

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**KAN TRANSFÜZYONU YAPILMIŞ OLAN HASTALARDA VE
RENAL TRANSPLANTASYON GERÇEKLEŞTİRİLMİŞ OLAN
HASTALARDA ANTI-HLA ANTİKORLARININ TESPİTİ**

Gönül Zişan ÖNCEL

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İbrahim PİRİM**

**Yüksek lisans tezi
ERZURUM 2007**

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**KAN TRANSFÜZYONU YAPILMIŞ OLAN HASTALARDA VE RENAL
TRANSPLANTASYON GERÇEKLEŞTİRİLMİŞ OLAN HASTALARDA ANTI-
HLA ANTİKORLARININ TESPİTİ**

Gönül Zişan ÖNCEL

Tezin enstitüye verildiği tarih : 04/09/2007

Tezin sözlü savunma tarihi : 19/09/2007

Tez danışmanı : Prof. Dr. İbrahim PİRİM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet AYYILDIZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fatih AKÇAY

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bünyamin ÜNAL

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Adnan TEZEL

i. Pirim
Ayyıldız
Y. N. Şahin
F. Akçay
B. Ünal

Eylül 2007
ERZURUM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	II
TABLolar DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÖZET	VI
SUMMARY	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İnsan Lökosit Antijenleri(Human Leucocyte Antigens; HLA).....	2
2.1.1. HLA Class I Molekülleri.....	4
2.1.1.2. HLA Class I Moleküllerinin Antijen Sunumu.....	6
2.1.2. HLA Class II Molekülleri.....	8
2.1.2.1. HLA Class II Moleküllerinin Antijen Sunumu.....	10
2.1.3. HLA Class III Molekülleri.....	11
2.1.4. HLA Doku Tiplemesi.....	12
2.2. HLA-Hastalık İlişkisi.....	12
2.3. Anti-HLA Antikorları.....	14
2.4. Transplantasyonda HLA'nın Önemi.....	16
2.4.1. T Hücre Aktivasyonu.....	17
2.4.2. Graft HLA'nın Tanınması.....	18
2.4.3. HLA Uyumu.....	20
2.4.4. PRA (Panel Reaktif Antikorlar).....	20
3. MATERYAL VE METOD	22
3.1. Serum Örneklerinin Teresaki Plaklarında Haritalanması.....	22
3.2. Lenfosit İzolasyonu.....	24
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA	40
6. KAYNAKLAR	45

TEŞEKKÜR

Tezimin yürütülmesinde destek ve yardımlarını esirgemeyen danıŐmanım sayın Prof. Dr. İbrahim PİRİM'e, çalıŐmalarımı yürüttüğüm Göğüs Cerrahisi servisinden Doç. Dr. Atilla EroĐlu ve Genel Cerrahi servisinden Yrd. Doç. Bülent Aydınılı'nın ilgisine, labaratuvar çalıŐmalarımnda daima yanımda bulunan sevgili arkadaŐım Melek Öksüz'e, katkılarından dolayı Nilnur Eyerci ve Mehmet Ezer'e, tüm bu zor aŐamalarda yanımda olmasalar dahi manevi desteklerini daima yanımda hissettiğim sevgili aileme ve niŐanlım UĐur Şahin'e çok teşekkür ederim.

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. HLA lokuslarının genotipik ve serolojik olarak tanımlanabilen allel sayıları.....	12
Tablo 2. HLA antijeni ve ilişkili olduğu hastalıklar.....	13
Tablo 3. Geniş antikor oluşturma kapasitesine sahip antijenler ve antikorları.....	16
Tablo 4a. Lot 1 de kullanılan serumların ait olduğu hasta bilgileri.....	26
Tablo 4b. Lot 2 de kullanılan serumların ait oldukları hasta bilgileri.....	27
Tablo 4c. Lot 3 de kullanılan serumların ait oldukları hasta bilgileri.....	28
Tablo 4d. Lot 4 de kullanılan serumların ait oldukları hasta bilgileri.....	29
Tablo 5a. Lot 1 de yer alan plaklarda kullanılan HLA s1 belirlenmiş lenfositler ve rx verdiği serumlar.....	30
Tablo 5b. Lot 2 de yer alan plaklarda kullanılan HLA s1 belirlenmiş lenfositler ve rx verdiği serumlar.....	31
Tablo 5c. Lot 3 de yer alan plaklarda kullanılan HLA s1 belirlenmiş lenfositler ve rx verdiği serumlar.....	32
Tablo 5d. Lot 4 de yer alan plaklarda kullanılan HLA s1 belirlenmiş lenfositler ve rx verdiği serumlar.....	33
Tablo 6a . Lot 1 için toplam antijen dağılımı.....	34
Tablo 7a. Lot 1 de varlığı tespit edilen HLA antikorları ve istatistiksel değerleri...	35
Tablo 6b. Lot 2 için toplam antijen dağılımı.....	35
Tablo 7b. Lot 2 de varlığı tespit edilen HLA antikorları ve istatistiksel değerleri	36
Tablo 6c. :Lot 3 için toplam antijen dağılımı.....	36
Tablo 7c. Lot 3 de varlığı tespit edilen HLA antikorları ve istatistiksel değerleri...	37

Tablo 6d. Lot 4 için toplam antijen dağılımı.....	37
Tablo 7d. Lot 4 de varlığı tespit edilen HLA antikoru ve istatistiksel değerleri.....	38
Tablo 8. Anti-HLA-B27 serumunun HLA-B27 + Hastalar ile test edilmesi ile ortaya çıkan skorlar.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Kromozom 6'nın yapısı	3
Şekil 2. HLA Class I Antijeninin yapısı	6
Şekil 3. Antijenlerin HLA Class I yolu ile işlenmesi ve sunumu.....	7
Şekil 4. HLA Class II Antijeninin yapısı	9
Şekil 5. Antijenlerin HLA Class II yolu ile işlenmesi ve sunumu	11
Şekil 6. Teresaki plağına serumların yerleştirilmesi	23

**KAN TRANSFÜZYONU YAPILMIŞ OLAN HASTALARDA VE RENAL
TRANSPLANTASYON GERÇEKLEŞTİRİLMİŞ OLAN HASTALARDA ANTI-
HLA ANTİKORLARININ TESPİTİ**

Bu çalışma, en az 1 ünite kan transfüzyonu yapılmış olan hastalar ve renal transplantasyon gerçekleştirilmiş hastalarda anti-HLA antikörlerinin varlığını tespit etmek amacı ile yapılmıştır.

Kan örnekleri Atatürk Üniversitesi Göğüs Cerrahi, Genel Cerrahi ve Organ Nakli servislerinden 15.10.2005- 15.05.2006 tarihleri arasında toplanmıştır.

İlk kez kan transfüzyonu ve multipar gebeliklerde tespit edilen anti-HLA antikörleri daha sonra rejeksiyona uğramış organ nakillerinde, otoimmün hastalıklarda ve viral hastalıklarda da tespit edilmiştir. Ortalama 5 ünite kan transfüzyonu olan hastalarda gelişen bu antikörler kişinin immün sistemine bağlı olarak 1 ünite kan transfüzyonu sonucunda da oluşabilmektedir. Organ nakillerinde ise bu antikörlerin oluşumu alıcı ve verici arasındaki HLA doku uyumuna göre değişmektedir. HLA uyumsuzluk sayısındaki artış, alıcının vericideki HLA antijenlerine karşı oluşturacağı antikör sayısını ve buna bağlı olarak rejeksiyon riskini de arttırmış olacaktır.

Çalışmamıza, en az 1 ünite kan transfüzyonu yapılmış olan 105 hasta ve 12 renal transplantasyon gerçekleştirilmiş olan hasta dahil edildi. Lenfositotoksitite yöntemi ile yapılan çalışma sonucunda kan transfüzyonu yapılmış olan grupta toplanan serumlardan 3 tanesi non-spesifik olarak kullanılan HLA antijenleri ile % 100 reaksiyon verirken 1 serum HLA-A1, 1 serum HLA-A2, 1 serum HLA-A3, 3 serum HLA-A29, 1 serum HLA-A35, 1 serum HLA-A68, 3 serum HLA-B7, 3 serum HLA-B8, 1 serum HLA-B27, 1 serum HLA-B49, 1 serum HLA-B51, 1 serum HLA-B62 ile reaksiyon verdi.

Renal transplantasyon hastalarına ait serumlardan bir tanesi HLA-B63, HLA-A2, HLA-A30, HLA-A68 ile reaksiyon verdi.

Çalışmamızın sonucu, kan transfüzyonu, multipar gebelikler ve renal transplantasyonun anti-HLA antikorlarının oluşumu için önemli rol oynadığını gösterdi.

Anahtar kelimeler: Anti-HLA antikorları, kan transfüzyonu, renal transplantasyon.

THE DETERMINATION of ANTI-HLA ANTIBODIES in PATIENTS that WENT through BLOOD TRANSFUSION and RENAL TRANSPLANTATION

This study is performed for the determination of anti-HLA antibodies in the patients who went through at least 1 unit of blood transfusion and renal transplantation.

The blood samples were collected from Ataturk University Thoracic Surgery, General Surgery and Transplantation departments during 15/10/2005-15/05/2006.

The anti-HLA antibodies that were first determined in blood transfusion and multipart pregnancies and also later were determined in organ transplantations which have been rejected, in autoimmune diseases and viral diseases. These antibodies that are formed in patients, who receive 5 units of blood transfusion, can be also formed in patients who receive 1 unit of blood transfusion due to patient's immunity system. But in the organ transplantations, formation of these antibodies changes up to the HLA tissue adaptation of the donor and the receiver. The increase in the number of mismatch will also increase the number of the receiver's antibodies against donor's antigens and due to this, will increase the risk of rejection.

105 patients who at least received 1 unit of blood transfusion and 12 patients with renal transplantation were included in our study. As a result of our study which was accomplished with lymphocytotoxicity method, 3 serum which were taken from the patients who received blood transfusion, non-specifically gave reaction with the HLA antibodies of all routine patients lymphocytes 100%, while 1 serum HLA-A1, 1 serum HLA-A2, 1 serum HLA-A3, 3 serum HLA-A29, 1 serum HLA-A35, 1 serum HLA-A68, 3 serum HLA-B7, 3 serum HLA-B8, 1 serum HLA-B27, 1 serum HLA-B49, 1 serum HLA-B51, 1 serum HLA-B62 gave reaction.

1 serum of renal transplantation patients gave specific reaction with HLA-B63, HLA-A2, HLA-A30, HLA-A68 antigen.

At the end of our study, it has been showed that, as a result of blood transfusion, multipart pregnancies and renal transplantation HLA discordance, HLA antibodies can be formed.

Keywords: Anti-HLA antibodies, blood transfusion, renal transplantation.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

HLA spesifik antikorlarının kan transfüzyonunda, gebelikte ve organ transplantasyonu sonucunda oluştuğu bilinmektedir. Bu antikorlar poliklonal olup aynı molekülün farklı epitoplarına karşı oluşmuş olan antikorları içerebilirler. Bu antikora anti-HLA antikorları ve tespit etmek için yapılan testlere de anti-HLA antikor tarama testleri adı verilmektedir.

Çalışmamızda en az bir ünite kan transfüzyonu yapılmış olan kişilerden ve renal transplantasyon gerçekleştirilmiş olan kişilerden aldığımız serum örneklerinde anti-HLA antikorlarının varlığını tespit etmeyi amaçladık. Metodumuz, kan transfüzyonu yapılmış kişilerin serumlarının 3 set olacak şekilde ve renal transplantasyon gerçekleştirilmiş olan kişilerin transplantasyon öncesi (PreTx) serumu ve transplantasyon sonrası (Post Tx) 1., 7., 14., 28. gün, 3., 6. ay ve 1.yıl serumlarının 1 set olacak şekilde teresaki plaklarına dökülüp, rutin HLA analizleri için Tıbbi Biyoloji laboratuvarına gelen hastalardan izole edilmiş lenfositlerin plaklara eklenmesi ile oluşacak antijen antikor reaksiyonunu kompleman eşliğinde lenfositotoksitite yöntemi ile belirlemektir. Anti-HLA antikorları mevcut olan serumların, eğer spesifik ise hangi HLA antijenlerine karşı oluştuğunu bulmak, eğer spesifik değilse genel olarak HLA antijenleri ile reaksiyonunun varlığını tespit etmektir. Spesifik olduğu istatistiksel olarak doğrulanan anti-HLA antikorları, spesifik olduğu antijenini içeren önceden doku tiplendirilmesi yapılmış hastaların lenfositleriyle test edildi.

Çalışmamız sonucunda elde edilen non-spesifik ve spesifik anti-HLA antikorları laboratuvarımızda çeşitli testlerde kullanılarak hastanemize de maddi destek sağlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNSAN LÖKOSİT ANTİJENLERİ (Human leucocyte antigens; HLA)

İmmünolojik ve non-immünolojik fonksiyonu olan bir dizi genden oluşan MHC gen bölgesi ilk kez farelerdeki transplantasyon çalışmaları ile Peter Gorer tarafından 1937 yılında ortaya çıkarılmıştır¹⁻⁴. Bu genlerin ürünleri olan moleküller, 1958 yılında Jean Dausset tarafından tanımlanmış, aynı yıl Van Rood kan transfüzyonu yapılmış kişilerin ve çok doğum yapmış kadınların serumlarında lökositlere karşı oluşmuş antikorların varlığını göstermişlerdir^{1,4-7}. İlk doku antijenleri lökositlerde saptandığı için insan lökosit antijenleri (Human Leucocyte Antigens: HLA) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki yıllarda eritrositlerin dışında bütün vücut hücrelerinde buldukları ve çok önemli oldukları anlaşılacak, bu grup antijen sistemi Major Histocompatibility Complex (MHC) molekülleri veya MHC antijenleri olarak adı verilmiştir^{8,9}. MHC genel bir isimdir ve her bir türün ayrı bir MHC simgesi vardır.

