

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
TRANSPLANTASYON İMMÜNOLOJİSİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**KARDİYAK NAKİLLERİN TEKRARLAYAN ANTİKOR ARACILI
REJEKSİYONUNDA DOKUDAKİ İMMÜNGLOBULİN-G POZİTİF
PLAZMA HÜCRE PROFİLİ VE SERUM DONÖR SPESİFİK ANTİKOR
DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

Ayşen SARAÇ TERZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA - 2024

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
TRANSPLANTASYON İMMÜNOLOJİSİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**KARDİYAK NAKİLLERİN TEKRARLAYAN ANTİKOR ARACILI
REJEKSİYONUNDA DOKUDAKİ İMMÜNGLOBULİN-G POZİTİF
PLAZMA HÜCRE PROFİLİ VE SERUM DONÖR SPESİFİK ANTİKOR
DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

Ayşen SARAÇ TERZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. BİLKAY BAŞTÜRK

ANKARA - 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İmmünoloji Anabilim Dalı Transplantasyon İmmünolojisi Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde PROF. DR. AYŞEN SARAÇ TERZİ tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/02/2024

Tez Adı: Kardiyak nakillerin tekrarlayan antikor aracılı rejeksiyonunda dokudaki immünglobulin-G pozitif plazma hücre profili ve serum donör spesifik antikor düzeyleri ile ilişkisinin araştırılması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Elçin Akay, Başkan,
Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Ayşe Ayar, Üye,
Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı

ONAY

Enstitü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 05/02/2024

Öğrencinin Adı, Soyadı: AYŞEN TERZİ

Öğrencinin Numarası: **22110387**

Anabilim Dalı: İMMÜNOLOJİ

Programı: TRANSPLANTASYON İMMÜNOLOJİSİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: PROF. DR. BİLKAY BAŞTÜRK

Tez Başlığı: **Kardiyak nakillerin tekrarlayan antikor aracılı rejeksiyonunda dokudaki IgG pozitif plazma hücre profili ve serum DSA düzeyleri ile ilişkisinin araştırılması**

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 42 sayfalık kısmına ilişkin, 05/02/2024 tarihinde tez danışmanım tarafından TURNİTİN adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 9'dur. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç

2. Alıntılar hariç

3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

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

Öğrenci İmzası:

İTHAF

Change is one thing, progress is another. Change is scientific, progress is ethical Change is indubitable, progress is a matter of controversy.

Değişim başka bir şey, ilerleme başka bir şeydir.

Değişim bilimseldir, ilerleme ise etiktir.

Değişim tartışmasızdır, ilerleme ise tartışma konusudur.

Ömürlerini ilerleme yolunda, çocuklarının eğitim ve öğrenimine adanmış,

egitimci, yazar, müzikçi ve araştırmacı Mustafa Özalp'a

TEŞEKKÜR

Başta, tüm öğrenim hayatımı borçlu olduğum Türkiye Cumhuriyeti'nin Kurucusu Ulu Önder Mustafa Kemal Atatürk olmak üzere, bu çağdaş eğitim ortamını bize hazırlayan Başkent Üniversitesi (BÜ) saygıyla ve sevgiyle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başta değerli danışmanım BÜ İmmünoloji ve çalışma arkadaşları sayın ve çalışma arkadaşları olmak üzere, bu yüksek lisans programının planlanması ve uygulanmasında emeği geçen tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Böyle değerli bir multidisipliner araştırmayı yürütecek ve bu eseri yazacak cesareti bulmam konusunda beni yüreklendiren, her aşamasında bilimsel katkılarını ve dostluklarını esirgemeyen, az bulunur bir dayanışma ve ekip ruhu ile çalışan muhteşem üçlü, BÜ İmmünoloji Uzmanı Prof.Dr.Bilge Türkmen, Ekip Fak.Pa. Öğretim Üyesi Dr.Özkan Akın ve Radyasyon Fizikçisi A.D. Bayraktar Prof.Dr. Mustafa Öneriye yürek dolusu teşekkürlerimi sunarım.

Bu zahmetli çalışmanın görünmez kahramanları,

a tüm emeklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yaşamımın önemli kısmını kaplayan eğitim ve iş yaşamıma büyük bir özveri ile katlanan ve her adımda desteklerini esirgemeyen, değerli eşim Faik Terzi'ye, canım kızlarım İmge ve Doğa'ya kucak dolusu sevgi ve teşekkürlerimle...

