

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

**BÖBREK TRANSPLANTASYONUNDAN SONRA
DONÖRE ÖZGÜ ANTİKORLAR GELİŞEN ALICILARIN
DOLAŞIMINDAKİ CXCR5+PD-1+CD8+ FOLİKÜLER
SİTOTOKSİK T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN VE PD-1,
PDL-1 mRNA İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurten Sayın EKİNCİ

DOKTORA TEZİ

2022-ANTALYA

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

**BÖBREK TRANSPLANTASYONUNDAN SONRA
DONÖRE ÖZGÜ ANTİKORLAR GELİŞEN ALICILARIN
DOLAŞIMINDAKİ CXCR5+PD-1+CD8+ FOLİKÜLER
SİTOTOKSİK T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN VE PD-1,
PDL-1 mRNA İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurten Sayın EKİNCİ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fahri UÇAR

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 07/12/2022

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fahri UÇAR
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Hüseyin KOÇAK
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Tülün ÇORA
Selçuk Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi

.....

Üye : Doç. Dr. Sezin YAKUT UZUNER
Akdeniz Üniversitesi

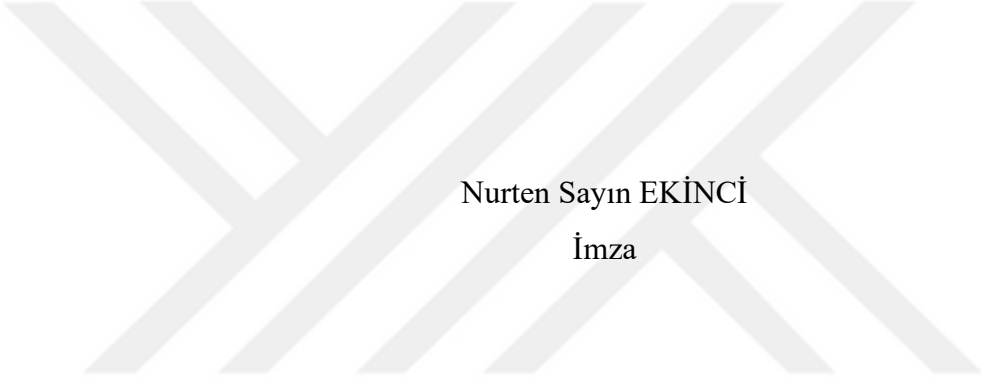
.....

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

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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



Nurten Sayın EKİNCİ
İmza

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Fahri UÇAR
İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince değerli bilgi ve tecrübelerini aktaran hem Ana bilim Dalı başkanımız hem danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fahri UÇAR'a

Doktora eğitimim sürecinde, destek ve bilgileri ile bana büyük katkıları olan, değerli zamanını ayıran bölümümüzün tüm kıymetli hocalarına ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Organ Nakli Kliniği'ndeki hastalara ve hasta verilerine ulaşmamı sağlayan Organ Nakli Kliniği hocalarına ve tüm çalışanlarına,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürüne, sekreterine ve tüm çalışanlarına,

Bugünüme kadar yaşamayı ve iyi bir insan olmayı öğrenmeye çalışırken varlıklarıyla ve zamansız mekânsız sevgileriyle herdem yanımda hissettiğim kıymetlilerim; anneme, kardeşlerime, eşime ve çocuklarıma,

Sonsuz teşekkür ve Saygılarımı sunarım...

Nurten Sayın EKİNCİ

ÖZET

Amaç: Donore özgü antikor gelişmesi böbrek nakli başarısının önündeki en büyük engellerden biri olup, DSA'ların ortaya çıkışı ile ilişkili biyolojik olaylar bilinmemektedir. Son yıllarda tanımlanan Foliküler Sitotoksik T hücre alt grubunun B hücrelerinin antikor üretimine yardım ettiği bildirilmiş ve bu hücre grubu ile DSA gelişimi arasındaki ilişki henüz aydınlatılmamıştır. Böbrek nakli olduktan 12 ay sonra DSA gelişen, DSA gelişmeyen alıcıların ve sağlıklı bireylerin periferik kan lenfositlerindeki $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ foliküler sitotoksik T hücre düzeyleri ile *PD1/PD-L1* genlerinin ifade seviyelerini incelemek, gözlenen mRNA ekspresyon ve protein seviyeleriyle korelasyonunu değerlendirmek bu tezde amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu araştırmada, 20 kişilik DSA gelişmiş hasta grubuyla aynı yaş ve cinsiyette olan 22 kişilik DSA gelişmemiş transplant ve 21 kişilik sağlıklı kontrol gruplarına ait periferik kan örneklerinden Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR yöntemi kullanılarak *PD-1*, *PD-L1* genlerinin ifade seviyeleri belirlendi. Akım Sitometri yöntemiyle hedef hücrelerin ekspresyon (%) düzeyleri değerlendirildi. Verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics for Windows Version 22 ve R.3.3.2 yazılımlarından yararlanıldı.

Bulgular: Hastalarda *PD-1* ve *PD-L1* ekspresyon seviyesi, transplant kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Akım Sitometri sonuçlarına göre hastalarda, transplant kontrol grubuna kıyasla $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ hücre ekspresyon (%) düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek seviyededir.

Sonuç: Böbrek transplantasyonu sonrasında nakil hastalarında DSA ile *PD-1/PD-L1* mRNA seviyesi ve $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ foliküler sitotoksik T hücre arasında doğru orantılı bir ilişki olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek Nakli, DSA, PD-1, PD-L1, $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ foliküler sitotoksik T hücre

ABSTRACT

Objective: The development of donor-specific antibody (DSA) is one of the biggest obstacles to the success of kidney transplantation, and the biological events associated with the emergence of DSAs have not yet been fully elucidated. The relationship between the Follicular Cytotoxic T cell subgroup, which has been identified in recent years, and the development of DSA, is unknown. The aims of this thesis are; To examine CD8+CXCR5+PD-1+ follicular cytotoxic T cell levels and expression levels of *PD1/PD-L1* genes in peripheral blood lymphocytes of healthy individuals and recipients who did not develop DSA 12 months after kidney transplantation to evaluate its correlation with observed mRNA expression and protein levels.

Methods: In this study, the expression levels of PD-1, PD-L1 genes were determined using the Real-Time Quantitative PCR method from peripheral blood samples of 22 patients with DSA developed, 20 patients with DSA underdeveloped transplant and 21 healthy control groups of the same age and sex. Expression (%) levels of target cells were evaluated by flow cytometry method. IBM SPSS Statistics for Windows Version 22 and R.3.3.2 software were used to evaluate the data.

Results: PD-1 and PD-L1 expression levels were higher in the patients compared to the transplant control group. According to the results of flow cytometry, CD8+CXCR5+PD-1+ cell expression (%) levels were found to be significantly higher in patients compared to the transplant control group.

Conclusion: It shows that there may be a direct correlation between DSA and PD-1 / PDL-1 mRNA level and CXCR5+PD1+CD8+ follicular cytotoxic T cell in transplant patients after kidney transplantation.

Keywords: Kidney Transplantation, DSA, PD-1, PD-L1, CD8+CXCR5+PD-1+T cell

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.	HLA Class I ve HLA Class II Donöre Özgü Antikorlar	28
Tablo 3.1.	Kantitatif PZR’de Kullanılan Primerler	62
Tablo 3.2.	Kantitatif PZR Kimyasal Protokolü	63
Tablo 3.3.	Kantitatif PZR Reaksiyon Koşulları	63
Tablo 4.1.	Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri	70
Tablo 4.2.	Hastaların HLA-Class Pozitifliklerine Göre Dağılımı	71
Tablo 4.3.	PRA pozitif hastaların Single Antijenleri	72
Tablo 4.4.	Transplant kontrol grubunun HLA sınıflarına göre PRA yüzdeleri, donör tipi, HLA uyumları ve nakil sonrası kullandıkları ilaçlar	75
Tablo 4.5.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	76
Tablo 4.6.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin karşılaştırılması	77
Tablo 4.7.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-L1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	79
Tablo 4.8.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-L1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin karşılaştırılması	72
Tablo 4.9.	Hasta ve Kontrol Gruplarının Akım Sitometri Sonuçlarının Yüzde (%) Düzeyleri	81
Tablo 4.10.	Hasta ve Kontrol Gruplarında CD8+CXCR5+PD-1+ T hücre yüzdelerinin karşılaştırılması	82

Tablo 4.11.	Hasta ve Kontrol Gruplarında CD4+CXCR5+PD-1+ T hücre yüzdelерinin karşılaştırılması	83
Tablo 4.12.	Hasta ve Kontrol Gruplarında lenfositlerdeki CXCR5+ hücre yüzdelерinin karşılaştırılması	84
Tablo 4.13.	Hasta ve Kontrol Gruplarında lenfositlerdeki PD-1+ hücre yüzdelерinin karşılaştırılması	86
Tablo 4.14.	HLA-Class I+ , HLA-Class II+ ve HLA-Class I ve Class II + gruplarının gen ekspresyon ve hücre yüzde karşılaştırması	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	GFH ve Albimüniri Kategorilerine Göre Kronik Böbrek Hastalığı Prognozu (KDIGO 2012)	4
Şekil 2.2.	HLA Gen Bölgesi ve HLA Sınıfları	15
Şekil 2.3.	Antikor Aracılı Rejeksiyonda DSA Patogenezi	27
Şekil 2.4.	Böbrek Rejeksiyonu ve T hücre Yanıtı	40
Şekil 2.5.	PD-1 ve PD-L1 Gen Yapısı	50
Şekil 2.6.	PD-1 ve PD-L1 Protein Yapıları	52
Şekil 2.7.	PD-1 PD-L1 Sinyal Yolağı	54
Şekil 3.1.	Örnek Amplifikasyon Eğrileri	61
Şekil 3.2.	PD-1 Amplifikasyon Eğrileri	64
Şekil 3.3.	PD-L1 Amplifikasyon Eğrileri	65
Şekil 4.1.	Hasta ve Transplant Kontrol Gruplarında PD-1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	77
Şekil 4.2.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	78
Şekil 4.3.	Hasta ve Kontrol Gruplarında PD-L1 Gen Ekspresyon Ölçümleri	80
Şekil 4.4.	Hasta ve Kontrol Gruplarında CD8+CXCR5+PD-1+ T hücre yüzdeleri	83

- Şekil 4.5.** Hasta ve Kontrol Gruplarında CD4+CXCR5+PD-1+ T hücre yüzdeleri 84
- Şekil 4.6.** Hasta ve Kontrol Gruplarında Lenfositlerindeki CXCR5+ hücre yüzdeleri 85
- Şekil 4.7.** Hasta ve Kontrol Gruplarında Lenfositlerindeki PD-1+ hücre yüzdeleri 86
- Şekil 4.8.** HLA-Class I+ , HLA-Class II+ ve HLA-Class I ve Class II + 88 gruplarının PD-L1 gen ekspresyon seviyeleri
- Şekil 4.9.** HLA-Class I+ , HLA-Class II+ ve HLA-Class I ve Class II+ 89 gruplarının PD-L1 gen ekspresyon seviyeleri

SİMGELER ve KISALTMALAR

AR	: Akut Rejeksiyon
ABMR	: Antikor Aracılı Rejeksiyon
ASH	: Antijen Sunan Hücre
ATG	: Antitimosit Globülin
bç	: Baz Çifti
C1q	: Kompleman Bileşeni 1q
CDC	: Kompleman Bağımlı Sitotoksiste
CsA	: Siklosporin A
CNI	: Kalsinörin İnhibitörleri
CXCL13	: C-X-C motif ligand 13
CXCR5	: C-X-C Motif Kemokin Reseptör 5
DSA	: Donöre Özgü Antikor
DC	: Dendritik Hücre
DAMP	: Hasar İlişkili Moleküler Patern
FCXM	: Akım Sitometrik Cross Match
GFH	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GC	: Germinal Merkez
HLA	: İnsan lökosit Antijen

IFN	: İnterferon
Ig	: İmmünoglobulin
IL	: İnterlökin
IMPDH	: İnozin Monofosfat Dehidrojenaz
ITIM	: İmmünreseptor Tirozin Bazlı İnhibitör Motif
ITSM	: İmmünreseptor Tirozin Bazlı Anahtar Motif
IVIG	: İntravenöz İmmünglobulin
KDIGO	: Kidney Disease Improving Global Outcomes
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
KDPI	: Kidney-Donor Profile Index
LCN2	: Lipokalin 2
LCM	: Lenfosit Cross Match
mAb	: Monoklonal Antikor
MFI	: Ortalama Floresan Yoğunluğu
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MICA	: MHC Class I İlişkili A Bölgesi Antijenleri
MMF	: Mikofenolat Mofetil
MPA	: Mikofenolik Asit
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi

NK	: Natural Killer
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölümü-1
PD-L1	: Programlı Hücre Ölüm Ligandı-1
PD-L2	: Programlı Hücre Ölüm Ligandı-2
PI3/AKT	: Fosfoinositid 3 kinaz/Akt
PRA	: Panel Reaktif Antikor
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homologu
PTK	: Protein Tirozin Kinaz
PZR(PCR)	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDBY	: Son Dönem Böbrek Yetmezliği
SSP	: Sekans Spesifik Primer
SSO	: Sekans Spesifik Oligonükleotit
TAC	: Takrolimus
Tcf-1	: T Cell Factor 1
Tcf-7	: Transkripsiyon Faktör 7
TCMR	: T-Hücre Aracılı Rejeksiyon
TCR	: T hücre reseptörü
TDIS	: Transplantasyon, Diyaliz ve İzlem Sistemleri
Tfc	: Foliküler Sitotoksik T Hücre

Tfh : Foliküler Yardımcı T Hücre

Th : Yardımcı T Hücreleri

TLR : Toll Like Reseptör

TND : Türk Nefroloji Derneği

Treg : Regülatör T Hücre

ZAP-70 : Zeta Zincir İlişkili Protein Kinaz-70

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
İÇİNDEKİLER	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kronik Böbrek Hastalığı (KBY)	4
2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	5
2.1.2. Risk Faktörleri	5
2.2. Böbrek Yerine Koyma Tedavileri	7
2.2.1. Diyaliz	7
2.2.2. Böbrek Nakli	7
2.2.3. Böbrek Nakli'nin Tarihçesi	9
2.2.4. Böbrek Nakli Hazırlık Süreci	10
2.3. Böbrek Naklinde İmmünogenetik Testler	11
2.3.1. Kan Grubu Antijenleri	11
2.3.2. HLA Doku Grubu Testleri	12
2.3.3. Serolojik Yöntemle HLA Tipleme	17
2.3.4. Moleküler Sekansa Özgü Primer Yöntemiyle HLA Tipleme (SSP)	17
2.3.5. Moleküler Diziyeye Özgü Oligonükleotit Primer Yöntemiyle HLA Tipleme (SSO)	18
2.3.6. Panel Reaktif Antikor Testleri	18
	xi

2.3.7. Cross-match Testleri	19
2.4. Böbrek Naklinde Rejeksiyon Sebepleri	21
2.4.1. Hücre Aracılı Rejeksiyon	22
2.4.2. Hümorale Rejeksiyon	22
2.4.3. Hiperakut Rejeksiyon	23
2.4.4. Akut Rejeksiyon	23
2.4.5. Kronik Rejeksiyon	24
2.5. Böbrek Nakli Alıcılarında Donöre Özgü Antikorlar	24
2.5.1. DSA Patogenezi	25
2.5.2. DSA Sınıfları ve Özgünlük	27
2.5.3. DSA Gücü	29
2.5.4. Kompleman Bağımlı DSA	30
2.5.5. DSA IgG Alt Sınıfları	31
2.5.6. HLA Dışı Antikorlar	33
2.5.7. DSA ve Akut Antikor Aracılı Rejeksiyon	34
2.5.8. Akut Antikor Aracılı Reddin Tedavisi	35
2.5.9. DSA ve Kronik Antikor Aracılı Rejeksiyon	36
2.5.10. Kronik Antikor Aracılı Reddin Tedavisi	37
2.6. Böbrek Rejeksiyonunun T hücre yanıtı ile ilişkisi	39
2.6.1. Yardımcı T Hücreleri	41
2.6.2. Gamma/delta ($\gamma\delta$) T Hücreleri	42
2.6.3. Sitotoksik T Hücreleri	43
2.7. Foliküler Sitotoksik T hücreleri	45
2.7.1. Foliküler Sitotoksik T Hücrelerinin Transkripsiyonel Profili	46
2.7.2. Foliküler Sitotoksik T Hücre Lokalizasyonu ve Fonksiyonu	48
2.8. PD-1 PD-L1 Yolağı	49
2.8.1. PD-1, PD-L1' in Böbrek Nakli ile ilişkisi	54
3. GEREÇ ve YÖNTEM	56

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımlanması	56
3.2. Etik Kurul Onayı	58
3.3. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı	58
3.4. Gerçek Zamanlı PZR Optimizasyon Çalışmaları	58
3.4.1. RNA İzolasyonu	59
3.4.2.cDNA Sentezi	60
3.4.3.Kantitatif PZR Zincir Reaksiyonu	61
3.5. Akım Sitometri Çalışmaları	66
3.5.1. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri İzolasyonu	67
3.5.2. Yüzey Antikor Boyama Prosedürü	68
3.6. İstatistiksel Analiz/Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	69
4. BULGULAR	70
5. TARTIŞMA	90
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	99
KAYNAKLAR	104
EKLER	138
ÖZGEÇMİŞ	143

1. GİRİŞ

Donöre özgü antikorlar (DSA), antikor aracılı reddi tahmin eden bir biyobelirteç olarak organ nakli kliniklerinde kullanılmaktadır (Zachary ve Leffell, 2008). DSA sonucu greft kaybını engellemek için günümüzde kullanılan stratejik tedavi seçenekleri; spesifik olmadıklarından, çok geç uygulandıklarından veya antikorların kaynağını hedeflemede etkisiz olduklarından dolayı sınırlı etkiye sahiptirler (Trpkov ve ark., 1996; McKenna ve ark., 2000). Böbrek transplantasyonunun başarısını artırmak, sonuçlarını iyileştirmek ve yeni stratejilerin geliştirilmesine rehberlik etmek için DSA'ların oluşumuna, gelişimine, kalıcılığına ve faaliyetine yol açan mekanizmaların daha iyi anlaşılması gereklidir.

T hücre immünoterapilerinin ve CD4⁺ T hücrelerini hedefleyen geleneksel idame immünosupresif ajanların kullanılmasına rağmen, de novo DSA gelişimi, hepatosit ve solid organ nakillerinin ~%20 - %40' ında meydana geldiği gözlenmiştir (Colvin ve Smith, 2005; Shimizu ve Colvin, 2005). Deneysel transplant modellerinde alloantikor üretimini ve reddini baskılayan birlikte uyarıcı blokaj terapileri ile umut verici sonuçlar, insanlarda kostimülatör blokajın etkinliğini test eden klinik çalışmaların yolunu açmıştır (Lenschow ve ark., 1992; Larsen ve ark., 1996; Regele ve ark., 2002; Adams ve ark., 2002; Shimizu ve Colvin, 2005; Larsen ve ark., 2005). CD8⁺ T hücreleri, sitolitik molekülleri salma kapasiteleri ve/veya interferon- γ (IFN- γ) gibi efektör sitokinleri üretme kapasiteleri ile antitümör yanıtlarında yer alan en önemli hücre tiplerinden birini temsil eder. Baskılayıcı fonksiyonlara sahip CD8⁺ T hücrelerinin patolojik koşullara ve lokalizasyonlara bağlı olarak farklı işlevlere sahip yeni alt kümeleri tanımlanmıştır (Gri ve ark., 2014; Dotiwala ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2018). CD8⁺ T hücrelerinin bir alt kümesinin B hücresi foliküllerinde lokalize olmak için CXCR5 ifade ettiği bulunmuştur. Tanımlanan bu yeni CD8⁺ T hücrelerinin işlevsel olarak CXCR5⁺CD4⁺ foliküler yardımcı T hücrelerine benzediği ancak foliküler yardımcı CD4 T hücrelerinden farklı olarak fenotip bakımından C-C chemokine receptor type 7 (CCR7)' yi daha az eksprese ettiği tespit edilmiştir. Germinal merkezdeki B hücreleri üzerindeki karşılık gelen ligandlarıyla etkileşime girerek otoimmün yanıtları ve otoantikor üretimini düzenlediği bilinmektedir. Tüm bu

bilimsel çalışmaların ışığında CXCR5⁺PD-1⁺CD8⁺T hücre grubu keşfedilmiş ve foliküler sitotoksik T hücreleri olarak adlandırılmıştır (Kang ve ark., 2002; Okazaki ve Honjo, 2007; Hong ve ark., 2012; Mueller ve ark., 2013; Fukazawa ve ark., 2015; Leong ve ark., 2016; Ferrando-Martinez ve ark., 2018). PD-1'in endojen ligandı olan PD-L1'in, periferik transplantasyon toleransı ve kronik allogreft reddini korumak için gerekli bir faktör olduğu gösterilmiştir. PD-1/PD-L1 yolağı, nakil sonrası seyir boyunca bağışıklık toleransının korunmasında etkili olmaya devam etmektedir (Özkaynak ve ark., 2002; del Rio ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada periferik kan hücrelerindeki PD-1 mRNA seviyelerinin böbrek transplantasyonu sonrası akut rejeksiyonun şiddeti ile allogreftinin sağkalımı üzerinde pozitif olarak etkileyebileceği ve böbrek transplantasyonundan sonra akut reddine karşı yeni bir tedavi olarak PD-1/PD-L1'e müdahale etmenin olası olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2011). Transplant alıcılarında DSA üretimini düzenleyen immün mekanizmalar iyi anlaşılmasa da, fare modellerinde yeni immüno-düzenleyici yollar tanımlanmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada böbrek naklinden sonraki ilk yılda de novo DSA üretimi ile periferik kan CXCR5⁺IFN- γ ⁺CD8⁺ T hücrelerinin miktarı arasında zıt yönlü bir ilişki bulunmuştur (Zimmerer ve ark., 2020). Bu bulgulara dayanarak, aktive edilmiş fenotipli bu yeni tanımlanmış foliküler sitotoksik T hücre alt grupları, böbrek transplantasyonundan sonra antikor üretiminde etkili olabilir. Foliküler sitotoksik T hücreleri, benzersiz CXCR5 ekspresyonu, yüksek PD-1 ve CD8 seviyesi ile ayırt edilebilir (Quigley ve ark., 2007). CD8⁺ T hücrelerinin bu alt grubunun aşı tepkileri, patojen enfeksiyonları ve otoimmünite üzerindeki rolleri belirtilmiş olsa da transplantasyonu takiben allogreft reddinde ve alloantikor yanıtlarındaki rolü büyük ölçüde keşfedilmemiştir (Mueller ve ark.,2013).

Foliküler sitotoksik T hücrelerinin tanımlanması, B hücrelerini ve foliküler sitotoksik T hücrelerini hedefleyen enfeksiyonları kontrol etmeye ve B hücresinden türetilmiş maligniteleri tedavi etmeye yönelik stratejilerin geliştirilmesi için geniş kapsamlı çıkarımlara sahiptir.

Bu nedenlerle CXCR5⁺PD-1⁺CD8⁺ foliküler sitotoksik T hücrelerinin periferik dolaşımdaki ekspresyonunu ve PD-1/PD-L1 genlerinin ifade seviyelerini belirleyerek böbrek nakli alıcılarında DSA'nın gelişimi ile ilişkisini belirleyebileceğimizi

varsaydık. Bu hipotezi araştırmaya başlamak için ileriye dönük ve seri olarak böbrek nakli alıcılarında nakil sonrası ilk yıl boyunca de novo DSA gelişimi ile periferal kan CXCR5⁺PD-1⁺CD8⁺ foliküler sitotoksik T hücresi dağılımlarını ve *PD-1/PD-L1* genlerinin ifade seviyeleri ile ilişkisini literatürde eksik olduğu için araştırmayı hedefledik. Kronik rejeksiyon tedavisinde yeni bir hedef olarak bu bulgunun kullanılabileceğini düşünmekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik böbrek hastalığı (KBH), kalıcı böbrek hasarı veya ilerleyici ve geri dönüşümü mümkün olmayan böbrek fonksiyonu kaybı ile karakterize edilen uzun süreli bir durumdur (Akoğlu ve Süleymanlar, 1996; Romagnani ve ark., 2017). KBH için ortak bir tanım ve evrelendirme yapılmıştır. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) ve National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQI) tarafından 2012 yılında hazırlanan klavuz ile böbrek fonksiyonunun derecesine göre hastalığın tanımı ve evrelendirilmesi yapılmıştır. Sağlığa olumsuz etkileri olduğu bilinen, 3 aydan fazla zamanda devam eden, böbreğin fiziksel yapısı ve işlevindeki normal dışı durumlar bu kılavuza göre KBH olarak tanımlanmıştır (Levin ve ark., 2013) (<https://kdigo.org/guidelines>, Erişim Tarihi: 8 Şubat 2022). Böbrek fonksiyon indeksi, glomerüler filtrasyon hızı (GFH) ve böbrek hasar belirteçleri kullanılarak 5 evreye sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1.).

				Persistan Albüminüri Kategorileri		
				A1	A2	A3
				Normal / yüksek normal	Yüksek	Çok yüksek
				<30 mg/gr <3 mg/mmol	30-300 mg/gr 3-30 mg/mmol	>300 mg/gr >30 mg/mmol
GFH Kategorileri (ml/dk/1,73 m ²)	G1	Normal veya yüksek	≥90			
	G2	Hafif azalmış	60-89			
	G3a	Hafif - orta derecede azalmış	45-59			
	G3b	Orta - şiddetli derecede azalmış	30-44			
	G4	Şiddetli azalmış	15-29			
	G5	Böbrek yetmezliği	<15			

Şekil 2.1.GFH ve Albimüniri Kategorilerine Göre Kronik Böbrek Hastalığı Prognozu (KDIGO 2012)

Yeşil: Düşük Risk, Sarı: Orta Derecede Artmış Risk, Turuncu: Yüksek Risk, Kırmızı: Çok Yüksek Risk. (Levin ve ark., 2013) (<https://kdigo.org/guidelines>, Erişim Tarihi: 8 Şubat 2022).

KBH tanısı için böbrek fonksiyonunun ve böbrek hasarının değerlendirildiği testler yapılmaktadır (Rosner ve Bolton, 2006). Klinik uygulamada böbrek hasarının tespit edilmesinde çoğunlukla albüminüri veya proteinüri belirteç olarak kullanılır. Sağlıklı bireylerde günlük ortalama albümin atılımı 30 mg'ın altında iken protein atılımı ise 150 mg'ın altında olmalıdır. Bu değerlerin artışı ile albüminüri veya proteinüriden bahsedilir ki üç aydan fazla bir zaman diliminde devam etmesi ise böbrek hasarının belirtisi olarak kabul edilir (Akoğlu ve Süleymanlar, 1996).

Böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesi için serum kreatinin düzeyi, glomerüler filtrasyon hızı, insülin klirensi, radyonüklid yöntemler, endojen kreatinin klirensi ve bazı klinik değişkenler değerlendirilir (McMahon ve Waikar, 2013).

2.1.1. Epidemiyoloji ve Etyoloji

KBH'nın küresel prevalansı % 9,1 olup yakın dönemde yayınlanan bir çalışmada dünya genelinde 700 milyon hasta bulunduğu bildirilmiştir (Hill ve ark., 2016). Türkiye'de yetişkinlerde KBH prevalansı % 15,7 olarak, kadınlarda % 18,4 ve erkeklerde ise % 12,8 tespit edilmiştir (Süleymanlar ve ark., 2011). Yapılan bu çalışmanın sonucuna göre neredeyse her 6-7 yetişkinin birinde farklı evrelerde KBH görülmektedir. Hastalığın ilerleme süreci göz önüne alındığında ilk evrelerde sessiz seyrettiğinden, KBH'nın tespiti ve erken tanısı önemlidir. Dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda, hastalığın farkındalığının %10 ve üzerini geçemediğini göstermiştir (Tuot ve ark., 2011). Türk Nefroloji Derneği (TND) tarafından ülkemizdeki KBH farkındalığının yüzde 2'nin altında olduğu rapor edilmiştir. KBH, hastalığa olan bilinç ve farkındalık düzeyinin az olmasından dolayı Son Dönem Böbrek Yetmezliği (SDBY) safhasına ilerlemektedir. Hastalar; yüksek morbidite ve mortalite oranlarının yanı sıra kötü yaşam koşulları ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu durum ise uygulanması gereken yüksek maliyetli tedavileri gerekli kılmaktadır (Süleymanlar ve ark., 2011).

2.1.2.Risk Faktörleri

Klinikte erken teşhis ve tedavi yöntemi, hastalığın mortalite ve morbiditesini azaltacağından oldukça önemlidir (Qureshi ve ark., 2002). Kronik böbrek hastalığı gelişimi bakımından belirgin risk faktörlerini sıralayacak olursak diabetes mellitus,

hipertansiyon, kalp ve damar hastalıkları, yaşın ilerlemiş olması, ailede bilinen böbrek hastalığı varlığı, obezite, üriner sistem problemleri, otoimmün hastalığın varlığı, nefrotoksik olduğu bilinen ilaçların alınması ve akut böbrek hasarı geçirme öyküsünün varlığıdır (Romagnani ve ark., 2017). Bunların yanı sıra farklı yaşam koşulları başta olmak üzere çevresel ve genetik faktörler, sigara kullanımı, eğitim düzeyinin düşük olması, sosyoekonomik durumun yetersizliği, doğum ağırlığının normalin altında olması gibi faktörler de KBH geliştirme riski bakımından yatkınlığı oluşturan koşullardır (Romagnani ve ark., 2017). Bu durumların çoğunluğu eş zamanlı olarak KBH'nın ortaya çıkmasını sağlayan etyolojik nedenleri de kapsamaktadır. Dünya'da ve ülkemizde tüm zamanlar için erişkinlerde KBH'nın görülmesinin nedenleri arasında önde gelen en önemli neden Diyabet (Diabetes Mellitus) hastalığıdır. Diyabetten sonra etyolojik dağılımda hipertansiyon ikinci sırada yer almaktadır (Hill ve ark., 2016). Hemen hemen her yaş grubunda görülebilen glomerülofritler ise üçüncü sırada bulunmaktadır. KBH'nın etyolojisinde yer almakta olan diğerk nedenler olarak genetik böbrek hastalıkları (polistik böbrek hastalığı gibi), ürolojik problemler ve tübülointerstisyel nefritler gibi sağlık problemleri göz önünde bulundurulabilir (Süleymanlar ve ark., 2013). Hastalar çoğu zaman KBH'nın yaklaşık olarak son evresinde Nefroloji kliniklerine geldiğı için hastalığın nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, “nedeni bilinmeyen KBH” da etyolojik dağılım içinde önemli bir yer tutmaktadır (Naqvi ve Collins, 2006). Risk faktörlerinin yanı sıra KBH'nda erken evrelerden sonra, özellikle kardiyovasküler sebeplerden dolayı günümüzde morbidite ve mortalite riskleri artmıştır (Foley ve ark., 1998).

Hastalık ilerledikçe risk artışı daha da artmakta ve hastaların büyük çoğunluğu henüz son evreye dahi ulaşmadan yaşamlarını kaybetmektedir (Danovitch, 2003; Levin ve ark., 2013). Hastalığın yol açtığı sorunlar nedeniyle Dünya genelinde her yıl yaklaşık 2.5 milyon kişinin hayatını kaybettiğı tahmin edilmektedir, KBH'nın sessiz fakat çok önemli bir sağlık sorunu olduğu bu nedenle unutulmamalı, etyolojik nedenlerle özellikle risk altındaki bireyler öncelikli olarak KBH bakımından taranmalıdır (Smart ve ark., 2014). Hastalık mümkün olduğu kadar en erken dönemlerde saptanmalı, korunma ve tedavi girişimlerine aciliyetle başlanmalıdır. KBH nin en şiddetli evresi SDBY'dir. SDBY gelişen hastaların bozulan böbrek fonksiyonları ile yaşamlarını

sürdüremeleri için bozulan böbrek fonksiyonuna benzer yerine koyma tedavilerinin mutlaka uygulanması gerekir (Danovitch, 2003; Levin ve ark., 2013).

2.2. Böbrek Yerine Koyma Tedavileri

Böbrek yerine koyma tedavileri başlıca diyaliz (hemodiyaliz ve periton diyalizi) ve böbrek nakli gibi iki temel seçenekten oluşur (Pippas ve ark., 2017; Shrestha ve ark., 2010).

Tüm dünyada en sık uygulanan diyaliz yöntemi hemodiyaliz olmakla beraber, hastanın hayat kalitesini arttıran en seçkin tedavi ise böbrek naklidir (Pippas ve ark., 2017; Shrestha ve ark., 2010).

2.2.1. Diyaliz

Diyaliz böbreğin atılım fonksiyonunu devam ettiren önemli ve temel bir tedavi yöntemidir (Alexander ve ark., 1994). Başlıca hemodiyaliz ve periton diyalizi olarak iki diyaliz uygulama metodu mevcut olmakla bu iki yöntemde de vücutta biriken fazla su ve toksinler, yarı geçirgen bir membran vasıtasıyla kandan diyaliz solüsyonuna geçerek temizlenir (Alexander ve ark., 1994). Diyaliz yöntemine hastanın o anki sahip olduğu klinik gözlemi ve kişisel seçeneği göz önünde bulundurularak hangi yöntemin uygulanacağına karar verilmektedir (Pippas ve ark., 2017). Çocuk hastalarda özellikle daha esnek diyet alımı seçeneği ile sosyal etkinliklere dahil olmayı daha az engellemesi nedeniyle periton diyalizi avantajlı bir seçenek sunmaktadır. Son yıllarda diyaliz teknolojisindeki gelişmeler yaşanmasına rağmen, genel nüfus ile kıyaslandığında bu hastalarda morbidite ve mortalite oranları halen yüksek olmaya devam etmektedir (Alexander ve ark., 1994).

2.2.2. Böbrek Nakli

Böbrekler toksinlerin, yabancı maddelerin ve metabolik artıkların vücudumuzdan atılımını sağlar (Altınören ve ark., 2017). Boşaltım sisteminin bir parçası olmasının yanı sıra endokrin ve metabolizma, kan basıncı, su-elektrolit ve asit-baz dengelerinin düzenlenmesi, ilaçların vücuda Emilimi, dağılımı, dönüşümü ve atılması gibi birçok önemli işlevi vardır (Altınören ve ark., 2017). Diyaliz, yalnızca böbreğin boşaltım işlevini sürdürmesine yardım eden bir tedavi yöntemidir. Böbreğin tüm işlevlerinin yeniden kazandırılması ise başarılı olarak yapılan bir böbrek naklinden sonra

gerçekleşebilir. Bu sebeple, böbrek nakli hayati bir öneme sahip olup ideal bir tedavi yöntemidir (Sumida ve Kovesdy, 2017). Hastaların günlük yaşam standartlarını iyileştirmesinin yanısıra yaşam sürelerinin de kaydadeğer bir şekilde uzamasını sağlar. Ortalama yaşam beklentisi diyaliz tedavisi gören bir hastada 7 yıl iken, böbrek nakli ise bu sürenin yaklaşık olarak 18-20 yıla kadar uzamasını sağlar (Cooper ve ark., 2010). Bununla birlikte, diyaliz ile kıyaslandığında böbrek naklinin maliyeti daha düşüktür (Shrestha ve ark., 2010). KBH'lı hastalara özellikle ilerleyici evre 4'den sonra böbrek nakli hakkında bilgi verilmelidir. Evre 5'e ulaşan SDBY olan hastalar ise herhangi bir olumsuz etkiye neden olacak duruma sahip olmayan hastalarda, özellikle henüz diyaliz tedavisine alınmamış olma durumları bakımından değerlendirilmeli ve böbrek nakli planlanmalıdır (Süleymanlar ve ark., 2019).

Böbrek nakli canlı veya kadavradan olmak üzere iki tür donörden yapılabilir. Bunlar arasında nakil için en ideal olanı, eğer mümkünse kadavra donörden yapılmasıdır. Canlıdan organ bağıışı genellikle akrabalar arasında yapılmaktadır. Akrabalık bağı dördüncü dereceye kadar yakın olan kişiler arasında nakil etik kurul kararıyla gerçekleştirilebilir (Kocak ve ark., 2004; Altınanahtar, 2016). Canlı donörden yapılan nakilde, donörün organlarından birini kaybetmesi, tıbbi olarak girişimsel işleme maruz kalması ve bir süre tıbbi denetim altında olması gibi olumsuzluklar gözlenmektedir. Hayatını yitirmiş bir bireyin organ ve dokuları ile yapılan bir nakil ise daha fazla kişiye yeni yaşam şansı verme özelliğı ile daha avantajlı durumdadır (Kocak ve ark., 2004; Altınanahtar, 2016). Günümüzde Avrupa ülkelerinde bu sebeple organ nakli için canlı donöre kıyasla daha çok kadavra donörler tercih edilmektedir. Türkiye'de kadavradan böbrek nakli yapılma oranı toplam yüzdenin sadece % 20-30'unu oluşturmaktadır. Organ nakil merkezlerinde canlı donöre sahip olmayan hastalar gerekli incelemeleri yapıldıktan sonra kadavradan nakil için Ulusal Böbrek Bekleme Listesine kaydedilirler (Kocak ve ark., 2004; Altınanahtar, 2016). Nakil düzeni ve koordinasyonu Sağlık Bakanlığı kontrolü altında yapılmaktadır. Bakanlığa bağılı olarak oluşturulan Ulusal Doku ve Organ Nakli Koordinasyon Sistemi kurum ve kuruluşlar arasında gerekli düzeni sağlamaktadır. Bağışlanan organ ve dokuların tıbbi etik ve bilimsel kurallara uygun olarak adaletli bir şekilde dağıtılmasını, en kısa süre içerisinde en uygun hastalara, naklini sağlamak için oluşturulmuştur. 2009-2022 yılları arasında T.C. Sağlık Bakanlığı Transplantasyon, Diyaliz ve İzlem Sistemleri

(TDİS)’ne kayıtlı 39.088 böbrek nakli yapılmıştır. Bu nakillerin 31.310 tanesi böbrek nakli canlı donörden yapılmıştır. Türkiye’de Sağlık Bakanlığı verilerine göre T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Organ ve Doku Bilgi Sistemi (TODBS)’ne kayıtlı 2022 yılında ise toplam 2.683 böbrek nakli yapılmıştır (<https://organkds.saglik.gov.tr>, Erişim tarihi: 01 Ekim 2022).

2.2.3. Böbrek Nakli’nin Tarihçesi

Böbrek naklinin tarihi, birçok başarısız girişimin, aksiliğin, ama aynı zamanda azim, öncü ruh ve kırılmayan cesaretin hikâyesidir ki bu hayalin gerçekleşmesi 20. yüzyılın sonlarını bulmuştur. 1902’de Avusturyalı Emerich Ullmann (1861–1937) tarafından bir köpek böbreğinin ilk deneysel transplantasyonu ile başlar (Ullman, 1914). Bir böbreğin ilk insan ksenotransplantasyonu 1906’da Lyon’da Mathieu Jaboulay (1860-1913) tarafından gerçekleştirildi. Bright hastalığı olan ve ilerleyici böbrek yetmezliği olan 49 yaşındaki bir kadına bir domuzun böbreğini nakletti. Greft sadece saatlerce çalıştı ancak 3 gün sonra öldü (Jaboulay, 1906). Bunu, 1909’da insan kadavra böbreklerini maymunlara aktarma girişimleri ve sonraki yıl ilk insan ksenotransplantasyonu izledi (Unger, 1909). Daha sonra köpekler, maymunlar, keçiler ve kuzular üzerinde yapılan deneyler başarılı olamadı. İlk insandan insana transplantasyon girişimi, 1911’de Philadelphia’da Amerikalı cerrahlar Levi Hammond (1861–1930) ve Howard Sutton (1873–1940) tarafından denendi, ancak başarısız oldu. Birinci Dünya Savaşı nedeniyle deneysel böbrek cerrahisine birkaç yıllık zorunlu ara verildi. Bir başka böbrek nakli denemesi 1933’te yapıldı ve 1936’da İspanyol El Siglo Medico dergisinde yayınlandı. 1933’te gerçekleştirilen nakil ilk kadavradan böbrek nakli olup Rus Yurii Voronoy tarafından gerçekleştirildi (Voronoy, 1937). Ukraynalı cerrah Yurii Voronoy (1895-1961), civa zehirlenmesinden kaynaklanan akut böbrek yetmezliği çeken 26 yaşındaki bir kadına kadavra böbreği nakletti. Voronoy, civa zehirlenmesinin neden olduğu bağışıklık sisteminin bloke edilmesinin, allogreftin daha iyi kabul edilmesine yol açacağını umuyordu. Farklı kan grubu ile yapılan transfüzyon sonucu, idrar çıkışı olmasına rağmen organ yetmezliği meydana geldi. Hasta sadece birkaç gün hayatta kaldı ve donörden alınan organ çalışmadı (Voronoy, 1937). 1953’te Jean Hamburger, en azından kısa bir süre için, nakil için ilk başarılı girişimi Paris’te yaptı. 16 yaşındaki bir çocuk, annesinin böbreğini canlı bağış olarak aldı (Billingham ark., 1953).

1954'te bir dönüm noktası olarak Joseph Murray tarafından Boston'da ilk uzun vadeli başarılı operasyon, tek yumurta ikizleri arasında 8 yıl hayatta kalan böbrek nakli ile gerçekleşmiştir. Murray, böbrek nakli gelişimine katkılarından dolayı 1990 yılında Nobel Tıp Ödülü'nü almıştır (Murray ve ark., 1976).

Türkiye'de ise ilk kez canlı donörden böbrek nakli 1975 yılının sonlarına doğru Mehmet Haberal tarafından gerçekleştirmiştir (<http://www.mehmethaberal.com/> Erişim tarihi: 02 Ekim 2022). Organ nakliyle ilgili 1979'da ilk ulusal yasa yapılmıştır ancak Türkiye'de transplantasyon merkezlerinin kurulması 1990 yıllarında hizmete geçirilmeye başlanmıştır. Günümüzde ise Transplantasyon, Diyaliz ve İzlem Sistemleri (TDİS) web programı 1 Haziran 2016 tarihinde kullanıma dahil olmuştur (<https://organgiris.saglik.gov.tr/> Erişim tarihi: 01 Ekim 2022).

2.2.4. Böbrek Nakli Hazırlık Süreci

Alıcının Değerlendirilmesi: Beklenen yaşam süresi 5 yıldan uzun olan hastalar koordinasyon sistemi tarafından oluşturulan güncel kadavra listesine dâhil edilmelidir. Böbrek nakli öncelikli olarak diyabetik ve yaşlı hastalarda diyaliz tedavisine kıyasla üstünlük gösterir. Hastalar malignite ve aktif infeksiyon durumu bakımından araştırılmalıdır (Abramowicz ve ark., 2015). Bu hastalara nakil yapıldığı takdirde, infeksiyon ve malignite hızlı bir gelişim gösterebilir bu durumdan dolayı nakilden kaçınılmalıdır. Maligniteli hastalarda nüks olasılığı açısından değerlendirilmek için tedaviden sonra bir süre beklenmeli ve gerekli değerlendirmeler yapıldıktan sonra nakil gerçekleştirilmelidir (Abramowicz ve ark., 2015). Bu değerlendirmelerin yanı sıra hastalar özellikle immünolojik risk bakımından bir takım testlerden de geçmiş olmalıdır. Nakil edilecek olan donörün böbreğine karşı her türlü olumsuz durumun oluşmasına neden olabilen antikorların varlığı mutlaka araştırılmalıdır (Abramowicz ve ark., 2015).

Donör Seçimi: Donörler iki türlü olmak üzere kadavra veya canlı donör kaynaklı olabilir. Canlı donörlerin nakil yapıldıktan sonra mortalite ve morbiditeye sebep olabilecek herhangi bir tıbbi kaynaklı sorunu olmamalıdır (Kocak ve ark., 2004; Altınanahtar, 2016). Bu nedenle tüm canlı gönüllü donörler böbrek yapıları ve böbrek

fonksiyonları, hipertansiyon, diyabet, kalp, akciğer hastalıkları gibi tıbbi sorunlar bakımından değerlendirmeye alınır (Kocak ve ark., 2004; Altınanahtar, 2016).

