

**BÖBREK TRANSPLANTASYONU YAPILACAK PRA
(PANEL REAKTİF ANTİKOR) POZİTİF HASTALARDA
HLA HAPLOTİPLERİ İLE İMMÜNOFENOTİP İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN PRA
POSITIVE PATIENTS WITH HLA HAPLOTYPES AND
IMMUNOPHENOTYPES IN RENAL TRANSPLANT
PATIENTS**

BELEMİR NERMİN ANIL

PROF. DR. İBRAHİM VARGEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır

2022

ÖZET

BÖBREK TRANSPLANTASYONU YAPILACAK PRA (PANEL REAKTİF ANTİKOR) POZİTİF HASTALARDA HLA HAPLOTİPLERİ İLE İMMÜNOFENOTİP İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

BELEMİR NERMİN ANIL

Yüksek Lisans, Biyomühendislik

Danışman: PROF. DR. İBRAHİM VARGEL

Eylül 2022, 84 sayfa

İnsan Lökosit Antijeni (HLA- Human Leucocyte Antigen) son derece kompleks bir morfolojiye sahiptir. Bu kompleks yapı, özellikle böbrek gibi bazı organ nakilleri söz konusu olduğunda hasta ve donör arasındaki uyumsuzluğa sebep olan önemli bir faktördür. HLA lokuslarında ne kadar çok uyum varsa rejeksiyon riski ve kullanılacak immünespresiflerin miktarı o kadar azdır. Panel Reaktif Antikor (PRA) testi ise hastanın serumunda bulunan anti-HLA antikorların tanımlanmasını sağlayan bir testtir. Böbrek bekleme listesindeki hastalarda, hastanın serumunda oluşan anti-HLA antikorlarının varlığı hastada hiper akut ve akut rejeksiyona sebep olmaktadır. PRA pozitif hastaların PRA negatif hastalara göre nakil başarıları daha düşüktür. Bu çalışmada 2012-2022 tarihleri arasında Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'na gelen ve kronik böbrek yetmezliği (KBY) teşhisi konulmuş, çalışma için uygun olan 24 hasta seçilmiştir. T lenfositler böbrek naklinde immün düzenleyici olarak rol alırlar. Antijen sunucu hücrelerle etkileşime giren T lenfositler uyarılır ve sinyal oluştururlar. En önemli sinyal, T hücre reseptörü *CD3*'ün bir majör histo uyumluluk kompleksi (MHC) ile temasından elde edilir. Bununla birlikte, T hücreleri üzerinde ifade edilen diğer sinyal molekülleri de T hücrelerinin

düzenleyici veya efektör hücrelere farklılaşmasını ve aktivasyonunu etkiler. Transplante edilen organın reddinin başlatılması ve sürdürülmesinde aktive edilmiş bu T hücreleri yer alır. Ancak böbrek nakli hastalarının kanında bulunan T lenfosit alt gruplarının ve *HLA – DR* pozitif hücrelerinin klinik önemi hala belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmayla 9 PRA pozitif hastanın antikorları belirlenmiştir. Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer-NK), T Lenfosit, B lenfosit aktivasyonunun belirlenmesi aşamasında Flow Sitometri cihazı (Beckman Coulter Navios-model, USA) ile *HLA – DR*, *CD3*, *CD4*, *CD8*, *CD16*, *CD56*, *CD25*, *CD127*, *CD45*, *CD57*, *CD19* belirteçleri kullanılarak lenfosit profili belirlenmiştir. Bu profil hastaların doku tipi ve kendi içinde alt gruplarına göre ayrılarak aradaki fark istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. PRA pozitif hastalarda sık görülen organ rejeksiyonları ile lenfosit profili arasındaki ilişki SPSS 23 analizi ile sorgulanmıştır. KBY Hastalarının PRA, nakil ve rejeksiyon durumlarına göre aktive *CD4* pozitif hücreleri tanımlayan $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA – DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde: KBY Hastalarının PRA durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA – DR^+$ T hücre yüzey belirteç ortancaları PRA pozitif hastalarda PRA negatif hastalara göre daha yüksek bulunmuştur ($z=4.025$; $p<0.001$; $r=0.821$). KBY hastalarına ait PRA pozitif hastaların sınıf I ve sınıf II yüzde değerlerinin $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA – DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerleri ile karşılaştırılması yapıldığında değişkenler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. KBY Hastalarının nakil durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ T hücre yüzey belirteç ortancaları nakil olan hastalarda nakil olmayan hastalara göre daha yüksektir ($z=2.578$, $p=0.009$, $r=0.520$). $CD4^+HLA – DR^+$ T hücre yüzey belirteç ortancaları için anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($z=0.550$, $p=0.608$, $r=0.110$). KBY Hastalarının rejeksiyon durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA – DR^+$ T hücre yüzey belirteç ortancaları rejeksiyon olan hastalarda olmayan hastalara göre daha yüksek saptansa da istatistiksel anlamlı bir değişkenlik göstermemiştir ($z=1.776$, $p=0.095$, $r=0.562$). Hasta sayısı arttırıldığında anlamlı bir fark elde edileceği etki büyüklüğü değerinden ($r=0.562$; $r>0.50$ large effect size) anlaşılmaktadır. Hastaların HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 doku tiplerine ait lokus numaraları ile PRA durumları

istatistiksel olarak Chi-Square analizi ile incelenmiştir. PRA test sonucu pozitif veya negatif olan hastalarda HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 lokus numaraları açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Yapılan çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; KBY hastalarının PRA durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin hasta monitorizasyonu için ek bir parametre olarak kullanılabilceğini düşündürmüştü ancak, hasta sayılarının artırılarak ve çok değişkenli istatistiksel analiz yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: HLA, PRA, İmmünofenotiplendirme, Böbrek Nakli, Kronik Böbrek Hastalığı

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN PRA POSITIVE PATIENTS WITH HLA HAPLOTYPES AND IMMUNOPHENOTYPES IN RENAL TRANSPLANT PATIENTS

BELEMİR NERMİN ANIL

Master of Science, Bioengineering

Supervisor: PROF. DR. İBRAHİM VARGEL

September 2022, 84 pages

The Human Leukocyte Antigen (HLA- Human Leucocyte Antigen) has an extremely complex morphology. This complex structure is an important factor that causes incompatibility between the patient and the donor, especially when it comes to some organ transplants, such as kidneys. The more compliance there is at the HLA loci, the less the risk of rejection and the amount of immunosuppressants to be used. The Panel Reactive Antibody (PRA) test is a test that allows the identification of anti-HLA antibodies found in the patient's serum. In patients on the renal waiting list, the presence of anti-HLA antibodies formed in the patient's serum causes hyperacute and acute rejection in the patient. The success of transplantation of PRA positive patients is lower than that of PRA negative patients. In this study, 24 patients who came to the Tissue Typing Laboratory of Deckapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital between 2012 and 2022 and were diagnosed with chronic renal failure (CRF) and were eligible for the study were selected. T lymphocytes are involved in kidney transplantation as immune regulators. T lymphocytes, which interact with antigen-presenting cells, stimulate T cells through signals. The most important signal is obtained from the contact of the T-cell receptor *CD3* with a major histocompatibility complex (MHC). However, other signaling molecules expressed on T cells also affect the

differentiation and activation of T cells into regulatory or effector cells. These activated T cells are involved in initiating and maintaining the rejection of the transplanted organ. However, the clinical significance of T lymphocyte subgroups and *HLA – DR* positive cells found in the blood of kidney transplant patients still remains unclear. In this study, antibodies of 9 PRA positive patients were determined. Natural killer cells (Natural Killer, NK), T-lymphocytes, B lymphocytes, the activation of the determination of Phase, Flow Cytometry device (Beckman Coulter Navios-model, USA), *HLA – DR*, *CD3*, *CD4*, *CD8*, *CD16*, *CD56*, *CD25*, *CD127*, *CD45*, *CD57*, *CD19* lymphocyte markers was determined using the profile. This profile was decoupled according to the tissue type of the patients and their subgroups within themselves and the difference was compared statistically. The relationship between organ rejections and lymphocyte profile, which are common in PRA positive patients, was questioned by SPSS 23 analysis. A comparison of $CD4^+CD25^{low}$ and $CD4^+HLA – DR^+$ T cell surface marker values, which identify activated CD4 positive cells according to the PRA, transplant and rejection status of CRF patients, was performed.

When the results obtained were examined statistically: $CD4^+CD25^{low}$ and $CD4^+HLA – DR^+$ T cell surface marker median values were found to be higher in PRA positive patients compared to PRA negative patients according to the PRA status of CRF patients ($z=4.025$; $p<0.001$; $r=0.821$). When the percentage values of class I and class II of positive patients belonging to CRF patients were compared with $CD4^+CD25^{low}$ and $CD4^+HLA – DR^+$ T cell surface marker values, there was no significant difference between the variables. According to the transplantation status of CRF patients, $CD4^+CD25^{low}$ T cell surface marker hydrangeas are higher in patients with transplantation than in non-transplant patients ($z=2.578$, $p=0.009$, $r=0.520$). No significant difference was obtained for $CD4^+HLA – DR^+$ T cell surface marker hydrangeas ($z=0.550$, $p=0.608$, $r=0.110$). $CD4^+CD25^{low}$ and $CD4^+HLA – DR^+$ T cell surface marker median values were found to be higher in patients with rejection compared to non-rejection patients, but there was no statistically significant variability ($z=1.776$, $p=0.095$, $r=0.562$). It is understood from the effect size value ($r=0.562$; $r>0.50$ large effect size) that a significant difference will be obtained when the number of patients is increased. The locus numbers

of the patients belonging to HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 tissue types and their PRA status were statistically examined by Chi-Square analysis. No significant differences were observed in terms of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 locus numbers in patients with positive or negative PRA test results.

The obtained results are evaluated within the scope of the study; according to the state of PRA CRF patients with $CD4^+CD25^{low}$ and $CD4^+HLA - DR^+$ T cell surface markers for patient monitoring of the value of an additional parameter that can be used as suggested, however, by increasing the number of patients and multivariate statistical analysis is required.

Keywords: HLA, PRA, Immunophenotyping, Kidney Transplant, Chronic Kidney Disease

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında destekleri ve katkıları ile yol gösteren, tez çalışmalarım boyunca bana gösterdiği sabır ve anlayışla yanımda olan ve beni çalışmaya teşvik eden danışmanım **Dr. İbrahim VARGEL**'e,

Tez çalışmalarım boyunca benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle her daim bana yol gösteren, karakteri, eğitimci kişiliği ve insani yönü ile hayatımın her alanında kendime örnek aldığım **Öğr. Gör. Uzm. Dr. Hamza OKUR**'a,

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan **Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA** ve **Doç. Dr. Fatma Visal OKUR**'a,

Tüm tez sürecimde yanımda olan, zor zamanlarımda gerek psikolojik gerekse yön verme açısından yanımda olan **Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ**'a

Hayatımı anlamlı kılan ve eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, hedeflerim doğrultusunda ilerlemem için olanak sağlayan, aile olmaktan gurur duyduğum annem **Sevda İZER** ve biricik kardeşim **Ayla Beliz ANIL**'a

Zor dönemlerimde her zaman psikolojik destek sağlayan ve yardımını esirgemeyen her canım sıkıldığında yanımda olan **Gökçe MÜLAZIMOĞLU**'na

Sonsuz Teşekkürler...

Belemir Nermin ANIL

Eylül 2022, Ankara

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER	xi
ŞEKİLLER	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HLA (Human Leucocyte Antigen) Sistemi	3
2.2. HLA Sisteminin Genetik Organizasyonu	3
2.3. Tarihçe	4
2.4. HLA Moleküllerinde Polimorfizm	4
2.5. İmmün Sistem Hücreleri	5
2.5.1. T Lenfositler	5
2.5.2. B Lenfositler	5
2.5.3. Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer-NK)	6
2.5.4. Makrofajlar	6
2.5.5. T ve B Lenfositlerin Yüzey Farklılaşma Antijenleri	6
2.6. HLA Genlerinin İsimlendirilmesi, Sınıflandırılması ve Kalıtımı	7
2.7. HLA Antijenlerinde Kalıtım	10
2.8. Doku Tipleme Analiz Yöntemleri	11
2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	11
2.8.2. Diziye Özgü Oligonükleotid Testi (SSO-Sequence Specific Oligonucleotide)	12
2.8.3. Panel Reaktif Antikor (PRA- Panel Reactive Antibody)	13
2.9. Akış Sitometrisi	14

2.9.1. Antijene Özgü Tepkiler	15
2.10.Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)	16
2.11.Kan Grubu Antijenleri	18
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	20
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar	20
3.2. Analiz Grupları	24
3.2.1. Hasta Grubu	24
3.2.1.1. Böbrek Nakli Olan PRA Pozitif Hasta Grubu	24
3.2.1.2. Böbrek Nakli Yapılmayan PRA Pozitif Hasta Grubu	25
3.2.2. Kontrol Grubu	25
3.2.2.1. Böbrek Nakli Olan PRA Negatif Kontrol Grubu	25
3.2.2.2. Böbrek Nakli Olmayan PRA Negatif Kontrol Grubu	26
3.3. DNA İzolasyonu	27
3.4. Doku Grubu Alellerinin Belirlenmesi	28
3.4.1. DNA Amplifikasyonu (PCR)	28
3.4.2. Hibridizasyon	30
3.5. Anti-HLA Antikorların Belirlenmesi	31
3.5.1. PRA Çalışma Prosedürü	32
3.6. Yüzeysel Antikor Boyaması	33
3.7. İstatiksel Analiz	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
4.1. Analiz Gruplarının Doku Tipi Sonuçları	35
4.1.1. Böbrek Nakli Olan PRA Pozitif Hasta Grubunun Doku Tiplendirmesi	35
4.1.2. Böbrek Nakli Olmayan PRA Pozitif Hasta Grubunun Doku Tiplendirmesi	36
4.1.3. Böbrek Nakli Olan PRA Negatif Kontrol Grubunun Doku Tiplendirmesi ..	37
4.1.4. Böbrek Nakli Olmayan PRA Negatif Kontrol Grubunun Doku Tiplendirmesi	38
4.2. Akış Sitometrisi Sonuçları	39
4.3. İstatiksel Sonuçlar	43

4.3.1. KBY Hastalarının PRA Durumuna Göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerlerinin Karşılaştırılması	44
4.3.2. KBY Hastalarına ait PRA Pozitif Hastaların Sınıf I ve Sınıf II Yüzde Değerlerinin $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerleri ile Karşılaştırılması	44
4.3.3. KBY Hastalarının Nakil Durumuna Göre $CD4^+HLA - DR^+$ ve $CD4^+CD25^{low}$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerlerinin Karşılaştırılması	45
4.3.4. KBY Hastalarının Rejeksiyon Durumuna Göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerlerinin Karşılaştırılması	46
4.3.5. KBY Hastalarının Doku Tiplerinin PRA Durumu İle Karşılaştırılması	46
5. YORUM	50
KAYNAKLAR	54

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. HLA Nomenklatürü [32].	8
Çizelge 2.2. KBH aşaması; GFR=Glomerüler Filtrasyon Hızı [56].....	17
Çizelge 2.3. Albüminüri kategorileri; izole idrar örneklerinde A/C oranı=Albümin/ Kreatinin oranı [56].	17
Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler	21
Çizelge 3.2. DNA izolasyonunda kullanılan cihazlar	21
Çizelge 3.3. Doku tiplendirme çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.	22
Çizelge 3.4. Doku tiplendirme çalışmasında kullanılan cihaz	22
Çizelge 3.5. PRA çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.	22
Çizelge 3.6. PRA çalışmasında kullanılan cihazlar	23
Çizelge 3.7. Akış sitometrisi çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.	23
Çizelge 3.8. Akış Sitometrisi çalışmasında kullanılan cihaz	23
Çizelge 3.9. Böbrek nakli olan PRA pozitif hasta grubunun cinsiyet, kan grubu, diyaliz türü ve nakil olma durumu.	25
Çizelge 3.10. Böbrek nakli olmayan PRA pozitif hasta grubunun cinsiyet, kan grubu, diyaliz türü ve nakil olma durumu.	25
Çizelge 3.11. Böbrek nakli olan PRA negatif kontrol grubunun cinsiyet, kan grubu, diyaliz türü ve nakil olma durumu.	26
Çizelge 3.12. Böbrek nakli olmayan PRA negatif kontrol grubunun cinsiyet, kan grubu, diyaliz türü ve nakil olma durumu.	26
Çizelge 3.13. PCR için gerekli reaktifler ve miktarları.....	29
Çizelge 3.14. HLA-A, B, DRB1 analizi için PCR döngü programı.	29
Çizelge 3.15. Hibridizasyon reaksiyon koşulları.	31
Çizelge 4.1. Böbrek nakli olan PRA pozitif hasta grubunun nakil olma durumu ve doku tiplendirmesi.....	36

Çizelge 4.2. Böbrek nakli olmayan PRA pozitif hasta grubunun nakil olma durumu ve doku tiplendirmesi.	37
Çizelge 4.3. Böbrek nakli olan PRA negatif kontrol grubunun nakil olma durumu ve doku tiplendirmesi.....	38
Çizelge 4.4. Böbrek nakli olmayan PRA negatif kontrol grubunun nakil olma durumu ve doku tiplendirmesi.	39
Çizelge 4.5. Böbrek nakli alıcılarının demografik özellikleri	43
Çizelge 4.6. KBY hastalarının PRA durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin karşılaştırılması.	44
Çizelge 4.7. KBY Hastalarına ait PRA pozitif hastaların sınıf I (%) ve sınıf II (%) değerlerinin $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerleri ile karşılaştırılması.....	45
Çizelge 4.8. KBY hastalarının nakil durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin karşılaştırılması.	45
Çizelge 4.9. KBY Hastalarının Rejeksiyon Durumuna Göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerlerinin Karşılaştırılması.	46
Çizelge 4.10. KBY hastalarının Ebeveyn 1 (EB1) HLA-A doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.	47
Çizelge 4.11. KBY hastalarının Ebeveyn 2 (EB2) HLA-A doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.	47
Çizelge 4.12. KBY hastalarının Ebeveyn 1 (EB1) HLA-B doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.	48
Çizelge 4.13. KBY hastalarının Ebeveyn 2 (EB2) HLA-B doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.	48
Çizelge 4.14. KBY hastalarının Ebeveyn 1 (EB1) HLA-DRB1 doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.	49

Çizelge 4.15. KBY hastalarının Ebeveyn 2 (EB2) HLA-DRB1 doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.	49
--	----

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. 6. Kromozomun kısa kolunda bulunan insan MHC gen bölgesi C'(komplement gen), TNF (tümör nekroz faktörleri)'lerini içerir [16].	3
Şekil 2.2. Bilgisayarlı HLA sınıf I (solda) ve HLA sınıf II (sağda) molekülleri. Her iki molekülün de peptitleri T hücre reseptörlerine sunulmak üzere bağlayan peptit bağlama oluşu vardır [37].	9
Şekil 2.3. HLA moleküllerinin kalıtımı (A9, B5, DR7 bir haplotiptir) [9].	10
Şekil 3.1. Sırasıyla soldan sağa, DNA izolasyon cihazı (BioRobot EZ1 Advanced XL, Qiagen, Almanya) ve Spektrofotometre (Thermo Scientific, UK)	27
Şekil 3.2. Luminex cihazı (Luminex Fluoroanalyzer 200, Luminex Corporation, USA).	28
Şekil 3.3. DNA ve master mix pipetleme yönü.	29
Şekil 3.4. Thermal cycler cihazı (Sensequest, ATQ; Almanya), PCR aşaması...	30
Şekil 3.5. PCR ürünlerinin Coster Plate'e koyulması ve çalışmanın Luminex IS 100 Software'de okutulması aşaması.	31
Şekil 3.6. PRA plağının seal ile kaplanması.	32
Şekil 3.7. Kullanılan antikorlar (Sırasıyla: <i>CD127-FITC</i> , <i>CD16-PE</i> , <i>CD56-PE</i> , <i>CD19-ECD</i> , <i>CD4-PC5</i> , <i>CD8-PC7</i> , <i>Anti-HLA – DR-APC</i> , <i>CD25-APC Alexa Flour 700</i> , <i>CD3-APC Alexa Flour 750</i> , <i>CD45 Krome Orange</i> , <i>CD57-Pacific Blue</i> ve çalışma düzeneği.	33
Şekil 3.8. Flow sitometri cihazı (Beckman Coulter In Navios, Amerika).	34