ÖZET

Kardiyak Nakillerin Tekrarlayan Antikor Aracılı Rejeksiyonunda Dokudaki İmmünglobulin-G Pozitif Plazma Hücre Profili Ve Serum Donör Spesifik Antikor Düzeyleri İle İlişkisinin Araştırılması, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji anabilim dalı transplantasyon İmmünolojisi tezli yüksek lisans programı

Kardiyak allogreftin antikor aracılı reddi (AMR), kronik greft hasarı, greft kaybı ve tedavi güçlüğü ile ilişkili sinsi bir süreçtir. Patolog, immünolog ve klinisyen için, sınırları henüz net tanımlanamamış, zorlu bir tanı olmayı sürdürmektedir. AMR'nin immünopatolojik ve morfolojik özelliklerinin doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanması ve teşhisi, zamanında müdahale ve tedavi için vazgeçilmezdir. Ayrıca risk altındaki greft alıcılarının belirlenmesi ve doğru yöntemlerle izlenmesi greft disfonksiyonu ve kardiyovasküler mortalite gibi istenmeyen sonuçları önlemek ve gereksiz immünsupresyonun komplikasyonlarından ve maliyetinden kaçınmak açısından önemlidir. Nakil kalp izleminde, detaylandırılmış immünolojik testler ve endomiyokardial biyopsilerin histopatolojik incelemeleri uygun tedavi yaklaşımlarına rehberlik etmektedir. Bu tez çalışmasında, öncelikli hedefimiz AMR patogenezinde plazma hücrelerinin ve onların ürünleri olan immünglobulinlerin (Ig) rolünü anlamak, histopatolojik ve immünolojik incelemelerde potansiyel yardımcı belirteçler bulmaktır. Merkezimizin Patoloji ve İmmünoloji arşivlerinde yeterli materyali ve hasta kayıtları bulunan 19 allogreft kalp nakil hastasından alınmış 91 endomiyokardiyal biyopsi (EMB) spesmeni ve immünolojik tetkikler için alınmış senkron serum örnekleri ile retrospektif multidisipliner bir çalışma planladık. Çalışma grubu, tekrarlayan AMR atakları ile kronik seyir izleyen hastalardan oluşturuldu. Tüm doku örnekleri tanısız patoloji rutinimizdeki immün belirteçlere (C4d, CD68) ek olarak, CD138, IgG, IgG1 ve IgG3 ile immünhistokimyasal boyamalar ile tekrar değerlendirildi. Miyokardial interstisyumda, subendokardial alanda veya kapiller lümenlerindeki tüm enflamatuar hücreler dikkate alınarak, en sık pozitif hücre bulunan alanları seçilerek, bir büyük büyütme alanındaki pozitif mononükleer hücreler sayıldı, ayrıca, %10 eşik değer esas alınarak, alandaki boyanmayan enflamatuar hücrelerle birlikte tüm enflamatuar hücrelere oranı hesaplandı. Aynı yöntem ile

endotelyal hücrelerdeki pozitiflik oranları da kaydedildi. Dokuda sadece bir adet CD138 pozitif plazma hücre varlığı, ya da IgG, IgG1 veya IgG3 pozitif mononükleer hücre varlığı hem C4d pozitifliği hem DSA pozitifliği ile ilişkiliydi. Endotelyal hücrelerdeki pozitiflik oranları da pozitif mononükleer hücre oranları ile paralel seyretti ve tanı gruplarına dağılımları anlamlı farklılıklar gösterdi. Akut rejeksiyon ve tedavi zamanları dikkate alınarak yapılan hasta bazlı analizlerde, dokuda IgG1 ve IgG3 pozitif hücrelerin bulunması ve sayılarının artışı hastanın senkron serumundaki DSA MFI düzeyleri ile yakın korelasyon gösterdi. Her biri, özellikle patoloji rutininde histomorfolojik ve immünohistokimyasal C4d ve CD68 bulguları sınırda olan, DSA durumu bilinmeyen AMR-1 olgularında potansiyel yardımcı belirteçler olarak öne çıktı.

Anahtar Kelimeler: AMR, kardiyak allogreft, plazma hücreleri, IgG1, IgG3

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA22/403) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Ayrıca çalışma, 1964 Helsinki Bildirgesi ve sonraki değişikliklerine uygun olarak tasarlanmıştır. Raporlanan araştırma ve klinik faaliyetler, “Organ Ticareti ve Organ Nakli Turizmi İstanbul Deklarasyonunda” belirtilen İstanbul Bildirgesi İlkeleri ile uyumludur. Veriler geriye dönük olarak toplandığı için birey düzeyinde bilgilendirilmiş onam alınmamıştır.

