



**TRANSPLANTASYON BAŞARISINDA ETKİLİ OLAN DONÖRE ÖZGÜN  
ALLOREAKTİF HAFIZA B HÜCRE REZERVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**HANDE AKALAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi**

**Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN**

**2023**

T.C.  
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TRANSPLANTASYON BAŞARISINDA ETKİLİ OLAN DONÖRE ÖZGÜN  
ALLOREAKTİF HAFIZA B HÜCRE REZERVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HANDE AKALAN

ORCID: 0000-0002-5922-2498

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ  
Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Ocak-2023

Her hakkı saklıdır.

## ARAŐTIRMA FONU DESTEĞİ BEYANI

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak sunulan ve Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışması; Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi BAP tarafından NKUBAP.01.GA.21.301 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

Hande AKALAN

26/01/2023



## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI



## ÖZET

### TRANSPLANTASYON BAŞARISINDA ETKİLİ OLAN DONÖRE ÖZGÜN ALLOREAKTİF HAFIZA B HÜCRE REZERVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hande AKALAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Alloantikorlara ek olarak, alloreaktif hafıza B hücre (hBH) rezervi, transplantasyon süreçleri sırasında immünolojik risk değerlendirmesi için bir potansiyele sahiptir. Şu anda alloreaktif hBH değerlendirmesi için, HLA tetramer boyama kullanılarak doğrudan Akım Sitometri (FC) analizi bir seçenektir. Poliklonal olarak uyarılmış alloreaktif hBH'ler tarafından üretilen alloantikorların *in vitro* kültür sisteminde değerlendirilmesi, başka bir yararlı yaklaşım gibi görünmektedir, ancak bu yaklaşımda ilave işlemlere gereksinim vardır. Bu çalışmada, hBH tespiti için *in vitro* poliklonal olarak aktive edilmiş hBH kültür süpernatantlarının ve potansiyel donörün lenfositlerinin kullanıldığı Akış Sitometrik Çapraz Eşleştirmenin (FCXM-süpernatant) kullanılabilirliğini araştırdık. Allosensitize edilmiş 10 böbrek nakli hastasından elde edilen poliklonal olarak aktive edilmiş hBH'lerin kültür süpernatantları ile bunların alloimmünite olmayan donörlerinin lenfositleri ve karşılıklı olacak şekilde FCXM-süpernatant deneyleri yapıldı. HLA tiplmesi SSP yöntemi ile yapıldı. *In vitro* aktive edilmiş alloreaktif hBH'ler tarafından üretilen anti-HLA antikorlar da Luminex testleri ile değerlendirildi. hBH'lerin *in vitro* poliklonal aktivasyonunun başarısı, toplam IgG Elisa testi ve FC tarafından antikor salgılayan hücre analizleri ile değerlendirildi. Donöre özgü alloreaktif hBH'ler, allosensitize edilmiş 10 vakanın %40'ında FCXM-süpernatant tarafından tespit edildi. Güçlü allosensitize vakalarda tespit oranı %75 (4'te 3) idi. Allosensitizasyon olmayan kontrol vakalarında hiçbir alloreaktif hBH tespit edilmedi. Allosensitize vakaların FCXM süpernatant negatif sonuçları, süpernatantların toplam IgG antikor testleri ile değerlendirilen düşük düzeyde allosensitizasyon ve yetersiz poliklonal stimülasyon ile ilişkiliydi. Bu çalışmada, doku tipleme laboratuvarlarında gerçekleştirilen rutin bir teste kolayca dönüştürülebilmesi için FCXM-süpernatant testi kullanılarak donöre özel bir şekilde alloreaktif hBH tespiti için pratik bir metodoloji sunuyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** İmmünoloji, Moleküler Biyoloji, Hafıza B Hücresi, Transplantasyon İmmünolojisi, Poliklonal Uyarım, Akış sitometrisi (FCXM)

## ABSTRACT

### ASSESSMENT OF THE DONOR SPECIFIC ALLOREACTIVE MEMORY B CELL RESERVE AFFECTING THE TRANSPLANTATION SUCCESS

Hande AKALAN

Department of Biology

PhD Thesis

Supervisor: Associate Professor Duygu YAŞAR ŞİRİN

In addition to alloantibodies, alloreactive memory B cell (mBC) evaluation has a potential for immunological risk assessment during transplantation processes. For the alloreactive mBCs evaluation currently, direct Flow Cytometric (FC) analysis using the HLA tetramer staining is an option. Evaluation of alloantibodies produced by the polyclonally stimulated alloreactive mBCs in *in vitro* culture system seems to be another useful approach, but this needs further downstream applications. In this study, we investigated the usefulness of the Flow Cytometric Cross Match (FCXM-supernatant) in which *in vitro* polyclonally activated mBCs culture supernatants and potential donor's lymphocytes being used for the mBC detection. FCXM-supernatant assays were performed between culture supernatants of polyclonally activated mBCs obtained from allosensitized 10 renal transplant patients, and their non-alloimmunized donors' lymphocytes, and vice versa. HLA typing was performed by SSP method. Anti-HLA antibodies produced by *in vitro* activated alloreactive mBCs were also evaluated by the Luminex assays. The success of *in vitro* polyclonal activation of mBCs was evaluated by a total IgG ELISA test and antibody secreting cell analyses by FC. Donor specific alloreactive mBCs were detected by FCXM supernatant in 40% of the 10 allosensitized cases. Detection rate was 75% (3 out of 4) in the strongly allosensitized cases. No alloreactive mBCs was detected in control cases without allosensitization. FCXM supernatant negative results of the allosensitized cases were related to low level of allosensitization and insufficient polyclonal stimulation evaluated by total IgG antibody tests of the supernatants. We herein report a practical methodology for alloreactive mBC detection as a donor specific manner using the FCXM-supernatant assay so that this would easily be transformed into a routine test performed in tissue typing laboratories.

**Keywords:** Immunology, Molecular Biology, Memory B Cell, Transplantation Immunology, Polyclonal Stimulation, Flow Cytometry

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
TEŞEKKÜR .....	viii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>16</b>
1.1 Literatür Özeti .....	17
1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı .....	20
<b>2. ORGAN NAKLİ (TRANSPLANTASYON) .....</b>	<b>22</b>
2.1 Organ Nakil Tarihiçesi .....	22
<b>3. ORGAN NAKİLLERİNE İMMÜNOLOJİK YAKLAŞIM .....</b>	<b>24</b>
3.1 Böbrek Nakil Öncesi Gerçekleştirilen İmmünolojik Değerlendirmeler .....	24
3.2 Böbrek Naklinde ABO Kan Grubu Uyumu .....	24
3.3 Böbrek Naklinde HLA Uyumu .....	25
3.3.1 HLA sınıf I molekülleri ( HLA A, B, C).....	27
3.3.2 HLA sınıf II molekülleri (HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1).....	28
3.3.3 HLA sınıf III molekülleri.....	30
3.4 HLA Tiplendirme Yöntemleri.....	30
3.4.1 Moleküler yöntemler.....	30
3.4.1.1 Diziye özgü primer yöntemiyle HLA tiplendirmesi (SSP).....	30
3.4.1.2 Diziye özgü oligonükleotit primer yöntemiyle HLA tiplemesi (SSO).....	30
3.4.2 Serolojik yöntemler.....	31
3.4.2.1 Anti-HLA antikorları (Panel reaktif antikor) taraması.....	32
3.4.2.2 Luminex yöntemi ile HLA taraması.....	32
3.4.2.3 Alıcı ve donör arasında yapılan çapraz (Cross-Match) testler.....	32
3.4.2.4 Kompleman bağımlı sitotoksikite çapraz karşılaştırma testi (CDCXM).....	33
3.4.2.5 Flow sitometri (akım sitometrisi) ile çapraz test (FCXM).....	33
3.4.2.6 Sanal çapraz test.....	34
3.4.2.7 Elisa testi.....	34

<b>4. KULLANILAN CİHAZ, KİMYASAL, SOLÜSYON VE KİTLER .....</b>	<b>36</b>
4.1 Kullanılan Cihazlar .....	36
4.2 Kullanılan Kimyasallar .....	36
4.3 Kullanılan Solüsyonlar .....	37
4.3.1 DMEM besiyeri ortamı (1 litre, pH:7,2) .....	37
4.3.2 Poliklonal uyarım kokteyli içeren besiyeri ortamı (100 ml) .....	37
4.3.3 1x Fosfat tuz tamponu (PBS) (1 litre, pH: 7,4) .....	37
4.3.4 Hücre dondurma solüsyonu .....	38
4.3.5 Enzim işaretli immünosorbent test (Elisa) solüsyonları .....	38
4.3.5.1 10 mM Tris pH 9,0 kaplama solüsyonu (500 ml).....	38
4.3.5.2 %0,025 Tween/PBS solüsyonu (500 ml).....	38
4.3.5.3 %0,05 Tween/PBS solüsyonu (10 litre) .....	38
4.3.5.4 %4 Sığır serum albümin (BSA) solüsyonu (500 ml) .....	38
4.3.5.5 %2 BSA solüsyonu (500 ml) .....	38
4.3.5.6 %1 BSA solüsyonu (500 ml) .....	38
4.3.5.7 %20 BSA/PBS/%0,02 azide solüsyonu (500 ml) .....	39
4.3.5.8 ABTS-substrat solüsyonu basamak 1 .....	39
4.3.5.9 ABTS-substrat solüsyonu basamak 2 .....	39
4.3.5.10 250 mM okzalik asit solüsyonu (500 ml) .....	39
4.4 Kullanılan Kitler .....	39
<b>5. OLGU SEÇİMİ .....</b>	<b>40</b>
<b>6. KULLANILAN YÖNTEMLER .....</b>	<b>41</b>
6.1 Periferik Kan Mononükleer Hücre (PBMNC) Eldesi .....	41
6.2 Olgu Seçiminde Akım Sitometrik Çapraz Uyum Testi (FCXM) .....	42
6.3 Genomik DNA izolasyonu .....	43
6.4 SSP Yöntemi ile HLA A, B, DR Genotiplendirmesi .....	44
6.5 Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PBMNCs) <i>in vitro</i> Kültüre Edilmesi, Uyarımı ve Antikor Sentezleyen Hücre Eldesi, Hafıza B Hücre Rezervinin Değerlendirilmesi .....	45
6.6 Kültür Süpernatantı 6. Gün Akım Sitometrik Çapraz Uyum Testi (FCXM) .....	47
6.7 Kültür Süpernatantı 12. Gün Akım Sitometrik Çapraz Uyum Testi (FCXM) .....	48
6.8 Hafıza B ve Plazma Hücrelerinin Hücre Yüzey Markerları ile Saptanması .....	50
6.9 Elisa .....	51
6.10 Luminex Çalışması .....	52



<b>7. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>53</b>
7.1 Allosensitize Olgu Seçiminde FCXM Sonuçları .....	53
7.2 HLA-A-B-DR Tiplendirme .....	55
7.3 Hücre Kültürü .....	56
7.4 6 ve 12. Gün Kültür Süpernatantlarında FCXM .....	57
7.5 Kültür Sonu Hücrelerin Hücre Yüzey Markerları ile İşaretlenmesi .....	59
7.6 12.Gün Kültür Sonu Luminex Sonuçları .....	60
7.7 Kültür Süpernatantlarındaki anti-HLA Ab Tespiti .....	61
7.8 Elisa Testi .....	61
<b>8. TARTIŞMA.....</b>	<b>64</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>68</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ ESERLER .....</b>	<b>76</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>77</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 6.1. Olerup SSP HLA-A-B-DR SSP combi tray kiti polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri.....	44
Çizelge 6.2. Olerup SSP HLA-A-B-DR SSP combi tray kiti polimeraz zincir reaksiyonu ısıl döngü derece ve süreleri.....	45
Çizelge 6.3. Deney grupları.....	47
Çizelge 7.1. Allosensitize olgu seçim.....	54
Çizelge 7.2. Olguların HLA tiplendirme ve mismatch sonuçları.....	56
Çizelge 7.3. Kültür süpernatatları ile gerçekleştirilen FCXM çalışmasının MCS sonuçları.....	57
Çizelge 7.4. CD38 boyama sonuçları.....	59
Çizelge 7.5. Gün kültür sonu Luminex sonuçları.....	60
Çizelge 7.7. Periferik hBH'lerin <i>in vitro</i> poliklonal stimülasyonundan sonra Elisa ile toplam IgG Ab analizlerinin uyarım yapılan ve yapılmayan kültürlerdeki değerlerin birbirine oranı...	63

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. HLA yapısı.....	26
Şekil 3.2. HLA Sınıf I Yapısı.....	28
Şekil 3.3. HLA Sınıf II Yapısı.....	29
Şekil 3.4. Sandviç elisa yöntemi.....	35
Şekil 6.1. Deney tasarımı.....	46
Şekil 7.1. FCXM-süpernatant Histogramları. FCXM-süpernatant test sonucu (+) pozitif olarak kabul edildi (MCS: 1,96) (A); FCXM-süpernatant test sonucu (++) pozitif olarak kabul edildi (MCS: sırasıyla 5,33 ve 57,1) (B ve C); ve FCXM-süpernatant test sonucu (+++) pozitif olarak kabul edildi (MCS: 480,86) (D).....	53
Şekil 7.2. HLA tiplendirme: Demonstratif agaroz jel görüntüleri.....	55
Şekil 7.3 PBMNC hücre kültürlerinin kültür süreleri boyunca poliklonal uyarıma bağlı olarak hücre morfolojilerindeki değişim.....	58
Şekil 7.4. IgG protein standart eğrisi ve konsantrasyon miktarları.....	62

## SİMGELER DİZİNİ

$(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Okzalik asit
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
KCl	Potasyum klorür
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Dipotasyum fosfat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Disodyum hidrojen fosfat dehidrat ekstra saf
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür



## KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
ABST	2,2'-azinobis [3-ethilenbenzothiazoline-6-sulfonik acit]-diamonyum tuzu
BSA	Sığır Serum Albumin
CD	Hücre Farklılaşması
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FBS	Fetal Sığır Serum
FC	Akış Sitometrisi
FCXM	Akış Sitometrik Çapraz Eşleştirme
FITC	Floresan izotiyosiyanat
g	Gram
gDNA	Genomik DNA
hBH	Hafıza B Hücresi
HLA	İnsan Lenfosit Antijen
IgG	İmmüoglobülin G
IL	İnterlökin
ITS	İnsülin Transferin Sodyum Selenit
IU	Uluslararası Unit
mBC	Hafıza B Hücresi
MFI	Ortalama Floresan Yoğunluğu
MCS	Medyan Kayması
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
O.D	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu solüsyon
rpm	Dakikada dönüş sayısı

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük özveri gösteren, her zaman anlayışla ve sabırla beni dinleyip tüm konu ve koşullarda desteğini benden esirgemeyen; her deney sonucumda benimle aynı heyecanı ve ilgiyi gösterip, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan; mesleki ve manevi açıdan iyi bir bilim insanı olarak yetişmem adına buraya yazmakla asla sığdıramayacağım emekler harcayan; yaptığım çalışmalarla “ben” olmama ön ayak olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN’e en içten minnet duygularıyla;

Doktora tez çalışma konumun belirlenmesinde büyük katkısı olan, çalışmalarımda tecrübeleriyle bana yön gösteren, yüksek lisans eğitim hayatımdan bugüne kadar bana kazandırmış olduğu sayısız çalışma tecrübeleri sonucu kendisiyle çalışmaktan dolayı kendimi her zaman çok şanslı gördüğüm Prof. Dr. Türker BİLGİN’e; deneylerimde beni cesaretlendiren, çok keyif aldığım bilimsel sohbetlerimizden ve kritik eleştirilerinden esinlenerek deney yapma şevkimi arttıran Prof. Dr. Mesut İzzet TİTİZ’e; laboratuvar şartlarında gerekli düzenin sağlanmasında her türlü imkanı güler yüzleri ile esirgemeyen Öğr. Gör. Duygu KORUCU ERDEM ve Öğr. Gör. Dr. Sertaç ATALAY’a; doktora eğitimim sürecinde tez çalışmam dışında farklı araştırmalarda görev almamı sağlayarak alanımda çok yönlü ilerlememe vesile olan Prof. Dr. Rıfat BİRCAN ve Prof. Dr. DENİZ ŞİRİN’e; çalışmalarım esnasında gerek göstermiş olduğu katkı gerek manevi desteği ile bu sürecin keyifli hale gelmesinde hiç kuşkusuz emeği büyük olan canım dostum Gonca TURANLI GÜZELEL’e; tez yazım aşamasında stresime ortak olup moralimi yüksek tutan; Binnur SEYHAN, Kübra KUŞSAN, Aslı AKYÜZ ve Melikenur TÜRKOL’a;

Hayatımın her anında destek ve sevgileri ile yanımda olan annem Nejla AKALAN, babam Hayri AKALAN ve kardeşim Emir Can AKALAN’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi BAP NKUBAP.01.GA.21.301 numaralı projeler ile desteklenmiştir

Hande AKALAN

## 1. GİRİŞ

Organ nakli günümüzde kronik organ yetmezliği olan hastalar için önemli bir tedavi seçeneğidir (Triulzi vd., 2009). Organ naklinin başarısı için nakil öncesi yapılan immünolojik değerlendirmede, alıcıda hâlihazırda var olabilen allojenik antikorların varlığının araştırılması önemli bir yer tutmaktadır (Ojo vd., 2013). Bu tip antikorların önceki organ nakilleri, gebelikler ve kan transfüzyonları nedeniyle geliştiği düşünülmektedir (Nouel, 2014). Organ nakli açısından en önemli antijenler İnsan Lökosit Antijenleridir (HLA). Bunun yanında HLA dışı diğer bazı antijenler ve bunlara karşı oluşturulan antikorlar da organ naklinde önemli olabilmektedir (Can vd., 2016; Lefaucheur vd., 2010). Nakil öncesi alıcıda hâlihazırda var olan allojenik antikorların transplantasyondaki önemi özellikle hiperakut ret reaksiyonundaki rolleri dolayısıyla gayet iyi bilinmektedir. Allojenik antikorların varlığı akut ve kronik ret reaksiyonlarıyla da ilişkilidir. Nakil sonrası, de novo antikor oluşumu da naklin başarısını etkileyen diğer bir antikor kaynaklı etkidir. Bu nedenlerle nakil öncesi ve sonrası testlerle alıcı serumundaki alloreaktif antikorların detaylı analizleri rutin olarak yapılmaktadır (Jackson vd., 2011; Opelz, 2005). Günümüzde organ nakline hazırlanan hastalarda nakil öncesi serumdaki allojenik antikorları tespit etmek naklin başarısını öngörmek açısından son derece önemlidir. Bu amaçla doku tipleme laboratuvarlarında rutin amaçla kullanılan çok sayıda test mevcuttur. Bu testlerin başında Panel Reaktif Antikor (PRA) testi gelmektedir. PRA ile allojenik antikorlara sahip olan hastalar (presensitize hastalar) belirlenebildiği gibi sensitizasyonun derecesi de belirlenebilir. Diğer yandan allojenik donör spesifik antikorların (DSA) tespit edilmesine ve alıcının potansiyel donörü açısından değerlendirilmesine imkan sağlayan kompleman bağımlı lenfositotoksisite çapraz uyum (CDC-XM), Akım sitometrik çapraz uyum (FCXM) ve lumineks temelli DSA testleri önemli bir yer tutmaktadır (Piazza vd., 2006, Susal vd., 2013). FCXM yöntemi, genellikle sitotoksik etkili antikorların saptanmasında vazgeçilmez bir yöntem olan CDC-XM yöntemiyle birlikte kullanılan, donör spesifik allojenik antikorların tespit ve kantite edilmesinde hassasiyeti yönüyle ön plana çıkan lenfosit temelli çapraz uyum testidir (Graff vd., 2010, Na vd., 2015). İmmünolojik değerlendirmede kullanılan testler son yıllarda çeşitlenmiş ve gelişmiş olmasına karşın nakil sonrası gelişen humoral reaksiyonların sayısı istenilen düzeye indirilememiştir. Bunun sebeplerinden birisi de mevcut şartlarda nakil öncesinde yapılan allojenik antikor değerlendirilmesinin, nakil sonrası gelişebilecek potansiyel humoral yanıtın gerçek büyüklüğünü belirlenmesindeki yetersizliğidir.

Humoral yanıtta merkezi role sahip olan B lenfositlerin transplantasyondaki önemi son yıllarda giderek daha iyi anlaşılmasına başlanmıştır. B hücreleri antikör aracılı organ reddine sebep olmanın dışında, antijen sunma yoluyla T hücre aracılı ret reaksiyonunda rol oynamaktadır (Salvalaggio vd., 2009). Bunların dışında B hücrelerin düzenleyici roller üstlendikleri de bilinmektedir (Zielinski vd., 2013).