- Şekil 4.1. SS INT/FS INT grafiğinde lenfosit bölgesinde T hücresi alt grupları değerlendirme stratejisi, PRA pozitif KBY hastasına ait dot-plot grafikleridir. SS INT/*CD45* KO grafiğinde kırmızı renkli alan lenfositlerin kapılama grafiğidir. *CD3*, hücre kümesi içinde yer alan *CD4* pozitif T hücre alt grupları ($CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$)'nın grafik ve yüzdeleri verilmiştir. 40
- Şekil 4.2. SS INT/FS INT grafiğinde lenfosit bölgesinde T hücresi alt grupları değerlendirme stratejisi, PRA negatif KBY hastasına ait dot-plot grafikleridir. SS INT/*CD45* KO grafiğinde kırmızı renkli alan lenfositlerin kapılama grafiğidir. *CD3*, hücre kümesi içinde yer alan *CD4* pozitif T hücresi alt grupları ($CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$)'nın grafik ve yüzdeleri verilmiştir. 41
- Şekil 4.3. PRA pozitif ve negatif hastaların yüzey belirteçlerinin yüzde değerleri ve PRA yüzdeleri 42

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	: Adenin Tri Phosphate
CTP	: Cytosinel Tri Phosphate
CD	: Cluster of Differentiation
CREDIT	: Chronic Renal Disease In Turkey
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNTP	: Deoksinükleotit Trifosfatlar
FSC	: Forward Scatter
GFR	: Gomerular Filtration Rate
GTP	: Guanin Tri Phosphate
HLA	: Human Leucocyte Antigen
HLDA	: İnsan Lökosit Farklılaşma Antijeni
HD	: Hemodializ
IgG	: Immunoglobulin G
IMGT	: İnternational Immunogenetics
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
MHC	: Majör Doku Uygunluk Kompleksi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	: Fitoeritrin
RPM	: Revolutions Per Minute
PRA	: Panel Reaktif Antikor
SA-PE	: Streptavin-Phycoerythrin
SSC	: Yan Saçılım-Side Scatter
SSO	: Diziye Özgü Oligonükleotid- Sequence Spesific Oligonucleotide
Taq	: Thermus Aquaticus
TNF	: Tümör Nekroz Faktörleri
TTP	: Timin Trifosfat

NK : Natural **K**iller - Doğal Öldürücü Hücreler

Simgeler

α : Alfa

β : Beta

m^2 : Metrekare

dk : Dakika

sn : Saniye

ml : Mililitre

mg/g : miligram/gram

μ l : Mikrolitre

ng : Nanogram

$^{\circ}$ C : Derece santigrat

1. GİRİŞ

Doku Uygunluk Antijenleri (MHC- Major Histocompatibility Complex) tüm omurgalılarda bulunan hücre yüzey bileşekleridir [1]. Bu yüzey bileşiklerine insanlarda ilk kez lökositlerde rastlanılmış ve insandaki MHC'ler "İnsan Lökosit Antijeni" (HLA-Human Leukocyte Antigen) olarak adlandırılmıştır [2]. 6. Kromozomun kısa kolunda konumlanan HLA antijenleri vücudumuza giren yabancı antijenlerin tanınmasında rol alırlar [3-5]. MHC gen bölgesinin diğer omurgalılardaki HLA'larda olduğu gibi insanlarda da 3 alt grubu içermektedir ve bunlar sınıf I, II ve III antijen olarak adlandırılmıştır. Sınıf I ve Sınıf II insan lökosit antijenleriyle ilişkilidir. Ancak hücrelere antijen sunumunda görev almayan Sınıf III bileşikleridir. Sınıf I, 6 bölge (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G) içerir ve HLA A, B ve C bölgeleri transplantasyonla direkt ilgilidir [6, 7]. Sınıf II (HLA-DRB1, -DP, -DQ, -DO, -DN, -DM) de altı bölge içerir transplantasyon ile ilgili olan antijeni HLA-DRB1'dir [8-10]. HLA antijenleri oldukça polimorfik bir yapıya sahiptir ve bundan dolayı hasta ve donör arasındaki uyumsuzluğun önemli sebeplerindendir. Böbrek nakilleri öncesinde hasta ve donör arasındaki antijen uyumunun tespiti için HLA-A, B, DR lokuslarının tanımlanması yapılmaktadır ve bu tanımlamalarda HLA uyumu açısından önem sırası HLA-DRB1, HLA-B ve HLA-A şeklindedir. HLA lokuslarında ne kadar çok uyum varsa rejeksiyon riski ve kullanılacak immüsupresiflerin miktarı o kadar az olacaktır [11].

Panel Reaktif Antikor (PRA) ise HLA'ya karşı hastanın serumunda bulunan anti-HLA antikorların tanımlanmasında kullanılan bir testtir. Kronik böbrek hastalarında böbrek naklinin kesin tedavi olduğu bilinmektedir. Anti-HLA antikorları hastada nakil öncesi veya sonrası için rejeksiyona sebep olabilmektedir ve bu yüzden bu antikorların profillerinin çok iyi belirlenmesi gerekmektedir. KBY hastalarında uygun donör seçilirken Anti-HLA antikorlarını tanımlayan PRA tarama ve tanımlama ve testleri yapılır ve bu sonuçlar doğrultusunda fazla duyarlılaşmış hastalarda bile nakil şansı arttırılabilmektedir. Böbrek bekleme listesindeki hastalarda, hastanın serumunda oluşan Anti-HLA antikorlarının varlığı hastada hiperakut ve akut rejeksiyona sebep olmaktadır [11]. Rejeksiyonu önlemek amacıyla nakil öncesi PRA tarama testinin yapılması önemlidir. PRA pozitif hastaların PRA negatif

hastalara göre nakil başarısı daha düşüktür. Kronik böbrek yetmezliği (KBY) hastalarında da nakil öncesi PRA pozitifliği nakil şansını düşürmektedir. Bir başka deyişle transplantasyon sonrası rejeksiyon riskini arttırmaktadır [12].

Literatürde yapılan çalışmalarda PRA testi sonucu pozitif olan hastaların sınıf I antikorlardan en sık tanımlananları, A2, A23, A24, A33, A68, B7, sınıf II antikorlardan tanımlananlar ise, DR4, DR7, DR9, DR11, DR10, DR1, DR8, DR17, DQ2, DQ9 olarak belirlenmiştir [13]. 2009 yılında Karahan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bazı HLA sınıf I antijenlerine karşı oluşan antikorlar tanımlanmış ve bunlardan en sık bulunup tanımlanan A68 antikorudur. HLA sınıf II antijenine karşı en sık tanımlanan antikor ise DQ3'dür. 2011 yılında Erikoğlu ve arkadaşları tarafından ülkemizde yapılan bir başka çalışmada HLA-A, B, DR grubunda A2, B35, DRB11 antijenlerini en sık görülen antijen olarak tanımlamışlardır [14]. Ayrıca, 2001 yılında Arnaiz-Villena ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise A2 antijeninin en sık olarak Türkiye popülasyonunda rastlandığını bildirmiştir [15].

Bu çalışmamızda PRA pozitif hastaların antikorlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışma kapsamında bu antikorların doku tipleri ile ilişkisi de araştırılacaktır. PRA pozitif hastaların antikor düzeyleriyle doku tipi arasındaki ilişki sorgulanarak rejeksiyon üzerindeki etkisi araştırılacaktır. Çalışma kapsamında, PRA pozitif KBY hastalarındaki antikorların belirlenmesinden sonra lenfosit fenotipine bakılacaktır. Aynı hastadan kan örneği alınarak DNA izolasyonu yapıldıktan sonra doku tipi ile PRA ve immünofenotip arasındaki ilişki belirlenecektir.

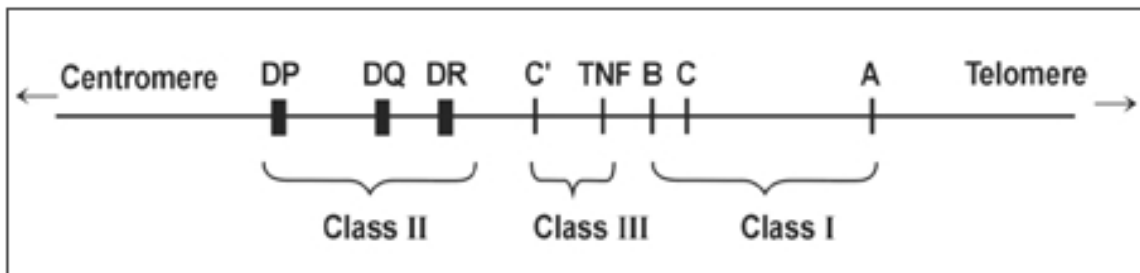
2. GENEL BİLGİLER

2.1. HLA (Human Leucocyte Antigen) Sistemi

Allojenik organların reddedilmesinde rol oynayan lokuslara Majör Doku Uyumluluk Kompleksi (MHC) denir. Yüksek oranda polimorfik olan hücre yüzeyi molekülleri MHC tarafından kodlanır. İnsanlarda bulunan MHC ilk olarak lökositlere karşı alloantikolar kullanılarak tanımlanıp karakterize edildiğinde HLA (insan lökosit antijeni) sistemi olarak adlandırılır. Transplantasyon antijeni olan HLA sisteminin birincil biyolojik rolü vücuttaki bağışıklık tepkisinin düzenlenmesidir. Yapılan çalışmalarda transplant reddinin, allojenik lökositlere karşı antikor üretimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur [16].

2.2. HLA Sisteminin Genetik Organizasyonu

7.6 Mb'lık alan kaplayan ve farklı işlevlerde olan 250'den fazla gen içeren HLA geni, 6. Kromozomun (6p21.31) kısa kolunda konumlanır. Günümüzde bilinen insan kromozomal alanlarında en fazla gen yoğunluğu ve polimorfizme sahip gendir [17]. İnsan MHC bölgesi fonksiyonlarına göre üç bölgeye ayrılır: HLA-A, B ve C sınıf I antijenleri, HLA-DP, DQ, DRB1 genlerini içeren HLA sınıf II antijenleri ve HLA moleküllerini kodlamayan Sınıf III antijenleridir. Sınıf III antijenlerinin tamamlayıcı bileşenleri (C2, C4, faktör B), tümör nekroz faktörleri (TNF'LER), 21-hidroksilaz ve diğer gen bölgelerini içerir [18]. Şekil 2.1'de insan MHC gen bölgesi gösterilmiştir.



Şekil 2.1. 6. Kromozomun kısa kolunda bulunan insan MHC gen bölgesi C'(komplement gen), TNF (tümör nekroz faktörleri)'lerini içerir [16].

2.3. Tarihçe

1940 yıllarında George Snell ve arkadaşları tarafından MHC keşfedilmiştir. 1940 yılından 1967 insan MHC' sinin keşfine kadar onlarca yıl doku ve organ nakilleri başarısız olmuştur. Snell ve arkadaşları iki farklı fare grubu kullanarak deri nakilleri ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalar neticesinde genetik olarak birbirinden farklı fare grubunda deri nakilleri rejeksiyonla sonuçlanmış, ancak genetik olarak aynı fare grubunda deri nakilleri başarılı olmuştur. Bu farklılığın sebebini genomdaki dev bir gen kompleksinden kaynaklandığı ortaya çıkarılmış ve MHC olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda George Snell ve arkadaşları insanda da bu gen kompleksinin bulunduğunu ortaya çıkarmış ve HLA olarak isimlendirmişlerdir. Yapılan ilk çalışmalardan sonra Snell ve arkadaşları MHC' nin kendisini ve bütün fonksiyonlarını tamamı ile tanımlamış ve bu buluş sayesinde 1980 yılında Nobel Tıp ödülünü kazanmışlardır [19]. İnsanlarda klinik doku ve organ nakillerinin yapılması bu genetik bölgenin keşfiyle başlamıştır. 1968 yılında Dünya Sağlık Örgütü Adlandırma Komitesi insan MHC' sini HLA olarak isimlendirmiş ve MHC ile bağlantılı genler tarafından kontrol edildiği açıklamıştır [20] .

2.4. HLA Moleküllerinde Polimorfizm

İnsan biyolojisinin ayırt edici özelliği genetik polimorfizmdir. Bir gen bir populasyonda birden fazla alelli ifade ettiğinde o alel polimorfik olarak adlandırılır. İnsan genlerinin en yüksek polimorfizm gösteren genleri HLA genleridir. HLA moleküllerinin değişkenliği esas olarak peptit bağlama alanında bulunur. Patojenlerin ve bu patojenlere yanıt veren bağışıklık sisteminin birlikte evrimi populasyonda HLA moleküllerinin değişkenliğine sebep olmuştur. Farklı viral peptitleri bağlama potansiyelinin artırılması, patojenlere karşı yanıtı en üst düzeye çıkarır. HLA genleri oldukça polimorfik olmasına rağmen aynı aleller genellikle bireylerle ilişkilidir. Bu, HLA genlerinin birbirleriyle güçlü bağlantı dengesizliği içinde olmasıyla açıklanabilir. "Bağlantı dengesizliği" terimi, bir populasyondaki tek bir alelin sıklığına dayalı olarak beklenenden daha sık meydana gelen, farklı lokuslardaki alellerin birlikteliğini ifade eder. Bunun en belirgin nedeni, aynı kromozom üzerinde birbirine yakın

olan iki lokustan alellerin birlikte kalıtımıdır. Bağlantı dengesizliği nedeniyle, belirli HLA haplotipleri diğerlerinden daha sıktır ve bu tür haplotipleri taşıyan hastaların uyumlu bir donör bulma şansı en yüksektir [21].

2.5. İmmün Sistem Hücreleri

2.5.1. T Lenfositler

T hücreleri, kemik iliği kaynaklı lenfoid öncülerinden farklılaşır ve fetal gelişim sırasında timusta maksimum düzeyde olgunlaşır. Üretim hızı günde ortalama 109 hücredir. Bu yeni oluşan T hücrelerinin bazıları dolaşım yoluyla ikincil lenfoid dokulara (dalak, lenf düğümleri ve mukoza ile ilişkili lenfoid dokular) göç eder. Yetişkin bireyler, toplam vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturan 1012 lenfosit hücrelerine sahiptir. Bu hücrelerin yaklaşık %50'si T lenfositlerdir. Dolaşımdaki T lenfositler, lökositlerin yaklaşık %20'sini oluşturur. T lenfositler, omurgalı bağışıklık sisteminin merkezi bir bileşenidir ve patojenik istilacılara karşı oldukça spesifik ve uzun süreli bağışıklık tepkilerini düzenlemekten sorumludur [22].

T hücreleri, kemik iliğinde üretilip timusta farklılaşan, kendinden olan ve olmayanı ayırt etme yeteneğini kazandıkları lenfoid öncüllerden türetilir. Olgunlaşma sürecinde T lenfositlerin yüzeyine birçok reseptör yerleşmeye başlar. Kemik iliğindeki embriyonik pluripotent hücreler, bazı sitokinlerin uyarılması ile gelişip pre-T lenfositlere farklılaşırlar. Daha sonra pre-T lenfositler timüs korteksine giderek olgunlaşıp çoğalırlar. Bu olgunlaşma sürecinde çeşitli yüzey molekülleri kazanıp farklı uyarılara yanıt verebilecek seviyeye erişirler [22].

2.5.2. B Lenfositler

Humoral bağışıklıktan sorumlu olan B hücreleri kemik iliğinde bulunan stem hücrelerden köken alırlar. İlk olarak lenfoid köken hücreleri daha sonra primer (pre) - B lenfositlere dönüşürler. Kanda tüm lenfositlerin %25'ini, dalakta ise %50 sini oluştururlar. B lenfositler

immüoglobulin (Ig) sentezlerler ve bu sentezledikleri Ig' leri hücre yüzeylerindeki zarlarda taşırlar. B lenfositler, yalnızca bir antijene bağlanabilen yüzey immünoglobulin reseptörlerini taşırlar. Bundan dolayı bağışıklık sisteminde zamanla karşılaşılacak on binlerce antijen için spesifik reseptörler taşıyan on binlerce B lenfosit tipi bulundurur [23].

2.5.3. Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer-NK)

NK'lar MHC molekülleri tarafından bir kısıtlama gerektirmeden, direkt olarak hedef hücreleri öldürebilen büyük granüositler olarak tanımlanırlar. NK hücreleri en iyi sitotoksik fonksiyonları ve uyarıldığında sitokin üretme yetenekleri ile karakterize edilir. NK'ların en önemli görevi tümör hücreleri, virüs, bakteri ve parazitlere karşı doğal immün sistemin ilk basamağını oluşturmaktır. NK hücreleri immün sistemdeki görevlerini sitokin salgılanması yoluyla yerine getiriler [24].

2.5.4. Makrofajlar

İmmün yanıtta görev alan, vücutta bulunan yabancı maddeleri fagosite ederken T ve B lenfositlere monokin adı verilen sitokini üreterek yardımcı olan hücrelerdir. Vücuttaki yabancı antijenleri fagosite edip lenfositlere tanıtırlar. Makrofajların lenfositlerden farkı daha önceden karşılaştığı antijeni tanımazlar ve tekrardan aktifleşirler [25].

2.5.5. T ve B Lenfositlerin Yüzey Farklılaşma Antijenleri

Tüm hücrelerin yüzeyinde kendine özgü hücre yüzey antijenleri bulunur. Bu antijenler: *CD3*, genellikle alfa ve beta T hücre reseptörü (TCR–T cell receptor) ile iletişim halindedir. Sitoplazmik uzantıları TCR'lerden uzundur. TCR tarafından algılanan sinyali çekirdeğe iletmekten sorumludur. *CD4*, yardımcı T lenfositlerin yüzeyinde bulunur ve yüzeylerinde MHC-II molekülleri bulunan hücelere bağlanıp yardımcı T lenfositleri uyarır. *CD8*, MHC-I içeren hücrelerle iletişim kurarak T lenfositlerini uyarır, sitotoksik T lenfositlerin yüzeyinde bulunan hücre adhezyon molekülüdür. *CD16*, *CD56^{dim}* taşıyan NK hücrelerinde daha

yüksek miktarlarda ve $CD56^{bright}$ taşıyan NK hücrelerinde daha düşük miktarlarda bulunan hücre yüzey molekülüdür. $CD56$, NK hücrelerinin alt gruplarında değişen seviyelerde ifade edilen bir hücre yüzeyi molekülüdür. $CD56^{dim}$ NK hücreleri tamamen olgundur ve periferik kandaki NK hücrelerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Sitotoksik yani hücre öldürücü yanıtta sorumludur ve antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksistide rol alır. $CD56^{bright}$ NK hücreleri, ağırlıklı olarak dokularda ve ikincil lenfoid organlarda bulunan olgunlaşmamış bir gruptur. $CD56^{bright}$ çoğalma ile ilgilidir ve sitotoksik aktivitesi azdır. $CD25$, birçok otoimmün hastalığın patogeneziinde rol alabileceği ve miktarının $CD4$ pozitif T hücrelerinde yüksek olduğu yapılan bazı çalışmalarla belirlenmiştir. $CD19$, B hücrelerin aktive olabilmeleri için gereklidir. Antijenik uyarı durumunda T hücrelerin yüzeyindeki $CD21$ ile bağlanmasıyla B hücre reseptörlerinde bulunan sinyal iletim sistemini güçlendirir [26]. $CD127$, Hafıza T hücreleri Yüzeyinde yüksek düzeyde IL-7 reseptörü ($CD127$) bulunur [27]. $CD45$, akım sitometrik değerlendirmede kullanılan oldukça önemli bir parametre olup ortak lökosit antijeni olarak isimlendirilir. $CD45$, hematopoietik kökenli hücreleri ayırt etmede kullanılan en faydalı belirteçlerden biridir [28]. $CD57$, T hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin alt kümelerinde bulunur [29].