ABSTRACT

Investigation Of The Relationship With Tissue Immunoglobulin-G Positive Plasma Cell Profile And Serum Donor Specific Antibody Levels In Repeat Antibody-Mediated Rejection Of Cardiac Transplantations, Başkent University Institute of Health Sciences, Department of Immunology, Transplantation Immunology master's program with thesis

Antibody-mediated rejection (AMR) of cardiac allograft is an insidious process associated with chronic graft damage, graft loss, and difficulty in treatment. It remains a challenging diagnosis for the pathologist, immunologist, and clinician; its boundaries are unclear. Accurate and rapid diagnosis of immunological and histopathological features of AMR are indispensable for timely treatment. Monitoring them properly is essential to prevent undesirable outcomes and avoid unnecessary immunosuppression and costs. In transplant heart follow-up, detailed immunological tests and histopathological examinations of endomyocardial biopsies guide appropriate treatment approaches. In this thesis study, our primary goal was to understand the role of plasma cells and their products, immunoglobulins (Ig), in the pathogenesis of AMR and to find potential helpful markers in histopathological and immunological examinations. We planned a retrospective multidisciplinary study with 91 endomyocardial biopsy (EMB) samples taken from 19 allograft heart transplant patients and synchronous serum samples taken for immunological examinations, for which there is sufficient material and patient records in the Pathology and Immunology archives of our center. The study group consisted of patients with a chronic course with recurrent AMR attacks. All tissue samples were re-evaluated with immunohistochemical stainings with CD138, IgG, IgG1, and IgG3, in addition to the immune markers (C4d, CD68) in our diagnostic pathology routine. Taking into account all inflammatory cells in the myocardial interstitium, subendocardial area, or capillary lumens, positive mononuclear cells were counted in a high magnification field by selecting the areas with the most positive cells, and the ratio of all inflammatory cells to all inflammatory cells in the field was calculated, based on a 10% threshold value. Positivity rates in endothelial cells were also recorded using the same method. Only one CD138-positive plasma cell or IgG, IgG1, or IgG3-positive mononuclear cell in the tissue was associated with C4d positivity and DSA positivity. Positivity rates in endothelial cells were also parallel to positive mononuclear cell rates, and their distribution among diagnostic groups showed significant differences. In patient-based

analyses, taking into account acute rejection and treatment times, the presence of IgG1 and IgG3 positive cells in the tissue and the increase in their numbers showed a close correlation with the DSA MFI levels in the patient's synchronous serum. Each of them stood out as a potentially helpful marker, especially in AMR-1 cases with borderline histomorphological and immunohistochemical C4d and CD68 findings in the pathology routine and unknown DSA status.

This study was approved by Başkent University Medicine and Health Sciences Research Board (Project no: KA22/403) and supported by Başkent University Research Fund. Additionally, the study was designed in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendments. The research and clinical activities reported are in line with the Principles of the Istanbul Declaration set out in the “Istanbul Declaration on Organ Trafficking and Transplant Tourism”. Since the data were collected retrospectively, informed consent was not obtained at the individual level.

ÖNSÖZ

Bu araştırmaya, solid organ nakli sonrası akut veya kronik doku reddinde plazma hücre alt gruplarının önemini sorgulayarak başladık. Nakil kalplerin doku reddi (rejeksiyon) yönünden rutin izleminde ve tedavi planlamasında etkin bir şekilde kullanılmakta olan endomiyokardial biyopsi (EMB) örneklerinde plazma hücrelerinin ne sıklıkta karşımıza çıkacağını ve özellikle antikor aracılı rejeksiyonlarda (AMR) hangi immünglobulin-G (IgG) alt gruplarının rol aldığını araştırmak için küçük bir hasta grubuyla bir ön çalışma planladık. Başkent Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiş kalp nakil hastalarından klinik seyri tekrarlayıcı AMR atakları ile giden ve eşzamanlı serum örneklerinde panel reaktif antikor (PRA) ve donöre özgü antikor (DSA) düzeyleri bilinen 12 hastanın 14 EMB spesmeni mercek altına aldık (Tablo 1). Ekonomik sınırlılık nedeniyle, IgG ve alt gruplarından sadece IgG4 pozitif plazma hücrelerini immünhistokimyasal yöntemle aradık. IgG4'ü öncelememizin nedeni, kronikleşmiş sinsi seyirli AMR ataklarında IgG4 alt grup plazma hücrelerinin gürültülü bir rejeksiyonu dizginleyici rolü olabileceği yönünde öngörülerimizin olmasıydı. Bu biyopsilerin 13'ü histopatolojik olarak pür veya miks AMR tanısı almıştı, biri ise pür akut hücrel rejeksiyon (ACR) tanılıydı. Işık mikroskobuyla, plazma hücrelerinin en yoğun olduğu 1 büyük büyütme alanında (HPF), IgG pozitif hücre sıklığı ve tüm inflamatuvar hücrelere oranı değerlendirildi. Tüm olgularda, IgG pozitif hücrelerin oranı inflamatuvar infiltratın %10'unu geçmekteydi. Pozitif kontrollü yapılan IgG4 immün-boyamalarında, tüm alanlarının taranmasına karşın, IgG4 pozitif plazma hücresi saptanmadı. Bu hastaların biyopsileri ile eşzamanlı alınmış serum örneklerinde saptanmış PRA/DSA ve antikorların bağlanma gücünü gösteren MFI (mean floresan intensity) düzeylerinin IgG pozitif plazma hücre sayıları ile ilginç bir şekilde korelasyon gösterdiği dikkatimizi çekti. Bu ön çalışmamız 2022 Dünya Transplantasyon Kongresinde sözel bildiri olarak sunulmuştur.

