plazma veya idrarında BK virüsü DNA'sının kantitasyonu saptamak için ticari olarak temin edilen “artus BK Virüsü PCR Kiti” (QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA) kullanılır.

Tablo 3.10.: BK Virüs RG PCR Kit İçeriği

BK Virüs RG PCR Kit İçeriği		
BK Virüsü RG Master	8 x 12 reaksiyon	Kullanıma hazırdır. -15 ile -30 °C'de saklanır.
BK Virüsü RG Magnzyum solvent	400 µl	Kullanıma hazırdır. -15 ile -30 °C'de saklanır.
BK Virüsü RG QS1 (1 x 104 kopya/µl)	200 µl	Kullanıma hazırdır. -15 ile -30 °C'de saklanır.
BK Virüsü RG QS2 (1 x 103 kopya/µl)	200 µl	Kullanıma hazırdır. -15 ile -30 °C'de saklanır.
BK Virüsü RG QS3 (1 x 102 kopya/µl)	200 µl	Kullanıma hazırdır. -15 ile -30 °C'de saklanır.
BK Virüsü RG QS4 (1 x 101 kopya/µl)	200 µl	Kullanıma hazırdır. -15 ile -30 °C'de saklanır.
BK Virüsü RG IC	2 x 1000 µl	Kullanıma hazırdır. -15 ile -30 °C'de saklanır.

1. Çalışılacak hasta sayısı, 4 kantitasyon standardı ve negatif kontrol için 0,1 ml'lik PCR tüpleri soğutma bloğunun adaptörlerine yerleştirilir.
 - 1.1. Tablo 3.11.'e göre n (test sayısı) + 1 olacak şekilde çalışılacak örnek sayısına göre reaktif hazırlanır.

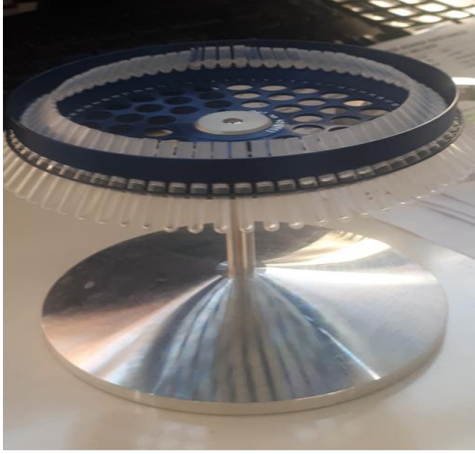


Resim 3.12.: BK virüs master mix aşaması

Tablo 3.11.: BK Virüs master mix tablosu

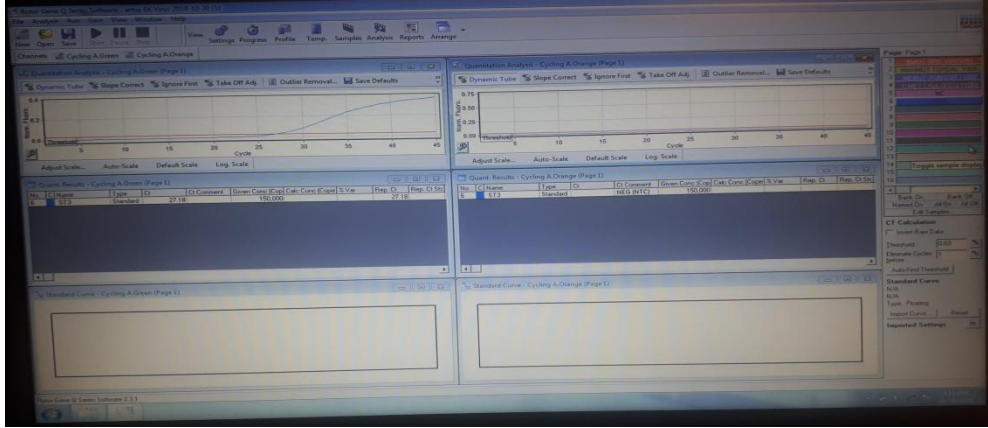
BK Virüs	RG PCR Kiti	RG Master (μ l)	RG Magnzyum Solvent (μ l)	Toplam (μ l)
BK Virüs		14	6	20

- 1.2. Hasta tüplerine ilgili DNA dan 30 μ l pipetlenir.
- 1.3. Standartlarının her birinden ilgili tüplere 15 μ l pipetlenir.
- 1.4. Hazırlanan reaktiften her kuyuya 20 μ l pipetlenir.
- 1.5. Standartlara 2 μ l internal kontrol eklenir.
- 1.6. Tüplerin kapakları kapatılır.
- 1.7. Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazı açılır.
- 1.8. PCR tüpleri rotora yerleştirilir.
- 1.9. Kilitleme halkası tüplerin çalışma sırasında yanlışlıkla açılmasını önlemek üzere rotorun üstüne yerleştirilir.



Resim 3.13.: Real time PCR aşaması

- 1.10. Cihazın kapağı kapatılır.
- 1.11. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda test okutulur.
- 1.12. Okutma sonrasında üretici firmanın kurduğu software programında değerlendirmesi yapılır.