2.6. HLA Genlerinin İsimlendirilmesi, Sınıflandırılması ve Kalıtımı

Bir kişinin bağışıklık direnci genler tarafından belirlenir. Kendinden olmayan antijenlerden kendi antijenlerinin tanınması, MHC tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir ve ebeveynlerden miras alınan genotipe bağlıdır. Bir türün hayatta kalması açısından, antijenlerin immünolojik olarak tanınması, vücudu yabancı patojenlere karşı koruyan son derece önemli bir biyolojik işlevdir. Bununla birlikte, verici antijenlerinin konakçının bağışıklık hücreleri tarafından saptanması ve ardından transplant reddi istenmeyen bir sonuçtur. Koruma genlerinin, evrim sırasında Homo Sapiens türlerinin korunmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Koruyucu genlere sahip bireyler, patojenlere karşı daha hızlı humoral ve hücreli tepkiler geliştirir. Bu genler, yabancı antijenlerin belirli lenfosit sınıflarına tanınması ve sunulmasında yer alan MHC/HLA sınıf I ve II sistemlerinin gen ürünleriyle yakından ilişkilidir [30].

IMGT (immunogenetics)/HLA veritabanı (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>), HLA alellerini kaydetmek, eşleştirmek ve adlandırmak için bir dizi tablo ve araç içerir. Düzenli olarak güncellenir ve terminolojiyi standart hale getirmek için uluslararası komite periyodik olarak toplanır. Son yıllarda, isimlendirme, çok sayıda yeni alelleri barındırmak için kapsamlı bir güncellemeden geçmiştir. Özetle, her lokusun kendi sembolü ve ardından bir yıldız işareti vardır (HLA-A*,HLA-DRB1* vb.). Bunları, iki nokta üst üste ile ayrılmış dört basamağa kadar benzersiz sayılar olan alel atamaları takip eder. İlk dört basamak en sık kullanılanlardır ve dört basamaklı yazma olarak adlandırılır. Çoğu durumda, ilk iki basamak allotip tarafından taşınan serolojik antijenin tipini gösterir (HLA-A*02). Daha sonra, amino asit dizisinde farklılığı gösteren alt türleri (HLA-A*02:02 ve HLA-A*02:03 gibi) temsil eden bir sonraki basamak grubundan iki nokta üst üste işareti ile ayrılır. Başka bir sütundan sonra, eşanlamı (sessiz) nükleotid ikameleri için üçüncü bir sayı kümesi kullanılabilir ve intronik bölgelerdeki değişiklikler için dördüncü bir küme kullanılabilir. Gizli (S), sitoplazmik (C), anormal (A), boş (N), düşük (L) ekspresyonu olan şüpheli (Q) proteinleri belirtmek için son ekler de eklenebilir [31].

Çizelge 2.1. HLA Nomenklatürü [32].

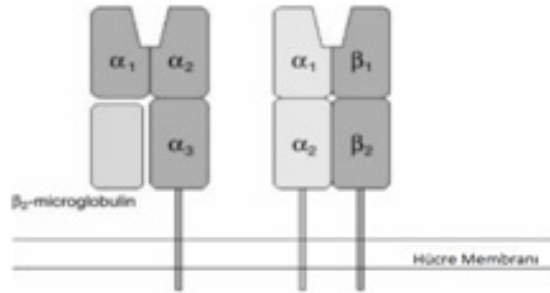
Doku Tipi İsimlendirmesi	Anlamı
HLA	Gen Bölgesi
HLA-B	Gen Lokusu
HLA-B*44	Belirli Aleli Kodlayan Bölge
HLA-B*44:02	Spesifik Alelin Alt Tipi

Günümüzde, insan MHC gen bölgesinde güncel HLA alel sayıları toplamda 33.490 alel içerir. Bu alellerin 24.308 tanesi Class I alelleri, 9182 tanesi ise Class II alelleridir [33] [33]. HLA alelleri kodlanmış proteinlerin özelliğine göre çeşitli bölgelere ayrılır. Bunlardan böbrek nakli ile ilgili olan HLA sınıf I ve sınıf II'dir. [9]. Böbrek nakli ile alakalı HLA sınıf I gen bölgesi A, B lokuslarını, sınıf II gen bölgesi ise DR lokusunu içerir. Bir bağışıklık tepkisi oluşurken HLA gen bölgeleri T hücelere antijen sunar. Bu antijen sunma T hücre alt gruplarında farklılıklar gösterir. CD8 pozitif sitotoksik T hücelere sınıf I HLA molekülleri, CD4 pozitif yardımcı T hücelere ise sınıf II molekülleri antijen sunar. Antijen sunma

olayında sınıf III HLA molekülleri yer almaz [4]. HLA molekülleri, T hücrelerine sunulmak üzere antijenik peptitleri bağlayan zara bağlı glikoproteinlerdir [34].

MHC sisteminde, sınıf I ve sınıf II bölgelerinde bulunan HLA-A, B, C, DRB1, DQ, DP lokuslarını kodlayan 20.000'den fazla farklı fakat yakından ilişkili alel vardır. HLA molekülleri, bağışıklık tepkisini modüle etmek ve hangi hücrelerin kendileri olarak tanınacağını belirlemek için timustaki T hücresi reseptörleri ile etkileşime girer [35, 36].

MHC Sınıf I, HLA-A, B ve C lokuslarını içerir. Sınıf I proteinler, tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde farklı derecelerde eksprese edilir ve α_1 , α_2 ve α_3 olarak adlandırılan üç hücre dışı alana sahip bir transmembran ağır zincir ile ağır zinciri sitoplazmik membrana sabitleyen bir β_2 -mikroglobulin hafif zincirinden oluşur. Ekson 2 ve 3 tarafından kodlanan α_1 ve α_2 segmentleri, peptit antijenlerini CD8 pozitif T lenfositlerine sunan bir peptit bağlama oluğu oluşturur [35, 36]. HLA'ların moleküllerinin yapısı Şekil 2.2' de gösterilmiştir.



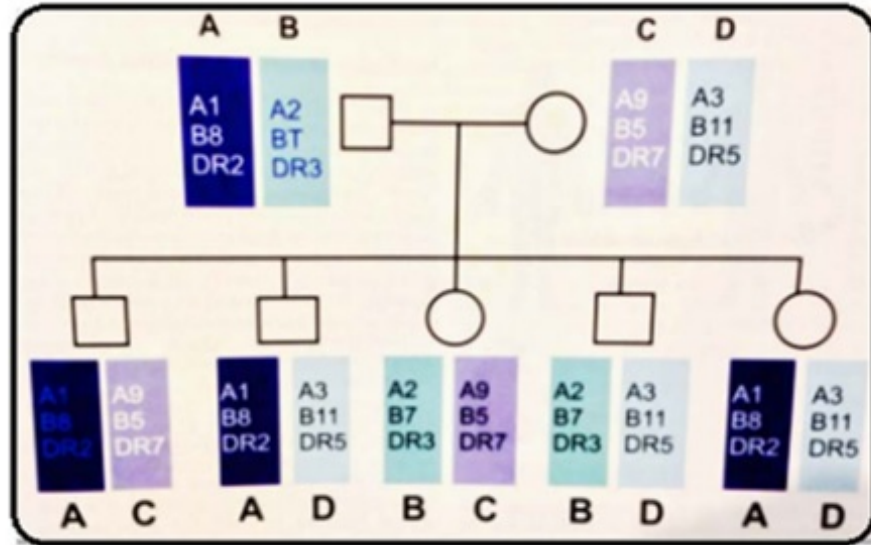
Şekil 2.2. Bilgisayarlı HLA sınıf I (solda) ve HLA sınıf II (sağda) molekülleri. Her iki molekülün de peptitleri T hücre reseptörlerine sunulmak üzere bağlayan peptit bağlama oluğu vardır [37].

MHC Sınıf II, HLA-DP, DQ ve DRB1 lokuslarından oluşur. Bu proteinlerin ekspresyonu, B hücreleri, aktive edilmiş T hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve timik epitel hücreleri dahil olmak üzere spesifik immün hücrelerle sınırlıdır. Sınıf II proteinler bir alfa zinciri ve bir beta zincirinden oluşur. α ve β zincir genleri ayrı ayrı belirtilir; örneğin, HLA-DQ proteinini kodlayan iki gen, HLA-DQA1 ve HLA-DQB1'dir. Her α ve β zincir proteini, sırasıyla α_1 ve α_2 ve β_1 ve β_2 olarak adlandırılan iki tane hücre dışı alan içerir. HLA-DRB1' de sınıf II proteinlerin β zinciri, nispeten korunmuş α zincirinden daha polimorfiktir. HLA-DQ ve -DP'de ise hem α hem de β zincirleri polimorfiktir. Peptit bağlama oluğu, α ve β genlerinin

ekson 2'si tarafından kodlanan $\alpha 1$ ve $\beta 1$ segmentleri tarafından oluşturulur. MHC Sınıf II proteinleri, peptitleri *CD4* pozitif T lenfositlerine sunar. Hem Sınıf I hem de Sınıf II moleküller, T lenfositlere kısa peptitler sunar; Sınıf I MHC, doğal proteinlere ek olarak mutasyona uğramış, hasar görmüş, bozulmuş veya yanlış katlanmış proteinler ve ayrıca *CD8* pozitif T lenfositler ve viral proteinler dahil olmak üzere endojen olarak üretilmiş peptitler sunar. MHC sınıf II, bakteriyel proteinler gibi eksojen olarak üretilen peptitleri *CD4* pozitif T lenfositlerine iletir [38].

2.7. HLA Antijenlerinde Kalıtım

Kromozomların üzerindeki genleri ifade ederken haplotip kelimesi kullanılır ve genellikle bu kullanım MHC sistemine özgüdür. Bir bireyin HLA genotipinde iki haplotip bulunur. Bütün haplotipler Mendel kurallarına uygun bir şekilde kalıtılır. HLA genlerinde biri anneden biri babadan gelen 2 haplotip vardır ve bu haplotipler kodominant olarak kalıtılır ve bu haplotiplerden herhangi birisini çocuklarına geçebilir. Bir çocukta her farklı haplotip görülme olasılığı %25'tir. Şekil 2.3'te HLA Antijenlerinin kalıtımı gösterilmiştir [9].



Şekil 2.3. HLA moleküllerinin kalıtımı (A9, B5, DR7 bir haplotiptir) [9].

2.8. Doku Tipleme Analiz Yöntemleri

2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, birçok protokolün ayrılmaz bir parçasıdır ve moleküler biyolojide anahtar bir tekniktir. PCR, son derece küçük miktarlardaki DNA'yı, doğrudan veya başka uygulamalar için kullanılabilir büyük miktarlara dönüştürür [39]. Temel PCR prosedürleri değiştirilmiş, genişletilmiş ve çok çeşitli problemlere ve tekniklere uygulanarak çok uzun bir spesifik uygulama listesi oluşturulmuştur. Mitotik hücre bölünmesi sırasında, her yeni somatik hücre için genomun bir kopyası oluşturulur. Bu işlem sonrasında DNA miktarı iki katına çıkar ve iki hücre arasında eşit olarak paylaşılır. Orijinal bir tek progenitör hücredeki tek bir genom kopyası, tamamen olgun bir organizmada milyarlarca kopyaya dönüştürülür. PCR, çok düşük DNA konsantrasyonlarını çok yüksek konsantrasyonlara dönüştürmek için benzer ilkelere ve bu işlemin izole edilmiş elemanlarına dayanır [40]. PCR' nin birçok bileşeni vardır. Bu bileşenlerden ilki şablondur. Kopyalanacak olan DNA şablon olarak adlandırılmıştır. DNA'nın yapı taşları olan deoksiniükleotit trifosfatlar (dNTP'ler) dört nükleotid, adenin trifosfat (ATP), timin trifosfat (TTP), guanin trifosfat (GTP) ve sitozin trifosfat (CTP) PCR'nin diğer bileşenlerindedir. Bir diğer önemli bileşen ise nükleotidleri birleştirerek şablonun ayna görüntüsünü oluşturacak enzim olan Taq DNA polimerazdır. PCR içerisinde; oligonükleotid primerlerine ek olarak hedef DNA'yı tamamlayıcı olan DNA polimerazın bağlandığı ve DNA sentezini başlattığı bir DNA dizisine uygun iyonik kuvvet ve pH değerine sahip bir tampon solüsyonu eşlik etmektedir. PCR' da kullanılan Taq DNA polimeraz ısıya dayanıklı termofilik bakteri *Thermus aquaticus*'tan türetilir. Termal stabilite, enzimin DNA'yı denatüre etmek için gereken ısıya dayanmasına ve nispeten yüksek sıcaklıklarda aktif kalmasına izin vererek, primer özgülüğünü artırır [41].

PCR' nin üç temel adımı vardır. 1. Adım, DNA zincirinin açılması (Denaturation)'dır. PCR bileşenlerini içeren çok küçük bir tüp olan PCR tüpü 94-96 °C'ye ısıtılır. Bu, iki tamamlayıcı ipliği ayırarak DNA'yı denatüre eder. 2. Adım, Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing)'dir. Tüp, DNA primerlerinin baz eşleşmesi yoluyla hedef dizilerine

bağlanmasına izin vermek için soğutulur. Primer DNA dizisi hedefi tamamlayıcıdır. 3. Adım ise Primer Uzaması (Primer Extension)' dir. DNA polimeraz, DNA primerlerine bağlanır ve ardından şablonu okurken primerleri birer birer bir nükleotit uzatır ve şablonu tamamlayan nükleotitleri ekler. Örneğin, şablon iplikte bir "A" varsa, DNA polimeraz yeni sentezlenmiş iplikte tamamlayıcı konumda bir "T" ekler. Bu işlem bir dizi döngü boyunca tekrarlanır ve hedef DNA'nın konsantrasyonu katlanarak artar. Örneğin, amplifikasyon için hedefin tek bir kopyası mevcutsa, bir PCR döngüsü, hedef sayısını iki katına çıkararak tek bir kopya oluşturacaktır. İkinci PCR döngüsünde, hedef sayısını dört katına çıkaracak şekilde kopyalanabilecek iki hedef olacaktır. Daha sonraki döngülerde hedef DNA'yı sürekli ikiye katlayacak şekilde çoğalmalar devam eder. Yüksek PCR verimliliği ve her döngüde şablon DNA'nın iki katına çıktığı varsayıldığında, nihai hedef molekül sayısı $Y = X(2^n)$ olur. Burada "X" ilk döngüdeki hedef sayı, "n" döngü sayısı "Y", hedef moleküllerin son sayısıdır, bu nedenle PCR, hedef DNA miktarını 225–235 kez çoğaltabilir [40, 41].

2.8.2. Diziyeye Özgü Oligonükleotid Testi (SSO-Sequence Specific Oligonucleotide)

Geliştirilen ilk PCR tabanlı HLA tiplene yöntemlerinden biridir ve sekansa özgü oligonükleotid prob testidir. Genellikle diziyeye özgü primer tahlillerden (SSP- Sequence Specific Primer) açıkça ayırt etmek için SSO şeklinde kısaltmayla ifade edilir. Bu yöntem sınırlı sayıda bilinen HLA alelini tamamlayan kısa (yaklaşık 20 nükleotid) problemler kullanır. Hasta örneğinden DNA elde edildikten sonra, belirli bir lokusun alellerini çoğaltacak spesifik primerler seçilir ve bir polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilir. Geleneksel SSO' da, kopyalanan ürün tek iplikler halinde denatüre edilir ve zara bağlanır. Membran daha sonra farklı SSO problemleri ile hibridize edilir. Çoğaltılmış DNA dizisi, oligonükleotid probu için tamamlayıcı ise, hibridizasyon meydana gelir. Hibridize ürün/prob, kemilüminesan veya kolorimetrik yöntemler kullanılarak tespit edilir ve HLA tipi belirlenir [42]. Şu anda kullanılan SSO yönteminin en yaygın uyarlaması, akış sitometrik boncuk tabanlı testtir. Örnek DNA, spesifik SSO problemleri ile bağlanıp floresan etiketli boncuklarla çoğaltılır ve inkübe edilir. Örnek DNA, prob dizisini tamamlarsa, boncuğa bağlanır. Bağlanan ürün, fitoeritrin (PE) gibi bir tespit etiketi ile etiketlenir ve bağlanma, akış sitometrisi veya floresan

sitometrisi kullanılarak tespit edilir. Akış sitometresi, boncuk etiketinin özgülüğünü ve PE sinyalinin gücünü algılar [43]. Bu yöntem birkaç nedenden dolayı avantajlıdır. Bu yöntem birkaç nedenden dolayı avantajlıdır. Kit bazlı çok sayıda ticari analiz mevcuttur ve yüksek oranda tekrarlanabilir sonuçlar sağlar. Dizi tabanlı testlerle karşılaştırıldığında geri dönüş süreleri nispeten kısadır. SSO ölçeklenebilirdir ve tek numune testinin yanı sıra aynı anda çok sayıda hastayı toplu olarak test etmek için kullanılır. Önceki SSO testleri yalnızca düşük çözünürlüklü tiplere sunuyordu. Günümüzde yüzlerce prob içeren daha yeni kitler de mevcuttur. Bu testler orta ila yüksek çözünürlüklü doku tipi sonucunu güvenilir bir şekilde sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, çok sayıda HLA aleli nedeniyle, SSO, daha fazla test gerektiren belirsiz tiplere sonuçlarına yol açabilir. En yaygın olarak kullanılan ticari kitler, yalnızca peptit bağlanma bölgelerinde nispeten kısa dizilere bağlanan problemleri içerdiğinden, bu alanların ötesinde farklılık gösteren alelleri ayırt etmek için ek testler gereklidir. Spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için çalışma prosedürlerine sıkı sıkıya bağlı kalınması gerekir [44].

2.8.3. Panel Reaktif Antikor (PRA- Panel Reactive Antibody)

Transplantasyondan önce donöre özgü HLA antikorlarının varlığı, genellikle erken ve geç antikor aracılı rejeksiyon ve zayıf uzun süreli allogreft sağ kalımı için bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir [45]. Ayrıca bu antikorlara karşı duyarlılık seviyeleri arttıkça transplantasyon için bekleme süresi artar [46]. Bu nedenle, ön duyarlılık seviyelerini belirlemek ve çapraz eşleşme negatif bir organ alma olasılığını tahmin etmek için transplantasyondan önce PRA testi yapılır. Böbrek nakli alıcı adaylarında duyarlılık ölçüsü PRA'dır. HLA antikor tespitinin duyarlılığı, kullanılan yöntemle bağlantılı olarak büyük ölçüde değişir. Son yıllarda, HLA antikorlarının tespit ve tanımlama teknolojisi ilerleme kaydetmiştir. Katı faz testleri, geleneksel sitotoksikite testlerinden daha fazla hassasiyet ve özgüllük sunar. Luminex platform yöntemi, katı faz testlerinin en hassası olarak kabul edilir. HLA alloimmünitesi, kan transfüzyonu, hamilelik veya transplantasyon gibi çeşitli duyarlılaştırıcı olaylardan kaynaklanabilir [47].

İmmün risk sınıflandırması, böbrek nakli alıcılarında indüksiyon seçimini ve immünsüpresyonun sürdürülmesini yönlendirmek için gereklidir. Daha genç alıcı yaşı, önceki nakil öyküsü, alıcının soyları ve donör ile alıcı arasındaki HLA eşleşmesinin derecesi, bağışıklık riskinin tipik klinik göstergeleridir. Ek olarak, PRA değerlendirmesi, immün risk sınıflandırmasında sıklıkla kullanılır. Çalışmalar, yüksek PRA seviyelerinin, artan reddedilme riski ve uzun vadeli greft kaybı ile ilişkili olduğunu göstermiştir, bu da yüksek PRA seviyelerinin bağışıklık riskinin genel bir göstergesi olduğu fikrini desteklemektedir. Buna göre, nakil öncesi PRA' ya dayalı immünosupresif tedavi protokolleri, klinik deneylerde yaygın olarak uygulanmaktadır [48].