Bu bulgular, renal transplantlarda, allograft kötü prognozu ile ilişkilendirilmiş ve yeni tanımlanmış olan 'plazma hücresinden zengin akut rejeksiyonu akla getirmiştir. Allograft kalplerde belirginleşen plazma hücre oranlarının kronik sinsi klinik seyir gösteren AMR atakları ile ilişkilendirilebileceği düşüncesiyle, daha geniş olgu serilerinde kontrollü yapılacak çalışmalar ile plazma hücre sayısı için anlamlı bir eşik değer belirlemek istedik. Bunun yanı sıra IgG4'ün bu ataklarda öne çıkmadığı anlaşıldığı için diğer alt gruplardan immün tetikleyici özellikleri ile bilinen diğer alt gruplardan IgG1 ve IgG3 pozitif plazma hücrelerini daha geniş bir seride aramak istedik. Ekonomik sınırlılıklar nedeniyle, IgG2 alt grubunu dokuda immünhistokimyasal olarak değerlendirmek veya eşzamanlı serum örnekleri

merkezimizin ‘Transplantasyon İmmünolojisi Laboratuvarı’nda bulunmasına karşın, tekrarlayan AMR atakları ile karakterli çalışma grubumuzdaki hastaların tüm biyopsilerinde PRA/DSA düzeylerini retrospektif veya prospektif olarak belirlemek mümkün olmadı. Böylece çalışmamızı retrospektif olarak ulaşılabilen mevcut PRA/DSA MFI düzeyleri ile bağlantılı yürütmeye karar verdik. Çalışma grubumuzdaki ve kontrol grubumuzdaki hastaları ulaşılabilen tüm uygun EMB spesmenleri ve çalışılmış PRA/DSA MFI düzeyleri ile sınırlı bir şekilde kurgulamak zorunda kaldık. İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde, IgG ve alt gruplarının, histo ve/veya immüno patolojik AMR tanısı almış dokularda sadece plazma hücrelerinde değil, miyokardial kılcal damarların endotel hücrelerinde de bağlantılı bir şekilde immün pozitiflik gözlenmesi, bazı olgularda IgG1, bazılarında IgG3 pozitifliğinin baskın olması endotelial hücrelere de odaklanmamıza neden oldu. Böylece araştırmamız başlangıçta hedeflenen plazma hücre sayısı ve oranlarını belirlemenin ötesine geçti. Tüm spesmenlere ait IgG, IgG1 ve IgG3 immün kesitleri tekrar ışık mikroskopik değerlendirmeye alındı ve bu kez pozitif endotelial hücreler, yamasal tutulum nedeniyle, sıklığın en yüksek olduğu alanda sayılarak yüzde oranları hesaplandı. Sonuçta, dokuda tek bir CD138 pozitif plazma hücre varlığının bulunması, IgG pozitif sadece 2 adet inflamatuvar hücrenin bulunması veya kapiller endotelial hücrelerde IgG ve/veya IgG1 veya IgG3 ile %10’un üzerinde pozitiflik bulunması DSA MFI yüksek düzeyleri ile istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Bu bulgular, immün-histopatolojik bulguları kriterleri doldurmayan hafif dereceli AMR ataklarının dokuda saptanmasında yardımcı ek biyolojik belirteçler sunmaktadır. Günümüzde, dünya genelinde, patoloji rutininde, EMB örneklerinin AMR tanısında, güncel kriterleri değerlendirmek için sadece C4d ve CD68 immün boyamaları kullanılmaktadır. İngilizce Literatür’de, immünglobulinlerin veya alt gruplarının greft organlarda immünohistokimyasal belirteçler ile araştırıldığı başka bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışmamızda, biyopsi sonrası klinik belirti veya bulgu veren, DSA MFI düzeyi yüksek, dokuda immün ve histopatolojik bulguların rejeksiyon tanısı için yetersiz kaldığı olgular gözlemledik ve elde ettiğimiz bulgular ışığında, böyle olgularda C4d ve CD68 negatif olduğunda, erken kapiller hasarını göstermek için, genel plazma hücre belirteci olan CD138 ve IgG ve/veya IgG1 ve IgG3 antikorlarından oluşan ek bir immün panel uygulamanın hafif dereceli AMR1(i) tanısında yararlı olacağı kanaatine vardık ve merkezimizde uygulama kararı aldık.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. NAKİL ÖNCESİ REJEKSİYON RİSKİNİ DEĞERLENDİRMeye VE ÖNLEMeye YÖNELİK ÇALIŞMALAR	2
1.1.1 HLA doku tipleme testleri.....	3
1.1.2. Panel reaktif antikor (PRA) tarama ve tanımlama testleri.....	3
1.1.3. Çapraz eşleştirme (XM) testleri.....	4
1.2. ALLOGREFT KALPLERİN NAKİL SONRASI İZLEMİ VE KARŞILAŞILAN SORUNLAR	4
1.2.1. Allogreft nakil kalplerde akut rejeksiyonların sıklığı ve sonuçları.....	4
1.2.2. Allogreft kalplerde histopatolojik akut hücresel rejeksiyon (ACR).....	6
1.2.3. Allogreft kalplerde histopatolojik akut hücreli rejeksiyon (AMR)	7
1.2.4. Allogreft kalp izleminde serolojik antikor testlerinin önemi.....	8
1.2.5. Nakil kalp alıcılarında akut hücreli rejeksiyon (AMR) tedavi protokolleri	9
1.3. REJEKSİYONDA ROL OYNAYAN İMMÜNOLOJİK MEKANİZMALAR.....	9
1.3.1. HLA sistemi	9
1.3.2. Kompleman sistemi	10
1.3.3. Antikor aracılı rejeksiyonda B hücrelerinin rolü.....	12
1.3.4. Antikor aracılı rejeksiyonda endotelin rolü.....	12
1.3.5. Antikor aracılı rejeksiyonda T hücrelerinin rolü	13
1.3.6. Antikor aracılı rejeksiyonda makrofaj ve doğal katil hücrelerin (NK) rolü.....	13
1.3.7. Antikor aracılı rejeksiyon ve organ uyumunun moleküler mekanizmaları	14
1.4. İMMÜNGLOBULİN G VE ALT SINIFLARININ YAPISAL VE FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ	15
1.4.1. IgG'nin 4 farklı alt sınıfı, yapısal ve işlevsel farklılıkları.....	17
1.4.2. HLA antikorlarının IgG alt sınıflarının transplantasyondaki önemi	18
1.4.3. IgG1 ve IgG3 alt gruplarının özellikleri ve farklılıkları.....	18
1.4.4. IgG4 alt sınıfı ve diğer IgG alt sınıfları ile farklılıkları	19
1.3.4. Araştırmamızın hipotezi ve amacı	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
2.1. ÇALIŞMAYA KABUL EDİLEN OLGU PROFİLİ.....	21
2.2. OLGU GRUBUNU OLUŞTURAN KALP ALICILARININ RUTİN TAKİP VE TEDAVİ PROTOKOLLERİ.....	22
2.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	22
2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	24
3. SONUÇLAR	25
3.1. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLEN KALP ALICI HASTA PROFİLİNİ TANIMLAYAN BULGULAR	25