## 1.1 Literatür Özeti

Stegall vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, bir grup hastada mevcut tekniklerle serumdaki antiHLA antikörler tespit edilememiş olmasına karşın HLA spesifik hafıza B hücrelerinin varlığının gösterilmiş olmasıyla, naklin başarısını öngörme ve tedaviyi planlama açısından HLA spesifik hafıza B hücrelerinin tespit ve kantite edilmesi önem kazanmıştır. Bazı araştırmacılar dolaşımdaki hafıza B hücre oranı ile serumdaki spesifik antikör miktarları arasında bir ilişki olduğunu öne sürmelerine karşın, böyle bir ilişkinin olmadığını söyleyen araştırmalarda mevcuttur (Caraux vd., 2010; Zachary vd., 2013). Bu nedenle alloreaktif hafıza B hücre rezervi serum antikör saptanmasından bağımsız bir parametre olarak immünolojik değerlendirmede yerini alabilir. Transplantasyon öncesi serum HLA antikörü negatif olan ancak HLA spesifik B hücreler açısından pozitif olan renal transplant alıcılarında nakilden hemen sonra antikör üretiminin HLA spesifik B hücre negatif hastalara oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Rojas vd., 2008). Bu bulgular HLA spesifik B hücre rezervinin belirlenmesinin klinik önemini göstermektedir. Serumda alloreaktif antikör saptanması ve düzeyinin belirlenmesi yanında alloreaktif antikörleri sentezleme potansiyelini temsil eden alloreaktif hafıza B hücre rezervinin değerlendirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Nakil sonrası grafit hedefleyecek antikörleri oluşturma potansiyeli olan B hücre rezervinin tespit edilmesiyle naklin başarısını etkileyen faktörlerin nakil öncesi değerlendirilmesinde önemli bir bilgi elde edilmiş olacaktır. Diğer taraftan alloreaktif B hücre rezervinin belirlenmesi nakil öncesi B hücre redüksiyonunu hedefleyen tedavi yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koyması açısından da önemlidir.

Antijen spesifik reaktif B hücre popülasyonlarının fonksiyonel olarak tespit ve kantite edilmesi hafıza B hücrelerinin *in vitro* olarak antikör salgılayan hücrelere dönüştürülmesine dayanmaktadır. Hafıza B hücrelerinin antijen spesifitesi ve miktarının çalışılmasına olanak sağlayacak şekilde *in vitro* olarak aktive edilebildikleri ve antikör üreten hücreler haline gelebildikleri birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Zachary vd., 2007).



Ayrıca monoklonal antiHLA antikor üretme yeteneğine sahip alloreaktif hafıza B hücrelerinin periferal kandan elde edilerek *in vitro* olarak indüklenmeleri de alloreaktif B hücre rezervinin belirlenmesi ve kantite edilmesine yönelik çalışmalara katkı sağlamıştır (Lanzavecchia vd., 2006). Elispot yöntemi antijen spesifik olarak antikor salgılayan B hücrelerinin fonksiyonel olarak tespit edilmesi için modifiye edilmiş bir çeşit elisa yöntemidir (Cao vd., 2010; Crotty vd., 2004; Han vd., 2009). Elispot testi, çok az sayıdaki özgün B hücre gruplarının tespit edilmesinde kullanışlı bir yöntem olmakla birlikte uygulama ve değerlendirmedeki güçlüklerden dolayı yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır. FCXM yöntemi alloreaktif antikor tespitinde rutin uygulamada yaygın bir şekilde kullanılan oldukça hassas bir yöntemdir. Bu yöntem ile poliklonal uyarım sonrası kültür süpernatantında bulunan alloreaktif antikorların donör lenfositleri üzerine bağlanması ve miktarının tespit edilmesi nakil öncesi immünolojik değerlendirmeye önemli bir katkı sağlayabilir. Böylelikle alloreaktif antikorların donöre özgün bir şekilde saptanması mümkün olabilir.

B lenfositlerin *in vitro* koşullarda CD40 ligandı (CD40L) aracılığıyla çoğaltılması, farklılaşması ve antikor salgılayan hücrelere döndürülebilmesi önemli bir dönüm noktası olmuştur (Banchereau ve Rausset, 1991; Fecteau ve Neron 2003, Lanzavecchia vd., 2006; Zachary vd., 2007b, Maiga vd., 2014; Nutt vd., 2015). Sonraki çalışmalarda B lenfositlerden daha fazla antikor elde edilmeye yönelik çabalar gözlenmektedir. Mulder vd. (2001) periferal kandan topladıkları hafıza B hücrelerini, CD40L kaynağı olan fibroblast hücreleri ile ko-kültür yaparak ve aynı zamanda T hücre kültür süpernantı ekleyerek *in vitro* olarak uyarılmış ve antikor üretmeye sevk etmiştir. Bu yolla elde ettikleri B hücre kültür süpernatantını daha önce HLA genotipi çıkartılmış bireylerden oluşan canlı hücre panelleri kullanarak CDC-PRA yöntemiyle test etmişlerdir. Böylelikle periferal kandan elde edilen hafıza B hücreleri kültüre edildiğinde, CD40L ve diğer sitokinlerle antijen spesifik olmayan bir şekilde uyarılarak antikor sentezleyen hücrelere döndürüldüğünde, B hücre kültür süpernatantının öncü B hücrelerin tespit edilmesinde kullanışlı olabileceğini göstermişlerdir (Rousset vd., 1995). Mulder vd. (2001) bu çalışmalarında bazı olgularda CDC ve elisa yöntemi ile tespit edilebilecek miktarlarda çok antikor üretilebildiğini göstermişlerdir.

Hafıza B hücre oranı periferal kandaki B lenfositlerin yaklaşık %20-30'unu oluşturmaktadır (Mulder vd., 2001). Periferal kandaki hafıza B hücre havuzu içerisinde eğer mevcutsa alloreaktif olanlar belirli bir oranda olacaktır. Bu durum ilgilenilen hücre sayısını oldukça düşürmekte ve tespitini güçleştirmektedir.

Periferel kandaki az sayıda alloreaktif hafıza B hücrelerin tespit edilmesindeki güçlükler kemik iliği biyopsisi ile aşılmaya çalışılmıştır. Elispot testinin antikor salgılayan HLA spesifik B hücrelerin klinik değerlendirmesinde kullanılabileceği ilk olarak Mayo klinikten bir grup tarafından önerilmiş ancak protokolleri kemik iliği biyopsisi gerektirdiği için kemik iliği almadaki güçlük nedeniyle rutin uygulamada yer bulmamıştır (Perez-Andres vd., 2010). Leiden üniversitesinden bir grup ise periferel kandan HLA spesifik antikor salgılayan B hücrelerin HLA spesifik B hücre elispot yöntemi ile özgün ve hassas bir şekilde tespit edilebileceğini HLA klas 1 antijenlerin rekombinant monomerlerini kullanarak göstermiştir (Perry vd., 2008). Aynı grup sonraki çalışmaları ile HLA Klas 2 antijenleri için de Elispot yöntemiyle benzer bulguları yayımlamışlardır (Heidt vd., 2012). HLA klas 1 ve klas 2 antijenlerine yönelik olarak hazırlanan Elispot plakaları hafıza B hücrelerinin poliklonal uyarılması ve önceden plaka tabanına yerleştirilmiş HLA antijenleri aracılığı ile tespit edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla hazır HLA spesifik Elispot plakalarının hazırlanması, ticari bir ürün olarak sunulması amaçlandığı görülmektedir. Bu şekilde uygulanan Klas-1 ve -2 spesifik Elispot yöntemi alıcıdaki alloreaktif B hücrelerin bir panel olarak değerlendirilmesine imkân sağlamaktadır. Bu yönüyle klas-1 ve 2 spesifik Elispot yöntemi Panel reaktif hafıza B hücre rezervi deneyi olarak da nitelenebilir. Klas-1 ve -2 spesifik Elispot yöntemi, HLA spesifik B hücrelerin tespit edilmesinde genel bir tarama özelliğine sahiptir ve alıcının potansiyel donöre karşı alloreaktif B hücrelere sahip olup olmadığı, tespit edilen HLA spesifik B hücrelerin potansiyel donörün HLA grupları ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilebilmektedir. Rutin uygulamalar için alınması en kolay hafıza B hücre kaynağı periferel kandır. Ancak hafıza B hücre sayısının periferel kanda düşük olması alloreaktif B hücre tespitinde bir dezavantajdır. Hafıza B hücrelerinin antikor salgılayan hücrelere dönüştürülmesinde güncel geçerli metot CD40L, CpG oligonükleotid DNA ve diğer bazı sitokinlerle gerçekleştirilen poliklonal uyarımdır.

B hücrelerinin antijen bağımlı ve antijen bağımsız bir şekilde uyarıldıktan sonra hızla çoğalarak antikor sentezleyen hücrelere dönüşebildiği bildirilmiştir. AntiHLA antikorlar açısından bugüne kadar yapılan çalışmalar hafıza B hücrelerinin antijen bağımsız bir şekilde poliklonal olarak uyarılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, sahip olunan bütün hafıza B hücrelerinin aktif olarak antikor sentezleyen hücrelere dönüştürülmesi ve oluşan antikorlar içinden alloreaktif olanların tespit edilmesi yoluna gidilmiştir. Aynı anda bütün hafıza B hücrelerinden antikor sentezlenmesi ve analiz edilmesinin hedeflenen antiHLA antikorların saptanmasında bir dezavantaj oluşturması beklenmelidir.

Çalışmamızda, ilgilenilen antiHLA antikorları sentezleme yeteneğine sahip hafıza B hücrelerinin bu potansiyellerini daha kuvvetli bir şekilde açığa çıkarabilmek ve mevcut tekniklerle analiz edilebilir seviyelerde antikor sentezlenmesini sağlayabilmek için literatürde yaygın bir şekilde uygulandığı gözlemlenen poliklonal uyarım gerçekleştirilmiştir.

## 1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Başta anti-HLA antikorları olmak üzere alloantikorlar, özellikle böbrek nakli hastalarında nakil öncesi ve sonrası immünolojik değerlendirmeler için ana hedeflerdir (Piazza vd., 2006; Tait vd., 2013). Serumdaki alloantikora ek olarak, alloreaktif hafıza B hücresi (hBH) değerlendirmesi, immünolojik değerlendirmeleri iyileştirme potansiyeline sahip olabilir (Chong vd., 2015; Chong vd., 2018; Crespo vd., 2015; Lucia vd., 2015; Wehmeir vd., 2020). Alloreaktif hBH'ler, antijenle yeniden karşılaşması veya hafızanın aktive olmasıyla alloantikor üreten hücrelere farklılaşarak, daha yüksek antikor aracılı rejeksiyon riski ve kötü allogreft sonucu ile ilişkili alloantikor seviyelerini arttırabilir (Karahan vd., 2015; Bernasconi vd., 2002; Burns vd., 2008). Alloreaktif hBH'lerin hem çeşidi hem de miktarı son yirmi yılda ilgi konusu olmuştur. Literatür araştırmaları, periferik alloreaktif hBH değerlendirmesi için iki farklı strateji olduğunu ortaya koydu. Biri, alloreaktif hBH'lerin HLA tetramer boyaması kullanılarak FC tarafından doğrudan analizine dayanmaktadır. Bu yaklaşımın dezavantajları; sentetik HLA moleküllerinin kullanılması, dolaşımda alloreaktif hBH'lerin düşük görülme sıklığı ve tespit edilen hücrelerin alloantikor salgılama kapasitesini göstermek için ek adımların gerekliliğidir (Zachary vd., 2008; Mulder vd., 2013). Diğer yaklaşım, hBH'lerin *in vitro* poliklonal aktivasyonunu ve onları antikor (Ab) salgılayan hücrelere dönüştürmesini gerektirir. Bu nedenle alloreaktif hBH'ler, Ab tespiti ile dolaylı olarak değerlendirilebilir (Crespo vd., 2015; Karahan vd., 2015; Karahan vd., 2017). Alloreaktif hBH'ler, sentetik HLA molekülleri kullanılarak HLA'ya özgü ELISPOT analizi veya hücre lizatları kullanılarak donöre özgü hBH ELISPOT analizi ile saptanabilir ve nicelendirilebilir. Her ikisi de rutin bir test olmakta güçlük çeken çok karmaşık testlerdir (Heidt vd., 2012; Karahan vd., 2017). Ayrıca, sentetik HLA moleküllerini kullanan Luminex, tanımlama ve kantifikasyon için güvenilirdir ancak *in vitro* poliklonal olarak aktive edilmiş hBH'lerin kültür süpernatantlarından Abs konsantrasyonu gerektiren pahalı bir testtir (Karahan vd., 2019; Wehmeier vd., 2020). Teknik zorluklar nedeniyle, alloreaktif hBH'lerin değerlendirmesi henüz rutin olarak gerçekleştirilememektedir.

Öte yandan, Akış Sitometrik Çapraz Eşleştirme (FCXM), donöre özgü alloantikör tespiti veya taramaları için yaygın olarak kullanılan hassas bir yöntemdir (Bilgen vd., 2017; Graff vd., 2010; Guillaume 2018). Literatürde aktif hBH'nin süpernatantları kullanılarak FCXM tarafından değerlendirilen sınırlı sayıda vaka vardır (Karahan vd., 2019; Lucia vd., 2015). Bu nedenle, bu çalışmayı periferik hBH'lerin saptanması için FCXM testinin kullanılabilirliği hakkındaki bilgileri genişletmek üzere planladık. Bu çalışmada, periferik alloreaktif hBH'lerin *in vitro* poliklonal aktivasyonunun ardından, kültür süpernatantlarında biriken alloantikörler, donör veya potansiyel donörün lenfositleri kullanılarak geleneksel FCXM testiyle saptandı.

Çalışmamız alloreaktif hafıza B hücrelerinin düşük maliyet ve yaygın kullanılan yöntemlerle değerlendirilmesi amacıyla var olan teknikleri kullanarak yeni bir metod geliştirmeyi amaçlamaktadır. Böylelikle Hafıza B hücre rezervinin donör spesifik olarak ortaya konması, nakil merkezlerindeki immünolojik değerlendirmede kullanılabilir olabilecek ve güncel altyapı olanakları ile gerçekleştirilebilir bir parametrenin kazandırılması amaçlanmaktadır.

## 2. ORGAN NAKLİ (TRANSPLANTASYON)

Hasta bireylerin sağlıklı, kaliteli, nitelikli bir hayat sürdürebilmeleri için modern tıp sürekli gelişim göstermektedir. Organ nakilleri de gelişim gösteren alanların başında yer almaktadır.

İnsan vücudunda yer alan organlardan birinin ya da birkaçının herhangi bir nedenle fonksiyonunu yerine getirememesi halinde canlı, kadavra ya da beyin ölümü gerçekleşmiş bireylerden alınan sağlıklı, görevini tam bir şekilde üstlenebilen aynı organın nakledilmesine organ nakli (transplantasyon) denilmektedir. Nakli gerçekleşen yapı organ ya da doku olabilir. Kadavradan gerçekleştirilecek olan nakillerde donörün tıbbi ölümünün (beyin ölümü) gerçekleşmiş olması gerekmektedir. Kişinin hayatta iken kendi iradesi doğrultusunda tıbbi ölümü gerçekleştikten sonra doku ve organlarını hasta bireylerin tedavisinde kullanılmasına onay vermesi ve bunu resmi olarak belgelendirmesine organ bağıışı denmektedir. Günümüzde böbrek, karaciğer, akciğer, pankreas, ince bağırsak, kalp, kemik iliği, kan, kornea, deri gibi çeşitli organların nakli gerçekleştirilmektedir.

### 2.1 Organ Nakil Tarihçesi

İlk böbrek nakli 1902 yılında Emerich Ullmann tarafından bir köpeğe uygulanan ototransplant ve bir köpekten keçiye uygulanan ksenograft ile gerçekleştirilmiştir (Ullmann 1914). Jaboulay, 1906 yılında domuz ve keçi donörleri kullanarak insanda ilk böbrek nakil çalışmasını yapmıştır. Ernst Unger, maymun donörlerden almış olduğu böbrek organlarını insan alıcılarına nakletmiştir. Yapılan tüm bu nakiller başarısız olmuş ve hastaların tamamı kısa süre içerisinde hayatlarını kaybetmiştir (Unger, 1910). 1904'te Carrel ve fizyolog Charles Guthrie böbrek, tiroid, yumurtalık, kalp, akciğer ve ince bağırsak nakilleri yapmıştır (Malanin, 1979). 1933 yılında Sovyet cerrah Voronay ilk insandan insana böbrek naklini gerçekleştirmiştir. Böbreğin donörün ölümünden kısa bir süre sonrasına kadar temin edilememiş olması ve hasta donör arasındaki kan uyumsuzluğu nedenlerinden dolayı nakil başarılı olamamıştır (Voronay, 1937). İkinci Dünya Savaşı sırasında İngiliz zoolog Sir Peter Brian Medawar yaralı askerlerde deri yamaları üzerine çalışmıştır. Ardından ikiz hayvanlar arasındaki deri yamalarının reddedilmediğini bulmuştur. Bunun üzerine vücudun göstermiş olduğu reaksiyonun bağışıklık sistemi ile ilgili olduğunu ortaya koymuş ve 1960 yılında Nobel Tıp ödülünü almıştır. HLA (insan lökosit antijeni)'nin 1953 yılında tanımlanması ile beraber organ nakil immüno genetiği alanında büyük bir adım atılmıştır (Billingham vd., 1953).

23 Aralık 1954'te Joseph Murray, hastanın tek yumurta ikizini insan böbrek nakli donörü olarak kullanarak ilk başarılı organ naklini gerçekleştirmiştir. (Merrill vd., 1956; Murray vd., 1955) Hasta nakil sonrası 8 yıl yaşamıştır. Bu başarısı ile Dr. Murray Nobel Tıp ödülü almıştır. Murray ve arkadaşları 1962 de ilk kez kadavradan başarılı allograft böbrek nakli yapmıştır (Murray vd., 1976). Yapılan başarılı nakillerden sonra immüsupresyon üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. İlk olarak Murray tüm vücut ışınlama yapmış ancak ölüme sebebiyet verdiği için bu yöntemin kullanılması durdurulmuştur. Daha sonra immünosupresif olarak 6-merkaptopurin ve azatiopürin kullanılmış ve düşük dozlarının 1 yıllık sağkalım artışında etkili olduğu görülmüştür. 1980 yılında MHC (büyük doku uyumluluk kompleksi) antijenlerinin keşfi ile başarılı organ nakillerinin önü açılmıştır (Petrányi, 1981).

Ülkemizde ilk allograft böbrek nakli Dr. Mehmet Haberal ve ekibi tarafından 1975 yılında donör olarak hastanın annesinden alınan böbreğin 12 yaşındaki oğluna nakledilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Haberal, 1995). 1990 yılında aynı ekip ilk segmental karaciğer naklini yapmıştır. Gün yüzüne çıkartılan immüno genetik mekanizmalar doğrultusunda uygulanan yeni organ nakil metotları ülkemiz tarafından da kullanılarak nakil başarısında artışı sağlamak hedeflenmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Organ ve Doku Bilgi Sistemi (TODBS)'ne kayıtlı 2016 yılında 2637 canlı ve 784 kadaverik olmak üzere toplam 3421 böbrek nakli, 2017 yılında 2649 canlı, 693 kadaverik toplam 3342 böbrek nakli ve 2018 yılında ise 3009 canlı, 858 kadaverik toplam 3867 böbrek nakli yapılmıştır (<http://organ.saglik.gov.tr> (07.01.2019).)

### **3. ORGAN NAKİLLERİNE İMMÜNOLOJİK YAKLAŞIM**

#### **3.1 Böbrek Nakil Öncesi Gerçekleştirilen İmmünolojik Değerlendirmeler**

Başarılı bir organ nakli için hasta ve donör arasında immünolojik açıdan uyum olması gerekmektedir. Nakil öncesinde olası immünolojik farklılıkların saptanması için ABO kan grubunun belirlenmesi gerekirken doku uyumluluk antijenlerinin uyumu (HLA: insan lökosit antijeni) ve alıcı hastanın serumunda bulunan anti-HLA antikorlarının varlığı araştırılmalıdır. Günümüzde çeşitli doku tiplendirme laboratuvarlarında bu durumlar tespit edilebilmektedir.

ABO kan grubu antijen sistemindeki uyumsuzluk böbrek nakil başarısının önündeki en büyük engeldir. Anti ABO, A ve B antikorları bu antijenlerin en az birini eksprese etmeyen kan gruplarında doğal olarak yapılmaktadır. Nakil esnasında alıcı ve donör arasında bol miktarda bu antikorların bulunması hızlıca organ rejeksiyonunun meydana gelmesine neden olmaktadır. Diğer bir engel ise donörün serumunda halihazırda bulunan anti-donör HLA antikorlarıdır. Anti HLA antikorları; kan transfüzyonları, çoklu gebelik, birden fazla geçirilen organ nakilleri sonucu meydana gelmektedirler. Hastanın serumunda bulunacak yüksek orandaki anti HLA antikor miktarı hiperakut rejeksiyona neden olabilmektedir. Ayrıca donör dokusunda uyumsuz HLA antijen miktarı ne kadar az ise organ nakil başarısı da o kadar fazladır.

#### **3.2 Böbrek Naklinde ABO Kan Grubu Uyumu**

1901 yılında Karl Landsteiner ABO kan grubu antijenlerini bulmuştur. Bu antijenler A, B, AB ve O olmak üzere dört gruba ayrılmakta olup lenfosit, trombosit, eritrosit, epitelyal ve endotelyal hücre yüzeylerinde yer almaktadır. Kan grubu antikorları konakçı da bulunmayan antijenlere karşı oluşmaktadır. A kan grubu bireylerin serumlarında B antikor, B kan grubu bireylerin serumun A antikor, 0 kan grubunda hem A hem de B antikor mevcut iken AB kan grubuna ait bireylerin serumlarında ise A B antijenlerine karşı hiçbir antikor bulunmamaktadır (Landsteiner, 1901).