2.9. Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi, tekli veya çoklu lazerlerden geçerken tamponlu tuz bazlı bir solüsyonda asılı duran tek hücreleri veya parçacıkları hızla analiz eden bir teknolojidir. Her parçacık görünür ışık saçılması ve bir veya birden fazla floresan parametresi açısından analiz edilir. Görünür ışık dağılımı, hücrelerin göreceli boyutunu gösterebilen ileri saçılım (FSC, Forward Scatter) ve hücrelerin iç karmaşıklığını veya tanecikliliğini gösterebilen 90°'de yan saçılım (SSC, Side Scatter) olmak üzere iki farklı yönde ölçülür. Işık saçılımı floresandan bağımsızdır. Akış sitometrisi, immünoloji, viroloji, moleküler biyoloji, kanser biyolojisi ve bulaşıcı hastalık izleme gibi birçok disiplinde uygulamaları olan güçlü bir araçtır. Örneğin, bağışıklık sisteminin incelenmesi, bulaşıcı hastalıklara ve kansere karşı bağışıklık tepkisinin anlaşılabilmesi açısından çok etkilidir. Lenf düğümleri, dalak, mukozal dokular, katı tümörler vb. gibi tek hücrelere ayrılabilen katı dokulara ek olarak kan ve kemik iliğinden oluşan karışık hücre popülasyonlarının eşzamanlı karakterizasyonuna izin verir. Akış sitometrisinin önemli bir uygulaması da hücre popülasyonlarının analizine ek olarak daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere hücreleri tek tip popülasyonlara ayırmaktır.

Akış sitometrisi en yaygın olarak immünofenotipleme için kullanılır. Bu uygulama ile karışık bağışıklık hücre popülasyonlarının birden çok parametresini aynı anda analiz etmeye olanak sağlar. İmmünofenotipleme, uygun (fluorochrome-conjugated) antikorlar ile boyanmış hücre

grubundan oluşur ve bu antikorlar hücrenin yüzeyinde bulunan antijenleri hedef alarak bağlanmayı gerçekleştirir. Bu antijenlere spesifik olarak bağlanan antikorlar için ortak bir isimlendirme kullanılır. Bu isimlendirme İnsan Lökosit Farklılaşma Antijeni (HLDA) tarafından atanır ve farklılaşma kümesi (*CD*- Cluster of Differentiation) adı verilir. Örneğin *CD3* farklılaşma kümesi denildiğinde tüm T hücreleri içeren düşünülür ve 3 numaralı farklılaşma kümesidir. Bağışıklık hücrelerinin çoğu kendi hücre popülasyonunu tanımlayan özel *CD* belirteçlerini içerir. Hücresel belirteçlerin analizi yapılırken ek analiz yapılmak istenmesi durumunda farklı numaralı farklılaşma kümeleri elde edilir. Örnek olarak T hücre belirteci olarak *CD4*, *CD8* ve *CD3*, B hücre belirteci olarak *CD19*, doğal katil hücre popülasyonu için ise *CD16* ve *CD56* verilebilir. Genellikle, immünofenotipleme antijene özgü belirteçler (majör histouyumluluk veya MHC Tetramerleri) gibi hücre içi belirteçleri de içerir. Mevcut aletler ve reaktifler 28 renkli immünofenotipleme testlerini gerçekleştirebilir, ancak testler daha yaygın olarak 12-15 renk aralığında gerçekleştirilir [49].

2.9.1. Antijene Özgü Tepkiler

Antijene özgü tepkiler, immün hücrelerini spesifik bir antijenle uyararak ve daha sonra MHC multimerleri aracılığıyla sitokin üretimi, proliferasyonu, aktivasyonu, belleği veya antijen tanımayı arayarak ölçülebilir. MHC multimerleri, genellikle biyotinlenmiş ve daha sonra floresan streptavidin omurgasına 4 (tetramer), 5 (pentamer) veya 10 (dekstromer) olarak bağlanan MHC monomerleridir (MHC-I veya MHC-II). Bu MHC multimerleri, tercih edilen antijenle yüklenir ve daha sonra antijeni tanıyan T hücrelerine bağlanmak için kullanılır, böylece spesifik bir antijene tepki seviyesini gösterir [49].

İmmünofenotiplemenin standardizasyonu, reaktiflere, numune kullanımına, cihaz kurulumuna ve veri analizine dikkatli bir şekilde dikkat edilmesini gerektirir ve başarılı çapraz çalışma ve verilerin merkezler arası karşılaştırması için esastır [50].

2.10. Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)

Böbrek fonksiyonunda veya yapısında, geri dönüşü olmayan, yavaş ve kademeli evrimi ile karakterize edilen bir klinik sendrom KBH olarak tanımlanır. Böbrek yapı ve işlevini etkileyen heterojen bozukluklar kronik böbrek hastalığı olarak ifade edilir [51]. Böbrek yetmezliği, fonksiyon kaybı ve bunun sonucunda kanda metabolitlerin birikmesi ile ortaya çıkar, vücuttaki sıvı ve elektrolit dengesi bozularak ciddi sağlık sorunlarına yol açar [52, 53]. Böbrek fonksiyonunda birkaç yıl içerisinde kademeli olarak gerçekleşen kayıp (KBH) veya kronik böbrek yetmezliği (KBY) olarak adlandırılır. Bu hastalarda oluşan semptomlar genel olarak çok çok hafiftir ve uzun süre fark edilmez. Hastalık sonucu oluşan bu semptomlar geç olduğundan sorun fark edilemeyebilir ve durumun tersine çevrilmesi zor hale gelir [54].

Glomerüler filtrasyon hızı (GFR-Glomerular Filtration Rate), böbreklerden süzülen sıvının akış hızını tanımlar [55]. Yetişkin bir birey düşünüldüğünde en az üç ay veya üç aydan daha fazla olan süre boyunca glomerüler filtrasyon hızı (GFR) $60 \text{ mL/dk}/1.73 \text{ m}^2$ 'den düşük veya GFR'nin $60 \text{ mL/dk}/1.73 \text{ m}^2$ 'den büyük ve böbrek yapısında bir hasarlanma kanıtı olduğunda KBH olarak tanımlanır. Böbrek hasarının bazı göstergeleri arasında albüminüri, böbrek görüntülemeindeki değişiklikler, hematüri/lökositüri, kalıcı hidroelektrolit bozukluklar, böbrek biyopsisinde histolojik değişiklikler yer alır. Albüminüri, 24 saatlik idrarda 30 mg 'dan fazla albumin veya idrar kreatinin ile ayarlanan izole bir idrar örneğinde 30 mg/g 'dan fazla albumin varlığı ile tanımlanır. Çeşitli hastalıklar KBH'ye neden olabilir. Bunlardan bazıları hipertansiyon, otoimmün hastalıklar, diyabet olarak sıralanabilir [56].

KBH, aşağıdaki çizelgelerde gösterildiği gibi GFR' ye göre beş evre, albüminüriye göre üç evre olarak sınıflandırılır:

Çizelge 2.2. KBH aşaması; GFR=Glomerüler Filtrasyon Hızı [56].

Aşama	GFR değeri mL/dk/1.73m ²	Sınıflandırma
I	>90	Yüksek
II	60-89	Biraz azalan
IIIA	45-59	Hafif veya orta derecede azalan
IIIB	30-44	Orta veya ciddi derecede azalan
IV	15-29	Ciddi derecede azalan
V	<15	Böbrek yetmezliği

Çizelge 2.3. Albüminüri kategorileri; izole idrar örneklerinde A/C oranı=Albümin/ Kreatinin oranı [56].

Kategori	24 - Saatlik Albüminüri mg/24 saat	A/C Oranı mg/g	Sınıflandırma
A1	<30	<30	Normal
A2	30-300	30-300	Orta
A3	>300	>300	Şiddetli

Örneğin, diyabetik nefropatisi olan bir hastanın GFR değeri=42 mL/dk ve üç aydan uzun bir süredir 200 mg/24 saatlik albüminürisi varsa, KBH evre IIIB A2 hastası olarak sınıflandırılır. Albüminüri değeri 30-300 mg/g arasında ise “mikroalbüminüri”, 300 mg/g’den büyükse “makroalbüminüri” olarak adlandırılır. Türkiye’de yetişkin bireylerde KBH prevalansı 2018 yılında yapılan bir çalışma ile yüzde 15,7 bulunmuştur. Bu çalışmadan yola çıkarak her 6-7 yetişkin bireyden birinde farklı evrelerde böbrek yetmezliği söz konusudur. GHF değeri yüzde 5.1 olarak bulunan hasta oranından dolayı yirmi yetişkin bireyden birinde ileri düzeyde KBH varlığından söz edilebilir. Yüzde olarak mikroalbüminüri oranı 10.2, makroalbüminüri oranı 2 olan yetişkin bireylerde bu değerler hasar göstergesi olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak KBH’nin Türkiye’de ve dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca Türkiye’de yapılan “Chronic Renal Disease In Turkey (CREDIT)” çalışma sonuçları kadınlarda görülen KBH prevalansı erkeklere oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir. Benzer sonuçlar Hill ve arkadaşlarının yayınladığı bir çalışmada da saptanmış dünya genelinde KBH sıklığı erkek bireylerde yüzde 12.8 iken kadın bireylerde yüzde 14.6 olarak bulunmuştur [57, 58].

2.11. Kan Grubu Antijenleri

ABO kan grubu sistemi, kırmızı kan hücresi zarlarının dış yüzeyinde ifade edilen karmaşık karbonhidrat moleküllerinden oluşur. A ve B alelleri, A ve B antijenlerini oluşturmak için H yapısına özgü monosakkaritleri (A=N-asetilgalaktozamin, B=D-galaktoz) bağlayan farklı glikosiltransferazları kodlar. O aleli fonksiyonel bir enzimi kodlamaz, bu nedenle O antijeni değişmemiş H yapısından oluşur. ABO antijenleri ayrıca epitelde, duyu nöronlarında, trombositlerde ve vasküler endotelde de eksprese edilir [59].

A ve B antijenleri, kodominant otozomal olarak Mendel kurallarına göre kalıtılır. Epstein ve Ottenberg 1908 yılında ABO kan gruplarının katılsal olabileceğini öne süren ilk kişilerdir. Bu daha sonra 1910 yılında Von Dungern ve Hirsfeld tarafından kanıtlanmıştır. ABO kalıtımı babalık testinde ve adli tıpta kullanılan ilk genetik belirteçlerden biridir [60].

ABO kan grubu, kırmızı kan hücrelerinin yüzeyindeki A ve B antijenlerinin ve serumdaki anti-A veya anti-B antikorlarının varlığı ile belirlenir. Yani, A kan grubunun kırmızı kan hücrelerinde antijen A ve anti-B antikorları içeren serum bulunur. Aynı şekilde B kan grubu da antijen B ve anti-A antikorlarına sahiptir. AB kan grubu hem A hem de B antijenlerini içerir, ancak antikor içermez. O kan grubu antijenine sahip değildir, ancak anti-A ve anti-B antikorları içerir. Anti-A ve anti-B antikorları genellikle IgM (immünglobulin M) tipindedir ve yeni doğanlarda bulunmaz ancak yaşamın ilk yılında ortaya çıkar. A ve B antijenlerine yapısal olarak benzeyen gıda ve çevresel antijenlere (bakteriyel, viral veya bitki antijenleri) karşı antikorlar oluşturulabilir [61].

Böbrek nakli için verici ve alıcı arasındaki ABO kan grubu sistemi uyumlu olmalıdır, uyumluluk kuralları kan transfüzyonu ile aynıdır (grup O genel vericiler, AB genel alıcılar) ancak Rh sistemi önemli değildir. Son yıllarda ülkemizde kan grubu uyumu olmaksızın böbrek nakilleri yapılmaktadır [62]. ABO uyumlu olmayan böbrek transplantasyonu ile ilgilenen önde gelen merkezler, hastalar ve transplantlar için ABO uyumlu transplantasyonla karşılaştırılabilir sağ kalım oranları yayınlamıştır. Bu güven verici sonuçlar, ölen donör böbrekleri için daha uzun bekleme süreleri ve mevcut canlı donör eksikliği ile birleştiğinde, ABO-uyumsuz nakillerin yaygın olarak benimsenmesine yol açmıştır. Son çalışmalar, ABO uyumlu ve ABO uyumlu olmayan böbrek transplantları arasında greft ve hasta sağkalımında önemli bir fark olmadığını göstermiştir [63].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar ve kullanılan malzemeler açıklanmıştır. Deneysel çalışmalar 2 temel aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama retrospektif olarak Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'na son 10 sene (2012-2022) içinde gelen PRA pozitif ve PRA negatif KBY hastalarının HLA profilleri geçmişe yönelik tarama şeklinde çıkarılmıştır. İkinci aşamada ise retrospektif çalışma sonucunda elde edilen PRA pozitif ve negatif hastalardan alınan yeni kan örneklerinden akış sitometri cihazı (Beckman Coulter Navios-model 3, Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA) yardımıyla NK, T lenfosit, B lenfosit aktivasyonu incelenmiş ve dağılımları ortaya çıkarılmıştır.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar

Bu tez çalışması kapsamında, retrospektif olarak Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı'na 2012–2022 tarihleri arasında gelen HLA ve PRA testi yapılan hastalar dahil edilmiştir. PRA Test sonucu pozitif olan hastalar PRA Pozitif, negatif olan hastalar PRA Negatif olarak adlandırılmıştır. PRA Pozitif ve PRA Negatif KBY hastalarının HLA profilleri incelenerek hastalar belirlenmiştir. Belirlenen hastalardan alınan kan örnekleri ile prospektif olarak bu tez çalışması tamamlanmıştır.

DNA izolasyonu için kullanılan DNA izolasyon kiti Qiagen (Almanya), Lifecodes Nuclease-Free su Lifecodes (Amerika) kullanılmıştır. İzolasyonu için EZ1 Advanced XL (Qiagen, Almanya) cihazı ve spektrofotometrik ölçümler için Thermo Scientific (United Kingdom) cihazı kullanılmıştır. Doku tiplendirme çalışmasında, Lifecodes firmasına ait HLA-A eres SSO typing kit, HLA-B eres SSO typing kit, HLA-DRB1 eres SSO typing kit, Taq Polimeraz, Streptavidin-PE (SA-PE), Luminex Sheath Fluid (1x veya 20x) kimyasalları ile Termocycle (Sensequest, ATQ; Almanya) ve Luminex (Luminex®xMAP; Austin, Amerika) cihazları kullanılmıştır. PRA çalışmalarında Lifecodes firmasına ait LifeScreen

Boncukları, konsantre konjugat, yıkama tamponu, pozitif kontrol Serum, pozitif kontrol serumu, negatif kontrol serumu kimyasalları ile Luminex (Luminex Fluoroanalyzer 200, Luminex Corporation, Texas, Amerika), vorteks (Jeiotech, Kore), çalkalayıcı (Euroclone, Amerika) ve vakum (Millipore, Amerika) cihazları kullanılmıştır. Akış sitometrisi çalışmasında *CD56-PE*, *CD19-ECD*, *CD57-Pacific Blue*, *CD4-PC5*, *CD3-APC Alexa Flour 750*, *CD25-APC Alexa Flour 700*, *CD127-FITC*, *CD8-PC7*, *CD45-Krome Orange*, *Anti-HLA – DR-APC*, *CD16-PE* kimyasalları kullanılmıştır. Çalışmalar Flow Sitometri (Beckman Coulter In Navios, Amerika) cihazı ile yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve cihazlar aşağıda çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Malzeme	Şirket	Ürün Kodu
DNA İzolasyon Kiti	Qiagen	951034
Lifecodes Nuclease-Free Su (20mL)	Lifecodes	757003

Çizelge 3.2. DNA izolasyonunda kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
DNA İzolasyon Cihazı	EZ1 Advanced XL, Qiagen, Almanya
Spektrofotometre	Thermo Scientific, UK

Çizelge 3.3. Doku tiplendirme çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Malzeme	Şirket	Ürün Kodu
Lifecodes HLA-A Eres SSO Typing Kit	Lifecodes	628913
Lifecodes HLA-B Eres SSO Typing Kit	Lifecodes	628917
Lifecodes HLA-DRB1 Eres SSO Typing Kit	Lifecodes	628925
Lifecodes Taq Polimeraz	Lifecodes	628075
Streptavidin-PE (SA-PE)	Lifecodes	628511
Lifecodes Luminex Sheath Fluid (1x veya 20x)	Lifecodes	B55159

Çizelge 3.4. Doku tiplendirme çalışmasında kullanılan cihaz

Cihaz	Marka
Luminex Cihazı	Luminex Fluoroanalyzer 200, Luminex Corporation, Texas, USA

Çizelge 3.5. PRA çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Malzeme	Şirket	Ürün Kodu
Lifescreeen Boncukları (LifeScreen Beads)	Lifecodes	628215
Konsantre Konjugat (Conjugate Concentrate)	Lifecodes	628215
Pozitif Kontrol Serum (Positive Control Serum)	Lifecodes	628215
Negatif Kontrol Serum (Negative Control Serum)	Lifecodes	628215
Yıkama Tamponu (Wash Buffer)	Lifecodes	628215

Çizelge 3.6. PRA çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
Vorteks	Jeotech
Çalkalayıcı (Shaker)	Euroclone
Vakum	Millipore
Luminex Cihazı	Luminex Fluoroanalyzer 200, Luminex Corporation, Texas, USA

Çizelge 3.7. Akış sitometrisi çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Malzeme	Şirket	Ürün Kodu
<i>CD127-FITC</i>	Beckman Coulter	B25366
<i>CD16-PE</i>	Beckman Coulter	B59335-AE
<i>CD56-PE</i>	Beckman Coulter	B59357-AE
<i>CD19-ECD</i>	Beckman Coulter	B59339-AD
<i>CD4-PC5</i>	Beckman Coulter	B59321-AE
<i>CD8-PC7</i>	Beckman Coulter	737918-AB
<i>Anti-HLA – DR-APC</i>	Beckman Coulter	B60233-AA
<i>CD25-APC Alexa Flour 700</i>	Beckman Coulter	B92455-PRINT-AA-AA
<i>CD3-APC Alexa Flour 750</i>	Beckman Coulter	B59591-AC
<i>CD45 Krome Orange</i>	Beckman Coulter	B59766-AF
<i>CD57 Pacific Blue</i>	Beckman Coulter	B59536-AB

Çizelge 3.8. Akış Sitometrisi çalışmasında kullanılan cihaz

Cihaz	Marka
Flow Sitometri Cihazı	Beckman Coulter In Navios, Amerika

3.2. Analiz Grupları

Tez çalışması kapsamında analiz gruplarına, KBY tanısı konmuş PRA test sonucu pozitif ve negatif, 18-60 yaş arası hastalar dahil edilmiştir. Analiz gruplarına 18 yaş altı, gebe veya yeni doğum yapmış, erken dönemde tam kan transfüzyonu yapılmış ya da hemodiyaliz işlemine tabi tutulmuş hastalar ve 2 haftadan daha kısa süre önce aşı yapılmış hastalar PRA test sonuçlarını etkilediği için dahil edilmemiştir.

Araştırmaya dahil olma kriterlerine uygun her hastayla görüşülmüş ve araştırma hakkında bilgilendirme yapılmıştır. Araştırmaya katılmak isteyen KBY hastalarının onamı alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Gönüllü onam formunu imzalamayan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışma kapsamında en eski böbrek nakli 1989 yılında, en yeni böbrek nakli ise 2022 yılında yapılmıştır.