Resim 3.14.: Software programında analiz aşaması

4. BULGULAR

Çalışma grubuna alınan 232 kronik böbrek hastasına nakil öncesi HLA -A, -B ve -DRB1 doku tiplemesi çalışılmıştır. Bu hastaların nakil sonrası plazma ve / veya idrarda BKV testleri çalışılmıştır. Plazma örneğinden BKV testi çalışılan hastalarda, 161 hastada BKV negatif (-), 70 hastada ise BKV pozitif (+) bulunmuştur. İdrar örneğinden BKV testi çalışılan hastalarda, 62 hastada BKV (-), 28 hastada ise BKV (+) bulunmuştur. 232 hastanın plazma ve idrardan çalışılan BKV sonucu birlikte değerlendirildiğinde ise 146 hastada BKV (-), 86 hastada ise BKV (+) çıkmıştır.

Tablo 4.1.: Hastaların plazma örnekleri ile çalışılan BKV testi sonuçları

Plazma	n	%
BKV (-)	161	69,7
BKV (+)	70	30,3

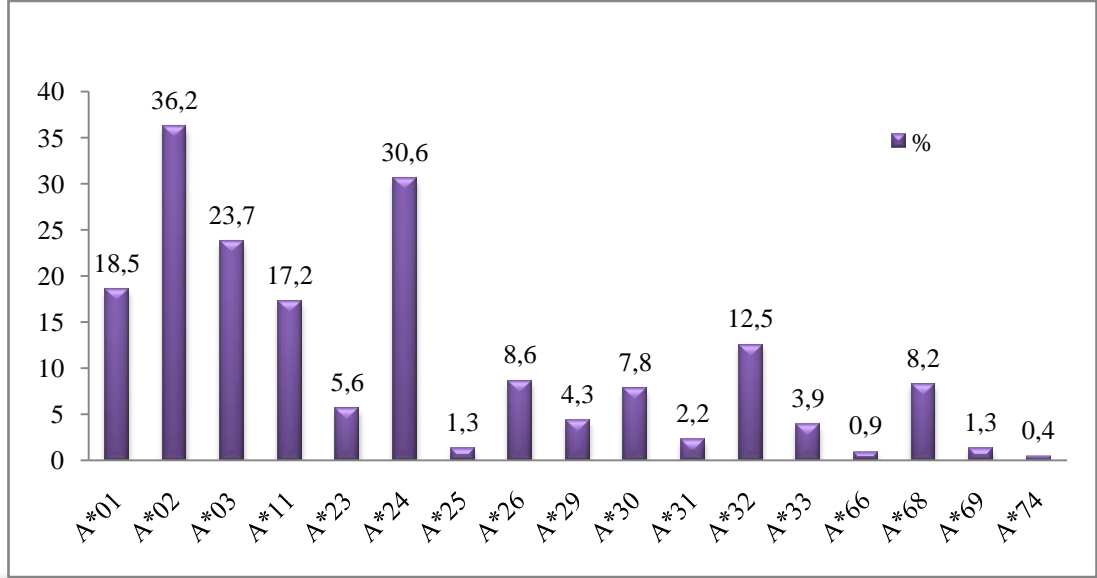
Tablo 4.2.: Hastaların idrar örnekleri ile çalışılan BKV testi sonuçları

İdrar	n	%
BKV (-)	62	68,89
BKV (+)	28	31,11

Tablo 4.3.: Hastaların plazma ve idrar örnekleri ile çalışılan BKV testi sonuçları

Plazma ve İdrar	n	%
BKV (-)	146	62,94
BKV (+)	86	37,06

Hastalara çalışılan HLA doku tipleme testine göre hastaların sahip oldukları HLA A allellerinin yüzde dağılımı grafik 4.1.'de verilmiştir. 232 hastada en sık HLA A*02 (% 36,2 oranında) görülürken, en az HLA A*74 (% 0,4 oranında) görülmüştür.



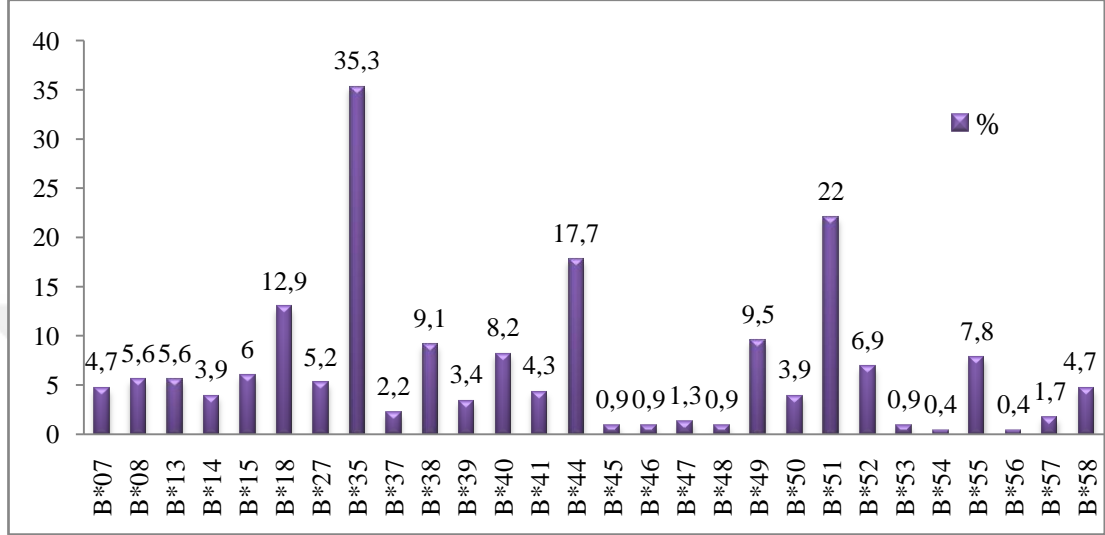
Grafik 4.1.: Hastalara ait HLA A yüzdeleri

HLA A allelleri ile BKV varlığı karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Ayrıntılı sonuçlar tablo 4.4.'te verilmiştir.