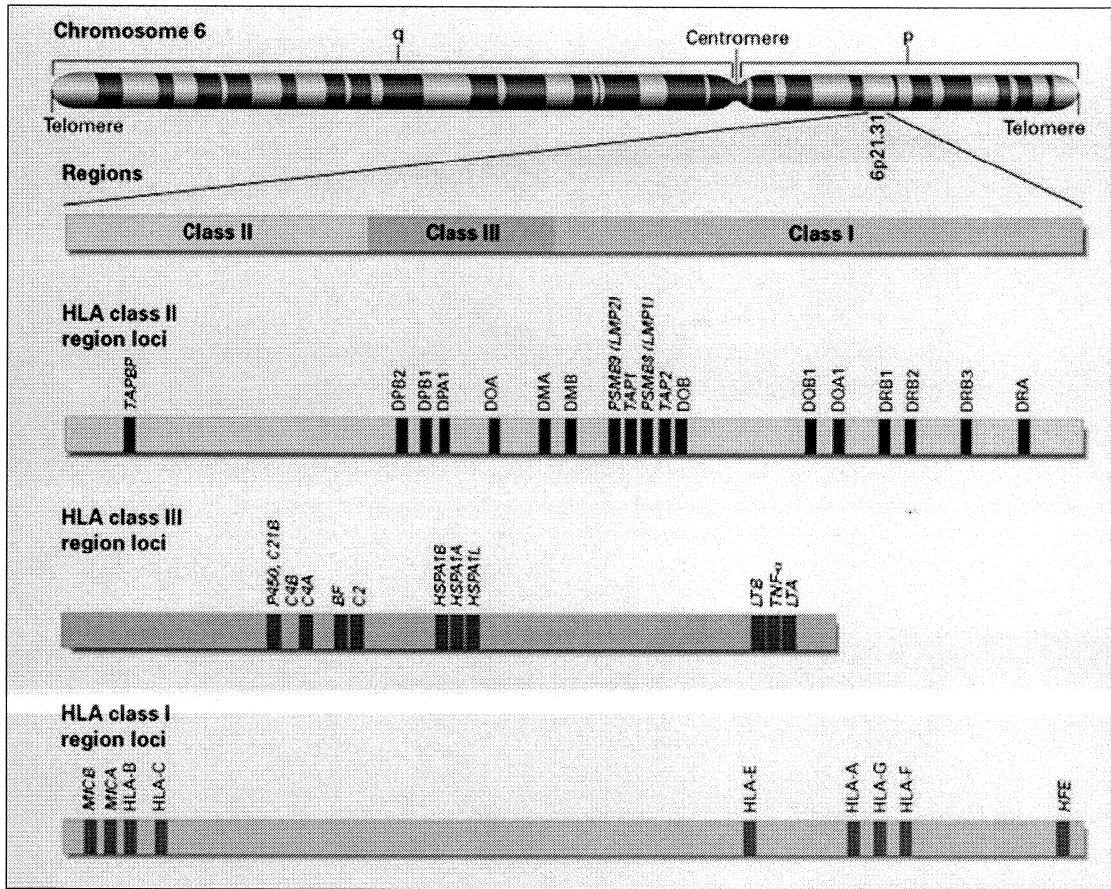
İnsanlardaki MHC gen bölgesinden kodlanan moleküller HLA (human leucocyte antigen) olarak isimlendirilmiştir. HLA antijenlerinin oluşumundan sorumlu genler 6. kromozomun kısa kolu üzerinde sentromere yakın bir bölgede (6p21.31) yerleşmiş olup, yaklaşık olarak 4Mbp'lik bir yer kaplar^{1,6-15}.

HLA ile ilgili ilk sınıflandırmayı, Jan Klein 1977 yılında Class I, II, III şeklinde yapmıştır¹. Günümüzde HLA Class III'e ait olan bölgenin telomerik ucundaki 0.3 Mbp'lik kısmın Class IV bölgesi olarak isimlendirilmesi önerilmektedir¹⁴.

Tüm Class I bölgesi 3-6 kb uzunluğunda olup, bu lokusta klasik antijenleri kodlayan HLA-A, -B, -C genleri bulunur. Bu bölge oldukça polimorfiktir. Klasik antijenleri kodlayan genler dışındaki Class I bölgesindeki diğer genler; HLA-E, -F, -G, -H, -J, -K, -L olup, bunlar arasından sadece HLA-E, -F, -G eksprese

olmaktadır^{1,6,8,9,12,17,18,19}. Class II genleri ise 4-11 kb uzunluğundadır. Class II bölgesinde klasik antijenleri kodlayan HLA-DP, -DQ, -DR genlerinin yanı sıra HLA-DM, -DN, -DO, TAP1, TAP2, LMP2 ve LMP7 gibi gen bölgeleri de bulunmaktadır^{6,7,9,12,20}.

Class III bölgesinin ise gen yoğunluğu oldukça fazladır. Ancak bunların bir kısmı immün sistem ile ilişkili değildir. Bu gen bölgesi kompleman faktörleri (C2, C4a, C4b, Tümör nekroz faktör (TNF α ve β), Properdin faktör) ve ısı şoku proteinleri gibi immünolojik reaksiyonlarla ilişkili proteinleri kodlar^{8,9,11,16,17}.



Şekil 1. Kromozom 6'nın yapısı⁷.

Tüm HLA genleri kodominant olarak kalıtılır^{1,6-11}. Böylece herhangi bir HLA lokusundaki her iki allel de eksprese edilir. Örneğin A lokusu için 24 farklı allellik gen vardır. Bir birey bu genlerden bir tanesini annesinden diğerini babasından almak suretiyle HLA-A alleli için heterozigot veya homozigot olmasına göre 1 veya 2 HLA-A hücre yüzey antijenine sahiptir. Benzer olarak hücreler, hücre yüzeyi üzerinde 1 veya 2 B, C, DR, DQ, DP antijenlerine sahiptir. Basit Mendel kalıtımına göre iki kardeşle 2 haplotipin birden aynı olma şansı %25, bir haplotipin ortak olma şansı %50, tamamen farklı haplotip olma şansı %25'dir. HLA'da çok sayıda gen bölgeleri olduğuna göre normal bir popülasyonda çok sayıda farklı haplotipler olacaktır^{6,11}.

2.1.1. HLA Class I molekülleri

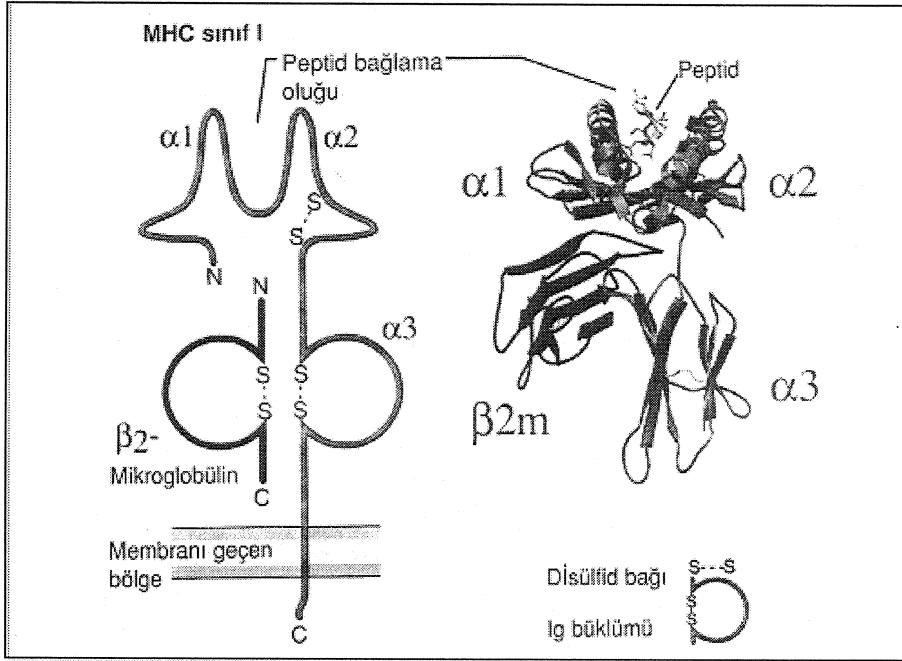
Tüm çekirdekli hücrelerin membranında taşınan transmembranik proteinler olup, CD8 sitotoksik T lenfositleri (CTL) ile köprü oluşturarak MHC sınırlı immün yanıtın ortaya çıkmasını sağlar. Class I molekülünün tüm bireylerde ortak olan, 6. kromozom üzerindeki MHC bölgesi tarafından kodlanan bir ağır zinciri (alfa; α) ve bu zincire non-kovalan olarak bağlı 15. kromozomdan kodlanan bir hafif zinciri (beta; β) vardır^{6-12,21}. α zinciri kodlayan Class I genleri HLA-A, B, C, E, F ve G işlevsel HLA izoformlarını oluşturur. Bunlardan ilk üçü klasik Class I antijenlerini sentezletirir. HLA-E natural killer (NK) hücreleri ile ilişkili immün yanıtta görev yapmaktadır^{9,22,23}. HLA-G maternal fetus toleransında rol oynar^{24,25}. HLA-H, J, K ve L diye adlandırılan ve henüz immünolojik özelliği olmadığı düşünülen yalancı genler bulunmaktadır^{19,26}. Tüm bireylerde 6. kromozomda HLA-A dan G ye kadar tüm genler eksprese edilir. Klasik Class I genlerine ilaveten HLA-B'nin sentromerine lokalize olmuş MICA ve MICB diye adlandırılan, HLA Class I zincir ilişkili genler yer almaktadır. Bu bölge oldukça polimorfik olup, bu genler tarafından kodlanan proteinler ne peptidlere ne de

β_2 -mikroglobulin zincirine bağlanır. MIC proteinleri, NK hücrelerinin NKG2D reseptörüne bağlanarak fonksiyonunu düzenler^{9,11,17,27}.

α zinciri, hücre membranına gömülü COOH ve hücre dışında kalan NH₂ ucuna sahiptir. α zinciri hücre dışında α_1 , α_2 ve α_3 olmak üzere 3 bölüme (domain) ayrılır^{1,2,5-11,15,17}. Domainleri oluşturan aminoasit (aa) dizilimindeki farklılıklar molekülün polimorfizmini oluşturur. Molekülün α_3 ve β_2 bölgeleri ise polimorfizm göstermez.

Class I molekülünün peptid bağlama özelliği α_1 ve α_2 bölgelerinde bulunur. Bu bölgelerin kıvrım yapıları 2 domain arasında küçük bir kovuk oluşturacak şekildedir ve buraya en fazla 10-20 aa uzunluğundaki bir peptid yerleştirilebilir. Peptid buraya non-kovalent olarak bağlıdır. Ancak bu bağlanma antikör molekülünün peptid bağlayan bölgesine uymayan veya uygun büyüklükte olmayan peptidlere karşı immün cevap oluşturmaz. Peptidlere karşı verilecek immün cevap için antijenler, antijen sunucu hücreler (APC) tarafından CTL'ne Class I molekülleri ile sunulur.

HLA Class I moleküllerinin esas görevi, hücre içerisindeki peptidleri hücre yüzeyine taşımaktır. Burada amaçlanan; örneğin bir viral enfeksiyon sırasında sentezlenen viral peptidlerin hücre yüzeyine taşınmasını ve böylece bireye ait olmayan bu moleküllerin CTL'leri tarafından tanınmasını sağlayarak enfekte hücrelerin öldürülmesine giden süreci başlatmaktır.

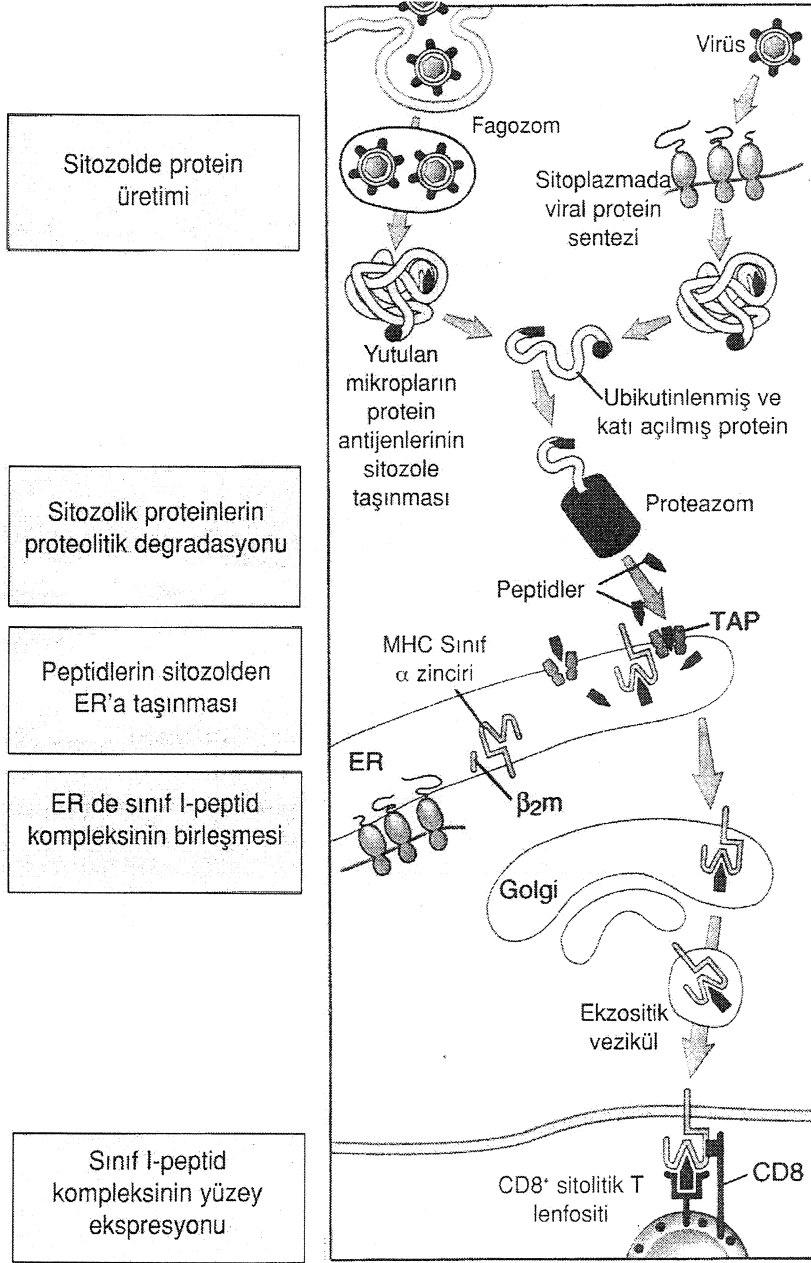


Şekil 2. HLA class I moleküllerinin yapısı¹⁵.

2.1.1.1. HLA Class I moleküllerinin antijen sunumu

Enfekte yaşayan virüslerden, fagosite edilen mikropların fagositik vezikülleri parçalayıp sitozole kaçmasından, mutasyona uğramış konak genlerden kaynaklanan hücre sitoplazmasındaki antijenler veya hücrenin kullanılamaz hale gelen kendi proteinleri HLA Class I molekülleri ile sunulur^{5,15,28}. Bunun için öncelikle bu proteinler proteoliz ile parçalanmaya yönlendirilir. Protein katlanmaları açılır ubiquitin ile işaretlenerek proteazom denilen proteaz enzimleri ile yıkılacakları organelere gönderilir^{14,27,29}. Burada proteinler Class I moleküllerine bağlanabilecek büyüklükte ve özellikle parçalanırlar. ER (Endoplazmik Retikulum) da sentezlenen HLA Class I molekülleri ile sitoplazmada parçalanmış olarak bulunan peptidlerin bağlanmasını transport associated protein (TAP; TAPI, TAPII) denen özelleşmiş bir protein tarafından sağlanır. TAP aktif transport ile peptidleri ER içine pompalar^{5,15,28,30}. Yeni

sentezlenen class I molekülleri TAP moleküllerinin iç yüzüne tutunur^{31,32}. Eğer class I molekülüne bağlanabileceği bir peptid bulursa dayanıklılık kazanır ve hücre yüzeyine taşınır. Ancak uygun peptid bulamaz ise dayanıksızdır ve proteazlar tarafından yıkılır.