Böbrek nakillerinde ABO kan grubu uyumunun önemini Hume vd, 1955 yılında belirtmiştir. Gerçekleştirilen ABO uyumsuz nakillerde A veya B antikorlarının varlığı hemagglütinasyona sebebiyet verdiği için hiperakut rejeksiyonu geliştirir. Bu nedenle nakil gerçekleştirilmeden önce alıcı ve verici arasındaki ABO kan grubu antijenlerinin uyumuna bakılmaktadır. Kan nakillerinde kullanılan prensip böbrek nakilleri içinde kabul edilmektedir. O kan grubu evrensel verici iken AB kan grubu evrensel alıcıdır.

O kan grubu vericilerin böbrekleri A, B veya AB alıcılara nakledilebilir (Nelson vd, 1992). Diğer yandan Rh faktörü ve diğer eritrosit antijenleri ise endotelyumda eksprese olmadıkları için ABO uyumu kadar önemli değildir (Ishida H vd., 2003).

Günümüzde nakil bekleyen hasta sayısını canlı veya kadavra donörleri karşılayamamaktadır. Bu yüzden desensitizasyon yöntemleri kullanılarak donör ve hasta arasında ABO uyumsuz nakiller gerçekleştirilmektedir (Morath vd., 2012).

Yoğun bir şekilde uygulanan desensitizasyon yöntemlerinin transplantasyon sonrası endotel hücreleri tarafından anti kompleman moleküllerinin ekspresyonunda meydana gelebilecek artış greft reddinde önemli rol oynamaktadır. ABO uyumsuz böbrek transplantasyonunda birkaç çalışma mevcuttur, ancak transplant sonrası antikor geri tepmesine karşı bu korumanın, endotel hücreleri tarafından anti-kompleman moleküllerin ekspresyonunun aracılık edebileceğini öne sürmektedir. Uyumsuz nakiller sonucu ortaya çıkacak akut antikor aracılı rejeksiyon, yoğun immünsüpresif kullanımı ve maliyetler ABO uyumsuz böbrek naklinin yaygınlaşmasını kısmen sınırlandırmıştır.

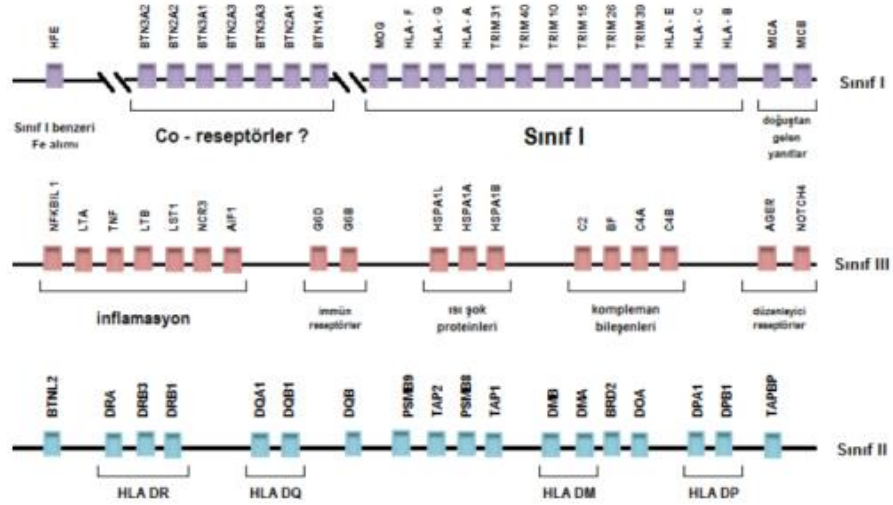
### **3.3 Böbrek Naklinde HLA Uyumu**

İmmün sistem hücrelerinin yabancı antijenleri tanıyabilmesi için antijen sunan hücelere (ASH) ihtiyacı vardır. 1930'lu yıllarda Gorer ve Snell'in keşfetmiş olduğu MHC gen bölgesi antijen sunumunda rol almaktadır (Mosaad, 2015; Shankarkumar, 2004).

1967 yılında insanda ilk kez insan lenfosit hücrelerinde keşfedilen MHC gen bölgesi, HLA (insan lenfosit antijen) olarak isimlendirilmektedir (Sayegh ve Carpenter, 2004). HLA geni, 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.31) yer almaktadır. Doku uygunluk antijenlerini içeren yaklaşık 4000 kilobaz (kb) büyüklüğünde, 7,6 milyon bç içeren bu gen kompleksi genomun %0,1'ini kapsamaktadır. Bu lokus yaklaşık 400 gen içeren oldukça polimorfik olan bir yapıya sahiptir. Bu özelliği ile kendine ait olmayana tanımada önemli bir rol oynar (Bodmer vd., 1999; Browning ve McMichael, 1996). HLA genleri Mendelian kalıtımla oğul döllere eş baskın olarak aktarılır. İlk kez Jan Klein bu gen bölgesini üç sınıf olarak (I, II, III) tanımlanmıştır (Choo, 2007; Hamosh vd., 2000; Shiina vd., 2004). HLA sisteminin isimlendirilmesi Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) denetiminde HLA nomenklatür komitesi tarafından düzenlenmektedir. Bu komiteye göre de HLA molekülleri kimyasal yapıları, hangi dokuda bulduklarına ve fonksiyonlarına göre HLA sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere 3 ana gruba ayrılır.



HLA sınıf I'de HLA -A, -B, -C, -E, -F, -G antijenleri ve -H, -X ise pseudo meleküller kodlanır. HLA-A, -B, -C klasik sınıf I moleküller olup, tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde eksprese olur ve antijen sunumu görevini üstlenmişlerdir. HLA-E,-F,-G klasik olmayan sınıf I molekülleridir ve her dokuda eksprese olmaz. HLA sınıf II'de HLA -DRB1, -DPB1, -DQB1, -DM, Transporter Associated with Antigen Processing 1 ve 2 (TAP1 ve 2) gibi antijenler kodlanmaktadır. HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1 klasik sınıf II molekülleridir ve antijen sunumunda görevlidir. DM, TAP1 ve TAP2 moleküller ise antijen işlenmesi ve sunumunda görevlidir. Sınıf II antijenleri B lenfositler, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi ASH'lerin yüzeyinde eksprese olur. HLA sınıf III'de ise Kompleman 2 (C2), C4A, C4B, lenfotoksin, 21-hidroksilaz enzimi, ısı şok proteinleri-70, TNF- $\alpha$  molekülleri gibi HLA dışında moleküllerin sentez edildiği bölgedir. HLA sınıf I ve sınıf II lokusları gibi Sınıf III lokusu da yüksek polimorfizm gösterir. HLA genlerinde fazla farklı allel olması ve bunların oldukça polimorfik yapıda olmaları HLA molekül çeşitliliğini arttırarak popülasyonda immünolojik açıdan farklı bireylerin oluşmasını sağlamıştır (DeWolf ve Sykes, 2107; Klein ve Sato, 2000; Roberts, 2009; Trowsdale, 2011). HLA 'nın yapısı Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



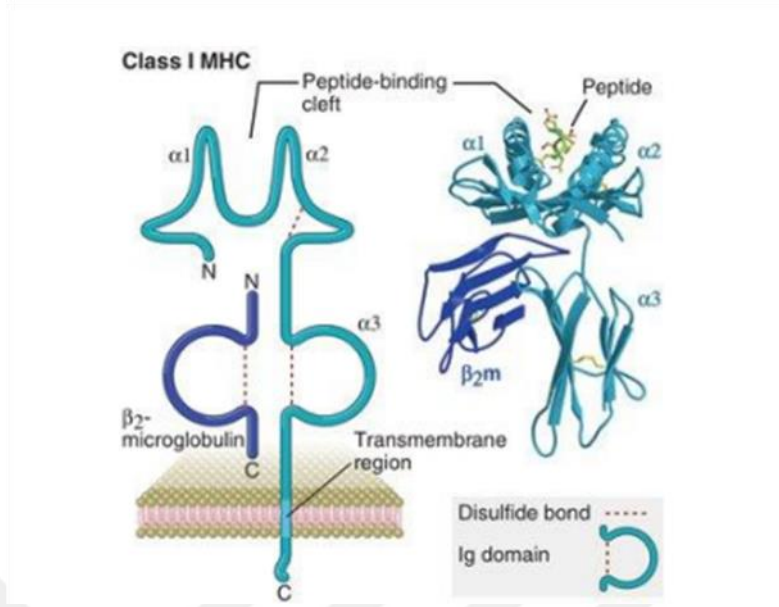
Şekil 3.1. HLA yapısı

Bireysel farklılık gösteren HLA tiplerinin alıcı ve donör arasındaki HLA uyumu doğrudan organ nakil başarısını belirlemektedir. Uyumsuz HLA ile gerçekleşen nakillerde alıcının CD4+ Th (T yardımcı hücre), CD8+ Tc (T sitotoksik) hücrelerinin aktivasyonunda hızlı bir artış meydana gelerek alloantikor üretimi gerçekleşir. Böylece hümmoral ve hüresel immün mekanizmalar kendinden olmayan organı tanır ve organ reddi gerçekleşir. Bu red olayı tersinir olarak donör dokusunun alıcıyı reddetmesiyle de gerçekleşebilir (Simpson E. 1998; Murata vd. 2004).

Ret mekanizması; hücre yüzeylerinde bulunan HLA moleküllerinin yabancı peptit parçalarını bağlaması ve bunları antijene spesifik olan T lenfositlerine sunması ile gerçekleşmektedir. HLA moleküllerine bağlanan peptitler hücre içi (endojen) ve hücre dışı (eksojen) kökenlidir. Eksojen kaynaklı peptitler MHC sınıf II, endojen kaynaklı peptitler MHC sınıf I molekülleriyle beraber T hücrelerine tanıtılarak T lenfositlerinin aktif hale geçmesi sağlanır. T hücreler kendi proteinlerini tanıyarak herhangi bir immün cevap oluşturmazken kendinden olmayan eksojen kaynaklı peptitlere karşı immün cevap verir (Afzali vd., 2008; Alelign vd., 2018; Everly vd., 2013; Herrera vd., 2004; Hickey vd., 2016; Warrens vd., 1994).

### 3.3.1 HLA sınıf I molekülleri (HLA A, B, C)

MHC gen bölgesinin içerisinde yer alan HLA sınıf I molekülleri (HLA-A-B-C) çekirdekli hücrelerin yüzeylerinde ifade olan glikoproteinlerdir. 44 kDa molekül ağırlığında ağır zincir- $\alpha$  ve 15. kromozomda kodlanan 12 kDa molekül ağırlığında  $\beta$ 2- mikroglobulin zincirinin birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlanmasıyla oluşur (Şekil 3.2.) (Morris vd., 1994; Van den Elsen, 2011). Polimorfik özellik gösteren  $\alpha$  zinciri 339 aminoasit içeren üç ekstraselüler globüler domaine ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 ve  $\alpha$ 3) sahiptir.  $\alpha$ 1 ve  $\alpha$ 2 domain zincirlerinin uç kısımları (N-ucu) kovalent olmayan bağlarla bağlıdır ve polimorfik bölgelerdir.  $\alpha$ 1 ve  $\alpha$ 2 kıvrımlarının arasında oluşan oluğa küçük peptitler (8-11 aminoasit büyüklüğünde) bağlanabilir.  $\beta$ 2 mikroglobulin de polimorfik yapıda olmayan  $\alpha$ 3 domainine kovalent olmayan bağlarla bağlanarak konformasyonel bütünlüğü sağlayan transmembran olmayan polipeptittir.  $\beta$ 2 mikroglobulin HLA antijenlerinin sadece ekspresyonu için gerekli olup HLA ile oluğa yerleşen peptit antijenin bağlantısını güçlendirir. HLA molekülüne antijenik özellik sağlamaz.  $\alpha$ 3 domaini ise HLA molekülünün CD8+ Tc lenfositlerine bağlanma bölgesidir. (Abbas vd., 2011; Madden, 1995; Mak ve Saunders, 2008).



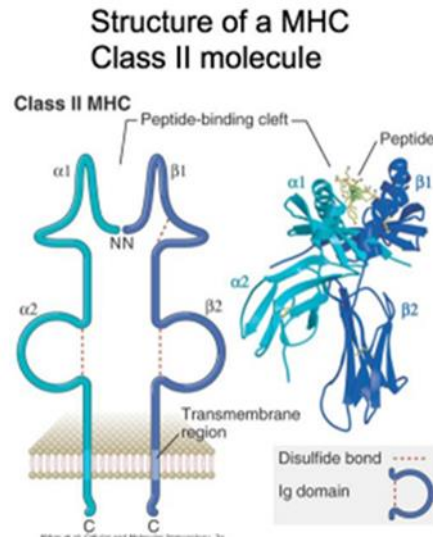
Şekil 3.2. HLA Sınıf I Yapısı

Sitoplazma içerisinde yer alan yabancı antijenler T hücrelerine HLA sınıf I molekülleri ile tanıtılmaktadır. Antijen içeren yabancı moleküller ASH'ler tarafından hücre içerisine fagositozla alınır ve işlenir. İşlenen antijenler bu ASH'ler üzerinde bulunan HLA sınıf I ve II molekülleri ile antijenle daha önce hiç karşılaşmamış T hücrelerine tanıtılır. Bu tanınma ile aktif hale gelen T hücrelerinden CD8+ Tc hücrelerinin sayısı çok hızlı bir artış gösterirken CD4+ Th hücre sayısındaki artış nispeten daha azdır. Daha sonra efektör CD8+ Tc hücreleri, antijenin bulunduğu bölgeye giderek sitoplazmalarında bulundurdukları perforin ve granzimin etkisiyle yüzeylerinde HLA sınıf I molekülleri bulunan antijen sunan hücreyi öldürür (Abbas vd., 2011; Madden, 1995; Mak ve Saunders 2008).

### 3.3.2 HLA sınıf II molekülleri (HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1)

HLA sınıf II molekülleri birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlı polimorfik bir  $\alpha$  (32-34 kDa) ve polimorfik bir  $\beta$  (29-32kDa) polipeptit zincirinden oluşurlar (Şekil 3.3.). İki zincirde polimorfik MHC gen bölgesinde kodlanır.  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  ve  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  olacak şekilde iki bölgede kıvrım yaparlar. Her iki zincir de N-uçlu ekstraselüler domain, bir immünoglobülin (Ig)-benzeri ekstraselüler domain, bir hidrofobik transmembran domaini ve bir kısa sitoplazmik kuyruk içermektedir.  $\alpha 1$  ve  $\beta 1$  domainlerinin N-uçları polimorfiktir ve antijen peptit bağlanma bölgesini oluşturur.  $\alpha 2$  ve  $\beta 2$  domainleri ise 24 globüler yapıda olup peptit bağlanmada rol oynamazlar. HLA sınıf I'den farklı olarak 10-30 aminoasit büyüklüğündeki peptitler bu oluğa

bağlanabilirler. HLA ile antijen peptidin bağlantısını güçlendirerek sabitleyen bölüm  $\alpha 2$  domainidir.  $\beta 2$  domaini ise HLA molekülü ile  $CD4^+$  Th lenfositlerin bağlanma bölgesini oluşturur. HLA sınıf II antijenleri B-lenfositler, ASH (makrofajlar, dentritik hücreler, kupffer hücreleri), uyarılmış T lenfositler ve endotelial hücreler üzerinde bulunurlar. HLA sınıf II moleküllerinin görevi ASH'lerin yüzeyinde eksprese olarak ekzojen peptitleri (mikroorganizmaları) fagositozla veya reseptör aracılı endositozla hücre içine alıp işledikten sonra bu antijenleri komşu lenf bezlerindeki daha önce bu antijenle karşılaşmamış olgunlaşmamış  $CD4^+$  Th hücrelerine sunmaktır. Aktive olmuş efektör  $CD4^+$  Th hücre klonu antijenin bulunduğu bölgeye gider. Eğer antijeni sunan hücre makrofaj ise  $CD4^+$  Th hücresi, antijeni fagositozunu arttırarak daha etkin bir hale getirir, B hücresini ise salgıladığı sitokinlerle antikor üretmesi yönünde uyarır (Abbas vd., 2011; Madden, 1995; Basturk vd., 2016; Mak ve Saunders, 2008). HLA sınıf II bölgesi içerisinde adozin trifosfat (ATP) bağlama kaskadı ailesinin üyesi olan TAP1 ve TAP2 kodlayan gen grubu vardır (Enderit ve Villadangos, 2007). TAP1 ve TAP2 proteinleri HLA sınıf I yolu ile antijen işlenmesinde görev alırlar. HLA sınıf I moleküllerine bağlanabilen peptitler TAP proteinleri tarafından sitoplazmadan endoplazmik retikuluma (ER) taşınır. MHC-  $\beta 2$  mikroglobulin dimeri ER'da TAP proteinlerine bağlanır ve peptitler ER içine alınır. Peptide bağlanarak kompleks oluşturmuş MHC sınıf I molekülleri ER'den çıkar ve hücre yüzeyine gider (Abbas, 2011; Madden, 1995). TAP proteinlerindeki azalma hücre yüzeyindeki HLA sınıf I moleküllerinin ekspresyonunda azalmaya bu da bu hücrenin  $CD8^+$  Tc'ye antijen sunma yeteneğini kaybetmesine sebep olur (Ortmann vd., 1994).



Şekil 3.3. HLA Sınıf II Yapısı

### 3.3.3 HLA sınıf III molekülleri

HLA sınıf III molekülleri, klasik kompleman yolunun C2, C4a ve C4b proteinleri; alternatif kompleman yolunda TNF gibi sitokinlerin sentezlenmesinde görevlidir. Fakat bu antijenlerin doğrudan nakil için olan önemi gösterilememiştir (Abbas vd., 2011; Basturk vd., 2016; Madden, 1995; Mak ve Saunders, 2008).

Alıcı ve donör arasındaki HLA uyumsuzluğu arttıkça alloimmün yanıtın artması da beklenmektedir. Böbrek nakillerinde HLA uyumuna HLA-A, HLA-B, HLA-DR lokuslarındaki benzerlik durumları incelenerek karar verilir. Başarılı bir böbrek nakli için transplantasyondan önce bu lokusların haritalandırılmasının doğru bir şekilde yapılması gerekmektedir. Günümüzde bu işlemler hem serolojik yöntemlerle hem de moleküler yöntemler (PCR temelli; dizilime özgü oligonükleotidlerin kullanıldığı tiplendirme (SSO), dizilime bağlı hazırlama (SSP) ve dizilim analizine dayanan tiplendirme (Sequence Based Typing (SBT)), real time PCR (RT-PCR) ve yeni nesil sekanslama (NGS)) kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

## 3.4 HLA Tiplendirme Yöntemleri

### 3.4.1 Moleküler yöntemler

HLA tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler; daha hızlı ve net sonuç vermesi, canlı hücre gerektirmemesi, duyarlılığının fazla olması açısından avantajlara sahiptir (Coleman vd., 2006; McPherson vd., 2007).

#### 3.4.1.1 Diziyeye özgü primer yöntemiyle HLA tiplendirmesi (SSP)

SSP yöntemi PCR temelli bir methoddur. Çoğaltılmak istenen bölgedeki HLA baz dizilimine uygun primerler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Primer ve çoğaltılmak istenen bölge arasındaki tek bir nükleotid farklılığı bile reaksiyonun sonlanmasına neden olduğu için HLA tiplendirmesinin doğru bir şekilde analiz edilmesinde bu yöntem oldukça verimlidir. Fakat bu testin dezavantajı her geçen gün yeni allel çiftlerinin bulunması ve yeni primerlerin dizayn edilme zorunluluğunu ortaya çıkmasıdır (Olerup ve Zetterquist, 1992).

#### 3.4.1.2 Diziyeye özgü oligonükleotit primer yöntemiyle HLA tiplendirmesi (SSO)

SSO yöntemi, daha nadir bilinen HLA alellerinin belirlenmesinde kullanılır. Bu yöntem de PCR temellidir. Bu yöntemde kullanılan primerler HLA alleleline tamamlayıcı yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda 5'-biotin işaretli bağlı kısa problemlerdir (McPherson vd., 2007).