Tablo 4.4.: Hastalara ait HLA A ve BKV sonuçları

HLA A	BKV (-)		BKV (+)		p
	n	%	n	%	
A*01	32	21,9	11	12,8	0,12
A*02	49	33,6	35	40,7	0,341
A*03	33	22,6	22	25,6	0,722
A*11	25	17,1	15	17,4	0,905
A*23	8	5,5	5	5,8	0,849
A*24	46	31,5	25	29,1	0,893
A*25	1	0,7	2	2,3	0,64
A*26	15	10,3	5	5,8	0,354
A*29	5	3,4	5	5,8	0,595
A*30	14	9,6	4	4,7	0,269
A*31	3	2,1	2	2,3	0,741
A*32	15	10,3	14	16,3	0,258
A*33	5	3,4	4	4,7	0,909
A*66	0	0	2	2,3	0,264
A*68	11	7,5	8	9,3	0,821
A*69	3	2,1	0	0	0,461
A*74	0	0	1	1,2	0,788

Hastalara çalışılan HLA doku tiplene testine göre hastaların sahip oldukları HLA B allellerinin yüzde dağılımı grafik 4.2.'de verilmiştir. 232 hastada en sık HLA B*35 (% 35,3 oranında) görülürken, en az HLA B*54 ve HLA B*56 (% 0,4 oranında) görülmüştür.



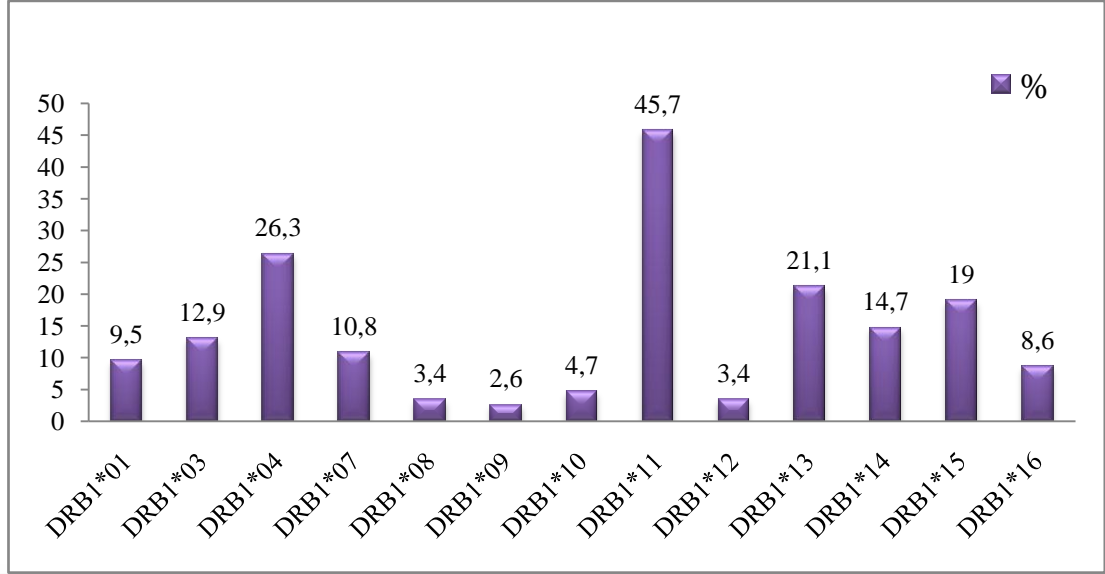
Grafik 4.2.: Hastalara ait HLA B yüzdeleri

HLA B allelleri ile BKV varlığı karşılaştırıldığında HLA B*13 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. HLA B*13 koruyucu faktör olarak düşünülebilir. HLA B*13 alleleline sahip hastalarda BKV(-) % 8,2 iken BKV(+) % 1,2'dir. Yapılan istatistiksel analizde p-değeri: 0,049 iken OR değeri: 0.131 ve 95% CI aralığı ise 0.017-1.029'dur. Ayrıntılı sonuçlar tablo 4.5.'te belirtilmiştir.

Tablo 4.5.: Hastalara ait HLA B ve BKV sonuçları

HLA B	BKV (-)		BKV (+)		P
	n	%	n	%	
B*07	7	4,8	4	4,7	0,787
B*08	5	3,4	8	9,3	0,113
B*13	12	8,2	1	1,2	0,049**
B*14	7	4,8	2	2,3	0,556
B*15	9	6,2	5	5,8	0,86
B*18	18	12,3	12	14	0,876
B*27	6	4,1	6	7	0,518
B*35	48	32,9	34	39,5	0,377
B*37	2	1,4	3	3,5	0,545
B*38	16	11	5	5,8	0,279
B*39	4	2,7	4	4,7	0,69
B*40	12	8,2	7	8,1	0,821
B*41	6	4,1	4	4,7	0,89
B*44	28	19,2	13	15,1	0,545
B*45	1	0,7	1	1,2	0,722
B*46	1	0,7	1	1,2	0,722
B*47	2	1,4	1	1,2	0,64
B*48	1	0,7	1	1,2	0,722
B*49	11	7,5	11	12,8	0,276
B*50	5	3,4	4	4,7	0,909
B*51	33	22,6	18	20,9	0,893
B*52	9	6,2	7	8,1	0,76
B*53	2	1,4	0	0	0,722
B*54	1	0,7	0	0	0,788
B*55	13	8,9	5	5,8	0,551
B*56	1	0,7	0	0	0,788
B*57	3	2,1	1	1,2	0,741
B*58	8	5,5	3	3,5	0,712

Hastalara çalışılan HLA doku tipleme testine göre hastaların sahip oldukları HLA DRB1 allellerinin yüzde dağılımı grafik 4.3.'te verilmiştir. 232 hastada HLA en sık DRB1*11 (% 45,7 oranında) görülürken en az HLA DRB1*09 (% 2,6 oranında) görülmüştür.