Şekil 3. Antijenlerin HLA class I yoluyla işlenmesi¹⁵

2.1.2. HLA Class II molekülleri

Bu moleküller sadece bazı hücrelerin örneğin monosit, aktive T lenfositleri ve B lenfositleri ile Langerhans ve Dentritik hücrelerin yüzeylerinde bulunmaktadır⁶⁻¹². Class II antijen ve genlerinin hepsinde ortak olan D harfinin bulunmasının nedeni, Class I antijenlerinin tanımlandığı yöntemden daha sonra farklı bir yöntem ile tanımlanmış olmasından kaynaklanır. HLA Class II genleri; DR, DQ ve DP genleri olup, bu gen ürünü olan HLA molekülleri birbirine non-kovalan olarak bağlanmış yaklaşık 34 kDa büyüklüğünde bir α ve 28 kDa büyüklüğünde bir β zincirinden oluşur. α ve β zincirleri dört domain içerir. Her iki zincirin amino ucu, $\alpha 1$ ve $\beta 1$ alt birimleri, polimorfik noktalar içerir ve 10-30 aa uzunluğundaki peptidlerin yerleşebileceği bir peptid bağlama domaini oluşturur^{1,5,8-12}. α ve β zincirleri, DRA ve DRB, DQA ve DQB, DPA ve DPB şeklinde, bir çift olarak saptanmıştır^{20,33}. Bunun yanı sıra DQ ve DP bölgeleri pseudogen çiftleri içerir³⁴.

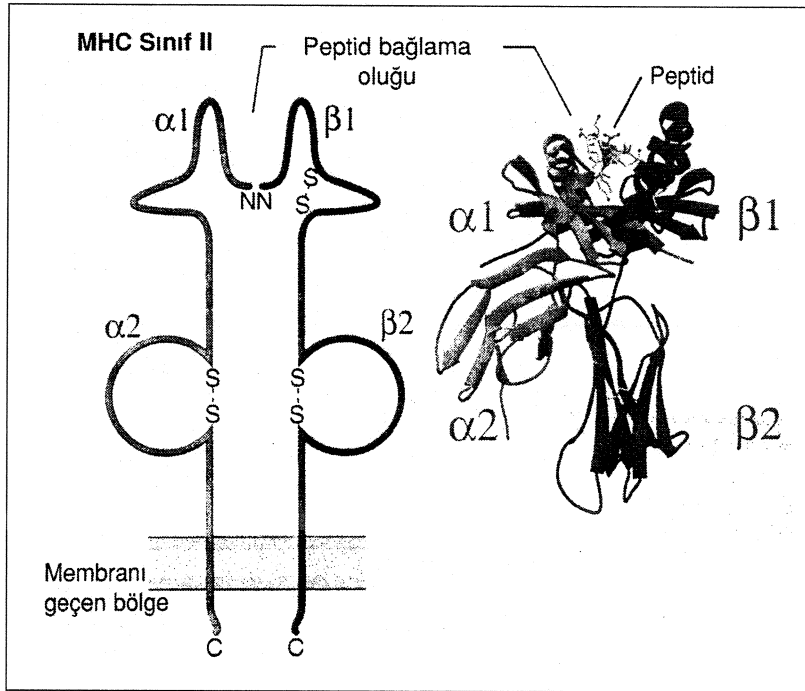
Çok az polimorfizm gösteren DMA/DMB ve DOA/DOB genleri non-klasik Class II moleküllerini kodlar^{9,35,36}. Hücrelere fagositoz ile alınan ve lizozomlarda peptidlere parçalanan proteinler HLA-DM molekülünün yardımı ile Class II molekülüne bağlanır³⁷.

HLA Class II bölgesi içerisinde, HLA Class I yolu ile antijen işlenmesinde görev alan, ATP bağlama kaskadı ailesinin üyesi olan transport associated proteinlerini (TAP1 ve TAP2) kodlayan bir gen grubu vardır^{11,30,38}. Bu proteinler ER'de peptidlerin sitoplazmadan lümene doğru geçmesini sağlayan bir kompleks oluşturur^{31,32}. Yapılan son çalışmalar TAP proteinleri ile HLA Class I molekülleri arasındaki sıkı ilişkiyi ortaya koymaktadır. TAP proteinlerindeki bir eksiklik hücre yüzeyindeki HLA Class I

moleküllerinin ekspresyonunda azalmaya ve bu hücrenin CTL'ne antijen sunma yeteneğini kaybetmesine neden olmaktadır^{39, 40}.

HLA Class II bölgesi içerisinde, TAP genlerine çok yakın lokalize olmuş LMP2 ve LMP7 genleri, proteozom kompleksinin komponentlerini kodlar¹². Bu kompleksin 7 farklı β alt ünitesi halka benzeri bir yapı oluşturur. Alt ünitelerin amino ucundaki 3 treonin bunların aktif bölgesini oluşturur. Class I molekülüne peptid bağlanması ile bunların proteolitik aktivitesi değişmektedir^{41,42}.

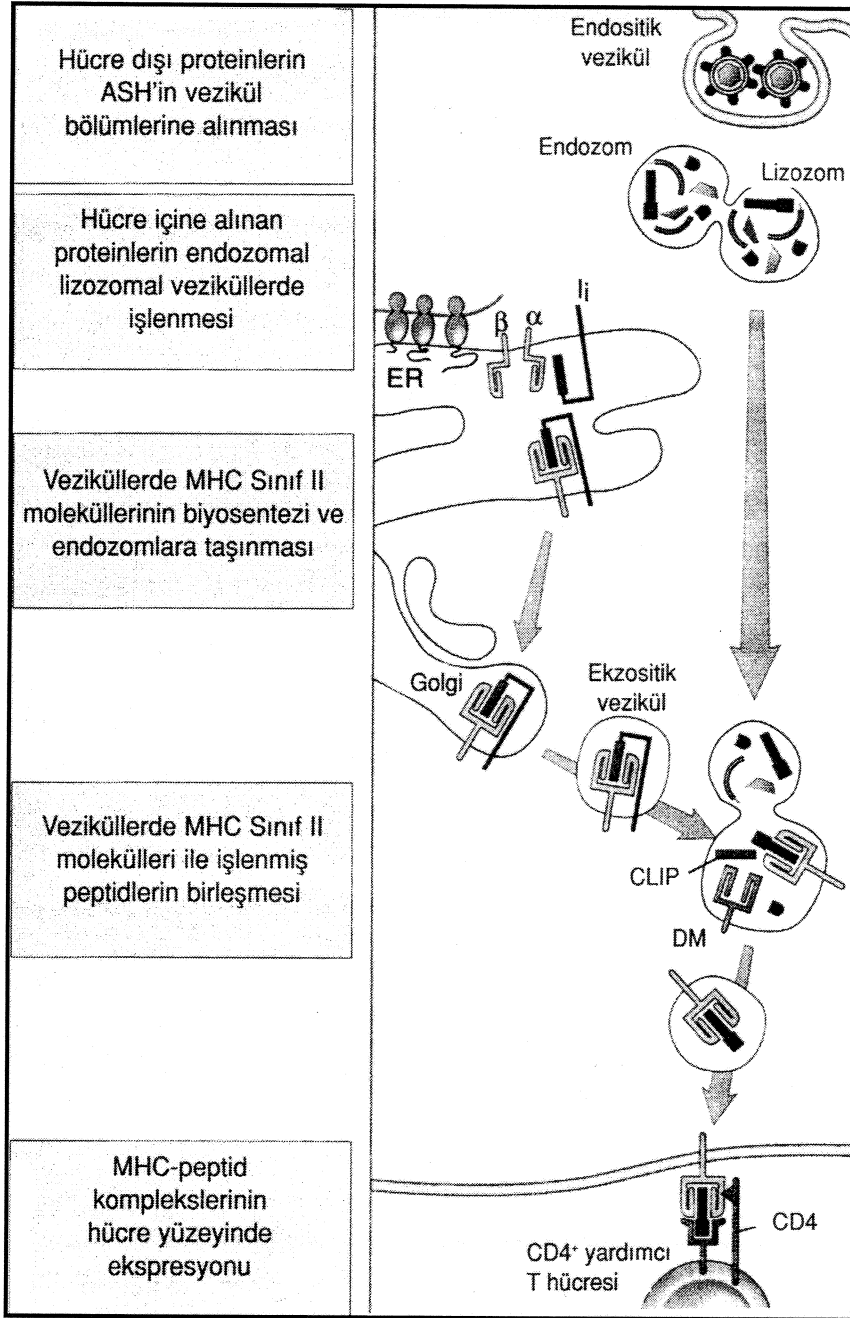
Class I ve II moleküllerinin yapısal farklılıkları, bağlayacakları peptidin özelliklerini ve bağlanma gücünü farklılaştırmaktadır. Class I'in daha kıvrımlı ve uçları kapalı yapısı Class II ye oranla daha küçük peptidleri bağlamasını sağlar. Class II daha açık ve daha düz yapısı ile büyük peptidleri bağlamasını sağlar.



Şekil 4. HLA class II moleküllerinin yapısı¹⁵

2.1.2.1. HLA Class II moleküllerinin antijen sunumu

Herhangi bir yol ile APC'lere alınan protein antijenleri endozom ve fagozomlara gelir. Proteinler bu veziküllerde proteolitik enzimlerle kesilerek farklı uzunluk ve dizide peptidler oluşturulur. APC'ler, ER' de Class II molekülü sentezler. Yeni sentezlenen HLA Class II molekülü kendisiyle birlikte peptid bağlama kovuğuna sıkıca bağlanan bir dizi (CLIP; class II associated invariant-chain peptide) taşırlar. Yani yeni sentezlenen class II moleküllerinin peptid bağlama kovuğu doludur. Bu peptid bağlama kovuğu dolu olan HLA Class II molekülü bir eksositik vezikül ile hücre yüzeyine taşınmaya başlar^{15,28,29}. Eksositik vezikül, hücre dışı proteinin hücre içine alındığı bir endosomal vezikül ile birleşir. Bu endosomal vezikül içerisinde class II molekülü benzeri olan ve görevi CLIP i uzaklaştırmak olan DM molekülünü içerir. DM'nin CLIP'i uzaklaştırması ile class II molekülünün peptid bağlama kovuğu boşalır ve peptid bağlayabilecek duruma gelir^{15,27,43}. Eğer peptidler arasında Class II molekülünün bağlayabileceği bir peptid varsa ve bağlanırsa bu kompleks dayanıklı hale gelir ve hücre yüzeyine iletilir. Ancak class II molekülü bağlayabilecek bir peptid bulamazsa bu boş molekül dayanıksızdır ve endosomdaki proteazlarca yıkılır.



Şekil 5. Antijenlerin HLA class II yoluyla işlenmesi¹⁵

2.1.3. HLA Class III molekülleri

6. kromozom üzerinde, HLA class I ve class II bölgelerini birbirinden ayıran ve en az 70 gen içerdiği düşünülen class III genleri yer almaktadır. Class III genleri properdin

faktör B (BF), C2, C4A ve C4B komplement bileşenlerinin yanı sıra ısı şok proteinleri ailesi üyelerinden bazılarını ve TNF kodlamaktadır^{7,12}.

2.1.4. HLA doku tiplemesi

HLA tiplendirilmesi; transplantasyondan önce, babalık tayininde, HLA-hastalık ilişkisinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Tiplendirme için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar;

- Serolojik testler (mikrolenfositotoksitite yöntemi)
- Hücresel testler (MLC; karışık lenfosit kültürü)
- Genomik testler (RFLP, PCR dayalı yöntemler; PCR-SSP, PCR-SSCP, PCR-SSO vs)^{6,11}

Tablo 1’de genomik testler ile elde edilen HLA lokuslarının allel sayısı ve serolojik yöntem ile elde edilen allel sayısı gösterilmiştir.

Tablo 1. HLA lokuslarının genotipik ve serolojik olarak tanımlanabilen allel sayıları

Lokus	Genotipik Allel sayısı	Serolojik Allel sayısı
HLA-A	303	24
HLA-B	559	55
HLA-C	150	9
HLA-DR	362	17

2.2. HLA –HASTALIK İLİŞKİSİ

HLA; hücrelerin birbirlerini tanımada, immün cevap oluşumunda antijenik peptidlerin lenfositlere sunulmasını sağlamakla birlikte birçok hastalık ile rölatif ilişki içerisindedir. Belirli bir HLA alleline sahip olan bireylerin, bu allele sahip olmayan

bireylere göre bazı hastalıklara yatkın oldukları belirlenmiştir. Bunlar, otoimmün hastalıklar, viral hastalıklar, kompleman sistemi bozuklukları, bazı nörolojik hastalıklar ve alerjik hastalıklardır⁶. Bu hastalıkların ortak birkaç özelliği vardır. Bunların oluşum mekanizmaları bilinmez, herediter dağılım paternine sahip olup penetrans gösterdiklerinden ötürü belirli bir HLA antijeni ile mutlak bir beraberlik göstermez, immün sistem hastalıkları birlikteliği vardır, üreme üzerinde çok az etkinliği vardır veya hiç yoktur⁷. Bu gibi hastalıklarda HLA dışında çevresel faktörlerin ve bazı genlerinde rol oynadığı göz önüne alınır ise kesin olarak HLA ile ilişkili olduğunu söylemek doğru değildir^{11,44}. Ayrıca bu hastalıklar ve ilişkili olduğu düşünülen HLA antijenleri bireylerin etnik kökenlerine göre de bazı farklılıklar göstermektedir. HLA antijenleri ve ilişkili olduğu hastalıklar Tablo2’de verilmiştir.

Tablo 2. HLA antijeni ve ilişkili olduğu hastalıklar

Hastalık	HLA antijeni
Myastenia gravis	B8/DR3
Ankilozan Spondilit	B27
Behçet hastalığı	B51
SLE	B8/DR3
Çölyak hastalığı	DRB1*03
Romatoid artrit	DR4
Juvenil romatoid artrit	DR4
İnsüline bağımlı DM	DQ3/DR4
Multiple skleroz	DR15

HLA ile hastalık ilişkisi ile ilgili bazı hipotezler ortaya atılmıştır. Bazı HLA molekülleri, virüsler ve toksinler gibi etiolojik ajanlar için reseptör görevi görürler. Bir başka hipoteze göre, belirli HLA moleküllerinin antijen bağlama bölgeleri hastalığa neden olan antijenik peptidi bağlayabilir. Hastalık ajanları hastalıkla ilişkili HLA antijenine immünolojik olarak benzerlik gösterebilir. Bu durumda ya hastalık ajanı vücudun kendi molekülü gibi algılanarak hiçbir immün yanıt oluşturulmaz ya da yabancı olarak tanınan ajana karşı oluşturulan kuvvetli immün yanıt kişinin kendi HLA molekülüne de yöneltilerek otoimmün hastalığın oluşmasını sağlar^{7,9,45}.

HLA molekülleri ile hastalık arasındaki en iyi bilinen ilişki HLA-B27 ile omurga sakroiliak eklemin kronik bir hastalığı olan ankilozan spondilit arasındaki kuvvetli ilişkidir. Ankilozan spondilit hastalığı olanların %95'inden fazlasında HLA-B27 pozitif olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, ankilozan spondilit gelişiminin rölatif olarak riski HLA-B27 olanlardan, HLA-B27 olmayanlara nazaran en az 150 kat artmıştır⁴⁶.