Kadavra donörler de öncelikle enfeksiyon ve malignite açısından mutlaka incelenmelidir (Abramowicz ve ark., 2015). Organ çıkarımı yapıldıktan sonra hemen olabilecek en kısa sürede uygun alıcı tespit edilip ve mümkünse soğuk iskemi süresi 24 saati geçmeyecek şekilde takılmalıdır. Bazı özel durumlarda; sıradışı yani diyabetik, akut böbrek hasarına sahip, ılımlı kronik böbrek hastalığı olan ve bunun gibi rahatsızlıkları olan donörlerden alınan böbrekler de kullanılabilir. Donöre ait olan böbreklerin nakil uygunluğunun değerlendirilmesi KDPI (Kidney Donor Profile Index) ile yapılır (<https://optn.transplant.hrsa.gov/resources/allocation-calculators/kdpicalculator>, Erişim Tarihi: 01 Ekim 2022). Bu indekse göre 0 ile 100 arasında puanlama ile kadavra organın olası greft kaybı riski ölçülmektedir. KDPI puanının düşük olması daha yüksek allograft sağkalımı ile ilişkilidir. Böbrek nakli başarısını sağlayabilmek için nakil öncesi alıcı ve donör adaylar için bazı immünolojik değerlendirme testlerinin yapılması önemlidir

2.3. Böbrek Naklinde İmmünojenetik Testler

Nakil öncesi immünolojik olarak değerlendirme testleri; kan grubu antijenleri (ABO kan grubu uyumu), HLA doku tiplemesi, Panel Reaktif Antikor (PRA) testi ve Lenfosit Çapraz Karşılaştırma (Lymphocyte Cross Match: LCM (Kompleman bağımlı sitotoksiste (CDC) ve Flow Sitometrik Cross Match (FCXM)) günümüzde halen doku tipleme laboratuvarlarında rutin uygulamada olan çalışmalardır (Tait ve ark., 2009). Nakil başarısını sağlayabilmek için nakil öncesi, nakil sonrası ve nakil takibi için bazı testlerin yapılması hayati öneme sahip olup bir zorunluluktur.

2.3.1. Kan Grubu Antijenleri

ABO kan grubu antijenleri yalnızca eritrositler (kırmızı kan hücreleri) üzerinde ifade edilmez bunların yanı sıra lenfositler, trombositler, endotel hücreleri, böbrekteki tübülüs, glomerül ve parankim hücreleri gibi hücrelerin üzerinde de eksprese olurlar (Landsteiner, 1901). Böbrek naklinde ABO uyumunun önemi 1955 yılında ilk kez vurgulanmıştır (Hume ve ark., 1955). Dolayısıyla organ nakillerinde alıcı ve donör arasındaki ABO uyumu kan transfüzyonlarında olduğu kadar önemli olup transfüzyon

için kabul gören kural böbrek nakli içinde geçerlidir. Hastaya özgü olmayan bu antijenlere karşı kan grubu antikorlarının oluşumu meydana gelir. Bu sebeple nakil öncesi alıcı ve donörün ABO kan grubu antijenlerinin uyumuna bakılmaktadır. AB kan grubu evrensel alıcı iken O kan grubu ise evrensel donördür (Hume ve ark., 1955). O kan grubuna sahip donörlerin böbrekleri A, B veya AB alıcılarında kullanılabilir. ABO uyumsuz olarak yapılan nakillerde A ve/veya B antikorlarının varlığı hemagglütinasyona neden olmak koşuluyla geri dönüşümsüz organ reddine sebep olur. Rh faktörü ve başka eritrosit antijenleri ise endotelyumda ifade edilmediklerinden dolayı ABO uyumu kadar nakilde öncelik ve uyum aranması bakımından önemli değildir (Nelson ve ark., 1992).

ABO uygun donörlerle yapılan nakillerde en iyi sonuç alınmasına rağmen uygun donör bulunamadığı durumlarda güçlü immünosüpresyon ve desensitizasyon tedavisi ile ABO uyumsuz donörden de böbrek nakli yapılabilir (Nelson ve ark., 1992).

2.3.2. HLA Doku Grubu Testleri

Büyük Doku Uyum Kompleksi (MHC: Major Histocompatibility Complex) immün sisteminin kendisine benzeyen ve benzemeyeni ayırt edebilmesi için elzem olan “doku antijenleri” ni kodlayan gen bölgesi ve aynı zamanda da antijenlerin sunumunda rol oynayan özelleşmiş hücresel yapı olarak tanımlanmıştır (Shankarkumar, 2004; Mosaad, 2015).

Tarihsel süreçte ilk olarak MHC’nin varlığı 1930’larda Gorer ve Snell tarafından farelerde tespit edilmiştir (Gorer, 1936; Snell, 1937). Kemirgenlerde tanımlanan bu MHC bölgesinin insanlarda karşılığı olan gen bölgesi 1952 yılında Dausset, Rappaport ve Snell tarafından beyaz kan hücreleri üzerinde gösterilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla MHC’nin sadece lökositlerde bulunmadığı aynı zamanda doku hücrelerinde de var olduğu tespit edilmiştir. İnsanlarda bu bölge 1967 yılından itibaren İnsan lökosit antijeni (HLA: Human Leukocyte Antigen) olarak adlandırılmaktadır (Sayegh ve Carpenter, 2004). 1977 yılında ise Jan Klein tarafından MHC gen kompleksi üç sınıfa ayrılmış olup ilk tanımlamayı Class I, Class II Class III şeklinde yapmıştır (Klein ve Sato, 2000). Bu bölgelerin tamamı, ifade edilen genler ve psödogenler ile birlikte çok sayıda gen lokusunu içerir. İnsanlarda 6. kromozomun kısa

kolunda (6p21.3) yerleşmiş olan yaklaşık 4000 kilobaz (kb) büyüklüğündeki bu bölgede bulunan genlerin çoğu yaklaşık 300'den fazla çeşitli fonksiyonu bulunur. Bu genler özellikle bağışıklık sisteminin proteinlerini kodlayan ve immün yanıtla ilişkisi henüz tanımlanamamış bazı genler de dâhil olmak üzere yaklaşık 400 gen bulunur (Trowsdale, 2011; Roberts, 2009; Klein ve Sato, 2000; DeWolf ve Sykes, 2017). 7,6 milyon baz çifti içeren bu gen kompleksi genomun % 0,1' ini kapsamaktadır. *HLA* alelleri için ortak terminoloji uluslararası adlandırma kuralına göre alınan kararlar ile belirlenir. Serolojik uygulamalar ile tayin edilmiş antijenler, genetik lokusun adı *HLA* ön ekinden sonra yazılır (*HLA-A* gibi), sonra gelen sayılar antijenin tanıtım sayısıdır (*HLA-A*03* gibi) bazı moleküllerde çalışmaların halihazırda devam ettiği anlamında 'w' (workshop) işareti bulunur (*CwI*, *Cw2* gibi). Antijen hakkında veri netleştğinde ise bu çalışmalar tamamlanıp 'w' işareti kaldırılır. *HLA* antijenleri moleküler yöntemle belirlendi edildi ise lokusun isimden sonra bir asteriks (*) işareti vardır (moleküler çalışma yapıldığı anlamına gelir), misal olarak (*HLA-B*...*) ve serolojik karşılığı bunun devamındaki ilk iki rakam tipi tanımlarken iki noktadan sonraki 3.ve 4. rakamlar *HLA* 'nın alt tipini ve kodlanan spesifik proteini belirler (*HLA-B*57:01* gibi) (Trowsdale, 2011; Roberts, 2009; Klein ve Sato, 2000; DeWolf ve Sykes, 2017) (<http://hla.alleles.org>, Erişim tarihi: 01 Ekim 2022).

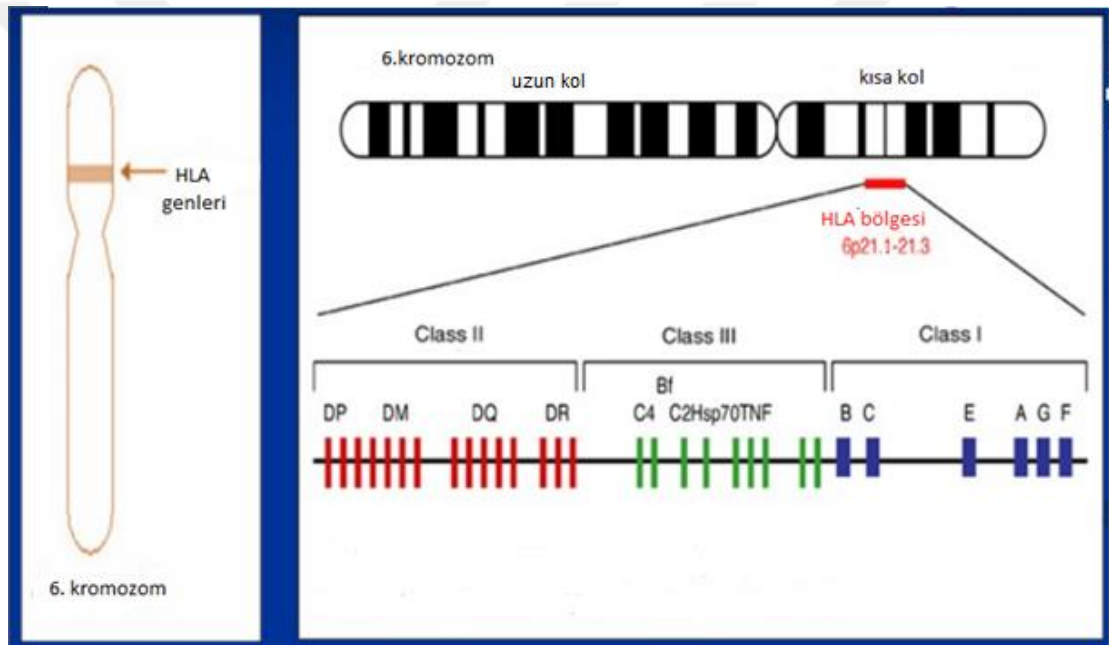
HLA Class I'de *HLA -A*, *-B*, *-C* -E, -F, -G -H, -X kodlanır. Klasik Class I molekülleri olan *HLA -A*, *-B*, *-C* molekülleri antijen sunumu görevini üstlenmiştir, eritrositler ve trofoblastlar hariç vücudun neredeyse tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde değişen yoğunlukta eksprese olurlar (Trowsdale, 2011; Roberts, 2009; Klein ve Sato, 2000; DeWolf ve Sykes, 2017). *HLA-E*, -F, -G klasik olmayan Class I molekülleri ve her dokuda eksprese olmazlar. *HLA-E*, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) tarafından hücre tanımada çok özel bir role sahiptir. *HLA-E*, klasik MHC Class I moleküllerinin sinyal peptitlerinden *HLA-A*, *B*, *C* ' den türetilen sınırlı bir peptit alt kümesini bağlar (Braud ve ark., 1997). *HLA-F* şu anda *HLA* moleküllerinin içinde kesin işlevleri hala çözülme beklemektedir. Diğer *HLA* moleküllerinin aksine, esas olarak hücre içinde bulunur ve örneğin NK , *B* ve *T* hücrelerinin aktivasyonu üzerine nadiren hücre yüzeyine ulaşır (Lin ve Yan, 2019). *HLA-G* ise immün modülatör rol oynayan bir molekül olup, plasenta dokusunda eksprese olduğu için özellikle gebelik ile ilişkilendirilmiştir. *HLA-H*, -X ise pseudo moleküller olarak kodlanır (Ishitani ve

ark., 2003). HLA Class I (HLA-A,-B,-C) molekülleri 44 kDa molekül ağırlığında ağır zincir-üç alfa (α -1, α -2 ve α -3) polipeptidi ve 15. kromozomda kodlanan 12 kDa molekül ağırlığında beta-2 mikroglobulin (β 2-m) zincirinin birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlanmasıyla oluşur (Morris ve ark., 1994; Van den Elsen, 2011). Bu HLA Class I moleküllerinin antijen bağlayan bölgeleri α -1 ve α -2 arasında yer alır ve yabancı (virüsler ve tümör antijenleri) peptid antijenleri CD 8⁺ T hücrelerine sunarlar (Goldsby ve ark., 2003). Antijen sunan hücreler (ASH) tarafından sitoplazmada antijen içeren bu hücreler fagositozla hücre içine alınırlar ve daha sonra efektör CD8⁺ T hücreleri, antijenin bulunduğu bölgeye giderek sitoplazmalarında bulundurdıkları perforin ve granzimin etkisiyle yüzeylerinde HLA Class I molekülleri bulunan antijen sunan hücreyi öldürürler (Madden, 1995; Mak ve Saunders, 2008; Abbas ve ark., 2011).

HLA Class II'de HLA-DRB1, -DPB1, -DQB1, -DM, Transporter Associated with Antigen Processing 1 ve 2 (TAP1 ve 2) gibi immün sistemde en önemli görevlerden biri olan antijen sunumunu üstlenen antijenler kodlanmaktadır. Class II antijenleri B lenfositler, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi ASH'lerin yüzeyinde eksprese olur (Madden, 1995; Mak ve Saunders, 2008; Abbas ve ark., 2011; Basturk ve ark., 2016). Antijen işlenmesi ve sunuma hazırlanmasında özellikle TAP1, TAP2 ve DM tarafından kodlanan moleküller, görev yaparlar. Class II molekülleri birbirine kovalent olmayan bağlarla bağlanmış iki polipeptid zincirinden polimorfik bir α (32-34 kDa) ve polimorfik bir β (29-32kDa)' dan oluşur, antijen bağlayan bölge, α -1 ve β -1 arasında bulunmaktadır. HLA Class I'den farklı olarak 10-30 aminoasit büyüklüğündeki peptitler bu oluğa bağlanabilirler (Madden, 1995; Mak ve Saunders, 2008; Abbas ve ark., 2011; Basturk ve ark., 2016). HLA ile antijen peptidin bağlantısını güçlendirerek sabitleyen bölüm α 2 domainidir. β 2 domaini ise HLA molekülü ile CD4⁺ T lenfositlerin bağlanma bölgesini oluşturur. HLA Class II antijenleri B-lenfositler, ASH (makrofajlar, dentritik hücreler, kupffer hücreleri), uyarılmış T lenfositler ve endotelial hücreler üzerinde bulunurlar. CD4⁺ T hücreler tarafından tanınan ekzojen peptitleri (mikroorganizmaları) MHC Class II molekülüne bağlandığında bu hücrelerin aktifleşmesi ve ardından proliferasyonu yardımı ile immün yanıt gerçekleşir. Bu şekilde aktive olan efektör CD4⁺ T hücre klonu antijenin bulunduğu bölgeye giderek fagositozu artırır ve B hücrelerini salgıladığı sitokinlerle antikor

üretmesi yönünde uyarır (Madden, 1995; Mak ve Saunders, 2008; Abbas ve ark., 2011; Basturk ve ark., 2016).

HLA Class III ise tümör nekroz faktörü (TNF), kompleman 2 (C2), kompleman 4 (C4A, C4B), lenfotoksin, 21-hidroksilaz enzimi, ısı şok proteini-70 ve HLA dışındaki moleküllerin sentez edildiği bölgedir. Class III lokusu da *HLA* Class I ve Class II lokusları gibi yüksek polimorfizm gösterir. *HLA* genlerinde sürekli yeni polimorfizmlerin meydana gelmesi ve fazla sayıda allele sahip olması popülasyonda belirli antijenleri sunabilen immünolojik bakımdan farklı bireylerin oluşumunu sağlamıştır (Şekil 2.2.) (Klein ve Sato, 2000; Roberts, 2009; Trowsdale, 2011; DeWolf ve Sykes, 2017).



Şekil 2.2. *HLA* Gen Bölgesi ve *HLA* Sınıfları

Narinder ve Gurvinder, 2003. Cambridge University Press (<https://www.cambridge.org/core/what-we-publish/journals>, Erişim Tarihi: 01 Ekim 2022).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün gözetiminde ve denetiminde bulunan HLA sisteminin isimlendirilmesi HLA nomenklatür komitesi ile bizzat düzenlenmektedir.

Bu sayılar sürekli güncellenmekte olup Ekim 2022 itibariyle bildirilen allel sayısı *HLA* Class I için 24.703, *HLA* Class II için 9,719 olmak üzere toplam 34,422'dir

(<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.htm>, Erişim tarihi: 01 Ekim 2022). Popülasyonlar arasında *HLA* alellerinin sıklıkları ve dağılımları çeşitlilik gösterir. Ülkemizde sağlıklı bireyler arasında yapılan çalışmalarda, *HLA-A* lokusu için en sık rastlanan doku grupları sırasıyla A2, A24 ve A3; *HLA-B* lokusu için başlıca B35, B51, B44; *HLA-DRB1* lokusu için ise özellikle DR11, DR4 ve DR13 olduğu tespit edilmiştir (Machulla ve ark., 2003; Uyar ve ark., 2004). Bu çalışmalara ek olarak 322 kişiden oluşan Kemik İliği Bankası gönüllü donörleri ile yapılan frekans çalışmasında *HLA-A**02:01 (%19,40), *A**24:02 (%17,93); *HLA-B**51:01 (%10,30), *B**35:01 (%9,95); *HLA-C**04:01 (%20,65), *C**07:01 (%13,53); *HLA-DRB1**11:04 (%13,21), *DRB1**11:01 (%11,18), *DRB1**07:01 (%9,55); *HLA-DQB1**03:01 (%30,17), *DQB1**02:01 (%9,72) alelleri kendi aralarında benzerlik göstermiştir (Fatma Oğuz Savran, 2014, yazılı görüşme). Oğul döllerine polimorfik bir gen topluluğu olan *HLA* genlerinin kalıtım şekli Mendelian olup her bireyde eş baskın (kodominant) olarak eksprese edilir. Bireyin *HLA* profili babadan ve anneden gelen birer haplotip sonucu oluşur.

Haplotipler, birlikte aktarılan, kromozomlar üzerinde bulunan ve birbirleriyle ilişkili lokuslardaki allel kombinasyonlarına verilen isimdir. *HLA* haplotipleri içinde kuvvetli Linkage Disequilibrium (LD) gösterilmiş olup *HLA* haplotipleri *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* ve *-DQB1*, *-DPB1* alel ve antijenleri ile tanımlanır (Hamosh ve ark., 2000; Shiina ve ark., 2004; Choo, 2007).

Böbrek Transplantasyonu öncesi alıcı ile donörün doku uyumunu değerlendirmek için Doku Tipleme Laboratuvarlarında *HLA-A*, *HLA-B* ve *HLA-DR* tiplemesi yapılır. Böbrek nakli yapıldıktan sonra uzun dönem sonuçlarının alınması dolayısıyla yapılan naklin başarı oranı günümüzde doku uyum oranı ile paralel şekilde ilerlemektedir (Liu, ve ark., 1996; Hata ve ark., 1998). Her ne kadar yeni ve etkin immün sistemi baskılayan ilaçlar pratik kullanıma girmiş olsa da doku uyumu ile en iyi nakil ve nakil sonrasında da daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Alıcıda ve donörde tüm antijenlerin aynı olması fullmatch olarak adlandırılırken, alıcıda bulunmayan her donör antijeni mismatch olarak adlandırılır ki anne ve babadan gelen alıcı ve donör arasındaki 2 adet *A*, 2 adet *B*, 2 adet *DR* olmak üzere 6 doku antijeni sayesinde mismatch sayısı belirlenmektedir (Leffell ve Zachary, 1999; Morris ve ark., 1999).

Böbrek naklinde HLA alellerinin belirlenmesi (HLA doku tipleme) için serolojik ve moleküler yöntemler uygulanmaktadır (Olerup ve Zetterquist, 1992; Tinckam, 2009). Ancak günümüzde daha çok moleküler yöntemler uygulanmaktadır. Doku tiplemesi için moleküler yöntemler daha spesifik, hızlı ve doğru sonuç vermesi ve canlı hücre gerektirmemesi bakımından avantajlı durumdadır. Bunların yanı sıra yeni aleller tanımlandıkça *HLA* genlerindeki çeşitliliğin gösterilebilmesi, hastalık veya tedaviden etkilenmemesi, daha fazla örneğin aynı anda çalışılabilmesi ve duyarlılığının yüksek olması açısından birçok avantajı vardır (Coleman ve Tsongali, 2006; McPherson ve ark., 2007).

2.3.3. Serolojik Yöntemlerle HLA Doku Tiplemesi

Lenfosit yüzeyindeki HLA antijenleri ile anti HLA antikorlarının etkileşimine dayanan mikrolenfotoksisite yöntemine bağlı olarak heparinli kandan tabakalı ayırıştırma (dansite gradient) yöntemiyle izole edilen lenfositler anti HLA antikorları bulunan (pozitif kontrol), bulunmayan (negatif kontrol) ve örnek serumunun bulunduğu terasaki kuyucuklarında karşılaştırılır. İnkübasyonu takiben ortama tavşan serumundan elde edilen kompleman eklenir. Böylece antijen antikor birleşmesi olan hücrelerde hücre bütünlüğü kaybedilir. Formaldehid eklenmesiyle reaksiyon durdurulur ve eosin eklenerek hücre lizisine uğrayan hücreler boyanır. Çalışmada kullanılan bu yöntemde ölü hücrelere göre değerlendirme yapılır (Kao ve ark., 1993). HLA tiplemesi için günümüzde pek çok laboratuvar serolojik yöntemlerin *HLA* alellerindeki polimorfizmi belirlemede yetersiz olması nedeniyle moleküler metodlar kullanarak test etmektedir.

2.3.4. Moleküler Diziyeye Özgü Primer Yöntemiyle HLA Tiplemesi (SSP)

Sınırlı sayıda aleli çoğaltan primerlerin kullanıldığı diziyeye özgü primer (Sequence Specific Priming: SSP) bazlı bir yöntemdir (Testi ve Andreani, 2015). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirli amplifikasyon koşulları altında yalnızca çoğaltılmak istenen kalıp bölgedeki spesifik HLA baz dizilimine uyumlu primerler ile kalıp sekans dizisinin tamamen eşleşmesi yöntemin ana prensibidir. EDTA'lı kan örneğinden izole edilen DNA, bir tampon, nükleotitler (dNTP'ler) ve polimeraz karışımına eklenir. Elde edilen karışım SSP plaklarına aktarılır. Reaksiyonun güvenilirliğini görmek için kontrol primerleri, primer setinde mevcuttur. Amplifikasyon için SSP plağı termal

cyclera yerleştirirler. Amplifikasyon ürününün varlığını tanımlamak için jel elektroforezi yapılır ve doğru uzunlukta olup olmadığı kitapçıkta yada software programında değerlendirilerek HLA doku tipi belirlenir. SSP kitleri dizayn bakımından az sayıda numune çalışılması bakımından basit, hızlı ve ideal bir test olmasına rağmen çok sayıda örnek için dezavantajlıdır (Olerup ve Zetterquist, 1992).

2.3.5. Moleküler Diziye Özgü Oligonükleotit Primer Yöntemle HLA Tiplemesi (SSO)

Diziye özgü oligonükleotit (Sequence Specific Oligonucleotides: SSO) primer yöntemi belirli sayıda bilinen *HLA* alellerin saptanmasında günümüzde en sık kullanılan yöntemdir. Kullanılan primerler yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda ve *HLA* alleleline özgü 5'-biotin işaretli bağlı kısa problemlerdir (McPherson ve ark., 2007). *HLA* Class I' e özgü ekzon 2 ve ekzon 3'e, *HLA* Class II' e özgü ekzon 2'ye spesifik primerler kullanılır ve böylece *HLA* polimorfik bölgelerinin lokusa spesifik amplifikasyonu gerçekleşir. Daha sonra sekans spesifik oligonükleotit problemlerin amplifiye DNA üzerine bağlanmasıyla hibridizasyon reaksiyonu gerçekleşir ve oligo boncuklar üzerindeki hibritleştirilmiş PZR ürünü, biyotin için çok yüksek bir bağlanma afinitesine sahip olan bir streptavidin konjugatı (SA-PE) ile işaretlenir. PZR ürünü ile hibritlenen her kodlanmış oligo boncuk üzerindeki SAPE' nin floresan yoğunluğunu tanımlama özelliğine sahip olan Luminex cihazı (Boncuk bazlı analiz) ile *HLA* genotipleme yapılır (Sheldon ve Poulton, 2006). Günümüzde artan hasta ve *HLA* allel sayısı göz önüne alındığında SSO yöntemi *HLA* doku tipini tespit edebilmesi bakımından çok daha avantajlı bir testtir (McPherson ve ark., 2007).

2.3.6. Panel Reaktif Antikor Testleri

Panel Reaktif Antikor (PRA) testi, nakil yapılacak hastaların *HLA* antijenlerine karşı antikor varlığını tespit etmeyi sağlar. Bu testle ayrıca hastada *HLA* antikorları varsa bu antikorların hangi *HLA* antijenlerine karşı olduğu da belirlenir (Sheldon ve Poulton, 2006). Kan transfüzyonları, geçirilmiş nakiller ve çoklu gebelik gibi nedenlerle donörlerin antijenlerine karşı alıcılarda bu antikorlar oluşabilmektedir. Böbrek naklinde PRA'nın tespiti düzenli peryotlarla yapılır. Nakil öncesi veya nakil sonrası gelişen anti-*HLA* antikorlarının varlığı (PRA pozitifliği), greftin sağ kalımı ve reddi için oluşabilecek herhangi bir risk faktörü hakkında fikir vermesi bakımından

çok önemli bir immünolojik parametredir (Tinckam, 2009). PRA pozitiflik oranının belirlenmesi, antikorların nicel ve nitel olarak sınıflandırılması sağlanmış olur. HLA antikorunun varlığı PRA tarama testi ile var olan antikorun yüzdelik değeri ise PRA tanımlama testleri sayesinde belirlenir. Solid fazlı PRA tarama ve tanımlama için Luminex yöntemi; hastanın serumunda bulunan HLA antijenlerine karşı kompleman aktivasyonuna bağlı olmaksızın gelişen önceden oluşmuş veya sonrasında oluşan anti-HLA antikorlarının tespit etmek için çok hassas ve spesifik bir yöntemdir (Tait ve ark., 2009). Flow Sitometri yöntemi ile de PRA testi yapılabilir, iki yöntemde de temel prensip aynıdır sadece uygulamada farklılık gösterirler (Pirim ve ark., 2015). HLA Class I ve II glikoproteinleri konjuge edilip saflaştırılmış ve mikro boncuklara bağlanmışlardır. Ortalama floresan ışıması (Median Fluorescence Intensity: MFI) boncuk değeri, PE işaretli floresan sinyali ile ifade edilir. PRA sonucu anti-HLA antikorları ile reaksiyona giren popülasyonun (pozitif-negatif) ve yüzdesini (%0-100) gösterir. PRA tarama testi sonucu pozitif çıkan hastalarda hangi HLA sınıfına yönelik antikor tespit edildiyse o sınıfa yönelik HLA Class I veya II PRA tanımlama testi uygulanır. PRA tanımlama testi sonucunda antikor varlığının miktarı yüzde % olarak ifade edilir. Yüksek oranda duyarlılık gösterirse (PRA>%85) bu hastaların duyarlı olduğu HLA antijenlerini saptamak için daha spesifik özelliğe sahip Tek Antijen Boncuk (SAB) Class I ve Class II testi yapılır (Tait ve ark., 2009). SAB analizi ile Class I ve II anti-HLA antikorları arasında kesin bir ayırım yapılan hastaların duyarlı oldukları spesifik HLA antijenlerinin tipi de belirlenmiş olur. Bu durum hastaya uygun bir donörün bulunmasında çok büyük avantaj sağlamaktadır (Dunn ve ark., 2011).

2.3.7. Cross-match Testleri

Cross-match, alıcının serumu ile donörün lenfositleri arasında bir reaksiyon oluşup oluşmadığının gözlendiği dolayısıyla DSA'ları belirlemek için kullanılan en temel immünolojik çaprazlama testidir (Shrestha, 2014). Hastaların böbrek nakli olabilmesi için bu testlerin sonuçlarının negatif olması gerekir. Nakilden hemen önce yapılan bu çaprazlama testlerin sonucunun negatif olması hiperakut rejeksiyonun gerçekleşmesini önemli ölçüde engeller. Cross-match testi, Kompleman Bağımlı Sitotoksite Çapraz Karşılaştırma Yöntemi (CDCXM), Akım Sitometri (Flow Sitometri) Metoduyla Çapraz Karşılaştırma Yöntemi (FCXM) ve Luminex yöntemi olarak üç farklı yöntemle yapılmaktadır (Shrestha, 2014).

CDCXM böbrek naklinde altın standart olarak kabul edilmiştir. Nakilden hemen önce yapılarak hiperakut rejeksiyonun önceden tahmin edilmesine yardımcı olur. Hasta serumu ile donör T ve B lenfositlerinin çaprazlandığı bir testtir. Bu deney ortamında T hücre crossmatch ile donörün Class I HLA antijenlerine, B hücre crossmatch ise Class II HLA antijenlerine karşı alıcının antikor geliştirip geliştirmediği test edilmektedir. Oluşan antikorun yapısı IgM ve IgG ayrımı dithiothreitol (DTT) ile yapılır. DTT uygulamasından önce ve sonraki sonuçların ikisi de pozitifse IgG yapısında, öncesi pozitif sonrası negatifse IgM yapısındaki donöre spesifik antikor varlığını gösterir. Parafin kaplı bir teresaki plağında hasta serumundaki antikorlar ile donör lenfositlerinin etkileşiminden sonra bu birleşime kompleman (tavşan serumu) ilave edilir (Shrestha, 2014). Böylece kompleman (C1) ile klasik kompleman aktivasyonu sonrası alıcının lenfositlerinde lenfoliz oluşacaktır. Acridine orange gibi bir boya uygulanırsa hücre membran yapısının bozulması nedeniyle hücre sitoplazması boyanacaktır ve dolayısıyla sonuç pozitifdir. Membranı sağlam hücreler boyayı hücre içine almazlar ve negatif olarak değerlendirilir. Bütün bu elde edilen veriler invert (floresan) mikroskop yardımıyla gözlemlenir ve okunur. Pozitif CDCXM test sonucu transplantasyon için olumsuzdur yani nakil yapılamaz. Bazı durumlarda sonuç negatif olsa bile rejeksiyon görülebilir, bunun nedeni antikorun komplemanı aktive edememesinden kaynaklanır bu durumda FCXM yöntemine ihtiyaç duyulur. Bu nedenle cross match testlerinin iki yöntemle çalışılması en güvenilir olanıdır.

FCXM ile CDCXM testlerinin ilk başlama yolağı aynı olup alıcının serumu donör lenfositleri ile muamele edilir. T hücre varlığı için CD3 floresan ile B hücre varlığı için ise CD19/CD20 floresan ile işaretlenir. Hastada bu hücrelere yönelik antikor varlığı, floresan işaretli anti insan IgG antikor ile işaretlenir ve bu anti-HLA antikorları akım sitometri cihazı yardımıyla belirlenebilir (Abbas ve ark., 2011; Montgomery ve ark.,2018). Testin güvenilirliği açısından kullanılan negatif ve pozitif serum örneklerinden elde edilen belli bir MFI değerine kıyaslama yapılarak T ve B hücre ayırımıyla sonuç negatif veya pozitif olarak değerlendirilir. T hücre çaprazlama testi pozitif ise hastada donörün HLA Class I antijenlerine karşı donöre özgü antikor olduğunu, B hücre testi pozitif ise hastanın serumunda HLA Class II antikorları

bulunabilir veya düşük titrede HLA Class I antikorları bulunabilir (Taylor ve ark., 2000; Shrestha, 2014).

Luminex-fluoroanalizör yöntemiyle de donörden elde edilen HLA Class I ve Class II antijenlerine bağlanan IgG antikorlarını tespit etmek için solid faz olarak antijenle kaplı mikro boncuklar kullanılır. Bu yöntemde, FCXM gibi kompleman aktivasyonuna bağlı olmaksızın anti-HLA antikorların sınıfı saptanabilmektedir (Colombo ve ark., 2007). Hastanın serumu ve donör lenfositleri karşılaştırıldıktan sonra ile değişik renklerde ve derecelerde florofor ile boyanmış floresan özelliği bulunan antijen kaplı boncuklar (polistiren küreler), inkübe edilir. Boncuklara bağlanmamış olan antikorları ortamdan uzaklaştırmak için yıkama yapılır ve anti-insan IgG antikor eklenir. İnkübasyon sonrasında Luminex cihazında her boncuktan alınan sinyal yoğunluğu analiz edilir (Picascia ve ark., 2012; Guichard-Romer ve ark., 2016).

Günümüzde nakil öncesi ve sonrası yapılan bu immünolojik testler sayesinde yapılan naklin başarısı öngörülebilmektedir. Nakilden sonraki dakikalar, saatler içerisinde ortaya çıkabilecek veya daha uzun zaman sonra oluşabilecek allogreft reddi de engellenebilmektedir.

2.4. Böbrek Naklinde Rejeksiyon Sebepleri

Böbrek nakli sonrasında oluşabilecek en ciddi sorun takılan yeni böbreğe karşılık olarak, alıcının immun sisteminin verdiği cevaba bağlı olarak nakledilen böbreğin reddidir (Shrestha ve ark., 2010). Donör böbreği bir alloantijen olarak hareket ettiğinden alıcı ile eşleştirmek için çeşitli faktörler dikkate alınmalıdır. Genel olarak, doku veya hücrelerin genetik olarak farklı bir donörden alıcısına nakledilmesi sırasında, donörün alloantijeni alıcıda bir bağışıklık tepkisini indükler. Bu yanıt, kontrol edilmezse grefti yok edebilir (Nankivell ve Alexander, 2010). Rejeksiyon olarak da adlandırılan bu durumu önlemek için daha önce belirttiğimiz gibi nakil öncesi bir takım immünolojik ve genetik parametreler rutin olarak test edilmek zorundadır. Nakil sonrası erken dönemde rejeksiyon gelişme ihtimali nakilde alıcı-donör arasındaki genetik ve immünolojik farklılıklara bağlıdır. Dolayısıyla bu uyumluluğun sağlandığı bir böbrek nakli sonrasında hasta daha uzun ve konforlu bir yaşam sürdürebilmektedir (Shrestha ve ark., 2010).

Hem doğuştan gelen hem de sonradan edinilen bağışıklık sistemleri, rejeksiyonde önemli bir rol oynar, ancak T lenfositleri, allogrefti tanıyan başlıca hücrelerdir. Bu hücreler dışında özellikle sitokinler gibi birlikte uyarıcı moleküller de bu reaksiyonda önemli bir rol oynar. Greft rejeksiyonu, bu ret sırasında etkili olan hücre tipleri ve immün mekanizmalara göre; hücresel ve hümmoral rejeksiyon olarak sınıflandırılır.

Nakil sonrasında gözlenen rejeksiyonun ortaya çıkma süresi ve klinik durumu bakımından değerlendirilmesi açısından ise; akut, kronik ve hiperakut rejeksiyon olarak sınıflandırılırlar (Nankivell ve Alexander 2010).

2.4.1. Hücre Aracılı Rejeksiyon

Hücre aracılı ortaya çıkan rejeksiyon, rejeksiyonun en temel ve genel şekli olmakla beraber greftin içindeki henüz olgun olmayan dendritik hücreler alıcının dokularına donör antijenlerini iletir. Dolayısıyla alıcının ASH'leri grefte doğru yönelen bu döngüye dahil olur (Larsen ve ark.,1990). ASH'ler alıcıdaki T hücrelerini uyarım sinyali gönderir ve aktive olan T hücreleri de altgruplarına farklılaşarak immün saldırı sonucu grefte zarar verirler. Bunun yanı sıra epitelyal ve endotelyal hücreler de benzer özellik göstererek antijen sunumu yoluyla T hücre aktivasyonunu sağlarlar. Alıcının lenfositleri, nakledilen organdaki yabancı (kendinden olmayan) donör antijenlerin ASH leri tarafından doğrudan, yarı-doğrudan veya dolaylı yollarla tanınmasıyla aktive hale gelir. T hücrelerinin aktivasyonu ve infiltrasyonu ile allogreft zarar görür. Tübüllerin, interstisyumun ve bazen arteriyel intimanın lenfositik infiltrasyonu ile karakterizedir (Hagerty ve Allen, 1992; Kreisel ve ark., 2002).

2.4.2. Hümmoral Rejeksiyon

Antikor aracılı rejeksiyona (ABMR), T hücrelerinin neden olduğu hücresel rejeksiyondan farklı mekanizmalar aracılık eder, bu nedenle tedavi ve önleme için başka yaklaşımlar gerektirir. Antikor, kompleman aktivasyonu yoluyla akut olarak reddi indükler, bu da doku hasarı ve pıhtılaşma ile sonuçlanır. Ek olarak, kompleman aktivasyonu makrofajları ve nötrofilleri alarak ek endotel hasarına neden olur (Mota ve ark., 2003; Mateu ve ark., 2004). Antikor ve kompleman ayrıca, arterleri ve bazal membranları yeniden şekillendirdiği düşünülen endotel hücreleri tarafından gen ekspresyonunu indükleyerek, greft fonksiyonunu kalıcı olarak tehlikeye atan sabit ve

geri dönüşü olmayan anatomik lezyonlara yol açar. Dolaşımdaki donöre özgü alloantikorların varlığı; böbrekte antikor aracılı yaralanmaların glomerül iltihabı (glomerülit) veya peritübüler kılcal damarların (peritübüler kapillerit) iltihaplanması gibi immünolojik kanıtlarını gösterir (Øien ve ark., 2007). ABMR' nin histolojik özellikleri arasında arteriolar fibrinoid nekroz, glomerüler kapillerlerde fibrin trombüsü, glomerülit, peritübüler kapillerit ve interstisyel kanama bulunur. Ayrıca, endotelyuma kovalent olarak bağlanan kompleman yolunun bir bozunma ürünü olan C4d için peritübüler kapiler lineer boyamanın varlığı, ABMR'yi oldukça düşündürür (Konvalinka ve Tinckam, 2015; Pratschke ve ark., 2016).

2.4.3. Hiperakut Rejeksiyon

Nakilden dakikalar sonra olur ve önceden oluşturulmuş antikor veya ABO kan uyumsuzluğu ile ilgilidir. Transplantasyon sırasında mevcut olan donör antijenine (genellikle ABO kan grubu veya HLA antijeni) karşı alıcının kanında önceden var olan dolaşan antikorlarla ilgilidir (Lee ve ark., 1994; Suchin ve ark., 2001). Bu antikorlar, allogreft revaskülarize edildikten hemen sonra veya birkaç saat içinde nakledilen organa saldırır ve yok eder. Nakledilen böbrek revaskülarize olur olmaz benekli, esmer ve siyah olur. Biyopside ciddi endotel hasarı, polimorfonükleer (PMN) infiltrasyon, tromboz, iskemik doku nekrozu görülmektedir (Herrera ve ark., 2004; Sivaganesh ve ark., 2013).

2.4.4. Akut Rejeksiyon

Nakil olduktan birkaç gün, birkaç hafta sonra ya da ay içindeki dönemde ortaya çıkabilir. Akut rejeksiyon (AR) ilk bir yıl içinde de görülebilmektedir (Halloran ve ark., 1992; Collins ve ark., 1999; Takemoto ve ark., 2004). Alloreaktif antikorlar ve T hücrelerin aracılığı ile kan damarlarındaki ve greft parankimindeki oluşan hasar akut rejeksiyonun belirteçidir. Gelişmiş ve güçlü immünosupresif ajanların kullanılmasıyla akut rejeksiyonun genel insidansı azalmış dolayısıyla greft sağkalımı iyileşmiştir. İlk yıl içinde akut rejeksiyon insidansı %7,9 civarındadır. Genel olarak, canlı donörde AR oranı, ölen donörden yapılan böbrek nakillerinden daha düşüktür; bu muhtemelen daha iyi eşleşme ve daha az soğuk iskemi süresi ile ilgilidir (Hart ve ark., 2017).

Aşağıdakilere göre sınıflandırılır:

A) Akut T-hücresi aracılı rejeksiyon (TCMR) : Alıcının lenfositlerinin, nakledilen organdaki donör antijenlerin ASH'ler tarafından doğrudan, yarı-doğrudan veya dolaylı yollarla tanınmasıyla aktive hale gelmesidir. T hücrelerinin aktivasyonu ve infiltrasyonu sonucunda allogreftin zarar görmesine neden olur. Tübülde, böbreğin interstisyumunda ve ciddi vakalarda allogreft damarlarında yaygın lenfositik infiltrasyon ile karakterizedir (Ingelfinger, 2005; Nankivell ve Alexander, 2010; Piotti ve ark., 2014; Konvalinka ve ark., 2015).

B) Antikor aracılı ret (ABMR) : Başta HLA antijeni olmak üzere donör antijenlere karşı antikorlarla ilgilidir. Komplemana bağımlı yolun aktivasyonu ve doğal öldürücü hücreler aracılığıyla allogreftte hasara yol açar (Bos ve ark., 2002; Stegall ve ark., 2012).

2.4.5. Kronik Rejeksiyon

Genellikle nakilden üç ay sonra gelişir. Kronik antikor aracılı ret veya kronik T hücre aracılı ret olabilir (Bingaman ve Farbel, 2004). Hem immün hem de immün olmayan aracılı faktörlerle ilişkilidir. Kronik rejeksiyon için birincil risk faktörü, immünosupresif ilaçlara karşı uyumsuzluktur. Temel olarak donör HLA antijenlerine yönelik DSA varlığı ile ilgili olan kronik antikor aracılı rejeksiyon veya nadir görülen kronik hücresel rejeksiyon olabilir. Bunlar interstisyel fibrozis, tübüler atrofi, vasküler fibröz intimal kalınlaşma, glomerüler bazal membran çift konturlama (nakil glomerülopatisi), arteriolar hiyalinoz ve hiyalin arteriolar kalınlaşmayı içerir (Nankivell ve Alexander, 2010).

2.5. Böbrek Nakli Alıcılarında Donöre Özgü Antikorlar

Böbrek naklinden önce tanımlanan DSA' lar rejeksiyon ve greft kaybına neden olabilir (Sellarés ve ark.,2012; Lawrence ve ark., 2013; Halloran ve ark., 2014; Djamali ve ark., 2014; Filippone ve Farber, 2015; Thaunat ve ark., 2016). Alternatif olarak, nakilden sonra yeni geliştirilen DSA' lar, geç ABMR, kronik antikor aracılı ret ve nakil glomerülopatisi (böbrek glomeruluslarında görülen yangısal özellikte bulunmayan bir patolojik farklılık) ile ilişkilidir (Lee ve ark.,2009; Sellarés ve ark.,2012; Valenzuela ve Reed, 2013; Djamali ve ark., 2014). Bununla birlikte, ABMR veya greft yetmezliği

ile ilişkili olmadıkları için klinik olarak anlamlı olamayabilecek “iyi huylu” DSA’lar da vardır. Bu nedenle DSA patojenitesini bilmek, klinisyenlerin hastanın immünolojik riskini sınıflandırmasına, antikor aracılı reddin fenotiplerini tahmin ve rehberlik etmesine yardımcı olmaktadır (Valenzuela ve Reed 2013; Kosmoliaptsis ve ark., 2011; Kumbala ve Zhang, 2013; Loupy ve ark., 2015).

2.5.1. DSA Patogenezi

Önceden oluşturulmuş veya de novo DSA’nın varlığı, yüksek antikor aracılı rejeksiyon insidansı, greft disfonksiyonu ve düşük greft sağkalımı dâhil olmak üzere kötü transplant sonuçlarını öngören bir biyobelirteç haline gelmiştir (Ntokou ve ark., 2011; Wiebe ve ark., 2012; Guidicelli ve ark., 2016).

Böbrek naklinden sonra de novo DSA gelişimi duyarlı olmayan hastalarda % 13 olarak bildirilmiştir. De novo DSA için risk faktörleri; HLA uyumsuzlukları (özellikle DQ uyumsuzlukları), yetersiz immünosupresyon ve greft immünojenitesini artırabilen viral enfeksiyon, hücresel rejeksiyon veya iskemi hasarı gibi greft iltihabı sayılabilir (Ntokou ve ark., 2011; Wiebe ve ark., 2012; Guidicelli ve ark., 2016). De-novo DSA ağırlıklı olarak donör HLA Class II uyumsuzluklarına yöneliktir. Genellikle böbrek nakli ilk yılı boyunca meydana gelir, ancak daha da birkaç yıl sonra da ya da daha erken de görülebilir (Ntokou ve ark., 2011; Wiebe ve ark., 2012; Guidicelli ve ark., 2016).

DSA’nın allogreft endotel hücrelerinde eksprese edilen antijene bağlanması, akut antikor aracılı ret fenotiplerinin önemli bir patolojik süreci olan klasik kompleman yolunu aktive edebilmektedir (Kumbala ve Zhang, 2013; Djamali ve ark., 2014).