HLA sınıf I için ekzon 2 ve ekzon 3'e, HLA sınıf II için ekzon 2'ye spesifik primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirir. Bu sayede HLA polimorfik bölgelerinin lokus spesifik amplifikasyonu gerçekleştirir. Daha sonra sekans 27 spesifik oligonükleotit problemlerinin amplifiye DNA üzerine bağlanmasıyla hibridizasyon reaksiyonu gerçekleştirir. Hibridizasyon reaksiyonunda PZR ürünleri bu renk kodlu mikroboncuklar ile bağlı oligonükleotit problemlere bağlanır ve streptavidin-fitoeritrin (SAPE) ile tespit edilir. Luminex metodu ile HLA genotiplenmesi yapılır. Luminex cihazı (Boncuk bazlı analiz) biotin işaretli PZR ürünü ile hibritlenen her kodlanmış oligo boncuk üzerindeki PE'nin floresan yoğunluğunu tanımlar (Sheldon ve Poulton, 2006). 5.5 µm çapında farklı polistiren renk kodlu mikro boncuk setleri oligonükleotit bağlanma problemlerini işaretlemek için kullanılır. Her bir boncuk seti, boncuklar içine gömülmüş kırmızı ve kızılötesi floresan boya oranıyla renklendirilmiş ve kodlanmıştır. Luminex 100 akış sitometresinde her bir florokromun konsantrasyonu ayarlanarak 100 farklı floresan işaretli mikroboncuk tanımlanabilir (Sheldon ve Poulton, 2006). SSO yöntemi sayıca artan alellere uyarlanabilen ve süre olarak SSP'den uzun olmasına rağmen tek seferde çok sayıda hastanın HLA doku tipini tespit edebilmesi yönünden avantajlı bir testtir. Ayrıca günümüzde kullanılan SSO problemleri sayesinde orta veya yüksek çözünürlüklü HLA doku tiplemesi güvenilir bir şekilde belirlenebilir (McPherson vd., 2007).

### **3.4.2 Serolojik yöntemler**

Kan transfüzyonları, çoklu gebelikler, organ nakilleri gibi durumlar bireylerde kendine ait olmayan HLA antijen maruziyetine sebep olmaktadır. Böylece HLA antijenlerine karşı bireyde anti-HLA antikorları oluşur. Bu durum böbrek nakillerinde immünolojik risk oluşturmaktadır (Lachmann vd., 2009; Loupy, 2009). Alıcı da nakilden önce ve nakilden sonra olası bulunan anti-HLA antikorlarının varlığı akut ve kronik rejeksiyona neden olur (Lee vd., 2002; Woodle vd., 2005). Nakil öncesinde alıcıda halihazırda bulunan antikorların varlığı panel reaktif antikor (PRA) tarama testiyle belirlenirken, donöre karşı alıcıda bulunan mevcut donör spesifik antikorlar cross-match (donöre spesifik antikor saptama testi) testleri ile nakil sonrası alıcı da donörüne karşı oluşabilecek olan antikorlar Luminex teknolojisi ile belirlenir (Cinti vd., 2009; Susal vd., 2009). Nakil öncesinde yapılan testlerde alıcıda donöre karşı antikor saptanmazsa organ nakli gerçekleştirilebileceği sonucuna varılır (Somasundaran ve Quiroga, 2011).

#### 3.4.2.1 Anti-HLA antikorları (Panel reaktif antikor) taraması

Organ alıcısı hasta bireylerde transplantasyon öncesi veya sonrası gelişen antikorların varlığı panel reaktif antikor test taraması ile saptanmaktadır. Yüksek panel reaktif antikor miktarının başarılı böbrek nakil şansını düşüren bir etmen olduğu bilinmektedir (Sheldon ve Poulton, 2006; Tinckam, 2009).

HLA antikorlarının varlığı solid faz temelli PRA taraması ile belirlenirken bu antikorların tanımlanması Luminex yöntemi kullanılarak gerçekleştirilir. (Tait vd., 2009). PRA taraması üç basamakta değerlendirilir; 1) PRA HLA sınıf I ve sınıf II testi 2) PRA tanımlama HLA sınıf I ve sınıf II testi 3) tek antijen (SA) HLA sınıf I ve sınıf II testi. Hasta serumunda bulunan IgG kökenli antikorların hangi HLA sınıfına ait olduğunu belirlemek için Luminex test taraması kullanılır. HLA sınıf I antijenleri için anti HLA A, anti HLA B, anti HLA C antikorlarının varlığı, HLA sınıf II için anti HLA DRB1, anti HLA DQB1, anti HLA DPB1 antikorlarının varlığı Luminex SA yöntemi ile araştırılır (Goldsby vd., 2003). Hasta antikorunda pozitif saptanan PRA'ların donöre spesifik olup olmadığı ise nakil öncesi alıcı ve verici arasında yapılan cross-match testleriyle belirlenir. (Bostock vd., 2013).

#### 3.4.2.2 Luminex yöntemi ile HLA taraması

Alıcı hastanın serumunda bulunan HLA sınıf I ve sınıf II antijenlerine bağlanan IgG antikorlarını saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Diğer testlere göre anti HLA antikor sınıflarının belirlenmesinde üstünlük sağlayan bu yöntem antijen kaplı boncukların kullanıldığı bir floroanalizör sistemden oluşur. Antijen kaplı, floresan özelliği bulunan florofor ile boyalı bu boncuklar hasta serumu ile inkübe edilir ve ardından Luminex cihazı kullanılarak elde edilen sinyal yoğunluğuna göre analiz işlemi gerçekleştirilir (Colombo vd., 2007; Guichard vd., 2016; Picascia vd., 2012).

#### 3.4.2.3 Alıcı ve donör arasında yapılan çapraz (Cross-Match) testler

Alıcı serumu ve donör lenfositleri arasında gerçekleştirilen, alıcı da bulunan antikorların donöre özgü olup olmadığını gösteren bir testtir. Başarılı bir böbrek nakli için transplantasyon öncesi yapılan bu testin negatif çıkması beklenir. Böylece nakil sonrası gerçekleşebilecek olan hiperakut red büyük oranda engellenir (Shrestha, 2014). Diğer taraftan donör spesifik antikorların varlığı akut ve kronik allogreft rejeksiyonda aşılması gereken bir problemdir.

#### 3.4.2.4 Kompleman bağımlı sitotoksiste çapraz karşılaştırma testi (CDCXM)

Terasaki yöntemi olan bu testte alıcı serumunun üzerine donörün lenfosit hücreleri eklenerek, komplemana bağlı antijen antikor etkileşimi belirlenir. Test ortamında donöre spesifik anti-HLA antikorları varsa bunlar donörün lenfosit hücreleri üzerindeki HLA antijenlerine bağlanarak antijen-antikor kompleksini meydana getirir (Patel ve Terasaki, 1969). Bu kompleks kompleman sistemini aktive eder ve hücre parçalanması gerçekleşir. Parçalanmış hücre miktarı testin pozitifliğini tayin eder (Montgomery vd., 2018). Sonuçların pozitif çıkması halinde test ortamına DTT (dithiothreitol) eklenir. Bu madde ortamda bulunan IgM moleküllerini yıkar ve sadece IgG kaynaklı antikorların ortamda bulunmasını sağlar. DTT eklenmesinin öncesi ve sonrası sonuçlarda antikor miktarı fazla ise donör spesifik antikorlar alıcıda fazla miktarda bulunuyor demektir. Bu yüzden böbrek nakli gerçekleştirilemez. PRA sonuçlarının negatif CDCXM sonuçlarının pozitif olması halinde hasta bireyde donöre özgü alloreaktif antikor titresinin düşük olduğu ve gerçekleştirilecek nakilde hiperakut rejeksiyon için büyük risk olduğu bilinmektedir. Bu nedenle transplantasyon öncesinde CDCXM testi tek başına yeterli olmayıp FCXM, Luminex testlerine de ihtiyaç duyulmaktadır.

#### 3.4.2.5 Flow sitometri (akım sitometrisi) ile çapraz test (FCXM)

Alıcı hasta bireyin serum örnekleri üzerine donörün lenfositleri eklenir ve donörün lenfosit hücreleri floresan boyalarla işaretlenerek anti-HLA antikor taraması gerçekleştirilir.

Akım sitometrisi, tekli ya da çoklu lazerlerin özel bir solüsyon içerisinde asılı halde duran tek hücreleri veya hücre parçacıklarını analiz eden bir testtir. Floresan ışık parametresine ve ışık saçılımına göre analiz edilen parçacıklar değerlendirilir. Görünür ışık saçılımı, hücrelerin boyutunu gösterirken (FSC, Forward scatter) yan saçılım (SSC, Side scatter) hücrelerin iç yapısını göstermektedir. Bu saçılımlar sonucu farklı dalga boylarında sinyaller elde edilir ve bu sinyaller histogramlar şeklinde analiz edilir. Bu histogramlar hücrelerin canlılığı ve immünofenotip yapısı hakkında bilgi verir (Delgado vd., 2008; Hwang vd., 2009). T hücre varlığını saptamak için CD3 floresan işareti, B hücre varlığı için CD19/CD20 floresan işareti test ortamına eklenir ve alıcı hasta bireyin bu hücrelere karşı yönelen antikorları, ikinci bir insan antikoruna (anti insan IgG antikor) karşı cevap floresan işaretli antikor ile işaretlenerek belirlenir (Abbas vd., 2011; Montgomery vd.,2018).



T hücreleri sadece HLA sınıf I antijenlerini eksprese ederken B hücreleri her iki sınıfı da eksprese etmektedir. B hücrelerinde HLA sınıf I antijenlerinin ekspresyon seviyesi T hücrelerindeki ekspresyon seviyelerinden daha fazladır. Bu nedenle T hücre akım sitometri testi negatif olan alıcı hastalarda donörün HLA sınıf I antijenlerine karşı donör spesifik antikor taşımadığı tespit edilir. B hücre akım sitometri testi pozitif ve T hücre testi negatif ise alıcı hasta serumunda HLA sınıf II antikorları olabilir veya düşük titrede HLA sınıf I antikorları bulunabilir (Shrestha, 2014).

#### *3.4.2.6 Sanal çapraz test*

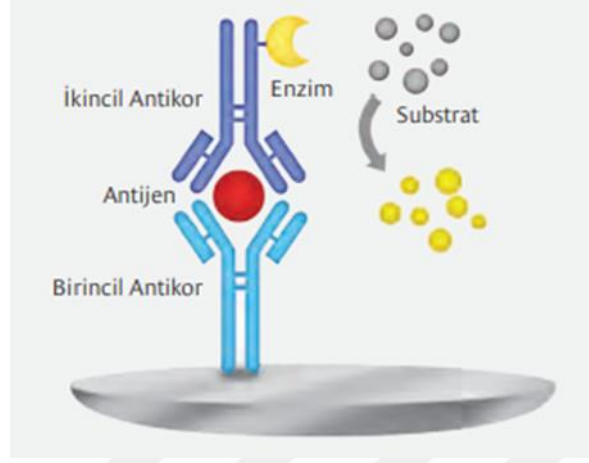
Sanal çaprazlama testi; alıcı hasta bireye ait farklı zamanlarda belirlenen geçmiş anti HLA antikor verileri kullanılarak hastanın doku tiplendirmesi bilinen kadaverik ya da canlı olmayan akraba donörlere karşı reaksiyon geliştirip geliştirmeyeceğinin tahmin edilmesinde kullanılan testtir. Düşük miktarda bulunan HLA gruplarına karşı alıcı bireyde bulunan düşük antikor miktarlarının saptanamaması durumlarında bu test tek başına yeterli olmayacaktır.

#### *3.4.2.7 Elisa testi*

Belirli antijen ve antikorların varlığını ve miktarını saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Belirlenmesi gereken alıcı hasta serumundaki antikorlar olduğunda antijen ile kaplı kuyucuklara hasta serumu eklenerek antijene karşı antikor varsa birbirine bağlanma sağlanır. İkincil antikor ve enzim substrat reaksiyonu ile oluşan kolorimetrik reaksiyonun gösterdiği absorban değeri sorgulanan antikorun varlığını ve miktarını gösterir.

Direkt elisa, dolaylı elisa, sandviç elisa ve yarışmacı elisa olmak üzere bu methodun 4 farklı çeşidi mevcuttur. 1977 yılında Kato ve arkadaşları tarafından geliştirilen sandviç elisa yönteminde kuyucuklar bir yakalama antikoru ile kaplanır. Konsantrasyonu belirlenecek olan örnekler antikorla kaplanmış bu kuyucuklarda belirli bir süre inkübasyona tabi tutulur ve ardından yıkanır. Böylece bağlanmamış antijenler test düzeneğinden uzaklaştırılırken kuyucukların kaplı olduğu antikora karşı antijenler uzaklaştırılmaz. Yıkama aşamasından sonra antijene özgü enzim ile etiketlenen antikorlar eklenir ve inkübe edilir. İnkübasyon ve yıkamanın ardından ortamda antijen varsa enzim etiketli antikorlar bunlara bağlandığı için uzaklaştırılmaz. Enzim aktivitesini ortaya çıkarmak için ortama enzim substratı eklenir ve renk değişimi sağlanır. Renk değişimi ne kadar fazla ise ortamda antijen miktarı o kadar fazladır.

Renk değişimine bağlı konsantrasyon miktarı kuyucukların belirli bir dalga boyunda mikroplate okuyucuda taranması sonucu elde edilir. Sandviç elisa yönteminin diğer tüm elisa yöntemlerinden 2-5 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.



Şekil 3.4. Sandviç elisa yöntemi

## 4. KULLANILAN CİHAZ, KİMYASAL, SOLÜSYON VE KİTLER

### 4.1 Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (class II), Nüve, Türkiye
- Buzdolabı, Profilo, Türkiye
- CO<sub>2</sub> etüv, Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)
- Su banyosu, Memmert, Türkiye
- Derin dondurucu -20°C, Vestel, Türkiye
- Distile su cihazı, Millipore, ABD-Kanada
- Isısal döngüleme cihazı, Applied biosystem, İngiltere
- İnvvert mikroskop, Olympus, Almanya
- Kırık buz makinesi, Fiocchetti, İtalya
- Mini mikrosantrifüj, Cleaver, Güney Kore
- Neubauer lamı, Marienfeld, Almanya
- Otoklav, Hirayama, Japonya
- Otomatik pipet seti, Axygen axypet, Kanada
- Vorteks, WiseMix, Kore
- Facs Calibur akım sitometri cihazı, BD
- Derin dondurucu -80°C Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)
- Santrifüj, Nüve, Türkiye
- Plate okuyucu, Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)

### 4.2 Kullanılan Kimyasallar

- Amfoterisin B, Multicell, Kanada
- Etanol, Sigma, ABD
- Fetal Sığır Serum (FBS), Multicell, Kanada
- L-glutamin, Multicell, Kanada
- Penisilin/Streptomisin, Sigma, ABD
- DMEM, Sigma, ABD
- Sodyum bikarbonat, Sigma, ABD
- Sodyum klorür, Sigma, ABD
- Potasyum klorür, Sigma, ABD

- Disodyum fosfat, Sigma, ABD
- Dipotasyum fosfat, Sigma, ABD
- Rekombinant insan IL-10, Biolegend, San Diego
- CpG-B DNA, HycultBiotech, Berlin
- Rekombinant insan CD40L, Biolegend, San Diego
- Rekombinant insan IL-2, Biolegend, San Diego
- ITS, Sigma, ABD
- Anti-IgG-FITC, Jackson Immunoresearch Laboratories

### 4.3 Kullanılan Solüsyonlar

#### 4.3.1 DMEM besiyeri ortamı (1 litre, pH:7,2)

- %1 g/L DMEM
- 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>
- %10 Fetal sığır serum
- %1 L-glutamin
- 100 µg/ml Penisilin – streptomisin
- 100 µg/ml Amfoterisin B

10 mg DMEM ve 3,7g NaHCO<sub>3</sub> tartılıp 800 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözüldü. 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak pH 7,2'ye ayarlandı. Ardından son hacim dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml 'ye tamamlandı.

887,5 ml DMEM besiyeri içerisine 100 ml FBS, 2,5 ml amfoterisin B, 10 ml penisilin-streptomisin, 10 ml L-glutamin ilave edilerek 0,22 µm filtreden süzüldü. Kullanıma hazır hale gelen besiyeri +4°C'de saklandı.

#### 4.3.2 Poliklonal uyarım kokteyli içeren besiyeri ortamı (100 ml)

100 ml DMEM besiyeri içerisine poliklonal uyarım kokteyli; (50 ng/ml rekombinant α-CD40 mAb, 2,5 µg/ml Toll-like receptor-9 ligand oligodeoxynucleotide (ODN)-2006 CpG, 600 IU/ml IL-2, 25 ng/ml IL-10, 100 ng/ml IL-21, ITS (5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, sodium selenite 5 ng/ml) takviye edildi. +4°C'de saklandı.

#### 4.3.3 1x Fosfat tuz tamponu (PBS) (1 litre, pH: 7,4)

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılıp, 800 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözüldü. pH 7,4'e ayarlanarak son hacim 1000 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Otoklav işlemi ile hazırlanan tampon çözelti steril hale getirildi ve +4°C'de saklandı.

#### 4.3.4 Hücre dondurma solüsyonu

50 ml'lik dondurma solüsyonu; %90 FBS (fetal sığır serum) ve %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı. -20°C sıcaklıkta muhafaza edildi.

#### 4.3.5 Enzim işaretli immünosorbent test (Elisa) solüsyonları

##### 4.3.5.1 10 mM Tris pH 9,0 kaplama solüsyonu (500 ml)

0,6055 g Trizma Base ( $C_4H_{11}NO_3$ ) 400 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldükten sonra 1M HCl kullanılarak pH 9,0'a ayarlandı ve son hacim dH<sub>2</sub>O ile 500 ml tamamladı. Solüsyon +4°C'de saklandı.

##### 4.3.5.2 %0,025 Tween/PBS solüsyonu (500 ml)

500 PBS solüsyonu içerisine 125 µl Tween20 eklendi ve +4°C'de saklandı.

##### 4.3.5.3 %0,05 Tween/PBS solüsyonu (10 litre)

10 litre PBS solüsyonu içerisine 5 ml Tween20 ilave edildi. +4°C'de saklandı.

##### 4.3.5.4 %4 Sığır serum albümin (BSA) solüsyonu (500 ml)

20 gram BSA 400 ml 1xPBS solüsyonu ile çözüldü ve 1xPBS solüsyonu ile son hacim 500 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon içerisine 125 µl Tween20 eklendi. Ardından 15 ml'lik falkon tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

##### 4.3.5.5 %2 BSA solüsyonu (500 ml)

450 ml 1xPBS solüsyonu içerisine 50 ml %20BSA/PBS/Azide solüsyonu ve 125 µl Tween20 eklendi ve +4°C'de saklandı.

##### 4.3.5.6 %1 BSA solüsyonu (500 ml)

475 ml 1xPBS solüsyonuna 25 ml %20BSA/PBS/%0,02 Azide solüsyonu ve 125 µl Tween20 eklendi. +4°C'de saklandı.

#### 4.3.5.7 %20 BSA/PBS/%0,02 azide solüsyonu (500 ml)

400 ml 1xPBS solüsyonu içerisinde 100 gram sığır serum albümin (BSA) çözüldü ve son hacim 500 ml olacak şekilde 1xPBS solüsyonu ile tamamlandı. Hazırlanan solüsyonun içerisine 1 ml natriumazide eklenerek +4°C’de saklandı.

#### 4.3.5.8 ABTS-substrat solüsyonu basamak 1

Son konsantrasyon 0,1 M olacak şekilde 9,605 g sitrik asit tartıldı. 500 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. +4°C’de saklandı.

0,1 M konsantrasyondaki Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O için 8,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tartıldı ve 500 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. +4°C’de saklandı.

Hazırlanan bu iki solüsyonun 7 volum sitrik asit + 10 volum Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> olacak şekilde birbirine karıştırılması sonucu ABTS-substrat solüsyon 1 elde edildi. +4°C’de saklandı.

#### 4.3.5.9 ABTS-substrat solüsyonu basamak 2

0,1 M konsantrasyonda pH: 4,2 olan 100 ml sitrat fosfat solüsyonu hazırlandı.

250 mg ABTS tartıldı ve hazırlanan 1 M 100 ml sitrat fosfat tamponu içerisinde çözüldü ve biyogüvenlik kabini içerisinde 0,2 µm filtre kullanılarak filtre edildi. Karanlık, +4°C sıcaklıkta saklandı.

Hazırlanan ABST solüsyonu içerisine %30’luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 µl/10 ml) ilave edilerek çalışmada bu şekilde kullanıldı. +4°C’de saklandı.

#### 4.3.5.10 250 mM okzalik asit solüsyonu (500 ml)

14,183 g okzalik asit (COOH)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 500 ml dH<sub>2</sub>O’da çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

### 4.4. Kullanılan Kitler

- Roche High Pure gDNA izolasyon kiti
- Olerup SSP HLA-A-B-DR SSP combi tray kit
- Lifecodes Lifescreen Deluxe kit (Immucor Transplant Diagnostics, Stamford, CT)
- LabScreen HLA class I and class II single antigen beads kit

## 5. OLGU SEÇİMİ

Çalışmamıza Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi hastanesine başvuran olgular arasından; organ nakli geçirmiş ve doku reddi gerçekleşmiş 25-45 yaşları arası gönüllü hastalar ve donörleri dâhil edildi. Öncelikle akım sitometri (FCXM) yöntemi kullanılarak 10 çift allosensitize hasta ve alıcılarına karşı allosensitize olmayan donörleri tespit edildi. Ardından bu kişiler çalışmamıza katılmak üzere davet edildi. Deney düzeneğinde olgular test grubunu, donörleri ise kontrol grubunu oluşturmakta olup seçilen olguların periferal kan örneklerinden mononükleer hücre eldesi gerçekleştirildi. Mononükleer hücreler içerisinde hafıza B hücrelerinin poliklonal uyarımını gerçekleştirmek üzere hücre kültürü kuruldu.