2.3. ANTI-HLA ANTİKORLARI

İlk kez 1958'de Dausset tarafından tanımlanan ve 1965' de Teresaki ve ark. yaptığı böbrek naklinin başarısızlıkla sonuçlanması ile HLA antikorlarının önemi ortaya çıkmıştır⁴⁷. HLA antikorları multipar gebeliklerde, rejeksiyon ile sonuçlanmış transplantasyonda, kan transfüzyonu, viral ve otoimmün hastalıklarda tespit edilmiştir⁴⁸⁻⁵⁰. Antikorum sınıfı, aviditesi ve afinitesi, konağın immün durumu, immün savunmadaki hücre sunumunun tipine ve immünizasyonun gidiş yönüne göre farklılık gösterir⁹.

Multipar gebe kadıların %15-20 de tanımlanan HLA antikorları IgG sınıfında, yüksek titrede ve afiniteye sahiptir⁹. Bu antikorları oluşum sebebi fetusun immünojenik olmasıdır. Gebeliğin 12. haftasında fetal HLA Class II antijenleri belirir. Bu antikorlar plasentadan geçebilmelerine karşın fetusa zarar vermez. Çünkü fetal paternal antijenlere

karşı otolog T hücre cevabını düzenleyen maternal T süpressör hücre etkinliği ortaya çıkar ve böylece fetusa karşı gelebilecek humoral ve hücrel tepkiler baskılanabilir^{5,51-55}. Bu antikorların ömrü 20 yıl olabildiği gibi 2 hafta içerisinde de kaybolabilmektedirler.

Organ nakillerinde ise; rejekte olan graft sonrasında, özellikle graft erken rejekte olmuş ve çıkarılmışsa birçok hastada antikor gelişir^{56,57,58}. Transplantasyondan sonra oluşan antikorların titresi donör ve alıcı arasındaki HLA uyumsuzluğunun derecesine bağlıdır. Bu antikorların çoğu IgG sınıfından olup IgM yapısında olanlar da vardır⁹.

Kan transfüzyonu sonucunda da HLA antikorları oluşabilmektedir. Oluşan bu antikorlar IgM ve IgG sınıfındandır⁹. Yüksek titre de olabilmesi için eğer herhangi bir gebelik söz konusu değilse 5 ünite kan transfüzyonu gerekmektedir^{57,59}. Tam kan transfüzyonu ile HLA ilişkili bazı komplikasyonlar gelişmektedir. Non-hemolitik febril transfüzyon reaksiyonlar (NHFTR), Transfüzyon ilişkili akciğer yaralanması (TRAIL) ve Graft-versus-host hastalığı (GVHD) bunlardan en önemlileridir. GVHD, immün süpresif hastalara, kemik iliği nakli veya kan transfüzyonu gibi allojenik lenfositlerin verilmesinden 4 ile 60 gün sonra, konakçıya karşı reaksiyon başlar^{10,59,60}. Aktive CTL'leri, yabancı antijenleri eksprese eden konak doku ve organlarına hasar verir. Bazen ikizler arasında yapılan nakillerde dahi görülebilir ki burada mhc'nin etkinliğinden söz edilmektedir.

HLA antikorlarının oluşumu sadece karşılaşılan antijenlere karşı olmayabilir. Karşılaşılan antijenin cross reaktif gruplarına göre de olabilir^{61,62}. Tablo 3'de geniş antikor oluşturma kapasitesine sahip antijenler ve oluşturduğu antikorlar gösterilmiştir.

Tablo 3. Geniş antikor oluşturma kapasitesine sahip antijenler ve antikorları

Genel (public) epitop	Oluşturduğu antikor
A1	A1, 3, 9, 10, 11, 19, 36, 43
A2	A2, 28
A28	A28, 26, 30, 31, 33
B5	B5, 35, 18, 53, 15, 70, 17, 21
B7	B7, 22, 27, 42, 40, 13, 47, 21
B8	B78, 14, 18, 16, 51, 59, 67
B12	B12, 21, 13, 40, 41, 37, 47

2.4. TRANSPLANTASYONDA HLA' NİN ÖNEMİ

Transplantasyon; donör (verici) tarafından verilen sağlıklı doku veya organın (graft) recipient' in (alıcı) hasarlı veya çalışmayan organının yerine koymak amacıyla nakledilmesidir. Donör yaşayan bir kişi veya kadavra olabilir. Transplantasyon donör ve alıcının türüne göre 4 grupta toplanır. **Otograft;** Bir dokunun kişinin bir bölgesinden alınıp farklı bir bölgesine nakledilmesi işlemidir. **Allograft (Allojenik);** Aynı türe ait canlılar arasında gerçekleştirilen doku ve organ nakilleridir. Nakledilen dokuda yabancı olarak tanınan moleküllere alloantijen denir. **İzograft (Sinjenik);** Genetik olarak aynı olan bireyler arasında yapılan nakillerdir. **Ksenograft (Ksenojenik);** Farklı türler arasında yapılan doku ve organ nakilleridir^{5,12,15}.

Bugün organ nakillerinin önündeki en büyük engel HLA olarak görülmektedir. Normalde kendi HLA moleküllerine bağlı yabancı antijeni tanıyan T hücre reseptörleri, yabancı HLA moleküllerini, bağlı antijen olmaksızın tanıyabilmektedir.

2.4.1. T Hücre Aktivasyonu

Vücuda giren peptid antijenlerinin ortadan kaldırılması için T lenfositlerinin aktivasyonu gerekmektedir. Bunun için T lenfositlerinde APC deki ligandlarını tanıyan birden fazla reseptöre ihtiyaç vardır. T lenfositlerinde; MHC-ilişkili peptidi tanıyan THR (T hücre reseptörü), HLA molekülünü tanıyan CD4 ve CD8 eş reseptörleri ve APC ye bağlanmayı kuvvetlendiren adezyon molekülleri bulunmaktadır. T lenfosit aktivasyonunun ilk basamağını antijenin tanınması oluşturmaktadır. Tanıma olayı eş reseptörler ve eş uyarımlarla gerçekleştirilmektedir. HLA Class II molekülü ile sunulan antijenler CD4+ T lenfositleri (Th; T hepler) tarafından, HLA Class I molekülü ile sunulan antijenler ise CTL tarafından tanınır^{5,15,63}. Eş uyarımlar T hücre aktivasyonunda 2. sinyaller olarak adlandırılır. APC' deki CD80 ve CD86, T lenfositlerindeki CD28'e bağlanmaktadır^{15,28,64}. Ayrıca APC deki CD40 molekülü ve T lenfositlerindeki CD40 ligandının bağlanması da eş reseptör ekspresyonunun ve sitokin sentezini uyarır^{5,15,28}.

T lenfositleri tanıdığı peptide THR ile zayıf bağlarla bağlıdır. Aktivasyonun olabilmesi için bu bağın kuvvetlendirilmesi gerekmektedir. Bu olayı ise T lenfositlerindeki LFA (lökosit fonksiyon ilişkili protein) integrini ve APC deki ligandı olan ICAMI'in (intracellular adhesion molecule) birbirine bağlanması sağlamaktadır^{12,14}.

THR' nün APC' deki MHC-ilişkili peptide bağlanması ve CD4-CD8 eş reseptörlerinin HLA molekülüne bağlanması ile bu reseptörlerin sitoplazmik uzantılarında bulunan bir tirozin kinaz olan Lck' yı aktive eder. Lck, THR ile non-kovalan olarak bağlı CD3 kompleksi ve ζ sinyal proteininin ITAM denilen immünoresptör tirozin bazlı aktivasyon motiflerindeki tirozini fosforiller.

Fosforillenmiş ITAM, ZAP70 ile bağlanarak 2 farklı sinyal yolu oluşturur. Bunlar Ca-NFAT ve Ras/Rac-MAP kinaz yolu olup, sonuçta sitokinlerin, hücre siklusu indükleyicilerinin ve CD40 gibi efektör moleküllerinin sitümlasyonu sağlanır^{5,15,28}.

2.4.2 Graft HLA'nin tanınması

Alıcının T lenfositlerinin donör HLA antijenlerinin tanınması bilinen en güçlü immün yanıtlardan biridir. Timusta pozitif seçim sonucunda olgun T lenfositleri yabancı peptidleri sunan kendi öz HLA moleküllerini güçlü bir biçimde tanır. Allojeneik hücreden kaynaklanan peptidleri taşıyan allojeneik HLA molekülleri, öz MHC+peptid kompleksine benzer. Bu şekilde allograftteki allojeneik HLA molekülleri tanınır¹². Tanıma alıcının T lenfositlerinin, alloantijenleri hangi hücreler üzerinden sunduğuna bağlı olarak 2 yolla olmaktadır. T lenfositleri nakledilen dokudaki APC'ler tarafından sunulan HLA moleküllerini tanıyabilir (direkt allo-tanıma) ya da alloantijenler alıcının APC' i tarafından işlenip sunulabilir (indirekt allo-tanıma). Direkt tanıma ancak nakledilen dokunun donör kaynaklı APC içermesi ile gerçekleşmektedir. Fakat nakledilen doku APC içermiyor ise indirekt tanıma devreye girer. Bu durumda allojeneik HLA molekülü alıcının APC' i tarafından işlenerek sunulur^{15,28,65,66}.

Sunulan alloantijenlerin tanınması ile aktive olan T lenfositlerinin aktivasyonu ile red mekanizması (rejeksiyon) gelişmektedir. Rejeksiyon; klinik ve patolojik özelliklerine göre; hiperakut, akut ve kronik rejeksiyon olarak sınıflandırılır.

Hiperakut rejeksiyon; graft vaskülarizasyonundan hemen sonra dakikalar, bazen de saatler içinde gelişir. Bu tip reaksiyon alıcıda önceden graft antijenlerine karşı var olan antikorlarla gelişir. Bu antikorlar kan transfüzyonu, multipar gebelik veya geçirilmiş transplantasyon sonucu oluşmuş HLA antikorları olabilir ya da ABO sistemine karşı gelişen antikorlardır. Hiperakut rejeksiyonda hedef antijenleri eksprese

eden endotel, aktif rol oynar. Önceden var olan antikorlar çok kısa zamanda graft endoteline bağlanıp, endotel-anti endotel antikor komplekslerini oluşturarak komplemanı aktive eder. Bu aktivasyon sonucu graft dokusunda iskemi ve nekroz gelişir^{10,67-70}. Hiperakut rejeksiyonun önlenmesi için transplantasyon öncesi alıcı ve vericide ABO uygunluğunun saptanması ve HLA antijenlerine karşı antikor taraması (Cross –match) yapılmalıdır.

Akut rejeksiyon; transplantasyondan sonraki birkaç haftada görülür. Bu tip reaksiyonda T lenfositler merkezi rol oynar, farklı zamanlarda farklı T lenfosit tipleri reaksiyona katılır. Graft dokusundaki alloantijen alıcının T lenfositlerini direkt olarak uyarır. Alıcının antijen sunan hücreleri de indirekt olarak graft antijenini Th lenfositlere sunar. Aktive olmuş T lenfositlerden salgılanan sitokinler, örneğin IL-2 CTL aktivasyonunu arttırarak graft hücre hasarını arttır ve immün yanıtta rol alan diğer hücrelerin büyümesini ve differansiyasyonunu sağlar. Interferon gama (IFN- γ) graft parankim hücrelerinde class I, vasküler endotelde class II HLA antijenlerinin ekspresyonunu arttırarak bu hücrelerin immün reaksiyonda hedef oluşturmasına ve reaksiyonun daha fazla uyarılmasına yol açar⁶⁷⁻⁷¹.

T lenfositler aktive olunca humoral reaksiyonlar da olaya katılır. Aktive T lenfositlerden salınan IL-4 ve IL-5 B lenfositleri uyarır ve antijen direkt B lenfositlerini etkiler. B lenfosit proliferasyonu ve differansiyasyonu sonucu plazma hücrelerinden graft dokusuna karşı antikor üretilir. Damar duvarına bağlanan antikorlar komplemanı fikse eder ve vasküler endotel hasarına neden olur^{15,68,70,71}. Damarlarda hemoraji, trombus ve hücre lizisi gelişir.

Kronik rejeksiyon ; transplantasyondan aylar veya yıllar sonra ortaya çıkabilir ve graft yetmezliğinin en önemli nedenidir. Kronik red, graft damarlarının dereceli olarak

daralması ile ortaya çıkar. Buna graft alloantijenlerine karşı Th lenfositlerinin sitokin salgılaması ve bunun sonucunda da graft fibroblastları ve damar düz kas hücrelerinin çoğalması uyarılarak damar daralmasına neden olur^{15,28,69-73}.

Tüm bu red mekanizmalarının önüne geçebilmek amacıyla transplantasyon gerçekleştirilmeden önce alıcı ve donör arasındaki HLA uyumu ve donörde daha önceden oluşmuş olabilecek HLA antikörlerinin varlığının tespit edilmesi gerekmektedir. Yani nakilin gerçekleştirilebilmesi için HLA uyumundan sonra gelen en önemli kriter PRA (panel reaktif antikörleri) testidir.

2.4.3 HLA Uyumu

HLA -A, -B, -DR majör transplantasyon antijenleri olarak bilinmektedir. Yapılan son çalışmalarda HLA-C'nin hemapoietik kök hücre transplantasyonunu etkilediği gösterilmiş olmasına karşın HLA-DP ve -DQ' un herhangi bir etkinliği ortaya çıkarılamamıştır³. Terminolojik olarak HLA identik; haploidentik; full match (tam uyum) 6 antijenin tamamının aynı olmasıdır (2 A, 2 B, 2 DR). Mismatch (uyumsuzluk); Vericide olup alıcıda olmayan antijen. 0 mismatch; tam uyumlu, 6 mismatch; tam uyumsuz olarak değerlendirilmektedir. Genel olarak alıcı ve verici arasında HLA uyumu graft yaşam süresi uzatmakta , akut rejeksiyon riskini ve immünsüpresif kullanımını azaltmaktadır⁷⁴.

2.4.4 PRA (Panel Reaktif antikörleri)

Anti-HLA antikörleri, rejeksiyonla sonuçlanmış nakiller, kan transfüzyonu ve multipar gebelik sonucu gelişebilmektedir. PRA olarak isimlendirilen bu antikörler, paneldeki donör hücrenin pozitiflik yüzdesini ifade eder^{49,69,75}. Panel, mikrolenfositotoksik bir plaktan 20 ile 60 donör hücresinin test edilmesiyle oluşur. PRA birçok yöntem ile tespit edilebilmektedir. Teresaki tarafından geliştirilen ve bu

yöntemlerden en eskisi olarak bilinen mikrolenfositotoksosite yöntemi ile, sadece aktivasyonu komplemana bağlı olan antikorlar (IgG1, IgG3) saptanabilmektedir. Bu test ile, düşük düzeydeki class I antijenlerine özgül antikorlar ve class II antijenlerine özgül antikorlar belirlenmemektedir. Graft sağkalımını etkileyen ve aktivasyonu komplemandan bağımsız olan otoantikorlar gibi antikorları tespit edememektedir^{10,48,56}. Bundan dolayı daha hassas yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden Flow PRA'da saflaştırılmış HLA antijeni ile kaplı mikro boncuklardan yararlanılmaktadır. Flow-PRA inceleme testinde, class I ve class II antijenleri ile kaplı boncuklardan oluşan bir havuz kullanılarak serumdaki antikor yüzdesi belirlenmektedir⁷⁶. Antikor tipini tespit etmek için de Flow-PRA spesifik testi uygulanmaktadır. ELISA PRA' da ise pürifiye edilmiş HLA Class I ve II antijenleriyle kaplanmış weller kullanılır^{77,78}.