Kompleman aktivasyonunun yokluğunda bile, bazı DSA’lar antikora bağlı hücresel sitotoksikite yoluyla greft hasarına neden olabilir. Nötrofiller, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler, DSA’ların Fc fragmanlarına bağlanabilir, degranülasyonu tetikleyebilir ve doku hasarına dolayısıyla hücre ölümüne neden olan litik enzimleri serbest bırakabilir. Bu süreç, endotel hücrelerinde hasarlara aracılık edebilir ve kronik antikor aracılı ret fenotiplerinde önemli bir patogenezi olarak öne sürülmektedir (Anthony ve Nimmerjahn, 2011; Hirohashi ve ark., 2012). Bundan başka, DSA vasküler endotelial büyüme faktörü üretimini artırarak, fibroblast büyüme faktörü

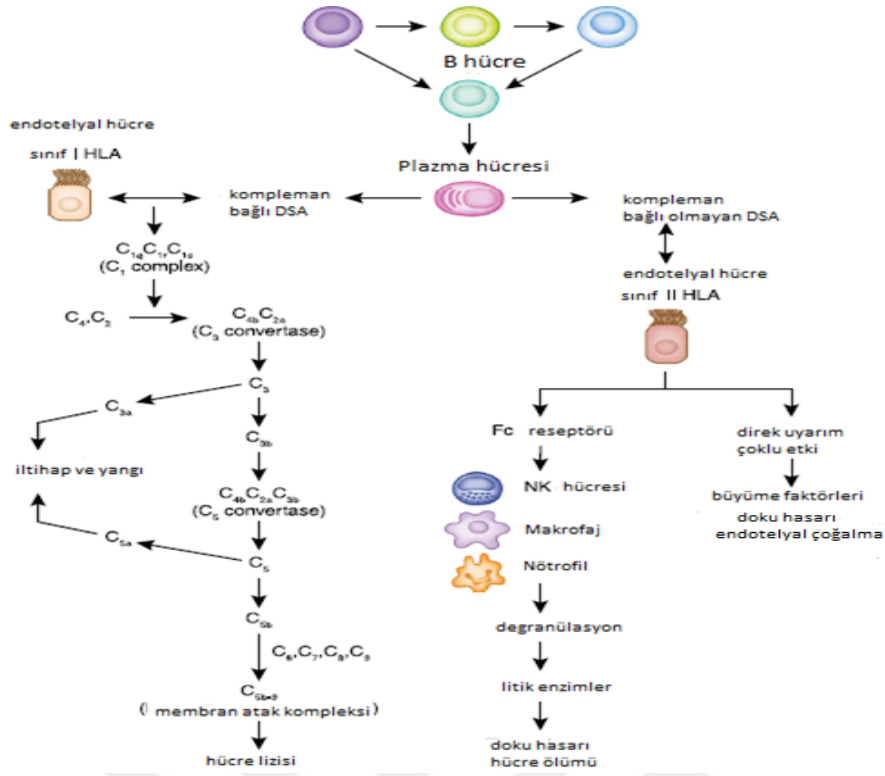
reseptörü gibi diğer sinyal yollarını da artırarak endotel çoğalma aktivasyonu ile doğrudan greft hasarına neden olabilir (Zhang ve Reed, 2009; Hidalgo ve ark., 2010; Valenzuela ve Reed, 2013; Haarberg ve Tambur, 2014). Bu patogenez, düz kas hücresi invazyonu ile birlikte glomerülopati ve vaskülopatiyeye katkıda bulunabilir.

Son iki yolakta kompleman bağımsız bir mekanizma olarak peritübüler kılcal damarlarda negatif C4d boyaması ile antikor aracılı reddin klinik fenotiplerini açıklayabilir (Şekil DSA patogenezi) (Zhang ve Reed, 2009; Hidalgo ve ark., 2010; Anthony ve Nimmerjahn, 2011; Hirohashi ve ark., 2012; Valenzuela ve Reed, 2013; Kumbala ve Zhang, 2013; Djamali ve ark., 2014).

Antikor aracılı redde DSA'lar üçüncü patojenez yolağında donöre ait antijen sunan hücreler arasında makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreleri bulunur. Kompleman bağımlı DSA'lar endotel hücrelerde Class I HLA'yı hedefler, klasik kompleman kaskadını aktive eder ve akut antikor aracılı redde komplemana bağlı sitotoksosite sağlar.

Kompleman bağımlı olmayan DSA'lar, Fc reseptörleri yoluyla doğuştan gelen bağışıklık hücreleri (NK hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller) yardımıyla antikora bağlı hücrel toksisiteye yol açar. Ek olarak, komplemana bağlı olmayan DSA'lar, doku hasarına, hücrel ve endotelial proliferasyona neden olan doğrudan uyarım ve çoklu etkilere sahiptir.

Son iki mekanizma antijen sunan hücreler; NK, doğal öldürücü hücreler, peritübüler kapillerlerde negatif C4d birikimi ile akut antikor aracılı redde, ayrıca kronik antikor aracılı red, transplant glomerülopatisi ve vaskülopatide önemli bir rol oynar (Şekil 2.3.) (Zhang ve Reed, 2009; Hidalgo ve ark., 2010; Anthony ve Nimmerjahn, 2011; Hirohashi ve ark., 2012; Valenzuela ve Reed, 2013; Kumbala ve Zhang, 2013; Djamali ve ark., 2014).



Şekil 2.3. Antikor Aracılı Rejeksiyonda DSA Patogenezi

Zhang, 2018 (<https://doi.org/10.2215/CJN.00700117>, Erişim Tarihi: 01 Ekim 2022)

2.5.2. DSA Sınıfları ve Özgünlük

DSA'lar, HLA antijenlerinin polimorfik bölgelerindeki kendilerine özgü epitopları hedefler. HLA Class I antijenleri (A, B ve C) tüm çekirdekli hücrelerde eksprese edilir ve her antijen bir α (44-47kD) ve bir β 2 mikroglobulin (12 kD) zincirinden oluşur. Epitoplar sadece polimorfik α zincirinde bulunur (Lee ve ark., 1994; Kumbala ve Zhang, 2013; Filippone ve Farber, 2015). HLA Class II antijenleri (DR, DQ ve DP) normalde antijen sunan hücrelerle (dendritik hücreler, B hücreleri ve makrofajlar) sınırlıdır, ancak iskemi-reperfüzyon hasarı, enfeksiyon ve rejeksiyon gibi durumlardan sonra artış gösterirler ve eksprese edilebilirler (Lee ve ark., 1994; Kosmoliaptsis ve ark., 2011; Valenzuela ve Reed, 2013; Filippone ve Farber, 2015; Loupy ve ark., 2015). Her Class II antijeni bir α zinciri ve bir β zincirinden oluşur ve her iki zincir de polimorfiktir. β -DQ zinciri özellikle polimorfiktir, bu da DQ antikorlarının klinik

karmaşıklığını açıklar (Haarberg ve Tambur, 2014). Duyarlı hastalarda önceden oluşturulmuş DSA'lar Class I, Class II, her ikisi olabilir ve özel veya genel epitoplara hedefleyebilirler (El-Awar ve ark., 2009; Ma ve ark, 2016). Önceden oluşturulmuş DSA'ların varlığı, transplant için karar verme sürecini doğrudan etkiler. Genellikle komplemana bağlı IgG1 veya IgG3 alt sınıfı olan sitotoksik IgG antikoruna ikincil pozitif bir T hücresi ile çapraz eşleşmesi varsa böbrek nakli yapılmamalıdır (Valenzuela ve Reed, 2013; Filippone ve Farber, 2015; Tambur ve ark., 2015; Ma ve ark, 2016).

Tablo 2. HLA Class I ve HLA Class II Donöre Özgü Antikorlar

HLA Class I ve HLA Class II Donöre Özgü Antikorların Özelliklerinin Karşılaştırılması		
	HLA Class I DSA	HLA Class II DSA
HLA		
Antijenler	A, B ve C	DR, DQ ve DP
Epitopların yeri	α - zinciri	α - ve β - zincirleri
Ekspresyon	Tüm çekirdekli hücreler	Antijen sunan hücreler
Önceden oluşturulmuş donöre özgü antikorlar		
Önemi	Çok	Az
Pozitif çaprazlaşma	T hücreleri	B hücreleri
Nakil kararı	Nakil olmaz	İzin verilebilir
De novo donöre özgü antikorlar		
Tespit etme	Erken	Geç
IgG alt sınıfları	IgG1, IgG3	IgG2, IgG4
Kompleman bağımlı	Güçlü	Zayıf/hayır
Sıklık	Daha Az	Yaygın, özellikle DQ
Antikor aracılı reddetme		
Fenotipler	Akut	Kronik, subklinik
Sunum	Erken	Sonra
Greft disfonksiyonu	Hızlı	Yavaş
C4d	Pozitif	Negatif
Tedavi	Daha duyarlı	Daha az duyarlı
Greft kaybı	Erken	Sonra

Zhang, 2018 (<https://doi.org/10.2215/CJN.00700117>, Erişim Tarihi: 01 Ekim 2022)

Böbrek nakli sonrası de novo DSA'ların çoğu, Class II antikorlardır ve çoğunlukla DQ ya yönelik antikorlardır. Class I de novo DSA'lar ise genellikle transplantasyondan sonra daha erken saptanır, IgG1 ve IgG3 alt sınıfları daha olasıdır. Akut antikor aracılı rejeksiyon ve erken greft kaybı ile ilişkilidirler (Lee ve ark., 1994; Valenzuela ve Reed, 2013).

Class II de novo DSA'lar daha sonra ortaya çıkar ve genellikle kompleman bağımlı olmayan IgG2 veya IgG4 alt sınıfıdır. Kalıcı olma eğilimindedirler ve kronik antikor aracılı rejeksiyon ve transplant glomerülopatisi ile ilişkilidirler (Valenzuela ve Reed, 2013; Freitas ve ark., 2013; Everly ve ark., 2013; Filippone ve Farber, 2015). Class II

DSA'yı önlemek için özellikle de DQ'yu bir şekilde ortadan kaldırmaya çalışmak başarılı olmayabilir ve hastaları aşırı immünsüpresyon riski altına sokabilir (Ma ve ark, 2016). Bu iki sınıf arasında belirli benzerlikler olmasına rağmen, Class I ve Class II DSA'ların baskın özellikleri Tablo 2.'de karşılaştırılmıştır.

2.5.3. DSA Gücü

DSA gücü (veya titresi) genellikle Luminex boncuk bazlı analiz ile ortalama floresan yoğunluğu olarak ifade edilir. Yapılan çalışmalar, ortalama floresan yoğunluğu ile antikor aracılı rejeksiyon riski arasındaki klinik ilişkiyi göstermiştir. Yüksek DSA titresi, kompleman bağlama kapasitesi ve daha ciddi doku yaralanmaları ile ilişkilendirilmiştir (Loupy ve ark., 2013; Freitas ve ark., 2013; Everly ve ark., 2013; Yell ve ark., 2015; Loupy ve ark., 2015; Tambur ve ark., 2015; Sicard ve ark., 2015). Teorik olarak, yüksek DSA titresi, komplemanı daha etkili bir şekilde aktive eden heksametrik kompleksler oluşturmak için birbirine yakın antijenlere bağlanabilen yeterli sayıda IgG molekülü oluşturur (Freitas ve ark., 2013; Yell ve ark., 2015). Bununla birlikte, DSA gücü ile klinik sonuç arasındaki ilişki tam net değildir. Benzer ortalama floresan yoğunluğuna sahip DSA'lar, kompleman kaskadını her zaman etkinleştirmez. Rejeksiyon veya greft disfonksiyonundan kaçan yüksek düzeyde dolaşımdaki DSA'ları olan nakilli hastalar vardır (Valenzuela ve Reed, 2013; Kumbala ve Zhang, 2013; Filippone ve Farber, 2015). HLA laboratuvarımız, klinik olarak anlamlı ortalama floresan yoğunluğu olarak Class I ve Class II DSA'lar için 1000 ortak sınır değerlerini kullanmaktadır. Katı faz boncuk tahlillerinin çeşitli teknik sınırlamaları bulunmaktadır. Denatüre HLA moleküllerine karşı antikorların varlığı nedeniyle yanlış pozitif veya yüksek titreler rapor edilebilir. Paylaşılan epitoplardan birini hedefleyen DSA'lar, boncuklar boyunca seyreltilebilir. Çok yüksek DSA düzeylerinin testini etkileyen inhibitörler veya "prozon etkileri" varlığında da yanlış negatif veya düşük titreler ortaya çıkabilir (Freitas ve ark., 2013; Tambur ve ark., 2015; Lefaucheur ve ark., 2016). DSA'lı hastalarda "prozon etkisinin" çok yaygın olduğunu (%71) ve testten önce serumun seri dilüsyonunun DSA gücünün daha doğru bir ölçüsünü sağladığı kaydedilmiştir (Tambur ve ark., 2015).

2.5.4. Kompleman Bağımlı DSA

Kompleman bağımlı DSA'lar için Luminex tabanlı testin son zamanlardaki yaygın olarak kullanılması, antikor aracılı ret fenotiplerini ve greft başarısızlığını tahmin etme yeteneğimizi önemli ölçüde geliştirdi (Yabu ve ark., 2011). Birkaç çalışma, C1q (Kompleman bileşeni 1q) bağımlı olmayan DSA'lar ile karşılaştırıldığında, C1q bağımlı DSA'ların, antikor aracılı rejeksiyon, ciddi doku hasarı ve greft kaybı riskinin önemli ölçüde daha yüksek olmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Comoli ve ark., 2016). Loupy ve ark yaptığı çalışmaya göre, böbrek naklinden 1 yıl sonra veya antikor aracılı rejeksiyon sırasında tespit edilen C1q bağımlı DSA, greft kaybının bağımsız bir faktörüydü. Greft kaybı riskini 4,78 kat arttırdı (%95 güven Aralığı [%95 GA], 2,69 ila 8,49). C1q bağımlı DSA, ortalama floresan yoğunluğu (tehlike oranı [HR], 4.5; %95 GA, 2.2 ila 9.0) için ayarlama yapıldıktan sonra böbrek allogreft kaybı riski ile bağımsız olarak ilişkili kaldı. C1q bağımlı olmayan DSA'ları olan hastalarla karşılaştırıldığında, C1q bağımlı DSA'lar, daha yaygın inflamasyon, mikrovaskülit, endarterit, transplant glomerülopatisi ve C4d birikintilerini içeren daha ciddi greft yaralanmaları ile daha yüksek antikor aracılı rejeksiyon insidansı ile ilişkilendirildi (Loupy ve ark., 2015). Yakın zamanda Guidicelli ve arkadaşları kompleman bağımlı DSA'ların uzun vadeli etkilerini C1q bağımlı olmayan DSA'lara karşı greft sağkalımları üzerinde etkilerini karşılaştırdı. Her ikisinin de greft kaybıyla ilişkili olduğunu buldular. Bununla birlikte, C1q bağımlı DSA'lar, ortaya çıktıktan sonra hızla meydana gelen greft kaybıyla ilişkilendirildi ve C1q bağımlı olmayan DSA'lar, uzun vadede greft kaybına yol açtı. Calp-İnal ve arkadaşları ileriye dönük olarak 284 hastada (grup 1) ve geriye dönük olarak 405 hastada (grup 2) C1q bağımlı DSA'yı inceledi. Akut antikor aracılı rejeksiyon insidansları, C1q-negatif DSA'ları olan hastalar (sırasıyla %5 ve %2) ve hastalarla karşılaştırıldığında, grup 1 (%45) ve 2'deki (%15) C1q-pozitif DSA'lı hastalarda anlamlı olarak daha yüksekti. DSA negatif olanlar sırasıyla %1 ve %3' idi. Kronik antikor aracılı rejeksiyon insidansları, C1q-negatif DSA'ları olan hastalarla (sırasıyla %5 ve %25) karşılaştırıldığında, grup 1 (%36) ve 2'de (%51) C1q-pozitif DSA'lı hastalarda da önemli ölçüde daha yüksekti. DSA negatif olan hastalar (sırasıyla %2 ve %6; $P < 0,001$) idi. Grup 1'deki greft sağkalımı, C1q-pozitif DSA'ları olan hastalarda (%73), C1q-negatif DSA'ları olan hastalarla (%95) ve DSA negatif olan hastalarla (%94; $P = 0.21$) karşılaştırıldığında

sayısal olarak daha düşüktü. C1q bağımlı DSA'ların varlığı, çalışmada antikor aracılı reddin hem akut hem de kronik fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir (Calp-Inal ve ark., 2016). Yabu ve arkadaşları ise, DSA'nın IgG düzeyi ile test edilmesinin pozitif C4d birikimi için çok hassas olmasına rağmen, pozitif C1q bağımlı DSA'nın transplant glomerülopatisi ve greft kaybı için daha spesifik olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, bu çalışmalar C1q bağımlı DSA'ların C1q bağımlı olmayan DSA'lardan daha zararlı olduğunu göstermektedir. Pozitif C1q bağımlı DSA, geleneksel DSA ortalama floresan yoğunluğunun ötesinde, antikor aracılı rejeksiyon ve greft kaybı için bağımsız bir risktir (Yabu ve ark., 2011).

Antikor aracılı reddin bir öngörücüsü olarak C3d veya C4d'ye bağlanan DSA'yı düşündüren ön veriler vardır. Sicard ve arkadaşları rejeksiyon teşhisi sırasında hem C1q hem de C3d bağımlı DSA tahlillerini karşılaştırdı. C3d bağımlı DSA'nın varlığının, ortalama floresan yoğunluğundan bağımsız olarak daha yüksek bir greft kaybı riski ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. C3d bağımlı DSA, greft kaybının C1q bağımlı DSA'dan daha iyi bir tahmincisiydi (Sicard ve ark., 2015). Pediatrik popülasyonda benzer sonuçlar bildirmiştir: C3d bağımlı DSA, antikor aracılı ret ve greft kaybı riskini sınıflandırmada C1q bağımlı DSA'dan daha iyiydi (Comoli ve ark., 2016). Teorik olarak, bu iki tahlil, kompleman aktivasyonunun farklı adımlarını analiz eder. C1q, klasik yolun ilk adımıdır ve kompleman kademesinin tam aktivasyonunun göstergesi olmayabilir. C3d daha aşağı yöndedir ve daha büyük olasılıkla tam kompleman aktivasyonunu gösterir. Başka bir çalışmada, C4d'yi bağlayabilen önceden oluşturulmuş DSA'ların, transplant öncesi çapraz eşleşme negatif olmasına rağmen, antikor aracılı reddi ve greft kaybını öngördüğü rapor edilmiştir (Lawrence ve ark., 2013). C3d ve C4d bağımlı DSA'ların antikor aracılı reddi ve greft kaybını öngörmedeki rolünü aydınlatmak için daha çok ve büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.5.5. DSA IgG Alt Sınıfları

IgG'nin birkaç alt sınıfı (IgG1, -2, -3 ve -4) vardır ve bunların komplemanı aktive etme ve efektör hücreleri Fc reseptörü aracılığıyla aktive etme konusunda çeşitli yetenekleri vardır. Bağışıklık tepkisi ve antikor üretimi boyunca, tipik olarak IgG3'ten IgG1'e ve IgG2'den IgG4'e sıralı bir IgG alt sınıfı değişimi vardır. IgG1 ve IgG3 genellikle kompleman bağlayan alt sınıflarıdır (van Zelm, 2014; Khovanova ve ark., 2015;

Lefaucheur ve ark., 2016). IgG1 ve IgG3 genellikle kompleman bağlayan alt sınıflarıdır. IgG1, en bol bulunan alt sınıftır ve toplam IgG seviyesini yansıtırken IgG3, C1q'ya daha yüksek bağlanma verimliliğine sahiptir ve kompleman kaskadını aktive eder. IgG2 komplemanı zayıf bir şekilde aktive edebilse de, IgG4, komplemanı hiç aktive etmez, ancak her ikisi de Fc reseptörü yoluyla efektör hücreleri aktive edebilir. IgG4 ayrıca olgunlaşmış yanıtın bir biyolojik belirteci olarak kabul edilir ve ileri düzeyde rejeksiyon ile ilişkilidir (Khovanova ve ark.,2015). Bu nedenle DSA'nın patojeniteleri sürekli ve IgG alt sınıf profiline göre değişir.

Lefaucheur ve ark . yakın zamanda böbrek naklinden sonraki ilk yıl içinde DSA saptanan 125 hastayı inceledi: bunlardan 51'inde akut antikor aracılı rejeksiyon, 36 hastada subklinik antikor aracılı rejeksiyon ve 38'inde antikor aracılı rejeksiyon yoktu (Lefaucheur ve ark., 2016). Antikor aracılı reddi olan hastalarda çoğunda DSA IgG alt sınıfları ve C1q bağımlı immün baskın donöre özgü antikor (iDSA) vardı. Antikor aracılı rejeksiyon içermeyen hastalarda C1q bağımlı iDSA'lar veya IgG3 veya IgG4 iDSA'ları yoktu. İlginç bir şekilde, akut antikor aracılı reddin esas olarak IgG3 iDSA (%91) tarafından yönlendirildiğini, buna karşın subklinik antikor aracılı reddin IgG4 iDSA (%76) tarafından yönlendirildiğini bulmuşlardır. IgG3 iDSA, daha kısa rejeksiyon süresi, artan mikrosirkülasyon hasarı ve komplemana bağlı sitotoksiteyi gösteren pozitif C4d birikintileri ile ilişkilendirildi. IgG4 iDSA, artan transplant glomerulopatisi ve interstisyel fibrozis/tübüler atrofi ile daha sonraki greft yaralanması ile ilişkilendirildi. Diğer analizler, IgG3 ve C1q bağımlı iDSA'ların greft kaybı ile güçlü ve bağımsız bir şekilde ilişkili olduğunu gösterdi. Antikor aracılı reddin IgG4 iDSA ile ilişkili subakut ve kronik fenotipleri, komplemandan bağımsız patogeneizlerle tutarlıydı (Lefaucheur ve ark., 2016). Viglietti ve arkadaşları yakın zamanda 851 böbrek alıcısının prospektif bir çalışmada sistemik DSA taraması ve karakterizasyonu (titre, C1q bağlama kapasitesi ve IgG alt sınıfları) nakil sırasında, nakilden 1 ve 2 yıl sonra ve klinik olayların zamanında gerçekleştirilmiştir. Geleneksel DSA titresi yaklaşımına IgG3 alt sınıfı veya C1q bağlama kapasitesinin eklenmesinin, hastaların >%60'ında bireysel allogreft kaybı riskini değerlendirmede performansı iyileştirdiğini bulmuşlardır. Kompleman bağımlı DSA testi ve IgG alt sınıf analizindeki gelişmeler, hastanın immünolojik riskini değerlendirme yeteneğini geliştirmiştir. Bunun yanı sıra klinisyenlerin daha zararlı DSA'ları tanımlamasına, antikor aracılı reddin farklı

fenotiplerini tahmin etmesine ve böbrek biyopsisi ile immünosupresif yönetiminde klinik kararlarına rehberlik etmesine yardımcı olabilir (Viglietti ve ark., 2017).

C4d, klasik kompleman yolunun bir ürünüdür. C4d'nin benzersiz bir özelliği, endotelial bazal membrana kovalent olarak bağlanmasıdır. Peritübüler kılcal damarlarda pozitif C4d birikimi, antikor aracılı reddin immünolojik belirteci olarak rol alır ve doku kesitinde immünofloresan ile gösterilir (Troxell ve ark., 2006; Worthington ve ark., 2007). Antikor aracılı reddi olan bazı hastalarda pozitif C4d boyanması olmayabilir. DSA pozitif ama C4d boyanması negatif olan vakalar ya teknik hatadan (yanlış negatif) ya da kompleman olmayan aktive edici DSA'dan kaynaklanabilir (Haas ve ark., 2014). Ayrıca, antikor aracılı red, HLA'ya karşı DSA olmadan pozitif C4d birikimi ile sonuçlanabilen HLA dışı (non-HLA) antikorlardan kaynaklanabilir (Dragun ve ark., 2005). Ayrıca, Kikić ve arkadaşları antikor aracılı rejeksiyonun histolojik özellikleri olan veya olmayan C4d pozitif olan hastaların, C4d negatif olan hastalara göre 8 yıllık greft sağkalımının daha kötü olduğunu bildirdi. Pozitif C4d birikimi, böbrek fonksiyonunda daha net bir düşüş ve greft yetmezliği için bir risk faktörü ile bağımsız olarak ilişkilendirildi (Kikić ve ark., 2015). Son zamanlarda, Orandi ve arkadaşları C4d-pozitif ve -negatif antikor aracılı reddin hasta sonuçlarını karşılaştırdı. Her iki fenotipin de reddedilmeyen hastalara kıyasla önemli ölçüde daha düşük greft sağkalımı ile ilişkili olduğunu ve C4d-pozitif antikor aracılı reddin en kötü greft sağkalımına sahip olduğunu bulmuşlardır. C4d-pozitif antikor aracılı red, klinik bir duruma sahip olma (%85.3'e karşı %54.9) ve daha erken (medyan =14'e karşı 46 gün) olma olasılığı bakımından anlamlı derecede daha yüksekti ve üç kat daha yaygındı (%7.8'e karşı %2.5). Bu, C4d-pozitif antikor aracılı reddin doğrudan komplemana bağlı sitotoksiteden kaynaklandığı ve daha akut ve şiddetli klinik sunumla ilişkili olduğu hipotezini desteklerken, C4d-negatif antikor aracılı rejeksiyon, doğası gereği subklinik veya kronik olan ve geç greft disfonksiyonuna dolayısıyla greft kaybına yol açan komplemandan bağımsız mekanizmalar aracılık edebilir (Orandi ve ark., 2016).

2.5.6. HLA Dışı Antikorlar

HLA-uyumlu kardeş nakillerinde de greft reddi meydana gelebilir ve bu durum HLA olmayan antijenlere karşı bir bağışıklık tepkisi olduğunu gösterir (Sun ve ark., 2011,

Dinavahi ve ark., 2011). HLA dışı antikorlar, antikor aracılı rejeksiyona ve greft kaybına neden olabilir. ABO-uyumsuz organ nakli, önceden oluşturulmuş hemaglutinin A ve/veya B antikorunun varlığı nedeniyle hiperakut rejeksiyona neden olabilir. Rhesus faktörü ve diğer kırmızı hücre antijenleri, endotel hücrelerinde eksprese edilmedikleri için organ nakli ile ilgili değildir (Kumbala ve Zhang, 2013).

Küçük doku uyum antijenlerinden (mHag) H-Y sadece erkeklerde Y kromozomu tarafından kodlanır ve bir erkekten alınan bir organ bir kadına nakledildiğinde alloimmün yanıtı indükleyebilir (Scott ve ark., 1997). MHC Class I ile ilişkili zincirler A ve B, endotel hücrelerde eksprese edilen küçük histo-uyumluluk molekülleridir ve bunların antikorları, antikor aracılı reddi tetikleyebilir. Antiendotel antikorlar, anti-glutasyon S-transferaz T1 ve anti-anjiyotensin-2 reseptörü gibi birkaç başka antikor da rapor edilmiştir. İlginç bir şekilde, anjiyotensin-2 reseptör antikoru, şiddetli vasküler daralmaya ve hipertansiyona neden olan agonistik bir etkiye sahiptir (Dragun ve ark., 2005; Zou ve ark., 2007). Transplant immünolojisindeki bilgiler ilerledikçe, muhtemelen daha fazla alloreaktif ve otoreaktif HLA olmayan antikorlar keşfedilecektir.

2.5.7. DSA ve Akut Antikor Aracılı Rejeksiyon

Transplantasyon sonrası süreç boyunca, hümmoral yanıt sırasında DSA'nın kapsamı, zamanlaması ve çeşitli özellikleri ile belirlenmiş birkaç antikor aracılı rejeksiyon fenotipi vardır. Hiperakut rejeksiyon, nakilden hemen sonra meydana gelir. Önceden oluşturulmuş antidonör antikorların yüksek titresi aracılık eder: anti-HLA, anti-ABO veya diğer HLA olmayan antikorlar (Kumbala ve Zhang 2013). Hiperakut ret, geri dönüşü olmayan bir vasküler ret, intravasküler tromboz ve greft nekrozu ile sonuçlanır ve greft nefrektomi genellikle endikedir. Rutin nakil öncesi çapraz eşleştirme ve ABO uyumluluğunun doğrulanması, hiperakut reddin çoğunu önlemelidir (Kumbala ve Zhang 2013).

Hızlandırılmış akut rejeksiyon (veya gecikmiş hiperakut rejeksiyon), nakilden sonraki 24 saat ila birkaç gün içinde ortaya çıkabilir. Bellek B ve plazma hücreleri tarafından önceki sensitizasyondan gelen anamnestic yanıtı temsil eder (Zachary ve ark., 2013; Lúcia ve ark. 2015). Nakil öncesi negatif bir çapraz eşleşme bile bunu

engelleyemeyebilir, çünkü önceden oluşturulmuş DSA titresi nakilden önce tespit edilemeyecek kadar düşük olabilir, ancak hafıza hücrelerinden gelen tepki, nakilden sonra DSA titresinde bir dalgalanmayı tetikleyebilir. Lúcia ve arkadaşları, HLA-B hücre enzimine bağlı bir immünoSpot testi ile donör HLA antijenlerine karşı dolaşımdaki bellek B hücrelerinin, bekleme listesindeki duyarlı hastalarda tanımlanabildiğini, ancak duyarsızlaştırılmış hastalarda tanımlanamadığını bildirmiştir. Ayrıca hafıza B hücreleri, kimerik bir anti-CD20 monoklonal antikor (mAb) olan rituksimab tarafından azaltılabilir; bu nedenle, anamnestik yanıt, böbrek nakli öncesi rituksimab tedavisi ile ortadan kaldırılabilir. Uzun ömürlü plazma hücrelerinin mevcudiyeti bir sorun olmaya devam etmektedir çünkü bunlar genellikle mevcut terapötiklere karşı dirençlidir (Zachary ve ark., 2013; Lúcia ve ark. 2015).

Erken akut antikor aracılı rejeksiyon, önceden oluşturulmuş DSA'nın yükselen titresinden nakilden hemen sonra meydana gelir. Böbrek nakli sonrası de novo DSA'nın ortaya çıkması nedeniyle geç akut antikor aracılı rejeksiyon gelişir. Antikor aracılı rejeksiyon, hâlihazırda gecikmiş greft fonksiyonundan muzdarip bir greftte de gelişebilir. Bu nedenle, gecikmiş greft işlevine sahip herhangi bir yeni böbrek nakli, gizli reddi tespit etmek ve uygun şekilde tedavi etmek için DSA izleme ve protokol biyopsilerine sahip olmalıdır. Erken akut rejeksiyon genellikle tedaviye daha fazla yanıt verirken, geç akut rejeksiyon tedaviye iyi yanıt vermeyebilir (Umber ve ark., 2017).

2.5.8. Akut Antikor Aracılı Reddin Tedavisi

Akut antikor aracılı reddin tedavi edilmesi genellikle birkaç tür antitimosit globülin (ATG, T hücreleri ve bunların öncülerinin önlenmesi ve tedavisinde kullanılır) plazmaferez, intravenöz Ig (IVIG), rituksimab, bortezomib ve kortikosteroid gibi kombine yöntemlerden oluşur. Plazmaferez, dolaşımdaki DSA'yı ortadan kaldırır, ancak hiçbir antikor üretimini baskılayamaz (Rocha ve ark., 2003; Lorenz ve ark., 2005). IVIG' ler genellikle plazmaferezden sonra uygulanır. İntravenöz Ig' lerin olası mekanizmaları, DSA' ları nötralize eden anti-idiotipik (etken antijeninin taklidi) antikorları, kompleman bağlanmasını veya aktivasyonunu inhibe eden ve DSA üretimini baskılayan immün düzenleyici molekülleri içerir (Luke ve ark., 2001). Rituximab (anti-CD20 monoklonal antikor) hem pre-B hem de olgun B hücrelerini

baskılar, böylece plazma hücrelerinin B hücrelerinden dönüşümünü azaltır (Fehr T, ve ark., 2009). Bortezomib, proteazomu inhibe eder ve antikor üreten plazma hücrelerinin apoptozunu aktive eder; bu nedenle, DSA üretimini doğrudan azaltabilir. Antikor aracılı reddin tedavisinde bortezomibin yararını gösteren birkaç çalışma vardır (Pearl ve ark., 2016). ATG B hücre apoptozunu indükleyerek doğrudan veya yardımcı T hücrelerini baskılayarak dolaylı olarak B hücresi yanıtını kontrol edebilir. Ek olarak, özellikle geleneksel tedavilere yanıt vermeyen zor hastalar için düşünülebilecek birkaç geleneksel olmayan yaklaşım vardır. Splenektomi, HLA-uyumsuz böbrek naklinden sonra ciddi antikor aracılı rejeksiyon için bir kurtarma tedavisi olarak rapor edilmiştir ve splenektomi ile ekulizumab kombinasyonu, her iki modalitenin tek başına uygulanmasından daha etkili olabilir (Orandi ve ark., 2014). Ekulizumab, C5'e yönelik bir insan mAb' dir ve C5'in C5a ve C5b'ye bölünmesini inhibe eder. Stegal ve arkadaşları pozitif çapraz eşleşmeli hastalarda duyarsızlaştırma protokolünün bir parçası olarak bunu inceledi. Ekulizumab tedavisinin, geçmiş bir kontrol grubuna kıyasla erken akut antikor aracılı rejeksiyon insidansını önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır (sırasıyla % 6,7'ye karşı % 43,8). Bununla birlikte, 2 yıllık bir takipten sonra ekulizumab, kronik antikor aracılı rejeksiyon gelişimini engellemedi (Stegall ve ark., 2011, Cornell ve ark., 2015). Bu, akut antikor aracılı rejeksiyonun komplemana bağlı patogenezi ve kronik antikor aracılı rejeksiyonun komplemandan bağımsız mekanizmalarını destekler. Son zamanlarda, Viglietti ve arkadaşları, başlangıçta geleneksel tedaviye yanıt vermeyen akut antikor aracılı reddi tedavi etmek için yüksek doz IVIG' lere eklenen bir C1 inhibitörünün (berinert, insan plazmasından türetilmiş bir C1 esterase inhibitörü) pilot çalışmasını bildirdi. 6 aylık bir tedaviden sonra böbrek fonksiyonunda iyileşme, C4d birikim oranında ve C1q bağımlı DSA durumunda azalma buldular. Teorik olarak, C1 inhibitörü, C5 inhibitörüne göre bazı faydalar sağlamalıdır, çünkü bloğu C5'e yakın olduğundan, anafilatoksinler olan C3a ve C5a'nın üretimini önleyerek daha fazla inflamatuvar yanıtı yol açar (Viglietti ve ark., 2016). Akut antikor aracılı rejeksiyondaki etkinliği aydınlatmak için kompleman inhibitörlerinin resmi klinik denemelerine ihtiyaç bulunmaktadır.

2.5.9. DSA ve Kronik Antikor Aracılı Rejeksiyon

Akut antikor aracılı rejeksiyon, kronik antikor aracılı ret ve transplant glomerülopatisinin gelişiminin öncül bir göstergesidir (Opelz ve Döhler, 2008). Akut

rejeksiyondan sonra gelişen ve kötüleşen proteinüri, kronik rejeksiyon veya transplant glomerülopatisinin gelişimini düşündürür (Kumbala ve Zhang, 2013). Subklinik antikor aracılı rejeksiyon, normal greft fonksiyonuna sahip protokol biyopsisi ile antikor aracılı reddin immünohistolojik kanıtı olarak tanımlanır ve ayrıca tedavi edilmezse kronik antikor aracılı reddin bir göstergesidir. Kronik antikor aracılı rejeksiyon, tipik kronik değişikliklerin (glomerüler değişiklikler, peritübüler kapiller bazal membranın çok katmanlı olması, interstisyel fibrozis/tübüler atrofi ve arterlerde fibröz intimal kalınlaşma) ve devam eden hümmoral aktivitenin (pozitif DSA, HLA olmayan antikor veya C4d boyama) olması durumudur. Kronik rejeksiyon genellikle geri döndürülemez ve ağırlıklı olarak kalıcı olma eğiliminde olan ve tedavisi zor olan genellikle HLA Class II DSA' lardan kaynaklanır (Viglietti ve ark., 2016).

2.5.10. Kronik Antikor Aracılı Reddin Tedavisi

Bortezomib ve yüksek dozlarda IVIG' lerin, Class II DSA düzeyini, Class I DSA düzeyinden daha az etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Philogene ve ark., 2014; Cooper ve ark. 2014). Class II DSA' ları (özellikle DQ'yu) ortadan kaldırma girişimleri, hastayı aşırı immünosupresyon açısından büyük risk altına sokabileceğinden başarılamayabilir (Ma ve ark. 2016). Rituksimab ve/veya IVIG ile tedavi, hümmoral aktivitenin kısmi kontrolünü sağlayabildiği ve greft sağkalımını iyileştirdiği bildirilmiştir (Smith ve ark., 2012; Cooper ve ark. 2014). Yakın zamanda kronik antikor aracılı ret için 6 aylık eculizumab tedavisinin pilot denemesi yapıldı. Tedavi grubu, kontrol grubunda not edilen yavaş yavaş bozulan böbrek fonksiyonuna kıyasla greft fonksiyonunun stabilizasyonuna sahipti (Kulkarni ve ark., 2017). Komplemandan bağımsız yollar yaygın olarak öngörülmesine rağmen, kronik antikor aracılı rejeksiyonda komplemana bağlı bir patogeneze de bulunmaktadır. Komplemana bağlı ve bağımsız mekanizmaların kombinasyonu, kronik antikor aracılı rejeksiyonda da mevcut olabilir (Philogene ve ark., 2014; Cooper ve ark. 2014).

İmmünesupresif ilaçlar günümüzde transplantasyon sonrasında prensipte indüksiyon ve idame ajanlar olarak tedavide kullanılmak üzere geliştirilmektedir ve teknolojik değişmelere ayak uyduracak şekilde geliştirilmeye devam edilmektedir. Kullanılan indüksiyon ajanları T hücre azaltması (deplezyon) yapan ve yapmayan ilaçlar olmak üzere iki sınıfta toplanabilir ki T hücre azaltması yapanlar Anti-timosit globülin,

OKT3, Anti-CD52, Rituximab (anti-CD20) iken, T hücre azaltması yapmayan ilaçlar ise Basiliximab ve Daclizumab indüksiyon sebebiyle kullanılan ilaçlar olarak dikkat çekmektedir. İdame immünosupresif ilaçlar, hümmoral aktiviteyi kontrol etme ve greft fonksiyonunu stabilize etme umuduyla daha güçlü ilaçlarla arttırılabilir veya ayarlanabilir (Smith ve ark., 2012; Cooper ve ark. 2014).

Siklosporin A (CsA) ve Takrolimus (TAC, FK-506) gibi kalsinörin inhibitörleri (CNI), böbrek transplantasyonunda hala immünosupresyonun temel dayanağıdır. Baskın etki mekanizmaları, Aktive T-hücrelerinin Nükleer Faktörü (NFAT) fosforilasyonunun inhibisyonu ve bunun sonucunda IL-2 aracılı T lenfosit aktivasyonunun ve proliferasyonunun azalmasıdır (Matsue ve ark., 2002; Winslow ve ark., 2006). Mikofenolat mofetil (MMF) ve aktif metaboliti mikofenolik asit (MPA), transplantasyonda en yaygın kullanılan ilaçlardır. MMF/MPA, esas olarak T ve B hücreleri tarafından eksprese edilen inozin monofosfat dehidrojenazı (IMPDH) seçici olarak inhibe ederek de novo guanozin nükleotid sentezini azalttığı için spesifik anti-lenfosit ajanları olarak kabul edilir (Allison ve Eugui, 2000). Glukokortikoidler, böbrek transplantasyonundan sonra immünosupresyonun hem indüksiyon hem de idame aşamasında kullanılan anti-inflamatuvar ilaçlardır. Enflamatuvar yanıtı ve lökositlerin iltihaplı dokulara göçünü engellerler. Ayrıca vasküler geçirgenliği ve lökosit dağılımını engelleyerek, ölüm/hayatta kalma ve hücrel farklılaşma programlarını modüle ederek inflamasyonun çözülmesini hızlandırırlar (Coutinho ve Chapman, 2011). Rapamisinin memeli hedefi (mTOR), çeşitli sinyal ağlarına sahip 2 farklı kompleksin (mTORC1 ve mTORC2) parçasıdır. mTORC1, proteinlerin, lipidlerin ve nükleotitlerin sentezini uyaran anabolik hücrel metabolizmayı destekler ve aynı zamanda lizozom biyogenezi ve otofaji gibi katabolik süreçleri inhibe eder. mTORC2, hücre sağkalımını, hücre iskeleti organizasyonunu, lipogenezi ve glukoneogenezi kontrol eder (Zaza ve ark., 2018). Organ transplantasyonunda mTOR inhibitörleri, Sirolimus ve Everolimus, immünosupresif fonksiyonlarını tercihen mTORC1'i inhibe ederek gösterirler (Wullschleger ve ark., 2006). Böylece efektör T hücre çoğalması için gerekli olan protein translasyonunu görünürde durdurur. mTOR inhibitörleriyle ilgili ek deneysel ve klinik deneyimler, kısmen doğuştan gelen bağışıklık hücreleri üzerinde hareket ederek greft sağkalımı üzerinde hem yararlı hem de zararlı etkiler sergilediklerini desteklemektedir (Zaza ve ark., 2013; Zaza ve ark.,

2014). Antijen sunumu ve birlikte uyarıcı moleküller, sitokin üretimi ve metabolik yollardaki değişiklikler yoluyla, mTOR inhibitörleri doğuştan gelen bağışıklık hücreleri üzerinde kapsamlı ve bazen çelişkili etkiler üretir.

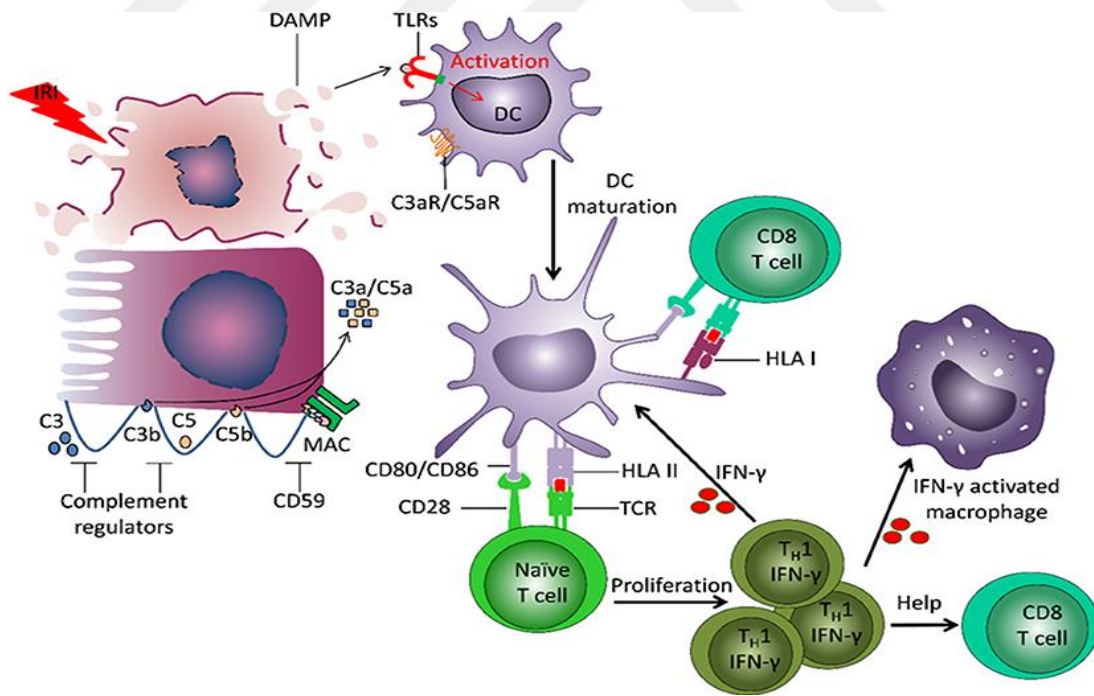
2.6. Böbrek Rejeksiyonunun T Hücre Yanıtı ile İlişkisi

İmmün sistem spesifik olmayan antijenlere karşı gelişen doğal immün sistem ve belirli spesifik antijene yanıt oluşturabilen kazanılmış edinsel immün sistem olarak iki ana başlıkta değerlendirilir (Abbas ve Lichtman, 2005). Transplant sonrası oluşan bağışıklık etkileşimi doğal immün sisteminin aktive olması ile oluşur. Yangısal süreçlerin oluşturduğu ve etkin olduğu yollar, T lenfositlerin doğrudan ya da dolaylı aktivasyonu ile rejeksiyonun tetiklenmesi aracılığıyla aktive olur. Bilindiği üzere çeşitli sebeplerle hasar almış dokularda, Toll Like Reseptör (TLR) ligandları; Hasar İlişkili Moleküler Patern (DAMP) ve diğer doğal immünite molekülleri ifade edilmektedir (Leemans ve ark., 2014).