Bu tez çalışması GO 21/781 kayıt numarası Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

3.2.1. Hasta Grubu

3.2.1.1. Böbrek Nakli Olan PRA Pozitif Hasta Grubu Bu grupta böbrek nakli yapılan ve PRA Pozitif hastalar ile çalışılmıştır. Çizelge 3.9'da verilen PRA pozitif hasta grubunda hasta 2 ve 14 akraba dışından böbrek nakli olmuştur. Hasta 7, 16, 19, 21 ve 24 birinci derece yakınlıkta olan yakınlarından böbrek nakli olmuştur. Hasta 16 ve 21 diyalize girmemektedir. Hasta 2, 7, 14, 19 ve 24'de haftada üç gün hemodiyalize girmektedir. Hasta 2 B Rh (+), hasta 7, 14, 24 A Rh (+) hasta 16, 19, 21 ise 0 Rh (+) kan grubuna sahiptir.

Çizelge 3.9. Böbrek nakli olan PRA pozitif hasta grubunun cinsiyet, kan grubu, diyaliz türü ve nakil olma durumu.

Hasta Numarası	Cinsiyet	Hasta Nakil Olma Durumu	(Varsa) Diyaliz Türü	Hasta Kan Grubu
Hasta 2	Erkek	Nakil Var(2009 Yılı Eşinden Nakilli)	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	B Rh (+)
Hasta 7	Erkek	Nakil Var(1998 Yılı Babadan Nakilli)	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	A Rh (+)
Hasta 14	Erkek	Nakil Var(2008 Yılı Kadavradan Nakilli)	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	A Rh (+)
Hasta 16	Kadın	Nakil Var(2022 Yılı Kardeşten Nakilli)	-	0 Rh (-)
Hasta 19	Kadın	Nakil Var(2004 Yılı Babadan Nakilli)	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	0 Rh (+)
Hasta 21	Erkek	Nakil Var(1989 Yılı Babadan Nakilli)	-	0 Rh (+)
Hasta 24	Erkek	Nakil Var(2020 Yılı Kardeşten Nakilli)	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	A Rh (+)

3.2.1.2. Böbrek Nakli Yapılmayan PRA Pozitif Hasta Grubu Bu grupta böbrek nakli yapılmayan ve PRA Pozitif hastalar ile çalışılmıştır. Çizelge 3.10.'da verilen hasta 11 haftada 3 gün hemodiyalize girmekte, hasta 3 ise haftada 2 gün hemodiyalize girmektedir. Her iki hasta grubu ise 0 Rh (-) kan grubuna sahiptir.

Çizelge 3.10. Böbrek nakli olmayan PRA pozitif hasta grubunun cinsiyet, kan grubu, diyaliz türü ve nakil olma durumu.

Hasta Numarası	Cinsiyet	Hasta Nakil Olma Durumu	(Varsa) Diyaliz Türü	Hasta Kan Grubu
Hasta 11	Kadın	Nakil Yok	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	0 Rh (+)
Hasta 3	Erkek	Nakil Yok	Haftada 2 Gün Hemodiyaliz	0 Rh (+)

3.2.2. Kontrol Grubu

Kontrol grubu olarak PRA test sonucu negatif 18 - 60 yaş arası hastalar kullanılmıştır.

3.2.2.1. Böbrek Nakli Olan PRA Negatif Kontrol Grubu Çizelge 3.11.'de verilen PRA negatif kontrol grubunda hasta 1, 5, 13, 15 akraba dışından böbrek nakli olmuştur. Hasta 1,

5, 20, 23 diyalize girmemektedir. Hasta 13 ve 15 haftada 3 gün hemodiyalize girmektedir. Hasta 1 ve 13 A Rh (+), hasta 5, 15 ve 23 0 Rh (+), hasta 20 ise AB Rh (+) kan grubuna sahiptir.

Çizelge 3.11. Böbrek nakli olan PRA negatif kontrol grubunun cinsiyet, kan grubu, diyaliz türü ve nakil olma durumu.

Hasta Numarası	Cinsiyet	Hasta Nakil Olma Durumu	(Varsa) Diyaliz Türü	Hasta Kan Grubu
Hasta 1	Kadın	Nakil Var(2019 Yılı Kadavradan Nakilli)	Diyaliz yok	A Rh (+)
Hasta 5	Erkek	Nakil Var(2020 Yılı Kadavradan Nakilli)	Diyaliz yok	0 Rh (+)
Hasta 13	Erkek	Nakil Var(2015 Yılı Kadavradan Nakilli)	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	A Rh (+)
Hasta 15	Erkek	Nakil Var(2019 Yılı Kadavradan Nakilli)	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	0 Rh (+)
Hasta 20	Erkek	Nakil Var(2016 Yılı Kardeşten Nakilli)	Diyaliz yok	AB Rh (+)
Hasta 23	Erkek	Nakil Var(1989 Yılı Babadan Nakilli)	Diyaliz yok	0 Rh (+)

3.2.2.2. Böbrek Nakli Olmayan PRA Negatif Kontrol Grubu Çizelge 3.12.'de verilen PRA negatif kontrol grubundaki hastalar böbrek nakli olmamıştır. Hasta 6, 8, 10, 9, 17 ve 22 haftada üç gün hemodiyalize girmektedir. Hasta 12, 4 ve 18 günde dört kez periton diyalizi olmaktadır. Hasta 6, 8, 17, 18 ve 20 0 Rh (+), Hasta 10, 12, 4 ve 9 ise A Rh (+) kan grubuna sahiptir.

Çizelge 3.12. Böbrek nakli olmayan PRA negatif kontrol grubunun cinsiyet, kan grubu, diyaliz türü ve nakil olma durumu.

Hasta Numarası	Cinsiyet	Hasta Nakil Olma Durumu	(Varsa) Diyaliz Türü	Hasta Kan Grubu
Hasta 6	Kadın	Nakil Yok	Haftada 3 Gün Hemodiyaliz	0 Rh (+)
Hasta 8	Erkek	Nakil Yok	Haftada 2 Gün Hemodiyaliz	0 Rh (+)
Hasta 10	Erkek	Nakil Yok	Haftada 2 Gün Hemodiyaliz	A Rh (+)
Hasta 12	Erkek	Nakil Yok	Günde 4 kez Periton Diyalizi	A Rh (+)
Hasta 4	Erkek	Nakil Yok	Günde 4 kez Periton Diyalizi	A Rh (+)
Hasta 9	Erkek	Nakil Yok	Haftada 2 Gün Hemodiyaliz	A Rh (+)
Hasta 17	Kadın	Nakil Yok	Haftada 2 Gün Hemodiyaliz	0 Rh (+)
Hasta 18	Kadın	Nakil Yok	Günde 4 kez Periton Diyalizi	0 Rh (+)
Hasta 22	Erkek	Nakil Yok	Haftada 2 Gün Hemodiyaliz	0 Rh (+)

3.3. DNA İzolasyonu

Periferik kan numunelerinin düşük çözünürlüklü HLA doku tiplendirmesi, periferik kan numunelerinde HLA hastalık ilişkilerini saptamak için kullanılan manyetik boncuk tabanlı bir izolasyon yöntemidir. İnsan genomunda bulunan HLA genleri oldukça polimorfik bir yapıya sahiptir [64]. DNA dizi seviyesinde belirlenen bu tür polimorfizmler, aleller olarak temsil edilir. PCR tabanlı moleküler HLA doku tiplemesi, DNA izolasyonu gerektirir [65].

Çekirdekteki DNA'ya ulaşmak için hücre duvarının yıkılması gerekir. Sistem, hücre duvarlarını parçalamak için bir lizis tamponu kullanır. Proteini DNA'dan ayırarak homojen bir karışım oluşturmak için Proteinaz K kullanılır. Manyetik boncuk yüzeyine negatif yüklü DNA bağlanması sağlanarak manyetik boncuk- DNA kompleksi toplam karışımdan ayrılır. Hücresel artıkları uzaklaştırmak amacı ile yıkama solüsyonu ile yıkama yapılır. Son olarak yüksek ısı ve Elution Buffer ile manyetik boncuk- DNA kompleksi birbirinden ayrılarak saf DNA elde edilir. Elde edilen DNA numaralandırılır ve çalışılmak üzere +4°C olan buzdolabına konulur. Çalışma tamamlandıktan sonra -20°C olan buzdolabında saklanır.

Çalışmanın DNA izolasyonu kısmında Qiagen EZ1 Advanced XL cihazı ve QIAGEN EZ 1 DNA Blood kiti kullanıldı. Hasta ve kontrol grubunda bulunan kişilerden 3 mL periferik kan örneği alınarak 200 µL DNA elde edildi.



Şekil 3.1. Sırasıyla soldan sağa, DNA izolasyon cihazı (BioRobot EZ1 Advanced XL, Qiagen, Almanya) ve Spektrofotometre (Thermo Scientific, UK)

Çalışmada kontaminasyonu önlemek amacı ile çalışma öncesi ve sonrasında cihazın içi %70'lik alkol ile temizlenip 20 dk UV (ultraviyole) ışınması verildi. Ayrıca DNA'lar Thermo Scientific marka Nanodrop 2000 programı ile kirlilik ve miktar açısından değerlendirildi. Referans aralıkları, 15-40 ng/ μ L miktar, 1.8 - 1.9 arası da kirlilik olmalıdır. Çalışmada DNA kirlilik miktarları referans aralığında çıkmıştır.

3.4. Doku Grubu Alellerinin Belirlenmesi

Hastaların doku grubu alellerini (HLA-A, B, DRB1) belirlemek için hasta ve kontrol grubundaki bireylerden alınan DNA örnekleri kullanılmıştır. Doku grubu alelleri, Itoh ve arkadaşlarının yaptığı PCR-SSO Luminex yöntemi [66, 67] ile doku tipleme laboratuvarında Lifecodes HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 Eres Rapid kitleri kullanılarak belirlenmiştir. HLA tiplemesi yapılan hastaların sonuçları Quick-Type for Lifematch programıyla analiz edildi.

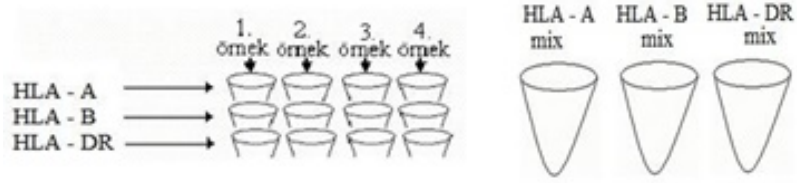


Şekil 3.2. Luminex cihazı (Luminex Fluoroanalyzer 200, Luminex Corporation, USA).

3.4.1. DNA Amplifikasyonu (PCR)

Her örnek için, yukarıdan aşağıya, yapılacak test sayısı kadar 0,2 mL'lik PCR tüpü kullanıldı. Her örnek için 4'er μ L DNA (kuyuların dibine), PCR tüplerine pipetlendi. Aşağıdaki çizelge

3.3 'a uygun olacak şekilde Mix hazırlandı.



Şekil 3.3. DNA ve master mix pipetleme yönü.

Çizelge 3.13. PCR için gerekli reaktifler ve miktarları.

Reaktifler	1 örnek için
Master Mix (+4°C)	6 µL
Nuclease-free su 8	10 µL
Taq Polymerase (-20°C)	0,5 µL

Yukarıda verilen Çizelge 3.13'e uygun olarak 6 µL Master Mix, 10 µL Nuclease-free su ve 0,5 µL Taq Polymerase DNA'ların üzerine pipetlendi. Aşağıda çizelge 3.14.'de verilen PCR döngü programına göre DNA amplifiye edildi.

Çizelge 3.14. HLA-A, B, DRB1 analizi için PCR döngü programı.

	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	300	1 döngü
Denatürasyon	95	30	8 döngü
Bağlanma	60	45	8 döngü
Uzama	72	45	8 döngü
Denatürasyon	30	300	32 döngü
Bağlanma	60	45	32 döngü
Uzama	72	45	32 döngü
Son uzama	72	900	1 döngü
Bekleme	4	300	1 döngü



Şekil 3.4. Thermal cycler cihazı (Sensequest, ATQ; Almanya), PCR aşaması.

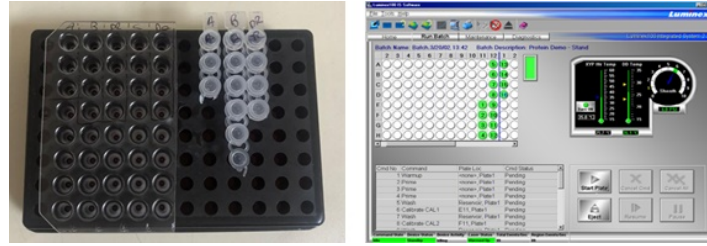
3.4.2. Hibridizasyon

Çalışmaya başlamadan önce kitin içinde bulunan dilüsyon solüsyonu 45°C'de 5 dakika ısıtıldı ve oda sıcaklığında bekletildi. 5 µL PCR ürünü Costar Plate'e alıktlandı. Bead mix (Probe Mix) (her kit için ayrı ayrıdır, kit kutusunun içinde +4°C'de bulunur – siyah tüpler-), ısı bloğunda 55°C'de 10 dakika ısıtıldı. 15 saniye sonike edildikten sonra 15 saniye vortekslendi. 15 µL Bead Mix (Probe Mix) ilgili testin tüm kuyularına dağıtıldı. Plate'in üzeri seal ile kaplanarak Thermal Cycler cihazına yerleştirildi. Hibridizasyon programı seçilerek, Hibridizasyon aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi (Çizelge 3.15.).

Hibridizasyonun son 5 dakikasında her kuyu için; 170 µL Dilution solution ve 0,85 µL Streptavidin karışımı hazırlandı. Plate Thermal Cycler'da 56°C'lik kısma gelip süre bitter bitmez Thermal Cycler açıldı, plate üzerindeki seal kaldırılıp 170 µL Dilution solution/PE-Streptavidin karışımı örnekler üzerine eklendi. Çalışma LifeMatch

Çizelge 3.15. Hibridizasyon reaksiyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
97°C	2 Dakika
47°C	10 Dakika
56°C	8 Dakika
56°C	∞



Şekil 3.5. PCR ürünlerinin Coster Plate'e koyulması ve çalışmanın Luminex IS 100 Software'de okutulması aşaması.

Flouoroanalyzer programında “Start” verilerek başlatıldı. Quick-Type for LifeMatch programıyla analiz edildi.

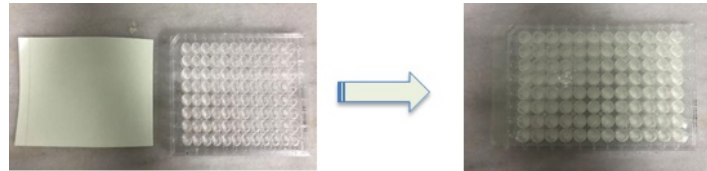
3.5. Anti-HLA Antikorların Belirlenmesi

Panel Reaktif Antikor testi, anti-HLA antikorlarının belirlenmesi için uygulanan bir testtir. Bu test, IgG (İmmünglobulin G) yapısına sahip anti-HLA antikorlarını saptamak için kullanılan boncuk (micro bead) temelli bir yöntemdir. Bu yöntem böbrek nakli öncesinde veya sonrasında hastada oluşan Anti-HLA antikorlarını belirlemek amacıyla kullanıldı. Kullanılan kit Lifecodes Lifescreen Deluxe'dir [47]. Sonuçlar Match IT Antibody programıyla değerlendirildi. LifeScreen kiti için antikorlar, uygun antijenler ile reaktifliği saptanan antikorlardır. Saflaştırılmış HLA Sınıf I glikoproteinleri 100 Kafkas, 100 Afrika Amerikan, 100 İspanyol kan vericisinin trombositlerinden, HLA Sınıf II glikoproteinleri EBV (Epstein-Barr virüs) transformed B lenfositlerinden elde edilmiştir. Kanlar aseptik teknik kullanılarak antikoagülansız olarak toplanmıştır. Kan örnekleri 2500 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiştir. 24 saat içerisinde test edilmeyecek ürünler 48

saate kadar 2-8°C'de saklanmıştır. Daha uzun süreli saklamak için -50°C veya -80°C' de dondurulmuştur.

3.5.1. PRA Çalışma Prosedürü

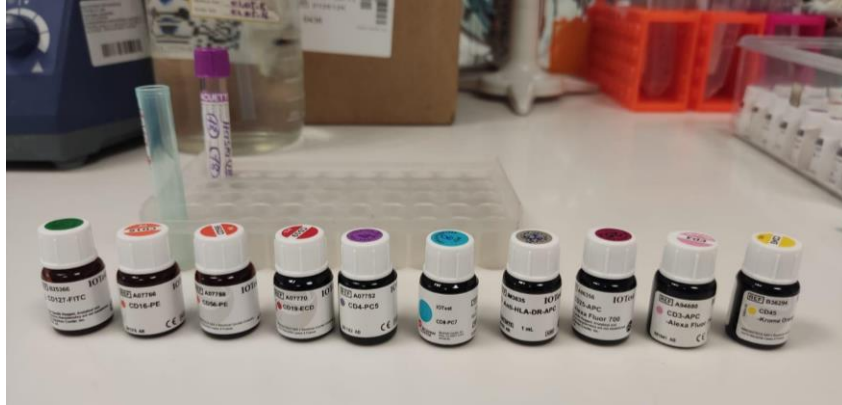
Yıkama solüsyonu kullanmadan önce oda sıcaklığına çıkartıldı ve diğer içerikler kullanılana kadar, karanlıkta 2-8°C'de bırakıldı. Bu süre içerisinde plak dizilim şeması (PRA plağı) kullanılarak analiz edilecek her bir serumun ve kontrollerin yerleri belirlendi. Kullanılmayan kuyuları uygun plastik kaplayıcı (seal) ile kaplandı. Daha sonra kullanılacak kuyular 250 μ L distile su ile yıkandı. 3 dakika sonra vakum manifoldu kullanılarak distile su aspire edildi. HLA boncukları, 30 saniye boyunca 600 - 800 xg'de santrifüj edilip herhangi boncuk veya sıvının kapakta ya da tüp kenarlarında kalmasını engelleyecek şekilde santrifüj edildi. Sonrasında yaklaşık 1 dakika vortekslenildi. Her bir hasta için 40 μ L yıkama solüsyonu ve 5 μ L HLA boncukları uygun ependorf içerisinde 2 dakika vortekslendi. Bu işlem her hasta için ayrı ayrı yapıldı. Elde edilen 45 μ L'lik karışım PRA plağında ilgili kuyuya konuldu. Üzerine 12,5 μ L hasta serumu ya da kontrol serumu eklendi. Plak içindekiler karanlıkta kalacak şekilde uygun plastik kaplayıcı ile kapatıldı. Oda sıcaklığında (20 - 24°C) ve karanlıkta bir rotator üzerinde (dakikada 200 rotasyon) 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında plastik kaplayıcı çıkartıldı ve tüm kuyular ilk önce 150 μ L, daha sonra 250 μ L yıkama solüsyonu ile aspire edildi. Örnek başına 40 μ L yıkama solüsyonu ile 5 μ L konjugat ile dilüe edilip ilgili kuyulara 45 μ L eklendi. Plak kaplanıp tekrardan karanlıkta bir rotator üzerinde (dakikada 200 rotasyon) 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 30 dakika sonunda her kuyuya 150 μ L yıkama solüsyonu eklenerek Luminex cihazında okutulmaya hazır hale getirildi.



Şekil 3.6. PRA plağının seal ile kaplanması.

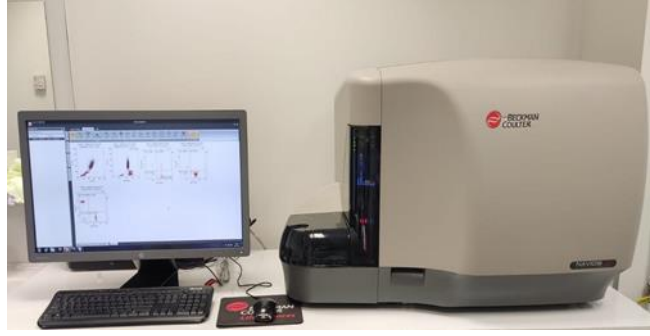
3.6. Yüzeyel Antikor Boyaması

Numaralandırılmış tüplere antikorlar (10µL) FITC/ PE /ECD/ PC5 /PC7 sırasıyla pipet yardımıyla konuldu. Üzerlerine 100 µL hücre süspansiyonu eklenip kısa süreli vorteks işleminden sonra 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Tüplere 500 µl PBS (Isoflow) konulup vortekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. 300 xg' de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpler yavaşça dökülerek süzülüp, ağız kısmı kurulandı. Üzerlerine 2 mL Isoflow eklenip vortekslendi. 300 xg' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Tüplere 500 µL PBS/Formaldehit konularak +4 °C 'de, cihazda okutuldu [68].