3.2. PATOLOJİK TANI GRUPLARINA GÖRE YAPILAN ANALİZLERDE ELDE EDİLEN BULGULAR.....	27
3.3. LSA, DSA VE MFI DÜZEYLERİ İLE İLİŞKİLİ ANALİZ SONUÇLARI.....	31
3.3.1. Çalışma grubundan iki hastanın, hasta bazlı LSA, DSA ve MFI düzeylerinin IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayılarıyla bağlantısını araştıran analiz sonuçları.....	35
3.4. TEDAVİ İLİŞKİLİ ANALİZ SONUÇLARI.....	37
3.5. C4D İLİŞKİLİ ANALİZLERDE ELDE EDİLEN BULGULAR	42
3.6. ROC EĞRİSİ İLE EŞİK DEĞER ANALİZ SONUÇLARI	49
3.7. CD68 İLE İLİŞKİLİ ANALİZ SONUÇLARI	50
3.8. ‘QUILTY EFFECT’ İLİŞKİLİ ANALİZ SONUÇLARI	54
4. TARTIŞMA.....	55
KAYNAKLAR.....	70
EK 1 BAŞKENT ÜN. İMMÜNOLOJİ A.D. TRANSPLANT İMMÜNOLOJİ LABORATUVARI SEKANS SPESİFİK OLİGONÜKLEOTİD ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ.....	75
EK 2 BAŞKENT ÜN. İMMÜNOLOJİ A.D. TRANSPLANT İMMÜNOLOJİ LABORATUVARI PRA TARAMA SINIF I ve II TESTİ ÇALIŞMA TALİMATI.....	78
EK 3 RESİMLER.....	81