TLR'ler klasik süreç içerisinde patojenleri tanır bazen de yabancı doku moleküllerini algılayabilme özelliğine sahiptirler ve ürettiği çeşitli moleküller aracılığıyla da akut rejeksiyonun başlamasında önemli rolü olduğu bilinen dendritik hücrelerin olgunlaşmasına ve aktive olmasına sebep olurlar (O'Neill ve ark., 2013). Dolaylı yoldan değilde direkt olarak greftin içindeki T hücrelerini ve ASH' leri aktive edebilme kabiliyetine sahip olduğu bilinen diğer doğal immünite elemanı ise, C3a ve C5a üreten kompleman sistemidir (Patel ve Terasaki, 1969).

MHC Class I ilişkili A bölgesi antijenleri (MICA) ise endotelial hücre yüzeyinde bulunurlar ve antijenin bu yüzeylerdeki artışı doğal olarak NK ve CD8 T hücrelerinin uyarılmasını sağlamaktadır. HLA uyumu olan nakillerde uyuma rağmen MICA antijen hassasiyeti başarısız greft prognozuyla ilişkilendirilmiştir (Seyhun ve ark. 2008). Genellikle allojenik HLA molekülleri transplante edilen dokularda bulunan ASH' ler aracılı sunulması ile T hücreleri tarafından hemen tanınırlar (direkt tanıma). Bazen de greftteki alloantijenler, alıcıdaki profesyonel ASH' ler sayesinde işlenerek T hücrelerine tanıtılırlar (dolaylı tanıma). İnsanlarda böbrek nakillerinde grefte karşı gelişen immün yanıtın birinci hedefi donör hücrelerinde eksprese olan HLA molekülleridir. Bu edinsel immünitenin bir çeşididir. T lenfositler, B lenfositlerle

birlikte edinsel immünitinin hücresel olan bileşenlerini oluşturur. Nakil edilen dokuya karşı gelişen veya rejeksiyonuna neden olabilecek immün yanıtı anlamak için edinsel immün yanıtta rol oynayan T hücrelerinin rolünü anlamak çok önemlidir. Kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücrelerden köken alan T lenfositler, olgunlaşma sürecini timusta tamamlar ve kan dolaşımına geçer (Lai ve Kondo, 2008). T hücreler sadece protein yapısında bulunan antijenleri tanıyabilirler. Aktivasyonları ise lenf düğümleri içinde meydana gelir. Bir T hücre reseptörü (TCR) antijen ile temasa geçtiği zama 3 tane sinyal ortaya çıkar. HLA molekülünün T lenfositleri için gerekliliğinin nedeni; üzerindeki antijen reseptörleri sayesinde T lenfositlerin yabancı antijenleri tanıyabilmesi için gerekli zemini ve ortamı sağlamasıdır. Birinci sinyal HLA molekül antijeninin bağlanması ile T hücre reseptörü arasındaki etkileşime girmesi sayesinde meydana gelir. HLA moleülleri ile sunuma hazırlanan peptidleri tanımak için her bireyde $CD4^+$ T ve $CD8^+$ T hücreleri farklılaşmıştır. $CD4^+$ T lenfositleri HLA Class II moleülleri ile birlikte sunulan antijenleri tanırken, $CD8^+$ T lenfositleri ise Class I moleülleri ile birlikte eş zamanlı olarak sunulan antijenleri tanır (Csencsits ve Bishop, 2003).



Şekil 2.4. Böbrek Rejeksiyonu ve T hücre Yanıtı

Eikmans ve ark., 2019 (<https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00358>, Erişim Tarihi: 10 Ekim 2022).

Class I özelliğine sahip moleküller, farklı miktarlarda neredeyse tüm çekirdekli hücrelerin yüzeylerinde ifade olurken genellikle hücre içi kaynaklı küçük antijenlerin tanınabilmesi için CD8⁺ sitotoksik T hücrelerine (Tc) sunulur. Class II molekülleri ise öncelikle B lenfositler ve monositler de dahil olacak şekilde immün sistem hücreleri ile kısıtlıdır. Bunun yanı sıra CD4⁺ T hücrelerine, hücreler arası 12-16 aa'lık proteinlerin sunulabilmesi için elzemdirler (Şekil 2.4.). T hücre yüzeylerinde ifade edilen eş uyarıcı moleküllerin (CD28), antijen sunan hücre (ASH) vazifesi bulunan makrofaj, dendritik hücre ve B lenfosit yüzeyindeki ligandları ile (B7-1 veya B7-2) birleşmesi ise ikinci sinyali iletir (Li ve ark., 2009). Bu sinyal iletimi gerçekleşmezse eğer reseptör aracılı sinyal ile T hücre aktive olamaz ve beklenen immün yanıt gözlenemez. T hücre yüzeyinde her zaman mevcut olan CD28 molekülü B7 ile etkileştiğinde T hücre aktivasyonu artışı takiben sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) ekspresyonunun artışı başlar. CD28 molekülü ile yarış halinde olarak bu aktivasyonu sınırlı tutar ve böylece IL-2 yapımı azalır. CTLA-4 bu fonksiyonu ile immün yanıtta inhibitör bir rolü üstlenmiş olmaktadır. Hücre içine iletilen sinyallerle bir takım genlerin transkribe olması ve sitokinlerin sentezlenme aşaması ise üçüncü sinyal antijenin TCR ile etkileşime girmesi aracılığı ile olmaktadır. Bu üç sinyalinde var olması ile aktive olan T hücreleri CD8 pozitif T hücre ilişkili sitotoksikiteyi başlatır (Li ve ark., 2009).

Periferal kanda bulunan lenfositlerin yaklaşık %60-%80 civarını T hücreleri oluşturur; bunların üçte ikisi yardımcı T helper CD4, üçte biri ise CD8 eksprese eder. T hücreleri; CD4⁺ T hücreleri (yardımcı T hücreleri, T helper hücreleri), CD8⁺ T hücreleri (sitotoksik T hücreleri, öldürücü T hücreleri) ve Gamma/delta ($\gamma\delta$) T Hücreleri olmak üzere belirli alt gruplara ayrılır (Croft ve ark.,1994; Erard ve ark., 1993; Ferrick ve ark., 1995).

2.6.1. Yardımcı T Hücreleri

Edinsel immün yanıtların neredeyse hepsi için yardımcı T hücreleri (Th) gereklidir. Dolayısıyla edinsel immünitedeki tartışmaya yer olmaksızın en önemli hücrelerdir. Vücuda alınan mikropları yok etmek için B hücrelerinin aktive ederek antikor salgılamalarına yardımcı olurlar. Alıcı CD4⁺ T hücreleri B hücreleri tarafından yüksek afiniteli donöre özgü antikorların üretiminde kritik öneme sahiptir (Chen ve

ark.,2018). Bunun yanı sıra enfekte edilmiş hedef hücreleri yok etmesi için sitotoksik T hücrelerini de aktive ederler. CD4⁺ T hücreleri salgılayabildikleri sitokinlere göre değişik alt sınıflara ayrılıp bunlara göre adlandırılmışlardır. Her geçen gün alt grup sayıları artmakla birlikte günümüzde Th1, Th2, Th17, Th9, regülatör T hücre (Treg), foliküler yardımcı T (Tfh) ve Th22 olarak sınıflandırılmışlardır (Raphael ve ark., 2015).

Th1 hücreleri, çok çeşitli yollarda nakil edilen greftin reddine doğrudan ya da dolaylı bir yolla katkıda bulunurlar. IL-2 üretimini sağlayarak alloreaktif sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu sağlarlar. B hücrelerini aktive ederek alloreaktif antikor üretimine katkıda bulunurlar. Bunların dışında Fas/Fas ligand aracılı sitotoksikite yoluyla allogreft hasarına doğrudan neden olabilirler (Jiang ve ark., 2004; Liu ve ark., 2013). Yapılan çalışmalar Th2 hücrelerinin de transplant reddine dahil olduğunu göstermekle birlikte, bu hipotezin aksi bir şekilde IL-4 ve IL-10 salgılayarak Th1 yanıtını inhibe edebileceği için greft reddinin önlenmesi için önerilmiştir (Waaga ve ark.,2001). Ancak, Th2 sitokinlerinin eozinofilleri aktive ederek greft reddini desteklediğine dair artan kanıtlar vardır (Goldman ve ark., 2001; Nocera ve ark., 2004). Th17 hücrelerinin IL-17A üretimi ve nötrofilleri yangı yerine çağırmak yoluyla transplant reddinde rol oynadığı gösterilmiştir (Gorbacheva ve ark., 2010; Fan ve ark., 2011). Transplantasyonda Treg tedavisi ile ilgili olarak, Th1 ve Th2 hücrelerinin Treg hücreleri tarafından baskılanmaya duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ancak bu konuda çelişkili veriler yayınlandığı için Treg hücrelerinin Th17 hücrelerini baskılayıp baskılayamayacağı açık değildir (Benghiat ve ark., 2008; Hester ve ark., 2011). Transplant reddinde yer alan, bahsetmeye değer başka bir T hücresi alt kümesi, Tfh hücreleridir. Bu hücrelerin, transplant alıcılarında alloantikor üretimi için B hücrelerine yardım sağladığı bilinmektedir (La Muraglia ve ark., 2019). Allogreft reddinde Th9 ve Th22'nin rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. IL-9 ile IL-22 ve transplant reddi arasında bir bağlantı vardır, ancak diğer birçok hücre tipi de bu sitokinleri salgılayabileceği için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Liu ve ark.,2013).

2.6.2. Gamma/delta ($\gamma\delta$) T Hücreler

Gamma delta T hücreleri, hem anti-inflamatuar hem de pro-inflamatuar yanıtların araçlarıdır. $\gamma\delta$ T hücreleri, hem anti-inflamatuar hem de pro-inflamatuar yanıtların

aracılarıdır ve etkilerini büyük ölçüde MHC' den bağımsız mekanizmalar yoluyla gösterir. Doğrudan sitotoksik olabilirler ancak diğer bağışıklık hücreleri tarafından da aktive edilebilirler (Hayday, 2000). Ayrıca, $\gamma\delta$ T hücreleri, nakil sonrası enfeksiyonun, özellikle sitomegalovirüsün (CMV) kontrolünde rol oynamaktadır. Transplantasyon sonuçlarındaki rolleri allojenik reddin hem etkileyicileri hem de baskılayıcıları olabileceklerini gösteren kanıtlarla birlikte bu konudaki belirsizliğini halen korumaktadır (Akbulut, yazılı sunum 2009).

2.6.3. Sitotoksik T Hücreleri

Edinsel immün yanıt içinde efektif bir şekilde görev yapan lenfositlerin diğer alt grubu olan $CD8^+$ T hücreleri, hücre içindeki patojenlere ve tümörlere karşılık geliştirilen bağışıklıkta önemli göreve sahiptirler (Klenerman ve Hill, 2005; Kuang ve ark., 2010; Gattinoni ve ark., 2012; Lu ve ark., 2014). Ayrıca otoimmün ve alerjik hastalıklar gibi patolojik süreçlerin düzenlenmesine de katkıda bulunurlar (Huber ve ark., 2009; Loser ve ark., 2010; Kim ve Cantor, 2011; Tang ve ark., 2012; Visekruna ve ark., 2013).

$CD8^+$ T hücreleri, antijen sunan hücreler üzerinde MHC Class I tarafından sunulan spesifik peptitlerin tanınmasıyla aktive edilirler. $CD8^+$ T hücreleri bu aktivasyon sonrasında fazla miktarda efektör hücre üretmek amacıyla farklılaşma sürecine girerler. MHC Class I molekülleri çoğu çekirdekli hücrede eksprese edildiğinden, efektör $CD8^+$ T hücreleri, eritrositler hariç vücudumuzun hemen hemen tüm hücreleri tarafından sunulan hedef antijenlerini tanıyabilirler (Kaeche ve Cui, 2012). Periferde antijenle karşılaşma durumunda efektör $CD8^+$ T hücrelerinin farklılaşmış olan alt grupları kendilerine özgü olan görevlerini yerine getirebilirler. Birincil yanıtın sonunda, yanıt veren $CD8^+$ T hücrelerinin büyük kısmı apoptoz yoluyla ölürken küçük bir bölümü ise uzun süreli bellek T hücreleri biçiminde devam ederler ve aynı antijen ile tekrardan temas ederlerse ilk seferde gösterdikleri yanıtın daha güçlü bir yanıt verirler (Kaeche ve Cui, 2012).

$CD8^+$ T hücrelerinin birbirinden değişik ve çeşitli alt grupları son zamanlarda kapsamlı olarak gözden geçirilerek Tc17, Tc9, Tc1, Tc2 ve $CD8^+$ T düzenleyici (Treg) hücreleri olarak kategorize edilmişlerdir (Shrikant ve ark., 2010; Kaeche ve Cui, 2012; Buchholz ve ark., 2012; Restifo ve Gattinoni, 2013; Gravano ve Hoyer, 2013; Mittrucker ve ark.,

2014). En iyi tanımlanan efektör $CD8^+$ T hücresi alt popülasyonu, sitotoksik T lenfositleri (Tc1) hücreleri olarak da adlandırılırlar ve özellikle hücre içi enfeksiyonlara yanıt oluştururlar. Tc1 hücreleri Tümör Nekroz Faktörü (TNF)- α ve İnterferon (IFN)- γ benzeri sitokinleri ortama sunarak, çeşitli otoimmün hastalıkların oluşumuna neden olabilen antijenleri taşıyan hücreleri öldürebilirler (Kaeche ve Cui, 2012). Tc2 hücreleri, belirli alerjenlere yanıt olarak IL-4 ve IL-5 sitokinleri üretirler, tipik olarak daha az sitolitik işlev sergilerler (Croft M, ve ark., 1994). $CD8^+$ T hücrelerinin IL-9 sitokinini salgılama yeteneğine sahip ve az granzim özelliği olan hücre grubu Tc9 hücreleri olarak adlandırılmıştır (Chang ve ark., 2013). IL-17 üreten Tc17 hücrelerinin de granzim B, IFN- γ ve perforin salgılaması kısıtlıdır. $CD8^+$ T düzenleyici (Treg) hücrelerinin işlev yapamaması sonucunda ise Multiple Skleroz (MS) ve Tip 1 Diyabet (T1D) dahil olmak üzere otoimmün hastalıklar gelişmekte olduğu bildirilmiştir (Smith ve Kumar, 2008; Hamada ve ark., 2009; Yen ve ark., 2009; Jiang ve ark., 2010).

Böbrek transplantasyonundan sonra, $CD8^+$ T hücreleri, allogreft reddi sürecinin gelişiminde, yalnızca allogreft dokusuna doğrudan invazyon yoluyla değil, aynı zamanda diğer tipteki bağışıklık hücrelerinin uyarılması ve aktivasyonu yoluyla da önemli bir role sahiptir (Calvo-Turrubiarres ve ark., 2009). $CD8^+$ T hücrelerinin aktivasyonunu gösteren belirteçler, böbrek nakli alıcılarından izole edilen periferik kanda saptanabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda efektör hücre durumundaki $CD8^+$ T hücre alt kümelerinin, allogreft reddi sürecinde yer aldığı gösterilmiştir (Betjes ve ark., 2012; Yap ve ark., 2014; Mou ve ark., 2014; Krajewska ve ark., 2019). Diğer yandan $CD8^+$ T naif hücre durumu sergileyen T hücresi alt tipleri, efektör T hücrelerinin düzenlenmesiyle bir "reddi önleme" sürecine dahil olabileceği de bildirilmiştir (Demmers ve ark., 2014; Yap ve ark., 2016; Bezie ve ark., 2018). Dolayısıyla periferik kandaki $CD8^+$ T alt gruplarının dinamiklerinin "ret" ve "kararlı" duruma göre önemli bir değişiklik göstermesi mümkündür. Bu nedenle, $CD8^+$ T hücre alt kümelerinin izlenmesinin, akut allogreft reddinin saptanması için yararlı olabileceği öne sürülmüştür (Posselt ve ark., 2003; Betjes ve ark., 2012; Mancebo ve ark., 2016).

Yakın zamanda CD8⁺ T hücrelerinin yukarıda saydığımız bu alt çeşitlerinden farklı foliküler sitotoksik T hücre (T_{fc}) olarak isimlendirilen yeni bir alt tipi literatürde yerini almıştır. C-X-C Motif Chemokine Receptor 5 (CXCR5) ifade eden CD8 T hücreleri, CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerinden tamamen farklı ve benzersiz bir fenotipe sahiptir. Viral enfeksiyonun kontrolünde, tümör gelişiminin engellenmesine veya inflamatuvar ve otoimmün yanıtların desteklenmesine yardımcı olan bir sitotoksik kapasiteyi sürdürürler. CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerinde bulunan gen varyasyonları, bu hücrelerin ortaya çıktığı koşullara bağlıdır (Quigley ve ark., 2007).

2.7. Foliküler Sitotoksik T hücreleri

İnsan bademcik foliküllerinde diğer gruplardan farklı bir CD8⁺ T hücresi tanımlanmış ve bu yerleşim yeri, araştırmacıların foliküler CD8⁺ T hücrelerinin fonksiyonu ve fenotipi hakkında veri elde edilmesine yardımcı olmuştur (Quigley ve ark., 2007). CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri, çeşitli kronik antijen ve inflamasyon koşulları altında gelişirler. Diğer CD8⁺ T hücre alt kümelerinden fenotipik ve transkripsiyonel özellik bakımından farklıdırlar. Bu sınıflandırmalara yol açan farklılığın bağışıklık ortamına ve CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerinin işlevsel tepkisine bağlı olduğu düşünülmektedir (Quigley ve ark., 2007). Dolaşımdaki CD8⁺ T hücrelerine benzer biçimde, foliküler CD8⁺ T hücreleri, MHC Class I tarafından sunulan peptitler tarafından aktive edilir. Hücrelerin ikincil lenfoid organlarda B hücre alanlarına giriş yapabilmek için lazım olan kemokin reseptörü CXCR5'i aşırı düzeyde eksprese ederler, ancak onları T hücre alanlarına yönlendiren CCR7 ekspresyonu göstermedikleri bildirilmiştir (He ve ark., 2016; Im ve ark., 2016; Sayın Ekinci ve ark., 2022).

CXCR5 kemokininin ligandı olan C-X-C motif ligand 13 (CXCL13)' ye karşılık CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri yanıt olarak B hücresi alanlarına doğru yönelirler. CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri, bu bilgilerin yanı sıra, eş uyaran moleküllerden olan CD28 ve CD27, hücrelerin aktivasyon belirteçleri CD95 ve CD69, bellek T hücre göstergesi olan CD45RO' nun fazla ekspresyonuna sahiptirler. Bu ifadelerin tersi yönünde, glukuronil transferaz CD57, hücre yapışma molekülü CD62L, naif T hücre belirteci CD45RA izoformu ve interlökin (IL)-7 reseptörü CD127 'ün ise az miktarlardaki düzeylerini ifade ederler (Quigley ve ark., 2007). CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerinin programlanmış ölüm (PD)-L1 ve PD-L2 ligandlarına bağlanan, T hücre aktivasyonunu

engelleyen PD-1 reseptörünü, bellek T hücre belirteçlerinin de varlığı ile uyumlu olarak ifade etikleri bildirilmiştir. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3) ve Natural Killer Cell Receptor 2B4 (CD244) gibi başka tükenmiş T hücre göstergeleri, CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri tarafından eksprese edilmezler (Blackburn ve ark., 2009; Golden-Mason ve ark., 2009).

Lokalize oldukları ikincil lenfoid organlarda CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri ise PD-1 ve TIM-3'ü yüksek düzeyde eksprese ederler, bu özellik bakımından CXCR5⁺CD8⁺ T' nin CXCR5 ifadesi ile diğerlerine göre daha az tükenmiş T hücre profil özelliğini ortaya çıkarır (He ve ark., 2016; Im ve ark., 2016; Leong ve ark., 2016). Kronik enfeksiyon koşullarında lenfoid folikülde CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerinin ortamda bulunan antijenlere aşırı maruziyet durumu, işlevi azalmış ve tükenmiş T hücre tepkilerine neden olabilir (Kahan ve ark., 2015). B hücre ve T hücre arasında oluşan etkileşimler için gerekli olan, CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri ile eksprese edilen öteki hücre yüzey reseptörleri, Killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) ve Inducible T cell costimulator (ICOS) 'dur (He ve ark., 2016; Im ve ark., 2016; Leong ve ark., 2016).

2.7.1.Foliküler Sitotoksik T Hücrelerinin Transkripsiyonel Profili

CXCR5⁺CD4⁺ foliküler yardımcı T hücreleri ile CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri kıyaslandıklarında, benzer birçok transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlarlar. Böylece farklılaşarak lenfoid folikül içerisinde bulunmaları sağlanmış olur. Bununla birlikte foliküle girişlerini sağlamak için CD8⁺ T hücrelerinin klasik sitotoksik efektör fonksiyonlarının azaltılmasını zorunlu kılar. T_{fc} ve T_{fh} hücrelerinin ortak transkripsiyon faktörü B-cell lymphoma 6 protein (Bcl-6)'dır (Dent ve ark., 1997). Zinc finger protein transkripsiyon faktörleri ailesinin üyesi bir transkripsiyonel baskılayıcı olup, DNA onarım genlerinin, hücre ölümü indükleyicilerinin ve hücre döngüsünü kontrol eder. Bu düzenleme B hücresinde açık bir şekilde ifade edilmiş olmasına rağmen T hücrelerinde henüz tanımlanmamıştır (Vasanwala ve ark., 2002). Aktivatör protein 1' in (AP-1) inhibe edilmesi ile Bcl-6 ayrıca foliküler T hücrelerinin gelişmesinde görev yapan transkripsiyon faktörü B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp1)' i kodlayan PR domain zinc finger protein 1 (PRDM1) geninin ifade edilmesini de engeller. Bcl-6 ve Blimp1 tarafından foliküler T hücrelerinin farklılaşması için hangi belirli genlerin ne şekilde yönlendirildikleri ise henüz tam

olarak aydınlatılmamıştır. Blimp1, hem B hem de T hücrelerinde ifade edilir. B hücresi gelişimi ve antikor üretiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Shaffer ve ark., 2002; Johnston ve ark., 2009; Gong ve Malek, 2007).

CD8⁺ T hücrelerinde, Blimp1' in eksprese edilmesi bu hücrelerin efektör ve hafıza alt kümelerine farklılaşarak dönüşmesine neden olur. Blimp1'i az ifade eden CD8⁺ T hücreleri, sitotoksik özelliği daha düşük olan hafıza öncü efektör hücrelere dönüşürler (Kallies ve ark.,2009). Blimp1'in yanı sıra Bcl-6 hafıza CD8⁺ T hücrelerinde daha yüksek oranda düzenlenebilirse granzim B üretimini ve fonksiyonunu baskılar. Bu özellikleri bakımından Bcl-6 ve Blimp1'in farklı koşullarda aktive olması CD8⁺ T hücre farklılaşmasını karşılıklı olarak düzenler (Fukuda ve ark., 1995; Yoshida ve ark., 2006).

Bcl-6 ifadesi ve Blimp1'in inhibisyonu sebebi ile CXCR5+CD8⁺ T hücreleri foliküler yardımcı T hücrelerle eş özellikler göstermesine karşın, daha az sitotoksik işlevlere sahiptir. CXCR5 promotöründe bir bağlanma sekansı bulunan E proteinini 2A (E2A)'nın, kısmi olarak CXCR5+CD8⁺ T hücrelerinin farklılaşabilmesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Leong ve ark.,2016). Bunun yanı sıra E2A CXCR5+CD8⁺ T hücrelerinin gelişmesinde ve farklılaşmasında görev yapan transkripsiyon faktörleri ya da düzenleyici proteinler olarak bilinen DNA-binding protein inhibitör 2 (Id2) ve DNA-binding protein inhibitor3 (Id3), Transcription Factor 7 (Tcf7) ve Bcl-6 lokuslarına da bağlanabilmektedir. E2A' nın en önemli düzenleyicisi olduğu bilinen Id2, CXCR5+CD8⁺ T hücrelerinin farklılaşmasına engel olmaktadır. Özellikle Id3 PD-1'i eksprese edebilen hücrelerde daha yüksek oranda ifade ederken, Id2 ekspresyonu bu hücreleri aşağı yönde düzenler (Mylvaganam ve ark., 2017; Sayın Ekinci ve ark., 2022). Wnt/ β -katenin yolağı sayesinde aktif hale gelen T cell Factor 1 (Tcf-1), Tcf7 tarafından kodlanır ve CXCR5+CD8⁺ T hücrelerindeki bir diğer önemli transkripsiyon faktörüdür. Yapılan fare deneylerinde Tcf7 eksikliği olanların CD8 T hücrelerinin CXCR5+CD8⁺ T hücrelerine farklılaşamadığı gösterilmiştir (Im ve ark., 2016; Leong ve ark., 2016). PRDM1,Tcf-1 ve Bcl-6'nın düzenleyici kısımlarına bağlanarak bu iki transkripsiyon faktörünün ifade edilmesini yukarı ve aşağı yönde düzenler (Xu ve ark., 2015).

2.7.2. Foliküler Sitotoksik T Hücre Lokalizasyonu ve Fonksiyonu

İnsanlarda, primatlarda ve murinler üzerinde son on yılda gerçekleştirilen çalışmaların neticesinde CD8⁺ T hücrelerinin lenfoid folikül ve GC'lere göç edebilme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir. Bildiğimiz sıradan sitotoksik fonksiyonlarının yanı sıra B hücrelerine antikor üretiminde yardımcı oldukları tespit edilmiştir. İnsanlarda CD8⁺ T hücrelerinin foliküler lokalizasyonunun ilk olarak tanımlanması, lenfadenopati çalışmalarında ortaya çıkmıştır. Enfeksiyonu bulunan lenfoid foliküllerde immünohistokimyasal yöntemler yardımıyla, fazla miktarlarda CD8⁺ T hücreleri boyaması gösterilmiştir (Toccanier ve Kapanci, 1985; Brask ve ark., 1987). Quigley ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada insan bademcik foliküllerine yerleşen CD8⁺ T hücresi popülasyonunu tanımlamışlardır. Foliküler CD8⁺ T hücrelerinin fenotipi ve fonksiyonu hakkındaki bilgileri bu sayede elde etmişlerdir. CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri, gösterdikleri CXCR5' in ekspresyonu ile paralel olarak, CXCL13' e cevap olarak hareket halindedirler. Homeostatik koşullar altında CXCL13, hem farelerde hem de insanlarda foliküler stromal hücreler sayesinde ifade edilir ve belirgin olarak sekonder lenfoid organların B-hücre folikülleri içerisinde bol miktarda mevcuttur (Quigley ve ark., 2007). Bu nedenle B hücre bölgesine girişi sağlayan esas kemokin reseptörü olan CXCR5' in ifade edilmesi, CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerin mevcut olduğu yerlerin belirlenmesi bakımından oldukça önemlidir. Üstelik foliküllerde CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerinin miktarındaki artışın, antijen miktarı veya immün ortam ile değil, kronik inflamasyon ve immün aktivasyon şartları sayesinde belirleniyor olabileceği de göz önünde tutulmalıdır (Sayın Ekinci ve ark., 2022).

Periferal kandan elde edilmiş human immunodeficiency virüs (HIV)'e spesifik CD8 T hücreleri, lenfoid CD8 T hücresi alt gruplarına oranla daha sitolitiktir. Ek olarak, lenfoid CD8 T hücre popülasyonları içinde, CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri, CXCR5⁻CD8⁺ T hücrelerine göre daha güçlü bir sitolitik özellik gösterirler (Reuter ve ark., 2017). Yapılan öncü çalışmalarda kronik viral enfeksiyon modellerinde, ektrafoliküler boşlukta ve germinal merkezde tanımlanan lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)'e özgü CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri incelenmiştir. Sonuç olarak CXCR5⁻CD8⁺ T hücrelerine oranla daha sitolitik bir yetenek sergilerler. CXCR5⁻CD8⁺ T hücreleri muhtemelen tükenmiştir (Reuter ve ark., 2017). Bu nedenle, viral enfeksiyon ve konakçı türlerinden bağımsız olarak, CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri, insanlarda ve

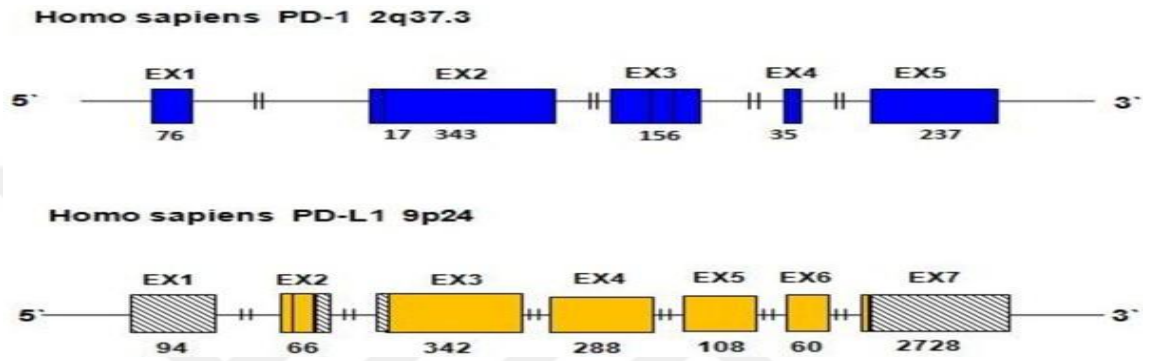
farelerde kanda, lenf düğümünde sitolitik kapasiteyi korurlar. Bu farklılıklar bir takım nedenlerle teorik anlatımla izah edilebilirler. Öncelikle sitotoksik efektör yeteneklere sahip olan CXCR5⁺CD8⁺ T hücreleri, işlevsel ve fenotipik özelliklerine henüz tam olarak farklılaşmamış olabilirler. İkincisi, değerlendirilen inflamatuvar bölgedeki lenfoid foliküllerde, GC'lerde ve periferdeki CXCR5⁺CD8⁺ T hücre gruplarının içinde miktar ve fonksiyon bakımından büyük bir heterojenlik bulunabilir (Quigley ve ark., 2007). Ayrıca kemokin reseptörlerinin ekspresyonu ve aktivasyonu efektör fonksiyonlarını yukarı ve aşağı regüle edebilir. Üçüncü teori olarak, PD-1 gibi bir tükenme özelliği gösteren baskılayıcı reseptörlerin ifade edilmesi CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerinin çoğalmasının, farklılaşmasının ve fonksiyonelliğinin yönlendirilmesinde rol oynayabilir. Bu teoriler farelere CXCR5⁺CD8⁺ T hücre reseptörlerinin transferinden sonra PD-1–PD-L1 yolunun bloke edilmesiyle CXCR5⁺CD8⁺ T ve CXCR5⁻CD8⁺ T hücrelerinin sıklığındaki artışla desteklenebilir (Im ve ark., 2016). Bu verilerin öncülüğünde CXCR5⁺CD8⁺ T hücrelerinin yerleşimlerine ya da direkt olarak hücre öldürme yeteneklerine yönelik yapılacak benzer araştırmaların devam etmesi gereklidir (Sayın Ekinci ve ark., 2022).

2.8. PD-1 PD-L1 Yolağı

PD-1 (CD279), Profesör Honjo'nun Nobel Ödülü aldığı, 1992'de keşfedilen B7-CD28 immünoglobulin süper ailesinden bir tip 1 transmembran glikoproteinidir (Ishida ve ark., 1992). Bu protein, insan kromozomu 2' deki Programmed Cell Death 1 (PDCD1) geni tarafından kodlanır ve kısa bir sinyal dizisi, hücre dışı IgV benzeri bir alan, bir sap bölgesi, bir transmembran alanı ve iki tirozin bazlı sinyal içeren hücre içi sitoplazmik kuyruktan oluşur. B7-CD28 süper ailesine ait olan bu genin ürünü 288 amino asitlik, 9028 baz çifti (bç) uzunluğundadır ve beş ekzondan oluşmuş olup 31.647 Da moleküler ağırlığına sahiptir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Tarihi: 01 Ekim 2022). Hücre içi motifler; immünoresseptör tirozin bazlı inhibitör motifi (ITIM) ve immünoresseptör tirozin bazlı anahtar motifleridir (ITSM) (Şekil 2.5.). Bu iki motif, PD-1' in engelleyici işlevlerine katkıda bulunur. PDCD1 ekspresyonunun düzenleyici elemanları, diğerlerinin yanı sıra, transkripsiyon başlangıç bölgesinin (TSS) akım yukarısında 100bp ve 1.1 kb olmak üzere iki korunmuş bölgede bulunur. Birden fazla TF bağlanma bölgesi içerirler: aktivatör protein-1 (AP-1) bağlanma bölgesi, interferon stimüle edilmiş yanıt elemanı (ISRE) ve ayrıca aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer

faktörü olan sitoplazmik 1 (NFATc1), forkhead box protein O1 (FoxO1), nükleer faktör kappa B (NF-kB) ve Notch' den oluşur (Chemnitz ve ark., 2004; Song ve ark., 2019).

İki ek düzenleyici eleman (-3.7 ve +17.1 kb TSS'yi oluşturur) STAT bağlanma bölgeleri içerir ve TCR ve IL-6 veya IL-12 sitokin stimülasyonundan sonra artan transkripsiyonel aktiviteye katkıda bulunur (Chemnitz ve ark., 2004; Song ve ark., 2019).



Şekil 2.5. PD-1 ve PD-L1 Gen Yapısı

Shi ve ark., 2013(<http://dx.doi.org/10.1186/1756-8722-6-74>, Erişim Tarihi: 01 Ekim 2022)

Memeli transkripsiyonel izolatör CCCTC-bağlama faktörü, yapısal olarak etkileşime giren ve kromatin halkalarını oluşturan -26.7 ve +17.5 kb'de yer alan elementlerle bağlanır (Bally ve ark.,2016). Bu sayede PD-1' in ifadesi kurallı ve sürekli olarak düzenlenir. Bu sayede PD-1' in ifadesi kurallı ve sürekli olarak düzenlenir. PD-1 seviyeleri, dinlenme halindeki naif T hücrelerinde ve ayrıca bazı gelişmekte olan timosit popülasyonlarında (bağışıklık toleransı ile bağlantılıdır) düşük olarak gözlenir. İmmün uyarıdan sonra, PD-1 geçici olarak CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar üzerinde eksprese edilebilir. Ayrıca NK T hücreler ve bazı dendritik hücrelerin alt kümelerinde de saptanabilir (Bally ve ark., 2016; Salmaninejad ve ark., 2018; Seliger, 2019).

PD-1'in aşağı yönlü regülasyonu akut antijen maruziyeti sırasında fark edilirken, kronik immün uyarım durumunda (örneğin, T hücreleri kalıcı olarak tümör hücrelerine maruz kaldığında) PD-1 aşırı şekilde yukarı yönlü olarak eksprese edilir (Bally ve ark.,

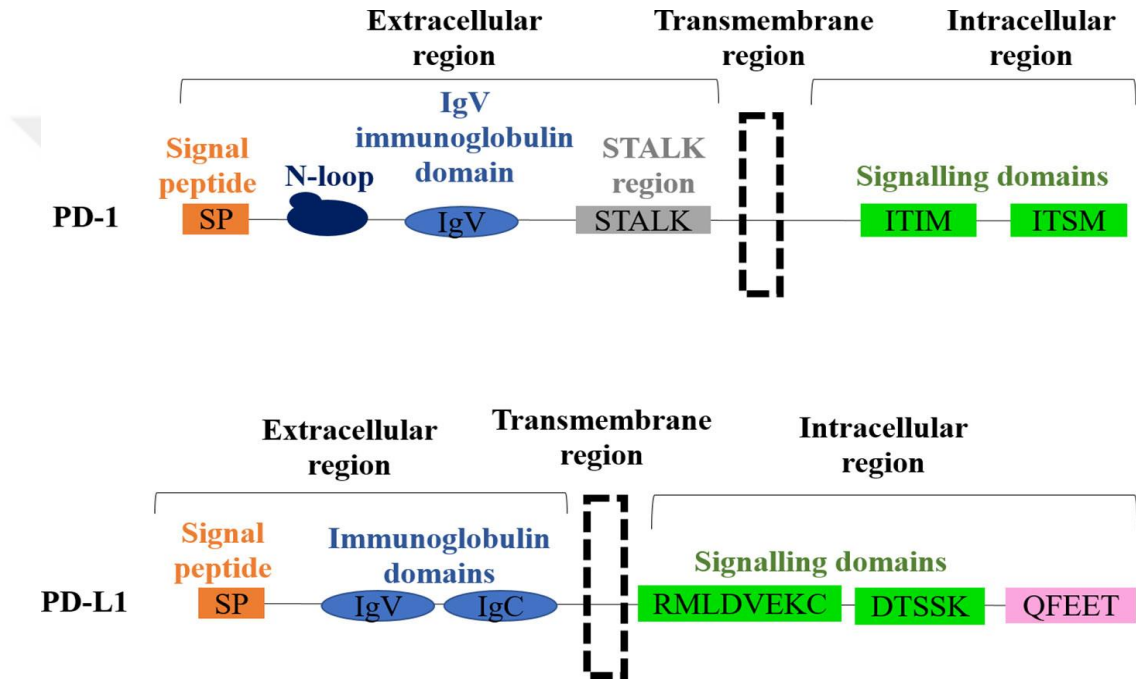
2016). Bu yüksek düzeyde PD-1 ekspresyonu T hücrelerinde işlevsel bozulmaya yol açabilir. Bu nedenle tümörde yerleşik olan T hücreleri genellikle fenotipik olarak bitkinlik ve tükenmişlik belirtileri göstermektedirler (Bally ve ark., 2016).

PD-1' in iki ana ligandı ve beş izoformu vardır. Ligandları: PD-L1 (B7-H1, CD274, Gen ID: 29126, MIM numarası: 605402) ve PD-L2 (B7-DC, CD273, Gen ID: 80380, MIM numarası: 605723) (Sharpe ve Freeman, 2002). PD-L1, 1999 yılında B7 ailesinin ek bir üyesi olarak keşfedilen insan kromozomu 9p24.1' de yer alır. 17.6 kb uzunluğundaki *CD274* geni, 290 amino asitlik 33 kDa ağırlığında olup, tip I transmembran proteinini kodlar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.tr> Erişim Tarihi: 08/10/2022/ HGNC erişim numarası: 17635; Ensembl Gen erişimi: ENSG00000120217). PD-L1, hematopoetik, endotelial ve epitelyal gibi birçok farklı dokularda ifade edilir, ancak esas olarak aktive edilmiş T ve B lenfosit hücrelerinde, dendritik hücrelerde, monositlerde ve çeşitli tümör hücre tiplerinde de ifade edilir (Ishida ve ark., 1992).

CD274/PD-L1 geni yüksek oranda korunmuştur ve omurgalı filogenisi boyunca (Danio rerio'dan Primatlara kadar) homologları bulunmuştur, bu nedenle birçok farklı türde fonksiyonel olarak önemini ortaya koymaktadır. *CD274/PD-L1* promotörünün, 5' çevrilmemiş bölge ve ekson 1 boyunca CpG metilasyon bölgelerini koruduğu, öte yandan çevirinin ekson 2'den başladığı bulunmuştur. *CD274/PD-L1* geni tarafından iki ana alternatif transkript oluşturulur: en uzun olanı (3.6kbp; NCBI accession number: NM_014143.3, Ensembl accession: ENST00000381577.3) 290 amino asitlik bir proteini (NCBI: NP_054862) kodlarken, ikincisi (3.3kbp; NM_001267706.1) 176 amino asitlik bir izoformu kodlar (NP_001254635). En uzun transkript yedi ekzon içerir ve kodlama dizisi yaklaşık 800 bp uzunluğundadır. Kodlanmış PD-L1 proteininin hücre içi alanı: bir sinyal dizisi, bir IgV benzeri alan (ekson 2 tarafından kodlanır; amino asit kalıntıları: 19–127), bir IgC benzeri alandan (ekson 3 tarafından kodlanmış; residue: 133–225) oluşur. Hidrofobik transmembran alanı ve hücre içi sinyal iletim kapasitelerine sahip hala belirsiz bir rolü olan yüksek oranda korunmuş 30 amino asitlik bir sitoplazmik kuyruğa (ekson 4-7 tarafından kodlanmıştır; residueler sırasıyla 240-259, 260-290) sahiptir. Alternatif ekleme nedeniyle, ikinci transkript üçüncü eksondan yoksundur, bu nedenle IgV benzeri alanı olmayan daha kısa bir PD-

L1 izoformu oluşturur. Hücre içi alanda ikisi interferon aracılı sitotoksisiteyi (RMLDVEKC ve DTSSK) düzenlemek için gerekli olan yüksek oranda korunmuş üç dizi motifi sunar (Şekil 2.6.) (Gato-Canas ve ark., 2017; Escors ve ark., 2018).

PD-L2, 2001 yılında keşfedilen *PDCD1lg2* geni tarafından kodlanan bir tip I transmembran proteindir ve PD-L1'den benzer bir moleküler organizasyon sergiler (Latchman ve ark., 2001 ; Tseng ve ark., 2001). Bir N-terminal IgV alanı ve bir membran-proksimal IgC domaininden oluşur. PD-L2' ye kıyasla PD-1'in PD-L1'e bağlanma afinitesi yaklaşık 3 kat daha fazladır (Akinleye ve Rasool, 2019).



Şekil 2.6. PD-1 ve PD-L1'in moleküler yapıları

Luisa Chocarro de Erauso ve ark., 2020 (<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00441>, Erişim Tarihi: 01 Ekim 2022)

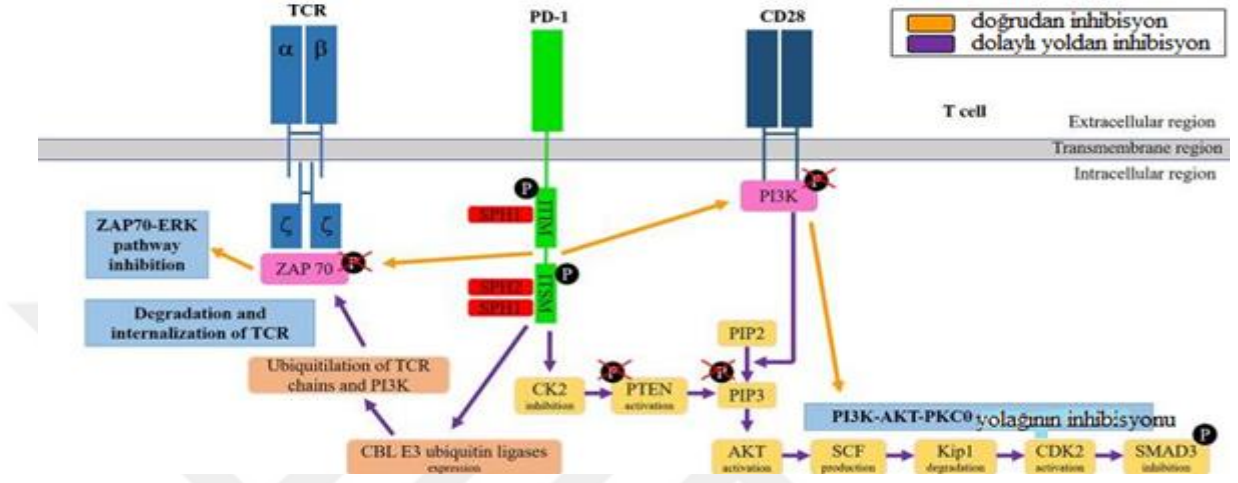
Programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) ve ligandı programlanmış hücre ölümü 1 ligandı 1 (PD-L1) gibi bağışıklık kontrol noktalarını hedefleyen kanser immünoterapileri, kanser tedavisinde devrim yaratmaktadır. Bununla birlikte, bu tip immünoterapilerin son zamanlardaki tüm başarılarına rağmen, çoğu hasta hala dirençlidir ve ya intrinsik direnç ya da kazanılmış direnç gösterir. Her iki durumda da,

bu büyük bir klinik problemidir ve onkolojideki en önemli zorluklardan biridir (Salmaninejad ve ark., 2019).

T hücresi aktivasyonu sırasında, PD-1, PD-L1 veya PD-L2 ile etkileşime girdikten sonra, TCR yakındaki sinyalleme merkezi supramoleküler aktivasyon kümesinde biriktikten sonra konformasyonunu değiştirir (c-SMAC) (Freeman ve ark., 2000; Latchman ve ark., 2001). PD-1 'in sitoplazmik kuyruğu, Src (sarkoma ile ilişkili) ailesi kinazları tarafından fosforile olur (Gauen ve ark., 1994; Zak ve ark., 2015). Bu fosforillenmiş tirozin motifleri, ITSM motifi, sitoplazmik tirozin fosfataz (SHP)-1 ve SHP-2'in bir yerleştirme yeri olarak hizmet eder. Hem SHP-1 hem de SHP-2' nin PD-1'e bağlandığı bulunsa da, canlı hücre görüntüleme tekniği, bu hücrelerde T hücresi aktivasyonu sırasında gerçek zamanlı olarak sadece SHP-2' nin PD-1 ile etkileşime girdiğini ortaya çıkardı (Yokosuka ve ark. 2012). SHP-2'nin TCR'ye yakın olarak alınması, Zeta zinciriyle ilişkili protein kinaz 70 (ZAP70)' in lenfosit-spesifik protein tirozin kinaz (LCK) aracılı fosforilasyonu gibi önemli TCR proksimal sinyal moleküllerinin defosforilasyonuna yol açar (Sheppard ve ark., 2004). TCR sinyallemede PD-1 Fosfatidilinositol-3-Kinaz (PI3K) –Protein Kinaz B (AKT), Fosfataz ve Tensin Homologu (PTEN) ve Ras/MEK/ERK gibi çeşitli doğrudan ve dolaylı sinyal yollarını kullanır (Salmaninejad ve ark., 2019).