Şekil 3. 7. Kullanılan antikorlar (Sırasıyla: CD127-FITC, CD16-PE, CD56-PE, CD19-ECD, CD4-PC5, CD8-PC7, Anti-HLA-DR-APC, CD25-APC Alexa Flour 700, CD3-APC Alexa Flour 750, CD45 Krome Orange) ve çalışma düzeneği.

Çalışmada Flow Sitometri Cihazı (Beckman Coulter In Navios, Amerika) cihazı kullanıldı ve sonuçların analizi Kaluza Analysis 2.1 programıyla yapıldı.



Şekil 3. 8. Flow sitometri cihazı (Beckman Coulter In Navios, Amerika).

3.7. İstatiksel Analiz

Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin istatiksel değerlendirilmesi SPSS 23 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Farklılıkların gruplar arasındaki değişiminin saptanması için non parametrik bir test olan Mann- Whitney U Testi ve Ki Kare Testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. Özet istatistik olarak birim sayısı (N), yüzde (%), ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri verilmiş ve plotlar paylaşılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaların sonuçları açıklanmış ve literatürde yapılan benzer çalışmalardan örnekler verilerek sonuçlar tartışılmıştır. Böbrek nakillerinde, HLA hasta ve donör arasında uyumsuzluğa neden olan önemli faktörlerden birisidir. Bu nedenle böbrek nakillerinden önce HLA-A, B, DR lokuslarının tanımlama çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Kronik böbrek yetmezliği hastalarında nakil öncesi PRA pozitifliği nakil şansını düşürmekte, transplantasyon sonrası rejeksiyon riskini arttırmaktadır. Bu çalışmada PRA pozitif hastaların antikorlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında antikorların doku tipleri ile karşılaştırılması yapılmıştır. PRA pozitif hastaların antikor düzeyleri ile doku tipi arasındaki ilişki sorgulanmış ve rejeksiyon üzerindeki etkisi incelenerek doku tipi, PRA ve immünojenotiplendirme analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1. Analiz Gruplarının Doku Tipi Sonuçları

Deneysel çalışmalar kısmında belirtilen çalışmaların sonuçları aşağıda verilmiştir. Hasta DNA izolasyon sonuçları tüm hasta grupları için Thermo Scientific marka Nanodrop 2000 programı ile kirlilik ve miktar açısından değerlendirilmiştir. DNA için beklenen saflık değeri 1.8- 1.9 ve miktarı 15- 40 ng arasındadır. DNA izolasyon sonuçları DNA miktarı ve kirlilik miktarları referans aralığında elde edilmiştir.

4.1.1. Böbrek Nakli Olan PRA Pozitif Hasta Grubunun Doku Tiplendirmesi

Çizelge 4.1'de verilen hasta grubunun hepsi böbrek nakli olmuştur. Hasta 2'nin doku tipi, HLA-A*03, HLA-A*02, HLA-B*40, HLA-B*52, homozigot HLA-DRB1B1*15'dir. Hasta 7'nin doku tipi, homozigot HLA-A*11, HLA-B*07, HLA-B*35, homozigot HLA-DRB1*07'dir. Hasta 14'ün doku tipi, HLA-A*23, HLA-A*26, HLA-B*49, HLA-B*55, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*13'tür. Hasta 16'nın doku tipi homozigot HLA-A*02, HLA-B*39, HLA-B*51, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*16'dır. Hasta

19'un doku tipi, HLA-A*11, HLA-A*24, HLA-B*35, HLA-B*55, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*11'dir. Hasta 21'in doku tipi, HLA-A*24, HLA-A*30, HLA-B*13, HLA-B*44, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*14'tür. Hasta 24'ün doku tipi HLA-A*03, HLA-A*30, homozigot HLA-B*35, HLA-DRB1*12, HLA-DRB1*13'tür.

Çizelge 4.1. Böbrek nakli olan PRA pozitif hasta grubunun nakil olma durumu ve doku tiplendirmesi.

Hasta Numarası	Hasta Nakil Olma Durumu	Hasta Doku Tipi		
		HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
Hasta 2	Nakil Var (2009 Yılı Eş'inden Nakilli)	02-02	40-52	15-15
Hasta 7	Nakil Var (1998 Yılı Babasından Nakilli)	11-11	07-35	04-04
Hasta 14	Nakil Var(2008 Yılı Kadavradan Nakilli)	02-02	49-55	11-13
Hasta 16	Nakil Var (2022 Yılı Kardeşten Nakilli)	02-02	39-51	04-16
Hasta 19	Nakil Var(2004 Yılı Babadan Nakilli)	11-24	35-55	03-11
Hasta 21	Nakil Var(1989 Yılı Babadan Nakilli)	24-30	13-44	04-14
Hasta 24	Nakil Var(2020 Yılı Kardeşten Nakilli)	03-30	35-35	12-13

4.1.2. Böbrek Nakli Olmayan PRA Pozitif Hasta Grubunun Doku Tiplendirmesi

Çizelge 4.2'de verilen hasta grubunun her ikisi de böbrek nakli olmamıştır. Hasta 11'in doku tipi, HLA-A*02, HLA-A*31, HLA-B*51, HLA-B*52, HLA-DRB1*15, HLA-DRB1*16'dır. Hasta 3'ün doku tipi ise, HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*35, HLA-DRB1*08, HLA-DRB1*15'dir.

Çizelge 4.2. Böbrek nakli olmayan PRA pozitif hasta grubunun nakil olma durumu ve doku tiplendirmesi.

Hasta Numarası	Hasta Nakil Olma Durumu	Hasta Doku Tipi		
		HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
Hasta 11	Nakil Yok	02-31	51-52	15-16
Hasta 3	Nakil Yok	02-24	07-35	08-15

4.1.3. Böbrek Nakli Olan PRA Negatif Kontrol Grubunun Doku Tiplendirmesi

Çizelge 4.3’de verilen kontrol grubundaki hastaların her ikisi de böbrek nakli olmuştur. Hasta 1’in doku tipi, HLA-A*01, HLA-A*24, HLA-B*48, HLA-B*51, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*09’dur. Hasta 5’in doku tipi ise, HLA-A*02, HLA-A*30, HLA-B*51, HLA-B*53, HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*13’tür. Hasta 13’ün doku tipi HLA-A*02, HLA-A*11, HLA-B*35, HLA-B*51, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*14’tür. Hasta 15’in doku tipi HLA-A*11, HLA-A*25, HLA-B*18, HLA-B*52, HLA-DRB1*08, HLA-DRB1*15’dır. Hasta 20’nin doku tipi HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*13, HLA-B*27, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*08’dır. Hasta 23’ün doku tipi HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-B*18, HLA-B*35, homozigot HLA-DRB1*11’dır.

Çizelge 4.3. Böbrek nakli olan PRA negatif kontrol grubunun nakil olma durumu ve doku tiplendirmesi.

Hasta Numarası	Hasta Nakil Olma Durumu	Hasta Doku Tipi		
		HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
Hasta 1	Nakil Var (2019 Yılı Kadavradan Nakilli)	01-24	48-51	04-09
Hasta 5	Nakil Var (2020 Yılı Kadavradan Nakilli)	11-11	07-35	04-04
Hasta 13	Nakil Var(2008 Yılı Kadavradan Nakilli)	02-02	49-55	11-13
Hasta 15	Nakil Var (2022 Yılı Kardeşten Nakilli)	02-02	39-51	04-16
Hasta 20	Nakil Var(2004 Yılı Babadan Nakilli)	11-24	35-55	03-11
Hasta 23	Nakil Var(1989 Yılı Babadan Nakilli)	24-30	13-44	04-14

4.1.4. Böbrek Nakli Olmayan PRA Negatif Kontrol Grubunun Doku Tiplendirmesi

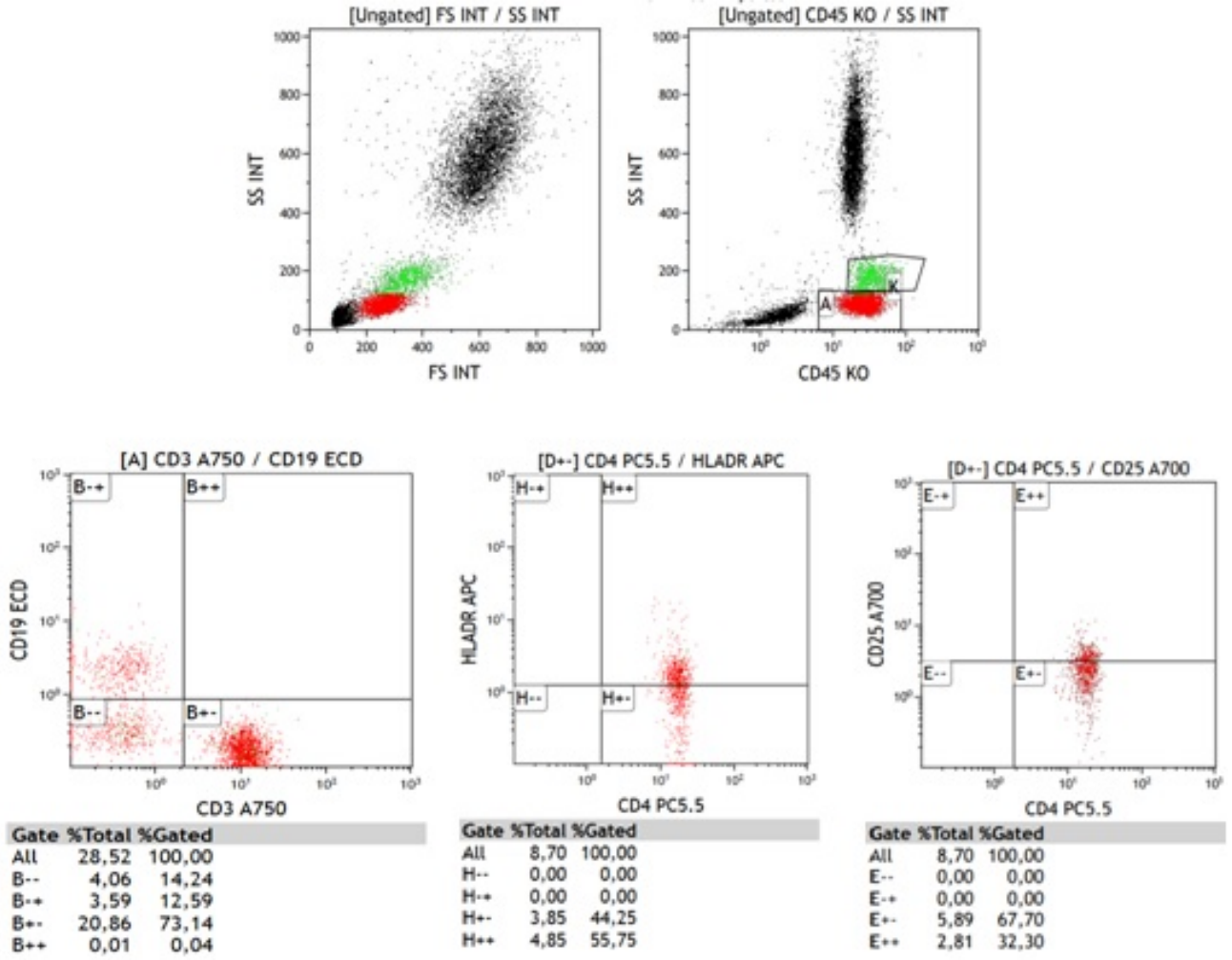
Çizelge 4.4.'de verilen kontrol grubundaki hastalar böbrek nakli olmamıştır. Hasta 6'nın doku tipi, HLA-A*03, HLA-A*11, HLA-B*35, HLA-B*50, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*13'tür. Hasta 8'in doku tipi, homozigot HLA-A*02, HLA-B*15, HLA-B*35, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*14'tür. Hasta 10'un doku tipi, HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-B*13, HLA-B*44, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*14'tür. Hasta 12'nin doku tipi, HLA-A*11, HLA-A*29, HLA-B*45, HLA-B*52, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*15'dir. Hasta 4'ün doku tipi, HLA-A*01, HLA-A*30, HLA-B*51, HLA-B*52, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*15'dir. Hasta 9'un doku tipi, HLA-A*01, HLA-A*03, homozigot HLA-B*35, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*14'tür. Hasta 17'nin doku tipi HLA-A*26, HLA-A*29, HLA-B*38, HLA-B*58, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*13'dür. Hasta 18'in doku tipi HLA-A*11, HLA-A*33, HLA-B*51, HLA-B*58, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*14'tür. Hasta 22'nin doku tipi homozigot HLA-A*24, homozigot HLA-B*49, homozigot HLA-DRB1*15'tir.

Çizelge 4.4. Böbrek nakli olmayan PRA negatif kontrol grubunun nakil olma durumu ve doku tiplendirmesi.

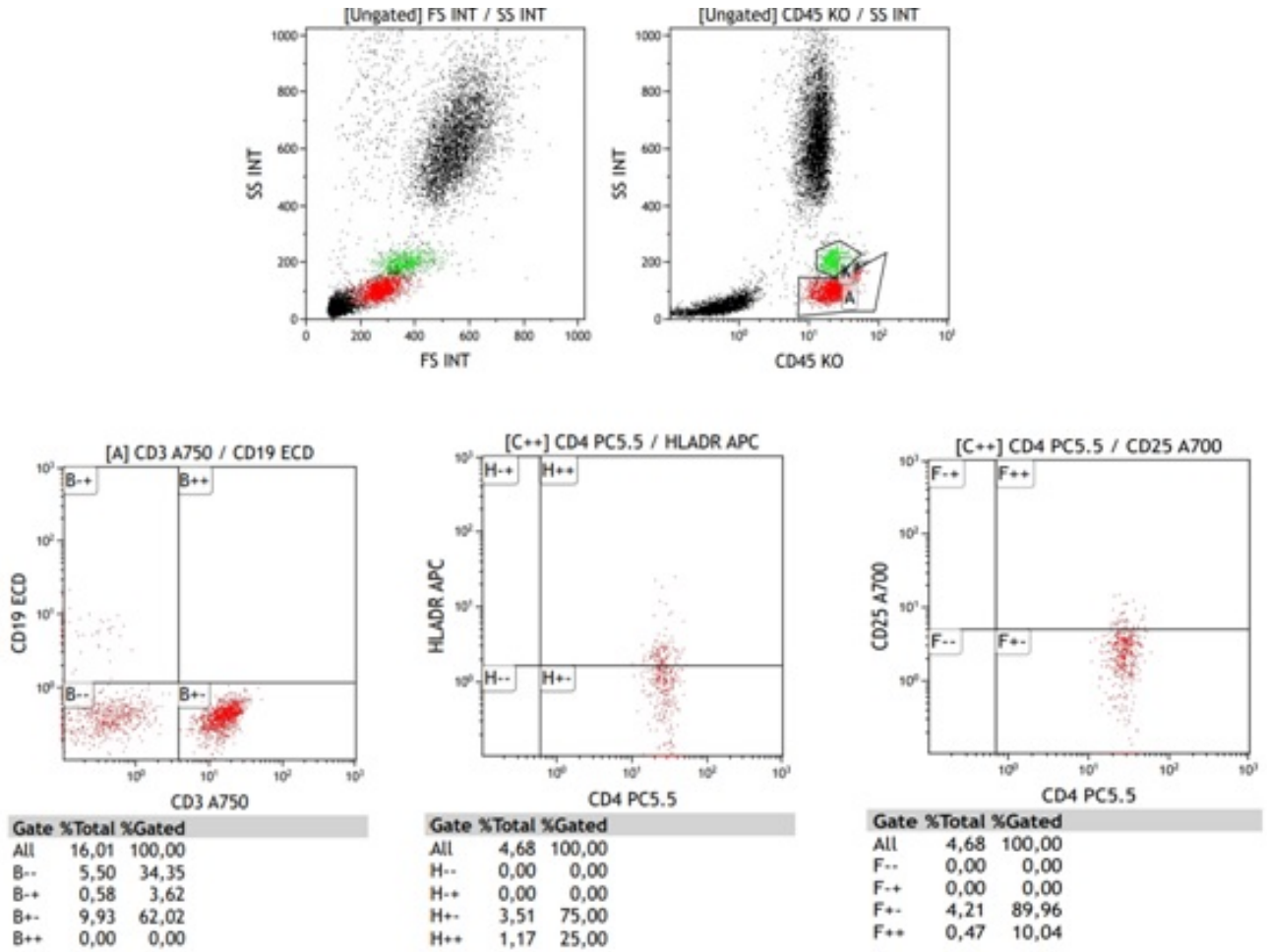
Hasta Numarası	Hasta Nakil Olma Durumu	Hasta Doku Tipi		
		HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
Hasta 6	Nakil Yok	03-11	35-50	11-13
Hasta 8	Nakil Yok	02-02	15-35	11-14
Hasta 10	Nakil Yok	02-24	13-44	07-14
Hasta 12	Nakil Yok	11-29	45-52	03-15
Hasta 4	Nakil Yok	01-30	51-52	04-15
Hasta 9	Nakil Yok	01-03	35-35	11-14
Hasta 17	Nakil Yok	26-29	38-58	04-13
Hasta 18	Nakil Yok	11-33	51-58	03-14
Hasta 22	Nakil Yok	24-24	49-49	15-15

4.2. Akış Sitometrisi Sonuçları

PRA pozitif ve negatif hastaların immünofenotiplendirmesi akış sitometrisi ile yapıp rejeksiyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar Kaluza programı ile analiz edilmiştir. PRA Pozitif ve Negatif hastalar için aşağıda grafikler verilmiştir.



Şekil 4.1. SS INT/FS INT grafiğinde lenfosit bölgesinde T hücresi alt grupları değerlendirme stratejisi, PRA pozitif KBY hastasına ait dot-plot grafikleridir. SS INT/CD45 KO grafiğinde kırmızı renkli alan lenfositlerin kapılma grafiğidir. CD3, hücre kümesi içinde yer alan CD4 pozitif T hücre alt grupları ($CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$)'nın grafik ve yüzdeleri verilmiştir.



Şekil 4.2. SS INT/FS INT grafiğinde lenfosit bölgesinde T hücreleri alt grupları değerlendirme stratejisi, PRA negatif KBY hastasına ait dot-plot grafikleridir. SS INT/CD45 KO grafiğinde kırmızı renkli alan lenfositlerin kapılma grafiğidir. CD3, hücre kümesi içinde yer alan CD4 pozitif T hücreleri alt grupları ($CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$)'nın grafik ve yüzdeleri verilmiştir.