## 6. KULLANILAN YÖNTEMLER

### 6.1 Periferal Kan Mononükleer Hücre (PBMNC) Eldesi

Hasta ve donör olgularından 10'ar ml taze periferal kan örneği alındı ve bu kan örneklerinin 5 ml'si periferal kan mononükleer hücre eldesinde, 3 ml'si kan serumu eldesinde ve 2 ml'si genomik DNA (gDNA) izolasyonunda kullanıldı.

- 1- Olgulardan heparinize tüpe alınan periferal kan örnekleri bire bir (1:1) oranında soğuk PBS solüsyonu ile sulandırıldı.
- 2- 15 ml'lik eppendorf tüp içerisine 3 ml Ficoll-Hypaque solüsyonu eklendi.
- 3- Ficoll solüsyonu üzerine 10 ml sulandırılmış periferal kan örneği cam pastör pipeti yardımı ile sızdırılarak ilave edildi.
- 4- Eppendorf tüp 1800 rpm hızda 30 dakika santrifuj edildi.
- 5- Santrifüj sonrası eppendorf tüpün orta hattında oluşan lökosit alanı (buffy coat) yeni bir 15 ml'lik eppendorf tüp içerisine cam pastör pipeti kullanılarak toplandı.
- 6- Eppendorf tüp üzerine 5 ml soğuk PBS solüsyonu ilave edilerek eppendorf tüp 1700 rpm hızda 5 dakika santrifuj edildi.
- 7- Santrifüj sonrası süpernatant kısım uzaklaştırıldı.
- 8- Pellet kısmında kalan hücre süspansiyonu Neubauer lamında her küçük kare alanında 20-25 lökosit olacak şekilde DMEM besiyeri ile sulandırıldı. Böylece lenfosit hücre süspansiyonu elde edildi.
- 9- Kan serumu eldesi için kullanılacak olan 5 ml periferal kan örneği 2500 rpm hızda 7 dakika santrifüj edildi.
- 10- Santrifüj sonrası süpernatantta biriken kan serumu yeni 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı.



## 6.2. Olgu Seçiminde Akım Sitometrik Çapraz Uyum Testi (FCXM)

- 1- Her bir hasta ve donör olgusu için 1 pozitif kontrol serumu, 1 negatif kontrol serumu, 1 olgu serumu ve 1 olgu serumunun ¼ sulandırılmış örneği olmak üzere toplam 8 adet 1,5 ml'lik eppendorf tüp hazırlandı. Her hasta için kendi donörünün lenfosit hücreleri, her donör için de alıcısının lenfosit hücreleri kullanılarak akım sitometrik çapraz uyum testi (FCXM)-serum deney düzeneği kuruldu.
- 2- 8 adet yeni 1,5 ml'lik eppendorf tüpün içerisine belirtilen serum örneklerinden 10µL eklendi.
- 3- Elde edilen lenfosit hücre süspansiyonundan ilgili eppendorf tüplerin üzerine 100 µL ilave edildi ve eppendorf tüpler düşük devirde 1-2 saniye vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 4- İnkübasyonu takiben eppendorf tüplere oda sıcaklığındaki PBS solüsyonundan 400 µl ilave edilerek eppendorf tüpler 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 5- Santrifüj sonunda eppendorf tüplerin süpernatant kısımları uzaklaştırıldı.
- 6- 4. basamakta bulunan yıkama işlemi tekrarlandı.
- 7- Her bir örnek için; 155 µl %10 FBS içeren hücre yıkama solüsyonuna 3,8 µl FITC konjuge Fab fragment anti human IgG eklendi.
- 8- Eppendorf tüpler düşük devirde vortekslelendikten sonra +4°C, karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildi.
- 9- İnkübasyonu takiben eppendorf tüplerin üzerine 400 µl %10 FBS içeren hücre yıkama solüsyonundan eklendi.
- 10- Eppendorf tüpler 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 11- 9. ve 10 basamaklar iki kez tekrar edildi.
- 12- Pellet kısmı 300 µl %10 FBS içeren yıkama solüsyonu ile çözülerek sitometrik akım okuma cihazına özel olan tüpler içerisine aktarıldı.
- 13- Prime işlemi yapılarak hazırlanan ve kalibrasyon kontrolü yapılmış olan BD marka Facs Calibur model akım sitometri cihazında tüpler okundu.
- 14- Her analizde 10.000 hücre kapıldıktan sonra elde edilen median floresan değerleri negatif kontrol tüpün median değeri ile oranlanarak değerlendirildi.

Değerlendirme sonucuna göre; hastaların, donörlerinin HLA gruplarına karşı anti-HLA antikorlara sahip olanları, donörlerin ise alıcılarının HLA gruplarına karşı anti-HLA antikorlara sahip olmayanları belirlendi.

### 6.3. Genomik DNA izolasyonu

Roche High Pure izolasyon kiti kullanılarak olguların 2 ml taze periferel kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

- 1- Her bir olgu için izolasyona  $10^4$  hücre sayısı ile başlandı.
- 2- Eppendorf tüplerde bulunan hücrelerin üzerine 200µl oda sıcaklığında PBS solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı.
- 3- 200 µl bağlanma (binding buffer) solüsyonu ve 40 µl proteinaz K ilave edildi ve eppendorf tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- 4- Eppendorf tüpler  $70^{\circ}\text{C}$  'de 10 dakika inkübe edildi.
- 5- Ardından 100µl  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de olan izopropanol eklendi.
- 6- Eppendorf tüp içerikleri kitin filtreli tüpüne aktarıldı.
- 7- Filtreli tüpler 8000 g hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 8- Filtreli tüp yeni bir koleksiyon tüpüne alındı.
- 9- Filtreli tüp üzerine 500 µl inhibitör remove solüsyonu eklendi.
- 10- Filtreli tüp 8000 g hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 11- Filtreli tüp yeni bir koleksiyon tüpüne alındı.
- 12- Filtreli tüp üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi.
- 13- Filtreli tüp 8000 g hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 14- 12. ve 13. basamaklar tekrar edildi.
- 15- Filtreli tüp yeni bir koleksiyon tüpüne alındı.
- 16- 1300 g hızda 10 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
- 17- Ardından filtreli tüp 1,5 ml'lik yeni eppendorf tüp içerisine alındı.
- 18- Filtreli tüp üzerine  $70^{\circ}\text{C}$  sıcaklıktaki elution solüsyonundan 200 µl eklendi.
- 19- 8000 g hızda 1 dakika santrifüj edilen eppendorf tüpte genomik DNA süzüntü halinde elde edildi.

#### 6.4 SSP Yöntemi ile HLA A, B, DR Genotiplendirmesi

Olerup SSP HLA-A-B-DR SSP combi tray kitinde olgulara ait gDNA örnekleri çalışıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) örneklerinin tüm içeriği (çizelge 6.1.) %2 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jele yüklendi ve jele 25 dakika boyunca 40 voltluk akım uygulandı. Agaroz jel görüntülerindeki bant profilleri start skor yazılımı ile değerlendirilerek HLA tiplendirmesi gerçekleştirildi. Tiplendirme sonuçlarına göre hasta ve donör arasındaki mismatch durumu belirlendi.

Çizelge 6.1. Olerup SSP HLA-A-B-DR SSP combi tray kiti polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri

<b>1 olgu için reaksiyon karışımı ;</b>	<b>Miktar</b>
gDNA	86,9 µl
dH <sub>2</sub> O	636 µl
Taq Polimeraz	8,3 µl

Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) karışımı 10µl olacak şekilde kitin 96 kuyucuklu tiplendirme deney kabına dağıtıldı. 96 kuyucuklu deney kabının üzeri sıcaklığa dayanıklı örtü ile kapatılarak çizelge 6.1. belirtilen şartlarda PCR reaksiyonuna tabi tutuldu.

Çizelge 6.2. Olerup SSP HLA-A-B-DR SSP combi tray kiti polimeraz zincir reaksiyonu ısı döngü derecesi ve süreleri

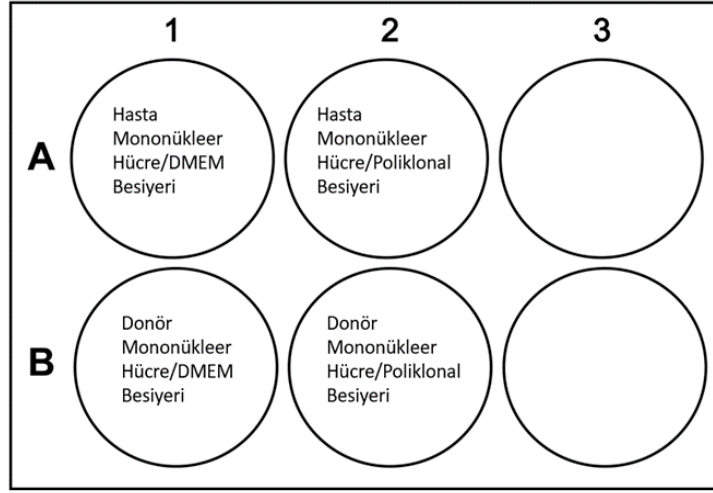
Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
94 °C	2 dakika	
94 °C	10 saniye	10
65 °C	60 saniye	10
94 °C	10 saniye	20
61 °C	50 saniye	20
72 °C	30 saniye	20

Allosensitizasyon durumları ve HLA tiplendirme testleri onaylanan vakalar taze kan alınması için tekrar davet edildi. Her bir olgudan 20 ml periferik kan alındı.

### 6.5 Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PBMNCs) *in vitro* Kültüre Edilmesi, Uyarımı ve Antikor Sentezleyen Hücre Eldesi, Hafıza B Hücre Rezervinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil olan gönüllü olgulardan alınan taze periferik kan örneklerinden standart Ficoll-Hypaque yoğunluk gradyanlı santrifüjleme tekniği kullanılarak PBMNC'ler izole edildi. Neubauer lamında sayılan PBMNC'ler,  $5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kaplarında 1 ml besiyeri ortamında *in vitro* kültür koşullarına alınarak çoğaltıldı. Geri kalan PBMNC'ler çalışmanın ilerleyen basamaklarında kültür süpernatantlarında biriken donör spesifik antikorların saptanmasında kullanılmak (200.000 hücre/olgu) üzere %90 FBS, %10 DMSO içeren dondurma solüsyonuna aktarıldı ve -80 °C'de muhafaza edildi.

PBMNC'ler hem sadece DMEM besiyeri (%10 fetal sıgır serumu, 2 mM L-glutamin, 100U/ml penisillin-streptomisin, 2mg amfoterisin) ortamında hem de literatürde tanımlanmış olan HLA spesifik hafıza B hücre havuzunun indüklenmesinde rol alan poliklonal uyarım kokteyli içeren (50 ng/ml rekombinant  $\alpha$ -CD40 mAb, 2.5  $\mu$ g/ml Toll-like receptor-9 ligand oligodeoxynucleotide (ODN)-2006 CpG, 600 IU/ml IL-2, 25 ng/ml IL-10 ve 100 ng/ml IL-21), ITS (5  $\mu$ g/ml insulin, 5  $\mu$ g/ml transferrin, sodium selenite 5 ng/ml) DMEM besiyeri ortamında 12 gün boyunca *in vitro* koşullar altında (37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub>) kültüre edildi (Karahan vd. 2019) (Şekil 6.1.).



Şekil 6.1. Deney tasarımı

Kültürün 6. gününde kültür süpernatantlarından 0,5 mL toplanarak kültür ortamına poliklonal stimülasyon kokteyli içeren taze hazırlanmış 0,5 mL DMEM veya sadece DMEM besi ortamları eklendi ve 6 gün daha kültürlerin devam etmesi sağlandı. 6. günün sonunda toplanmış olan 0,5 mL kültür süpernatantları daha sonraki analizler (FCXM) için - 20°C'de saklandı.

İkinci 6 gün yani kültürün 12. günü sonunda hücreler ve süpernatantlar toplandı. Süpernatantlar; Elisa, FCXM-süpernatant ve allojenik Ab saptaması için Luminex taramasında kullanıldı. FCXM-süpernatant ve Luminex tarama testlerinde nispeten daha yüksek miktarlarda allojenik Abs içeren iki numune, Luminex-SAB ile analiz edildi. Kültür sonunda toplanan hücreler ise hafıza B hücre uyarımını değerlendirmek üzere hücre yüzey antikorları ile işaretlendi ve akış sitometri kullanılarak hücre tipleri analiz edildi.

Aşağıdaki tabloda belirtilen 1. grup poliklonal uyarımla yapılan güncel uygulamayı yansıtmaktadır. Bu deney grubu poliklonal uyarım neticesinde kültür süpernatantında biriken antikorların FCXM yöntemiyle donör spesifik olarak tespit edilebilir olup olmadığını göstermemizi sağladı. 2. grupta ise poliklonal uyarım kokteyli içermeyen besiyerinde hücreler kültüre edildi ve böylece 1. ve 2. grup arasındaki antikor miktarındaki değişime poliklonal uyarımın etkisi saptandı. Allojenik sensitizasyonu olmadığı bilinen donörlerden oluşan kontrol grubunda da çizelge 6.3.'te belirtilen deney düzeneği uygulandı ve tüm deney grupları iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı.

Çizelge 6.3. Deney grupları

	Hasta Lenfosit Kültürü	Donör Lenfosit Kültürü
Grup1/ Poliklonal Uyarım	+	+
Grup 2/ Poliklonal Uyarımsız	+	+

## 6.6 Kültür Süpernatantı 6. Gün Akım Sitometrik Çapraz Uyum Testi (FCXM)

- 1- Çalışmanın 6. gününde kültür süpernatantları 1,5 ml'lik eppendorf tüplerin içerisine aktarıldı.
- 2- Eppendorf tüpler 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 3- Santrifüj sonrası tüplerin süpernatant kısımlarından 500 µL alınarak yeni 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı.
- 4- Eppendorf tüplerde geri kalan 500 µL besiyeri pipetaj yapılarak pellet kısma çöken hücreler süspande hale getirildi ve kültür kaplarındaki ilgili kuyucuklara geri eklendi.
- 5- Olguların dondurulan lenfosit hücreleri (200.000 hücre/olgu) üzerine 6. gün kültür süpernatantları, pozitif ve negatif kontrol serumları eklenerek akım sitometrik çapraz uyum testi (FCXM) gerçekleştirildi.
- 6- Olguların dondurulan hücreleri 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı ve 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 7- Eppendorf tüplerin süpernatant kısımları uzaklaştırılarak pellet kısım süspande edildi.
- 8- Hasta olguların hücreleri üzerine donör olgular için kurulan kültür süpernatantlarından 500 µl, donör olguların hücreleri üzerine de hasta olgular için kurulan kültür süpernatantlarından 500 µl eklenerek FCXM deneyi gerçekleştirildi. Ayrıca her bir olgu hücresi için ayrı ayrı hem pozitif hem negatif serum örneklerinden 100 µl eklenerek FCXM deney düzeneği kuruldu.
- 9- Hücrelerin üzerine uygun süpernatant ve serumlar eklendikten sonra eppendorf tüpler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 10- İnkübasyonu takiben eppendorf tüplere oda sıcaklığındaki PBS solüsyonundan 400 µl ilave edilerek eppendorf tüpler 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 11- Santrifüj sonunda eppendorf tüplerin süpernatant kısımları uzaklaştırıldı.
- 12- 10. ve 11. basamakta bulunan yıkama işlemi tekrarlandı.
- 13- Her bir örnek için; 155 µl %10 FBS içeren hücre yıkama solüsyonuna 3,8 µl FITC konjuge Fab fragment anti human IgG eklendi.

- 14- Eppendorf tüpler düşük devirde vortekslendikten sonra +4°C', karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildi.
- 15- İnkübasyonu takiben eppendorf tüplerin üzerine 400 µl %10 FBS içeren hücre yıkama solüsyonundan eklendi.
- 16- Eppendorf tüpler 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 17- 15. ve 16. basamaklar iki kez tekrar edildi.
- 18- Pellet kısmı 300 µl %10 FBS içeren yıkama solüsyonu ile çözülerek akım sitometri okuma cihazına özel olan tüpler içerisine aktarıldı.
- 19- 'Prime' işlemi yapılarak hazırlanan ve kalibrasyon kontrolü yapılmış olan BD marka Facs Calibur model akım sitometri cihazında tüpler okundu.
- 20- Her analizde 10.000 hücre kaplandıktan sonra elde edilen median floresan değerleri negatif ve pozitif kontrol tüplerinin median değeri ile oranlanarak değerlendirildi.

#### **6.7 Kültür Süpernatantı 12. Gün Akım Sitometrik Çapraz Uyum Testi (FCXM)**

- 1- Kültürün 12. gününde tüm kuyucukların içeriği 2 ml'lik eppendorf tüplerin içerisine aktarıldı.
- 2- Eppendorf tüpler 1700 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi.
- 3- Süpernatant kısım yeni tüplere aktarıldı ve 12. gün FCXM deneyi gerçekleştirildi. 12. gün FCXM deneyi sonrası kalan süpernatant örnekleri Luminex ve Elisa çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Pellet kısımda kalan lenfosit hücrelerinin hücre yüzey markerları ile boyama işlemi gerçekleştirildi.
- 4- Olguların dondurulan lenfosit hücreleri (200.000 hücre/olgu), 12.gün kültür süpernatantları, pozitif ve negatif kontrol serumları kullanılarak akım sitometrik çapraz uyum testi gerçekleştirildi.
- 5- Olguların dondurulan hücreleri 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı ve 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 6- Eppendorf tüplerin süpernatant kısımları uzaklaştırılarak pellet kısım süspande edildi.
- 7- Hastaların lenfosit hücreleri üzerine donör olgular için kurulan kültür süpernatantlarından 500 µl, donör olguların lenfosit hücreleri üzerine de hasta olgular için kurulan kültür süpernatantlarından 500 µl eklenerek FCXM deneyi gerçekleştirildi. Ayrıca her bir olgu hücresi için ayrı ayrı hem pozitif hem negatif serum örneklerinden 100 µl eklenerek FCXM deney düzeneği kuruldu.

- 8- Lenfosit hücrelerin üzerine uygun süpernatant ve serumlar eklendikten sonra eppendorf tüpler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 9- İnkübasyonu takiben eppendorf tüplere oda sıcaklığındaki PBS solüsyonundan 400 µl ilave edilerek eppendorf tüpler 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 10- Santrifüj sonunda eppendorf tüplerin süpernatant kısımları uzaklaştırıldı.
- 11- 9. ve 10. basamakta bulunan yıkama işlemi tekrarlandı.
- 12- Her bir örnek için; 155 µl %10 FBS içeren hücre yıkama solüsyonuna 3,8 µl FITC konjuge Fab fragment anti human IgG eklendi.
- 13- Eppendorf tüpler düşük devirde vortekslendikten sonra +4°C, karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildi.
- 14- İnkübasyonu takiben eppendorf tüplerin üzerine 400 µl %10 FBS içeren hücre yıkama solüsyonundan eklendi.
- 15- Eppendorf tüpler 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 16- 14. ve 15. basamaklar iki kez tekrar edildi.
- 17- Pellet kısmı 300 µl %10 FBS içeren yıkama solüsyonu ile çözülerek akım sitometri okuma cihazına özel olan tüpler içerisine aktarıldı.
- 18- Prime işlemi yapılarak hazırlanan ve kalibrasyon kontrolü yapılmış olan BD marka Facs Calibur model akım sitometri cihazında tüpler okundu.
- 19- Her analizde 10.000 hücre kapıldıktan sonra elde edilen median floresan değerleri negatif ve pozitif kontrol tüplerinin median değeri ile oranlanarak değerlendirildi.



## 6.8 Hafıza B ve Plazma Hücrelerinin Hücre Yüzey Markerları ile Saptanması

- 1- Kültürün 12. günün de toplanan hücrelerin üzerine 1 ml oda sıcaklığındaki PBS solüsyonundan eklenerek 1700 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- 2- Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.
- 3- Pellet üzerine 200 µL oda sıcaklığındaki PBS solüsyonu ilave edildi ve hücre süspansiyonu Neubauer lamı kullanılarak sayıldı.
- 4- Her bir olgu için hem hafıza B hücre hem plazma hücre sayıları hesaplandı.
- 5- Hafıza B hücresi için Anti-CD19-PE/ Anti-CD27-APC/ Anti-CD38-PerCP/ Anti-CD138-FITC boyaları, plazma hücresi için Anti-CD20-PE/ Anti-CD27-APC/ Anti-CD38-PerCP/ Anti-CD138-FITC boyaları kullanıldı.
- 6- Boyamada kullanılacak olan boya miktarı hücre sayısına bağlı olarak hazırlandı.
  - CD 38 (perCp); 5 µl CD38 (boya) /1 milyon hücre/ 100 µl (final hacim)
  - CD 27 (APC); 5 µl CD27 (boya) /1 milyon hücre/ 100 µl (final hacim)
  - CD 138 (FITC); 5 µl CD138 (boya) /1 milyon hücre/ 100 µl (final hacim)
  - CD 19 (PE); 20 µl CD19 (boya) /1 milyon hücre/ 100 µl (final hacim)
  - CD 20 (PE); 5 µl CD20 (boya) /1 milyon hücre/ 100 µl (final hacim)
- 7- Her bir olgu için 2 farklı eppendorf tüp hazırlandı ve bu eppendorf tüplerinin birincisine hafıza B hücre yüzey marker boyaları diğer eppendorf tüpe plazma hücre yüzey marker boyaları eklendi ve üzerlerine 100 µl hücre süspansiyonu ilave edilerek eppendorf tüpler düşük devirde 1-2 saniye vortekslendikten sonra oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- 8- Eppendorf tüplere 400 µl oda sıcaklığındaki PBS solüsyonu ilave edildi ve tüpler 8000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 9- Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.
- 10- 8. ve 9. basamaklar bir kez daha tekrar edildi.
- 11- Hücre pelleti 300µl facs akım solüsyonu ile çözüldü ve eppendorf tüplerin içeriği akım sitometri okuma cihazına özel olan tüpler içerisine aktarıldı.
- 12- Prime işlemi yapılarak hazırlanan ve kalibrasyon kontrolü yapılmış olan BD marka Facs Calibur model akım sitometri cihazında tüpler okundu.
- 13- Hafıza B hücre ve plazma hücre sayıları toplam okunan hücre sayısına oranlanarak belirlendi.