Grafik 4.3.: Hastalara ait HLA DRB1 yüzdeleri

HLA DRB1 allelleri ile BKV varlığı karşılaştırıldığında HLA DRB1*03 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. HLA DRB1*03 risk faktörü olarak düşünülebilir. HLA DRB1*03 alleleline sahip hastalarda BKV(-) % 8,9 iken BKV(+) % 19,8'dir. Yapılan istatistiksel analizde p-değeri: 0,029 iken OR değeri: 2.521 ve 95% CI aralığı ise 1.157-5.490'dır. Ayrıntılı sonuçlar tablo 4.6.'da belirtilmiştir.

Tablo 4.6.: Hastalara ait HLA DRB1 ve BKV sonuçları

HLA DRB1	BKV (-)		BKV (+)		p
	n	%	n	%	
DRB1*01	15	10,3	7	8,1	0,761
DRB1*03	13	8,9	17	19,8	0,029**
DRB1*04	37	25,3	24	27,9	0,784
DRB1*07	18	12,3	7	8,1	0,438
DRB1*08	4	2,7	4	4,7	0,39
DRB1*09	5	3,4	1	1,2	0,534
DRB1*10	8	5,5	3	3,5	0,712
DRB1*11	73	50	33	38,4	0,113
DRB1*12	5	3,4	3	3,5	0,729
DRB1*13	26	17,8	23	26,7	0,148
DRB1*14	24	16,4	10	11,6	0,418
DRB1*15	23	15,8	21	24,4	0,146
DRB1*16	12	8,2	8	9,3	0,964

BKV reaktivasyonları cinsiyet bakımından karşılaştırıldığında kadın ve erkek cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p-değeri: 0,598).

Tablo 4.7.: BKV’de cinsiyete göre ilişki

CİNSİYET	BKV (-)		BKV (+)	
	n	%	n	%
ERKEK	98	64,47	54	35,53
KADIN	48	60	32	40

BKV reaktivasyonlarına bakılarak verici tipi incelendiğinde ise canlı verici ile kadaverik verici arasında bir fark görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p-değeri: 0,111).

Tablo 4.8.: BKV'de verici tipine göre ilişki

VERİCİ TİPİ	BKV (-)		BKV (+)	
	n	%	n	%
CANLI	106	68,83	53	31,17
KADAVERİK	40	54,8	33	45,2

BKV reaktivasyonları yaş grubu bakımından karşılaştırıldığında erişkin ve pediatri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p-değeri: 454).

Tablo 4.9.: BKV'de yaş grubuna göre ilişki

YAŞ GRUBU	BKV (-)		BKV (+)	
	n	%	n	%
PEDİATRİ	33	57,9	24	42,1
ERİŞKİN	113	64,57	62	35,43

BKV reaktivasyonları ve nakil öncesi alıcı verici HLA uyumlarına bakıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmesi de HLA uyumu arttıkça BKV pozitifliğinin azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıntılı sonuçlar tablo 4.10.'da belirtilmiştir.

Tablo 4.10.: BKV'de HLA uyumuna göre ilişki

HLA UYUMU	BKV (-)		BKV (+)	
	n	%	n	%
0/6 UYUM	0	0	2	100
1/6 UYUM	14	50	14	50
2/6 UYUM	30	58,82	21	41,18
3/6 UYUM	72	68,57	33	31,43
4/6 UYUM	18	66,6	9	33,4
5/6 UYUM	3	100	0	0
6/6 UYUM	9	60	6	40

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda hastaların cinsiyetlerine göre BKV reaktivasyonları incelendiğinde kadın (% 40) ve erkek (% 35,5) cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Ping Li ve arkadaşlarının canlı vericiden nakil olmuş 52 hastada yaptıkları çalışmada kadın ve erkek cinsiyet arasında istatistiksel fark olmadığı belirtilmiştir (87). Hässig ve arkadaşlarının canlı ve/veya kadaverik nakil olmuş 152 hasta ile yaptıkları çalışmada da kadın erkek cinsiyeti açısından istatistiksel fark saptanmadığı görülmektedir (4). Bu çalışmalarla bizim yaptığımız çalışma sonuçları birbirini destekler yöndedir. Bununla birlikte Kosuke Masutani ve arkadaşlarının 198 hastada yaptıkları çalışmada erkek cinsiyetin istatistiksel olarak anlamlı derecede (< 0.001) risk faktörü olabileceğini göstermiştir (5).

Farklılığın çalışılan gruba, çalışmaya dahil edilen hasta sayısına ve tedavi protokolüne göre değişebileceği düşünülebilir.