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Akut Hücresel Rejeksiyonlar (ACR) İçin ISHLT 1990 ve 2004 Skorlama Sistemleri.....	6
Tablo 1.2. ISHLT 2013 Patolojik AMR Formülasyon Şeması	8
Tablo 2.1. İmmünohistokimyasal ek inceleme için kullanılan antikorlar.....	22
Tablo 3.1.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik ve klinik profili	25
Tablo 3.1.2. Tanı gruplarına göre olgu dağılımı.....	26
Tablo 3.2. Tanı gruplarına göre CD138, IgG, IgG1 ve IgG3 (+) hücre sayıları dağılımı...	27
Tablo 3.6.1. Tablo 3.6.1. ROC eğrisine göre, AMR için anlamlı risk oluşturan CD138, IgG, IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayısı eşik değerleri.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. İnsan immünoglobulin molekülünün temel yapısının şematik çizimi.....	15
Şekil 1.2. İnsan immünoglobulin ağır zincir lokusu ve sınıf değiştirme potansiyeli	16
Şekil 1.3. IgG alt sınıflarının ve bunların izomerlerinin şematik düzeni.....	17
Şekil 3.2.1. LSA pozitif olguların tanı gruplarına göre dağılımı.....	28
Şekil 3.2.2. DSA pozitif olguların tanı gruplarına göre dağılımı.....	28
Şekil 3.2.3. CD138 + plazma hücre sayısının tanı gruplarına göre dağılımı	28
Şekil 3.2.4. IgG+ inflamatuvar hücre sayısının tanı gruplarına göre dağılımı	29
Şekil 3.2.5. IgG1+ hücre sayısının tanı gruplarına göre anlamlı değişkenliği	29
Şekil 3.2.6. IgG3 + hücre sayısının tanı gruplarına göre dağılımını gösteren grafi.....	30
Şekil 3.3.1. Donöre özgüllüğü bilinmeyen LSA saptanmış hastalarda IgG	31
Şekil 3.3.2. HLA sınıf-I, sınıf-II tipinde DSA saptanan ve DSA saptanmayan hastalarda IgG	31
Şekil 3.3.3. HLA sınıf-I, sınıf-II tipinde DSA saptanan ve DSA saptanmayan hastalarda IgG1.....	32
Şekil 3.3.4. LSA MFI düzeyleri ve IgG pozitifliği	32
Şekil 3.3.5. Senkron serumlarında DSA saptanmış 37 hasta ile DSA negatif 25 hastada IgG.....	33
Şekil 3.3.6. Senkron serumlarında DSA saptanmış 37 hasta ile DSA negatif 25 hastada IgG1.....	33
Şekil 3.3.7. Senkron serumlarında sınıf DSA saptanmış 37 hasta ile DSA negatif 25 hastada IgG3.....	34
Şekil 3.3.1.1. Tek hastanın (9 no'lu) izlemi	35
Şekil 3.3.1.2. Tek bir hastanın (11 numaralı) izlemi	36
Şekil 3.4.1. Plazmaferez+IVIG ve/veya Ritüksimab üçlü tedavisi almış hastalar	37
Şekil 3.4.2. DSA HLA sınıflarına göre alt gruplar.....	37
Şekil 3.4.3. Plazmaferez+IVIG ve/veya Ritüksimab tedavisi almış hastaların IgG % oranları.....	38
Şekil 3.4.4. Plazmaferez+IVIG+Ritüksimab üçlü tedavisi almış hastaların IgG1 pozitifliği.....	38
Şekil 3.4.5. Plazmaferez+IVIG+Ritüksimab üçlü tedavisi almış hastaların IgG3 pozitifliği.....	39
Şekil 3.4.6. LSA durumu bilinen 62 olgu IgG pozitiflik % oranları.....	40
Şekil 3.4.7. LSA durumu bilinen 62 olgu IgG1 pozitiflik % oranları	40
Şekil 3.4.8. LSA durumu bilinen 62 olgu IgG3 pozitiflik % oranları	41
Şekil 3.4.9. ACR tedavisi (Metil prednizolon) almış ve 2 ay içinde kontrol amaçlı alınmış 10 biyopsi	41
Şekil 3.5.1. DSA pozitif ve negatif gruplarda %10 eşik değere göre derecelendirilen C4d pozitiflik dağılımı.....	42
Şekil 3.5.2. DSA pozitifliği (var/yok) ile herhangi bir orandaki C4d pozitiflik dağılımı.....	42