	PRA YÜZDELERİ													
	CD3 ⁺	CD19 ⁺	CD3 ⁺ CD16/56	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ^{low}	CD127/CD4 ⁺ CD25 ^{low}	CD4 ⁺ HIA-DR ⁺	CD4 ⁺ CD57 ⁺	CD8 ⁺ CD5 ⁺	CD127/CD8 ⁺ CD25 ^{low}	CD8 ⁺ CD57 ⁺	CD8 ⁺ HIA-DR ⁺	CD4 ⁺ HIA-DR ⁺
HASTA 1	83,30	7,65	6,70	42,40	55,19	11,94	78,79	24,97	1,33	5,38	12,07	29,01	17,61	88,04
HASTA 5	74,16	12,17	11,24	45,29	48,23	11,15	75,76	20,63	2,97	2,61	0,52	49,81	12,74	88,81
HASTA 6	82,09	11,75	9,85	55,47	32,31	8,92	68,18	20,95	0,14	18,56	3,25	31,32	12,30	74,09
HASTA 8	63,27	5,71	26,34	54,61	21,38	8,69	74,67	28,13	8,50	15,54	12,61	10,85	12,33	71,51
HASTA 10	80,57	8,32	11,79	34,09	40,84	10,04	51,35	28,36	5,97	19,25	10,87	28,77	12,68	85,25
HASTA 12	79,76	7,99	11,33	63,31	32,20	9,83	67,20	29,32	10,53	18,43	3,72	38,08	13,16	94,02
HASTA 9	49,68	10,55	36,74	56,33	35,39	8,56	60,94	29,95	4,28	24,89	17,87	33,03	21,49	82,54
HASTA 4	76,13	4,84	12,17	61,44	16,05	8,18	60,82	15,15	22,51	12,25	4,19	34,48	34,19	94,86
HASTA 13	52,53	6,80	29,97	44,50	54,82	10,94	56,33	10,94	26,25	24,69	4,97	44,23	12,97	78,71
HASTA 15	74,52	8,59	13,83	56,03	41,91	8,64	42,42	11,14	9,38	12,22	4,76	25,61	6,64	86,12
HASTA 17	46,08	7,19	42,90	72,35	22,82	12,22	55,97	24,70	15,50	13,91	2,26	30,72	14,78	75,55
HASTA 18	86,45	6,32	4,38	55,85	35,11	4,39	31,03	24,51	4,39	12,27	7,84	31,29	11,07	87,46
HASTA 22	62,02	8,62	26,92	29,23	33,23	10,90	41,18	24,79	13,68	12,03	23,44	39,47	16,35	73,41
HASTA 20	80,59	12,81	5,52	48,62	40,08	13,55	21,71	17,12	5,25	9,69	22,37	37,50	11,73	77,25
HASTA 23	85,37	8,58	2,07	59,98	21,77	9,47	63,64	18,79	10,19	16,21	21,95	32,81	9,88	50,59
HASTA 2	56,02	9,60	29,89	58,82	30,73	16,59	52,07	36,27	16,58	3,63	0,66	38,28	36,30	90,87
HASTA 7	68,42	3,30	24,10	40,26	40,26	20,74	53,85	33,51	6,91	22,88	12,77	27,12	24,47	77,69
HASTA 11	74,30	11,91	11,19	63,55	29,31	16,25	54,83	40,20	2,18	31,25	26,56	10,54	8,79	89,44
HASTA 3	74,29	10,24	12,26	33,59	57,97	21,49	56,15	30,41	1,82	8,24	2,01	30,65	17,53	96,42
HASTA 14	87,85	1,88	6,54	62,43	29,90	23,88	49,56	38,31	8,05	13,91	15,79	25,18	18,59	85,58
HASTA 16	80,57	6,42	9,89	49,89	44,58	27,05	48,40	45,61	5,32	11,11	21,74	14,98	26,57	79,53
HASTA 19	73,14	12,59	11,82	30,50	39,03	29,57	55,52	55,63	3,10	11,86	11,36	29,47	22,64	82,25
HASTA 21	83,04	8,56	5,50	68,58	21,98	22,09	48,56	44,41	15,51	11,55	21,88	31,23	20,04	62,65
HASTA 24	56,38	33,47	3,04	29,82	22,18	22,42	50,57	39,48	2,98	7,80	31,11	40,73	17,85	61,57

Şekil 4.3. PRA pozitif ve negatif hastaların yüzey belirteçlerinin yüzde değerleri ve PRA yüzdeleri

4.3. İstatiksel Sonuçlar

Çizelge 4.5. Böbrek nakli alıcılarının demografik özellikleri

Değişkenler	n (%)
Cinsiyet	
Kadın	8 (33.3)
Erkek	16 (66.7)
Kadın Doğum Bilgileri	
Yapan	6 (25.0)
Yapmayan	2 (8.3)
Kürtaj	
Olan	4 (16.7)
Olmayan	4 (16.7)
Düşük	
Yapan	2 (8.3)
Yapmayan	6 (25.0)
Kan Grubu	
A Rh(+)	9 (37.5)
B Rh(+)	1 (4.2)
AB Rh(+)	1 (4.2)
0 Rh(+)	12 (50.0)
0 Rh(-)	1 (4.2)
Nakil Durumu	
Yapılan	13 (54.2)
Yapılmayan	11 (45.8)
Diyaliz Durumu	
Hemodiyaliz	14 (58.3)
Periton diyalizi	5 (20.8)
Girmeyen	5 (20.8)
PRA Durumu	
PRA Pozitif	9 (37.5)
PRA Negatif	15 (62.5)

4.3.1. KBY Hastalarının PRA Durumuna Göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerlerinin Karşılaştırılması

KBY hastalarının PRA durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin karşılaştırılması Tablo 2’de yapılmıştır. Sayısal ölçümler normallik varsayımını sağlamadığı için Median (Q1-Q3) tanımlayıcı istatistikler ile verilmiştir. PRA Pozitif olan kişilerin $CD4^+CD25^{low}$ Hücre yüzey belirteç ortancaları PRA Negatif olan kişilere göre daha yüksektir. Aynı şekilde PRA Pozitif olan kişilerin $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre yüzey belirteç ortancaları PRA Negatif olan kişilere göre daha yüksektir. Bu durum hasta monitorizasyonu değerlendirmesi için, etki büyüklükleri dikkate alındığında ($r=0.821$; $r>0.50$ large effect size), düşük hasta sayısına rağmen, PRA pozitiflik ve negatiflik durumunun, $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ ölçümleri üzerine etkisinin büyük olduğu söylenebilir ($z=4.025$; $p<0.001$; $r=0.821$).

Çizelge 4.6. KBY hastalarının PRA durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin karşılaştırılması.

	PRA Pozitif	PRA Negatif	Test İstatistiği (z)	p value	Etki Büyüklüğü (r)
$CD4^+CD25^{low}$	22.09 (20.74-23.88)	9.83 (8.64-11.15)	4.025	<0.001 ^a	0.821
$CD4^+HLA - DR^+$	39.43 (36.27-44.41)	24.51 (17.12-28.13)	4.025	<0.001 ^a	0.821

^a: p değeri Mann-Whitney U testi ile elde edilmiştir.

4.3.2. KBY Hastalarına ait PRA Pozitif Hastaların Sınıf I ve Sınıf II Yüzde Değerlerinin $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerleri ile Karşılaştırılması

PRA Pozitif hastalar $CD4^+CD25^{low}$, $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre yüzey belirteçleri, sınıf I ve II pozitiflik yüzdeleri arasındaki ilişki Spearman Sıra Korelasyon Katsayısı yöntemi ile incelenmiştir. İstatiksel veriler Tablo 3’de verilmiştir. Değişkenler arasında anlamlı bir fark yakalanamamıştır. PRA testinin yüzde pozitiflik durumunun bu değişkenlerden bağımsız olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.7. KBY Hastalarına ait PRA pozitif hastaların sınıf I (%) ve sınıf II (%) değerlerinin $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerleri ile karşılaştırılması.

		$CD4^+CD25^{low}$	$CD4^+HLA - DR^+$	Sınıf I (%)	Sınıf II (%)
$CD4^+CD25^{low}$	r_s	1.000			
	p	-			
$CD4^+HLA - DR^+$	Korelasyon Katsayısı	0.583	1.000		
	P Değeri	0.099	-		
Sınıf I (%)	Korelasyon Katsayısı	0.623	0.96	1.000	
	P Değeri	0.099	0.821	-	
Sınıf II (%)	Korelasyon Katsayısı	-0.228	0.240	-0.036	1.000
	P Değeri	0.588	0.568	0.932	-

r_s : Sperman sıra korelasyon katsayısı

4.3.3. KBY Hastalarının Nakil Durumuna Göre $CD4^+HLA - DR^+$ ve $CD4^+CD25^{low}$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerlerinin Karşılaştırılması

KBY hastalarının nakil durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4'de gösterilmiştir. İstatistiksel sonuçlar incelendiğinde, gruplar arasında ortalama değeri için, böbrek nakli yapılan hastalarda nakil yapılmayanlara göre anlamlı bir fark elde edilmiştir. $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre yüzey belirteçleri için nakil durumuna göre ortalama değerleri incelendiğinde anlamlı bir fark elde edilememiştir. Bu sonuçlar $CD4^+CD25^{low}$ T hücre yüzey belirteçlerinin organ naklinde ek bir parametre olarak kullanılabilmesini desteklemektedir. $CD4^+CD25^{low}$ hücre yüzey belirteç artışı rejeksiyon göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Çizelge 4.8. KBY hastalarının nakil durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin karşılaştırılması.

	Nakil Yapılan	Nakil Yapılmayan	Test İstatistiği (z)	p value	Etki Büyüklüğü (r)
$CD4^+CD25^{low}$	16.5 (11.15-22.42)	9.83 (8.56-12.20)	2.578	0.009	0.520
$CD4^+HLA - DR^+$	33.51 (18.79-39.43)	28.13 (24.51-29.95)	0.550	0.608	0.110

4.3.4. KBY Hastalarının Rejeksiyon Durumuna Göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerlerinin Karşılaştırılması

KBY hastalarının rejeksiyon durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ T hücre yüzey belirteç değerlerinin karşılaştırılması Tablo 5’de gösterilmiştir. Sayısal ölçümler normallik varsayımını sağlamadığı için Median (Q1-Q3) tanımlayıcı istatistikler ile verilmiştir. Rejeksiyon olan kişilerin $CD4^+CD25^{low}$ T Hücre yüzey belirteç ortancaları rejeksiyon olmayan kişilere göre daha yüksektir. Benzer şekilde Rejeksiyon olan kişilerin $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre yüzey belirteç ortancaları rejeksiyon olmayan kişilere göre daha yüksektir. Ancak rejeksiyon durumuna göre sayısal ölçümler bakımından farklılık yakalanamamış olmasına rağmen p value değeri 0.05’e oldukça yakın bir değerdir. Hasta sayısı arttırıldığında anlamlı bir fark elde edileceği etki büyüklüğü değerinden ($r=0.562$; $r>0.50$ large effect size) anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.9. KBY Hastalarının Rejeksiyon Durumuna Göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T Hücre Yüzey Belirteç Değerlerinin Karşılaştırılması.

	Rejeksiyon Var	Rejeksiyon Yok	Test İstatistiği (z)	p value	Etki Büyüklüğü (r)
$CD4^+CD25^{low}$	22.42 (20.74-23.89)	11.94 (11.15-13.55)	1.776	<0.095 ^a	0.562
$CD4^+HLA - DR^+$	38.31 (36.27-39.43)	24.63 (17.12-24.97)	1.776	<0.095 ^a	0.562

^a: p değeri Mann-Whitney U testi ile elde edilmiştir.

4.3.5. KBY Hastalarının Doku Tiplerinin PRA Durumu İle Karşılaştırılması

Hastalarının HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 doku tiplerine ait lokus numaraları ile PRA durumları istatistiksel olarak Chi-Square analizi ile incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 6’da verilmiştir. PRA test sonucu pozitif veya negatif olan hastalarda HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 lokus numaraları açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.10. KBY hastalarının Ebeveyn 1 (EB1) HLA-A doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.

HLA-A EB1	PRA Pozitif n(%)	PRA Negatif n(%)	Test İstatistiği	p value
1	0 (0.0)	3 (100.0)	4.465	0.829
2	4 (44.4)	5 (55.6)	4.465	0.829
3	1 (33.3)	2 (66.7)	4.465	0.829
11	2 (40.0)	3 (60.0)	4.465	0.829
23	1 (100.0)	0 (0.00)	4.465	0.829
24	1 (50.0)	1 (50.0)	4.465	0.829
26	0 (0.0)	1(100.0)	4.465	0.829

Çizelge 4.11. KBY hastalarının Ebeveyn 2 (EB2) HLA-A doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.

HLA-A EB2	PRA Pozitif n(%)	PRA Negatif n(%)	Test İstatistiği	p value
2	2 (66.7)	1 (33.3)	7.706	0.687
3	3 (0.0)	2 (100.0)	7.706	0.687
11	1 (33.3)	2 (66.7)	7.706	0.687
24	2 (33.3)	4 (66.7)	7.706	0.687
25	0 (0.0)	1 (100.0)	7.706	0.687
26	1 (100.0)	0 (0.0)	7.706	0.687
29	0 (0.00)	2 (100.0)	7.706	0.687
30	2 (50.0)	2 (50.0)	7.706	0.687
31	1 (100.0)	0 (0.00)	7.706	0.687
33	0 (0.0)	1 (100.0)	7.706	0.687

Çizelge 4.12. KBY hastalarının Ebeveyn 1 (EB1) HLA-B doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.

HLA-B EB1	PRA Pozitif n(%)	PRA Negatif n(%)	Test İstatistiği	p value
7	2 (100.0)	0 (0.0)	6.273	0.787
13	1 (33.3)	2 (66.7)	6.273	0.787
15	0 (0.00)	1 (100.0)	6.273	0.787
18	0 (0.00)	2 (100.0)	6.273	0.787
35	2 (22.2)	3 (60.0)	6.273	0.787
38	0 (0.00)	1 (100.0)	6.273	0.787
39	1 (100.0)	0 (0.0)	6.273	0.787
40	1 (100.0)	0 (0.0)	6.273	0.787
45	0 (0.0)	1(100.0)	6.273	0.787
48	0 (0.0)	1(100.0)	6.273	0.787
49	1 (50.0)	1 (50.0)	6.273	0.787
51	1 (25.0)	3 (75.0)	6.273	0.787

Çizelge 4.13. KBY hastalarının Ebeveyn 2 (EB2) HLA-B doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.

HLA-B EB2	PRA Pozitif n(%)	PRA Negatif n(%)	Test İstatistiği	p value
27	0 (0.0)	1 (100.0)	7.103	0.830
35	3 (50.0)	3 (50.0)	7.103	0.830
44	1 (50.0)	1 (50.0)	7.103	0.830
49	0 (0.00)	1 (100.0)	7.103	0.830
50	0 (0.00)	1 (100.0)	7.103	0.830
51	1 (33.3)	2 (66.7)	7.103	0.830
52	2 (40.0)	3 (60.0)	7.103	0.830
53	0 (0.0)	1 (100.0)	7.103	0.830
55	2 (100.0)	0 (0.0)	7.103	0.830
58	0 (0.0)	2 (100.0)	7.103	0.830

Çizelge 4.14. KBY hastalarının Ebeveyn 1 (EB1) HLA-DRB1 doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.

HLA-DRB1 EB1	PRA Pozitif n(%)	PRA Negatif n(%)	Test İstatistiği	p value
1	0 (0.0)	1 (100.0)	6.273	0.787
3	1 (33.3)	2 (66.7)	6.273	0.787
4	3 (50.0)	3 (50.0)	6.273	0.787
7	0 (0.00)	2 (100.0)	6.273	0.787
8	1 (50.0)	1 (50.0)	6.273	0.787
11	1 (20.0)	4 (80.0)	6.273	0.787
12	1 (100.0)	0 (0.0)	6.273	0.787
13	0 (0.0)	1 (100.0)	6.273	0.787
15	2 (66.7)	1 (33.3)	6.273	0.787

Çizelge 4.15. KBY hastalarının Ebeveyn 2 (EB2) HLA-DRB1 doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırılması.

HLA-DRB1 EB2	PRA Pozitif n(%)	PRA Negatif n(%)	Test İstatistiği	p value
4	1 (100.0)	0 (0.0)	7.066	0.428
8	0 (0.0)	1 (100.0)	7.066	0.428
9	0 (0.0)	1 (100.0)	7.066	0.428
11	1 (50.0)	1 (50.0)	7.066	0.428
13	2 (40.0)	3 (60.0)	7.066	0.428
14	1 (16.7)	5 (83.3)	7.066	0.428
15	2 (33.3)	4 (66.7)	7.066	0.428
16	2 (100.0)	0 (0.0)	7.066	0.428

5. YORUM

Jang-Hee Cho ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada böbrek nakli alıcılarında immünolojik inceleme için, T lenfosit alt kümelerinin ve HLA-DRB1 pozitif monositlerin önemini ve sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu ile ilişkisini araştırmışlardır. Böbrek nakli alıcıları ile yapmış oldukları bu çalışmada, 123 hastadan transplantasyondan önce, transplantasyondan 2 hafta sonra ve tanı anında kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri, CMV enfeksiyonu bulunan hastalardan ise CMV tedavisinden 2 hafta sonra alınmıştır. Akış sitometrik analizi ile 123 hastadan elde ettikleri periferik kandan *HLA – DR*, *CD3*, *CD4*, *CD8*, *CD25* T-lenfositlerin ve *HLA – DR* pozitif monositlerin frekanslarını belirlemişlerdir. İstatiksel incelemeler sonucu, *HLA – DR*-pozitif monositlerin, $CD4^+CD25^+/CD4^+$ T hücrelerinin ve $CD8^+CD25^+/CD8^+$ T hücrelerinin frekansları klinik parametrelerden farklı olarak transplantasyondan 2 hafta sonra, transplantasyon öncesine göre anlamlı olarak daha düşük ($P<0,001$) bulunmuştur. Böbrek nakli alıcılarından, akut rejeksiyonlu hastalarda $CD4^+CD25^+/CD4^+$ T hücrelerinin sıklığı, transplantasyondan 2 hafta sonra, önemli ölçüde daha yüksek tespit edilmiştir. Ancak, böbrek nakli alıcıları ile CMV enfeksiyonlu alıcılar arasında önemli bir fark gözlemlenmemişlerdir [69].

Rebecca Pike ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada immünfenotipleme parametreleri ile böbrek naklinden önce veya sonra rejeksiyon risk tahmini üzerine çalışmışlardır. 28 hastadan transplantasyon öncesi haftalık olmak üzere 3 ay boyunca kan örnekleri almışlardır. Her numune için 13 doğuştan gelen lenfosit alt kümelerini ve 52 T hücrelerini tanımlamak için çok parametrelili akış sitometrisi kullanmışlardır. Akış sitometrisi analizi ile çalışmaya dahil edilen 28 hasta için, 11.000'den fazla, bağışıklık durumunu tanımlayan, veri noktası üretmişlerdir. Bu verilerin temel bileşen analizi ile histolojik olarak rejeksiyonu doğrulanmış hastaların rejeksiyon olmayan hastalardan ayrılabilceğini öne sürmüşlerdir. İstatiksel değerlendirmeler sonucu “Protein Death 1” (PD1) eksprese eden T hücre alt alt gruplarının ret riskinin önemli bir göstergesi olabileceğini öne sürmüşlerdir [70].

Tülay Kılıçaslan Ayna ve arkadaşları 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada alıcı (KBY hastaları) ve sağlıklı böbrek vericilerinin lenfosit yüzdelerini değerlendirmişlerdir. Flow sitometri sistemi ile doğrudan alıcı ve donör arasında B ve T hücrelerinin uyumu 103 alıcı-donör çifti üzerinde araştırmışlardır. Bu amaçla *CD19-PE* ve *CD3-PerCP* monoklonal antikoları sırasıyla B ve T hücrelerini ayırt etmek için kullanılmış ve katılımcıların B ve T hücre yüzdeleri istatistiksel olarak incelemiştir. Donör grubunda B ve T lenfosit yüzdeleri KBY hastalarına göre daha yüksek olmasına rağmen, istatistiksel anlam sadece T lenfositler için sağlamışlardır ($p<0.05$). Ek olarak donörlerin KBY hastalarına göre daha yüksek hemoglobin ve albümin konsantrasyonuna sahip olduğu tespit etmişlerdir [71].