## 6.9 Elisa

- 1- 10 mM tris içerisinde çözünmüş olan 1,8 ug/ml GaHuIgG, yüksek bağlanma özelliğine sahip 96 kuyucuklu elisa kaplarının içerisine 100 µl olacak şekilde eklendi.
- 2- Ardından elisa kabının üzeri örtücü ile kapatılarak +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- 3- Kuyucuklar 200 µl, %0,05 tween 20/PBS solüsyonu ile iki kez yıkandı.
- 4- Kuyucukların bloklanması için %2BSA/Tween/PBS (azide ilaveli) solüsyondan 300µl eklenerek kuyucukların üzeri kapatıldı.
- 5- Elisa kabı 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- 6- Standart eğriyi oluşturmak için kullanılan referans serumun seri dilüsyonu ve süpernatant örneklerinin dilüsyonları 100 µl, %1BSA/Tween20/PBS (azide ilaveli) solüsyonu ile gerçekleştirildi.
- 7- Elisa kabının üzeri kapatıldı ve 37°C'de 1 saat inbübe edildi.
- 8- İnkübasyon sonunda elisa kabının kuyucukları 200 µl, %0,05 tween 20/PBS solüsyonu ile iki kez yıkandı.
- 9- Dilüsyonu yapılan örnek ve serumlar kuyucuklara eklendi. Negatif kontrol olarak 100µl %1BSA/Tween20/PBS (azide ilaveli) kullanıldı.
- 10- Elisa kabının üzeri kapatıldı ve 37°C'de 1 saat inbübe edildi.
- 11- Kuyucuklar 200 µl, %0,05 tween 20/PBS solüsyonu ile iki kez yıkandı.
- 12- Kuyucukların içerisine 100 µl, 0.11 µg/ml konsantrasyona sahip biotinli GaHuIgG eklendi ve 1 saat 37C'de inkübe edildi.
- 13- Kuyucuklar 200 µl, %0,05 tween 20/PBS solüsyonu ile iki kez yıkandı.
- 14- Kuyucuklara 100 µl,  $9,6 \cdot 10^{-2}$  u/ml konsantrasyona sahip %1BSA/Tween20/PBS (azide içermeyen) solüsyon içerisinde hazırlanan strepteavidin-HRP solüsyonundan eklendi.
- 15- Elisa kabının üzeri kapatıldı ve 37°C'de 1 saat inbübe edildi.
- 16- Kuyucuklar 200 µl, %0,05 tween 20/PBS solüsyonu ile iki kez yıkandı.
- 17- Kuyucukların içerisine 100 µl ABST solüsyonu (%1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren) eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyon sağlandı.
- 18- Kuyucukların üzerine reaksiyonu durdurmak amaçlı 25 µl 250 mM oksalik asit eklendi.
- 19- 450 nm dalga boyunda elisa kabının kuyucuklarının absorbans değerleri belirlendi.

## 6.10 Luminex Çalışması

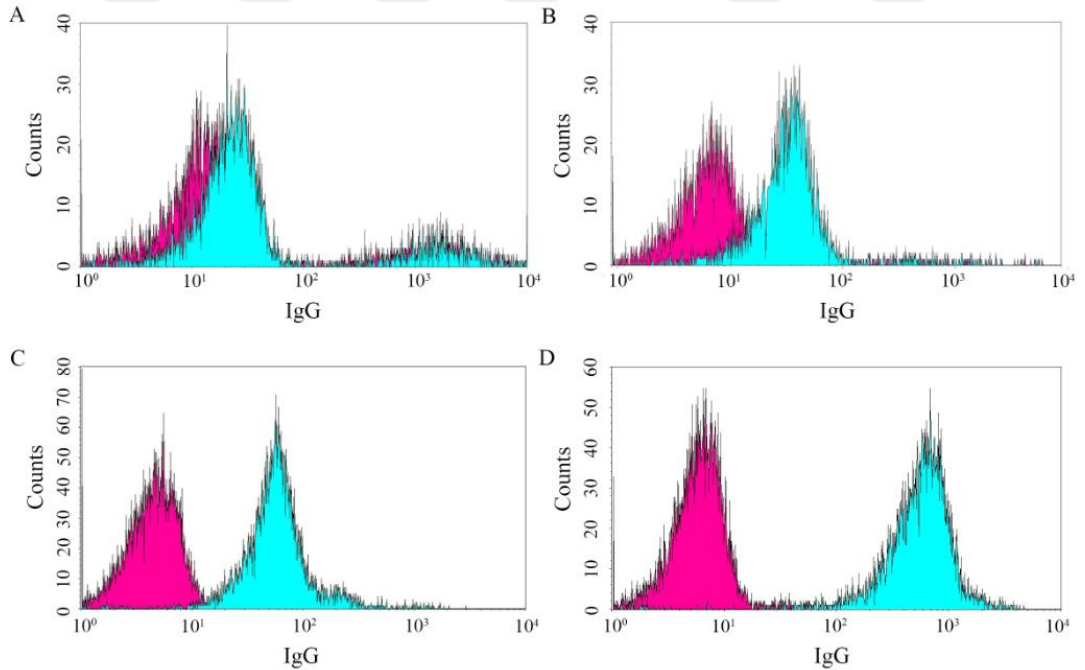
Luminex çalışması Antalya Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



## 7. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 7.1 Allosensitize Olgu Seçiminde FCXM Sonuçları

FCXM-serum testleri, standart prosedürlere göre toplam lenfosit çapraz karşılaştırma analizi olarak yapıldı ve FACS Calibur (Becton Dickinson, ABD) ile analiz edildi. PBMNC, standart Ficoll Hypaque yoğunluk gradyanlı santrifüjleme tekniği kullanılarak heparinize periferik kan örneklerinden izole edildi. Lenfosit alloantikor bağlanması, FCXM-serum testlerinde anti-IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, ABD) ile belirlendi. Önceki çalışmalardan doğrulanmış negatif ve pozitif kontrol serum örnekleri de dahil edildi. Hücreler, 400 uL FACS akış çözeltisi ile yeniden süspansiyon edildi ve bir akış sitometrisinde (FACS Calibur, BD Biosciences, CA, ABD) analiz için akış tüplerine aktarıldı. Ab bağlanma skoru, histogram üzerinde medyan floresan yoğunluğu (MFI) değeri olarak belirlendi. FCXM sonucu, örneğin negatif kontrol MFI değeri oranı 1,6'dan büyük olduğunda pozitif kabul edildi. FCXM testinde (+) pozitiflik düzeyi olan olgular düşük sensitizasyon düzeyine sahip olarak kabul edilirken, FCXM testinde (++) pozitiflik düzeyi olan olgular yüksek sensitizasyon düzeyine sahip olarak kabul edildi. FCXM testinde belirlenen +, ++ ve +++ değerlerini gösteren demonstratif histogram şekil 7.1.'de verilmiştir.



Şekil 7.1. FCXM-süpernatant Histogramları. FCXM-süpernatant test sonucu (+) pozitif olarak kabul edildi (MCS: 1,96) (A); FCXM-süpernatant test sonucu (++) pozitif olarak kabul edildi (MCS: sırasıyla 5,33 ve 57,1) (B ve C); ve FCXM-süpernatant test sonucu (+++) pozitif olarak kabul edildi (MCS: 480,86) (D)

Çalışmamızda belirlediğimiz MCS değer aralıkları şekildeki haliyle kabul edilmiştir. Buna göre tez kapsamında çalışılan FCXM çalışmalarının pozitiflik durumları şekil 7.1. 'de verilen MCS aralıklarına göre değerlendirilmiştir.

Çalışmamıza dahil olan hasta ve donör çiftlerin allosensitize durumları FCXM yöntemi kullanılarak MCS hesaplamasıyla belirlendi. Sonuçlar çizelge 7.1' de gösterildi. Hasta olguların donörlerine karşı allosensitize olduğu, donörlerin ise allosensitize olmadığı saptandı.

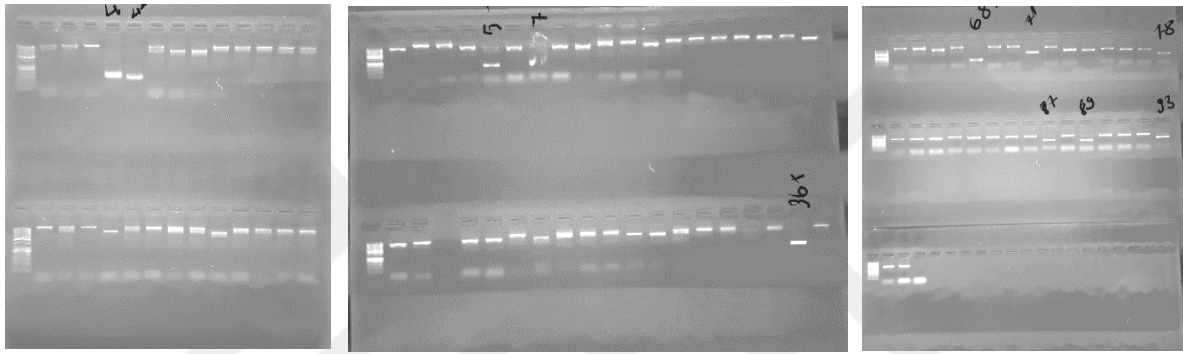
Çizelge 7.1. Allosensitize olgu seçim

<b>Olgu</b>	<b>Serum FCXM</b>	<b>Serum FCXM</b>
1a hasta	+++	3
1b donör	-	0
2a hasta	+	1
2b donör	-	0
3a hasta	++	2
3b donör	-	0
4a hasta	+	1
4b donör	-	0
5a hasta	+++	3
5b donör	-	0
6a hasta	+	1
6b donör	-	0
7a hasta	+	1
7b donör	-	0
8a hasta	+++	3
8b donör	-	0
9a hasta	+	1
9b donör	-	0
10a hasta	+	1
10b donör	-	0

1a, 3a, 5a, 8a olguları MCS değerlerine göre kuvvetli pozitif; 2a, 4a, 6a, 7a, 9a ve 10a olguları ise zayıf pozitif; 1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b, 8b, 9b ve 10b olguları (donörler) negatiftir. Seçilen tüm olguların %50'si pozitif %50'si negatif iken pozitif olgularında %40'ı kuvvetli pozitif %60'ı zayıf pozitifdir.

## 7.2 HLA-A-B-DR Tiplendirme

Olguların periferal kan örneklerinden Roche High Pure gDNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. Olerup SSP HLA-A-B-DR combi tray kiti kullanılarak diziyeye özgül primer yöntemi (SSP) SSP yöntemi ile elde edilen ürünler %2 konsantrasyondaki agaroz jel elektroforezinde 40V akım altında yürütüldü. Agaroz jel görüntülerindeki bant profilleri start skor yazılımı ile değerlendirilerek HLA tiplendirmesi gerçekleştirildi. Tiplendirme sonuçlarına göre hasta ve donör arasındaki mismatch durumu belirlendi. Yapmış olduğumuz tiplendirme çalışmasına ait demonstratif jel görüntüleri şekil 7.2. de gösterilmiştir. Sonuçlar ise çizelge 7.2’de verilmiştir.



Şekil 7.2. HLA tiplendirme: Demonstratif agaroz jel görüntüleri

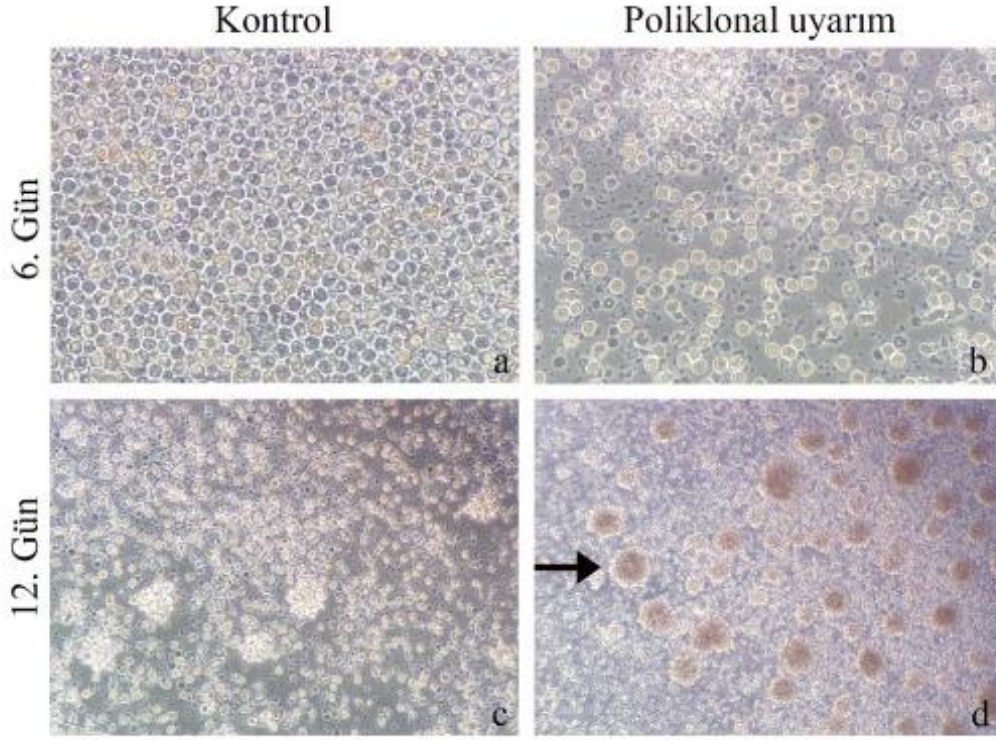
Çizelge 7.2. Olguların HLA tiplendirme ve mismatch sonuçları

Olgu	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA mismatch
1a hasta	*02 / *02	*27/*51	*01/*16	+
1b donör	*01 / *02	*27/*08	*01 /*03	+
2a hasta	*11 / *11	*50/*51	*07/ *08	+
2b donör	*24 / *32	*35/*51	*11/ *11	+
3a hasta	*02/*11	*35/*35	*04/*15	+
3b donör	*01/*24	*40/*55	*01/*14	+
4a hasta	*24/*30	*13/*35	*11/*15	+
4b donör	*11/*24	*13/*35	*01/*11	+
5a hasta	02/*30	*15/*49	*01/*11	+
5b donör	*01/*24	*18/*24	*03/*11	+
6a hasta	*02/*23	*44/*50	*04/*15	+
6b donör	*02/*02	*51/*63	*04/*13	+
7a hasta	*03/*11	*35/*35	*04/*11	+
7b donör	*03/*11	*35/*55	*04/*14	+
8a hasta	*24/*30	*37/*?	*08/*13	+
8b donör	*24/*30	* ? /*?	* ? /*13	+
9a hasta	*02/*03	*37/*47	*13/*14	+
9b donör	*02/*03	*37/*44	*11/*13	+
10a hasta	*02/*03	*40/*44	*04/*11	+
10b donör	*11/*30	*18/*40	*03/*11	+

8b olgusunun HLA-B ve HLA-DR gruplarından 1 aleli saptanamamıştır. Diğer tüm olgularda hasta ve donör arasında mismatch durumu belirlenmiştir.

### 7.3 Hücre Kültürü

Seçilen olguların lenfosit hücre kültürü hem DMEM besiyerinde hem de poliklonal uyarım kokteyli içeren DMEM besiyerinde *in vitro* koşullar altında gerçekleştirildi. Kültüre edilen hücreler belirli zaman aralıklarında invert mikroskop altında incelenerek iki farklı besiyerinde çoğalan hücrelerin morfolojileri değerlendirildi. Poliklonal uyarım sonucu plazma hücrelerinin hafıza hücrelerine indüklendiği gözlemlendi. Hasta olguların kültür örneklerine ait olan mikroskop görüntüleri demonstratif olarak şekil 7.3'te gösterildi.



Şekil 7.3 PBMNC hücre kültürlerinin kültür süreleri boyunca poliklonal uyarıma bağlı olarak hücre morfolojilerindeki değişim **ok**: Poliklonal uyarıma yanıt olarak oluşan hücre kümeleri

#### 7.4 6 ve 12. Gün Kültür Süpernatantlarında FCXM

Çalışmamızın 6. ve 12. günlerinde kültür süpernatantında biriken alloantikörleri tespit etmek ve buna göre alloreaktif hBH varlığını ortaya çıkarmak için kültür süpernatantları ve karşılık gelen lenfositleri kullanılarak FCXM-süpernatant testleri yapıldı. FCXM süpernatant testleri, serum numuneleri kullanılarak FCXM'ninkine benzer standart prosedüre göre toplam lenfosit çapraz eşleştirme testi olarak yapıldı ve FC (FACS Calibur, Becton Dickinson, ABD) ile analiz edildi. FCXM-süpernatant testleri, alloreaktif hafıza B hücresi süpernatant numunenin MFI değerinin, uyarılmamış süpernatant numunenin MFI değerine oranı 1,6'dan büyük olduğunda pozitif kabul edildi. FCXM süpernatant pozitiflik seviyeleri (+, ++ ve +++), konvansiyonel FCXM testine benzer şekilde MCS değerlerine göre belirlendi. FCXM süpernatant testlerinde negatif kontrol örneği olarak taze besiyeri ortamı da kullanılmıştır. Ek olarak, ultra-santrifüj filtreler (Milipore, İrlanda) kullanılarak liyofilizasyon ve ultra-filtrasyon gibi konsantrasyon prosedürlerinin FCXM-süpernatant madde testinin MCS değerleri üzerindeki etkileri, rastgele seçilen iki allosensitize vakanın süpernatant numuneleri için değerlendirildi (çizelge 7.3.).



Çizelge 7.3. Kültür süpernatatları ile gerçekleştirilen FCXM çalışmasının MCS sonuçları

<b>Olgu</b>	<b>6.gün/12. Gün süpernatant FCXM</b>	<b>6. gün süpernatant FCXM</b>	<b>12. gün süpernatant FCXM</b>
1a hasta	++/++	2	2
1b donör	-/-	0	0
2a hasta	-/-	0	0
2b donör	-/-	0	0
3a hasta	+/+	1	1
3b donör	-/-	0	0
4a hasta	-/-	0	0
4b donör	-/-	0	0
5a hasta	+++/>+++	3	3
5b donör	-/-	0	0
6a hasta	+/+	1	1
6b donör	-/-	0	0
7a hasta	-/-	0	0
7b donör	-/-	0	0
8a hasta	+++/>+++	3	3
8b donör	-/-	0	0
9a hasta	-/-	0	0
9b donör	-/-	0	0
10a hasta	-/-	0	0
10b donör	-/-	0	0

Kuvvetli pozitif olgulardan 1a, 5a ve 8a olgularının hem 6. hem 12. gün kültür sonu süpernatantlarında gerçekleştirilen FCXM test sonucu kuvvetli pozitif; kuvvetli pozitif 3a olgusunun sonucu pozitif; pozitif (+) belirlenen 2a, 4a, 6a, 9a, 10a olguları ile negatif belirlenen olguların tamamında FCXM sonuçları 6. ve 12. gün için negatiftir.

## 7.5 Kültür Sonu Hücrelerin Hücre Yüzey Markerları ile İşaretlenmesi

Hafıza B hücre uyarımının etkinliğini saptamak için olgu ve kontrollerin poliklonal olarak uyarılmış ve uyarılmamış numuneleri arasında karşılaştırma yaptık (çizelge 7.4.).

Çizelge 7.4. CD38 boyama sonuçları

<b>Olgu</b>	<b>CD 38 +</b>
1a hasta	3,67
1b donör	0,87
2a hasta	2,36
2b donör	2,98
3a hasta	2,31
3b donör	-
4a hasta	0,97
4b donör	0,93
5a hasta	1,93
5b donör	0,95
6a hasta	-
6b donör	-
7a hasta	2,29
7b donör	1,24
8a hasta	1,62
8b donör	2,49
9a hasta	1,18
9b donör	1,8
10a hasta	6,96
10b donör	1,78

Kültürün 12. günü toplanan hücreler anti-CD38-FITC ile işaretlendi ve CD38+ hücre sayısı akım sitometrik yöntemle tespit edildi. Elde edilen CD38+ hücre sayıları deney ve kontrol grupları arasında oranlanarak değerlendirildi. 3b, 6a, 6b olgularında CD38+ değeri saptanamazken diğer olgular arasında 0,87 ile 6,96 kat aralığı değişiklik gösterilmiştir.