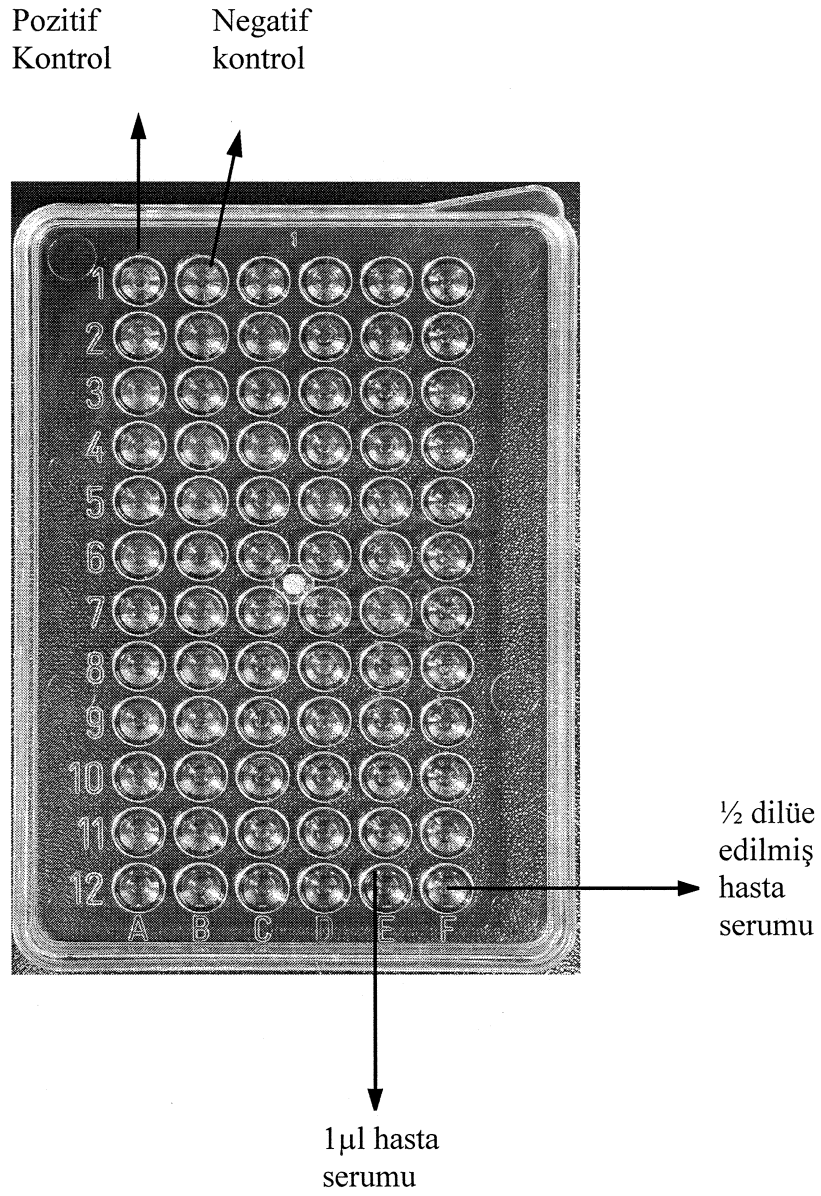
PRA hastaya nakil yapıp yapılamayacağını belirler. Bu nedenle nakil bekleyen hastaların her ay düzenli olarak PRA testi yaptırması gerekmektedir. Çünkü HLA antikorları bir süre sonra ortadan kaybolabilmektedir. Bu durumda da nakil gerçekleştirilebilir^{61,79}. Ayrıca PRA hastayı nakil öncesinde donör ve alıcı arasındaki cross-match testine de hazır tutmaktadır. Cross-match testi, hasta serumu (anti-HLA antikor) ile donör hücrelerinin (HLA antijen) tavşan serumu (kompleman) eşliğinde 1 saat 30 dakika inkübe edilmesi ve boyanması esasına dayandırılmıştır¹⁰. Hastada donör antijenlerine özgü HLA antikorlarının (DSA; donör spesifik antikorları) varlığında oluşan antijen-antikor kompleksinin kompleman aktivasyonu ile hücre membranında porlar oluşturarak hücrenin boyanmasını sağlar. Bu da pozitifliği işaret etmektedir. Ayrıca cross-match testinde IgG yapısında olan HLA antikorları, IgM yapısında olan diğer non-HLA antikorlarından DTT (Dihiotreitol) tekniği ile ayrılabilir^{56,80}.

3. MATERYAL VE METOD

HLA antikorlarının tespiti için, en az 1 ünite kan transfüzyonu yapılmış olan 105 hastadan alınan serumlar ve 12 Renal transplantasyon gerçekleştirilmiş olan hastadan alınan transplantasyon öncesi (PreTx) ve transplantasyon sonrası (Post Tx) serumlar teresaki plaklarına döküldü. Laboratuvarımızda rutin analizlerde doku tespiti yapılmış lenfositler ile serumlar test edildi.

3.1. Serum Örneklerinin Terasaki Plaklarında Haritalanması

72 kuyulu teresaki plaklarının her kuyucuğuna 1 µl parafin yüklenir. Kan transfüzyonu yapılmış olan kişilerden alınan serum örnekleri 72 kuyulu teresaki plaklarına her iki kuyucuk aynı serum örneğini taşıyacak şekilde 1µl konuldu. (İkinci kuyucuğa ½ RPMI ile dilue edilmiş serum konuldu). 72 kuyucuktan bir tanesine pozitif kontrol olarak PRA' sı pozitif olan bir hastanın serumundan 1µl , bir kuyucuğuna ise negatif kontrol olarak 1µl izotonik konuldu. Organ nakli ünitesinde Renal transplantasyon gerçekleştirilmiş olan 12 hastanın Pre Tx serumu, Post Tx 1., 7. 14. ,28. gün ,3. ve 6.ay ,1.yıl serumları ile 3 sağlıklı bireyin serumları her biri ayrı bir kuyucuğa olacak şekilde yerleştirildi. Bir kuyucuğa pozitif kontrol, başka bir kuyucuğa izotonik negatif kontrol olarak yerleştirildi (Şekil 6).



Şekil 6. Teresaki plağına serumların yerleştirilmesi

1. plağı 35 farklı hastanın serumu dökülüp bu serum dağılımına sahip plaktan 63 adet hazırlanıp 1. lot ismi verilmiştir. 2. ve 3. plak serileri de aynı şekilde hazırlanmış olup sırasıyla, 2. lottan 61, 3. lottan 40 adet hazırlanmıştır. 4. plak serisi 4. lot olarak

adlandırılmış ve 12 renal transplant hastasının PreTx ve Post Tx serumları ile 40 adet hazırlanmıştır.

Plaklar özel plak rotorunda 1800 rpm de 2 dakika santrifüj edilerek -70 de saklanmak üzere dondurucuda saklanmıştır. Plak kullanılacağı zaman dondurucudan çıkarılır ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.

3.2. Lenfosit İzolasyonu:

Sağlıklı bireylerden 5 ml heparinli kan alınır. Eşit miktarda fosfat tamponlu tuz (phosphate buffered saline, PBS) solüsyonu ilave edilerek ½ dilüe edilir. Dilüe edilen kan 14 ml'lik plastik santrifüj tüplerine 4 ml fikol (density: 1.077) üzerine yüklenir. 2600 rpm de 20 dakika santrifüj edilir ve oluşan lenfosit halkası pastör pipetiyle ayrı bir santrifüj tüpünde toplanır. 5 ml PBS ile 1800 rpm de hücreler santrifüj edilir. Süpernatant kısmı atılır. 5 ml NH₄Cl çözeltisinde 5 dakika bekletilir. 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra 3 kez PBS ile 1000 rpm de hücreler santrifüj edilir. Bu işleme yıkama işlemi adı verilir. Burada amaç özellikle trombositlerin uzaklaştırılmasıdır. Lenfositler 3 kez yıkamadan sonra RPMI 1640+ %10 FCS (Fetal calf serum) ile 50 µl de 4000 olacak şekilde sayılır.

Lenfosit izolasyonunu yaptığımız sağlıklı kişilerin lenfositleri (mikrolitrede 4000) bütün kuyucuklara dökülür. 30 dakika süresince inkübasyona bırakılır. Süre sonunda bütün kuyucuklara 5 µl rabbit komplemanı ilave edilir ve 1 saat beklenir. Kompleman süresi dolduktan sonra bütün kuyucuklara soft drop yöntemiyle boya eklenir. Sonuçlar invert ışık mikroskobunda değerlendirilir. Plakların üzeri ince bir lamel ile kapatıldığında faz kontrast altında olan hücreler siyah, canlı hücreler parlak olarak görülür. Boya alan ve almayan hücreler; 1; hücrenin boyayı almadığı, 2; %25, 4; %50, 6; %70-80, 8; %100 hücrenin boya alması şeklinde skorlanacaktır.

4.BULGULAR

Çalışmamızda, 2005- 2006 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Servisi , Göğüs Cerrahi Servisinde tedavi olan 105 kan transfüzyonu yapılmış olan hastadan alınan serum örnekleriyle 3 seri plak hazırlandı. Organ Nakli Ünitesinde renal transplantasyon gerçekleştirilmiş olan 12 hastadan alınan serum örnekleri ile 1 seri (Lot) plak hazırlandı. 1., 2. ve 3. serilerde her bir hasta için 1µl dilüe edilmemiş ve 1µl ½ dilüe edilen serum örneği kullanıldı. Serum örnekleri kullanılan hastaların yaşları, kan grupları, kan transfüzyonu sayısı, kan transfüzyonu için kanı kimden aldığı, kaç doğum yaptığı, herhangi bir metabolik rahatsızlıklarının olup olmadığına dair bilgiler edinildi. 4. plak serisinde ise renal transplant hastalarının 1µl ¼ dilüe edilmiş transplantasyon öncesi (Pre Tx) ve transplantasyon sonrası (Post Tx) 1µl 1. , 7. , 14. , 28. gün , 3.ve 6. ay , 1. yıl serumları kullanıldı. Hastalara ait bilgiler Tablo 4 a-d'de gösterildi. Bu serum örnekleri üzerine doku tipi bilinen taze izole edilmiş lenfosit örnekleri döküldü. Kullanılan lenfositlerin doku tipi ve reaksiyon (Rx) verdiği serumlar Tablo 5 a-d de verildi.

Tablo 4a. Lot 1'de kullanılan serumların ait olduğu hasta bilgileri

Serum No	Serumun Plaktaki yeri	Yaş	Cinsiyet	Kan Nakli sayısı(U)	Kanı veren
1	1A,1B	68	Erkek	3	KB
2	1C,1D	66	Kadın	2	KB
3	1E,1F	63	Erkek	2	Yeğen
4	2F,2E	48	Erkek	2	Yeğen
5	2D,2C	74	Erkek	2	KB
6	2B,2A	79	Erkek	2	KB
7	3A,3B	27	Erkek	2	KB
8	3C,3D	40	Kadın	1	KB
9	3E,3F	40	Kadın	3	KB
10	4F,4E	71	Kadın	2	KB
11	4D,4C	32	Kadın	4	KB
12	4B,4A	18	Erkek	2	KB
13	5A,5B	65	Kadın	2	KB
14	5C,5D	59	Erkek	5	KB
15	5E,5F	36	Erkek	2	KB
16	6F,6E	62	Kadın	2	Oğlu
17	6D,6C	52	Erkek	2	KB
18	6B,6A	58	Kadın	3	KB
19	7A,7B	20	Erkek	2	KB
20	7C,7D	66	Erkek	2	KB
21	7E,7F	9	Erkek	2	KB
22	8F,8E	36	Kadın	4	KB
23	8D,8C	36	Kadın	6	KB
24	8B,8A	75	Erkek	3	KB
25	9A,9B	21	Erkek	4	KB
26	9C,9D	61	Erkek	2	KB
27	9E,9F	37	Erkek	5	KB
28	10F,10E	43	Erkek	2	KB
29	10D,10C	30	Erkek	3	Hala
30	10B,10A	30	Erkek	5	KB
31	11A,11B	29	Erkek	2	KB
32	11C,11D	72	Erkek	2	Oğlu
33	11E,11F	66	Erkek	2	Kardeş
34	12D,12C	40	Erkek	1	KB
35	12A,12B	60	Erkek	2	KB

* KB: Kan Bankası

* U: Ünite

Tablo 4b. Lot 2’de kullanılan serumların ait oldukları hasta bilgileri

Serum No	Serumun yeri	Plaktaki	Yaş	Cinsiyet	Kan Nakli sayısı	Kanı veren
1	1C,1D		57	Kadın	4	KB
2	1E,1F		69	Erkek	3	oğlu
3	2F,2E		55	Kadın	4	KB
4	2D,2C		80	Kadın	4	KB
5	2B,2A		57	Erkek	3	KB
6	3A,3B		16	Erkek	2	Baba
7	3C,3D		41	Erkek	4	KB
8	3E,3F		50	Erkek	3	KB
9	4F,4E		75	Erkek	2	KB
10	4D,4C		69	Erkek	3	KB
11	4B,4A		49	Erkek	3	KB
12	5A,5B		47	Erkek	2	KB
13	5C,5D		74	Erkek	4	KB
14	5E,5F		38	Kadın	5	KB
15	6E,6F		23	Erkek	2	KB
16	6C,6D		6	Erkek	3	KB
16	6A,6B		67	Erkek	4	KB
18	7A,7B		56	Erkek	2	Otonom
19	7C,7D		44	Kadın	2	Otonom
20	7E,7F		35	Kadın	2	KB
21	8F,8E		70	Kadın	2	KB
22	8D,8C		39	Erkek	3	KB
23	8B,8A		41	Erkek	2	KB
24	9A,9B		22	Erkek	1	KB
25	9C,9D		56	Erkek	6	KB
26	9E,9F		45	Kadın	4	KB
27	10F,10E		61	Erkek	8	KB
28	10D,10C		64	Kadın	5	KB
29	10B,10A		67	Erkek	3	KB
30	11A,11B		20	Kadın	2	KB
31	11C,11D		45	Kadın	2	KB
32	11E,11F		41	Erkek	4	KB
33	12E,12F		30	erkek	21	KB
34	12D,12C		56	kadın	2	oğlu
35	12A,12B		56	Erkek	4	KB