Şekil 3.5.3. DSA pozitifliğinin HLA sınıflarına göre gruplandırması	43
Şekil 3.5.4. LSA durumu bilinen 42 olgu, LSA pozitifliği	44
Şekil 3.5.5. MFI düzeyi ve C4d pozitiflik (var/yok) dağılımı.....	44
Şekil 3.5.6. MFI düzeyi ve C4d pozitiflik (%) dağılımı.....	45
Şekil 3.5.7. Miyokardial kılcal damarlarda herhangi bir oranda C4d pozitifliği ile IgG.....	45
Şekil 3.5.8. Miyokardial kılcal damarlarda herhangi bir oranda C4d pozitifliği ile IgG1.....	46
Şekil 3.5.9. Miyokardial kılcal damarlarda herhangi bir oranda C4d pozitifliği ile IgG3.....	46
Şekil 3.5.10. C4d'nin herhangi bir derecede pozitifliği ile plazma hücre sayısı	47
Şekil 3.5.11. Klinik grupların dokuda C4d pozitifliği bulunması ile anlamlı bağıntısı.....	48
Şekil 3.6.1. ROC Eğrisi	50
Şekil 3.6.2. Dokuda, IgG, IgG1 ve IgG3 pozitif inflamatuvar hücre sayıları ROC eğrisi.....	50
Şekil 3.7.1. CD68'in %10 eşik değere göre 3 aşamalı kategorizasyonu ile C4d.....	51
Şekil 3.7.2. CD68'in %10 eşik değere göre kategorizasyonu ile IgG.....	52
Şekil 3.7.3. CD68 pozitif makrofaj sayısı ve IgG1.....	52
Şekil 3.7.4. LSA pozitif olgu grubundaki HLA sınıflarına göre CD68 pozitiflik dağılımı.....	53
Şekil 3.7.5. LSA pozitif olgu grubundaki MFI 1000 ve üzeri ve altındaki değerlerde CD68	53
Şekil 3.7.6. DSA ve HLA alt sınıflarına göre CD68 pozitiflik dağılımı	54
Şekil 3.8.1. 'Quilty Effect' varlığı ile herhangi bir oranda endotelial IgG3 pozitifliği arasındaki ilişki.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A.D.	Anabilim Dalı
Ün.	Üniversitesi
Fak.	Fakültesi
B.Ü.	Başkent Üniversitesi
BBA	Büyük büyütme alanı (x400)
Ig	İmmünglobulin
Ig G	İmmünglobulin-G (G1,G2,G3,G4)
PRA	Panel reaktif antikorlar
DSA	Donör Spesifik (Vericiye özgü) anti-HLA antikor
LSA	Tek antijen tanımlama testleri (LUMİNEX teknolojisinde)
MFI	Ortalama Flöresan Yoğunluğu (meanfloresan intensity)
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (human leukocyte antigen)
AMR	Antikor aracılı (hüморal) rejeksiyon
CDC-XM	Hücre bazlı komplemana bağlı sitotoksikite-çapraz eşleştirme testi
CXM	Çapraz eşleştirme (crossmatch)
SAB	Luminex single-antigen bead (SAB) testi
LSA	Luminex single-antigen bead (SAB) testi ile saptanan IgG tipinde antikorlar
VXM	Sanal çapraz eşleştirme (VXM)
PF	Plazmaferez
IVIG	İntravenöz immünglobulin
LVEF	Sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonu
NÖ	Nakil öncesi
NS	Nakil sonrası
CAV	Kardiak allogreft vaskülopati
ARVD	Aritmojenik sağ ventrikül displazisi
DKM	Dilate kardiomiopati
KM	Kardiomiopati
RKM	Restriktif kardiomiopati
KH	Kalp hastalığı
C4d	Kompleman faktörü 4d (İmmünhistokimyasal bir belirteç olarak kullanıldı)
CD	Yüzey farklılaşma antijenleri (Differentiation molecules)
CD68	Histiyositik hücre belirteci (İmmünhistokimyasal bir belirteç olarak kullanıldı)
CD138	Plazma hücre belirteci (İmmünhistokimyasal bir belirteç olarak kullanıldı)
SSO	Polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO)
SPA	Solid faz antikor tespit analizleri
H&E	Tanısal patoloji rutininde kullanılan boya (hematoksilen ve eozin)
İHK	İmmünhistokimyasal (immünperoksidaz tekniği ile) boyama

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Kalp nakilleri, organ bağışının çok nadir olması nedeniyle diğer organ nakillerinden farklı bazı özellikler gösterir. Kalp nakli, sadece kadavradan yapılabilmesi ve nakil için karar verme sürecinin çok kısa olması nedeniyle, ek zorluklarla gerçekleştirilmektedir. Kalp nakli öncesi ve sonrasında alıcının klinik, histopatolojik ve immünolojik açıdan multidisipliner bir yaklaşımla yakın takibi, nakledilen organın işlevselliğinin sürdürülmesi ve alıcının yaşam süresi ve kalitesinin optimizasyonu için vazgeçilmezdir¹.