FCXM değeri kuvvetli olan olguların CD38+ ortalaması 2,28, zayıf pozitiflerin ortalaması 1,67, negatif olguların ortalaması 1,63 olarak hesaplandı. CD38+ işaretli hücre miktarı kuvvetli pozitif olgularda, zayıf pozitiflere oranla 1,36 kat daha fazladır.

## 7.6 12.Gün Kültür Sonu Luminex Sonuçları

Kültür sonunda toplanan süpernatantlarla Luminex çalışması gerçekleştirilerek poliklonal uyarımın HLA sınıfları üzerindeki etkinliğini saptadık (çizelge 7.5.)

Çizelge 7.5. 12. Gün kültür sonu Luminex sonuçları

Olgu	12. Gün Luminex Sınıf I/II	12. Gün Luminex Sınıf I	12. Gün Luminex Sınıf II
1a hasta	+/+	1	1
1b donör	-/-	0	0
2a hasta	-/-	0	0
2b donör	-/-	0	0
3a hasta	-/-	0	0
3b donör	-/-	0	0
4a hasta	-/-	0	0
4b donör	-/-	0	0
5a hasta	+/+	1	1
5b donör	-/-	0	0
6a hasta	-/-	0	0
6b donör	-/-	0	0
7a hasta	-/-	0	0
7b donör	+/+	1	1
8a hasta	-/-	0	0
8b donör	-/+	0	1
9a hasta	-/-	0	0
9b donör	-/+	0	1
10a hasta	-/-	0	0
10b donör	-/-	0	0

Başlangıç FCXM sonuçları kuvvetli pozitif olan 1a, 5a, 8a (+++) olgularında HLA sınıf I HLA sınıf II antikorlarının varlığı, olgu 9a (+)'nın sadece HLA sınıf II antikorlarının varlığı saptanmıştır. Kuvvetli pozitif olgu 3a ve negatif olguların tamamında HLA antikorlarına rastlanmamıştır. Luminex yöntemi ile tüm pozitif olguların %30'unu, kuvvetli pozitif olanların da %50'si saptamıştır.

## 7.7 Kültür Süpernatantlarındaki anti-HLA Ab Tespiti

Süpernatantlar ve karşılık gelen lenfositler kullanılarak gerçekleştirilen FCXM-yüzer madde analizlerine ek olarak, kültür süpernatantları, Lifecodes Lifescreen Deluxe Kit (Immucor Transplant Diagnostics, Stamford, CT) kullanılarak Luminex tarafından anti-HLA Abs varlığı açısından tarandı. Luminex testindeki poliklonal olarak uyarılmış hBH kültür süpernatantlarındaki anti-HLA Abs'nin MFI değerleri, serum örneklerinden çok daha düşük olduğu için, seçilen örnekler Luminex-SAB testi uygulandı. Poliklonal olarak uyarılmış hBH kültürü süpernatantlarında, Luminex ve FCXM üstte yüzen tahlillerinde alloantikörler için nispeten daha yüksek MFI değerlerine sahip vakalardan ikisi (Çizelge 7.3.'de 5a ve 8a) Luminex-SAB testi için seçildi. Bu iki örnek, anti-HLA Ab özgüllüklerini belirlemek için LabScreen HLA sınıf I ve sınıf II tek antijen boncukları (One Lambda, Canoga, CA) kullanılarak test edildi.

Luminex ve FCXM'deki poliklonal olarak uyarılmış hBH kültürü süpernatantlarında anti-HLA Abs için nispeten daha yüksek MFI değerlerine sahip iki vaka (olgu 5a ve olgu 8a) Luminex-SAB tahlili için seçildi. Poliklonal olarak uyarılmış hBH kültürü süpernatantları ile Luminex-SAB çalışmaları, spesifik anti-HLA Ab türlerini ortaya çıkardı (Çizelge 7.6.).

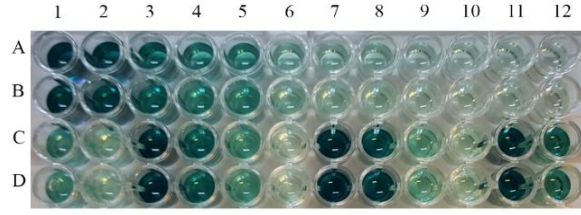
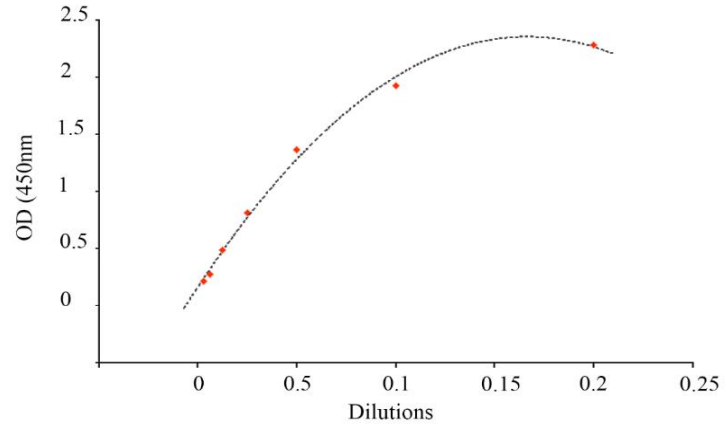
Çizelge 7.6. Luminex SAB test sonuçları

Case No.	Class I anti-HLA Abs	Class II anti-HLA Abs	Miss-matches
5a	A*01:01 A*03:01 A*11:01 A*11:02 A*23:01 A*24:02 A*24:03 A*25:01 A*26:01 A*32:01 A*33:01 A*33:03 A*34:02 A*36:01 A*66:01 A*66:02 A*68:01 A*68:02 A*69:01 A*80:01 B*07:02 B*07:03 B*08:01 B*13:02 B*14:01 B*14:02 B*15:12 B*15:16 B*18:01 B*27:03 B*27:05 B*27:08 B*37:01 B*38:01 B*39:01 B*40:01 B*40:02 B*41:01 B*42:01 B*44:02 B*44:03 B*45:01 B*47:01 B*48:01 B*54:01 B*55:01 B*56:01 B*57:01 B*58:01 B*59:01 B*67:01 B*73:01 B*81:01 B*82:02 C*01:02C*02:02C*04:01C*04:03C*05:01C*06:02C*15:02C*17:01C*18:01	DRB1*09:01 DRB3*01:01 DRB3*03:01 DQA1*01:03 DQB1*03:02 DQB1*03:03 DQB1*06:01 DQB1*06:02 DQB1*06:03 DQB1*06:04	A*01, A*24 B*18, B*24 DRB1*11
8a	A*02:02 A*02:03 A*02:05 A*03:01 A*11:01 A*30:01 A*31:01 A*33:03 A*66:01 A*66:02 A*68:01 A*68:02 A*74:01		A*30, B*07

## 7.8 Elisa Testi

Toplam IgG Ab seviyeleri, dolaylı Elisa testi ile ölçüldü. Optik yoğunluk (OD) değerleri, bir mikropilaka okuyucusunda (MultiSkan FC, Thermo Fisher Scientific) 450 nm dalga boyunda elde edildi. Hasta ve kontrol grubu için poliklonal olarak uyarılmış ve uyarılmamış numuneler arasında toplam IgG Ab seviyeleri karşılaştırıldı (çizelge 7.7).

Optik yoğunluğa göre toplam IgG Ab seviyelerini belirlemek için şekil 7.4.'te gösterilen IgG standart eğrisi oluşturuldu. Standart eğri oluşturulurken kullanılan konsantrasyonlar 2 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı (şekil 7.4.).



Şekil 7.4. IgG protein standart eğrisi ve konsantrasyon miktarları

Çizelge 7.7. Periferik hBH'lerin *in vitro* poliklonal stimülasyonundan sonra Elisa ile toplam IgG Ab analizlerinin uyarım yapılan ve yapılmayan kültürlerdeki değerlerin birbirine oranı

<b>Olgu</b>	<b>12. gün Elisa total IgG oranı</b>
1a hasta	3,65
1b donör	9,62
2a hasta	1,7
2b donör	-
3a hasta	52,94
3b donör	1,88
4a hasta	-
4b donör	-
5a hasta	25,76
5b donör	6,06
6a hasta	16,06
6b donör	42,07
7a hasta	-
7b donör	3,06
8a hasta	18
8b donör	34,64
9a hasta	2,02
9b donör	-
10a hasta	3,25
10b donör	10,35

2b, 4a, 4b, 7a, 9b olgularında total IgG oranı belirlenememiştir. Diğer tüm olgularda poliklonal uyarım ile birlikte kültürde biriken total IgG miktarının 1,7 ile 52,94 kat aralığında değişimi saptanmıştır.

FCXM sonucu kuvvetli pozitif olgulardaki IgG ortalaması 27,45; zayıf pozitif olgularda ortalama 9,75; negatif olgularda 15,38 değerindedir. Kuvvetli pozitif olgularda IgG miktarı pozitif olgulara göre 2,81 kat daha fazladır.

## 8. TARTIŞMA

Alloreaktif hBH'nin hümmoral alloimmünitenin bir parçası olarak değerdendirilmesinin transplantasyonun başarısını arttırması beklenir. Teknik sınırlamalar nedeniyle, şu anda alloreaktif hBH değerdendirmesi için rutin olarak uygulanabilir bir test yoktur. FC, ELISPOT ve Luminex tabanlı yaklaşımlarla HLA tetramer boyaması favoriler arasındadır, ancak FCXM'nin bu amaç için kullanışlılığı hakkında daha az bilgi mevcuttur. Bu nedenle bu çalışmada alloreaktif hBH değerdendirmesinde FCXM tekniğinin değerdendirini araştırmayı amaçladık.

Alloreaktif hBH'lerin daha fazla bulunduğu kemik iliği veya lenf dđğümlerinden biyolojik örneklerin elde edilmesi zor olduğundan günümüzde alloreaktif hBH değerdendirmesi için periferik kanın en iyi biyolojik materyal olduğu konusunda bir fikir birliği vardır. Öte yandan, periferik kandaki hBH repertuarının hümmoral alloimmün potansiyeli ne kadar temsil edebileceği veya tamamlayabileceği hala tam olarak net değildir. Bununla birlikte, bu çalışmada erişilebilirliği nedeniyle alloreaktif hBH'yi değerdendirmek için periferik kan örneklerini kullandık. Biyolojik materyal örneklemesinin ötesinde, eğer alloreaktif hBH değerdendirmesi klinik olarak anlamlı bir test haline gelecekse, doku tipleme laboratuvarlarında halihazırda var olan ekipman ve teknikleri kullanmamız daha iyi olacaktır. Maliyet, kolaylık ve güvenilirlik, dikkate alınması gereken diğer konulardır. Tüm bunları göz önünde bulundurduğumuzda, FCXM-süpernatant tabanlı yaklaşım bazı avantajlar sunmaktadır. Anti-HLA Abs'yi saptamak için sentetik HLA moleküllerini kullanan diğer analizlerin aksine, FCXM süpernatantı, HLA'nın doğal formlarını ve ayrıca lenfositlerin yüzeyindeki diğer alloantijen moleküllerini kullanır; bu, FCXM süpernatantı ve donöre özgü HLA-ELISPOT için benzersiz bir özelliktir. Çalışmamızda tespit edilen FCXM-süpernatant pozitif ancak Luminex-süpernatant negatif 1 olgunun (olgu 3a) açıklaması luminekte sentetik HLA moleküllerinin kullanılıyor olmasıdır. Donöre özgü HLA-ELISPOT testinin alloreaktif hBH'leri de ölçebildiği bildirilmiştir (Karahan ve ark. 2017). FCXM-süpernatant testinden elde edilen MFI değerdeleri, alloreaktif hBH'nin miktarını gösterebilsede, alloreaktif hBH'leri güvenilir bir şekilde ölçebilen paralel olarak gerçektştirilen bir test olmadan hBH miktarını belirleme kabiliyeti hakkında yorum yapmak zordur.

Literatürde FCXM-süpernatant testinin küçük bir çalışma grubu üzerinde gerçektştirildiği iki rapor bulunmaktadır. Lucia vd. (2015) hBH süpernatantları ile gerçektştirilen FCXM testinde 10 örnekten yalnızca birinin negatif olduğunu bildirdi. Karahan

ve ark. çalışmalarında FCXM testinde 10 günlük uyarılmış hBH kültürü süpernatantları ile birlikte HLA tipi bilinen sağlıklı bireylerin periferal kan mononükleer hücreleri kullanmışlardır. Alloantijen maruziyeti olan vakaların tüm IgG izole süpernatant örneklerinde FCXM testlerinin ya T-FCXM ya da B-FCXM için pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Gerçekleştirmiş oldukları çalışmada alloantijen maruziyeti olmayan olgularda FCXM testleri negatifti. Ayrıca, FCXM test sonuçlarında, bir hücre kültüründe *in vitro* poliklonal stimülasyon üzerine üretilen alloantikörlerin, lenfositlerin yüzeyindeki doğal HLA moleküllerine bağlanma kabiliyetini göstermesi açısından önemli olduğunu iddia etmişlerdir. Karahan ve ark. HLA'ya özgü hBH'lerin, sensitize bireylerin %64'ünde ultra-santrifüj filtrasyonun ardından saptanabilir olduğunu bildirdi. Ayrıca, immünize edilmiş bireylerin %82'sinde protein G afinite saflaştırma yöntemini kullanarak süpernatantın konsantrasyonunu takiben HLA'ya özgü hBH'leri saptamışlardır (Karahan vd., 2019).

Çalışmamıza dahil edilen tüm alloimmünize bireylerin %50'sinde herhangi ilave konsantrasyon aşaması olmaksızın FCXM-süpernatant testi ile alloreaktif hBH'ler saptadık. Çalışmamızda IgG Ab saflaştırmasını kullanamadık. Bunun yerine, liyofilizasyon ve ultra filtrasyon prosedürlerinin teknik faydalarını, FCXM süpernatant pozitif vakaların MFI değerleri üzerinde değerlendirdik. Liyofilize numunelerde 2,44 kat daha yüksek MFI değerleri ve ultra filtrelenmiş numunelerde 5,2 kat daha yüksek MFI değerleri belirlenmiştir. Bu tür konsantrasyon prosedürleri, özellikle düşük alloantikör seviyelerine sahip numunelerde FCXM-süpernatant testinin saptama oranını arttırabileceğini ortaya koymaktadır.

Toplam IgG Ab seviyeleri, hem allosensitize hem de allosensitize olmayan olguların poliklonal olarak uyarılmış hBH kültür süpernatantlarında poliklonal olarak uyarılmamış süpernatant örneklerine kıyasla yaklaşık 10 kat daha yüksek seviyeye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum allosensitizasyonun poliklonal stimülasyon seviyesi üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Toplam IgG Ab düzeylerinin ayrıntılı analizlerinde, FCXM-serumunun zayıf (+) pozitif olduğunu, ancak FCXM-süpernatant negatif numunelerin daha düşük toplam IgG Ab düzeylerine (Ortalama: 27,45; 9,75) sahip olduğunu fark ettik; bu sonuçlarda zayıf allosensitize olgularda hBC uyarımının yetersiz olduğunu göstermektedir. Öte yandan, FCXM serumu kuvvetli (++ ve +++) pozitif olan ve toplam IgG Ab düzeyi düşük olan tüm vakaların FCXM-süpernatant test sonuçları pozitif. Ayrıca, yalnızca FCXM-serum testi ile tespit edilen düşük düzeyde allosensitizasyona sahip vakalar dikkate alındığında, toplam IgG Ab seviyeleri, FCXM süpernatant pozitif vakalarda ortalama 9,75 ve negatif FCXM-



süpernatant olgularından ortalama 15,38 olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak poliklonal stimülasyonun başarısı, FCXM-süpernatant test pozitifliği ile yakından ilişkilidir ve toplam IgG Ab Elisa testi, *in vitro* poliklonal stimülasyonun başarısını tahmin edebilir.

Çalışmamızda allosensitize ve allosensitize olmayan olguların toplam IgG düzeylerinde tespit edilen benzerliğin aksine, allosensitize olguların antijen sunun hücre (ASC) oranı allosensitize olmayan olgulardan beklenmedik şekilde 2,86 kat daha yüksekti. Poliklonal stimülasyonun, allosensitize edilmiş ve allosensitize edilmemiş olgular arasında toplam IgG seviyelerini eşit tutarak allosensitize olgularda ASC benzeri hücre sayısını nasıl arttırılabileceği sorusu yanıtlanmayı beklemektedir.

Önceki çalışmalar, poliklonal olarak aktive edilmiş hBH kültür süpernatantlarında biriken alloantikörlerin miktarını göstermede yetersiz olduğundan, anti-HLA'nın varlığını araştırmak için Luminex-SAB testinde FCXM çalışmasında elde edilen en yüksek MFI değerine sahip yalnızca iki süpernatant numunesini seçtik. Luminex-SAB testi, sırasıyla olgu 5a ve 8a'nın hBH'lerinin poliklonal aktivasyonunu takiben donörlerin mismatch HLA gruplarına karşı üretilmiş olabilecek üç farklı anti-HLA Abs ve yalnızca bir anti-HLA Ab gösterdi.

Elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde olgulardaki HLA mismatch sayısı ile kuvvetli veya zayıf pozitiflik arasında bir ilişkinin belirlenebilmesi için daha fazla olgu ile yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın amacı serum ve süpernatant numuneler arasında anti-HLA Ab türlerini karşılaştırmak olmadığından, olgu 5a ve 8a'nın serumları için Luminex-SAB sonuçlarına sahip değiliz. Luminex-SAB testinin, FCXM-süpernatant testinde (+++) pozitiflik düzeyi olan olguların süpernatantlarında anti-HLA Ab türlerini başarılı bir şekilde ortaya koyabildiğini söylemek mümkündür.

Alloreaktif hBH tespiti için kullanılan FC tabanlı FCXM-süpernatant testi mevcut haliyle hBH'nin profilinin çıkarılması için yeterli değildir. Bununla birlikte, HLA karakterizasyonu iyi yapılmış lenfosit kültürlerinin süpernatantları kullanılarak yapılacak olan FCXM çalışmalarının hBH profillemesi için hala bir olasılık taşımaktadır. HLA tetramer boyaması ve Luminex tabanlı analizler ile belirli HLA gruplarının çalışılması sonucunda dolaşımdaki alloreaktif hBH havuzu belirlenebilir. Bu da potansiyel olarak nakil öncesi ve sonrası risk değerlendirmesinin doğruluğunu arttırabilir ve bekleme listesini şekillendirebilir.

Öte yandan, alloreaktif hBH'lerin donöre özgü bir şekilde ortaya çıkarılması, yalnızca nakil öncesi ve sonrası dönemde donöre özgü antikorların başarılı bir şekilde izlenmesini geliştirebilir. Donöre özgü HLA-ELISPOT ve FCXM analizlerinin, alloreaktif hBH'leri donöre özgü bir şekilde ortaya çıkarabilen tekniklerden ikisi olduğu görülmektedir (Karahana vd., 2017). Güvenilir bir niceleme için tek başına yeterli olmamasına rağmen, FCXM-süpernatant testinin basitliği nedeniyle donöre özgü HLA-ELISPOT'tan bir adım önde olduğu tahmin edilebilir.

Çalışmamızda elde edilen 6. gün ve 12. gün FCXM-süpernatant testi sonuçları arasındaki tam uyum, 6 günlük PBMNC kültür periyodunun FCXM süpernatant testinde güvenilir sonuçlar almak için yeterince iyi olduğunu göstermektedir.