Tablo 4c. Lot 3 de kullanılan serumların ait oldukları hasta bilgileri

Serum No	Serumun Plaktaki yeri	Yaş	Cinsiyet	Kan Nakli sayısı	Kanı veren
1	1A,1B	31	Erkek	2	KB
2	1C,1D	55	Kadın	4	KB
3	1E,1F	52	Erkek	10	KB
4	2F,2E	19	Kadın	1	KB
5	2D,2C	48	Erkek	3	KB
6	2B,2A	19	Kadın	2	KB
7	3A,3B	30	Erkek	1	KB
8	3C,3D	51	Kadın	3	KB
9	3E,3F	30	Erkek	2	KB
10	4F,4E	40	Kadın	3	KB
11	4D,4C	34	Erkek	3	KB
12	4B,4A	54	Kadın	15	KB
13	5A,5B	38	Erkek	2	KB
14	5C,5D	20	Kadın	4	Kardeş
15	5E,5F	22	Erkek	20	KB
16	6F,6E	29	Kadın	8	KB
17	6D,6C	21	Erkek	3	KB
18	6B,6A	38	Kadın	2	KB
19	7A,7B	16	Kadın	4	KB
20	7C,7D	27	Kadın	20	KB
21	7E,7F	56	Erkek	4	KB
22	8F,8E	55	Kadın	2	Kardeş
23	8D,8C	73	Kadın	3	Kardeş
24	8B,8A	67	Kadın	4	KB
25	9A,9B	49	Kadın	4	KB
26	9C,9D	40	Erkek	2	KB
27	9E,9F	56	Erkek	2	Amca
28	10F,10E	74	Erkek	3	KB
29	10D,10C	40	Kadın	4	KB
30	10B,10A	70	Erkek	2	KB
31	11A,11B	38	Erkek	4	KB
32	11C,11D	35	Kadın	2	KB
33	11E,11F	48	Kadın	1	KB
34	12D,12C	36	Kadın	2	KB
35	12A,12B	38	Erkek	5	KB

Tablo 4d. Lot 4'de kullanılan serumların ait oldukları hasta bilgileri

Hasta bilgileri			Serum	Plaktaki yeri
1-D.K	17	Kadın	¼ dilüe Pretx	1A
			¼ dilüe 1.Gün	2A
			¼ dilüe 7.gün	3A
			¼ dilüe 14.gün	4A
			¼ dilüe 28.gün	5A
			¼ dilüe 3.ay	6A
			¼ dilüe 6.ay	7A
			¼ dilüe 1.yıl	8A
2-S.S	33	Kadın	¼ dilüe Pretx	9A
			¼ dilüe 1.Gün	10A
			¼ dilüe 7.gün	11A
			¼ dilüe 14.gün	12A
3-Ç.Y	19	Kadın	¼ dilüe Pretx	1B
			¼ dilüe 1.Gün	2B
			¼ dilüe 7.gün	3B
			¼ dilüe 14.gün	4B
			¼ dilüe 28.gün	5B
			¼ dilüe 3.ay	6B
			¼ dilüe 1.yıl	7B
4-Ş.A	16	Kadın	¼ dilüe Pretx	8B
			¼ dilüe 1.Gün	9B
			¼ dilüe 7.gün	10B
			¼ dilüe 14.gün	11B
			¼ dilüe 28.gün	12B
5-S.T	27	Erkek	¼ dilüe Pretx	1C
			¼ dilüe 1.Gün	2C
			¼ dilüe 7.gün	3C
			¼ dilüe 14.gün	4C
			¼ dilüe 28.gün	5C
			¼ dilüe 3.ay	6C
			¼ dilüe 6.ay	7C
6-K.A	24	Kadın	¼ dilüe Pretx	8C
			¼ dilüe 1.Gün	9C
			¼ dilüe 14.gün	10C
			¼ dilüe 28.gün	11C
7-F.T	39	Kadın	¼ dilüe Pretx	12C
			¼ dilüe 1.Gün	1D
			¼ dilüe 7.gün	2D
			¼ dilüe 14.gün	3D
			¼ dilüe 28.gün	4D
8-M.K	17	Erkek	¼ dilüe 3.ay	5D
			¼ dilüe 6.ay	6D
			¼ dilüe 1.yıl	7D
			¼ dilüe Pretx	8D
			¼ dilüe 14.gün	9D
			¼ dilüe 28.gün	10D
9-M.Y	54	Kadın	¼ dilüe 3.ay	11D
			¼ dilüe 6.ay	12D
			¼ dilüe Pretx	2E
			¼ dilüe 1.Gün	3E
			¼ dilüe 7.gün	4E
			¼ dilüe 14.gün	5E
			¼ dilüe 28.gün	6E
10-M.A.K	23	Erkek	¼ dilüe 3.ay	7E
			¼ dilüe Pretx	8E
			¼ dilüe 1.Gün	9E
			¼ dilüe 7.gün	10E
			¼ dilüe 28.gün	11E
11-C.S	44	Erkek	¼ dilüe 3.ay	12E
			¼ dilüe Pretx	2F
			¼ dilüe 1.Gün	3F
			¼ dilüe 14.gün	4F
12-H.A	44	Kadın	¼ dilüe 28.gün	5F
			¼ dilüe Pretx	6F
			¼ dilüe 7.gün	7F
			¼ dilüe 14.gün	8F
13-M.E	30	Erkek	¼ dilüe 3.ay	9F
			Komplemansız	10F
14-E.D	27	Kadın	Komplemansız	11F
15N.Ö	27	Kadın	Komplemansız	12F

Tablo 5a. Lot 1'de yer alan plaklarda kullanılan HLA'i belirlenmiş lenfositler ve rx verdiği serumlar

Piak No	Rx veren serumlar							HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DR
1	8	9						2 24	35 50		7 11
2	3	8	9	16	17			1 29	44 61		
3	8	9						3 26	44 51	4	7 9
4	8	9						2	18 35	3 7	
5	8	9						1 2	8 51	7	
6	8	9	16	17	24			3 30	8 49		16 17
7	8	9						2 26	41 60	3	
8	8	9	16	17				3 24	35 50	4 6	
9	8	9						2 28			
10	8	9						24 36	35	4	
11	8	9						24 32	35	4	
12	8	9						26	44 55		
13	8	9						3 26	35 50	4 6	
14	8	9						1 2	60 3		
15	8	9						32	7 51	4	
16	8	9						2 24	51 61		
17	3	8	9	16	17			3 24	8 35	4 7	11 17
18	8	9	16	17				1 2	37 55	1 6	11
19	8	9						1 26	37 38 6		
20	8	9						2	7 55	1	
21	8	9	16	17				24 32	35 38		4 7
22	8	9						23 32	7 8	7	4 17
23	8	9	17					26 33	51		7
24	8	9						11 74	38 51		
25	8	9						11 24	35 51	4	
26	8	9	16	17				11 24	35 51		11 13
27	8	9	24					2 24	35	4	11
28	8	9						2 32	13 35	4 6	4 11
29	3	8	9					2	44 51		11 15
30	8	9	16	17				2 23	39 45	6	11
31	8	9	16	17				30 68	51		1 11
32	8	9	16	17				29 32	57 63		
33	8	9	16					23	18 51		11 12
34	8	9						29 68	7 51		4
35	8	9						30 68	51		1 11
36	8	9						30	41 49	7	3
37	8	9	11					29 32	57 63		
38	8	9	14					11 24	27 55	1 2	
39	8	9						11 24	35 51	4	1 15
40	8	9						2 24	18 55		11 15
41	8	9						1 32	38 49	7	15 17
42	8	9						1 2	38 41		15 17
43	8	9	16	17	24			2 24	50 60		4 11
44	8	9	24					24 26	35 58	1	11 13
45	8	9	24					32	44		4
46	8	9	24					26	57	6	
47	8	9	24					3 32	18 41	2	3 16
48	8	9	24	3				2	18 49	7	12 13
49	2	8	9 11	16	24			11 68	49 51	7	
50	8	9						24 26	35 51		1
51	8	9						24	51		
52	8	9						24 68	51		
53	8	9						2 24	51 61		
54	8	9						2 24	35 50	4 6	7 11
55	8	9	16	17				1 29	44 61		
56	8	9	16	17				24 29	55 62		
57	8	9						26	44 55		
58	3	8	9	16	17	24		2 24	51		4 13
59	8	9						3 26	35 50	4 6	
60	8	9						1 24	35 52		4 17
61	8	9	16	24				24 26	35	4 6	
62	3	8	9	16	17			1 2	8 51	2 7	
63	8	9	16					24 32	35	4	

Tablo 5b. Lot 2’de yer alan plaklarda kullanılan HLA’i belirlenmiş lenfositler ve rx verdiği serumlar

Plak No	Rx veren serumlar								HLA-A		HLA-B		HLA-Cw		HLA-DR	
1	26							1	2	37	55	1	6	11		
2	26	34						2	24	35	50			7	11	
3	14	26	31					23	32	7	8	7		14	17	
4	14	26	31					26	33	51				17		
5	14	22	31					11	74	38	51					
6	14							11	24	35	51	4				
7	14	31						11	24	35	51			11	13	
8	1	14	22	23	26	31		3	11	8	35	7				
9	14	22	26	31				2	11	35		4				
10	14	26	31					2		44	51			11	15	
11	14	26						2	24	8	57	6	7			
12	26	31						2	23	39	45	6		11		
13	31							29	68	7	51			4		
14	14	26	31					3		18	51			11	12	
15	26							1	24	57	61			7		
16								11	24	27	55	1	2			
17	14	26	31					1	2	38	41			15	17	
18	26							24	30	8	60			4	17	
19	14	26						1		51				5	16	
20	14	26	31					1	24	38	55	1				
21	14							30		8	44	7		4	17	
22	4	23						2	11	50	51	5		11		
23	14	23	26	31				3		35	51	4		4		
24	14	19	26					11	24	49	51			15		
25	1	13	14	26	31			2	24	35	57	7		3	4	
26	1	14	31					1	24	51	55	1		11	16	
27	9	14	26	31				3	29	35	44	4				
28	14	22	26					11	68	35	44	4		4	14	
29	14	26	31					1	3	18	51			4		
30	14	26						25	26	35	55	3	4			
31	14	31						11		49	50	2	6	7	11	
32	31							11	24	18	44	7		4	7	
33	14	31						24		44	51			7	11	
34	14	31						11	24	21	51			4	11	
35								1	29	13	41			11	13	
36	14	26	31					3	11	35	44	4		4	11	
37	14	22	31					32	68	51	58	3	4			
38	1	14	22	26	31			11	68	49	51			4	11	
39	14	31						24	26	35	51			1		
40	14	31						24		68	51					
41	14	31						24		51						
42	14	26	31					1	2	49	51	1	7	4	7	
43	14	22	31					11	23	50	51	5		4	13	
44	14	31						1	23	49						
45	14	26	31					1	24	18	63			11		
46	1	14	23	26	31			24	18	38				11	13	
47	14	22	31							35	51	4		11		
48	1	14	22	26	31			11	24	35	49	4	7	11	15	
49	1	14	31					11	26	18	35			1	11	
50	14	31						3	26	18	62	3		1	16	
51	14	31						3	24	35	50	4	6			
52	14	26	31					3	24	35	50	4	6			
53	26	31						2		38						
54	14	31						24	32	35	4					
55	26							26		44	55					
56	14	31						1	11	13	51	5				
57	14	26	31					2	24	51	61					
58	14	26	31					3	26	44	51	4		7	9	
59	14	26	31					2		35	18	3	7			
60	14	26						1	2	8	51	7				
61	14	26	31					3	26	35	50					

Tablo 5c. Lot 3'de yer alan plaklarda kullanılan HLA'i belirlenmiş lenfositler ve rx verdiği serumlar

Plak No	Rx veren serumlar								HLA-A		HLA-B		HLA-Cw		HLA-DR	
1	2	25	29	35					2		18	51	7		4	14
2	23	29							2	33	55	58	1	3	15	17
3	1	2	6	21	29				3	24	35	51				
4	2	29							26	31	38	51				
5	2	28	29	35					2	24	35	50			7	11
6	29								2	30	8				11	17
7	28	29							1	3	50	63	6		7	13
8	29								1	11	61	63	7		7	13
9	29								24	29	44	57	5		4	8
10	2	28	29						3	30	51	50	6		4	7
11	29								11	30	51	50	6		4	7
12	29								2	26	13	51			4	7
13	2	29	35						11	24	35	38	4		3	13
14	29	33							26	33	38		5		14	15
15	2	29							26	31	38	51				
16	2	28	29						2		18	51				
17	28	29							2		51				15	17
18	2	28	29						2		8	51	7		17	18
19	29								2		35	50	4		11	17
20	29								26	68	55		1		11	17
21	2	29							2		8	51	7			
22	2	29	35						2	24	35	51	4		1	10
23	2	28	29	35					1	69	8	51	7		1	10
24	28	29							2	11	35	41	4		11	13
25	2	28	29	35					1		18	51			11	13
26	2	8	28	29	35				3	30	7	35	7		14	15
27	2	29	31						2	41	50	6			7	11
28	2	28	29						1	32	51	62			4	13
29	2	28	29						1	24	57	61			7	
30	2	8	28	29					11	32	35	57	4	6		
31	2	28	29						1	2	51	60	3		11	18
32	2	8	28	29					2		38	57	7		4	
33	2	29							2		38	57	7		4	
34	2	23	28	29	35				11	68	35		4		1	
35	28	29	35						2	11	35	50	4	6	17	
36	28	29	35						11	24	35	51	4		1	13
37	29								2	11	35	51	4			
38	29								2	11	27	41	2	17	7	10
39	28	29							2	11	35	55			9	11
40	29								2	11	18	41	17		11	13

Tablo 5d. Lot 4'de yer alan plaklarda kullanılan HLA'i belirlenmiş lenfositler ve rx verdiği serumlar

Plak No	Rx veren serumlar							HLA-A		HLA-B		HLA-Cw		HLA-DR	
1								2		35	53	4			
2								3	33	35	65	4	8		
3								3		35	4	6		7	11
4	12							30		41	51				
5								23	33	49	65	7			
6	12							2	3	41	65	8			
7	12							24	68	8	51	4	7	13	17
8								1	24	49	51	7	11	13	
9	12							2	24	8	61	2		16	17
10	12							1	3	49	63	7		11	13
11	12							2	11	18	41			10	17
12	12							2	11	35	55			9	11
13	12							2	11	18	41			11	13
14								3	11	35	49	4	7	4	6
15	12							2		53	65	8		1	17
16								29	33	7	65	8		1	13
17								3	24	18	62	3			
18								24	33	18	65	8		1	13
19	12							2	3	7	8	7		4	17
20								11	32	27		2			
21	12							24		35	38	4		11	13
22	12							2	26	38	60	3		13	16
23								1	69	8	51	7		1	10
24								2	11	35	41	4		11	13
25	12							1		18	51			11	13
26	12							3	30	7	35	7		14	15
27								2		41	50	6		11	17
28	12							1	32	51	62			4	13
29								1	24	57	61			7	
30								11	32	35	57	4	6		
31	12							1	2	51	60	3		8	11
32	12							2		38	57	7		4	
33								11		35	68	4		1	
34								2	11	35	50	4	6	1	7
35								11	24	35	51	4		1	13
36								2	11	35	51	4	6		
37								1	3	49	63	7		11	13
38								2	11	27	41	2	17	7	10
39								2	11	35	55			9	11
40	12							2	11	18	41	17		11	13

En az 1 ünite kan transfüzyonu yapılmış, 105 hastadan alınan serumlar ile yapılan lenfositotoksisite yöntemi ile 17 hastada anti-HLA antikörleri tespit edildi. Plaklara yerleştirilen serumlar ve üzerlerine dökülen doku tipi bilinen lenfositlerin reaksiyonları PRA-base analiz sistemi ile değerlendirildi. Her bir lot için ayrı olarak uygulanan analiz sonucunda toplam antijen dağılımı Tablo 6 a-d de verilmiştir. Analiz sisteminin doğru pozitif ve yanlış pozitif olarak değerlendirdiği anti-HLA antikörlerinin istatistiksel sonuçları da Tablo 7 a-d de verilmiştir. Kullanılan PRA-base analiz sisteminde R değeri; anti-HLA antikörünün, taranan antijenlere karşı oluşabilme sıklığını göstermektedir.