Böbrek nakilleri için istenilen ağırlıklı olarak kadaverik nakil olmasına rağmen ülkemizde ne yazık ki canlı vericilerden yapılan nakiller daha fazladır. 2008 yılından günümüze kadar yapılan nakillerin yaklaşık % 22'si kadaverik nakildir. Merkezimizde bu sayı ülke geneline göre daha yüksek olup yaklaşık % 32 seviyesindedir. Kadavradan yapılan nakillerde organın soğuk iskemi süresinin uzaması, genellikle doku uyumunun az olması, gibi nedenlerle immünsüpresif tedavi daha farklı planlanmaktadır. BKV reaktivasyonunun immünsüpresyona bağlı olduğu düşünüldüğünde kadaverik nakillerde BKV problemlerini de beklemek doğaldır. Literatüre baktığımızda kadaverik nakillerin, BKV yönünden istatistiksel olarak anlamlı olmasa da şanssız olduğunu görmekteyiz(4, 5, 88). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da (p-değeri: 0,111) kadaverik vericiden yapılan nakillerde BKV reaktivasyonu canlı gönüllü vericiye göre daha fazladır.

Çalışma grubumuz içinde 175 erişkin ve 57 çocuk yaş grubundan hastalar bulunmaktadır. Merkezimiz bulunduğu bölgede en fazla çocuk hasta nakli yapılan merkez olma özelliğindedir. Yapılan değerlendirmede çocuk ve erişkin yaş grubu

arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Literatür taramalarında elde edilen bilgilere göre (4, 88-90) erişkin ve çocuk yaş grubu arasında istatistiksel bir fark olmadığı bildirilmiş olup çalışma bulgularımızla uyumludur.

Organ nakillerinde en önemli faktör nakledilen organın alıcı tarafından yabancı olarak algılanmaması reddedilmemesidir. Vericinin HLA doku grubuyla alıcının HLA doku grubu uyumu ne kadar iyiye rejeksiyon riski o kadar az olur. Ancak her zaman tam ya da iyi sayılabilecek doku grubu uyumunu bulmak mümkün olmaz. Çalışmamızda 0/6 uyumla yapılan iki nakil hastasında da BKV pozitifliği belirlenmiştir. HLA uyumu arttıkça pozitifliğin azaldığı belirlenmiştir. Literatürde sonuçlarımızı destekleyen yayınlar (4, 89) olmakla birlikte HLA uyumsuz nakillerle HLA tam uyumlu ya da yarı uyumlu nakiller arasında istatistiksel fark olmadığını gösteren yayınlar da mevcuttur (90). HLA uyumsuzlukları ve BKV ilişkisini inceleyen çalışmalar, nakil sonrası hücrel ve humoral rejeksiyon varlığını da araştıran aradaki ilişkiyi ortaya koymayı hedefleyen çalışmalardır. Bizim çalışmamızın amacı rejeksiyon varlığından bağımsız olarak HLA allel sıklığı ile BKV reaktivasyonunun ilişkisinin araştırılmasıdır.

Anne ve babadan geçen HLA allel frekansı büyük çaplı toplum taramaları ve çalışılan grupların kökenlerinin de ayrımının yapılabilmesiyle ortaya konmaktadır. Bizim çalışmamızda yer alan hastaların allel sıklıkları daha önce yaptığımız ve çalışmanın yapıldığı bölgeyi yansıtan 4707 kişinin allel sıklığının incelendiği çalışma sonuçlarıyla uyumludur (63).

Böbrek nakli olup BKV nefropatisi gelişen hastalarda sıklıkla immünespresif tedavinin azaltılması yoluna gidilmektedir. Bu bir taraftan BKV nefropatisi için fayda sağlarken diğer taraftan rejeksiyon riskini arttırmaktadır. Literatürde bu alanda sınırlı sayıda çalışma olup bu çalışmalarda BKV'nin, HLAA*02 epitopu ile tanınan, VP-1 ve büyük T (Large T: LT) antijenleri incelenmiştir(91, 92). Daha sonra yapılan çalışmalarda immünojenik antijen tanıma işleminin sadece HLA A*02 ile sınırlı olmayıp, HLA B*07, HLA B*08, HLA DRB1*03, HLA DRB1*09 ve HLA DRB1*13 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (93). Bir başka çalışma HLA A*01, HLA

A*03, HLA A*24 ile bağlanan LT antijen yapısının hem sağlıklı hem de immünsüpresif kontroller tarafından tanınabildiğini göstermiştir (94).