Son olarak, donöre özgü alloreaktif hBH'lerin tespiti söz konusu olduğunda, FCXM-süpernatant testinin bazı modifikasyonlarla rutin bir test olmaya aday olacağına inanıyoruz. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar [doi.org/10.1016/j.trim.2022.101642](https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101642) numaralı makalede yayınlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. (2011). Cellular and molecular immunology seventh edition Elsevier Health Sciences; 109-38.
- Afzali, B., Lombardi, G. & Lechler, R.I. (2008). ABO-Incompatible Kidney Transplantation Enabled by Non-Antigen-Specific Immunoabsorption Aug. Pathways of Major Histocompatibility Complex Allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant*, 13(4):438-44.
- Aghdaie, M.H., Azarpira, N., Kazemi, K., Geramizadeh, B., Darai, M. & Malekhoseini, S.A. (2011). Frequency of HLA-G exon 8 polymorphisms and kidney allograft outcome in Iranian population. *Mol. Biol. Rep*, 38 3593–3597.
- Banchereau, J. & Rousset, F. (1991). Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature*, 353(6345), p. 678-9.
- Basturk, B., Kantaroglu, B. & Kavuzlu, M. (2016). The most common hla alleles and anti-hla antibodies to know for virtual cross-match. *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 14: 53-5.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E. & Lanzavecchia, A., (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 298 (5601), 2199–2202.
- Bilgen, T., Ata, P., Tozgir, J., Tozgir, H. & Titiz, M.I. (2017). Cytotoxic antibody detection by means of flow-cytometric cross-match. *Transplant. Proc*, 49 (3), 440–444.
- Bilgen, T., Canbakan, M., Sahin, G. & Titiz, M.I. (2019). Comparison of cytotoxic flow cytometric cross match with complement dependent lymphocytotoxicity and flow cytometric cross match in renal transplant patients. *Transplant. Proc*, 51 (4), 1021–1023.
- Bostock, I.C., Alberú, J., Arvizu, A., Hernández-Mendez, E.A., De-Santiago, A., GonzálezTableros, N., López, M., Castelán, N., Contreras, A.G., Morales-Buenrostro, L.E., Gabilondo, B. & Vilatobá, M. (2013). Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA. *Transplant Immunology*. doi.org/10.1016/j.trim.2013.05.00
- Burns, J.M., Cornell, L.D., Perry, D.K., Pollinger, H.S., Gloor, J.M. & Kremers W.K. (2008). Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. *Am. J. Transplant*, 8 (12), 2684–2694.
- Can, O., Gökçe, A.M., Canbakan, M., Ata, P., Şahin, G.M., Titiz, M.İ. & Apaydın, S. (2016). Evaluation of Pre-Transplant Panel Reactive Antibody Levels and Sensitization: A Single-Center Study. *Ann Transplant*, 21, p. 577-81.
- Cao, Y., Gordic, M., Kobold, S., Lajmi, N., Meyer, S., Bartels, K., Hildebrandt, Y., Luetkens, T., Ihloff, A.S., Kröger, N., Bokemeyer, C. & Atanackovic, D. (2010). An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. *J Immunol Methods*, 358(1-2), p. 56-65.

- Caraux, A., Klein, B., Paiva, B., Bret, C., Schmitz, A., Fuhler, G.M., Bos, N.A., Johnsen, H.E., Orfao, A. & Perez-Andres, (2010). Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica*, 95(6), p. 1016-20.
- Chong, A.S. & Ansari, M.J. (2018). Heterogeneity of memory B cells. *Am. J. Transplant*, 18 (4), 779–784.
- Chong, A.S. & Sciammas, R. (2015). Memory B cells in transplantation. *Transplantation*, 99 (1), 21–28.
- Choo, S.Y. (2007). The hla system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal*, 48 (1): 11-23.
- Cinti, P., Pretagostini, R., Lai, Q., Tamburro, ML., Rossi, M., Poli, L. & Berloco, P. (2009). Alloantibodies and outcomes of deceased donor kidney allografts. *Hum Immunol*, 70: 651-654.
- Coleman., W.B. & Tsongalis, G.J. (2006). Molecular Diagnostics: for The Clinical Laboratorian. *Second Edition edHumana Press*, 485-494
- Colombo, M.B., Haworth, S.E., Poli, F., Nocco, A., Puglisi, G., Innocente, A., Serafini, M., Messa, P. & Scalomogna, M. (2007). Cytometry B Clin Cytom. Luminex Technology for antiHLA Antibody Screening: Evaluation of Performance and of Impact on Laboratory Routine. 72(6):465-71.
- Crespo, M., Heidt, S., Redondo, D. & Pascual, J., (2015). Monitoring B cell subsets and alloreactivity in kidney transplantation. *Transplant. Rev*, 29 (2), 45–52.
- Crotty, S., Aubert, R.D., Glidewell, J. & Ahmed, R. (2004). Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J Immunol Methods*, 286(1-2), p. 111-22.
- Delgado, J.C. & Eckels, D.D. (2008). Positive B-cell only flow cytometric crossmatch: implications for renal transplantation. *Exp Mol Pathol*, 85: 59-63.
- DeWolf, S. & Sykes, M. (2007). Alloimmune T Cells in Transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, 127 (7):2473-2481.
- Endert, P.V. & Villadangos, J.A. (2007). Antigen processing and recognition. *Curr Opin Immunol*, 19: 63-65.
- Fecteau, J.F. & Neron, S. (2003). CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol*, 171(9), p. 4621-9.
- Goldsby, R.A., Kindt, TK., Osborne, B.A. & Kuby, J. (2003). Major Histocompatibility Complex. In *Goldsby RA, Kindt TK, Osborne BA and Kuby J, Immunology (5th edt). W.H. Freeman and Company*, p161-184

- Graff, R.J., Buchanan, P.M., Dzebisashvili, N., Schnitzler, M.A., Tuttle-Newhall, J. & Xiao, H. (2010). The clinical importance of flow cytometry crossmatch in the context of CDC crossmatch results. *Transplant. Proc*, 42 (9), 3471–3474.
- Graff, R.J., Buchanan, P.M., Dzebisashvili, N., Schnitzler, M.A., Tuttle-Newhall, J., Xiao, H., Schadde, E., Gheorghian, A. & Lentine, K.L. (2010). The clinical importance of flow cytometry crossmatch in the context of CDC crossmatch results. *Transplant Proc*, 42(9), p. 3471-4.
- Guichard, R.A., Marino, L.A., Castelán, N., López, M., GonzálezTableros, N., Arvizu, A., Santiago, A.D., Alberú, J. & Morales-Buenrostro, L.E. (2016). Impact of Pretransplant Exposure to Allosensitization Factors Generating HLA Antibodies in the Luminex Era. *Transpl Immunol*, 38:33-9.
- Guillaume, N. (2018). Improved flow cytometry crossmatching in kidney transplantation. *HLA*, 92 (6), 375–383.
- Haberal, M. (1995). Historical evolution of kidney and liver transplantation in Turkey. *Transplantation Proceedings*, 27(5), 2771-4.
- Hamosh, A., Scott, AF., Amberger, J., Valle, D. & McKusick, VA. (2000). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Hum Mutat*, 15: 57–61.
- Han, M., Rogers, J.A., Lavingia, B. & Stastny, P. (2009). Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies *in vitro*. *Hum Immunol*, 70(1), p. 29-34.
- Heidt, S., Hester, J., Shankar, S., Friend, P.J. & Wood, K.J. (2012). B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am. J. Transplant*, 12 (7), 1784–1792.
- Heidt, S., Roelen, D.L., de Vaal, Y.J., Kester, M.G., Eijsink, C. & Thomas, S. (2012). A NOVEL ELISPOT assay to quantify HLA-specific B cells in HLA-immunized individuals. *Am. J. Transplant*, 12 (6), (1469–1478).
- Heidt, S., Roelen, D.L., de Vaa, Y.J.H.I., Kester, M.G.D., Eijsink, C., Thomas, S., van Besouw, Herrera, OB., Golshayan, D., Tibbott, R., Ochoa, FS., James, MJ., Marelli-Berg, FM. & Lechler, RI. (2004). A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells. *J Immunol*, 15;173(8):4828-37.
- Hickey, MJ., Valenzuela, NM. & Reed, EF. (2016). Alloantibody Generation and Effector Function Following Sensitization to Human Leukocyte Antigen. *Front Immunol*, doi: 10.3389/fimmu.2016.00030.
- Hume, D.M., Merrill, J.P., Miller, B.F. & Thorn, G.W. (1955). Feb Experiences With Renal Homotransplantation in the Human: Report of Nine Cases. *J Clin Invest*, 34(2):327-82.
- Hwang, HS., Hyung, BJ., Lee, SY., Jeon, YJ., Yoon, HE. & Kim, JY. (2009). Comparison of antibody monitoring system with flow cytometric crossmatch test in renal transplant recipients with high panel-reactive antibody. *Nephron Clin Pract*, 111: 260-264.

- Ishida, H., Tanabe, K., Toma, H. & Akiba T. (2003). Therapeutic apheresis therapy for ABO incompatible renal transplantation. *Ther Apher Dial*, 7(6):520-8.
- Jackson, A.M., Lucas, D.P., Melancon, J.K. & Desai, N.M. (2011). Clinical relevance and IgG subclass determination of non-HLA antibodies identified using endothelial cell precursors isolated from donor blood. *Transplantation*, 92(1), p. 54-60.
- Karahan, G.E., Claas, F.H. & Heidt, S. (2015). Detecting the humoral alloimmune response: we need more than serum antibody screening. *Transplantation*, 99 (5), 908–915.
- Karahan, G.E., de Vaal, Y.J.H., Krop, J., Wehmeier, C., Roelen, D.L., Claas, F.H.J., et al., (2017). A memory B cell crossmatch assay for quantification of donor-specific memory B cells in the peripheral blood of HLA-immunized individuals. *Am. J. Transplant*, 17 (10), 2617–2626.
- Karahan, G.E., Krop, J., Wehmeier, C., de Vaal, Y.J.H., Langerak-Langerak, J., Roelen, D. L., Lardy, N.M., Bemelman, F.J., Ten Berge, I.J.M., Reinders, M.E.J., van Kooten, C., Claas, F.H.J. & Heidt, S. (2019). An easy and sensitive method to profile the antibody specificities of HLA-specific memory B cells. *Transplantation*, 103 (4), 716–723.
- Klein, J. & Sato, A. (2000). The hla system. First of two parts. *The New England journal of medicine*, 343: 702-9.
- Lachmann, N., Terasaki, PI., Budde, K., Liefeldt, L., Kahl, A., Reinke, P., Pratschke, J., Rudolph, B., Schmidt, D., Salama, Ar. & Schönemann, C. (2009). Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*, 87: 1505-13.
- Landsteiner, K., (1901). Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes [German]. *Wien Klin. Wochenschr* 14, 1132–1134.
- Lanzavecchia, A., Bernasconi, N., Traggiai, E., Ruprecht, C.R., Corti, D. & Sallusto, F. (2006). Understanding and making use of human memory B cells. *Immunol Rev*, 211, p. 303-9.
- Lee, PC. , Terasaki, PI., Takemoto, SK., Lee, PH., Hung, CJ., Chen, YL., Tsai, A., Lei, HY. (2002). All Chronic Rejection Failures of Kidney Transplants Were Preceded by the 160 Development of HLA Antibodies. *Transplantation*, 27;74(8):1192-4.
- Lefaucheur, C., Loupy, A., Hill, G.S., Andrade, J., Nochy, D., Antoine, C., Gautreau, C., Charron, D., Glotz, D. & Suberbielle-Boissel, C. (2010). Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 21(8), p. 1398-406.
- Lucia, M., Luque, S., Crespo, E., Melilli, E., Cruzado, J.M. & Martorell, J. (2015). Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int*, 88 (4), 874–887.
- Madden, DR. (1995). The three dimensional structure of peptide MHC complexes. *Ann Rev Immunol*, 13: 587-622.

- Maiga, R.I., Bonnaure, G., Rochette, J.T. & Néron, S. (2014). Human CD38<sup>hi</sup>CD138<sup>(+)</sup> plasma cells can be generated *in vitro* from CD40-activated switched-memory B lymphocytes. *J Immunol Res*, 2014, p. 635108.
- Mak, T.W. & Saunders, M.E. (2008). The Major Histocompatibility Complex. *Elsevier, Oxford, UK*, p101-113.
- McPherson, R.A., Pincus, M.R. & Henry, J.B. (2007). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. (Eds.), 21nd Edition. *Saunders Elsevier*, 750-790.
- Montgomery, R.A., Tatapudi, V.S., Leffell, M.S. & Zachary AA. (2018). HLA in transplantation. *Nature reviews Nephrology*, 14: 558-70.
- Morath, C., Becker, L.E., Leo, A., Beimler, J., Klein, K., Seckinger, J., Kihm, L.P., Schemmer, P., Macher Goeppinger, S., Wahrmann, M., Böhmig, G.A., Opelz, G., Süsal, C., Zeier, M. & Schwenger, V. (2012). ABO-incompatible Kidney Transplantation Enabled by NonAntigen-Specific Immunoabsorption. *Transplantation*, 27;93(8):827-34.
- Morris, A., Hewitt, C. & Young, S. (1994). The major histocompatibility complex: its genes and their roles in antigen presentation. *Mol Aspects Med*. 15: 377-503.
- Mosaad, Y.M. (2015). Clinical Role of Human Leukocyte in Health and Diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*, 82(4):283-306
- Mulder, A., Kardol, M.J., Kamp, J., Broek, C.U.H., Schreuder, G.M.T., Doxiadis, I.I.N. & Claas, F.H.J. (2001). Determination of the frequency of HLA antibody secreting B-lymphocytes in alloantigen sensitized individuals. *Clin Exp Immunol*, 124(1), p. 9-15.
- Mulder, A., Eijssink C., Kardol, M.J., Franke-van Dijk, M.E., van der Burg, S.H., Kester, M., Doxiadis, I. N. & Claas, F.H.J. (2003). Identification, isolation, and culture of HLA-A2-specific B lymphocytes using MHC class I tetramers. *J. Immunol*, 171 (12), 6599–6603.
- Murata, M., Warren, E.H. & Riddell, S.R. (2003). A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med*, 197: 1279– 89.
- Na, G.H., Kim, E.Y., Hong, T.H, You., Y.K. & Kim, D.G. (2015). Effects of Preoperative Positive Cross-Match and HLA Mismatching on Early Acute Cellular Rejection and Graft Survival in Living Donor Liver Transplantation. *Ann Transplant*, 20, p. 553-60.
- Nelson, P.W., Helling, T.S., Shield, C.F., Beck, M. & Bryan, C.F. (1992). Current Experience With Renal Transplantation Across the ABO Barrier. *Am J Surg*, 164(5):541-4.
- Nouel, A. (2014). B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int*, 85(3), p. 590-9.
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M. & Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*, 15(3), p. 160-71.

- Ojo, A.O., Morales, J.M., González-Molina, M., Steffick, D.E., Luan, F.L., Merion, R.M., Ojo, T., Moreso, F., Arias, M., Campistol, J.M., Hernandez, D. & Serón, D. (2013). Comparison of the long-term outcomes of kidney transplantation: USA versus Spain. *Nephrol Dial Transplant*, 28(1), p. 213-20.
- Olerup, O. & Zetterquist, H. (1992). HLA-DR typing by PCR amplifications with sequencespecific primers (PCR-SSP) in two hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*; 39:225-235.
- Opelz, G. (2005). Collaborative Transplant, Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet*, 365(9470), p. 1570-6.
- Ortmann, B., Androlewicz, MJ. & Cresswell, P. (1994). MHC class I/beta 2m associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*, 369: 864-867.
- Patel, R. & Terasaki, P.I. (1969) . Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 280(14), 735-9.
- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W.G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, RF, Jr, Marti, G.E., Rawstron, A.C., Van Zelm, M.C., Van Dongen, J.J., Johnsen, H.E., Klein, B. & Orfao, A. (2010). Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*, 78 Suppl 1, p. S47-60.
- Perry, D.K, Pollinger, H.S., Burns, J.M., Rea, D., Ramos, E., Platt, J.L., Gloor, J.M. & Stegall, M.D. (2008). Two novel assays of alloantibody-secreting cells demonstrating resistance to desensitization with IVIG and rATG. *Am J Transplant*, 8(1), p. 133-43.
- Piazza A, Poggi E, Ozzella G, Borrelli, L, Scornajenghi A, Iaria G, Tisone G, Adorno D (2006). Post-transplant donor-specific antibody production and graft outcome in kidney transplantation: results of sixteen-year monitoring by flow cytometry. *Clin Transpl*, p. 323-36.
- Picascia, A., Infante, T. & Napoli, C. (2012). Luminex and Antibody Detection in Kidney Transplantation. *Clin Exp Nephrol*. 16(3):373-81.
- Roberts, SC. (2009). Complexity and context of mhc-correlated mating preferences in wild populations. *Molecular ecology*, 18: 3121-3.
- Rojas, O.L., Greenberg, H.B., Narváez, C.F. & Angel, J. (2008). Characterization of rotavirus specific B cells and their relation with serological memory. *Virology*, 380(2), p. 234-42.
- Rousset, F., Peyrol, S., Garcia, E., Vezzio, N., Andujar, M., Grimaud, J.A. & Banchereau, J. (1995). Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *Int Immunol*, 7(8), p. 1243-53.
- Salvalaggio, P.R., Graff, R.J., Pinsky, B., Schnitzler, M.A., Takemoto, S.K., Burroughs, T.E., Santos, L.S. & Lentine, K.L. (2009). Crossmatch testing in kidney transplantation: patterns of practice and associations with rejection and graft survival. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 20(4), p. 577-89.



- Sayegh, MH. & Carpenter, CB. (2004). Transplantation 50 years later-progress, Challenges and promises. *N Engl J Med*, 351(26): 2761-2766.
- Shiina, T., Inoko, H. & Kulski, JK. (2004). An Update of the HLA Genomic Region, Locus Information and Disease Associations. *Tissue Antigens*, 64(6):631-49.
- Shrestha, BM. (2014). Immunology for Renal Transplantation: A Review. *J Transplant Technol Res*, 4: 130.
- Simpson, E. (1998). Minor transplantation antigens: animal models for human host- versus-graft, graft- versus- host, and graft- versus- leukemia reactions. *Transplantation*, 65: 611– 6.
- Somasundaran, M. & Quiroga, I. (2011). Principles in Transplantation: immunology. *Surgery*, 29:295-300.
- Stegall, M.D., Raghavaiah, S. & Gloor, J.M. (2010). The (re)emergence of B cells in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 15(4), p. 451-5.
- Susal, C., Roelen, D.L., Fischer, G., Campos, E.F., Gerbase-DeLima, M., Hönger, G., Schaub, S., Lachmann, N., Martorell, J. & Claas, F. (2013). Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens*, 82(2), p. 83-92.
- Tait, B.D., Susal, C., Gebel, H.M., Nickerson, P.W., Zachary, A.A., Claas, F.H., et al. (2013). Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*, 95 (1), 19–47.
- Tait, BD., Hudson, F., Cantwell, L., Brewin, G., Holdsworth, R., Bennett, G. & Jose, M. (2009). Luminex Technology for HLA Antibody Detection in Organ Transplantation. *Nephrology (Carlton)*, 14(2):247-54.
- Tinckam, K. (2009). Histocompatibility methods. *Transplantation reviews*, 23: 80-93.
- Triulzi, D.J., Kleinman, S., Kakaiya, R.M., Busch, M.P., Norris, P.J., Steele, W.R., Glynn, S.A., Hillyer, C.D., Carey, P., Gottschall, J.L., Murphy, E.L., Rios, J.A., Ness, P.M., Wright, D.J., Carrick, D. & Schreiber, G.B. (2009). The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion*, 49(9), p. 1825-35.
- Trowsdale, J. (2011). The mhc, disease and selection. *Immunology letters* 137: 1-8.
- Van den Elsen, P. J. (2011). Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. *Front Immuno*, 2: 48.
- Warrens, AN., Lombardi, G. & Lechler, RI. (1994). MHC and alloreactivity Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. Department of Immunology, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London. *Transplant Immunology*. 2:103-107.

- Wehmeier, C., Karahan, G.E., Krop, J., de Vaal, Y., Langerak-Langerak, J., Binet, I., et al. (2020). Donor-specific B cell memory in alloimmunized kidney transplant recipients: first clinical application of a novel method. *Transplantation*, 104 (5), 1026–1032.
- Woodle, ES., Alloway, RR., Buell, JF., Wesley, AJ., Munda, R., Roy-Chaudhury, P., Roy, FM., Cardi, M. & Trofe, J. (2005). Multivariate Analysis of Risk Factors for Acute Rejection in Early Corticosteroid Cessation Regimens Under Modern Immunosuppression. *Am J Transplant*. 5(11):2740-4.
- Zachary AA, Kopchaliiska D, Melancon K, Montgomery RA (2007a). HLA-specific B cells: II. Application to transplantation. *Transplantation*, 83(7): p. 989-94.
- Zachary, A.A, Lucas, D.P., Montgomery, R.A. & Leffell, M.S. (2013). Rituximab prevents an anamnestic response in patients with cryptic sensitization to HLA. *Transplantation*, 95(5), p. 701-4.
- Zachary, A.A., Kopchaliiska, D., Melancon, K. & Montgomery, R.A. (2007b). HLA-specific B cells: I. A method for their detection, quantification, and isolation using HLA tetramers. *Transplantation*, 83(7), p. 982-8.
- Zachary, A.A., Kopchaliiska, D., Montgomery, R.A. & Leffell, M.S. (2007). HLA-specific B cells: I. A method for their detection, quantification, and isolation using HLA tetramers. *Transplantation*, 83 (7), 982–988.
- Zielinski, M., Zielińska, H., Moszkowska, G., Dębska-Ślizień, A., Rutkowski, B. & Trzonkowski, P. (2013). Modified flow cytometry crossmatch detecting alloantibody-related cytotoxicity as a way to distinguish lytic antibodies from harmless in allosensitized kidney recipients. *Transplant Proc*, 45(1), p. 88-94.

## TEZDEN ÜRETİLMİŞ ESERLER

### A. Uluslararası Hakemli Makaleler

Hande Akalan , Duygu Yasar Sirin, Ipek Yılmaz, Pınar Ata, Veli Melih Kara, Nicel Tasdemir, Mesut Izzet Titiz, Türker Bilgen. 2022. Alloreactive memory B cell detection by flow cytometric cross match using polyclonally activated memory B cell culture supernatants. *Transplant Immunology*, 73 (2022) 101642.