Tablo 6a. Lot 1 için toplam antijen dağılımı

A1:10	A2:21	A3:8	A11:6	A23:3	A24:25	A25:0
A26:12	A28:1	A29:6	A30:4	A31:0	A32:10	A33:1
A34:0	A36:1	A43:0	A66:0	A68:5	A69:0	A74:1
A80:0	B7:4	B8:5	B13:1	B14:0	B15:0	B18:5
B27:1	B35:21	B37:2	B38:5	B39:1	B41:4	B42:0
B44:7	B45:1	B46:0	B47:0	B48:0	B49:5	B50:6
B51:20	B52:1	B53:0	B54:0	B55:7	B56:0	B57:3
B58:1	B59:0	B60:3	B61:4	B62:1	B63:2	B64:0
B65:0	B67:0	B71:0	B72:0	B73:0	B75:0	B76:0
B77:0	B81:0					

Tablo 7a. Lot 1’de varlığı tespit edilen HLA antikorları ve istatistiksel değerleri

Serumun Plaktaki yeri	Anti-HLA Antikoru	AA(++)	BB(+/-)	CC(-/+)	DD(--)	R
3C,3D	FULL POZİTİF					
3E,3F	FULL POZİTİF					
4C,4D	B62	1	2	0	60	0,568
5C,5D	B27	1	0	0	62	1
6C,6D	B8	3	1	2	51	0,643
	A29	4	4	2	53	0,526
6E,6F	A29	4	10	2	47	0,347
	B8	3	7	2	45	0,346
8A,8B	B49	3	5	2	53	0,417

*AA(++); Doğru pozitif

*BB(+/-); Yanlış pozitif

*CC(-/+); Yanlış negatif

*DD(--); Doğru negatif

*R; Antijene karşı antikor oluşabilme sıklığı

Tablo 6b. Lot 2 için toplam antijen dağılımı

A1:13	A2:15	A3:11	A11:19	A23:4	A24:23	A25:1
A26:8	A28:0	A29:3	A30:2	A31:0	A32:3	A33:1
A34:0	A36:0	A43:0	A66:0	A68:5	A69:0	A74:0
A80:0	B7:2	B8:6	B13:2	B14:0	B15:0	B18:8
B27:1	B35:20	B37:1	B38:4	B39:1	B41:2	B42:0
B44:9	B45:1	B46:0	B47:0	B48:0	B49:6	B50:6
B51:27	B52:	B53:0	B54:0	B55:6	B56:0	B57:3
B58:1	B59:0	B60:1	B61:2	B62:1	B63:2	B64:0
B65:0	B67:0	B71:0	B72:0	B73:0	B75:0	B76:0
B77:0	B81:0					

Tablo 7b. Lot 2’de varlığı tespit edilen HLA antikorları ve istatistiksel değerleri

Serumun Plaktaki yeri	Anti-HLA Antikoru	AA(++)	BB(+)	CC(-)	DD(-)	R
8A,8B	A68	3	6	2	50	0,381
9E,9F	A2	13	15	1	32	0,514

Tablo 6c. Lot 3 için toplam antijen dağılımı

A1:8	A2:19	A3:5	A11:12	A23:0	A24:8	A25:0
A26:5	A28:0	A29:1	A30:4	A31:2	A32:2	A33:2
A34:0	A36:0	A43:0	A66:0	A68:2	A69:1	A74:0
A80:0	B7:1	B8:4	B13:1	B14:0	B15:0	B18:4
B27:1	B35:13	B37:0	B38:5	B39:0	B41:4	B42:0
B44:1	B45:0	B46:0	B47:0	B48:0	B49:1	B50:6
B51:18	B52:0	B53:0	B54:0	B55:3	B56:0	B57:4
B58:1	B59:0	B60:1	B61:2	B62:1	B63:3	B64:0
B65:0	B67:0	B71:0	B72:0	B73:0	B75:0	B76:0
B77:0	B81:0					

Tablo 7c. Lot 3’de varlığı tespit edilen HLA antikoru ve istatistiksel değerleri

Serumun Plaktaki yeri	Anti-HLA Antikoru	AA(++)	BB(+)	CC(+)	DD(--)	R
1C,1D	B7	1	2	0	19	0,549
	B51	12	3	6	19	0,545
3C,3D	B7	1	0	0	39	1
6C,6D	B8	3	1	2	51	0,643
	A29	4	4	2	53	0,526
10C,10D	FULL POZİTİF					
10E,10F	A1	1	3	0	15	0,456
	A3	7	4	6	15	0,339
	B35	6	11	2	21	0,329
12A,12B	B7	1	6	0	33	0,348

Tablo 6d. Lot 4 için toplam antijen dağılımı

A1:4	A2:15	A3:10	A11:11	A23:1	A24:14	A25:0
A26:3	A28:0	A29:1	A30:1	A31:0	A32:5	A33:4
A34:0	A36:0	A43:0	A66:0	A68:3	A69:0	A74:0
A80:0	B7:2	B8:3	B13:1	B14:0	B15:0	B18:7
B27:3	B35:12	B37:0	B38:3	B39:0	B41:5	B42:0
B44:2	B45:0	B46:0	B47:0	B48:0	B49:5	B50:1
B51:9	B52:3	B53:3	B54:0	B55:3	B56:1	B57:0
B58:0	B59:0	B60:1	B61:1	B62:1	B63:1	B64:0
B65:7	B67:0	B71:0	B72:0	B73:0	B75:0	B76:0
B77:0	B81:0					

Tablo 7d. Lot 4’de varlığı tespit edilen HLA antikorları ve istatistiksel değerleri

Serumun Plaktaki yeri	Anti-HLA Antikoru	AA(++)	BB(+/-)	CC(-/+)	DD(--)	R
7F,8F	B63	1	0	0	21	1
	A2	13	4	2	21	0,692
	A30	1	1	0	21	0,691
	A68	2	2	0	21	0,676

Lot 1 (3C,3D) 8 nolu serum test edilen tüm lenfositlerdeki HLA Ag’leri ile rx verdi. Ag spesifikliğı yoktur.

Lot 1(3E,3F) 9 nolu serum test edilen tüm lenfositlerdeki HLA Ag’leri ile rx verdi. Ag spesifikliğı yoktur.

Lot 3(10C,10D) 29 nolu serum test edilen tüm lenfositlerdeki HLA Ag’leri ile rx verdi. Ag spesifikliğı yoktur.

Non-spesifik rx veren serumlar laboratuvar çalışmamızda anti-HLA pozitif kontrolleri olarak kullanılacaktır. Özellikle PRA ve cross çalışmalarında kullanılan pozitif kontroller, tespit ettiğimiz bu serumlardan yapılabilecektir.

Çalışmamızda kan transfüzyonu yapılan hastalardan alınan serumlarda; A1 (1 serum), A2 (1 serum), A3 (1 serum), A29 (3 serum), A35 (1 serum), A68 (1 serum), B7 (3 serum), B8 (3 serum), B27(1 serum), B49 (1 serum), B51 (1 serum), B62(1 serum) HLA Ag ile reaksiyon veren spesifik anti-HLA antikorları lenfositotoksisite yöntemiyle belirlendi.

Renal transplantasyon gerçekleştirilmiş olan hastalardan alınan PreTx ve Post Tx serumlarından hazırlanmış olan LT4 serisinde 12 numaralı hastanın transplantasyon

sonrası 7.gün (7F) ve 14.gün (8F) serumlarında, A2, A30, A68 ve B63 HLA Ag ile reaksiyon veren spesifik anti-HLA antikorları lenfositotoksosite yöntemiyle belirlendi.

Yine bu sette nakil gerçekleştirilmemiş 3 kişiden alınan serumlar kompleman aktivitesinin test edilmesi amacı ile kompleman eklenmesi olmaksızın çalışılmıştır.

Çalışmamız sonucunda istatistiksel olarak doğru pozitif sonuç veren anti-HLA antikorlarından HLA-B27 antikorunu, laboratuvarımıza rutin hasta olarak gelen ve HLA-B27 pozitif olarak raporlandırılmış olan 16 hastanın lenfositleri ile test edildi. Bunun için HLA-B27 antikorunu olan serumdan, her teresaki plağına 4 hasta lenfositini dökülebilecek şekilde, 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dilüsyonlarını hazırlandı. 16 HLA-B27+ olan hasta lenfositleri ile test edilen serum; 12 hasta lenfositini ile farklı skorlarda reaksiyon verirken 4 hasta lenfositini ile reaksiyon vermedi.

Tablo 8. Anti-HLA-B27 serumunun HLA-B27 + Hastalar ile test edilmesi ile elde edilen skorlar

HLA-B27+ Hasta	Kullanılan serumun skoru				
	1 μ	1/2 μ	1/4 μ	1/8 μ	1/16 μ
1	6	4	4	4	4
2	4	4	4	4	4
3	8	8	6	4	4
4	6	6	4	2	2
5	1	1	1	1	1
6	6	6	4	2	2
7	6	4	2	2	1
8	1	1	1	1	1
9	4	4	4	2	2
10	6	6	4	4	2
11	1	1	1	1	1
12	8	8	6	4	2
13	6	4	2	2	1
14	6	4	2	2	2
15	1	1	1	1	1
16	6	4	4	2	2

5.TARTIŞMA

Üzerinde bir çok araştırmanın yapıldığı ve bugün hala bazı soruların yanıtı kalıldığı immün sistemimiz oldukça komplekstir. Doğal immün sistemimiz ilk koruyucu engeli oluştururken, edinsel immünitemiz doğal immünite tarafından tanımlanamayan veya doğal immüniteyi aşarak dokulara giren antijenlere karşı savunmayı sağlamaktadır. Aslında edinsel immün sistem farklı antijenlere karşı farklı yanıt yolları geliştirmiştir. Edinsel immün sistemin bir kolu olan humoral immünite, antijen hücre içine girmeden ortadan kaldırmaya yönelik B lenfositleri tarafından antikorlar üretirken, hücrel immünitemiz ancak hücre içine giren antijenler kendi APC' lerimiz tarafından T lenfositlerine sunulduğu zaman devreye girmektedir. Yine burada immün sistemimizin farklı elemanları devreye girer ve sistem hangi tip HLA molekülü ile antijen sunulmuş ise ona yönelik farklı tip T subsetlerini aktive eder. Class I molekülü ile sunum gerçekleşmiş ise CD8 sitotoksik T lenfositleri aktive olurken, Class II molekülü ile sunulmuş ise CD4 T lenfositlerinin aktivasyonu gerçekleşir. CTL'lerinin antijeni tanınması farklı sinyal mekanizmalarını aktive eder ve granüler yol veya reseptörler aracılığıyla antijenin bulunduğu hücre apoptoza uğratılır. CTL'i salgıladıkları bazı sitokinlerle (IFN γ) fagositleri de aktive ederek antijenin uzaklaştırılmasını sağlayabilirler. CD4 T lenfositleri de salgıladıkları IFN γ ile makrofajları aktive edip fagosite edilmiş antijenlerin ortadan kaldırılmasını sağlarken, TNF sentezlemesi ile de nötrofil ve monositlerin bu bölgeye çekilerek daha güçlü bir yanıt oluşturulmasını sağlar. Ayrıca B lenfositlerinin antijen sunan hücrelere dönüşmesini de indükler.

Bu şekilde hücre aracılı immün yanıtın oluşabilmesi için gerekli ilk aşama olan T hücrelerinin antijeni tanınması ve bağlanabilmesi için gerekli olan HLA molekülü 6.

kromozomun kısa kolunda yer alan MHC kompleksindeki bir gen topluluğu olan HLA genleri tarafından kodlanmaktadır. HLA molekülleri ilk olarak kan transfüzyonu yapılmış olan hastalarda ve multipar gebelik geçiren kadınlarda tespit edilmiştir. HLA molekülleri transplantasyonda grafitin kabul veya reddedilmesinde de rol oynar.

Araştırma kapsamına alınan 127 hastaya ait bilgiler Tablo 4a-d de verilmiş olup, bu bilgilerin değerlendirilmesine yönelik tartışma 2 grup altında yapılmıştır.

5.1. Kan Transfüzyonu yapılan hastalarda anti-HLA antikorlarının tespitine yönelik bulguların tartışılması

Kan transfüzyonundan sonra alıcının immün sisteminde kısa yada uzun süreli çeşitli değişikliklerin olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu değişikliklerin bir kısmı verilen kan komponentlerine karşı alloimmünizasyon şeklinde immün sistemin uyarılması yönünde gerçekleşirken, diğer kısmı kan komponentinin özellikleri ve alıcının immün durumuna bağlı olarak immün sistemin baskılanması yönünde de gerçekleşebilmektedir.

Çalışmamızda 105 kan transfüzyonu yapılmış olan hastada anti-HLA antikorlarının tespit etmeyi amaçladık.

Çalışma sonucunda;

3 hasta serumunun full pozitif yani tüm test edilen HLA antijenlerine karşı reaksiyon veren HLA antikorlarına sahip olduğunu tespit ettik. Bu hastalardan 3 de kadın olup, 1 den fazla kan transfüzyonu ve ikiden fazla gebelikleri vardı. Bu hastalarda tespit edilen anti-HLA antikorlarının non-spesifik olduğu söylenebilir.

11 hastada HLA spesifik antikorları tespit ettik. Bu hastaların bir tanesinde yakın akrabadan alınan kan kullanılırken diğerlerinde kan bankasından alınan kan transfüzyonda kullanılmıştır. Yakın akrabadan kan transfüzyonu yapılan hastanın 6

doğum yapmış olması oluşan HLA-antikorlarında etkilidir. Bunun dışında 11 hastaya yakın akrabadan kan transfüzyonu yapılmış ancak hiçbirinde HLA-antikoru tespit edilememiştir. Anti-HLA antikorlarının mendelian kalıtım göstermesi ile 1.derece akrabalarda aynı HLA antijenlerine sahip olma oranı artacağından dolayı onlara karşı HLA antikoru da oluşturulmayabileceği söylenebilir.

Tespit edilen HLA antikorları; A1 (1 serum), A2 (1 serum), A3 (1 serum), A29 (3 serum), A35 (1 serum), A68 (1 serum), B7 (3 serum), B8 (3 serum), B27(1 serum), B49 (1 serum), B51 (1 serum), B62(1 serum) olup, bu serumları ait olduğu 12 hastanın 8'i erkek, 4'ü kadındır. Bu hastalarda en az 3 Ü kan nakli söz konusu olup, kadın hastalar da buna ilaveten 2 den fazla doğum hikayesi vardır. Bu veriler ışığında erkek hastalarda varlığı tespit edilen anti-HLA antikorlarının kan transfüzyonu sonucu oluştuğu kesindir. Ancak kadın hastalarda gebelikten kaynaklanan antikor oluşumu ihtimali olduğundan dolayı, varlığı tespit edilen anti-HLA antikorlarının kesinlikle kan transfüzyonu ile oluştuğu söylenemez.