Sınıf-I HLA moleküllerinin sitotoksik CD8⁺T hücre yardımı ile virüslere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda HLA sınıf-I molekülleri içerisinde yer alan HLA B*13 allelinin BKV'ye karşı koruyucu faktör olarak belirlenmesi (p:0,049, OR: 0.131 ve 95% CI:0.017-1.029) bunu desteklemektedir. HLA sınıf-II ise immün sistemin sitokin salgılayarak yardımcı olan CD4⁺T hücreleri ile ilişkilidir. CD4⁺T hücreleri aldıkları uyarılara yanıt olarak hem immün sistemi uyaran hem de baskılayabilen bir rol oynar. Bizim çalışmamızda HLA DRB1*03 allelinin ise (p: 0,029, OR: 2.521 ve 95% CI: 1.157-5.490) BKV'ye karşı risk faktörü olabileceği belirlenmiştir. Bu da HLA DRB*03 alleli taşıyanla böbrek nakli olmuş hastalarda immün yanıtın, BKV yanıtına karşı, baskılayıcı yönde gelişebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda, literatür taramalarımıza göre oldukça az olan, böbrek nakli olan hastalarda HLA allelleri ile BKV ilişkisini araştırmayı hedefledik. Çalışma sonuçlarımız, bizim çalışma grubumuz içinde HLA B*13 allelinin BKV reaktivasyonuna karşı koruyucu, HLA DRB1*03 allelinin ise risk faktörü olabileceğini göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Sethi S, Choi J, Toyoda M. Desensitization: Overcoming the immunologic barriers to transplantation. *Journal of immunology research* 1-11, 2017.
2. Sypek M, Kausman J, Holt S. Hla epitope matching in kidney transplantation: An overview for the general nephrologist. *Am J Kidney Dis* 71: 720-31, 2018.
3. Montgomery RA, Tatapudi VS, Leffell MS. Hla in transplantation. *Nature reviews Nephrology* 14: 558-70, 2018.
4. Hassig A, Roos M, Etter A. Association of BK viremia with human leukocyte antigen mismatches and acute rejection, but not with type of calcineurin inhibitor. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 16: 44-54, 2014.
5. Masutani K, Ninomiya T, Randhawa P. HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of bk viremia. *Nephrol Dial Transplant* 28: 3119-26, 2013.
6. Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: A review. *The Journal of infection* 68 Suppl 1: 2-8, 2014.
7. Hirsch HH, Randhawa P. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 Suppl 4: 179-88, 2013.
8. Mani J, Wang L, Huckelhoven AG. Definition and characterization of novel HLA-A*02-restricted CD8+ T cell epitopes derived from jcv polyomavirus with clinical relevance. *Oncotarget* 8: 2485-500, 2017.
9. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 3: 1-24, 2017.
10. Levin A, SPE, Bilous R.W., Coresh J., De Francisco A.L.M., De Jong P.E., Griffith K.E., Winearls C.G. Kdigo 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* 3: 1-150, 2013.
11. McMahon GM, Waikar SS. Biomarkers in nephrology: Core curriculum 2013. *Am J Kidney Dis* 62: 165-78, 2013.
12. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL. Global prevalence of chronic kidney disease - a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 11: 1-18, 2016.
13. Zhang L, Wang F, Wang L. Prevalence of chronic kidney disease in china: A cross-sectional survey. *The Lancet* 379: 815-22, 2012.
14. Arora P, Vasa P, Brenner D. Prevalence estimates of chronic kidney disease in canada: Results of a nationally representative survey. *CMAJ : Canadian Medical Association journal* 185: 417-23, 2013.
15. White SL, Polkinghorne KR, Atkins RC. Comparison of the prevalence and mortality risk of ckd in australia using the ckd epidemiology collaboration (ckd-epi) and modification of diet in renal disease (mdrd) study gfr estimating equations: The ausdiab (australian diabetes, obesity and lifestyle) study. *Am J Kidney Dis* 55: 660-70, 2010.
16. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *The Lancet* 379: 165-80, 2012.

17. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C. The prevalence of renal failure. Results from the german health interview and examination survey for adults, 2008-2011 (degs1). *Dtsch Arztebl Int* 113: 85-91, 2016.
18. Bruck K, Stel VS, Gambaro G. Ckd prevalence varies across the european general population. *J Am Soc Nephrol* 27: 2135-47, 2016.
19. Fraser SD, Aitken G, Taal MW. Exploration of chronic kidney disease prevalence estimates using new measures of kidney function in the health survey for england. *PLoS One* 10: 1-16, 2015.
20. Suleymanlar G, Utas C, Arinsoy T. A population-based survey of chronic renal disease in turkey--the credit study. *Nephrol Dial Transplant* 26: 1862-71, 2011.
21. Stanifer JW, Muiru A, Jafar TH. Chronic kidney disease in low- and middle-income countries. *Nephrol Dial Transplant* 31: 868-74, 2016.
22. Nitsch D, Grams M, Sang Y. Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: A meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)* 346: 1-14, 2013.
23. Van de Luijngaarden MW, Jager KJ, Segelmark M. Trends in dialysis modality choice and related patient survival in the era-edta registry over a 20-year period. *Nephrol Dial Transplant* 31: 120-8, 2016.
24. Pippias M, Kramer A, Noordzij M. The european renal association - european dialysis and transplant association registry annual report 2014: A summary. *Clin Kidney J* 10: 154-69, 2017.
25. Utaş C. Renal replasman tedavilerinde periton diyalizi. 2014.
26. Türkiye böbrek hastalıkları önleme ve kontrol programı. T.C. Sağlık Bakanlığı Yayın No : 946, Ankara. 2014.
27. Perkovic V, Agarwal R, Fioretto P. Management of patients with diabetes and ckd: Conclusions from a "kidney disease: Improving global outcomes" (kdigo) controversies conference. *Kidney Int* 90: 1175-83, 2016.
28. Rebholz CM, Coresh J, Grams ME. Dietary acid load and incident chronic kidney disease: Results from the aric study. *Am J Nephrol* 42: 427-35, 2015.
29. Asghari G, Farhadnejad H, Mirmiran P. Adherence to the mediterranean diet is associated with reduced risk of incident chronic kidney diseases among tehranian adults. *Hypertens Res* 40: 96-102, 2017.
30. Liu Y, Kuczmarski MF, Miller ER, 3rd. Dietary habits and risk of kidney function decline in an urban population. *J Ren Nutr* 27: 16-25, 2017.
31. Dunkler D, Kohl M, Teo KK. Dietary risk factors for incidence or progression of chronic kidney disease in individuals with type 2 diabetes in the european union. *Nephrol Dial Transplant* 30 Suppl 4: 76-85, 2015.
32. Snelson M, Clarke RE, Coughlan MT. Stirring the pot: Can dietary modification alleviate the burden of ckd? *Nutrients* 9: 1-29, 2017.
33. Smyth A, Griffin M, Yusuf S. Diet and major renal outcomes: A prospective cohort study. The nih-aarp diet and health study. *J Ren Nutr* 26: 288-98, 2016.
34. Rebholz CM, Crews DC, Grams ME. Dash (dietary approaches to stop hypertension) diet and risk of subsequent kidney disease. *Am J Kidney Dis* 68: 853-61, 2016.
35. Dobre M, Rahman M, Hostetter TH. Current status of bicarbonate in ckd. *J Am Soc Nephrol* 26: 515-23, 2015.