Selene Ottonello ve arkadaşları 2020 yılında, akciğer kanseri üzerine benzer bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada, tedavi sırasında ölçülen bağışıklık parametrelerine ek önceden var olan immünolojik özelliklerin klinik bir rehberlik sağlayıp sağlayamayacağını değerlendirmişlerdir. Bu amaçla 74 hastadan alınan kan örneklerini incelemiştir. Sonuç olarak, tedaviden önce lenfosit alt kümelerinin dağılımının (*CD3⁺*, *CD4⁺* ve *CD8⁺*) ve PD-1'in T hücreleri üzerindeki ekspresyonunun bilinmesi ile bu hastalarda tedavi sonucunun öngörülebileceğini ve bunlara ek olarak T hücre başlangıç ve tedavi sonrası seviyelerinin değerlendirilmesi ile klinik sonucun tahmin edilebileceğini belirtmişlerdir [72].

Burcu Karakuş'un 2017 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Organ Nakli birimi'nde yapmış olduğu çalışmada KBY hastalarının Anti- HLA antikolarının HLA alleleriyle ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada 1079 KBY ve 1111 sağlıklı kontrol kullanılmıştır. KBY hastalarının etiyolojileri ile ilgili yapılan çalışmada farklılıklar bulup bunu hastanın doku tipi ile ilişkilendirmişlerdir. PRA testi sonucu pozitif veya negatif olan KBY hastalarının HLA alleleri arasında anlamlı farklılıklar bulmuşlardır. KBY hastalarıyla yapılan çalışmada PRA testi sonucu sınıf I pozitif sınıf II negatif olan hastalarda en sık görülen HLA alleleri, HLA-A*03, HLA-DRB1*04 olarak, sınıf II pozitif sınıf I negatif olarak bulunan hastalarda en sık görülen HLA alleleri, HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-B*35 olarak, PRA testi sonucu sınıf II ve sınıf II pozitif olan hastalarda en sık görülen HLA alleleri, HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-B*35, HLADRB1*11 olarak bulunmuştur [10].

Bu tez çalışmasında, 2012-2022 tarihleri arasında Dışkapı Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarına gelen KBY hastalarından alınan kan örnekleri ile dolaşımdaki T lenfositlerin alt grupları incelenmiştir. Kan örneklerinden elde edilen veriler ($CD3^+$, $CD19^+$, $CD3^-CD16/56$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD25^{low}$, $CD127/CD4^+CD25^{low}$, $CD4^+HLA - DR^+$, $CD4^+CD57^+$, $CD8^+CD25^+$, $CD127/CD8^+CD25^{low}$, $CD8^+CD57^+$, $CD8/CD8^+HLA - DR^+$, $CD14HLA - DR^+$ istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

1. KBY hastalarının PRA durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey antijeni değerleri PRA Pozitif hastalarda daha yüksek olduğu bulunmuştur.
2. PRA Pozitif hastalar $CD4^+CD25^{low}$, $CD4^+HLA - DR^+$ yüzey belirteçleri, sınıf I ve II pozitiflik yüzdeleri arasında anlamlı bir fark elde edilmemiştir.
3. KBY hastalarının nakil durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteçleri değerlerinden, $CD4^+CD25^{low}$ yüzey belirteç değerinin böbrek nakli yapılan KBY hastalarıyla yapılmayan KBY hastaları arasında anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur.
4. KBY hastalarının rejeksiyon durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ T hücre yüzey belirteç değerleri incelendiğinde rejeksiyon durumuna göre istatistiksel farklılık gözlenmemiş ancak p-value değeri 0.05'e oldukça yakın elde edilmiştir. Bu durum hasta sayısının artırılmasıyla anlamlı bir fark elde edileceğini düşündürmüştür.
5. KBY hastalarının doku tipleri PRA durumu ile karşılaştırıldığında PRA test sonucu pozitif veya negatif olan hastalarda HLA-A, HLA-B ve HLA-DRB1 lokus numaraları açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Elde edilen sonuçlar, 24 hastalık verilerde PRA pozitif hastalarda $CD4^+CD25^{low}$ ve $CD4^+HLA - DR^+$ yüzey belirteçleri ve KBY hastalarının nakil olanlarında $CD4^+CD25^{low}$ yüzey belirteci değerlerinde istatistiksel anlamlı değişiklikler saptanmıştır. Anlamlı bir fark yakalanamayan KBY hastalarının nakil durumuna göre $CD4^+HLA - DR^+$ yüzey belirteç ve rejeksiyon durumuna göre $CD4^+CD25^{low}$ ve

$CD4^+HLA - DR^+$ yüzey belirteçlerinde de istatistiksel anlamlı olmayan değişimler saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında, Covid-19 süreci nedeniyle, planlanan hasta sayılarına ulaşamamıştır. Hasta sayılarının arttırılması ve çok değişkenli istatistiksel analizlerle bu bulguların desteklenmesi durumunda bu immünolojik belirteçlerin hasta monitorizasyonu için ek bir parametre olarak kullanılabilceği düşünölmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Jan Klein and FELIPE Figueroa. Evolution of the major histocompatibility complex. *Critical reviews in immunology*, 6(4):295–386, **1986**.
- [2] Irene Park and Paul Terasaki. Origins of the first hla specificities. *Human immunology*, 61(3):185–189, **2000**.
- [3] John Trowsdale. “both man & bird & beast”: comparative organization of mhc genes. *Immunogenetics*, 41(1):1–17, **1995**.
- [4] Jeffrey R Gruen and Sherman M Weissman. Evolving views of the major histocompatibility complex. *BLOOD-NEW YORK-*, 90:4252–4265, **1997**.
- [5] B BROWNING. Hla and mhc: genes, molecules and function. *Peptide associated with MHC class I and Class II molecules*, **1996**.
- [6] John Trowsdale. The mhc, disease and selection. *Immunology letters*, 137(1-2):1–8, **2011**.
- [7] Monika-Sarah ED Schulze and Kai W Wucherpfennig. The mechanism of hla-dm induced peptide exchange in the mhc class ii antigen presentation pathway. *Current opinion in immunology*, 24(1):105–111, **2012**.
- [8] K Dalva. Her yerde karşımda: Nedir bu hla tiplendirimi. *XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu*, pages 23–28, **2004**.
- [9] Gülüzar Özbolat, Ebru Dünder Yenilmez, and TULİ Abdulah. İnsan lökosit antijenleri, yapı ve işlevleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23(3):387–397, **2014**.
- [10] Burcu Karakuş. Kronik böbrek yetmezliği hastalarının etiyolojilerine göre hla doku tipinin belirlenmesi ve antikör düzeylerinin araştırılması. **2017**.
- [11] Hooi Sian Eng, Greg Bennett, Peter Bardy, Patrick Coghlan, Graeme R Russ, and P Toby H Coates. Clinical significance of anti-hla antibodies

detected by luminex®: Enhancing the interpretation of cdc-bxm and important post-transplantation monitoring tools. *Human immunology*, 70(8):595–599, **2009**.

- [12] Lois U Nwakanma, Jason A Williams, Eric S Weiss, Stuart D Russell, William A Baumgartner, and John V Conte. Influence of pretransplant panel-reactive antibody on outcomes in 8,160 heart transplant recipients in recent era. *The Annals of thoracic surgery*, 84(5):1556–1563, **2007**.
- [13] Mustafa Soyöz, Tülay Kılıçaslan Ayna, Burcu Çerçi Gürbüz, Derya Güleç, Murat Kılıçoğlu, Ceren Yüksel, and İbrahim Pirim. Böbrek nakli bekleme listesindeki hastalarda anti-hla antikorlarının tanımlanması. *Med J SDU/SDÜ Tıp Fak Derg*, 24(2):41–45, **2017**.
- [14] Mehmet ERİKOĞLU, Murat BÜYÜKDOĞAN, and CORA Tülin. The relationship between hla antigens and blood groups. *European Journal of General Medicine*, 8(1):65–68, **2011**.
- [15] A Arnaiz-Villena, M Karin, N Bendikuze, E Gomez-Casado, J Moscoso, C Silvera, FS Oguz, A Sarper Diler, A De Pacho, L Allende, et al. Hla alleles and haplotypes in the turkish population: relatedness to kurds, armenians and other mediterraneans. *Tissue antigens*, 57(4):308–317, **2001**.
- [16] Sung Yoon Choo. The hla system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal*, 48(1):11–23, **2007**.
- [17] Bingnan Liu, Yuanyuan Shao, and Rong Fu. Current research status of hla in immune-related diseases. *Immunity, Inflammation and Disease*, 9(2):340–350, **2021**.
- [18] Michael Cullen, Janelle Noble, Henry Erlich, Karen Thorpe, Stephan Beck, William Klitz, John Trowsdale, and Mary Carrington. Characterization of recombination in the hla class ii region. *American journal of human genetics*, 60(2):397, **1997**.

- [19] Başak Yalçın. Major doku uygunluk kompleksi (mhc) molekülleri: genel özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi. *Archives of the Turkish Dermatology & Venerology/Turkderm*, **2013**.
- [20] Javier Chinen and Rebecca H Buckley. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2):S324–S335, **2010**.
- [21] Walport M Janeway CA Jr, Travers P. *HLA polymorphism*. Yale University School of Medicine, Anthony Nolan Research Institute, London, Imperial College School of Medicine, London, **2001**.
- [22] Monica Fabbri, Chanel Smart, and Ruggero Pardi. T lymphocytes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(7):1004–1008, **2003**.
- [23] Berna GÜNEY SARUHAN and Selman DERELİ. Lenfosit çeşitleri ve immun sistemdeki görevleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1):41–48.
- [24] Benedikt Strunz, Julia Hengst, Katja Deterding, Michael P Manns, Markus Cornberg, Hans-Gustaf Ljunggren, Heiner Wedemeyer, and Niklas K Björkström. Chronic hepatitis c virus infection irreversibly impacts human natural killer cell repertoire diversity. *Nature communications*, 9(1):1–12, **2018**.
- [25] Thomas A Wynn, Ajay Chawla, and Jeffrey W Pollard. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446):445–455, **2013**.
- [26] Şükran YEDİEL ARAS and Ebru KARADAĞ SARI. İmmun sistem hücrelerinde cd molekülleri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2):206–214, **2017**.
- [27] Utku Horzum. Farklı aktivasyon basamaklarına ilerletilen yardımcı t hücrelerinde adezyon ve migrasyon mekanizmalarının incelenmesi. **2020**.

- [28] Hüseyin Avcılar, Mustafa Köker, and Bülent Eser. Sağlıklı kemik iliği ve kan örneklerinde akım sitometri uygulamaları. *Cumhuriyet Medical Journal*, 36(3):415–421, **2014**.
- [29] Ronald A DeLellis, Sandra J Shin, and OD Treaba. Immunohistology of endocrine tumors. **2010**.
- [30] A Mikłaszewicz, S Giedrys-Kalemba, U Teodorczyk, J Hałasa, K Goertz, S Zieliński, M Ostrowski, R Kostyrka, J Lapis, G Kulig, et al. Influence of protective genes in the hla system on renal graft survival. In *Transplantation proceedings*, volume 32, pages 1337–1338. **2000**.
- [31] John Trowsdale and Julian C Knight. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*, 14:301, **2013**.
- [32] Carolyn Katovich Hurley. Naming hla diversity: a review of hla nomenclature. *Human immunology*, 82(7):457–465, **2021**.
- [33] Stefan Müller, editor. *Proceedings of the 15th International Conference on Head-Driven Phrase Structure Grammar*. **2008**.
- [34] Stephen Sheldon and Kay Poulton. Hla typing and its influence on organ transplantation. *Transplantation Immunology*, pages 157–174, **2006**.
- [35] Gönül Zişan Öncel, Nilnur Eyerci, Atilla Eroğlu, and İbrahim Pirim. Kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu yapılmış hastaların serumlarında anti-hla antikorlarının tanımlanması.
- [36] YM Mosaad. Clinical role of human leukocyte antigen in health and disease. *Scandinavian journal of immunology*, 82(4):283–306, **2015**.
- [37] D Turner. The human leucocyte antigen (hla) system. *Vox sanguinis*, 87:87–90, **2004**.

- [38] JAN Klein and Akie Sato. The hla system. *New England Journal of Medicine*, 343(10):702–709, **2000**.
- [39] JP Clewley. The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. *Journal of virological methods*, 25(2):179–187, **1989**.
- [40] Daniel LE Waters and Frances M Shapter. The polymerase chain reaction (pcr): general methods. In *Cereal Genomics*, pages 65–75. Springer, **2014**.
- [41] Janice Cline, Jeffery C Braman, and Holly H Hogrefe. Pcr fidelity of pfu dna polymerase and other thermostable dna polymerases. *Nucleic acids research*, 24(18):3546–3551, **1996**.
- [42] Manuela Testi and Marco Andreani. Luminex-based methods in high-resolution hla typing. In *Molecular Typing of Blood Cell Antigens*, pages 231–245. Springer, **2015**.
- [43] Falko Markus Heinemann. Hla genotyping and antibody characterization using the luminextm multiplex technology. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 36(4):273–278, **2009**.
- [44] Heather Dunckley. Hla typing by sso and ssp methods. *Immunogenetics*, pages 9–25, **2012**.
- [45] Carmen Lefaucheur, Caroline Suberbielle-Boissel, Gary S Hill, Dominique Nochy, Joao Andrade, Corinne Antoine, C Gautreau, D Charron, and D Glotz. Clinical relevance of preformed hla donor-specific antibodies in kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*, 8(2):324–331, **2008**.
- [46] Susan V Fuggle and Susan Martin. Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation*, 86(3):384–390, **2008**.

- [47] J Hyun, K Deuk Park, Yv Yoo, B Lee, BY Han, EY Song, and MH Park. Effects of different sensitization events on hla alloimmunization in solid organ transplantation patients. In *Transplantation proceedings*, volume 44, pages 222–225. Elsevier, **2012**.
- [48] James H Lan, Matthew Kadatz, Doris T Chang, Jagbir Gill, Howard M Gebel, and John S Gill. Pretransplant calculated panel reactive antibody in the absence of donor-specific antibody and kidney allograft survival. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 16(2):275–283, **2021**.
- [49] Katherine M McKinnon. Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*, 120(1):5–1, **2018**.
- [50] Greg Finak, Marc Langweiler, Maria Jaimes, Mehrnoush Malek, Jafar Taghiyar, Yael Korin, Khadir Raddassi, Lesley Devine, Gerlinde Obermoser, Marcin L Pekalski, et al. Standardizing flow cytometry immunophenotyping analysis from the human immunophenotyping consortium. *Scientific reports*, 6(1):1–11, **2016**.
- [51] Andrew S Levey and Josef Coresh. Chronic kidney disease. *The lancet*, 379(9811):165–180, **2012**.
- [52] Aline Rodrigues Pinto, Nathani Cristina Da Silva, and Luciana Pinato. Analyses of melatonin, cytokines, and sleep in chronic renal failure. *Sleep and Breathing*, 20(1):339–344, **2016**.
- [53] Peter Stiefelhagen. 34. acute and chronic renal failure–prognosis depends on early diagnosis! *MMW Fortschritte der Medizin*, 144(29-30):I–XII, **2002**.
- [54] DF Geary, K Haka Ikse, P Coulter, and D Secker. The role of nutrition in neurologic health and development of infants with chronic renal failure. *Adv Perit Dial*, 6:252–254, **1990**.
- [55] Paul E Stevens, Adeera Levin, and Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members*.

- Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Annals of internal medicine*, 158(11):825–830, **2013**.
- [56] Andrew S Levey, Josef Coresh, Kline Bolton, Bruce Culleton, Kathy Schiro Harvey, T Alp Ikizler, Cynda Ann Johnson, Annamaria Kausz, Paul L Kimmel, John Kusek, et al. K/doqi clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American Journal of Kidney Diseases*, 39(2 SUPPL. 1):i–ii+, **2002**.
- [57] Gültekin Süleymanlar, Cengiz Utaş, Turgay Arinsoy, Kenan Ateş, Bülent Altun, Mehmet Riza Altıparmak, Tevfik Ecder, Mehmet Emin Yılmaz, Taner Çamsarı, Ali Başçı, et al. A population-based survey of chronic renal disease in turkey—the credit study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(6):1862–1871, **2011**.
- [58] ÖZER Zülfünaz, Nevin AYGÜN, TEKE Neslihan, and Rukiye PINAR. Hemodiyalize giren hastaların diyabet yönetim durumları: Diyarbakır örneği. *Nefroloji Hemşireliği Dergisi*, 15(2):56–65.
- [59] Monica SY Ng, Shahid Ullah, Gregory Wilson, Stephen McDonald, Matthew Sypek, and Andrew J Mallett. Abo blood group relationships to kidney transplant recipient and graft outcomes. *PloS one*, 15(7):e0236396, **2020**.
- [60] JR Storry and Martin L Olsson. The abo blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology*, 25(2):48–59, **2009**.
- [61] Eiji Hosoi. Biological and clinical aspects of abo blood group system. *The journal of medical investigation*, 55(3, 4):174–182, **2008**.
- [62] Tekin Akpolat and C Utaş. Hemodiyaliz hekimi el kitabı. *Türk Nefroloji Derneği Yayını, Erciyes Üniv mat. Kayseri*, **1997**.
- [63] Annelies E de Weerd and Michiel GH Betjes. Abo-incompatible kidney transplant outcomes: a meta-analysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 13(8):1234–1243, **2018**.

- [64] Steven J Mack. A gene feature enumeration approach for describing hla allele polymorphism. *Human immunology*, 76(12):975–981, **2015**.
- [65] Ulf Gyllensten and Marie Allen. Pcr-based hla class ii typing. *PCR Methods Appl*, 1(2):91–98, **1991**.
- [66] Yoshiki Itoh, Nobuhisa Mizuki, Tsuyako Shimada, Fumihiko Azuma, Mitsuo Itakura, Koichi Kashiwase, Eri Kikkawa, Jerzy K Kulski, Masahiro Satake, and Hidetoshi Inoko. High-throughput dna typing of hla-a,-b,-c, and-drb1 loci by a pcr–ssop–luminex method in the japanese population. *Immunogenetics*, 57(10):717–729, **2005**.
- [67] Klara Dalva and Meral Beksac. Hla typing with sequence-specific oligonucleotide primed pcr (pcr-ssop) and use of the luminex™ technology. In *Bone Marrow and Stem Cell Transplantation*, pages 61–69. Springer, **2007**.
- [68] Hana Glier, Ingmar Heijnen, Mathieu Hauwel, Jan Dirks, Stéphane Quarroz, Thomas Lehmann, Alicia Rovo, Kornelius Arn, Thomas Matthes, Cassandra Hogan, et al. Standardization of 8-color flow cytometry across different flow cytometer instruments: a feasibility study in clinical laboratories in switzerland. *Journal of immunological methods*, 475:112348, **2019**.
- [69] Jang-Hee Cho, Young-Deuk Yoon, Hye Min Jang, Eugene Kwon, Hee-Yeon Jung, Ji-Young Choi, Sun-Hee Park, Yong-Lim Kim, Hyung-Kee Kim, Seung Huh, et al. Immunologic monitoring of t-lymphocyte subsets and hla-dr-positive monocytes in kidney transplant recipients: a prospective, observational cohort study. *Medicine*, 94(44), **2015**.
- [70] Rebecca Pike, Niclas Thomas, Sarita Workman, Lyn Ambrose, David Guzman, Shivajanani Sivakumaran, Margaret Johnson, Douglas Thorburn, Mark Harber, Benny Chain, et al. Pd1-expressing t cell subsets modify the rejection risk in renal transplant patients. *Frontiers in immunology*, 7:126, **2016**.

- [71] Tülay Kılıçaslan Ayna, Burcu Akman, Aslı Özkızılcık Koçyiğit, Derya Güleç, Cem Tugmen, and Mustafa Soyöz. Flow cytometric evaluation of t and b lymphocyte percentage in chronic kidney disease. *Medical Research Journal*, 2(1):29–33, **2017**.
- [72] Selene Ottonello, Carlo Genova, Irene Cossu, Vincenzo Fontana, Erika Rijavec, Giovanni Rossi, Federica Biello, Maria Giovanna Dal Bello, Marco Tagliamento, Angela Alama, et al. Association between response to nivolumab treatment and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with non-small cell lung cancer. *Frontiers in immunology*, 11:125, **2020**.