Ortalama 5Ü kan naklinden sonra anti-HLA antikorlarının oluşması beklenmektedir. Bazen 1U kan transfüzyonu sonrasında antikor gelişiminin pozitif olduğu durumlar görülmüştür. Çalışmamızda 5 Ü'den fazla kan nakli yapılmış 13 hasta mevcut olup bunlardan 8'i erkek, 5'i kadındır. Bu hastalardan sadece iki tanesinde anti-HLA antikoru tespit ettik. Kan transfüzyonu ile HLA antikorlarının oluşumunda kanın kimden alındığı kadar kişinin immün sistemi, kanın ne kadar bekletildikten sonra kullanıldığı ve serumun ne kadar süre sonra alındığı da önemlidir. Örneğin çalışmamızda yer alan 2 hafta içerisinde 20 Ü kan transfüzyonu yapılmış olan hastadan 6 ay sonra alınan serumunda HLA antikoru tespit edemedik. Yine bir yıl içerisinde 20 ü kan nakli olan hastamızdan en son kan naklinden 1 yıl sonra serum alındığında o

hastada anti-HLA antikorlarını tespit edemedik. Bu hastalarda desensitizasyondan söz edilebilir.

Çalışmamızda HLA-B27 antikorunu tespit ettiğimiz hasta serumunu HLA-B27+ olan hastalar ile test ettik. Sonuçta bazı HLA-B27+ hastalarının lenfositlerinin bu serum ile reaksiyon vermediğini gözlemledik. Bu durumda hasta serumumuzun HLA-B27 allelinin bir alt dijitine karşı oluşmuş bir HLA antikorunu oluşturduğunu ve reaksiyon vermeyen hastalarda bulunan HLA-B27 antijeninin bu dijitten farklı olduğu sonucuna vardık.

5.2. Renal Transplantasyon gerçekleştirilmiş olan hastalarda anti-HLA antikorlarının tespitine yönelik bulguların tartışılması

Transplantasyon gerçekleştirilen hastalarda donör HLA antijenlerine karşı oluşan HLA antikorları DSA (Donör Spesifik Antikoru) olarak isimlendirilir. Donör ve alıcı arasındaki HLA mismatch sayısının artması ile birlikte alıcıda DSA oluşumu artacaktır. Bu antikorlar HLA Class I ve Class II sınıfına aittir. Çalışmamızda lenfositotoksitite metodu ile elde ettiğimiz sonuçları PRA-Base analiz sistemi ile değerlendirmeye aldığımızdan dolayı ancak class I sınıfına ait olan HLA antikorlarını tespit edebildik. Lenfositotoksitite metodu komplemandan bağımsız aktive olan veya HLA spesifik IgG ve non-sitotoksik antikorların ayırımını yapamadığı için birlerine bazı üstünlükleri olan Flow PRA ve ELISA PRA metodları da rejeksiyonu en aza indirmek amacı ile kullanılmaktadır.

Çalışmamızda transplantasyon öncesi alınan serumlarında PRA negatif olan 12 renal transplant hastasından nakil sonrası alınan 1., 7., 14., 28. gün, 3. ve 6. ay, 1.yıl serumlarında lenfositotoksitite metodu ile HLA antikorlarını tespit etmeye çalıştık. Bu hastalardan sadece 1 tanesinde HLA antikorlarının varlığını tespit edebildik. Bu hastaya

3 HLA mismacht olan donörden renal transplantasyon yapılması sonucunda hastanın Post Tx 7. ve 14. günlerine ait serumlarında HLA-B63, HLA-A30, HLA-A68 antikorlarını tespit ettik. Çalışmamızın bu kısmında alıcılar ve donörlerinin doku grupları tespit edilmişti. Donör'de var olan HLA-A2 antijenine karşı alıcıda bu antijen bulunmadığından dolayı antikor oluşumu söz konusudur . Ancak bunun yanı sıra hasta serumunda HLA-B63, HLA-A30, HLA-A68 antikorlarının varlığı hastaya daha önceden kan nakli yapılmış olması ve birden fazla doğum yapmış olmasının bir sonucudur.

Kan transfüzyonu yapılmış kişilerden alınan serumlardan elde ettiğimiz non-spesifik HLA antikorları, laboratuvarımızda rutin HLA testlerinde pozitif kontrol olarak değerlendirilebilecektir. Çalışmamız daha kapsamlı bir şekilde düzenlenmesi ile daha fazla spesifik HLA antikorları elde edilerek yurt dışından oldukça yüksek maliyetlerde getirilen serolojik plaklar daha düşük maliyette laboratuvarımızda yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. “Majör Histocompatibility Complex”, (Çevrimiçi)
“<http://www.dorak.info/mhc/mhc.html>”, 14.06.2007.
2. “Majör Histocompatibility Complex”, (Çevrimiçi)
“[http://www.dadamo.com/wiki/wiki.pl/Major_Histocompatibility_Complex_\(MHC\)#Major_Histocompatibility_Complex_\(MHC\)2](http://www.dadamo.com/wiki/wiki.pl/Major_Histocompatibility_Complex_(MHC)#Major_Histocompatibility_Complex_(MHC)2)”, 06.10.2006.
3. Kerman RH and Stepkowski SM. Clinacal significance of HLA antigens and non-HLA antigens in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2006; 11: 418-424.
4. Halloran PF. The clinical importance of alloantibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2003; 3: 639-640.
5. Kılıçturgay K. İmmünoloji. Motif Matbaacılık. Nobel & Güneş Tıp Kitapevi. 2003; 261: 288.
6. Uçar F, Ovalı E, Değer O, Önder E, Kartı SS. MHC gen kompleksi ve HLA doku tiplemesi testlerinin önemi. *İbni Sina Tıp Dergisi*. 2001; 6: 117-124.
7. Temiz N. Akdeniz bölgesinde HLA (Human Leucocyte Antigens) tipleri ve sıklığının hesaplanması. Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans. Kahramanmaraş. 2005.
8. Benacerraf B and Germain RN. The immune response genes of the major histocompatibility complex. *Immunol Rev*. 1978; 38: 70–119.
9. Choo SY. Immunogenetics of the HLA system. *Yonsei Med J*. 1991; 32:1
10. Nelson KA. Human leukocyte antigen system and the immun response to it. *Clin Ortho R*. 1996; 326: 35-42.

11. Navarrete CV. The HLA system in blood transfusion. *Baillière's Clin Haematol.* 2000; 13:511-532.
12. "Transplantasyon İmmünolojisi", (Çevrimiçi)
"http://www.medicine.ankara.edu.tr/dahili_tip/nefroloji//files/Tximmunoloji.doc",
10.12.2006.
13. Choo SY. The HLA system: Genetics, immunology, clinical testing and clinical implication. *Yonsei Med J.* 2007; 48: 11-23.
14. "Transplantasyon ve immün yanıt", (Çevrimiçi)
"http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/v_cag/new_page_2.htm", 04.06.2007.
15. Abbas AK, Lichtman AH. *Basic Immunology*. Tercüme: Camcioğlu Y, Deniz G. *Temel İmmünoloji; İmmün sistemin işlev ve bozuklukları*. İstanbul Medikal Yayıncılık. İstanbul Tıp Kitapevi. 2007; 41-177
16. McCluskey J, Peh CA. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet.* 1999; 1: 3-20.
17. Jing P and Wang E. Polimorphism in clinical immunology - Form HLA typing to immunogenetic profiling. *J Trans Medicine.* 2003; 1: 1-8.
18. Lawlor DA, Zemmour J, Enis PD and Parham P. Evolution of class I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8: 23-63.
19. Geraghty DE. Structure of HLA class I region and exspression of resident genes. *Curr Opin Immunol.* 1993;5: 3-7.
20. Rollini P, Mach B, Gorski J. Linkage map of three HLA-DR beta chain genes: evidence for a recent duplication event. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1985; 82: 7197-7201.

21. Bjorkman PJ. The foreign antigen binding site and T cell recognition region of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 1987; 329: 512-518.
22. Ulbrecht M, Kellermann J, Johnson JP and Weiss EH. Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding. *J Exp Med*. 1992; 176: 1083-1090.
23. Braud VM, Allan DSJ., O'Callaghan CA et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors. *Nature*. 1998; 391: 795-797.
24. Loke YW and King A. Recent developments in the human maternal-fetal immune interaction. *Curr Opin Immunol*. 1991; 3: 762-766.
25. Parham P. Immunology: keeping mother at bay. *Curr Biol*. 1996; 6: 638-641
26. Le Boiteller P. HLA class I chromosomal region, genes and products: fact and question. *Crit Rev Immunol*. 1994; 14: 89-129.
27. "HLA Molecules, Biosynthesis and Expression", (Çevrimiçi)
"<http://www.dorak.info/mhc/mhc.html>", 14.06.2007.
28. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders. 2005; 65-369.
29. Güneş HV. Moleküler hücre biyolojisi. Etam. Kaan Kitabevi. 2003; 356.
30. Endert PV and Villadangos JA. Antigen processing and recognition. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19: 63-65.
31. Androlewicz MJ and Cresswell P. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity*. 1997; 1: 7-14.
32. Momburg F. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med*. 1994; 179: 1613-1623.

33. Anderson G, Larhammar D, Widmark E et al. Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of DR-beta genes. *J Biol Chem.* 1987; 262: 8748-8758.
34. Gustafsson K, Widmark E, Jonsson A et al. Class II genes of the human major histocompatibility complex. Evolution of the DP region as deduced from nucleotide sequences of the four genes. *J Biol Chem.* 1987; 262: 8778-8786.
35. Cho S, Ataya M, Monaco JJ. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature.* 1991; 353: 573-576.
36. Sanderson F and Trowsdale J. Kissing cousins exchange CLIP. *Curr Biol.* 1995; 5: 1372-1376.
37. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly AP et al. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science.* 1994; 266: 1566-1569.
38. Townsend A and Trowsdale J. The transporter associated with antigens processing. *Semin Cell Biol.* 1993; 4: 53-61.
39. Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/beta 2m associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature.* 1994; 369: 864-867.
40. Spies T and De Mars R. Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature.* 1991; 351: 323-324.
41. Kelly A, Powis SH, Kerr LA et al. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature.* 1991; 353: 667-668.
42. Goldberg AL. Functions of proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science.* 1995; 268: 522-523.

43. Denzin LK and Cresswell P. HLA-DM induced CLIP dissociation from MHC class II dimers and facilitates peptide loading. *Cell*. 1995; 82: 155- 165.
44. Davidson A and Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001; 345: 340-350.
45. Brewerton DA. Discovery: HLA and Disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2003; 15: 369-373.
46. Feltkamp TEW, Khan MA, Lopez de Castro JA. The pathogenetic role of HLA-B27. *Immunol Today*. 1996; 17: 5-7.
47. Dausset J. The HLA adventure. *Transplant Proc*. 1999; 31: 22–24.
48. Holgersson SS. HLA-specific alloantibodies and renal graft outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16: 897-904.
49. Ayna TK, Diler AS, Şentürk H et al. Flow cytometry ile panel reaktif antikorların belirlenmesi. *Klinik Gelişim Dergisi*.;22-25.
50. Gould DS, Auchincloss HJr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today*. 1999; 20: 77-82.
51. Erlebacher A. Why isn't the fetus rejected? *Curr Opin Immunol*. 2001; 13: 590-593.
52. Gaunt G, Ramin K. Immunological tolerance of the human fetus. *Am J Perinatol*. 2001;18(6):299-312.
53. Reed E, Beer AE, Hutcherson H et al. The alloantibody response of pregnant women and its suppression by soluble HLA antigens and anti-idiotypic antibodies. *J Reprod Immunol*. 1991; 20(2): 115-28.
54. Strirrat GM. Pregnancy and immunity. *J Brit Med*. 1994; 308: 1385-1386.
55. Ober C. HLA and pregnancy: The paradox of the fetal allograft. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 1-5.

56. Scornik JC, Salomon DR, Howard RJ et al. Evaluation of antibody synthesis in broadly sensitized patients. *Transplantation*. 1988; 45: 95-100.
57. Ting A. Problems of the strongly sensitized patient. *Transplant Proc*. 1983; 15:1198-1202.
58. “İmmünoloji, Hemato-Onk.,Genetik T.A.M.”, (Çevrimiçi)
“<http://www.florence.com.tr/tr/unitedetail.asp?Uid=59>”, 07.05.2007.
59. Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T et al. *Klinik Hematoloji*. Nobel Matbaacılık. Nobel Tıp Kitabevi. 2003; 307-325.
60. “Transfüzyon ve immodülasyon”, (Çevrimiçi).
“http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/v_cag/new_page_2.htm”, 12.11.2006.
61. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies, *Transplantation*. 2002; 74: 1192.
62. McKenna RM, Takemoto SK and Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000; 69: 319.
63. Rojo J and Janeway CJr. The biological activity of anti-T cell receptor variable region monoclonal antibodies is determined by the epitope recognize. *J. Immunol*. 1988; 140: 1081-1088.
64. Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM et al. B7, a new member of the IgG superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol*. 1889; 143: 2714-2722.
65. Game DS, Lenclerv RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Trans Immunol*. 2002; 10: 101-108.

66. Côté I, Rogers NJ, Lenchler RI. Allorecognition. *Transrus Clin Biol.* 2001; 8: 318-323.
67. “Rejection: The Allogeneic Immune Response”, (Çevrimiçi)
“http://www.medscape.com/viewarticle/436533_12”, 18.05.2006.
68. “Immunology of Transplant Rejection”, (Çevrimiçi)
“<http://www.emedicine.com/ped/topic2841.htm>”, 21.07.2006.
69. Hajeer AH. Panel reactive antibody test (PRA) in renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 2006; 17(1): 1-4.
70. Racusen LC and Haas M. Antibody-mediated rejection in renal allografts: Lessons from pathology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1: 415–420.
71. Pescovitz MD. B cells: a rational target in alloantibody-mediated solid organ transplantation rejection. *Clin Transplant.* 2005; 10: 399-439.
72. Afzali B, Lechler RI and Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: Clinical implications. *Tissue Antigens.* 2007; 69: 545–556.
73. Moll S and Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant.* 2005; 5: 2611–2618.
74. “HLA uyumu ve PRA'nın renal transplantasyona etkileri”, (Çevrimiçi)
“http://www.diyalizdernek.com/hdguzokulu/Doku_tiplendirme_HLA_sistemi_Dr_isil.ppt”, 26.03.2007.
75. Crew RJ and Ratnert LE. Overcoming immunologic incompatibility: Transplanting the difficult to transplant patient. *Seminars in Dialysis.* 2005; 18: 474-481.
76. Cicciarelli J, Helstab K, Mendez R. Flow cytometry PRA, a new test that is highly correlated with graft survival. *Clin Transplant.* 1992; 6: 159-164.

77. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S and Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol.* 1999; 60: 1293.
78. Mulder A, Kardol MJ, Kamp J et al. Determination of the frequency of HLA antibody secreting B-lymphocytes in alloantigen sensitized individuals. *Clin Exp Immunol.* 2001; 124: 9-15.
79. Claas FH, De Meester J, Witvliet MD et al. Acceptable HLA mismatches for highly immunized patients. *Rev Immunogenet.* 1999; 1: 351-358.
80. Smith JD, Danskin AJ, Laylor RM et al. The effect of panel reactive antibodies and the donor specific crossmatch on graft survival after heart and heart-lung transplantation. *Transplant Immunol.* 1993; 1: 60-65.