36. Banerjee T, Crews DC, Wesson DE. High dietary acid load predicts esrd among adults with ckd. *J Am Soc Nephrol* 26: 1693-700, 2015.
37. Low Birth W, Nephron Number Working G. The impact of kidney development on the life course: A consensus document for action. *Nephron* 136: 3-49, 2017.
38. Levin A, Tonelli M, Bonventre J. Global kidney health 2017 and beyond: A roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *The Lancet* 390: 1888-917, 2017.
39. Türkmen K, Erdur FM, Erikoğlu M. 2003-2011 yılları arasında meram tıp fakültesi organ nakli merkezinde yapılan böbrek nakli olgularının sonuçları *Turk Neph Dial Transpl* 22: 34-44, 2013.
40. Sumida K, Kovesdy CP. Disease trajectories before esrd: Implications for clinical management. *Semin Nephrol* 37: 132-43, 2017.
41. Tordoir J, Canaud B, Haage P. Ebgp on vascular access. *Nephrol Dial Transplant* 22 Suppl 2: 88-117, 2007.
42. Leurs P, Machowska A, Lindholm B. Timing of dialysis initiation: When to start? Which treatment? *J Ren Nutr* 25: 238-41, 2015.
43. Shrestha A, Shrestha A, Basarab-Horwath C. Quality of life following live donor renal transplantation: A single centre experience. *Annals of transplantation* 15: 5-10, 2010.
44. Abramowicz D, Cochat P, Claas FH. European renal best practice guideline on kidney donor and recipient evaluation and perioperative care. *Nephrol Dial Transplant* 30: 1790-7, 2015.
45. Sebillé V, Hardouin JB, Giral M. Prospective, multicenter, controlled study of quality of life, psychological adjustment process and medical outcomes of patients receiving a preemptive kidney transplant compared to a similar population of recipients after a dialysis period of less than three years--the prekit-qol study protocol. *BMC Nephrol* 17: 1-9, 2016.
46. Chang P, Gill J, Dong J. Living donor age and kidney allograft half-life: Implications for living donor paired exchange programs. *Clin J Am Soc Nephrol* 7: 835-41, 2012.
47. Allen PJ, Chadban SJ, Craig JC. Recurrent glomerulonephritis after kidney transplantation: Risk factors and allograft outcomes. *Kidney Int* 92: 461-9, 2017.
48. Deniz MN. Böbrek fizyolojisi. Erişim: (<http://www.jcam.com.tr/files/JCAM-3906.pdf>). Erişim tarihi: 26/01/2019
49. Altınören O, Aydın G, Güngör Ö. Böbrek anatomisi. In: Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ, editors. *Böbrek fizyopatolojisi: 2017*; 2017. p. 1-6.
50. Bertram JF, Douglas-Denton RN, Diouf B. Human nephron number: Implications for health and disease. *Pediatr Nephrol* 26: 1529-33, 2011.
51. Learoyd P. The history of blood transfusion prior to the 20th century--part 2. *Transfus Med* 22: 372-6, 2012.
52. Murray JE, Tilney NL, Wilson RE. Renal transplantation: A twenty-five year experience. *Annals of surgery* 184: 565-73, 1976.
53. Haberal M. Prof. Dr. Mehmet haberal'ın İlkleri. Erişim: (<http://www.mehmethaberal.com.tr/ilkler.php>). Erişim tarihi: 12/01/2019