PI3/AKT yolağı TCR sinyalizasyonunun temel mekanizmalarından birisidir. PD-1 PI3K inhibisyonu ile bu yolağı bloke eder. ZAP70, CD3C ve PKCθ gibi moleküller, LCK tarafından fosforile edilmesiyle T hücrelerinin aktivasyonunu sürdürürler. Fakat PD-1 LCK fonksiyonunu inhibe eder ve TCR sinyalizasyonu sonlanır. PD-1'in TCR sinyalizasyonunu engellediği diğer bir dolaylı mekanizma, protein kinaz CK2 üzerinden PTEN molekülünün fosforilasyonudur. PTEN'in sitoplazmik alanının CK2 ile fosforillenmesi, bu molekülün stabilitesine yol açar ve fosfataz aktivitesini engeller. PTEN'in serin-treonin fosfataz olarak işlevi, PI3K işlevinin aksidir. Fosfatidilinositol-3,4,5-bisfosfat (PIP3)'ı fosfataz aktivitesi ile inaktif Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2)' a dönüştürür. PIP3, AKT fosforilasyonuna sebep olur ve nükleusa sinyaller iletir. PD-1, CK2'nin fonksiyonunu inhibe eder. PTEN aktive edilmiş olur. Böylece fosfataz aktivitesini devam ettirerek TCR aktivasyon sinyallerini inhibe eder. Başka bir dolaylı yoldan etkilediği mekanizma ise Ras/MEK/ERK sinyal yolağıdır. Bu yolak,

PLC γ 1'in PI2P'i, DAG ve IP3 molekülüne hidrolize etmesiyle başlar. PLC γ 1 aktivitesi önemlidir. Ras/MEK/ERK sinyal yolundaki diğer önemli nokta olan DAG ve kalsiyumun RasGRP1'i aktive etmesidir. PD-1, PLC γ 1 aktivitesini durduğu için dolaylı olarak bu sinyal yolağı da bloke olur (Şekil 2.7.) (Salmaninejad ve ark., 2019).



Şekil 2.7. PD-1 PD-L1 Sinyal Yolağı

Luisa Chocarro de Erauso ve ark., 2020 (<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00441>, Erişim Tarihi: 1 Mart 2022)

2.8.1. PD-1, PD-L1' in Böbrek Nakli ile İlişkisi

Böbrek transplantasyonu yapılmış farelerde PD-1 proteininin rejeksiyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Shim ve ark., 2020). Deneyin sonucunda C57BL/6 farelerine nakledilen A/J farelerinin böbreklerine alıcı T hücrelerinin, hızla infiltre olduğu bulundu ki bu durum altı günde zirveye ulaştı ve 14. günde azaldı. T hücreleri, tübüler epitelin sınırlı infiltrasyonu ile öncelikle tübülleri de çevreledi. Lipokalin 2 (LCN2), tübüler yaralanmanın bir belirteci, ayrıca altıncı günde idrarda zirve yaptı ve ardından düştü. Özellikle akım sitometrisi ile bu T hücrelerinin çoğunun PD-1'i (CD8'in %90' ından fazlası ve CD4 hücrelerinin yaklaşık %75' i) altıncı günde ifade ettiğini göstermiştir. PD-1 için ligand olan PD-L1'e yönelik bloke edici antikorun uygulanması, altıncı günden önce T hücre sızıntılarını ve idrar LCN2' yi artırarak terminal akut rejeksiyona neden oldu. Buna karşılık, altıncı günden sonra PD-1/PD-

L1 etkileşimlerinin bloke edilmesi, idrar LCN2’de yalnızca geçici bir artışa neden oldu. CD4 ve CD8 T hücrelerinin tüketilmesi, tübüllere zarar veren T hücrelerini desteklemek için idrarda LCN2’ yi neredeyse ortadan kaldırdı. Bu nedenle, PD-1/PD-L1 etkileşimlerinin sadece T hücrelerinin kronik antijenik uyarımı ile ilgili olmadığını, aynı zamanda böbrek transplantlarına akut T hücresi tepkilerinin düzenlenmesi için kritik olduğunu göstermektedir (Shim ve ark., 2020).

Böbrek transplantasyonu yapılmış hastaların periferik kanındaki mRNA ekspresyon çalışması ile artan *PD-1* mRNA seviyelerinin akut rejeksiyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2011). Başka bir çalışmada benzer şekilde PD-1 eksprese eden T hücre alt kümelerinin oranının, ret riskinin önemli bir göstergesi olabileceğini öne sürülmüştür. PD-1’i hedefleyen antikorların veya CTLA-4’ e yönelik monoklonal antikorların kullanımıyla immün kontrol noktalarının inhibisyonu, çeşitli tipte hastalarda klinik olarak kullanılmıştır. Böbrek nakli olmuş hastalarda immün kontrol noktalarına yönelik antikorların kullanıldığı sınırlı sayıda çalışmada bu ajanlar hücre aracılı ve antikor aracılı rejeksiyon ile ilişkilendirilmiştir.

Böbrek transplantasyonunun başarısını arttırmak, sonuçlarını iyileştirmek ve yeni stratejilerin geliştirilmesine rehberlik etmek için DSA’ların oluşumuna, gelişimine, kalıcılığına ve faaliyetine yol açan mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekir. Son yıllarda tanımlanan Foliküler sitotoksik T hücre alt grubunun B hücrelerinin antikor üretimine yardım ettiği bildirilmiştir. Fakat bu hücre grubunun DSA gelişimi ile ilişkisi bilinmemektedir. Çalışmamızda böbrek nakli olan DSA gelişen, gelişmeyen bireylerin ve sağlıklı olguların periferik kanındaki CXCR5⁺CD8⁺ PD-1⁺ foliküler sitotoksik T hücre dağılımları ve *PD1/PD-L1* genlerinin ifade seviyelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımlanması

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Organ Nakli Merkezinde Kasım 2018 ile Ağustos 2021 tarihleri arasında canlı/kadavradan böbrek transplantasyonu yapılan ve nakil sonrası ilk 12 aylık süreç içerisinde bulunan 42 hasta alınmıştır. Sağlıklı kontrol grubu için ise rutin kontrollerden geçen herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan böbrek ve kemik iliği donör adayı 21 birey dahil edilmiştir.

Çalışmaya katılan gönüllü hasta ve kontrol grubundan aydınlatılmış onam alınmıştır. Aynı zamanda böyle bir çalışma dizaynı ile hali hazırdaki tanı ve tedavi amaçlı alınan periferik kan numuneleri kullanılacağı için periferik kan hücrelerinin toplanması aşamasında çalışmamız için hastalar maduriyet yaşamamıştır.

Değerlendirme ve izlem sırasında alıcı yaşı, alıcı cinsiyeti, alıcı ve donörün akrabalık derecesi, canlıdan / kadavradan nakil, posttransplant Class I/Class II PRA, mismatch sayısı, uygulanan immünsupresif protokol, indüksiyon tedavisi alıp almadıkları hasta dosyalarından kaydedildi. Alıcı ve donörlerin HLA-A, HLA-B ve HLA-DR'leri karşılaştırılarak fullmatch ve mismatch durumları belirlendi. Rutin olarak laboratuvarımızda böbrek nakli hastalarında gelişen donöre özgül antikorlar posttransplant PRA tarama, tanımlama ve single antijen değerleri luminex yöntemiyle tespit edilmektedir. Çalışma grubumuzun oluşturulması bu yöntem ile DSA çalışma sonuçlarına göre retrospektif olarak taranması ile belirlenmiştir.

Çalışmaya alınma ölçütleri:

- a. 18 yaş üstü,
- b. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Organ Nakli Merkezi' nde böbrek nakli yapılmış,
- c. Nakil sonrası donöre özgü antikor gelişmemiş, gelişmiş ise %25 ve üzeri pozitif olan,
- d. Çalışmaya sözlü ve yazılı onay vermiş,
- e. Tedavi ve poliklinik takipleri düzenli olarak Organ Nakli Polikliniği'nde yapılmış hastalar çalışmaya alınmıştır.

Çalışmadan dışlanma ölçütleri:

- a. Birden fazla nakil geçirmiş,
- b. Çoklu gebelik öyküsü bulunan ve birden fazla kan transfüzyonu yapılan,
- c. Nakil öncesi PRA pozitifliği olan hastalar
- d. Başka merkezde takip edilen veya polikliniğe gelmeyen hastalar,
- e. Ölen hastalar,
- f. Greft disfonksiyonu gelişen ve diyalize dönen hastalar,
- g. Çalışmaya sözlü ve yazılı onay vermemiş hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Çalışma grupları hasta grubu ve kontrol gruplarından oluşturulmuştur.

Hasta grubu:

2018-2021 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Organ Nakli Merkezinde canlı veya kadavra donörden böbrek nakli yapılan 20 birey (yaş ortalaması: $44,75 \pm 12,2$ yıl, K/E: 10/10) dahil edildi. Hasta grubuna nakilli pediatri hastası dahil edilmemiş olup çalışma 18 ve üzeri erişkin bireylerden oluşturulmuştur. Nakil sonrası 12 aylık süreç içinde Luminex yöntemiyle PRA taraması yapılmıştır. PRA yüzdesi % 25 ve üzeri olan, Luminex Single Antijen (LSA) testi çalışılan bireylerden seçilmiş olup HLA Class I pozitif, HLA Class II pozitif ve HLA Class I-Class II (her ikisi de) pozitif olmak üzere kendi içinde 3 gruba ayrılmıştır.

Kontrol grupları:

Transplant kontrol grubu: 2018-2021 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Organ Nakli Merkezinde canlı veya kadavra donörden böbrek nakli yapılan greftleri en az 1 yıldır fonksiyonel bir şekilde çalışan PRA tarama sonuçları negatif olan bireyler olarak seçilmiştir. Tez çalışması için örnek alındığı dönemde klinik anlamda herhangi bir rejeksiyon belirtisi göstermeyen böbrek nakli olmuş 22 birey dâhil edildi. (yaş ortalaması: $47,36 \pm 9,5$ yıl; K/E: 9/13).

Sağlıklı kontrol grubu (SK): 20 yaşından büyük 21 sağlıklı birey dâhil edildi (yaş ortalaması: $46,19 \pm 20$ yıl; K/E: 9/12). Sağlıklı kontrol grubu herhangi enfeksiyonu

bulunmayan yaş aralığı 24-60 olan nakil merkezimize gelen böbrek nakli ve kemik iliği için uygun donörlerden oluşturulmuştur.

3.2. Etik Kurul Onayı

Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Nefroloji Polikliniği'ne başvuran, Akdeniz Üniversitesi Organ Nakli Merkezinde canlı/kadavradan böbrek transplantasyonu yapılan hasta ve sağlıklı donör çalışmaya dahil edilmiştir. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Başhekimliği'nden 09/10/2020 tarihinde 36702 sayılı izin ile Miamed sisteminden 2021-2023 tarihleri arasında hasta bilgileri tez çalışmamız için alınmıştır. Tüm hasta ve kontrol olguları ve/veya aileleri, araştırmanın amacı, özellikleri ve yöntemi konusunda bilgilendirilip sözlü ve yazılı onayları alınmıştır. Çalışma protokolü Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 24.11.2020 tarih ve 70904504/770 sayılı kurul toplantısı gereğince kabul edilmiştir. Çalışmamız TUBİTAK 1002 proje kapsamında C puanı ile değerlendirilmiş olup çalışmadaki tüm finansal giderler tarafımızdan karşılanmıştır.

3.3. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol olgularından kan örnekleri kolun median kübital bölgesindeki uygun bir damara intravenöz olarak girişten sonra yaklaşık 10 ml olacak şekilde tek kullanımlık 10 ml'lik plastik enjektör ile iki adet 18.0mg EDTA içeren K2 EDTA'lı (BD Vacutainer) steril tüplere 5'er ml alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarı ortamına getirildi.

Projemizde çalıştığımız yöntemler, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ankara menşeli özel bir firma ile çalışmaların teyidi için iş birliği yapıldı.

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR:PCR) Optimizasyon Çalışmaları

Periferik venöz kan örneklerinden total RNA kalıbı kullanılarak random hexamer primerleri aracılığıyla cDNA sentezlendi. Hedef *PD-1* ve *PD-L1* genlerine özgü primerler tasarlanarak bu genlerin mRNA ifadesi seviyesini belirlendi. Tablo cDNA kalıbı ve primerler varlığında, prob içeren polimeraz enzimi kullanılarak kantitatif PZR gerçekleştirildi.

3.4.1.RNA İzolasyonu

Periferal kan örnekleri santrifüj edilerek çöktürüldü. Eritrositler, parçalama (lysis) tamponu solüsyonu kullanarak uzaklaştırılmak suretiyle geride kalan çekirdekli hücrelerden de silika kolon yöntemi yardımı ile total RNA eldesi gerçekleştirildi (NucleoSpin® RNA Blood (MN-740200,50, Germany)). RNA kalitesi ve miktarı nanodrop spektrofotometre (Nano) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. 260nm/280nm dalga boyunda elde edilen ve miktarı belirlenip saflık oranları 1,8 civarı olan RNA örnekleri cDNA sentezi için -20 C’de saklandı.

RNA izolasyonu aşamaları;

1. EDTA tüpe 3 ml periferal kan örneği alındı.
2. Kan örneği 15 ml’lik falkon tüpe aktarıldı ve üzerine 2 katı eritrosit lizis buffer koyularak 10 dk. inkübasyon için oda ısısında bekletildi.
3. 4000 rpm 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant döküldü.
4. İkinci bir yıkama için üzerine 1 ml eritrosit lizis buffer koyularak pipetaj yapıldı ve 1,5 ml’lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
5. 8000 rpm 3 dk. santrifüj edildi ve süpernatant döküldü.
6. Üzerine 200 µL DL Liziz Buffer eklendi ve pipetaj yapıldı.
7. Üzerine 5 µL Sıvı Proteinaz K eklendi ve kapağı kapatıldı. Oda sıcaklığında 3-15 dk. tüp karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı (18-25°C).
8. Tüpe hacminin yarısı kadar %70 ethanol eklenip ve güçlü bir şekilde karıştırıldı.
9. 400 µL NucleoSpin® RNA Blood Column içine aktarılıp 11,000 x g’de 30sn santrifüj edildi.
10. Kalan hacim için işlem tekrarlandı.
11. 350 µL MDB (Membranı tuzdan arındırma) buffer çözeltisi kolona eklenerek 11,000 x g’de 30 sn santrifüjlenir.
12. Kolona 95 µL rDNase eklendi. Oda sıcaklığında 15 dk. bekletildi.
13. 200 µL RB2 buffer çözeltisi NucleoSpin® RNA Blood Column’a eklenerek 11,000 x g’de 30sn santrifüj edildi. Sıvı kısmı içeren tüpü sıvıyla birlikte atılarak filtreli kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

14. 600 µL RB3 buffer çözeltisi NucleoSpin® RNA Blood Column'a eklendi. 11,000 x g'de 30sn santrifüj edildi. Sıvı kısmı içeren tüp sıvıyla birlikte atılıp filtreli kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
15. 250 µL RB3 buffer çözeltisi NucleoSpin® RNA Blood Column'a eklendi. 11,000 x g'de 2 dk. santrifüj edildi. Sıvı kısmı içeren tüpüsıvıyla birlikte atılarak filtreli kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
16. 50µL RNase-içermeyen H₂O kolona eklendi ve 11,000 x g'de 30 sn santrifüj edildi. RNA 1.5 mL toplama tüpüne ayrıışmış oldu.
17. Bu işlem tekrarlandı ve aynı örnekten 2. bir elüsyon elde edildi. RNA örneklerimiz cDNA sentez işlemimiz için -20C'de kısa süreliğine saklandı. (Braga, 2014; Raja, 2012).

3.4.2. cDNA sentezi

cDNA sentezine başlamadan önce tüm RNA örnekleri 100 ng/µL olacak şekilde ayarlandı. cDNA sentezi için 'EasyScript Plus TM cDNA Synthesis Kit' (ABM-G236, Canada) kiti kullanıldı. -20C'de muhafaza ettiğimiz total RNA örnekleri oda ısısında eritildi. Kullanılacak tüm solüsyonlar oda ısısında eritilip vortekslendikten sonra buz üzerine alındı. Ependorf tüplerine aşağıdaki malzemeler eklenir.

- 5 µL total RNA,
- 1 µL random primer,
- 1 µL dNTP,
- 7,5 µL 'nuclease-free H₂O'

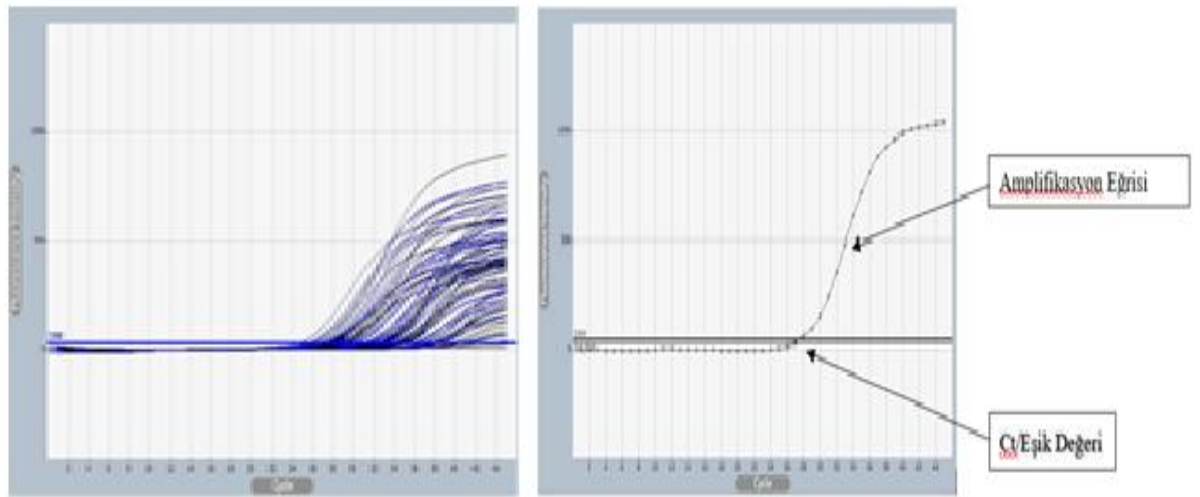
Tekrar kısa bir spinden sonra 65C'de 5 dakika thermal cyclerda inkübe edildi. Sonrasında 5 dakika +4C'de bekletildi. Üzerine aşağıdakiler ilave edildi.

- 4 µL 5X RT tamponu,
- 0,5 µL 'RNase OFF Ribonuclease Inhibitor',
- 1 µL 'EasyScript Plus TM RTase'

Pipetaj yapıldı ve kit prosedürüne uygun olarak sırası ile thermal cyclerda 25C'de 10 dakika, 40C'de 50 dakika, 85C'de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20C'de saklandı.

3.4.3. Kantitatif PZR

Primer veya probalar, kullanmış olduğumuz Q-PCR cihazının çalışma prensiplerine ve özelliklerine uyumlu olmak üzere tasarlandı. Primer setlerinin, % 20-80 oranında Guanin (G) – Sitozin (C) içermesine, özellikle G ile benzer çalışan nükleotitlerden ve probun 5' ucuna G bazı gelmemesine, seçilen dizide G'den çok C bazı olmasına, melting temperature (T_m) sıcaklığının ise 65-85 C arasında olmasına ayrıca dikkat edildi. Bu özelliklere uygun şekilde Q-PZR deneyimizde GreenStar qPCR Master Miks ve primer setleri kullanıldı. Primerin gen bölgelerini arttırıp ya da azaltması SYBER GREEN boyasının serbest halde DNA üzerine bağlanması ile ortaya çıkan sinyalin, FAM filtresi kullanılmak aracılığı ile floresan miktarının ölçülmesi kuralına dayanmaktadır. Uygun PZR koşullarında primerin hedef bölgeye bağlanması ve uzamasının devamında yeni zincir oluşmaya başlar. DNA zincir sentezi bu şekilde uzadıkça ve her bir döngüde de ürün miktarı artmaya başladıkça yansıyan floresan ışımaya da ona bağlı bir şekilde paralel olarak artmaya devam eder. Kullanılan primer dizileri bu şekilde uygun ve uyumlu olduğu sürece ilgili gen bölgesi de çoğalır, tek bir baz farklılığı ve değişikliği bile gen bölgesinin tamamının çoğaltılmasına engel olabileceği ve sonraki dizinin hedef bölgeyi çoğaltmasına izin vermeyeceği için dolaylı olarak aynı diziye sahip olmayan gen bölgelerinde farklı Amplifikasyon eğrileri elde edilir (Şekil 3.1.) (Monis ve ark., 2005).



Şekil 3.1. Örnek Amplifikasyon Eğrileri

GreenStar qPCR Master Mix protokolüne göre 20 µl’lik reaksiyon hacmi hazırlamak için 1-100 ng arasında cDNA eklenmesi önerilmektedir. Çalışmamızda BIONEER Marka AccuPower GreenStar qPCR PreMix (Katalog no: K-6210) kullanıldı. Bu mikserler, PZR koşulları için gerekli tüm materyali içerisinde bulundurduğu için sadece primer ve örnek cDNA’sı eklenerek kullanıldı. Kullanılan primerlerin sentezi Sentebiolab Biyoteknoloji (Türkiye) firmasına yaptırılmıştır. Hazır reaksiyon tüplerine eklenen primerler ve örnek cDNA’nın (veya Negatif Kontrol için PZR Grade su) üzerine PZR Grade su ile son örnek hacmi 20 µl’ye tamamlanarak Tablo 3.2.’de gösterilen protokole göre çalışıldı. Reaksiyonda kullanılan primerler Tablo 3.1.’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kantitatif PZR’de Kullanılan Primerler

Gen	Kullanılan primerler	Referans
PD-1	İleri: 5'-CCCTGGTGGTTGGTGTCGT-3' Geri: 5'-GCCTGGCTCCTATTGTCCCTC-3'	(Wang ve ark., 2017)
PD-L1	İleri: 5'-GGTGCCGACTACAAGCGAAT-3' Geri: 5'-ATGGTCACTGCTTGTCCAGATG-3'	(Wang ve ark., 2017)

Tablo 3.2. Kantitatif PZR Kimyasal Protokolü

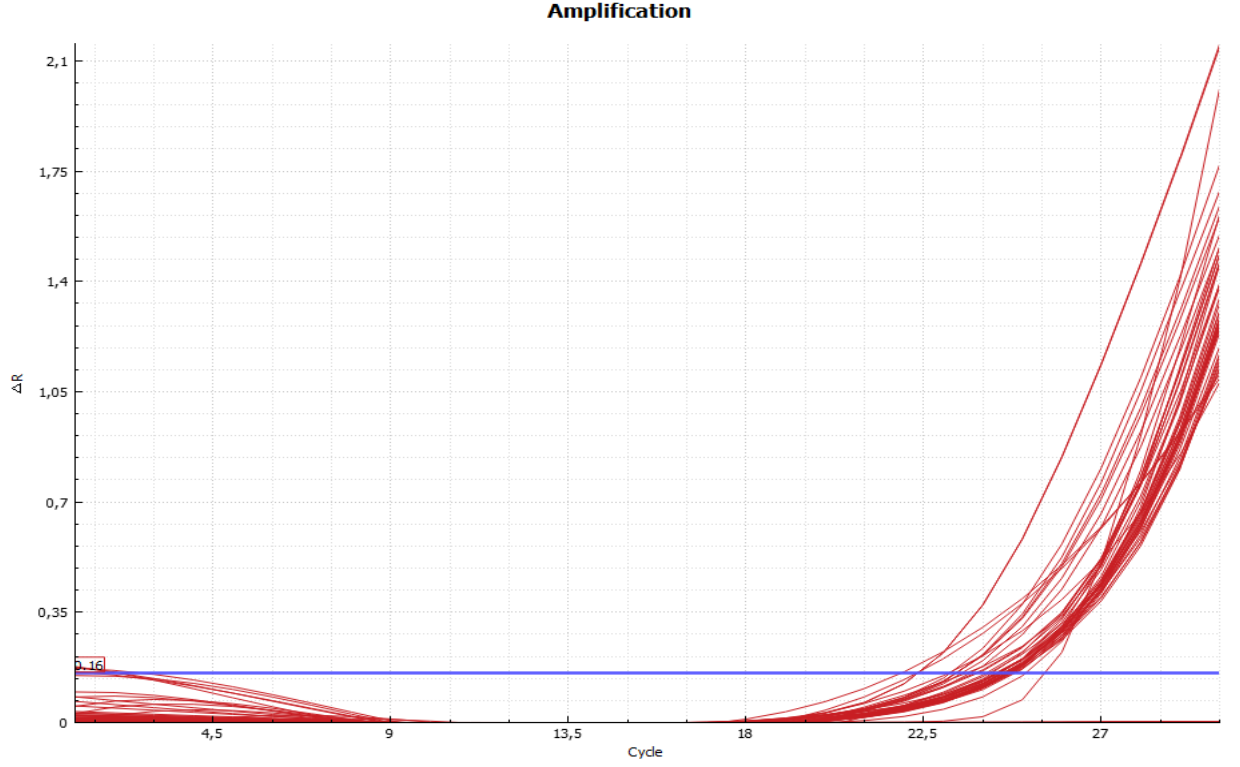
PZR Reaksiyon Karışımı	1 Reaksiyon için Hacmi
qPZR Master (SYBR)	10 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
Örnek cDNA	5 µl
PZR Grade su	3 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.3. Kantitatif PZR Reaksiyon Koşulları

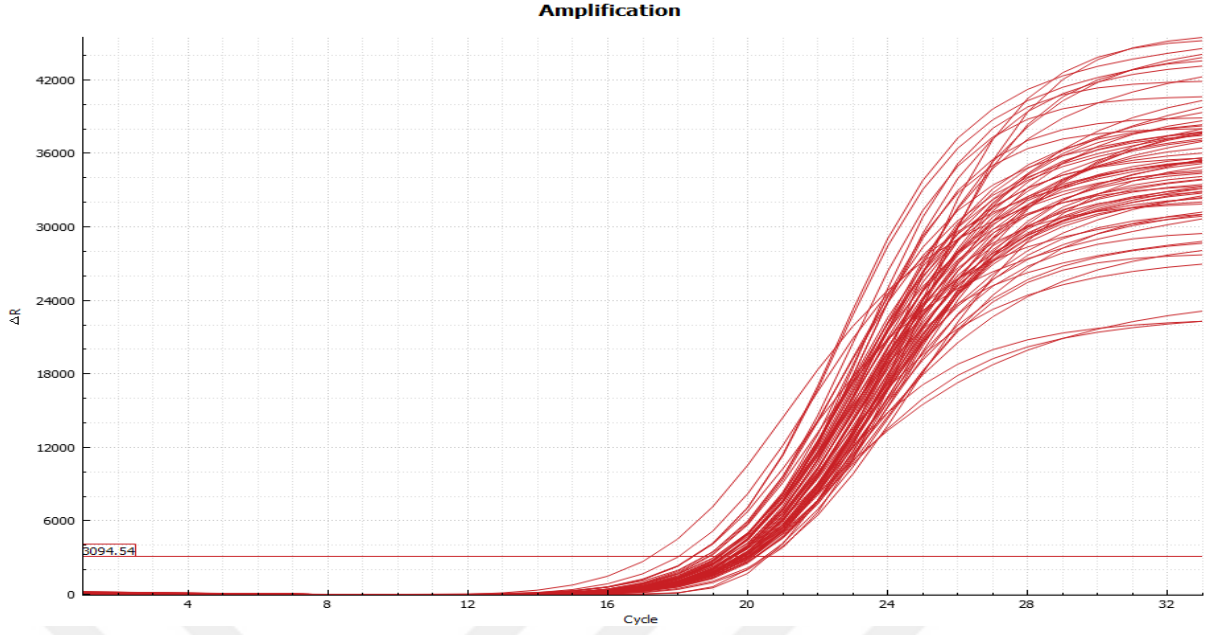
	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	20 saniye	38
Bağlanma	55	40 saniye	
Uzama	60	45 saniye	

Hazırlanan mikslar, optik şeffaf filmle kaplı olan 0,2ml’lik PZR tüpleri içinde BIONEER Marka ExiSpin Model Vortex-Mixer cihazı ile homojenliği sağlandıktan sonra BIONEER Marka ExiCycler96 Model Q-PCR cihazına yerleştirildi. Tablo 3.3.’de gösterilen deneylerin amplifikasyon koşulları, (SyberGreen Master Mix için gerekli sıcaklık, süre ve döngü sayıları) zaten BIONEER (Cihazları, Master Mix’leri ve Primer-Prob’ların üreticisi) tarafından daha önce de çalışıldığı ve optimize edildiği için yaptığımız çalışmalardan doğru ve olumlu sonuçlar alındı.

Hedeflediğimiz genlerde ekspresyona bağlı olarak belirli sayıda çoğaltım sonrasında ilerleyen döngülerde hızla artmaya başlamaktadır. Bu artış miktarı Q-PCR cihazının 2D-CCD kamerasının algılayabildiği miktara ulaştığında Ct (Treshold: İlk algılanma Eşik değeri) olarak algılanmakta ve analiz yazılımı bu değerleri kullanarak sonuç vermektedir (Şekil 3.2.) (Şekil 3.3.) (Ek 1 ve Ek 2).



Şekil 3.2. PD-1 Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 3.3. PD-L1 Amplifikasyon Eğrileri

Gerçek zamanlı kantitatifPZR’den elde edilen veriler, aşağıdaki formüle dayalı olarak hastalardaki mRNA ekspresyon seviyelerinin değerini hesaplamak için ‘kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)’ kullanılır. Göreceli gen ekspresyon seviyesini hesaplamak için şu şekilde uygulanır:

1) Hedef genin Ct değeri, ekspresyon seviyesi bir hücrede her zaman aynı olan house-keeping (referans/gardiyan) genin Ct değerinden çıkartılır. Bu değere, “delta Ct” denir.

$$\Delta Ct = Ct (\text{hedef}) - Ct (\text{referans})$$

2) Hasta grubunun delta Ct değerleri, kontrol grubunun delta Ct değerlerinden sırasıyla çıkartılarak “delta delta Ct” değerleri bulunur.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hedef}) - \Delta Ct (\text{kontrol})$$

3) Hesaplanan değerlerin her bir replikasyon döngüsündeki artan veya azalan kat sayısını bulmak için ise 2 üzeri negatif kuvveti alınır. Bu yöntemin nihai sonucunda hedef gen ekspresyonunun kat değişimi elde edilir.

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$, hasta bireylerdeki gen ekspresyonunun sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu anlamına gelir.

$2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$, hasta bireylerdeki gen ekspresyonunun sağlıklı bireylerden daha düşük olduğu anlamına gelir.

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$, hasta bireylerdeki gen ekspresyonunun sağlıklı bireylerdekine eşit olduğu anlamına gelir.

Çalışmalar, iki tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirildi. Gen ifadesi analizi için tüm örneklerin Ct değerleri gardiyan (house-keeping) gen olarak kullanılan Beta aktin'e (β -Aktin) fold change 'kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)' yöntemiyle Microsoft Excel 2010 Bilgisayar programı aracılığıyla oranlanarak yaklaşık kat değişimi bulundu.

3.5. Akım Sitometri Çalışmaları

Testin çalışma ilkeleri: Akım sitometrisi, hücreleri büyüklüğüne (FSC) ve granülaritesine (SSC) göre ayırabilmektedir. Hücrelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini tespit etmek ve ölçmek için kullanılan ve tek hücre seviyesinde araştırma olanağı sağlayan bir sistemdir. İmmünfloresan tabanlı bir teknik olarak hücreleri yüzeyindeki belirteçlere göre belirlemeyi sağlar. Floresan boyalar ile işaretlenmiş özgün antikorlar bu belirteçlere bağlanır. Bu işlemde, hücreler veya partiküller içeren bir numune bir sıvı içinde (cell-wash) süspanse edilir ve akım sitometre cihazına bir tüp ile sunulur. Numune, saçılan ışığın hücrelere ve bileşenlerine özgü olduğu bir lazer ışını aracılığıyla her seferinde tek bir hücreye ideal olarak odaklanır. Hücreler floresan boyalar ile işaretlidir, böylece ışık emilir ve daha sonra bir dalga boyu bandında yayılır. On binlerce hücre hızlı bir şekilde incelenebilir ve toplanan veriler bir bilgisayar tarafından işlenir. Akım sitometrisi, temel araştırmalarda, klinik uygulamalarda ve klinik deneylerde gereklidir. Dahası hücre sayımı, hücre sıralama, hücre özelliklerini ve işlevini belirleme, lenfosit cross match ve kan kanserleri gibi sağlık bozukluklarının teşhisi için rutin laboratuvarlarında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda floresan renkleri farklı olacak şekilde aşağıdaki monoklonal antikorlar seçildi.

CD4 FITC (Beckton Dickinson, ABD)

CD8 PE (Beckton Dickinson, ABD)

CXCR5 (CD185) PerCP/Cyanine 5,5 (BioLegend, San Diego, CA)

PD-1 APC (Beckton Dickinson, ABD)

Boyama işlemi lenfositlerle yapıldığı için ilk olarak periferel kan mononükleer hücre izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapıldı.

3.5.1. Periferel kan mononükleer hücreleri İzolasyonu

Periferel kan mononükleer hücreleri (PKMH) Ficoll 1077(Cegrogen biotech, Germany) ile “gradyan yöntemi” kullanılarak izole edildi.

1. Sodyum-heparinli tüplere her bireyden 7 ml kan alındı.
2. Oda sıcaklığında laboratuvaraulaştırıldı.
3. 15 ml’lik bir falkon tüpüne alınan 4 ml kan, aynı miktarda fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi olan PBS ile karıştırıldı.
4. 15 ml’lik bir falcon tüpe 3 ml Ficoll konuldu. PBS ve kann karışımından m, 3/1 oranında Ficoll bulunan tüpün içine yavaş yavaş eklendi.
5. 1600 rpm’de +4°C’de 30 dk santrifüj (Gyrozen 1580R santrifüj cihazı kullanıldı) edildi.
6. Santrifüj sonrası fazlarına göre orta tabakada bulutsu şekilde ayrılan periferel kan mononükleer hücreler pipet yardımıyla yeni bir boş falkon tüpüne aktarıldı. 2/1 oranında PBS eklenerek 2500 rpm’de 7 dakika, +4°C’de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası pelletin (hücreler) üstünde kalan süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Pellerin üzerine tekrardan2/1 oranında PBS eklenerek 2500 rpm’de 7 dakika, +4°C’de santrifüj edildi. .
9. Becton Dickinson (BD) Pharmingen Stain Buffer ile (FBS) ml’de 1 milyon hücre olacak şekilde seyreltip hücre sayımı yapıldı.

Değerlendirme öncesi polistren çalışma tüpleri hazırlandı ve üretici firmaların (Biolegend ve Becton Dickinson) belirtilen tavsiyeleri doğrultusunda tüm örnekler için aşağıdaki boyama prosedürü gerçekleştirildi.

3.5.2. Yüzey Antikor Boyama Prosedürü

1. 12.75 ml'lik yuvarlak dipli polipropilen akım sitometri tüplerinin üzerine kullanılacak antikorlar ve olguların isimleri yazıldı.
2. +4°C'de saklanan floresan işaretli antikorlar oda sıcaklığına getirildi.
3. Antikorlar yaklaşık olarak 30 saniye vortekslendi.
4. Tüplerin dibine her antikoru üzerinde yazan test başına kullanım miktarı kadar antikor ve izotipleri dağıtıldı.
5. Her tüpe FBS ile seyreltilen $\sim 1 \times 10^6$ hücreler çalışma tüplerine eklendi.
6. Antikor ve hücre birleşimi vortekslendikten sonra çalışma tüpleri +4°C'de, 30 dakika karanlıkta bekletildi.
7. Yıkama işlemi için çalışma tüplerine 1500 µl FBS'li cellwash ilave edildi, vortekslendi. Çalışma tüpleri 2500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Tüpler tek hamlede ters döndürülerek (hücre kaybı olmadan) süpernatant atıldı.
8. FBS ile yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.
9. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplerde kalan hücre pelleti 400 µl wash buffer ile resuspende edildi ve en kısa sürede cihazda okutuldu.

Floresan işaretli antikorlar;

CD8 (PE Mouse Anti-Human CD8/Clone RPA-T8 (RUO)-Katalog No: 555367) ve izotipi (PE IgG1, κ Isotype Control-Katalog No: 555749) (Beckton Dickinson, ABD),

CD279 (PD-1) (APC Mouse Anti-Human CD279/Clone MIH4 (RUO)-Katalog No: 5558694) ve izotipi (APC IgG2a, κ Isotype Control-Katalog No: 555576) (Beckton Dickinson, ABD),

CXCR5 (PerCP/Cyanine5.5 Mouse Anti-Human CD185/Clone J252D4-Katalog No: 344750) ve izotipi (PerCP/Cyanine5.5 IgG1, κ Isotype Control-Katalog No: 400149)(BioLegend, San Diego, CA),

CD4 (FITC Mouse Anti-Human CD4/Clone RPA-T4 (RUO) -Katalog No: 561842) ve izotipi (FITC IgG1, κ -Katalog No: 553924) (Beckton Dickinson, ABD) olarak seçildi.

Foliküler sitotoksik CD8 T lenfosit profilinin belirlenmesi için PD-1, CD-8 ve CXCR5'e karşı antikor varlığı ve düzeyleri değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilen

toplam 63 olgunun periferik mononükleer hücreleri CXCR5, CD4, CD8, PD-1, proteinlerine özgül floresan işaretli monoklonal antikorlarla boyandı. Örneklerden elde edilen floresan işaretli hücrelerin ekspresyonlarının seviyeleri 8 renkli akım sitometri cihazı (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, CA) ile değerlendirildi ve FACS Diva yazılımı ile analiz edildi. En geç 4 saat içinde veri toplama işlemi tamamlandı. (Tüm örneklerde veriler aynı gün toplandı). Yardımcı T lenfosit profilinin belirlenmesi için CD4 kapısı alınarak CD4⁺CXCR5⁺PD-1 hücre grubu seçildi. Sitotoksik T lenfosit profilinin belirlenmesi için CD8 kapısı alınarak CD8⁺CXCR5⁺PD-1 hücre grubu seçildi. Değerlendirmeler izotip kontrollere göre hücre kapıları alınarak yapıldı. Bu veriler kullanılarak hücre oranları hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Analiz/Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics for Windows Version 23 yazılımından yararlanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile incelendi. Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testlerinde hesaplanan değer 0.05'in altında ise normal dağılım göstermiyor, üstünde ise normal dağılım gösteriyordur. Ayrıca Q-Q plotlarda da veriler çok dağınık ve merkez doğrudan uzaklaşıyorsa ise normal dağılım söz konusu değildir. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin üç grup karşılaştırmaları Kruskal Wallis H testi ile gerçekleştirildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerde üç grup karşılaştırmaları Anova testi ile gerçekleştirildi. Kategorik değişkenler için gruplar arasındaki korelasyon analizi olarak veriler normal dağılım göstermediği için Spearman testi kullanıldı. ($\rho > 0.70$ güçlü korelasyon olarak kabul edilir). Kategorik değişkenler için gruplar arasındaki dağılımsal ilişki Chi-Square testi ve Exact testi ile değerlendirildi. İstatistik parametreleri Mean $\pm$ Standard Deviation, Median(Quartile %25 (Q1)-Quartile %75 (Q3)) ve n (%) ile ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Böbrek nakli yapılmış kişilerin nakil öncesi ve sonrası, serum örnekleri ile PRA düzeyleri HLA Doku Tipleme Laboratuvarımızda mikrobuncuk tabanlı yöntem ile (Luminex) çalışılıp değerlendirilmektedir. Hastanemizin Başhekiminden aldığımız 12/06/2020 tarihli aldığımız izinle veri tabanı olan MiaMed sisteminden hastaların dosyaları geriye dönük olarak incelenerek hastalarımızın PRA sonuçlarına bakılarak demografik ve klinik özellikleri yardımıyla çalışma grubumuzu belirledik. Çalışmaya dahil edilen hasta grubumuz nakil öncesi PRA sonucu negatif olan ancak nakil sonrası 12 aylık süreç içerisinde de novo donöre özgü antikor geliştirmiş 20 bireyden oluşturuldu. Bu bireylerin yaş ortalaması 44,75 olup 11 (%28,6) erkek ve 9 (%35,7) kadın olarak seçildi. Kontrol grubumuz ise transplant kontrol grubu ve sağlıklı kontrol olarak iki ayrı grup olarak belirlendi. Transplant kontrol grubumuzu nakil öncesi PRA sonucu negatif olan ve nakil sonrası 12 aylık süreç içerisinde de novo donöre özgü antikor geliştirmemiş 22 bireyden oluşturuldu. Yaş ve cinsiyet olarak hasta grubumuza uyumlu olarak yaş ortalaması 47,3 olup 14(%37,1) erkek ve 8(%32,1) kadın olarak seçildi. Sağlıklı kontrol grubumuz ise hasta ve transplant kontrol grubumuzla benzer şekilde 46,1 yaş ortalamasına sahip, 12(%34,3) erkek ve 9(%32,1) kadıncinsiyette olan 21 kişiyi kapsamaktadır. Hastaların ve kontrol gruplarının demografik özellikleri Tablo 4.1.' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri

ÖZELLİK	CİNSİYET					
	Hasta grubu		Transplant kontrol grubu		Sağlıklı kontrol grubu	
YAŞ	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
	44,75		47,3		46,1	
Ortalama n (%)	11(28,6)	9(35,7)	14(37,1)	8(32,1)	12(34,3)	9(32,1)

20 kişiden oluşan hasta grubumuz nakil sonrası ilk 12 ay içinde de novo DSA geliştirmiştir. PRA Class I ve PRA Class II tarama testi pozitif çıkan ve donöre özgü antikor taraması yapılması gereken durumlarda laboratuvarımızda bu HLA antijenlerinin yüzdelerinin belirlenmesi ve tanımlanması için hasta serum örnekleri Single Antigen Class I/II testi fluoroanalizör yöntemiyle Luminex cihazında çalışılmıştır. Sistem taraması sonucunda bu 20 hasta içerisinde HLA-Class I + pozitif olan 6 hasta, HLA-Class II + pozitif olan 6 hasta ve hem HLA-Class I + hem de HLA-Class II + pozitif olan 8 hasta tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre hasta grubu kendi arasında HLA sınıflarına karşı oluşturulan PRA pozitifliğine göre 3 gruba ayrılmıştır. Bu grupları sadece HLA-Class I + pozitif, HLA-Class II + pozitif ve hem Class I hem de Class II pozitif olma durumlarına göre sınıflandırılmıştır. Bu grupların demografik özellikleri Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Hastaların Demografik Özelliklerinin Hastalığın Alt Tiplerinde Dağılımı

		HLA-Class I +	HLA- Class II +	HLA-Class I ve Class II +
Yaş	Ortalama	43	43,5	47
Cinsiyet	Erkek n (%)	1 (16,7)	5(83,3)	4 (50,0)
	Kadın n (%)	5 (83,3)	1(16,7)	4 (50,0)

Tarama testlerinde anti HLA antikorları pozitif saptanan örneklerde tanımlama testi yapılarak PRA pozitifliğinin yüzdeleri belirlenmektedir. Tanımlama testlerinde %25 ve üzeri pozitifliğe sahip olan hastalar çalışma grubumuza alınmıştır. Bu hastaların daha sonra anti- HLA tipleri single antijen Class I ve Class II tanımlama testi ile belirlenmektedir. LSA testi çalışılan hastalarımızın anti HLA antikorlarının hangi antijenlere karşı geliştikleri Tablo 4.3.'de verilmiştir. HLA Class I için HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-A*68, HLA-B*08, HLA-B*15, HLA-B*35, HLA-B*51, HLA-B*53, HLA-B*57, HLA-B*58 antijenlerine yönelik antikorları bulunmaktadır. HLA Class II için ise HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*14, HLA-DRB1*15, HLA-DRB1*16, HLA-DQB1*02, HLA-DQB1*03, HLA-DQB1*04, HLA-

DQB1*05, HLA-DQB1*06 antijenlerine karşı antikor oluşturdıkları belirlendi. 5 hastanın ise LSA testi çalışılmamıştı. Bu nedenle tabloda bu kısım boş bırakılmıştır.

Tablo 4.3.PRA pozitif hastaların Lenfosit Single Antijenleri.

	HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*
1		*07:02,*08:01,*15:01,*15:02, *15:03,*15:12,*15:18,*18:01, *27:08,*35:01,*39:01,*42:01, *45:01,*50:01,*54:01,*55:01, *56:01,*67:01,*78:01,*82:02		
2	*02:01,*02:02,*02:03,*02:05, *26:01,*68:01,*68:02,*69:01	*57:01,*58:01		
3	*23:01,*24:02,*24:03,*25:01, *32:01	*15:13,*15:16,*27:05,*38:01, *44:02,*44:03,*49:01,*51:01, *52:01,*53:01,*57:01,*58:01, *59:01		
4	*02:01,*02:02,*02:03,*02:05, *24:02,*24:03,*68:01,*68:02, *69:01	15:03,*15:16,*57:01,*58:01		
5	*02:03,*03:01,*29:02,*33:03, *66:01,*68:02,*74:01			
6				
7				
8				*02:01,*02:02,*03:01,*03:02,*03:03,*04:01,*04:02
9			*15:01,*15:02,*15:03	*02:01,*02:02,*04:01,*04:02, *05:01,*05:02,*06:01,*06:02,*06:03,*06:04
10			*03:01,*03:02,*03:03,*08:01, *08:02,*11:01,*11:03,*11:04, *13:01,*13:03,*13:05,*14:01, *14:03,*14:04	
11				
12				
13	*02:01,*02:02,*02:03,*02:05, *23:01,*24:02,*24:03,*68:01, *68:02,*69:01	*46:01,*58:01	*03:01,*03:02,*03:03,*04:01, *04:02,*04:03,*04:04,*04:05, *11:03,*13:05,*14:03,*15:01, *15:02,*15:03,*16:01	
14	*03:01,*11:01,*11:02,*25:01, *26:01,*36:01,*43:01,*66:01	*27:05,*27:08	*11:01,*11:04	*05:02,*06:02,*06:04
15				
16				
17	*23:01,*24:02,*24:03	*08:01,*15:02,*15:18,*35:01, *35:08,*51:01,*53:01,*78:01	*01:03,*15:01,*15:02,*15:03, *16:01,*16:02	
18				
19	*02:01,*02:02,*02:03,*02:05, *68:01,*68:02,*69:01		*01:01,*01:02,*01:03,*09:01, *10:01	*03:02,*03:03,*04:01,*04:02,*05:01, *05:02,*05:03,*06:01,*06:02,*06:03,*06:04
20	*03:01,*11:02,*23:01		*11:01,*11:03,*11:04,	*03:01

Değerlendirme ve izlem sırasında alıcı yaşı, alıcı cinsiyeti, alıcı ve donörün akrabalık derecesi, canlıdan / kadavradan nakil, posttransplant class I/class II PRA, mismatch sayısı, uygulanan immünsupresif protokol, indüksiyon tedavisi alıp almadıkları hasta dosyalarından kaydedildi. Alıcı ve donörlerin HLA-A, HLA-B ve HLA-DR'leri karşılaştırılarak fullmatch ve mismatch durumları belirlendi. Bu verilere göre çalışmaya dahil ettiğimiz tüm hastaların böbrek nakilleri canlı ve kadavra donörlerden yapılmıştır. Hasta grubundaki 4 hastanın böbrek nakli kadavradan olup, 16 hastanın ise canlı donörden yapılmıştır. Transplant kontrol grubundaki 5 hastanın böbrek nakli kadavradan olup, 17 hastanın ise canlı donörden yapılmıştır. HLA uyumları full match, mismatch ya da allel olarak belirtilmiştir. Nakil HLA allel uyumları hasta grubumuzda 2 olgu mismatch, 2 olgu full-match, 6 olguda bir haplotip (1A1B1DR) uyumu gözlenmiş olup 10 olguda ise en az bir HLA allel uyumu gözetilerek nakil yapılmıştır. Transplant kontrol grubumuzdaki HLA allel uyumları ise 2 olgu mismatch, 1 olgu full-match, 7 olgu 1A1B1DR, 12 olguda ise en az bir HLA allel uyumu gözetilerek nakil yapılmıştır.

Hastalarımızın kullandıkları ilaçlar belirlenmiştir. Transplant kontrol grubunun PRA ları negatif olup nakil türleri canlı ve kadavradan yapılmıştır. HLA uyumları full match mismatch ya da allel olarak belirtilmiş olup kullandıkları ilaçlar belirlenmiştir. Hasta grubumuz nakil sonrası indüksiyon ve idame tedavisinde kullanılan ilaçlardan ATG(15/20), MMF(16/20), TAC(17/20), Basiliximab (5/20), MYF (1/20) CsA(1/20) kullanmaktadır. ATG(9/20), MMF(12/20), TAC(13/20), Basiliximab (10/20), MYF (2/20) CsA(2/20) tedavisi almaktadır. Hasta ve transplant kontrol grubunun cinsiyet, yaş, HLA sınıflarına göre PRA pozitiflik yüzdeleri, donör tipi, HLA uyumları ve nakil sonrası kullandıkları ilaçlar Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Hastaların PRA yüzdeleri ile kadavradan veya canlı donör tipinden yapılan nakil arasında anlamlı bir ilişki ya da fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Hasta ve transplant kontrol gruplarında yapılan nakillerde HLA uyumlarının full match ya da miss match olması bakımından PRA pozitifliği ile arasında anlamlı bir ilişki yoktur ($p>0.05$).

Donör tipi, HLA uyumuna benzer şekilde hasta ve transplant kontrol gruplarının nakil sonrası kullandıkları ilaçlar ile nakil sonrası donöre özgü gelişen antikorlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterilememiştir ($p>0.05$).

Bu parametreler bakımından seçtiğimiz çalışma gruplarımız homojen bir dağılım göstermektedir.



Tablo 4.4. Hasta ve Transplant kontrol grubunun HLA sınıflarına göre PRA yüzdeleri, donör tipi, HLA uyumları ve nakil sonrası kullandıkları ilaçlar

HASTA GRUBU										Transplant Kontrol Grubu									
KULLANILAN İLAÇLAR										KULLANILAN İLAÇLAR									
ÇİNSİYET	YAŞ	HLA CLASS 1 %	HLA CLASS 2 %	Verici Tipi	HLA Uyumu	ATGM/MF/MFA TAC	Basitümab	CsA	MTF	ÇİNSİYET	YAŞ	HLA CLASS 1 %	HLA CLASS 2 %	Verici Tipi	HLA Uyumu	ATGM/MF/MFA TAC	Basitümab	CsA	MTF
E	16	82	-	C	2A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓	E	57	-	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓
K	45	52	-	K	1B 2DR	✓	✓	✓	✓	K	59	-	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓
K	60	70	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓	E	51	-	-	C	1DR	✓	✓	✓	✓
K	23	76	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓	K	37	-	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓
E	41	98	-	C	2A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓	E	39	-	-	C	UYUM YOK	✓	✓	✓	✓
E	24	30	-	K	1B 1DR	✓	✓	✓	✓	E	55	-	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓
E	63	-	67	C	MISS MATCH	✓	✓	✓	✓	E	43	-	-	C	1DR	✓	✓	✓	✓
E	46	-	73	C	1A 1DR	✓	✓	✓	✓	K	41	-	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓
E	30	-	97	C	FULL MATCH	✓	✓	✓	✓	E	57	-	-	C	1B 1DR	✓	✓	✓	✓
K	62	-	93	C	1A 1B 2DR	✓	✓	✓	✓	K	48	-	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓
K	49	-	97	C	1A	✓	✓	✓	✓	E	62	-	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓
K	50	-	47	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓	E	45	-	-	C	1A	✓	✓	✓	✓
K	67	70	56	C	FULL MATCH	✓	✓	✓	✓	E	57	-	-	C	MISS MATCH	✓	✓	✓	✓
K	56	100	83	C	MISS MATCH	✓	✓	✓	✓	E	35	-	-	C	FULL MATCH	✓	✓	✓	✓
E	30	30	60	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓	E	47	-	-	C	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓
K	46	67	26	K	1A 1B 1DR	✓	✓	✓	✓	K	48	-	-	C	1DR	✓	✓	✓	✓
E	42	92	67	C	1A 1DR	✓	✓	✓	✓	K	36	-	-	K	1A 1DR	✓	✓	✓	✓
E	60	80	93	K	2A 1DR	✓	✓	✓	✓	K	50	-	-	K	1A 1DR	✓	✓	✓	✓
E	29	38	77	C	1A 1DR	✓	✓	✓	✓	K	27	-	-	C	1DR	✓	✓	✓	✓
E	41	98	77	C	1A 2B 1DR	✓	✓	✓	✓	E	61	-	-	K	1A 1DR	✓	✓	✓	✓
						✓	✓	✓	✓	K	40	-	-	K	1DR	✓	✓	✓	✓
						✓	✓	✓	✓	E	47	-	-	K	1A 1B 2DR	✓	✓	✓	✓

Çalışmamızda gen ifadesi analizi için çalıştığımız bütün örneklerin Ct değerlerinin (Eşik değeri), “kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)” yöntemi yardımı ile yaklaşık kat değişimi bulundu. Bunun yanı sıra çalışmalarımız iki tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş ve esas alınan değer iki tekrarın ortalamasından oluşmaktadır.

PD-1 ($X^2= 12.879$, $df = 2$, $P = 0.002$) ve *PD-L1* ($X^2= 7.947$, $df = 2$, $P = 0.019$) gen ekspresyonlarının gruplar arasında farklı olduğu görülmüştür. Başka bir ifade ile istatistiksel olarak hasta grup, bu değişkenler bakımından transplant kontrol grubu ve kontrol grubundan farklıdır.

PD-1 gen ekspresyonu için 3 grup karşılaştırıldığında hasta grubunun kat sayısının transplant kontrol grubu ve kontrol grubundan farklı olduğu tespit edilmiştir.

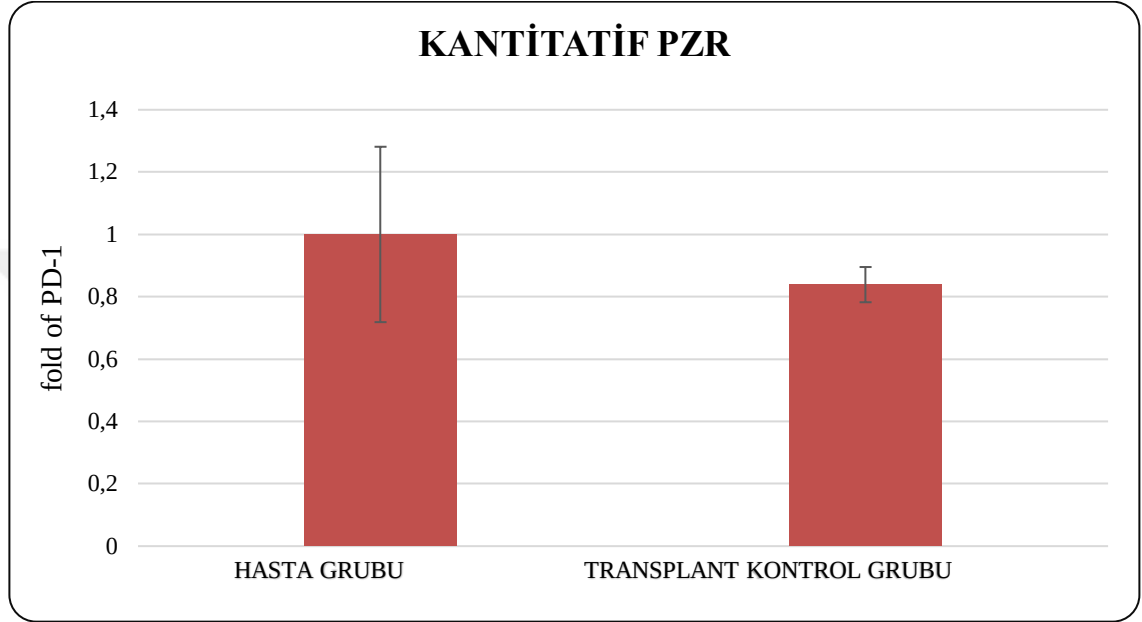
Buna göre hasta grubunun kat sayısının 1,03 transplant kontrol grubunun kat sayısının 0,82 ve sağlıklı kontrol grubunun kat sayısının ise 1,13 olduğu tespit edilmiştir. *PD-1* gen ekspresyonunun hasta grubunda transplant kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($P = 0.006$). Hasta ve transplant kontrol gruplarının *PD-1* genine ait ortalama Ct değerleri Tablo 4.5.’de verilmiştir.

Tablo 4.5.Hasta ve Kontrol Gruplarında *PD-1* Gen Ekspresyon Ölçümleri

		n	Ortalama±Sd (CT değerleri)
PD-1	Sağlıklı Kontrol Grubu	21	1,13±0.37
	Transplant Kontrol Grubu	22	0,82±0.15
	Hasta Grubu	20	1,03±0.29

sd: Standart Sapma, CT değerleri: Eşik Değerleri, n: olgu sayısı

PD-1 gen ekspresyonunun hasta grubunda transplant kontrol grubuna göre daha fazla eksprese edildiği aynı zamanda Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Hasta ve Transplant Kontrol Gruplarında *PD-1* Gen Ekspresyon Ölçümleri

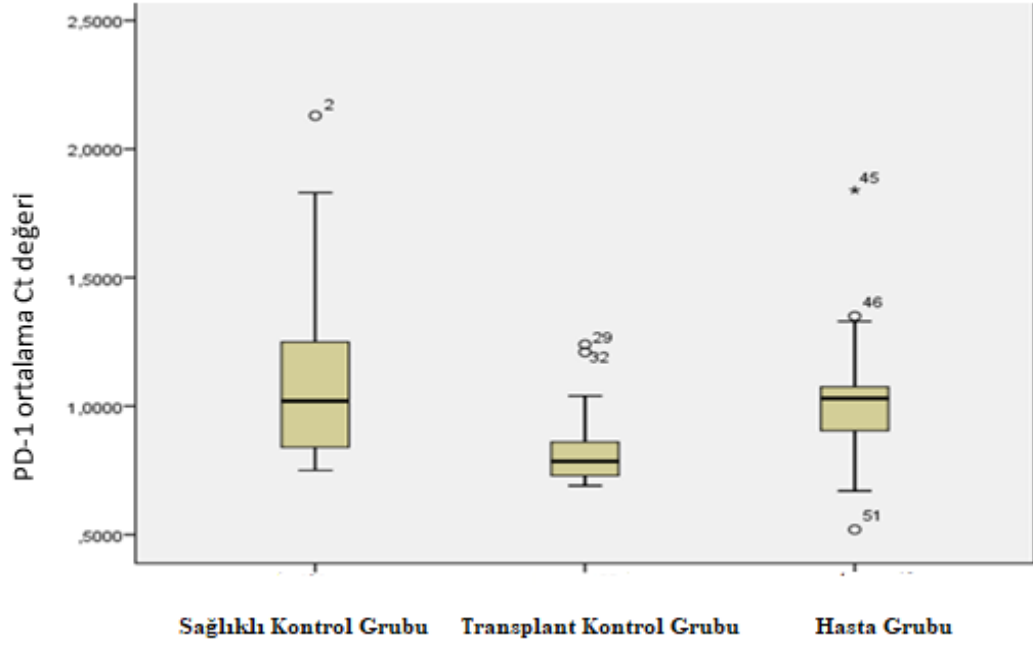
Tablo 4.6. Hasta ve Kontrol Gruplarında *PD-1* Gen Ekspresyon Düzeylerinin karşılaştırılması

	p değeri
PD-1	
Hasta Grubu-Transplant Kontrol Grubu	0.006*
Transplant Kontrol Grubu- Sağlıklı Kontrol Grubu	0.001*
Hasta Grubu-Sağlıklı Kontrol Grubu	0.559

* $p < 0.005$ istatistiksel olarak anlamlı

Sağlıklı kontrol grubuna göre kıyaslandığında transplant kontrol grubunda *PD-1* gen ekspresyonunun daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($P = 0.001$). Hasta grubunda *PD-1*

gen ekspresyonu sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük olup aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($P = 0.559$). Hasta ve kontrol gruplarının *PD-1* gen ekspresyonu bakımından karşılaştırılması hem Tablo 4.6.' da hem de Şekil 4.2.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.2.Hasta ve Kontrol Gruplarında *PD-1* Gen Ekspresyon Ölçümleri

PD-L1 gen ekspresyonu için hasta grubu, transplant kontrol grubu ve sağlıklı kontrol grupları karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grubunun kat sayısının hasta grubu ve transplant kontrol grubundan farklı olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının *PD-L1* genine ait ortalama Ct değerleri Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.7.Hasta ve Kontrol Gruplarında *PD-L1* Gen Ekspresyon Ölçümleri

		n	Ortalama±Sd (CT değerleri)
PD-L1	Kontrol Grubu	21	1,04±0,40
	Transplant Kontrol Grubu	22	0,88±0,11
	Hasta Grubu	20	0,84±0,23

n: katılımcı sayısı, sd: Standart Sapma, CT değerleri: Eşik Değerleri

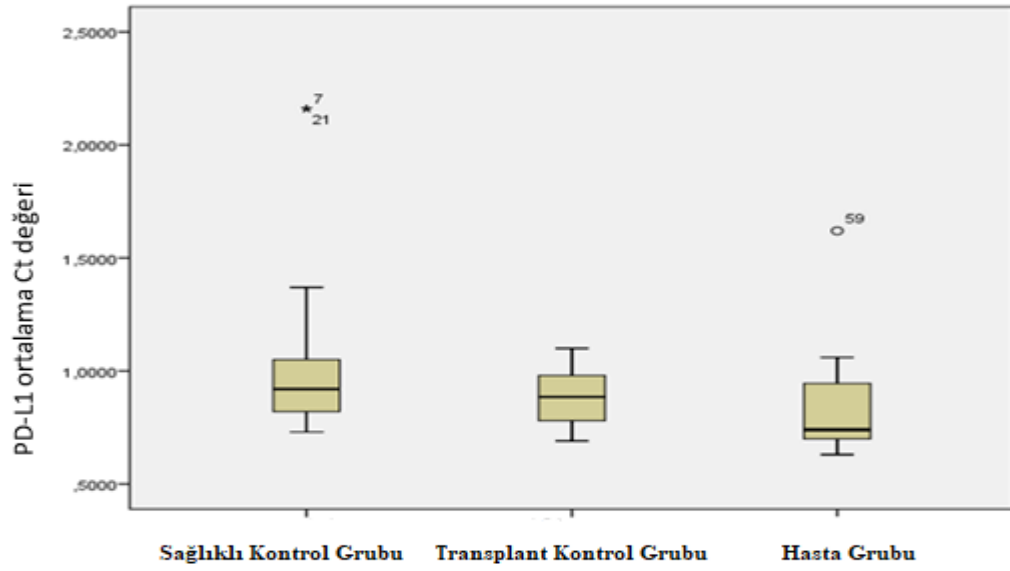
Bu verilere göre *PD-L1* gen ekspresyonu incelendiğinde; sağlıklı kontrol grubunun kat sayısının 1,04, hasta grubunun kat sayısının 0,84 ve transplant kontrol grubunun ise 0,88 olduğu tespit edilmiştir. *PD-L1* gen ekspresyonu Tablo 4.8.'de görüldüğü gibi sağlıklı kontrol grubunda hasta grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (P = 0.005).

Tablo 4.8. Hasta ve Kontrol Gruplarında *PD-L1* Gen Ekspresyon Düzeylerinin karşılaştırılması

		p değeri
PD-L1	Hasta Grubu-Transplant Kontrol Grubu	0.247
	Hasta Grubu - Sağlıklı Kontrol Grubu	0.005*
	Transplant Kontrol Grubu -Sağlıklı Kontrol Grubu	0.009

*p<0.005

PD-L1 gen ekspresyonu bakımından hasta ve transplant kontrol grup arasında fark gözlenmemiş olup kontrol grubundaki gen ekspresyonu her iki gruptan daha yüksek ifade edilmiştir (Şekil4.3.).



Şekil 4.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında *PD-L1* Gen Ekspresyon Ölçümleri

Periferik kan lenfositlerindeki CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T, CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T, CXCR5⁺, PD-1⁺ hücrelerin ve total tüm hücreler içindeki yüzey ekspresyonları akım sitometri yöntemi ile değerlendirildikten sonra ortalama yüzdeleri belirlenmiş olup, Tablo 4.9.'da verilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının periferik kan lenfositlerindeki CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücrelerinin ekspresyon yüzdeleri için 3 grup karşılaştırıldığında; transplant kontrol grubumuzun, hasta ve sağlıklı kontrol gruplarımızdan farklı olduğu bulunmuştur(%) ($\chi^2=42.061$, df = 2, P = 0.001) (Ek 3., Ek 4. ve Ek 5.).

Tablo 4.9.Hasta ve Kontrol Gruplarının Akım Sitometri Sonuçlarının (%) Düzeyleri

Hücreler Gruplar	CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T Hücreleri (%)Ortalama±Sd	CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T Hücreleri (%) Ortalama±Sd	CXCR5⁺ Lenf. Hücreleri (%) Ortalama±Sd	CXCR5⁺Total Hücreleri (%) Ortalama±Sd	PD1⁺Lenf. Hücreleri (%) Ortalama±Sd	PD-1⁺ Total Hücreleri (%) Ortalama±Sd
Hasta Grubu	3,06±1,98	6,09±4,12	35,6±16,01	5,45±4,32	8,78±4,83	1,97±1,62
Transplant Kontrol Grubu	0,52±0,40	1,38±1,82	22,3±14,4	7,22±4,99	2,21±1,88	2,49±1,61
Sağlıklı Kontrol Grubu	2,78±0,59	5,59±2,64	36,4±10,5	6,37±2,57	8,15±2,88	3,11±2,70

CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücrelerinin yüzdeleri transplant kontrol grubu ile hasta grubu arasında ve transplant kontrol grubu ile sağlıklı kontroller arasında hücre yüzeyinde eksprese edilme yüzdeleri açısından farklılıklar göstermektedir. Bu grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması ise Tablo 4.10.'da belirtildiği gibidir.

Tablo 4.10. Hasta ve Kontrol Gruplarında CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücre yüzdelerinin karşılaştırılması

		P değeri
CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺T	Hasta Grubu-Transplant Kontrol Grubu	0.001*
	Transplant Kontrol Grubu- Sağlıklı Kontrol Grubu	0.001*
Hücreleri (%)	Hasta Grubu-Sağlıklı Kontrol Grubu	0.620

Hasta grubunda periferal kan lenfositlerindeki CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücrelerinin yüzdesi transplant kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksektir (p=0.001). Bunun yanı sıra sağlıklı kontrol grubuna kıyasla transplant kontrol grubunda CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücrelerinin yüzdesi daha düşük tespit edildi (p=0.001). Üstelik hasta grubunda periferal kan lenfositlerindeki CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücre yüzdesi sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksektir. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.620) (Şekil 4.4.).



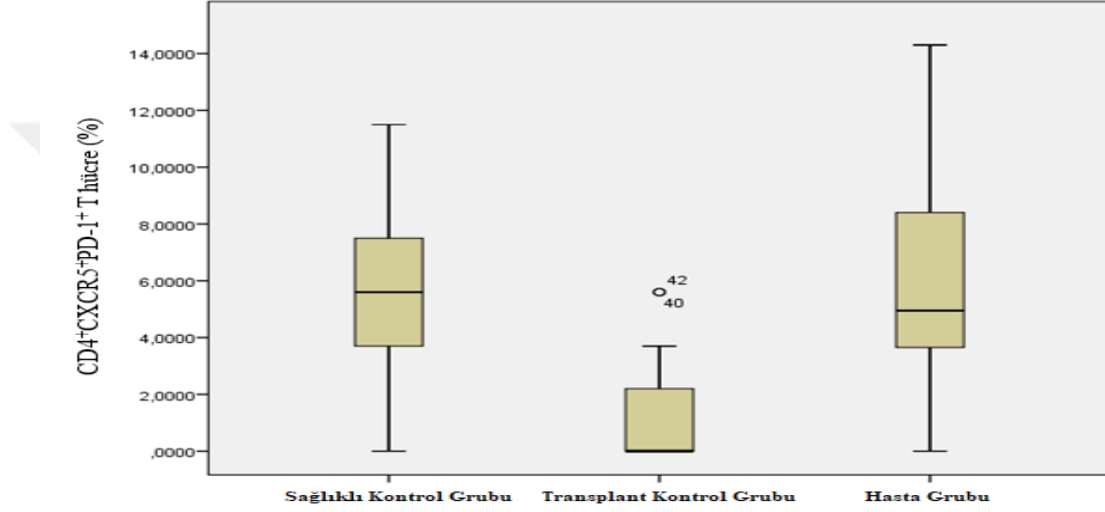
Şekil 4.4. Hasta ve Kontrol Gruplarında CD8+CXCR5+PD-1+ T hücre yüzdeleri

CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücreleri (%) ($X^2= 25.263$, $df = 2$, $P = 0.001$), Lenfosit hücrelerindeki CXCR5 ($X^2= 11.353$, $df = 2$, $P = 0,001$) ve lenfositlerdeki PD-1 ($X^2= 32,450$, $df = 2$, $P = 0.001$) yüzdelерinin gruplar arasında farklı olduğu görülmüştür. Başka bir ifade hasta grup, bu değişkenler bakımından transplant kontrol grubu ve sağlıklı kontrol grubundan farklıdır. CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücrelerinin yüzdeleri transplant kontrol grubu ile hasta grubu arasında farklılık göstermektedir (Tablo 4.11.).

Tablo 4.11. Hasta ve Kontrol Gruplarında CD4+CXCR5+PD-1+ T hücre yüzdelерinin karşılaştırılması

		p değeri
CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T Hücreleri (%)	Hasta Grubu-Transplant Kontrol Grubu	0.001*
	Transplant Kontrol Grubu- Sağlıklı Kontrol Grubu	0.001*
	Hasta Grubu-Sağlıklı Kontrol Grubu	0.894

Hasta grubunda $CD4^+CXCR5^+PD-1^+$ T hücrelerinin yüzdesi transplant kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0.001$). Sağlıklı kontrol grubuna kıyasla transplant kontrol grubunda $CD4^+CXCR5^+PD-1^+$ T hücrelerinin yüzdesi daha düşük tespit edildi. ($p=0.001$) (Şekil 4.5.). Hasta grubunda hücre yüzdesi sağlıklı kontrol grubuna göre grubuna daha yüksektir. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.



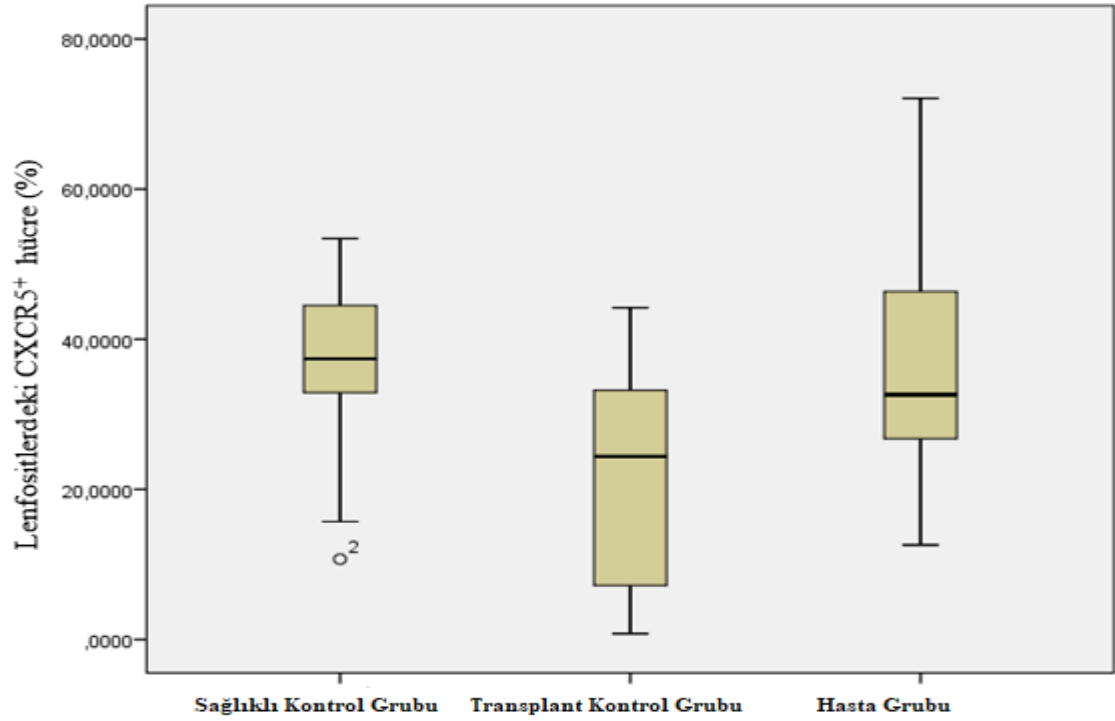
Şekil 4.5. Hasta ve Kontrol Gruplarında $CD4^+CXCR5^+PD-1^+$ T hücre yüzdeleri

Lenfosit hücrelerindeki CXCR5 yüzdeleri transplant kontrol grubu ile hasta grubu arasında farklılık göstermektedir.

Tablo 4.12. Hasta ve Kontrol Gruplarında lenfositlerdeki CXCR5+ hücre yüzdelerinin karşılaştırılması

		p değeri
Lenfositlerdeki CXCR5⁺ (%)	Hasta Grubu-Transplant Kontrol Grubu	0.019*
	Transplant Kontrol Grubu- Sağlıklı Kontrol Grubu	0.001*
	Hasta Grubu-Sağlıklı Kontrol Grubu	0.392

Hasta grubunda lenfositlerdeki CXCR5 yüzdesi transplant kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0.019$). Sağlıklı kontrol grubuna kıyasla transplant kontrol grubunda lenfositlerdeki CXCR5 yüzdesi daha düşük tespit edildi. ($p=0.001$). Hasta grubunda hücre yüzdesi sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksektir. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.392$) (Tablo 4.12.) (Şekil 4.6.).



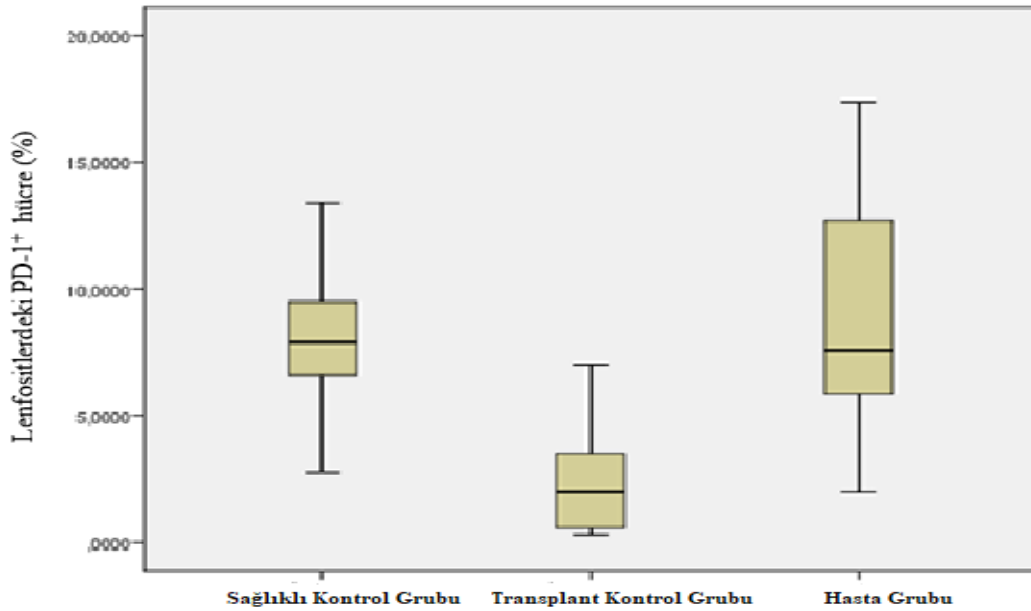
Şekil 4.6. Hasta ve Kontrol Gruplarında Lenfositlerindeki CXCR5⁺ hücre yüzdeleri

Lenfosit hücrelerindeki PD-1 yüzdeleri transplant kontrol grubu ile hasta grubu arasında farklılık göstermektedir.

Tablo 4.13. Hasta ve Kontrol Gruplarında lenfositlerdeki PD-1+ hücre yüzdelерinin karşılaştırılması

		p değeri
Lenfositlerdeki PD-1⁺ (%)	Hasta Grubu-Transplant Kontrol Grubu	0.001*
	Transplant Kontrol Grubu- Sağlıklı Kontrol Grubu	0.001*
	Hasta Grubu-Sağlıklı Kontrol Grubu	0.950

Hasta grubunda lenfositlerdeki PD-1 yüzdesi transplant kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksektir (p=0.001). Sağlıklı kontrol grubuna kıyasla transplant kontrol grubunda lenfositlerdeki PD-1 yüzdesi daha düşük tespit edildi. (p=0.001). Hasta grubunda hücre yüzdesi sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksektir. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.950) (Tablo 4.13.) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Hasta ve Kontrol Gruplarında Lenfositlerindeki PD-1⁺ hücre yüzdeleri

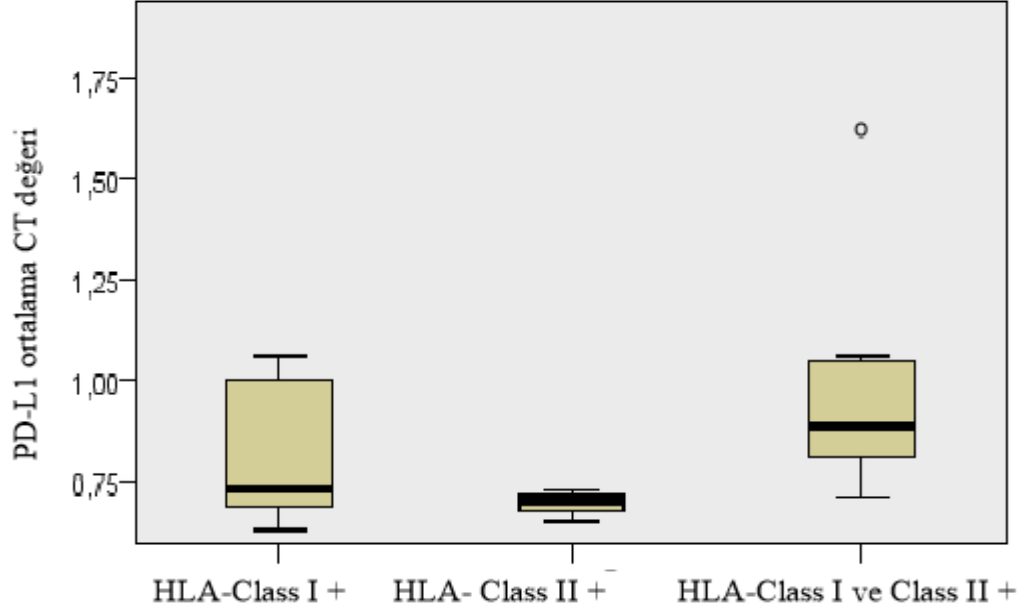
Hasta grubu kendi arasında PRA pozitifliğine göre HLA-Class I +, HLA-Class II + ve HLA-Class I ve Class II + olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Bu üç grubunperiferal kan lenfositlerindeki CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T, CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T, CXCR5⁺, PD-1⁺ hücrelerin ve total tüm hücreler içindeki CXCR5 ve PD-1 yüzey ekspresyonları akım sitometri yöntemi ile değerlendirildikten sonra ortalama yüzdeleri belirlenmiş olup, Tablo 4.14.'de verilmiştir. HLA-Class II + grubunda sadece PD-L1 (P = 0,029) gen ekspresyon seviyeleri ve CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücre (P = 0,049) yüzdeleri HLA-Class I + ve hem HLA-Class I hem de Class II + gruplarına göre HLA-Class II + grubunda anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur.

Tablo 4.14.HLA-Class I + , HLA- Class II + ve HLA-Class I ve Class II + gruplarının gen ekspresyon ve hücre yüzde karşılaştırması

	PD-1 CTdeğeri Ort±Sd	PD-L1 CTdeğeri Ort±Sd	CD8 ⁺ CXCR5 ⁺ PD1 ⁺ T Hücreleri (%) Ort±Sd	CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ PD1 ⁺ T Hücreleri (%) Ort±Sd	CXCR5 ⁺ Len Hücreleri(%) Ort ±Sd	CXCR5 ⁺ Tot Hücreleri(%) Ort ±Sd	PD1 ⁺ Lenf. Hücreleri (%) Ort ±Sd	PD-1 ⁺ Total Hücreleri(%) Ort ±Sd
HLA- ClassI + n=6	1,21±0,33	0,80±0,17	3,63±2,72	8,65±4,10	35,6±16,01	3,68±2,28	11,9±4,8	0,91±0,29
HLA- ClassII+ n=6	0,88±0,29	0,69±0,29	1,65±0,50	3,43±2,88	22,3±14,4	6,38±6,99	5,85±2,95	1,81±2,02
HLA- Class I ve Class II + n=8	1,01±0,18	0,91±0,28	3,68±1,67	6,17±4,06	36,4±10,5	6,07±2,86	8,75±4,93	2,88±1,43

PD-L1 gen ekspresyonu bakımından HLA-Class I + , HLA- Class II + ve HLA-Class I ve Class II + gruplar arasında HLA- Class II + grubundaki gen ekspresyonu her iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük ifade edilmiştir (P = 0,029) (Şekil 4.8.). PD-1 gen ekspresyonu bakımından HLA-Class I +, HLA- Class II + ve HLA-Class I ve

Class II + gruplar arasında HLA- Class II + grubundaki gen ekspresyonu her iki gruptan daha düşük ifade edilmiştir. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi.

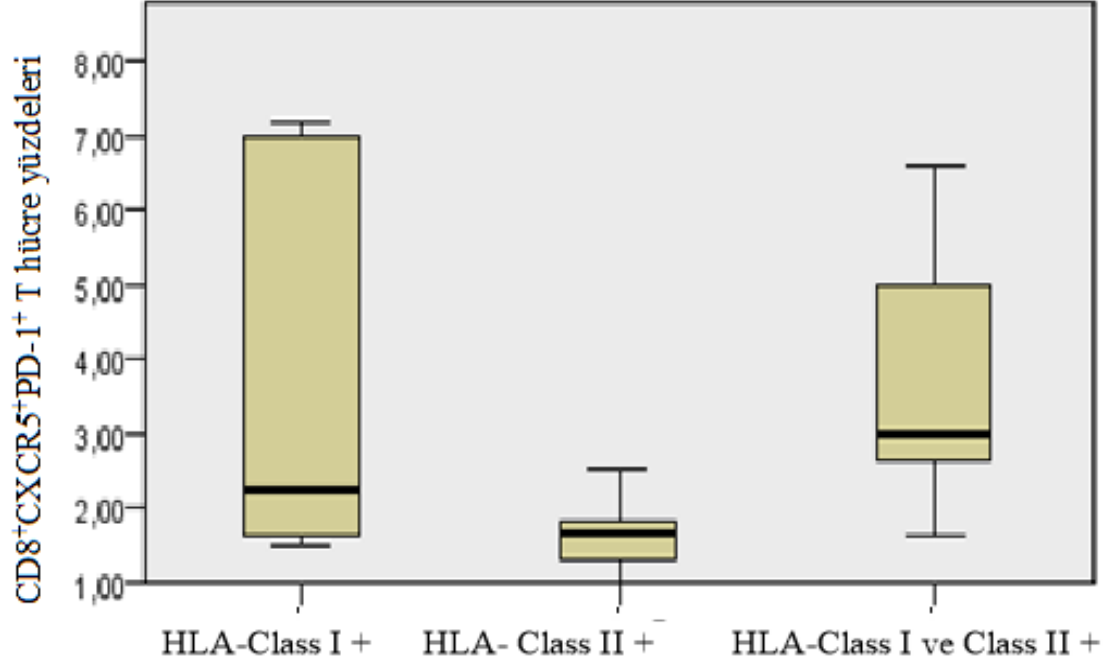


Şekil 4.8.HLA-Class I + , HLA- Class II + ve HLA-Class I ve Class II + gruplarının PD-L1 gen ekspresyon seviyeleri

HLA-Class I +, HLA- Class II + ve HLA-Class I ve Class II + gruplarının periferik kan lenfositlerindeki CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücrelerinin ekspresyon yüzdeleri için 3 grup karşılaştırılmıştır. HLA-Class I + ve hem HLA-Class I hem de Class II + gruplarına göre HLA-Class II + grubunda CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücrelerinin ekspresyon yüzdeleri istatistiksel analiz bakımından anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (P = 0,049) (Şekil 4.9.).

Bu üç grubun periferik kan lenfositlerindeki CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T, CXCR5⁺, PD-1⁺ hücrelerin ve total tüm hücreler içindeki CXCR5 ve PD-1 yüzey ekspresyonları da analiz edilmiştir. Bu hücrelerin ekspresyon yüzdeleri bakımından gruplar arasında kıyaslama yapıldığında total hücrelerdeki CXCR5⁺ hücre yüzdesi hariç hepsinde HLA- Class II +

grubunda diğer iki gruba göre hücre ekspresyonları daha düşük bulunmuş olup, aralarındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).



Şekil 4.9. HLA-Class I, HLA- Class II + ve HLA-Class I ve Class II + gruplarının CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücre yüzdeleri

Gen ekspresyon seviyeleri ile hücre yüzdeleri arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek için korelasyon analizi yapıldı. PD-1'in sadece CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücreleri ile pozitif korelasyonu vardır ($\rho= 0.40$, $P= 0.001$). Ancak zayıf bir ilişkinin olduğu korelasyon katkısının 0.40 olmasından anlaşılmaktadır (0.70 üzeri güçlü korelasyon olarak kabul edilir). PD-L1'in ise hücre yüzdeleri ile arasında korelasyon bulunmamıştır ($P > 0.01$).

5. TARTIŞMA

Böbrek nakli, hastaların günlük yaşam standartlarını iyileştirmesinin yanı sıra yaşam sürelerinin uzamasını sağlayan ideal bir tedavi yöntemidir (Sumida ve Kovesdy, 2017). Transplantasyon başarısını arttırmak ve rejeksiyon gelişimini önlemek için DSA varlığını tespit edebilen immunogenetik testler hayati öneme sahiptirler (Sheldon ve Poulton, 2006; Tinckam, 2009). DSA pozitifliği böbrek nakli sonrası greft kaybının nedenlerinden biri olan antikor aracılı reddi tahmin eden önemli bir biyobelirteç haline gelmiştir (Jackson ve Zachary, 2008; Lopes ve ark., 2015). DSA'lar HLA Class I, Class II, MICA ve MICB gibi minör doku uyumluluk moleküllerine veya endotel ve epitel hücrelerin yüzeylerinde ifade edilen HLA-dışı antijenlere karşı gelişir (Zachary ve Leffell, 2008).

Transplantasyon sonrası güçlü immünosupresif ilaçların kullanılmasına rağmen literatürde belirtilen bilgilere göre böbrek nakli alıcılarının önemli bir kısmı (%13-27) de novo DSA geliştirir (Devos ve ark., 2014, Heilman ve ark., 2014, Lefaucheur ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda gözlemlenen HLA Class I (6/20 alıcı), HLA Class II (6/20 alıcı) ve hem HLA Class I hem de Class II (8/20 alıcı) alloantijenlerine karşı DSA gözlemlenen hasta sayısı, böbrek naklinden sonraki ilk yıl içinde meydana gelen de novo DSA gelişimi bakımından literatürdeki diğer yayınlarla benzerdir (Ntokou ve ark., 2011, Wiebe ve ark., 2012, Guidicelli ve ark., 2016). Çalışmamızdaki tüm alıcılarda nakil öncesi DSA'ların olmamasına dayanarak sonradan de novo DSA geliştirdiğini düşünülmekle birlikte, erken DSA oluşumunun (nakil sonrası 3 aydan az) bazı durumlarda olabileceği kabul edilmektedir (Devos ve ark., 2014, Heilman ve ark., 2014, Lefaucheur ve ark., 2016).

Böbrek naklinde alıcı ve donör arasındaki HLA uyumu alıcılarda DSA oluşumunu ve akut rejeksiyon riskini büyük ölçüde engellemektedir. Kadavradan nakil olan böbrek nakli hastalarının canlı donörden yapılan hastalara göre rejeksiyon görülme riski yüksek olup, akut rejeksiyondan kronik rejeksiyona ilerleme hızının da daha fazla olduğu yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (Knight ve ark., 2001). Çalışmamızda alıcı ve donör arasındaki

HLA uyumları ve donör tipinin canlıdan veya kadavradan yapılması bakımından DSA oluşumu ile ilişkili herhangi bir fark gözlenmedi.