54. T.C. Sağlık Bakanlığı Organ Ve Doku Nakli Hizmetleri Yönetmeliği. Erişim: (<http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.15860&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=>). Erişim tarihi: 26/01/2019
55. T.C. Sağlık Bakanlığı Transplantasyon, Diyaliz Ve İzlem Sistemleri (Tdis) Hakkında Duyuru. Erişim: (https://organ.saglik.gov.tr/icerikler/DosyaYoneticisi/Belgeler/DuyuruEkleri/TDIS_Duyuru.pdf). Erişim tarihi: 12/01/2019
56. Tdis karar destek sistemi bekleme listesi sayilari Erişim: (<https://organkds.saglik.gov.tr/KamuyaAcikRapor.aspx?q=ORGANBEKLEME>). Erişim tarihi: 26/01/2019
57. Tdis Karar Destek Sistemi Organ Nakli Sayilari. Erişim: (<https://organkds.saglik.gov.tr/KamuyaAcikRapor.aspx?q=ORGANNAKLI>). Erişim tarihi: 26/01/2019
58. Lim WH, Chadban SJ, Clayton P. Human leukocyte antigen mismatches associated with increased risk of rejection, graft failure, and death independent of initial immunosuppression in renal transplant recipients. *Clinical transplantation* 26: 428-37, 2012.
59. Tait BD, Susal C, Gebel HM. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with hla and non-hla antibodies in transplantation. *Transplantation* 95: 19-47, 2013.
60. Dalva K. Her yerde karşında: Nedir bu hla tiplendirimi. XXXI Ulusal Hematoloji Kongresi, IV Hematoloji İlk Basamak Kursu: 23-8, 2004.
61. Trowsdale J. The mhc, disease and selection. *Immunology letters* 137: 1-8, 2011.
62. HLA alleles numbers. Erişim: (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). Erişim tarihi: 26/01/2019
63. Basturk B, Kantaroglu B, Kavuzlu M. The most common hla alleles and anti-hla antibodies to know for virtual cross-match. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 14: 53-5, 2016.
64. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. seventh edition Elsevier Health Sciences; 109-38,2011.
65. Roberts SC. Complexity and context of mhc-correlated mating preferences in wild populations. *Molecular ecology* 18: 3121-3, 2009.
66. Klein J, Sato A. The hla system. First of two parts. *The New England journal of medicine* 343: 702-9, 2000.
67. Tinckam K. Histocompatibility methods. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)* 23: 80-93, 2009.
68. Madden K, Chabot-Richards D. Hla testing in the molecular diagnostic laboratory. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*: 1-9, 2018.
69. Itoh Y, Mizuki N, Shimada T. High-throughput DNA typing of hla-a, -b, -c, and -drb1 loci by a pcr-ssop-luminex method in the japanese population. *Immunogenetics* 57: 717-29, 2005.
70. Picascia A, Infante T, Napoli C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clinical and experimental nephrology* 16: 373-81, 2012.

71. Garces JC, Giusti S, Staffeld-Coit C. Antibody-mediated rejection: A review. *The Ochsner journal* 17: 46-55, 2017.
72. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 87: 1505-13, 2009.
73. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9: 2561-70, 2009.
74. Azar H, Mourani C, Nehme Chelala D. Donor specific anti-hla antibodies detection and impact in kidney transplantation. *Le Journal medical libanais The Lebanese medical journal* 63: 154-8, 2015.
75. Lee PC, Zhu L, Terasaki PI. Hla-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss. *Transplantation* 88: 568-74, 2009.
76. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3: 665-73, 2003.
77. Pajaro OE, George JF. On solid-phase antibody assays. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 29: 1207-9, 2010.
78. Colombo MB, Haworth SE, Poli F. Luminex technology for anti-hla antibody screening: Evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 72: 465-71, 2007.
79. El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. Hla antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Human immunology* 66: 989-97, 2005.
80. Cecka JM. Current methodologies for detecting sensitization to hla antigens. *Current opinion in organ transplantation* 16: 398-403, 2011.
81. van den Berg-Loonen EM, Billen EV, Voorter CE. Clinical relevance of pretransplant donor-directed antibodies detected by single antigen beads in highly sensitized renal transplant patients. *Transplantation* 85: 1086-90, 2008.
82. Cai J, Terasaki PI. Post-transplantation antibody monitoring and hla antibody epitope identification. *Current opinion in immunology* 20: 602-6, 2008.
83. Pinto M, Dobson S. Bk and jc virus: A review. *The Journal of infection* 68 Suppl 1: S2-8, 2014.
84. Çolak M, Altay A, Erten Y. İmmünsüprese hastalarda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time pcr) ile bk ve jcv DNA pozitifliğinin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 45: 12-21, 2015.
85. Mischitelli M, Bellizzi A, Anzivino E. Complications post renal transplantation: Literature focus on bk virus nephropathy and diagnostic tools actually available. *Virology journal* 5: 38-42, 2008.
86. Ayar Y, Ersoy A, Muti A. Böbrek nakilli hastalarda BK nefropatisi. *Turkiye Klinikleri Journal of Nephrology* 9: 38-48, 2014.

87. Li P, Cheng D, Wen J. Risk factors for bk virus infection in living-donor renal transplant recipients: A single-center study from china. *Renal failure* 40: 442-6, 2018.
88. Skulratanasak P, Mahamongkhonsawata J, Chayakulkeereeb M. Bk virus infection in thai kidney transplant recipients: A single-center experience. *Transplantation proceedings* 50: 1077-9, 2018.
89. Awadalla Y, Randhawa P, Ruppert K. Hla mismatching increases the risk of bk virus nephropathy in renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4: 1691-6, 2004.
90. Dogan SE, Celebi ZK, Akturk S. Prevalence and risk factors of bk viremia in patients with kidney transplantation: A single-center experience from turkey. *Transplantation proceedings* 49: 532-6, 2017.
91. Provenzano M, Bracci L, Wyler S. Characterization of highly frequent epitope-specific cd45ra+/ccr7+/- t lymphocyte responses against p53-binding domains of the human polyomavirus bk large tumor antigen in HLA-A*0201+ bkV-seropositive donors. *Journal of translational medicine* 4: 47, 2006.
92. Binggeli S, Egli A, Schaub S. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to vp1 and large t-antigen in kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7: 1131-9, 2007.
93. Li J, Melenhorst J, Hensel N. T-cell responses to peptide fragments of the bk virus t antigen: Implications for cross-reactivity of immune response to JC virus. *The Journal of general virology* 87: 2951-60, 2006.
94. Ramaswami B, Popescu I, Macedo C. HLA-A01-, -A03-, and -A024-binding nanomeric epitopes in polyomavirus bk large t antigen. *Human immunology* 70: 722-8, 2009.