DSA ve idame tedavide kullanılan immunosupresif ilaçların ilişkisini belirlemek için yapılan çalışmaların genelinde, uygulanan immünosupresifin DSA gelişimini etkili bir şekilde önlemediği sonucuna varılmıştır (Millán ve ark., 2014). Bazı araştırmacılar ise kalsinörin inhibitörlerinin greft fonksiyonunu azalttığını ve DSA oluşumunu tetiklediğini bildirmişlerdir (Liefeldt ve ark., 2012). Ancak takrolimus+MMF+steroid uygulamaları ise düşük subklinik rejeksiyon ve de-novo anti-HLA antikor gelişiminde azalmayla ilişkilendirilmiştir (Moreso ve ark., 2004; Rowshani ve ark., 2006; Eng ve ark., 2009). Çalışmamızda Takrolimus, Basiliximab, ATG, MMF, CsA ve MYF kullanımı ile HLA antikor gelişimi açısından herhangi bir farklılık bulunamamıştır. Bununla birlikte, DSA'ların ortaya çıkışı ile ilişkili biyolojik, genetik ve immunolojik olaylar henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. DSA sonucu greft kaybını engellemek için günümüzde kullanılan stratejik seçenekler; spesifik olmadıklarından, çok geç uygulandıklarından veya antikorların kaynağını hedeflemede etkisiz olduklarından sınırlı etkiye sahiptirler (Trpkov ve ark., 1996; McKenna ve ark., 2000). Böbrek transplantasyonunun başarısını arttırmak ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine rehberlik etmek için DSA'ların oluşumuna, gelişimine, kalıcılığına ve faaliyetine yol açan mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

Transplantasyon sonrası alıcılarda oluşan immün yanıt, genellikle aktive CD4⁺ T lenfositlerinde, düzenleyici ve sitotoksik T hücrelerinde dengesizliğe yol açan bir artışla karakterize edilir (Terasaki ve Cai, 2005; Moll ve Pascual, 2005). Humoral alloimmünitinin modüle edilmesine yönelik geleneksel yaklaşım, B hücrelerinin antikor üretmesine "yardımcı olan" CD4⁺ T hücrelerinin baskılanmasına odaklanmıştır (McKenna ve ark., 2000; Terasaki ve Cai 2005; Moll ve Pascual, 2005). CD4⁺ T hücrelerini hedefleyen geleneksel idame immünosupresif ajanların kullanılmasına rağmen, de novo DSA gelişimi, hepatosit ve solid organ nakillerinin ~% 20 -% 40'ında meydana geldiği gözlenmiştir (Colvin ve Smith, 2005; Shimizu ve Colvin, 2005). Alloantikor üretimini ve reddini baskılayan terapileri geliştirmek için yapılan deneysel çalışmaları neticesinde

ortaya çıkan umut verici sonuçlar, insanlarda klinik çalışmaların yolunu açmıştır (Lenschow ve ark., 1992; Larsen ve ark., 1996; Adams ve ark., 2002; Regele ve ark., 2002; Larsen ve ark., 2005; Shimizu ve Colvin, 2005). Bu konuda son yıllarda odaklanılan $CD4^+ T$ hücre alt grubu transplant reddinde de yer alan $CXCR5^+PD-1^+ICOS^+$ foliküler yardımcı T hücreleridir. Transplant alıcılarında alloantikor üretimi için bu hücrelerin B hücrelerine yardım sağladığı bilinmektedir (La Muraglia ve ark., 2019). 2019 yılında yapılan çalışmada immünsupresyon tedavisi alan hastalarda $CD4^+CXCR5^+PD-1^+$, $CD4^+CXCR5^+PD-1^+ICOS^+$ ve $CD4^+CXCR5^+PD-1^+CXCR3^+$ ’ün sıklığında önemli bir artış gözlenmiştir. Aktive Tfh alt kümeleri bakımından hastalarda transplantasyondan 12 ay sonrası ile 0. günde hiçbir fark gözlenmedi. $CXCR5^+PD-1^+$, Tfh’deki PD-1 ekspresyon seviyeleri, 12 ay sonrası ATG ile tedavi edilen hastalarda 0. güne göre önemli ölçüde daha yüksekti. Ek olarak, ATG tedavisi gören hastalar ile diğer tedavileri alanlar arasında saptama zamanında ölçülen de novo DSA yoğunluğunda (maksimum MFI) hiçbir fark yoktu. Daha düşük $CXCR5^+PD-1^+ICOS^+$ seviyelerine sahip DSA’sız hastalar Tfh’lerin transplantasyondan sonraki ilk yıldan sonra de novo DSA geliştirme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Danger ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda da transplantasyondan bir yıl sonra gelişen de novo DSA ile ilişkili olarak lenfositlerde $CXCR5^+$ ve $CD4^+CXCR5^+PD-1^+$ eksprese eden hücre yüzdeleri DSA pozitif olan hasta grubunda transplant kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). Ayrıca $CD4^+CXCR5^+PD-1^+$ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla yüksek olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.005$). Diğer çalışmalarla tutarlı olarak çalışmamızda DSA oluşumu ile Tfh hücre artışının doğru orantılı olduğu bulunmuştur. Ancak çalışmamız ICOS⁺ a yönelik boyamanın yapılamaması nedeniyle tek yönlü değerlendirme içermektedir. Bunun haricinde de novo DSA oluşumunda ve allograft reddinde Tfh hücrelerinin rollerinin kanıtlanması, özellikle kan ve eşleştirilmiş biyopsilerle yapılan uzun zamanlı daha fazla araştırma gerektirecektir. Yapılan klinik deneyler bu hücrelere yönelik tedavilerin halen daha donore özgü antikor oluşumunu engelleyemediğini göstermiştir. Bu nedenle, humoral alloimmünite gelişimini baskılayan ve AMR’yi önleyen yeni immünoterapötik yaklaşımlara ihtiyaç vardır.

CD8⁺ T hücreleri, sitolitik molekülleri salma kapasiteleri ve/veya interferon- γ (IFN-) gibi efektör sitokinler üretme kapasiteleri ile antitümör yanıtlarında yer alan en önemli hücre tiplerinden birini temsil eder. Baskılayıcı fonksiyonlara sahip CD8⁺ T hücrelerinin patolojik koşullara ve lokalizasyonlara bağlı olarak farklı işlevlere sahip tıpkı CD4⁺ T hücrelerinde olduğu gibi yeni alt grupları tanımlanmıştır (Gri ve ark., 2014; Dotiwala ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2018). CD8⁺ T hücrelerinin bir alt kümesinin B hücre foliküllerinde lokalize olmak için CXCR5 ifade ettiği bulunmuştur. Germinal merkezdeki B hücreleri üzerindeki karşılık gelen ligandlarıyla etkileşime girerek otoimmün yanıtları ve otoantikor üretimini düzenlediği bilinmektedir. Tüm bu bilimsel çalışmaların ışığında CXCR5⁺PD-1⁺CD8⁺ T hücre grubu keşfedilmiş ve foliküler sitotoksik T hücreleri olarak adlandırılmıştır (Kang ve ark., 2002; Okazaki ve Honjo, 2007; Hong ve ark., 2012; Mueller ve ark., 2013; Fukazawa ve ark., 2015; Leong ve ark., 2016; Ferrando-Martinez ve ark., 2018).

Mevcut çalışmalar, antikor baskılayıcı CD8⁺ T hücre fonksiyonu için CXCR5'in ekspresyonunu ve rolünü araştırmak üzere tasarlanmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki CXCR5, in vivo CD8⁺ T hücresi alloantikor baskılayıcı işlevi için kritik derecede önemlidir. CXCR5⁺ IFN- γ ⁺ CD8⁺ T hücresi alt kümesinin, bir murin transplant modelinde transplantasyon sonrası alloantikor üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği bildirildi. Bu bulgular, çalışmayı yapan grubun mevcut çalışmayı, böbrek transplantasyonundan sonra de novo DSA gelişimi ile aynı fenotipe sahip insan CD8⁺ T hücrelerinin ilişkisini araştırmaya sevk etti. Böylece antikor baskılayıcı CD8⁺ T hücrelerinin insanlarda bulunabileceğini ve böbrek nakli alıcılarında DSA gelişimini etkileyebileceğini varsaymışlardır. Böbrek nakli alıcılarında periferik kan T-hücresi alt kümelerini prospektif ve seri olarak izleyip, nakil sonrası ilk yıl boyunca de novo DSA gelişimi ile ilişkilendirdiler. Böylece insan periferik CXCR5⁺ IFN- γ ⁺ CD8⁺ T hücrelerinin de novo DSA gelişimi arasındaki zıt yönlü ilişkiyi bildirmişlerdir (Zimmerer ve ark., 2020). Bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızda da yeni tanımlanan CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T foliküler sitotoksik hücrelerin antikor üretimine yardımcı olma özelliğinden faydalananarak de novo DSA oluşumu ile ilişkili olabileceğini düşündük.

Böbrek naklinden 1 yıl sonra de novo DSA ya sahip alıcılar ile de novo DSA gelişmeyen alıcıların ve sağlıklı bireylerin periferal mononükleer hücrelerindeki CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T ekspresyon yüzdeleri karşılaştırdık. CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T eksprese eden hücre yüzdeleri bakımından transplant kontrol grubu ile hasta grubu arasında farklılık gözlemlenmiştir. CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda transplant kontrol grubuna kıyasla istatistiksel bakımdan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0.001). Transplant kontrol grubunda CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ eksprese eden T hücre yüzdeleri sağlıklı kontrollere göre daha düşük olup bu farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p=0.001). CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ eksprese eden T hücre yüzdelerinin sağlıklı kontrollere göre hasta grubunda daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Buna göre CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücrelerinin ekspresyon (%) düzeylerinin, hasta grubunda daha yüksek olduğunu tespit ettik. Bu sonucumuzu kıyaslayabileceğimiz literatürde yayın bulunmamaktadır. Bu nedenle sonuçlarımız bu konudaki ilk olma özelliğini göstermektedir. Böbrek nakli sonrası donöre özgü oluşan antikorlara sahip bireylerin dolaşımlarındaki CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücre seviyesi artmaktadır.

Sağlıklı bireylerdeki periferal CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücre yüzdesinin tespit edildiği sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada sağlıklı bireylerden ve değişen hematolojik tümörleri olan hastalardan alınan CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücreleri karşılaştırılmıştır (Hofland ve ark., 2021). Sonuçta sağlıklı bireylerde, insan CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücre yüzdesini 8 sağlıklı bireyde % 0,46 olarak rapor etmişler biz ise 21 sağlıklı bireyde %2,78 oranında bulduk. Bu aradaki farkın çalışmaya dahil edilen birey sayımızın bu çalışmadaki birey sayısından fazla olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Donöre özgü antikor oluşumu gözlenen alıcı grubunda CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T hücre yüzdesinin kontrol grubundan yüksek çıkmasından sonra daha spesifik bir araştırmaya yöneldik. Bu nedenle PRA pozitif olan hasta grubumuzu sadece HLA-Class I + , sadece HLA- Class II + ve hem HLA-Class I hem de Class II + üç grup olarak sınıflandırdık. Hasta grubunun alt tiplerinde CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ eksprese eden T hücre yüzdeleri

kendi aralarında kıyaslandı. Sonuç olarak, HLA-Class II + grubunda CD8⁺CXCR5⁺PD-1⁺ eksprese eden T hücre yüzdesinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az olduğu tespit edildi (p = 0,049). Bilindiği gibi CD4⁺ T hücreler tarafından tanınan ekzojen peptitleri (mikroorganizmaları) HLA-Class II + molekülüne bağlandığından, bu hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu ile immün yanıt gerçekleşir. CD8⁺ T hücreler ise MHC Class I ile immün yanıtı devam ettirirler. HLA-Class II + grubunda bu hücre grubunun diğer gruplardakinden daha düşük gözlenmesi beklenen bir netice oldu. Bu bakımından hücre grubumuzun CD8 ve CXCR5 taşımasının ötesinde immünmodülatör olan PD-1' i de eksprese etmesi ile transplantasyon sonrasında immün yanıtın şekillenmesinde ve düzenlenmesinde rol almış gibi gözükmektedir.

PD-1 inhibitör yolağı, transplant fare modellerinde immün toleransı sağlamada kritik bir öneme sahiptir (Özkaynak ve ark., 2002). Yapılan bir çalışmada periferik tam kan hücrelerindeki PD-1 mRNA seviyelerinin böbrek transplantasyonu sonrası akut rejeksiyonun şiddeti ile allogreftinin sağkalımı üzerinde pozitif olarak etkileyebileceği gösterilmiştir. Böbrek transplantasyonundan sonra akut reddine karşı yeni bir tedavi olarak PD-1 / PDL-1' e müdahale etmenin olası olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada böbrek transplantasyonu sonrası akut rejeksiyonlu 19 denekten, gecikmiş greft fonksiyonu (DGF) olan 20 denekten ve stabil alıcılı 21 denekten tam kan örnekleri toplanıp PD-1'in mRNA sonucuna göre, mRNA düzeylerinin akut rejeksiyon ve hastalık şiddeti ile ilişkisini ortaya koymuşlardır. Periferik kan mononükleer hücresinde akut rejeksiyonlu grupta (4.52 ± 1.1) DGF'li grupta (1.12 ± 0.6) ve normal biyopsi sonuçları olan grupta (0.7 ± 0.4) CT katsayılarını elde etmişler (Wang ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda ise rejeksiyon durumu olmayan hasta grubunun CT kat sayısının 1,03 olarak, transplant kontrol grubunun CT kat sayısının 0,82 ve sağlıklı kontrol grubunun CT kat sayısının ise 1,13 olduğu tespit edilmiştir. *PD-1* ekspresyonu hasta grubunda transplant kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (P = 0.006). Sağlıklı kontrol grubuna göre kıyaslandığında transplant kontrol grubunda *PD-1* ekspresyonunun düşük olduğu tespit edilmiştir (P = 0.001). Hasta grubunda *PD-1* ekspresyonu sağlıklı kontrol grubundan daha azdı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p >0.005). Sonuç olarak

PRA pozitifliği bulunmayan transplant kontrol grubumuzun *PD-1* ekspresyon seviyesi hem hasta grubundan hem de sağlıklı kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur. Hasta grubunun HLA-Class I + , HLA- Class II + ve HLA-Class I ve Class II + alt tiplerinde *PD-1* ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark görülmedi. Ancak HLA- Class II + grupta *PD-1* ekspresyon seviyesi diğer gruplara göre daha düşüktü. HLA-Class I + grupta diğer gruplara göre *PD-1* ekspresyonu daha yüksekti ($p>0,05$). Bu sonuçlarımız ile Wang ve arkadaşlarının bulduğu sonuçlar kıyaslandığında PRA pozitifliğinin greft rejeksiyonuna neden olacağından dolayı, benzer bir şekilde daha yüksek seviyede *PD-1* ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Wang ve ark., 2011). Ancak bu çalışmada böbrek transplantasyonundan sonra akut reddine karşı yeni bir tedavi olarak *PD-1/PD-L1* yolağını hedef göstermelerine rağmen, *PD-L1* mRNA ekspresyonu ile ilgili bir çalışma yapmamışlardır. Bizim çalışmamızda ise sadece *PD-1* ekspresyonunu araştırmadık, gruplarımızın periferik kan mononükleer hücrelerinin *PD-L1* ekspresyon seviyelerini de karşılaştırdık.

PD-L1 ekspresyonu ve böbrek nakli ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada; böbrek allogreft reddi olan hastaların biyopsilerinde *PD-L1* ekspresyonunun transplant öncesi hastalara kıyasla, daha yüksek seviyelerde olduğu bulunmuştur (Starke ve ark., 2010). Üstelik *PD-L1*'in indüksiyonu, akut vasküler rejeksiyon ile önemli ölçüde ilişkili olup, renal epitelyal *PD-1/PD-L1* yolağının alloreaktif T-hücre yanıtları üzerinde inhibitör etki ettiğini göstermişlerdir. Akut allogreft reddi olan hastalarda proksimal tübüler epitel hücreleri üzerinde *PD-L1*'in (0.60–2.83) yüksek ekspresyon göstermesinin, T hücre aracılı hasarı azaltılabileceği yönünde öngörüle bulunmasına neden olmuştur (Starke ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda *PD-L1* ekspresyonu incelendiğinde, sağlıklı kontrol grubunun CT kat sayısının 1,04 olarak, hasta grubunun CT kat sayısının 0,84 ve transplant kontrol grubunun ise CT kat sayısının 0,88 olduğu tespit edilmiştir. *PD-L1* ekspresyonunun sağlıklı kontrol grubunda hasta grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($P = 0.005$). *PD-L1* ekspresyonu bakımından hasta ve transplant kontrol grup arasında fark gözlenmemiş olup, kontrol grubundaki gen ekspresyonu her iki gruptan daha yüksek seviyede ifade edilmiştir. Sonuç olarak *PD-L1* gen ekspresyonu

sağlıklı kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek olup, bu sonucumuz Starke ve arkadaşlarının öngörüsünü destekler biçimdedir (Starke ve ark., 2010).

Hasta grubumuzun alt tiplerinde *PD-L1* ekspresyonu incelendiğinde, HLA-Class I + grubunun CT kat sayısının 0,80 olarak HLA- Class II + grubunun CT kat sayısının 0,69 ve hem HLA-Class I hem de Class II + hasta grubunun CT kat sayısının ise 0,91 olduğu tespit edilmiştir. *PD-L1* ekspresyonu HLA- Class II + grubunda HLA-Class I + grubuna ve HLA-Class I ve Class II + grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu bulunmuştur ($p = 0,029$). Bu sonuçlar literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır bu nedenle özgün değere sahip olduğunu düşünmekteyiz. *PD-L1* ekspresyonun Class II+ grupta düşük olması T hücre aktivasyonuna neden olacağından rejeksiyon bakımından literatürün yanı sıra klinisyenlere de yol göstereceğini inanmaktayız.

DSA'ların ortaya çıkışı ile ilişkili biyolojik olaylar henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Türkiye'de yapılan araştırmalarda böbrek transplantasyonu sonrasında nakil hastalarında DSA ile CXCR5⁺PD1⁺CD8⁺ foliküler sitotoksik T hücreleri düzeylerinin arasındaki ilişki açısından bir çalışma bulunmamaktadır. PD-1/PD-L1 mRNA ifadesinin çeşitli klinik transplantasyon olgularında ve transplant fare modellerinde önemi bildirilmesine rağmen, bildiğimiz kadarıyla böbrek transplantasyonundan sonra donöre özgü antikorlar gelişen alıcıların dolaşımındaki PD-1/PD-L1 mRNA ifadesi arasındaki ilişkiyi bildiren yeterli çalışma bulunmamaktadır. Böbrek transplantasyonu sonrasında nakil hastalarında DSA ile PD-1/PDL-1 mRNA seviyesi ve CXCR5⁺PD1⁺CD8⁺ foliküler sitotoksik T hücre düzeylerinin arasındaki ilişkinin daha önce çalışılmaması çalışmamızın özgünlüğünü göstermektedir. DSA üretiminin artmasına neden olabileceği için; CXCR5⁺PD1⁺CD8⁺ foliküler sitotoksik T hücreleri ve PD-1/PD-L1 mRNA seviyesinin belirlenmesi, bilimsel bir veri kaynağı olarak literatüre katkı sağlayacaktır. DSA gelişen böbrek nakli hastalarında CXCR5⁺PD1⁺CD8⁺ foliküler sitotoksik T hücre düzeylerinin tanımlanması, PD-1/PD-L1 baskılanması veya artırılması gibi çözüm seçenekleri sunabilecektir. Buna bağlı organ sağkalımının sağlanması için yeni tedavi stratejileri geliştirilmesinde yararlı olacaktır. CXCR5⁺PD1⁺CD8⁺ foliküler sitotoksik T hücreleri ve PD-1/PD-L1 mRNA seviyesinin antikor aracılı rejeksiyon riskinin değerlendirilmesinde non-invaziv standart

tanı kriteri olarak kullanılabilirliğinin gösterilmesi için şimdiden adım atmış olduk. Elde edilen tüm bulgular istatistiksel olarak anlamlılık değerlerine göre prognostik çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nefroloji Kliniği'nde Aralık 2018-Kasım 2020 yılları arasında canlı veya kadavra donörden böbrek nakli yapılan kırk iki olgu ve rutin biyokimyasal tetkikleri incelenen sağlıklı yirmi bir olgu olmak üzere toplam 63 olgu ile yapıldı.

Literatür taramalarımıza göre böbrek nakli sonrasında oluşan donöre özgü antikorlar ile CD8+CXCR5+PD-1+ T hücreleri ve *PD-1*, *PD-L1* gen ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki ve etkilerinin birlikte ele alındığı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu konuyu araştıran ilk çalışmadır. Literatürdeki bu boşluğu doldurmak amacıyla planlanan çalışmamızın ana sonuçları aşağıda belirtilen maddeler halinde özetlenebilir:

1. Hasta olguların yaş aralığı 16 ile 67 arasında değişmekte olup medyan yaşı 45,5 idi. Olguların 9'u (%35,7) kadın, 11'i (%28,6) erkek cinsiyettedir.
2. Çalışmaya dahil edilen kontrol olgulardan 22 kişilik tansplant olan ama PRA'sı bulunmayan transplant kontrol grubunun yaş aralığı 27 ile 62 arasında değişmekte olup medyan yaşı 47,3 idi. 8'i (%32,1) kadın, 14'ü (%37,1) erkek cinsiyettedir. Sağlıklı kontrol grubumuzun ise yaş aralığı 26 ile 60 arasında değişmekte olup medyan yaşı 46,1 idi. 9'u (%32,1) kadın, 12'i (%34,3) erkek cinsiyettedir.
3. Hasta grubumuz PRA pozitifliğinin olduğu HLA sınıflarına göre üç gruba ayrılmıştır. PRA pozitifliği %20 ile %100 aralığında olup, HLA-Class I + , HLA- Class II + ve hem HLA-Class I hem de Class II + olarak sınıflandırıldı.
4. Hasta grubunun 4'ü kadavradan 16'ı ise canlı donörden böbrek nakilli olup, transplant kontrol grubumuz ise 5'i kadavradan 17'i ise canlı donörden böbrek nakillidir. Donör tipi bakımından olgularımız uyumlu olarak seçildi.
5. Nakil HLA allel uyumları hasta grubumuzda 2 olgu mismatch,2 olgu full-match, 6 olguda bir haplotip (1A1B1DR) uyumu gözlenmiş olup,10 olguda ise en az bir HLA allel uyumu gözetilerek nakil yapılmıştır. Transplant kontrol grubumuzdaki HLA allel uyumları ise 2 olgu mismatch, 1 olgu full-match, 7 olgu 1A1B1DR,12 olguda ise en az

bir HLA allel uyumu gözetilerek nakil yapılmıştır. Donör tipi ve uyum bakımından hasta grubumuz ve transplant kontrol grubumuz benzer yapıya sahipti. Deney sonuçlarımızı bu özellikler etkilememiştir. Bu özellikler bakımından anlamlı bir fark gözlenebilmesi için daha yüksek sayıda olguya ihtiyaç vardır.

6. Nakil sonrası kullanılan indüksiyon ve idame tedavisinde kullanılan ilaçlar hasta grubumuz ATG(15/20), MMF(16/20), TAC(17/20), Basiliximab (5/20), MYF (1/20) CsA(1/20), tedavisi almaktadır. ATG(9/20), MMF(12/20), TAC(13/20), Basiliximab (10/20), MYF (2/20) CsA(2/20), tedavisi almaktadır. Kullanılan tedavi bakımından hasta ve transplant kontrol grubumuz ortak özelliklere sahipti. Deney sonuçlarımızı bu özellikler etkilememiştir. Bu özellikler bakımından anlamlı bir fark gözlenebilmesi için daha yüksek sayıda olguya ihtiyaç vardır.

7. Gen ifadesi analizi için tüm örneklerin CT değerleri için REST analizi yöntemiyle yaklaşık kat değişimi bulundu. Buna göre hasta grubunun CT kat sayısının 1,03 transplant kontrol grubunun kat sayısının 0,82 sağlıklı kontrol grubunun kat sayısının ise 1,13 olduğu tespit edilmiştir. *PD-1* ekspresyonunun hasta grubunda transplant kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($P = 0.006$).

8. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında transplant kontrol grubunda *PD-1* ekspresyonunun daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($P = 0.001$). Hasta grubunda *PD-1* ekspresyonu sağlıklı kontrol grubundan azdı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.005$).

9. PRA pozitifliği bulunmayan transplant kontrol grubumuzun *PD-1* ekspresyon seviyesi hem hasta grubundan hem de sağlıklı kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur.

10. Hasta grubunun HLA-Class I + , HLA- Class II + ve hem HLA-Class I hem de Class II + alt tiplerinde *PD-1* ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark görülmedi. Ancak HLA- Class II + grupta *PD-1* ekspresyon seviyesi diğer gruplara göre daha düşüktü. HLA-Class I + grupta diğer gruplara göre *PD-1* gen ekspresyonu daha yüksekti ($p > 0,05$).

11. *PD-L1* ekspresyonu incelendiğinde, sağlıklı kontrol grubunun CT kat sayısının 1,04 olarak, hasta grubunun CT kat sayısının 0,84 ve transplant kontrol grubunun ise 0,88 olduğu tespit edilmiştir. *PD-L1* ekspresyonu sağlıklı kontrol grubunda hasta grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur ($P = 0.005$).
12. *PD-L1* ekspresyonu bakımından hasta ve transplant kontrol grup arasında fark gözlenmemiş olup kontrol grubundaki gen ekspresyonu her iki gruptan daha yüksek seviyede ifade edilmiştir.
13. *PD-L1* ekspresyonu incelendiğinde, HLA-Class I + grubunun CT kat sayısının 0,80 olarak, HLA- Class II + grubunun CT kat sayısının 0,69 ve hem HLA-Class I hem de Class II + hasta grubunun CT kat sayısının 0,91 olduğu tespit edilmiştir. *PD-L1* ekspresyonu HLA- Class II + grubunda HLA-Class I + grubuna ve hem HLA-Class I hem de Class II + grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu bulunmuştur ($p = 0,029$).
14. Periferik mononükleer hücreler içindeki $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ T eksprese eden hücreler hasta grubunda % 3,06 olarak, transplant kontrol grubunda %0,052 ve sağlıklı kontrol grubunda %2.78 oranında tespit edilmiştir.
15. $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ T eksprese eden hücre yüzdeleri bakımından transplant kontrol grubu ile hasta grubu arasında farklılık göstermektedir. $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda transplant kontrol grubuna kıyasla istatistiksel bakımdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.001$).
16. Transplant kontrol grubunda $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ eksprese eden T hücre hücre yüzdeleri sağlıklı kontrollere göre daha düşük olup bu farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p=0.001$).
17. $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ eksprese eden T hücre yüzdeleri sağlıklı kontrollere göre hasta grubunda daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Buna göre $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ T hücrelerinin ekspresyon (%) düzeylerinin, hasta grubunda daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.
18. Hasta grubunun HLA-Class I + , HLA- Class II + ve hem HLA-Class I hem de Class II + alt tiplerinde $CD8^+CXCR5^+PD-1^+$ eksprese eden T hücre yüzdeleri bakımından, HLA- Class II + grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede diğer gruplara göre az olduğu tespit edildi ($p = 0,049$).

19. CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda transplant kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur (p=0.001). Benzer bir şekilde transplant kontrol grubuna göre sağlıklı kontrol grubunda da bu hücrelerin ekspresyon yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulundu (p=0.001). Ayrıca CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla yüksek olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (p >0.005).

20. CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ eksprese eden T hücre yüzdeleri hasta grubunun HLA-Class I + ve hem HLA-Class I hem de Class II + alt tipleri ile kıyaslanığında HLA- Class II + grubunda diğer gruplara göre az olduğu tespit edildi ve bu fark anlamlı değildi (p >0.005).

21. Lenfositlerdeki CXCR5⁺ eksprese eden hücre yüzdesi hasta grubunda transplant kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (p=0.019). Aynı şekilde sağlıklı kontrol grubunda transplant kontrol grubuna oranla lenfositlerdeki CXCR5⁺yüzdesi daha yüksek tespit edildi (p=0.001). Ayrıca CXCR5⁺ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla yüksek olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (p >0.005).

22. HLA-Class I + ve hem HLA-Class I hem de Class II + alt tipleri ile kıyaslanığında HLA- Class II + grubunda diğer gruplara göre lenfositlerdeki CXCR5⁺ yüzdesinin daha az olduğu tespit edildi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p >0.005).

23. Hasta grubunda lenfositlerdeki PD-1⁺ eksprese eden hücre yüzdesi transplant kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p=0.001). Sağlıklı kontrol grubunda da transplant kontrol grubuna oranla lenfositlerdeki PD-1⁺ eksprese eden hücre yüzdesi daha yüksek tespit edildi (p=0.001). Lenfositlerdeki PD-1⁺ eksprese eden hücre yüzdeleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (p >0.05).

24. HLA-Class I + ve hem HLA-Class I hem de Class II + alt tiplerine göre HLA- Class II + grubunda lenfositlerdeki PD-1⁺ eksprese eden hücre yüzdesinin daha az olduğu bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi (p >0.005).

25. Gen ekspresyon seviyeleri ile hücre yüzdeleri arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek için korelasyon analizi yapıldı. PD-1'in sadece CD8+CXCR5+PD-1+ T

hücreleri ile pozitif korelasyonu vardır ($\rho= 0.40$, $P= 0.001$). Ancak zayıf bir ilişkinin olduğu korelasyon kat sayısının 0.40 olmasından anlaşılmaktadır (0.70 üzeri güçlü korelasyon olarak kabul edilir). PD-L1'in ise hücre yüzdeleri ile arasında korelasyon bulunmamıştır ($P > 0.01$).

Çalışmamızdaki kısıtlayıcı unsurlarımız; hasta takibindeki uzun süreç gereksiniminin yanı sıra mali olanaksızlıkların olmasıdır. Transplantasyon sonrası uygulanan indüksiyon ve idame tedavisindeki yeni nesil ilaçlar PRA yüzdesini azalttığı için daha fazla hastaya ulaşmamıza engel olmuştur. Fakat elde ettiğimiz sonuçların bu konuda fikir sağlamaya yetebileceğini ve yapılacak sonraki çalışmalara zemin hazırlayacağı kanatını taşımaktayız.

KAYNAKLAR

Akoğlu E, Süleymanlar G. Kronik Böbrek Yetersizliği, Temel İç Hastalıkları. Ankara: Güneş Kitapevi; 1996, p: 769-776.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. seventh edition Elsevier Health Sciences. 2011; 109-38.

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. Elsevier Saunders. Philadelphia;2005, pp. 1-15.

Abramowicz D, Cochat P, Claas FH. European renal best practice guideline on kidney donor and recipient evaluation and perioperative care. Nephrol Dial Transplant. 2015;30: 1790-7.

Adams AA,Larsen CP, Pearson TC, Newell KA. The Role of TNF Receptor and TNF Superfamily Molecules in Organ Transplantation American Journal of Transplantation. 2002;2: 12-18.

Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. Journal of hematology & oncology. 2019;12: 1-13.

Alexander SR, Balfe JW, Harvey E. Peritoneal Dialysis. In: Children The Textbook of Peritoneal Dialysis. R Gokal, KD Nolphs, eds. Kluwer Academic Publishers. Netherlands; 1994, p: 591-637.

Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. Immunopharmacology. 2000;47:85–118.

Altınanahtar A. Dünya’da ve Türkiye’de Organ Tedariki ve Nakli: İktisadi Perspektifler, Sorunlar ve Çözüm Önerileri. Sosyoekonomi 2016;24: 11-30.

Altınören O, Aydın G, Güngör Ö. Böbrek anatomisi. In: Böbrek fizyopatolojisi. Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit Ğ, eds. Reaktif Yayınevi. Türkiye; 2017, p: 1-6.

Anthony RM, Nimmerjahn F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcγRs in vivo. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011;16: 7–14.

Bally AP, Austin JW, Boss JM. Genetic and Epigenetic Regulation of PD-1 Expression. *J Immunol*. 2016;196(6):2431–7.

Basturk B, Kantaroglu B, Kavuzlu M. The most common hla alleles and anti-hla antibodies to know for virtual cross-match. *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2016;14: 53-5.

Benghiat FS, Craciun L, De Wilde V, Dernies T, Kubjak C, Lhomme F, et al. IL-17 production elicited by allo-major histocompatibility complex class II recognition depends on CD25posCD4pos T cells. *Transplantation*. 2008; 85(7): 943-9.

Betjes MG, Meijers RW, de Wit EA, Weimar W, Litjens NH. Terminally differentiated CD8+ Temra cells are associated with the risk for acute kidney allograft rejection. *Transplantation*. 2012;94(1): 63–9.

Bezie S, Anegon I, Guillonneau C. Advances on CD8+ Treg Cells and Their Potential in Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(9): 1467–78.

Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953;172: 603-6.

Bingaman AW, Farber DL. Memory T Cells in Transplantation: Generation, Function, and Potential Role in Rejection. *American Journal of Transplantation*. 2004;4: 846-852.

Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10: 29–37.

Bos IG, Ten Berge IJ, Hack CE. Role of complement in graft rejection after organ transplantation. *Transfusion Medicine Reviews*. 2002;16: 251-64.

Brask S, Hager H, Pallesen G, Porwit A, Biberfeld P, Gerstoft J. Quantification of CD8-positive lymphocytes in lymph node follicles from HIV-infected male homosexuals and controls. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A*. 1987;95: 155–7.

Braud V, Jones EY, McMichael A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol*. 1997;27(5): 1164-9.

Buchholz VR, Graf P, Busch DH. The origin of diversity: studying the evolution of multifaceted CD8⁺ T cell responses. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69: 1585–1595.

Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int*. 2016;89: 209–216.

Calvo-Turrubiarres M, Romano-Moreno S, Garcia-Hernandez M, Chevaile-Ramos JA, Layseca-Espinosa E, Gonzalez-Amaro R, et al. Quantitative analysis of regulatory T cells in kidney graft recipients: a relationship with calcineurin inhibitor level. *Transpl Immunol*. 2009;21(1): 43–9.

Chang SY, Song JH, Guleng B, Cotoner CA, Arihiro S, Zhao Y, et al. Circulatory antigen processing by mucosal dendritic cells controls CD8(+) T cell activation. *Immunity*. 2013;38: 153–165.

Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *The Journal of Immunology*. 2004;173(2): 945-954.

Chen CC, Koenig A, Saison C, Dahdal S, Rigault G, Barba T, et al. CD4⁺ T cell help is mandatory for naive and memory donor-specific antibody responses: impact of therapeutic immunosuppression. *Front Immunol.* 2018;9: 275.

Choo SY. The hla system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal.* 2007;48: 11-23.

Coleman WB, Tsongali G.J. *Molecular Diagnostics: for The Clinical Laboratorian*, Second Edition ed Humana Press; 2006, 485-494.

Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff- Rubin N, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: Diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 2208-2214.

Colombo MB, Haworth SE, Poli F, Nocco A, Puglisi G, Innocente A, et al. Cytometry B Clin Cytom. Luminex Technology for anti-HLA Antibody Screening: Evaluation of Performance and of Impact on Laboratory Routine. 2007;72(6): 465-71.

Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005;5: 807–817.

Comoli P, Cioni M, Tagliamacco A, Quartuccio G, Innocente A, Fontana I, et al. Acquisition of C3d-binding activity by de novo donor-specific HLA antibodies correlates with graft loss in nonsensitized pediatric kidney recipients. *Am J Transplant.* 2016;16: 2106–2116.

Cooper BA, Branley P, Bulfone L, Collins JF, Craig JC, Fraenkelet MB et al. A randomized, controlled trial of early versus late initiation of dialysis. *N Engl J Med.* 2010;363: 609-619.

Cooper JE, Gralla J, Klem P, Chan L, Wiseman AC. High dose intravenous immunoglobulin therapy for donor-specific antibodies in kidney transplant recipients with acute and chronic graft dysfunction. *Transplantation*. 2014;97: 1253–1259.

Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive crossmatch kidney transplant recipients treated with eculizumab: Outcomes beyond 1 year. *Am J Transplant*. 2015; 15: 1293–1302.

Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;335: 2–13.

Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of IL-4 and IL-12 in promoting Type 2 versus Type 1 cytokine profiles. *J Exp Med*. 1994;180: 1715-1728.

Csencsits KL, Bishop DK. Contrasting alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells: there's more to it than MHC restriction. *Am J Transplant*. 2003;3: 107-15.

Danger R, Chesneau M, Delbos F, Le Bot S, Kerleau C, Chenouard A, et al. CXCR5 + PD1 + ICOS + Circulating T Follicular Helpers Are Associated With de novo Donor-Specific Antibodies After Renal Transplantation. *Front Immunol*. 2019;10: 2071.

Danovitch GM. Böbrek Nakli El Kitabı Çeviren: Karpuzoğlu T. 9. basım, Günes Kitapevi Ltd. Şti., Ankara; 2003, s: 1-16.

del Rio ML, Buhler L, Gibbons C, Tian J, Rodriguez Barbosa JI. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other coinhibitory signaling pathways in transplantation. *Transpl Int*. 2008;21: 1015-28.

Demmers MW, Baan CC, Janssen M, Litjens NH, Ijzermans JN, Betjes MG, et al. Substantial proliferation of human renal tubular epithelial cell-reactive CD4⁺CD28null

memory T cells, which is resistant to tacrolimus and everolimus. *Transplantation*. 2014;97(1): 47–55.

Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*. 1997; 276:589.

Devos JM, Gaber AO, Teeter LD, Edward AG, Samir JP, Geoffrey AL, et al. Intermediate-term graft loss after renal transplantation is associated with both donor-specific antibody and acute rejection. *Transplantation*. 2014;97(5): 534–540.

DeWolf S, Sykes M. Alloimmune T Cells in Transplantation. *Journal of Clinical Investigation*. 2017;127: 2473-2481.

Dinavahi R, George A, Tretin A, Akalin E, Ames S, Bromberg JS, et al. Antibodies reactive to non-HLA antigens in transplant glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22: 1168–1178.

Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: Current status and novel approaches. *Am J Transplant*. 2014;14: 255–271.

Dotiwala F, Mulik S, Polodoro RB, Ansara JA, Burleiqh BA, Walch M, et al. Killer lymphocytes use granulicin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat Med*. 2016;22: 210–6.

Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005;352: 558–569.

Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting Traditional Risk Factors for Rejection and Graft Loss After Kidney Transplantation. *Am J Transplant*. 2011;10: 2132-43.

Ekinci NS, Darbaş Ş, Uçar F. CXCR5⁺CD8⁺ Follicular Cytotoxic T Cell Biology and Its Relationship with Diseases. *Turk J Immunol.* 2022; 10(2): 48-55.

El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, Saji H, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol.* 2009;70: 844–853.

Eng HS, Bennett G, Bardy P, Coghlan P, Graeme R, Russ P, et al. Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Human Immunology.* 2009;70: 595–599.

Erard F, Wild M, Garcia-Sanz JA, Le Gros G. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8–CD4– cells that make Th2 cytokines and help B cells. *Science.* 1993;260: 1802-1805.

Escors D, Gato-Canas M, Zuazo M, Arasanz H, Garcia-Granda M. J, Vera R, et al. The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduct. Target Ther.* 2018;3: 26.

Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation.* 2013;95: 410–417.

Fan L, Benson HL, Vittal R, Mickler EA, Presson R, Fisher AJ, et al. Neutralizing IL-17 prevents obliterative bronchiolitis in murine orthotopic lung transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11(5): 911-22.

Fehr T, Rüsi B, Fischer A, Hopfer H, Wüthrich RP, Gaspert A. Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplantation.* 2009;87: 1837–1841.

Ferrando-Martinez S, Moysi E, Pegu A, Andrews S, Makamdop KN, Ambrozak D, et al. Accumulation of follicular CD8⁺ T cells in pathogenic SIV infection. *J. Clin. Invest.* 2018;128: 2089–2103.

Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania TH, sieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1-and Th2-stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells in vivo. *Nature.* 1995;373: 255-257.

Filippone EJ, Farber JL. Humoral immune response and allograft function in kidney transplantation. *Am J Kidney Dis.* 2015;66: 337–347.

Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32: 112-9.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel b7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 2000;192: 1027–1034.

Freitas MC, Rebellato LM, Ozawa M, Nguyen A, Sasaki N, Everly M, et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation.* 2013;95: 1113–1119.

Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, Park H, Matsuda K, Bae JY, et al. B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controller, *Nat. Med.* 2015;21: 132–139.

Fukuda T, Miki T, Yoshida T, Hatano M, Ohashi K, Hirose S, et al. The murine BCL6 gene is induced in activated lymphocytes as an immediate early gene. *Oncogene.* 1995;11: 1657–63.

Gato-Canas M, Zuazo M, Arasanz H, Ibanez-Vea M, Lorenzo L, Fernandez-Hinojal G, et al. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep.* 2017;20: 1818–1829.

Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*. 2012;12: 671–684.

Gauen LK, Gauen Y, Zhu F, Letourneur QH, Bolen J, Matis LA, et al. Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif *Mol. Cell. Biol.* 1994;14: 3729-3741.

Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Virol*. 2009;83: 9122–30.

Goldman M, Le Moine A, Braun M, Flamand V, Abramowicz D, et al. A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends Immunol*. 2001;22(5): 247-51.

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

Gong D, Malek TR. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J Immunol*. 2007;178: 242–52.

Gorbacheva V, Fan R, Li X, Valujskikh A. Interleukin-17 promotes early allograft inflammation. *Am J Pathol*. 2010;177(3): 1265-73.

Gorer PA. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br. J. Exp. Pathol*. 1936;17: 42–50.

Gravano DM, Hoyer KK. Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8⁺ T cells. *J Autoimmun*. 2013;45: 68–79.

Gri SM, Kaech SM, Staron MM. The interface between transcriptional and epigenetic control of effector and memory CD8⁺ T-cell differentiation. *Immunol Rev*. 2014;261: 157–68.

Guichard-Romer A, Marino-Vazquez LA, Castelán N, López M, González-Tableros N, Arvizu A, et al. Impact of Pretransplant Exposure to Allosensitization Factors Generating HLA Antibodies in the Luminex Era. *Transpl Immunol*. 2016;38: 33-9.

Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thaumat O, Dubois V, et al. Non-complement-binding de novo donorspecific anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(2): 615–625.

Haarberg KM, Tambur AR. Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Br Med Bull*. 2014;110: 23–34.

Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff meeting report writing committee: Banff 2013 meeting report: Inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014;14: 272–283.

Hagerty DT, Allen PM. Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. *J Immunol* 1992;148: 2324-30.

Halloran PF, Reeve JP, Pereira AB, Hidalgo LG, Famulski KS. Antibody-mediated rejection, T cell-mediated rejection, and the injury-repair response: New insights from the Genome Canada studies of kidney transplant biopsies. *Kidney Int*. 2014;85: 258–264.

Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class 1 antibody response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation*. 1992;53: 550-555.

Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, Kai K, et al. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol*. 2009;182: 3469–3481.

Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Hum Mutat*. 2000;15: 57–61.

Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, et al. OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant*. 2017;17: 21-116.

Hata Y, Cecka JM, Takemoto S, Ozawa M, Cho YW, Terasaki PI. Effects of changes in the criteria for nationally shared kidney transplants for HLA-matched patients. *Transplantation*. 1998;65: 208-212.

Hayday A.C. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection *Annu. Rev. Immunol*. 2000;18: 975-1026.

He R, Hou S, Liu C, Zhang A, Bai Q, Han M, et al. Follicular CXCR5-expressing CD8⁺ T cells curtail chronic viral infection. *Nature*. 2016;537: 412–28.

Heilman RL, Nijim A, Desmarteau YM, Khamash H, Pando MJ, Smith ML, et al. De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation. *Transplantation*. 2014;98(12): 1310–1315.

Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Ochoa FS, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells. *J Immunol*. 2004;15: 4828-37.

Hester J, Mills N, Shankar S, Carvalho-Gaspar M, Friend P, Wood KJ. Th17 cells in alemtuzumab-treated patients: the effect of long-term maintenance immunosuppressive therapy. *Transplantation*. 2011; 91(7): 744-50.

Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: Evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2010;10: 1812–1822.

Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global prevalence of chronic kidney disease-A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(7): e0158765.

Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, Sebastian D, Alessandrini A, Madsen JC, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant*. 2012;12: 313–321.

Hofland T, Martens AWJ, van Bruggen JAC, de Boer R, Schetters S, Remmerswaal EBM, et al. Human CXCR5 + PD-1 + CD8 T cells in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Eur J Immunol*. 2021;51(3): 703-713.

Hong JJ, Amancha PK, Rogers K, Ansari AA, Villinger F. Spatial alterations between CD4(+) T follicular helper, B, and CD8(+) T cells during simian immunodeficiency virus infection: T/B cell homeostasis, activation, and potential mechanism for viral escape. *J Immunol*. 2012;188: 3247–3256.

Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, et al. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol*. 2009;39: 1716–1725.

Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences With Renal Homotransplantation in the Human: Report of Nine Cases. *J Clin Invest*. 1955;34: 327-82.

Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature*. 2016;537: 417–21.

Ingelfinger JR. Agonistic autoantibodies and rejection of renal allografts. *The New England Journal of Medicine*. 2005;352: 617-9.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11: 3887-3895.

Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake, Marquardt H, et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-

E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J. Immunol.* 2003;171: 1376–1384.

Jaboulay M. Greffe de reins au pli du coude par soudures artérielles et veineuses. *Lyon Med* 1906;107: 575–577.

Jackson M, Zachary A. The problem of transplanting the sensitized patient: whose problem is it? *Front Biosci.* 2008;13: 1396-412.

Jiang H, Canfield SM, Gallagher MP, Jiang HH, Jiang Y, Zheng Z, et al. HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 2010;120: 3641–3650.

Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:550–7.

Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science.* 2009;325: 1006–10.

Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2012;12: 749–761.

Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology.* 2015;479: 180–93.

Kallies A, Xin A, Belz GT, Nutt SL. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity.* 2009;31: 283–95.

Kang YM, Zhang X, Wagner UG, Yang H, Beckenbaugh RD, Kurtin PJ, et al. CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Exp Med.* 2002;195: 1325–36.

Kao KJ, Scornik JC, Small SJ. Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies—an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation*. 1993;55: 192–196.

Khovanova N, Daga S, Shaikhina T, Krishnan N, Jones J, Zehnder D, et al. Subclass analysis of donor HLA-specific IgG in antibody-incompatible renal transplantation reveals a significant association of IgG4 with rejection and graft failure. *Transpl Int*. 2015;28: 1405–1415.

Kikić Ž, Kainz A, Kozakowski N, Oberbauer R, Regele H, Bond G, et al. Capillary C4d and kidney allograft outcome in relation to morphologic lesions suggestive of antibody-mediated rejection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10: 1435–1443.

Kim HJ, Cantor H. Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8(+) regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2011;23: 446–452.

Klein J, Sato A. The hla system. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2000;343: 702-9.

Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol*. 2005;6: 873–879.

Knight RJ, Burrows L, Bodian C. The Influence of Acute Rejection on Long-Term Renal Allograft Survival: A Comparison of Living and Cadaveric Donor Transplantation. *Transplantation*. 2001;72: 69-76.

Kocak T, Nane I, Ander, Ziylan O, Oktar T, Özsoy C. Urological and surgical complications in 362 consecutive living related donor kidney transplantations. *Urologia Internationalis*. 2004;72: 252-6.

Konvalinka A, Tinckam K. Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26: 1489-502.

Kosmoliaptsis V, Sharples LD, Chaudhry AN, Halsall DJ, Bradley JA, Taylor CJ. Predicting HLA class II alloantigen immunogenicity from the number and physiochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation*. 2011;91: 183–190.

Krajewska M, Koscielska-Kasprzak K, Kaminska D, Zabinska M, Myszk-Kozłowska M, Gomulkiewicz A, et al. Kidney Transplant Outcome Is Associated with Regulatory T Cell Population and Gene Expression Early after Transplantation. *J Immunol Res*. 2019;2019: 7452019.

Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, Riha M, Gelman AE, Popma SH, et al. Mouse vascular endothelium activates CD8⁺ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol*. 2002;169: 6154-61.

Kuang DM, Peng C, Zhao Q, Wu Y, Zhu LY, Wang J, et al. Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8⁺ T cells in hepatocellular carcinoma patients. *J Immunol*. 2010;185: 1544–1549.

Kulkarni S, Kirkiles-Smith NC, Deng YH, Formica RN, Moeckel G, Broecker V, et al. Eculizumab therapy for chronic antibody-mediated injury in kidney transplant recipients: A pilot randomized controlled trial. *Am J Transplant*. 2017;17: 682–691.

Kumbala D, Zhang R. Essential concept of transplant immunology for clinical practice. *World J Transplant*. 2013;3: 113–118.

La Muraglia II GM, Wagener ME, Ford ML, Badell IR. Circulating T follicular helper cells are a biomarker of humoral alloreactivity and predict donor-specific antibody formation after transplantation. *Am J Transplant*. 2020;20(1): 75-87.

Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol*. 2008;20: 207-212.

Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes [German]. *Wien Klin. Wochenschr*. 1901;14: 1132–1134.

Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med*. 1990;171: 307-14

Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways", *Nature*. 1996; 381(6581): 434–438.

Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert E, et al. "Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties" , *Am J Transplant*. 2005;5: 443–453.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol*. 2001;2: 261–268.

Lawrence C, Willicombe M, Brookes PA, Santos-Nunez E, Bajaj R, Cook T, et al. Preformed complement-activating low-level donor-specific antibody predicts early antibody-mediated rejection in renal allografts. *Transplantation*. 2013;95: 341–346.

Lee PC, Zhu L, Terasaki PI, Everly MJ. HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss. *Transplantation*. 2009; 88: 568–574.

Lee RS, Grusby MJ, Glimcher LH, Winn HJ, Auchincloss JH. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med*. 1994;179: 865–872.

Leemans JC, Kors L, Anders HJ, Florquin S. Pattern recognition receptors and the inflammasome in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10: 398–414.

Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27: 293–304.

Leffell MS, Zachary AA. The national impact of the 1995 changes to the UNOS renal allocation system. United Network for Organ Sharing. *Clin Transplant*. 1999;13: 287-295.

Lenschow DJ, Zengj Y, Thistlethwaite R, Montag A, Brady W, et al. Long-Term Survival of Xenogeneic Pancreatic Islet Grafts Induced by CTLA4lg. *Science*. 1992;257: 789-792.

Leong YA, Chen Y, Ong HS, Wu D, Man K, Deleage C, et al. CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. *Nat Immunol*. 2016;17: 1187–96.

Levin A, Stevens PE, Bilous RW, Coresh J, De Francisco ALM, De Jong PE, et al. Kdigo 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements*. 2013;3: 1-150.

Li XC, Rothstein DM, Sayegh MH. Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. *Immunol Rev*. 2009;229: 271-93.

Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, Waiser J, Lachmann N, Schönemann C, et al. Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12(5):1192–1198.

Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, Reed EF, Fisher PE, Mancini D, et al. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest*. 1996;98: 1150.

Liu Z, Fan H, Jiang S. CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunol Rev*. 2013;252: 183-91.

Lin A, Yan WH. The Emerging Roles of Human Leukocyte Antigen-F in Immune Modulation and Viral Infection. *Front. Immunol*. 2019; doi.org/10.3389/fimmu.2019.00964.

Lopes D, Barra T, Malheiro J, Tafulo S, Martins L, Almeida M. et al. Effect of different sensitization events on HLA alloimmunization in kidney transplantation candidates. *Transplantation proceedings*. 2015;47(4): 894-897.

Lorenz M, Regele H, Schillinger M, Kletzmayer J, Haidbauer B, Derfler K, et al. Peritransplant immunoadsorption: A strategy enabling transplantation in highly sensitized crossmatch-positive cadaveric kidney allograft recipients. *Transplantation*. 2005;79: 696–701.

Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, et al. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8⁺ T cells. *Nat Med*. 2010;16: 713–717.

Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 2013;369: 1215–1226.

Loupy A, Vernerey D, Viglietti D, Aubert O, Duong Van Huyen JP, Empana JP, et al. Determinants and outcomes of accelerated arteriosclerosis: Major impact of circulating antibodies. *Circ Res*. 2015;117: 470–482.

Lu Y, Hong B, Li H, Zheng Y, Zhang M, Wang S, et al. Tumor-specific IL-9-producing CD8⁺ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111: 2265–2270.

Lúcia M, Luque S, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Martorell J, et al. Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int*. 2015;88: 874–887.

Luke PP, Scantlebury VP, Jordan ML, Vivas CA, Hakala TR, Jain A, et al. Reversal of steroid- and anti-lymphocyte antibody-resistant rejection using intravenous immunoglobulin (IVIG) in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2001;72: 419–422.

Ma J, Patel A, Tinckam K. Donor-specific antibody monitoring: Where is the beef? *Adv Chronic Kidney Dis.* 2016;23: 317–325.

Machulla HK, Batnasan D, Steinborn F, Uyar FA, Saruhan Direskeneli G, Oguz FS, et al. Genetic affinities among Mongol ethnic groups and their relationship to Turks. *Tissue Antigens* 2003;61(4): 292-9.

Madden DR. The three dimensional structure of peptide MHC complexes. *Ann Rev Immunol.* 1995;13: 587-622.

Mak TW, Saunders ME. *The Major Histocompatibility Complex.* Elsevier Oxford UK; 2008, p101-113.

Mancebo E, Castro MJ, Allende LM, Talayero P, Brunet M, Millan O, et al. High proportion of CD95(+) and CD38(+) in cultured CD8(+) T cells predicts acute rejection and infection, respectively, in kidney recipients. *Transpl Immunol.* 2016;34: 33–41.

Mateu LMP, Calabuig AS, Plaza LC, Esteve AF. Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;3: 38-42.

Matsue H, Yang C, Matsue K, Edelbaum D, Mummert M, Takashima A. Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation. *J Immunol.* 2002;169: 3555–64.

McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation.* 2000;69(3): 319-26.

McMahon GM, Waikar SS. Biomarkers in nephrology: Core curriculum 2013. *Am J Kidney Dis.* 2013;62: 165-78.

McPherson RA, Pincus MR, Henry JB. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* (Eds.), 21nd Edition. Saunders Elsevier; 2007, 750-790.

Millán RS JC, López-Hoyos M, Segundo DS, Quintela E, Rodrigo E, Gómez-Alamillo C, et al. Predictive factors of allosensitization in renal transplant patients switched from calcineurin to mTOR inhibitors. *Transpl Int*. 2014;27(8): 847–856.

Mittrucker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Arch Immunol Ther Exp*. 2014;62: 449–58.

Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant*. 2005;5(11): 2611-8.

Montgomery RA, Tatapudi VS, Leffell MS, Zachary AA. HLA in transplantation. *Nature reviews Nephrology*. 2018;14: 558-70.

Moreso F, Serón D, Carrera M, Gil-Vernet S, Cruzado JM, Hueso M, et al. Baseline immunosuppression is associated with histological findings in early protocol biopsy; Transplantation. 2004;78: 1064-8. 34.

Morris A, Hewitt C, Young S. The major histocompatibility complex: its genes and their roles in antigen presentation. *Mol Aspects Med*. 1994;15: 377-503.

Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, Belger MA, Briggs JD. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet*. 1999; 354: 1147-152.

Mosaad YM. Clinical Role of Human Leukocyte in Health and Diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2015;82(4): 283-306.

Mota A, Figueiredo A, Cunha MF, Bastos M, Pratas J, Furtado L. Risk factors for acute rejection in 806 cyclosporine-treated renal transplants: a multivariate analysis. *Transplant Proc*. 2003;35: 1061-3

Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 negative T cells: is their loss our gain? *Am J Transplant*. 2014;14(11): 2460–6.

Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.* 2013;31: 137–161.

Murray JE, Tilney NL, Wilson RE. Renal transplantation: A twenty-five year experience. *Annals of surgery.* 1976;184: 565-73.

Mylvaganam GH, Rios D, Abdelaal HM, Iyer S, Tharp G, Mavinger M, et al. Dynamics of SIV-specific CXCR5⁺ CD8 T cells during chronic SIV infection. *Proc Natl Acad Sci .* 2017; 10.1073.

Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med* 2010;7: 1451-62.

Naqvi SB, Collins AJ. Infectious complications in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2006;13: 199-204.

Nelson PW, Helling TS, Shield CF, Beck M, Bryan CF. Current Experience With Renal Transplantation Across the ABO Barrier. *Am J Surg.* 1992;164(5): 541-4.

Nocera A, Tagliamacco A, De Palma R, Del Galdo F, Ferrante A, Fontana I, et al. Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts. *Clin Transplant.* 2004;18(5): 564-70.

Ntokou IS, Iniotaki AG, Kontou EN, Darema MN, Apostolaki MD, Kostakis AG, et al. Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: high immunogenicity of HLA class II graft molecules. *Transpl Int.* 2011;24(11): 1084–1093.

Oğuz FS. Transplantasyon Nefrolojisi Pratik Uygulama Önerileri. Editör: Türkmen A. 1. Baskı. Buluş Tasarım ve Matbaacılık Hizmetleri San Tic. Ankara;2016, p.27-35.

Øien CM, Reisaeter AV, Leivestad T, Dekker WF, Line PD, Os I. Living donor kidney transplantation: the effects of donor age and gender on short- and long-term outcomes. *Transplantation.* 2007;15: 600-6.

Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol*. 2007;19: 813–824.

Olerup O, Zetterquist H. 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*. 1992;39: 225-235.

O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13: 453–60.

Opelz G, Döhler B. Collaborative Transplant Study Report: Influence of time of rejection on long-term graft survival in renal transplantation. *Transplantation*. 2008;85: 661–666.

Orandi BJ, Zachary AA, Dagher NN, Bagnasco SM, Garonzik-Wang JM, Van Arendonk KJ, et al. Eculizumab and splenectomy as salvage therapy for severe antibody-mediated rejection after HLA-incompatible kidney transplantation. *Transplantation*. 2014;98: 857–863.

Orandi BJ, Alachkar N, Kraus ES, Naqvi F, Lonze BE, Lees L, et al. Presentation and outcomes of C4d-negative antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16: 213–220.

Özkaynak E, Wang L, Goodearl A, McDonald K, Qin S, O'Keefe T, et al. Programmed Death-1 Targeting Can Promote Allograft Survival", *J Immunol*. 2002;169: 6546-6553.

Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280: 735–9.

Pearl MH, Nayak AB, Ettenger RB, Puliyanda D, Palma Diaz MF, Zhang Q, et al. Bortezomib may stabilize pediatric renal transplant recipients with antibody-mediated rejection. *Pediatr Nephrol*. 2016;31: 1341–1348.

Philogene MC, Sikorski P, Montgomery RA, Leffell MS, Zachary AA. Differential effect of bortezomib on HLA class I and class II antibody. *Transplantation*. 2014;98: 660–665.

Picascia A, Infante T, Napoli C. Luminex and Antibody Detection in Kidney Transplantation. *Clin Exp Nephrol*. 2012;16(3): 373-81.

Piotti G, Palmisano A, Maggiore U, Buzio C. Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Frontiers in Immunology*. 2014;5: 505.

Pippias M, Kramer A, Noordzij M. The european renal association - european dialysis and transplant association registry annual report 2014: A summary. *Clin Kidney J*. 2017;10: 154-69.

Pirim I, Soyoz M, Ayna TK, Kocyigit AO, Gurbuz BC, Tugmen C, et al. De novo produced anti-human leukocyte antigen antibodies relation to alloimmunity in patients with chronic renal failure. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2015;19: 335-338.

Posselt AM, Vincenti F, Bedolli M, Lantz M, Roberts JP, Hirose R. CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003;76(1): 190–5.

Pratschke J, Dragun D, Hauser, IA, Horn S, Mueller TF, Schemmer P, et al. Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. *Transplantation Reviews*. 2016;30: 77-84.

Quigley MF, Gonzalez VD, Granath A, Andersson J, Sandberg JK. CXCR5+ CCR7- CD8 T cells are early effector memory cells that infiltrate tonsil B cell follicles. *Eur J Immunol*. 2007;37: 3352–62.

Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13: 28-36.

Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;74: 5–17.

Regele H, Böhmig GA, Habicht A, Gollowitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S, et al. Capillary Deposition of Complement Split Product C4d in Renal Allografts is Associated with Basement Membrane Injury in Peritubular and Glomerular Capillaries: A Contribution of Humoral Immunity to Chronic Allograft Rejection. *JASN*. 2002;13: 2371-2380.

Restifo NP, Gattinoni L. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2013;25: 556–563.

Roberts SC. Complexity and context of mhc-correlated mating preferences in wild populations. *Molecular ecology*. 2009;18: 3121-3.

Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, Reddan DN, Tuttle-Newhall J, Collins BH, et al. Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation*. 2003;75: 1490–1495.

Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3: 1-24.

Rosner MH, Bolton WK. Renal function testing. *Am J Kidney Dis*. 2006;47: 174-83.

Rowshani AT, Scholten EM, Bemelman F, Eikmans M, Idu M, Roos-van Groningen MC. No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17: 305-12.

Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *Journal of cellular physiology* 2019;234: 16824-16837.

Salmaninejad A, Khoramshahi V, Azani A, Soltaninejad E, Aslani S, Zamani MR, et al. PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*. 2018;70: 73–86.

Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later-progress, Challenges and promises. *N Engl J Med*. 2004;351(26): 2761-2766.

Sayın Ekinci N, Darbaş Ş, Uçar F. CXCR5+CD8+ Follicular Cytotoxic T Cell Biology and Its Relationship with Diseases. *Turkish Journal Of Immunology*.2022; 10 (2), 48-55.

Scott DM, Ehrmann IE, Ellis PS, Chandler PR, Simpson E. Why do some females reject males? The molecular basis for male-specific graft rejection. *J Mol Med*. 1997;75: 103–114.

Seliger B. Basis of PD1/PD-L1 Therapies. *J Clin Med*. 2019;8: 2168–82.

Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12: 388–399.

Seyhun Y, Ozdilli, K, Oguz F, Karahan G, Onal E, Turkmen A, et al. Evaluation of anti-HLA and MICA antibodies after kidney transplantation. 22nd EFI Conference, Toulouse, France. *Tissue Antigens*. 2008;71: 293.

Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002;17: 51–62.

Shankarkumar U. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. *International Journal of Human Genetics*. 2004;4: 91–103.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7–CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2: 116-126.

Sheldon S, Poulton, K. Transplantation Immunology: Methods and Protocols, Humana Press Inc; 2006, 157-174.

Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. Pd-1 inhibits t-cell receptor induced phosphorylation of the zap70/cd3zeta signalosome and downstream signaling to pcktheta. FEBS letters. 2004;574: 37-41.

Shiina T, Inoko H, Kulski J K. An Update of the HLA Genomic Region, Locus Information and Disease Associations. Tissue Antigens. 2004;64(6): 631-49.

Shim YJ, Khedraki R, Dhar J, Fan R, Dvorina N, Valujskikh A, et al. Early T cell infiltration is modulated by programmed cell death-1 protein and its ligand (PD-1/PD-L1) interactions in murine kidney transplants. Kidney Int. 2020;98: 897-905.

Shimizu A, Colvin RB. Pathological features of antibody-mediated rejection. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord. 2005;5(3): 199-214.

Shrestha A, Shrestha AN, Basarab-Horwath C, McKane W, Shrestha B, Raftery A. Quality of life following live donor renal transplantation: A single centre experience. Annals of transplantation. 2010;15: 5-10.

Shrestha BM. Immunology for Renal Transplantation: A Review. J Transplant Technol Res. 2014;4: 130.

Shrikant PA, Rao R, Li Q, Kesterson J, Eppolito C, Mischo A, et al. Regulating functional cell fates in CD8 T cells. Immunol Res. 2010;46: 12–22.

Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, Couzi L, McGregor B, Badet L, et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. J Am Soc Nephrol. 2015;26: 457–467.

Sivaganesh S, Simon JH, Thomas MC, Chris JC, Kourosh SP, Margaret CN, et al.. Copresentation of intact and processed MHC alloantigen by recipient dendritic cells

enables delivery of linked help to alloreactive CD8 T cells by indirect-pathway CD4 T cells. *J Immunol.* 2013;190: 5829–5838.

Smart NA, Dieberg G, Ladhani M, Titus T. Early referral to specialist nephrology services for preventing the progression to end-stage kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;6: CD007333.

Smith RN, Malik F, Goes N, Farris AB, Zorn E, Saidman S, et al. Partial therapeutic response to Rituximab for the treatment of chronic alloantibody mediated rejection of kidney allografts. *Transpl Immunol.* 2012;27: 107–113.

Smith TR, Kumar V. Revival of CD8⁺ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol.* 2008;29: 337–342.

Snell G. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. *J. Pathol. Bacteriol.* 1937;44: 691–699.

Song MK, Park BB, Uhm J. Understanding immune evasion and therapeutic targeting associated with PD-1/PD-L1 pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *International journal of molecular sciences.* 2019;20(6): 1326.

Starke A, Lindenmeyer MT, Segerer S, Neusser MA, Rüsi B, Schmid DM. Renal tubular PD-L1 (CD274) suppresses alloreactive human T-cell responses. *Kidney Int.* 2010 Jul;78(1):38-47.

Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, et al. Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2011;11: 2405–2413.

Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nature Reviews Nephrology.* 2012;8: 670-8.

Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol.* 2001;166: 973–981.

Sumida K, Kovesdy CP. Disease trajectories before esrd: Implications for clinical management. *Semin Nephrol.* 2017;37: 132-43.

Sun Q, Cheng Z, Cheng D, Chen J, Ji S, Wen J, et al. De novo development of circulating anti-endothelial cell antibodies rather than pre-existing antibodies is associated with post-transplant allograft rejection. *Kidney Int.* 2011;79: 655–662.

Süleymanlar G, Utaş C, Arinsoy T, Ateş K, Altun B, Altıparmak MR, et al. A population-based survey of Chronic RENal Disease. In: Turkey—the CREDIT study. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2011;26(6): 1862-1871.

Süleymanlar G, Altıparmak MR, Seyahi N, Trabulus S. Türkiye’de diyaliz ve transplantasyon registry 2012. Ankara: Türk Nefroloji Derneği Yayınları; 2013, 743-800.

Süleymanlar G, Ateş K, Seyahi N. Türkiye’de Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon – Registry 2018. Türk Nefroloji Derneği Yayınları, Ankara; 2019: 1-136.

Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdsworth R, Bennett G, et al. Luminex Technology for HLA Antibody Detection in Organ Transplantation. *Nephrology (Carlton).* 2009;14: 247-54.

Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J, et al. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J transplant.* 2004;4: 1033-1041.

Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing antibody strength: Comparison of MFI, C1q, and titer information. *Am J Transplant.* 2015;15: 2421–2430.

Tang Y, Guan SP, Chua BY, Zhou Q, Ho AWS, Wong KHS, et al. Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN-gamma and dendritic cell function. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129: 1611–1620.

Taylor CJ, Smith SI, Morgan CH. Selective omission of the donor crossmatch before renal transplantation: efficacy, safety and effects on cold storage time. *Transplantation*. 2000;69: 719-723.

Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(5): 541-5.

Testi M, Andreani M. Luminex-Based Methods in High-Resolution HLA Typing. *Methods Mol Biol*. 2015;1310: 231-45.

Thaunat O, Koenig A, Leibler C, Grimbert P. Effect of immunosuppressive drugs on humoral allosensitization after kidney transplant. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27: 1890–1900.

Tinckam K. Histocompatibility methods. *Transplantation reviews*. 2009;23: 80-93.

Toccanier MF, Kapanci Y. Lymphadenopathy in drug addicts. A study of the distribution of T lymphocyte subsets in the lymph nodes. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1985;406: 149–63.

Trowsdale J. The mhc, disease and selection. *Immunology letters*. 2011;137: 1-8.

Troxell ML, Weintraub LA, Higgins JP, Kambham N. Comparison of C4d immunostaining methods in renal allograft biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1: 583–591.

Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solz K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. *Transplantation*. 1996;61: 1586–1592.

Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* 2001;193: 839–846.

Tuot DS, Plantinga LC, Hsu C, Jordan R, Burrows NR, Hedgeman E, et al. Chronic kidney disease awareness among individuals with clinical markers of kidney dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6: 1838-1844.

Ullman E. TISSUE AND ORGAN TRANSPLANTATION. *Ann Surg.* 1914; 60: 195-219.

Umber A, Killackey M, Paramesh A, Liu Y, Qin H, Atiq M, et al. A comparison of three induction therapies on patients with delayed graft function after kidney transplantation. *J Nephrol.* 2017;30: 289–295.

Unger E.Über Nierentransplantationen. *Berl Klin Wschr.* 1909;46: 1057–1060.

Uyar FA, Dorak MT, Saruhan-Direskeneli G. Human leukocyte antigen-A, -B and -C alleles and human leukocyte antigen haplotypes in Turkey: Relationship to other populations. *Tissue Antigens.* 2004;64: 180-7.

Valenzuela NM, Reed EF. Antibodies in transplantation: The effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. *Methods Mol Biol.* 2013;1034: 41–70.

Van den Elsen PJ. Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. *Front Immunol.* 2011;2: 48.

van Zelm MC. B cells take their time: Sequential IgG class switching over the course of an immune response? *Immunol Cell Biol.* 2014;92: 645–646.

Vasanwala FH, Kusam S, Toney LM, Dent AL. Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene. *J Immunol.* 2002;169: 1922–9.

Viglietti D, Gosset C, Loupy A, Deville L, Verine J, Zeevi A, et al. C1 Inhibitor in acute antibody-mediated rejection nonresponsive to conventional therapy in kidney transplant recipients: A pilot study. *Am J Transplant*. 2016;16: 1596–1603.

Viglietti D, Loupy A, Vernerey D, Bentelejewski C, Gosset C, Aubert O, et al. Value of donor-specific anti-HLA antibody monitoring and characterization for risk stratification of kidney allograft loss. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28: 702–715.

Vissekruna A, Ritter J, Scholz T, Campos L, Guralnik A, Poncette L, et al. Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2013;43: 606–618.

Voronoy U. Blocking the reticuloendothelial system in man in some forms of mercuric chloride intoxication and the transplantation of the cadaver kidney as a method of treatment for the anuria resulting from the intoxication. *Siglo Med* . 1937;97: 296.

Waaga AM, Gasser M, Kist-van Holthe JE, Najafian N, Müller A, Vella JP, et al. Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. *J Clin Invest*. 2001;107(7): 909-16.

Wang W, Shen G, Wu S, Song S, Ni Y, Suo Z, et al. PD-1 mRNA expression in peripheral blood cells and its modulation characteristics in cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8: 50782-50791.

Wang YW, Wang Z, Shi BY. Programmed death 1 mRNA in peripheral blood as biomarker of acute renal allograft rejection. *Chin Med J*. 2011;124: 674–8.

Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012;12(5): 1157–1167.

Winslow MM, Gallo EM, Neilson JR, Crabtree GR. The calcineurin phosphatase complex modulates immunogenic B cell responses. *Immunity*. 2006;24: 141–52.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124: 471–84.

Xu L, Cao Y, Xie Z, Huang Q, Bai Q, Yang X, et al. The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of TFH cells during acute viral infection. *Nat Immunol*. 2015;16: 991.

Yabu JM, Higgins JP, Chen G, Sequeira F, Busque S, Tyan DB. C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation*. 2011;91: 342–347.

Yap M, Boeffard F, Clave E, Pallier A, Danger R, Giral M, et al. Expansion of highly differentiated cytotoxic terminally differentiated effector memory CD8⁺ T cells in a subset of clinically stable kidney transplant recipients: a potential marker for late graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(8): 1856–68.

Yap M, Tilly G, Giral M, Brouard S, Degauque N. Benefits of Using CD45RA and CD28 to Investigate CD8 Subsets in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2016;16(3): 999–1006.

Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q binding activity of de novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2015;99: 1151–1155.

Yen HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg MV, et al. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol*. 2009;183: 7161–7168.

Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito, T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit t cell receptor signaling by recruiting phosphatase shp2. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209: 1201-1217.

Yoshida K, Sakamoto A, Yamashita K, Arguni E, Horigome S, Arima M, et al. Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2006;36: 3146.

Zachary AA, Leffell MS. Detecting and monitoring human leukocyte antigen-specific antibodies. *Hum Immunol.* 2008; 69(10):591-604.

Zachary AA, Leffell MS. *Transplantation Immunology* (2nd ed). New York: Humana Press.2013.

Zachary AA, Lucas DP, Montgomery RA, Leffell MS. Rituximab prevents an anamnestic response in patients with cryptic sensitization to HLA. *Transplantation.* 2013;95: 701–704.

Zak KM, Kitel R, Przetocka S, Golik P, Guzik K, Musielak B, et al. Structure of the complex of human programmed death 1, PD-1, and its ligand PD-L1. *Structure.* 2015;23: 2341-2348.

Zaza G, Tomei P, Ria P, Granata S, Boschiero L, Lupo A. Systemic and nonrenal adverse effects occurring in renal transplant patients treated with mTOR inhibitors. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013: 403280.

Zaza G, Granata S, Tomei P, Masola V, Gambaro G, Lupo A. mTOR inhibitors and renal allograft: Yin and Yang. *J Nephrol.* 2014;27:495–506.

Zaza G, Granata S, Caletti C, Signorini L, Stallone G, Lupo A. mTOR inhibition role in cellular mechanisms. *Transplantation.* 2018;102: 3–16.

Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant*. 2009;9: 2459–2465.

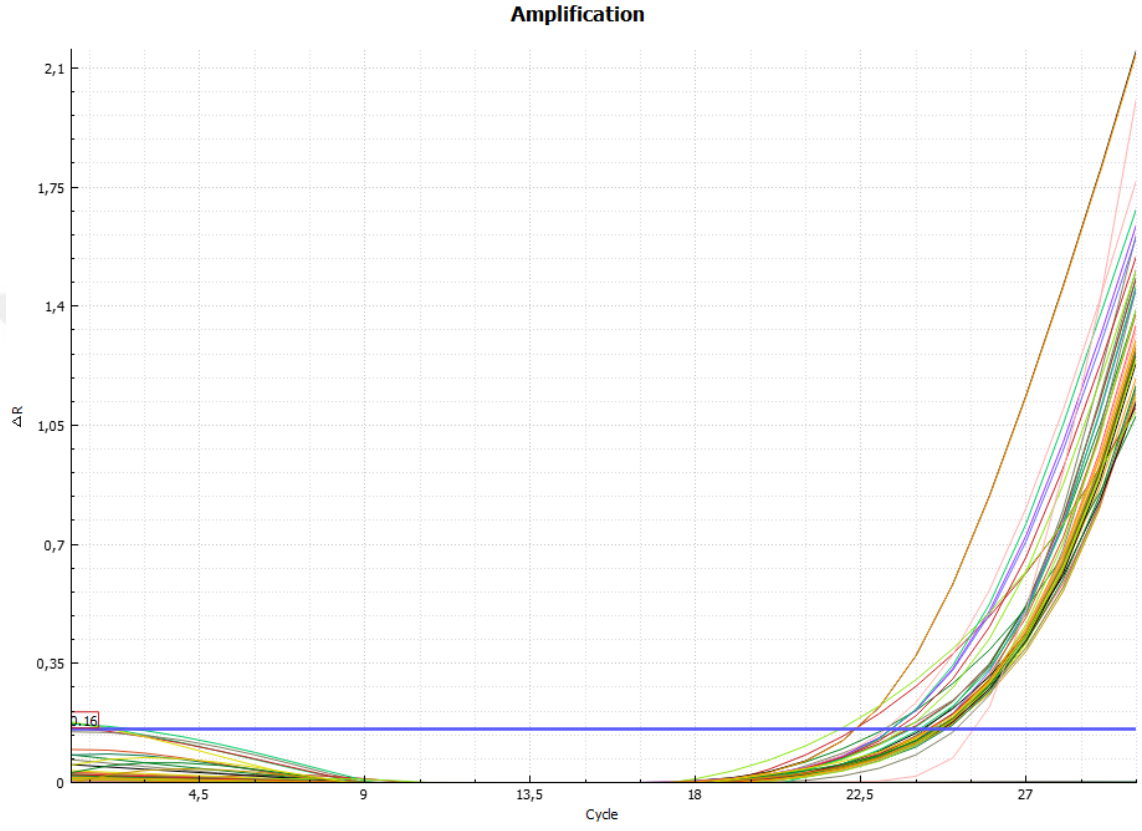
Zhao D, Feng F, Zhao C, Wu F, Ma C, Bai Y, et al. Role of perforin secretion from CD8+ T-cells in neuronal cytotoxicity in multiple sclerosis. *Neurol Res*. 2018;40: 62–7.

Zimmerer JM, Basinger BA, Ringwald MAR, Pelletier RP, Rajab A, Ashraf El-Hinnawi HP, et al. Inverse Association Between the Quantity of Human Peripheral Blood CXCR5+IFN- γ +CD8+T cells with De Novo DSA Production in the First Year After Kidney Transplant Transplantation. 2020;104(11): 2424–2434.

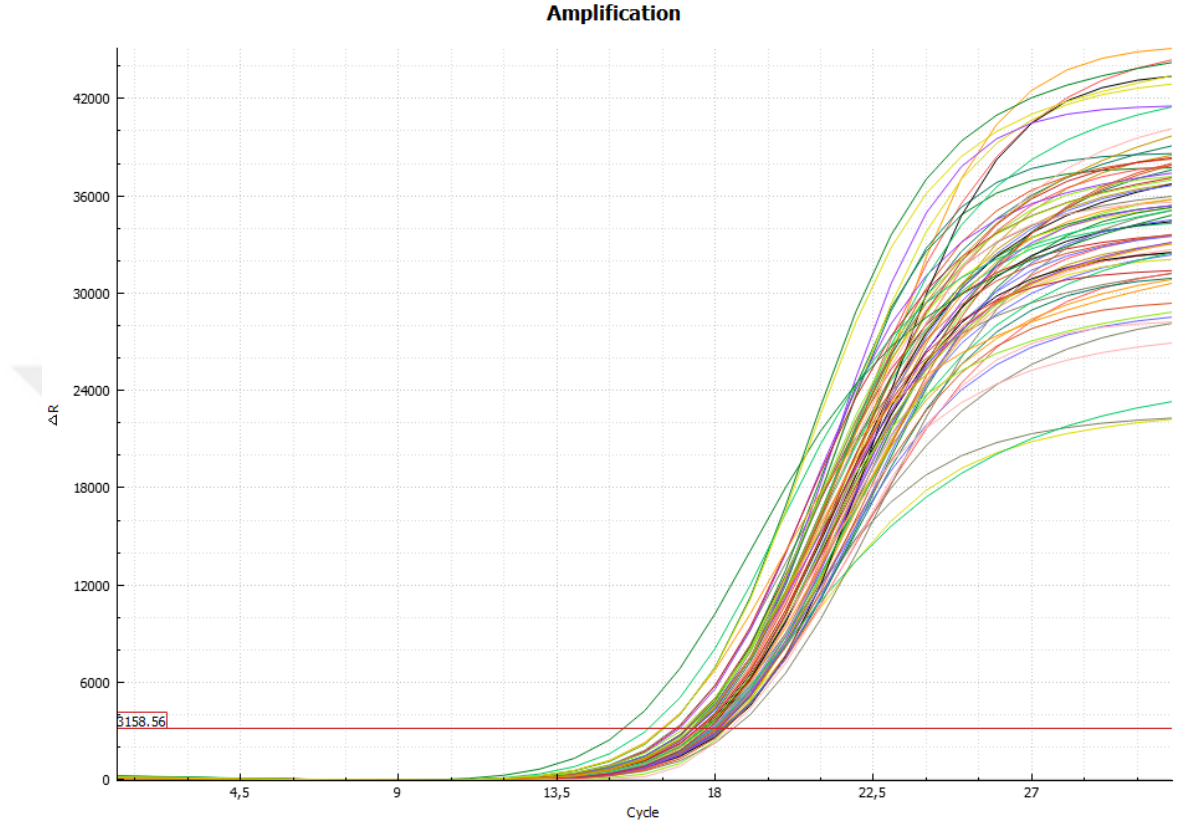
Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med*. 2007;357: 1293–1300.

EKLER

Ek 1. OlgularınPD-1 için Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Analizinden Örnek Görüntü



Ek 2. Olguların *PD-L1* için Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Analizinden Örnek Görüntü



Tube: TUBE 58

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
lymphocytes	2,217	22.2	22.2
cd4+ T helper	774	34.9	7.7
cd4+cxcr5	209	27.0	2.1
cd4+cxcr5+pd-1+	23	11.0	0.2
Q2	0	0.0	0.0
Q3	186	89.0	1.9
Q4	0	0.0	0.0
cd8+ T cytotoxic	527	23.8	5.3
cd8+cxcr5	527	100.0	5.3
cd8+cxcr5+pd-1+	35	6.6	0.4
Q2-1	0	0.0	0.0
Q3-1	491	93.2	4.9
Q4-1	1	0.2	0.0
cd4+cxcr5+pd-1+	1,163	52.5	11.6
Q1-2	321	14.5	3.2
Q2-2	1	0.0	0.0
Q3-2	1,887	85.1	18.9
Q4-2	8	0.4	0.1
total cxcr5	1,146	11.5	11.5
Q1-3	399	4.0	4.0
Q2-3	38	0.4	0.4
Q3-3	9,264	92.6	92.6
Q4-3	299	3.0	3.0

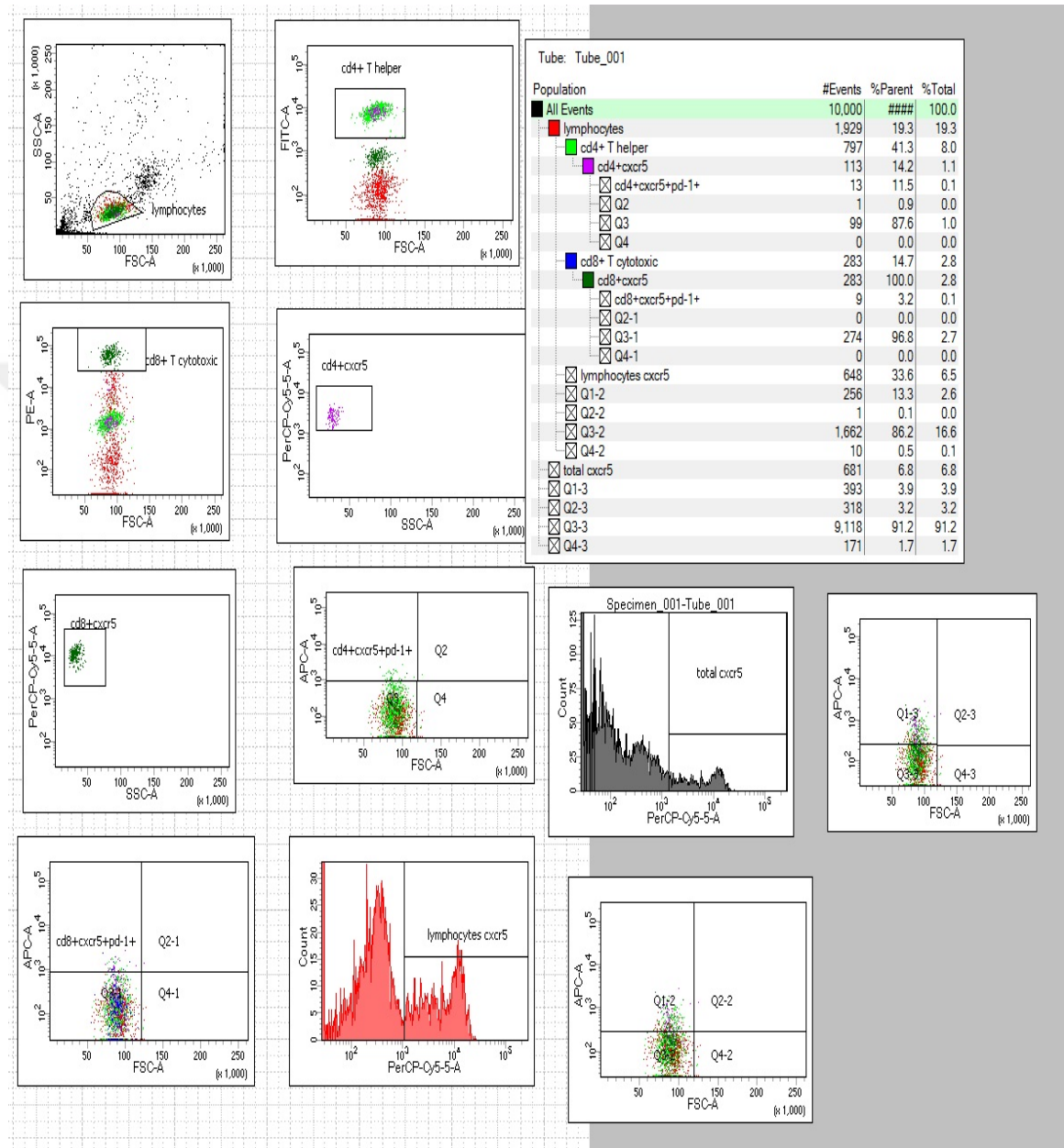
Specimen_001-TUBE 58

total cxcr5

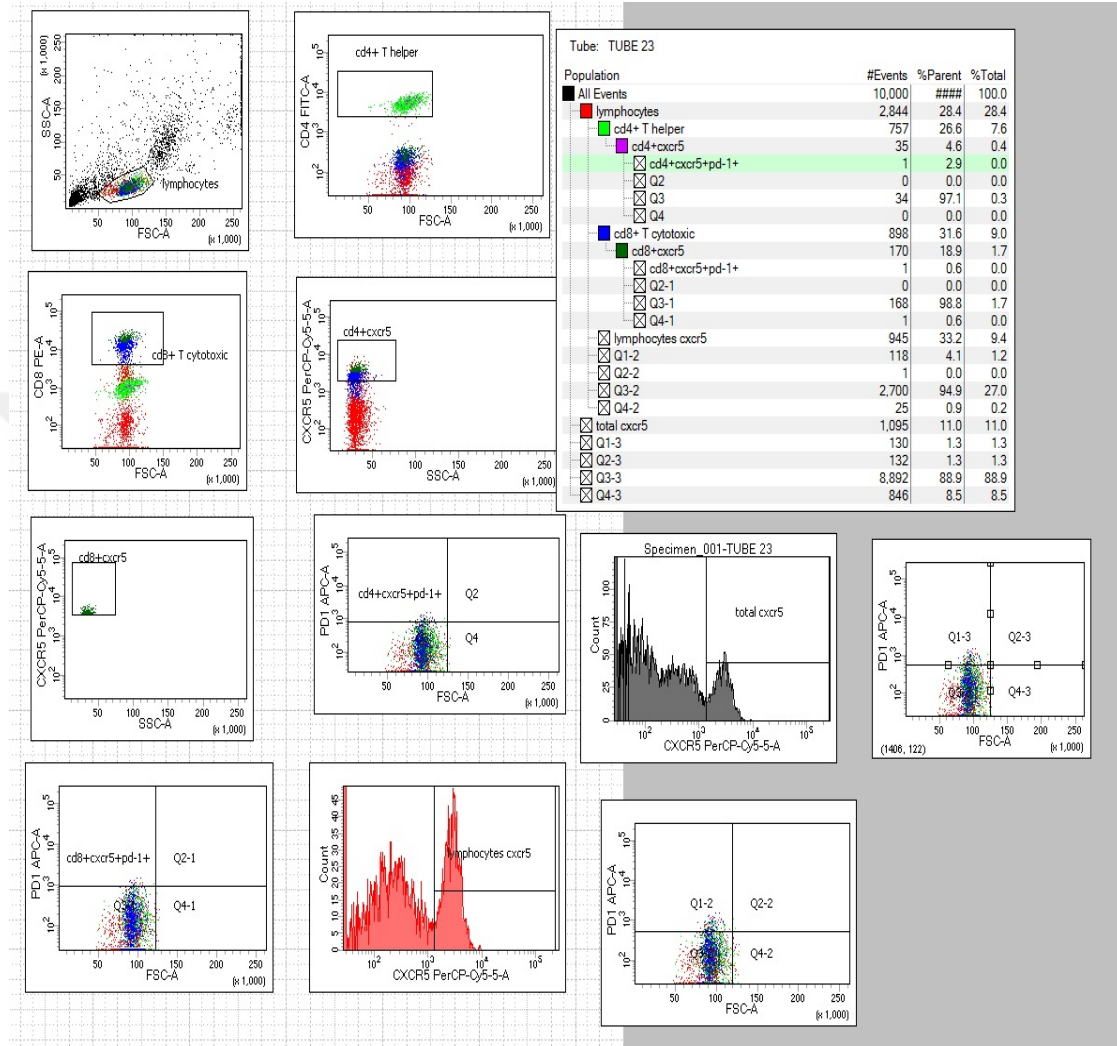
Q1-3 **Q2-3** **Q3-3** **Q4-3**

Q1-2 **Q2-2** **Q3-2** **Q4-2**

Ek 4. Sağlıklı Kontrol Grubunun Akım Sitmetri Analiz Örnek Görüntüleri



Ek 5. Transplant Kontrol Grubunun Akım Sitmetri Analiz Örnek Görüntüleri



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nurten	Uyruğu	T.C.
Soyadı	SAYIN EKİNCİ	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Sağ. Tekns.		
Araş. Gör.		

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Yayınlar ve Bildiriler:

YAYINLAR