Nakil sonrası ortaya çıkabilecek en önemli sorunlardan biri, immün mekanizmalarla gelişen doku reddi hasarıdır (rejeksiyon). Rejeksiyon, alıcının immün sisteminin, vericinin nakledilen organını yabancı olarak algılayıp ona karşı savaşma sürecini ifade eder ve iki farklı yoldan gerçekleşen immün mekanizmalarla, T hücre aracılı (hücrel) rejeksiyon (ACR) veya B hücre aracılı (hümorale) rejeksiyon (AMR) olarak tanımlanır². Bazen her iki mekanizma devreye girer ve mikst ACR ve AMR olarak tanımlanan süreçler meydana gelir. Bu süreçler, alıcının nakil öncesi duyarlanma durumu, immün baskılayıcı (immünsupresif) tedavinin etkinliği veya yönetimine bağlı olarak, nakil sonrası, dakikalar içinde başlayabileceği gibi (hiperakut), ilk haftalarda veya aylarda (akut), bazen yıllar içinde tekrarlayan ataklar (kronik) halinde kendini gösterebilir. Alıcının bağışıklık hücreleri tarafından greft organın yabancı olarak algılanması, vericinin hücrelerindeki insan lökosit antijenlerinin (human leukocyte antigen;HLA) varlığıyla ilişkilidir². Bu nedenle ‘HLA uyumu’, nakledilen organ ya da dokunun (greftin) yaşam süresi ve işlevselliğiyle yakından ilişkilidir. Nakil öncesi duyarlanma ile veya nakil sonrası ortaya çıkabilecek HLA hedefli (anti-HLA) antikorlar, organ nakillerindeki önemli engellerden birisidir. Panel reaktif antikorlar (PRA) olarak da bilinen bu antikorların bir kısmı ‘donöre özgü anti-HLA IgG antikorları (DSA)’ temsil etmektedir. Bu antikorların varlığı, özellikle antikor aracılı (hümorale) rejeksiyon (AMR) ile ilişkilendirilmiştir^{3,4}. Graft kalp alıcılarında, serumda direngen DSA varlığı ve tekrarlayan AMR ataklarının kardiyak allograft vaskülopatisi (CAV), greft kaybı ve mortalite ile yakın ilişkili olduğu bilinmektedir⁴⁻⁸. Bu ataklar çoğu zaman klinik olarak sessiz seyreder ve tanı güçlüğü yaratır. Bu nedenle kalp nakli alıcılarında, nakil sonrası akut rejeksiyon ataklarının erken tanınması için histopatolojik değerlendirme esastır. Operasyonu takiben belirli protokoller dahilinde rutin endomiyokardiyal biyopsi (EMB) spesmenleri alınarak olası akut rejeksiyonlar yönünden değerlendirilmesi, ek olarak klinik belirti veya bulgu olması halinde endikasyon biyopsileri alınması, dünya genelindeki kalp

nakil merkezlerinde kabul görmüş, güncelliğini koruyan bir yöntemdir⁹. Son yıllarda biyopsi spesmenleri üzerinde uygulanabilen immünhistokimyasal ve immünflöresan tekniklerin gelişimi, özellikle klinik ve histomorfolojik olarak daha sinsi seyirli olabilen AMR ataklarının teşhisinde patoloğların elini güçlendirmiştir⁹.

Multidisipliner bir yaklaşımla retrospektif planlanan bu tez çalışmasının amacı, allogreft nakil kalplerin tekrarlayan antikor aracılı rejeksiyonlarında, dokudaki immünglobulin-G (IgG) pozitif plazma hücre alt grup profili (IgG1, IgG3 için) ve sıklığının rolünü araştırmak, ayrıca immünhistokimyasal tekniklerle saptanabilen, dokudaki IgG, IgG1 ve IgG3 pozitif plazma hücrelerinin ve endotel hücrelerinin varlığının serumdaki ‘Donöre özgü HLA antikorı (DSA)’ pozitifliği ve bağlanma gücünü temsil eden MFI (meanfloresan intensity) düzeyleri ile ilişkisini aramaktır. Böylece greft kalp biyopsilerinde histopatolojik değerlendirmelerde, tanı güçlüğü gösteren hafif dereceli AMR tanısında yardımcı olabilecek immünhistokimyasal belirteçler ve anlamlı kantitatif eşik değerlere ulaşmaktır.

1.1. Nakil Öncesi Rejeksiyon Riskini Değerlendirmeye ve Önlemeye Yönelik Çalışmalar

Başarılı organ naklinin önündeki en büyük engel, alıcının donörün insan lökosit antijenlerine (HLA) karşı önceden duyarlanmasıdır. Duyarlanma, alıcı serumlarında donöre özgü anti-HLA IgG antikorlarının (DSA) varlığıyla yansıtılır. DSA'nın yüksek düzeyleri güçlü allosensitizasyona işaret eder ve genellikle ‘hücre bazlı komplemana bağlı sitotoksikite çapraz eşleştirme’ (CDC-XM) testiyle tespit edilir. Pozitif olduğunda, AMR ve erken greft kaybı riski yüksektir, bu nedenle pozitif bir CDC-XM uzun süredir transplantasyon için bir kontrendikasyon olarak kabul edilmektedir¹⁰. Bu nedenle, nakil öncesinde ve sonrasında, alıcının ve vericinin antikor varlığının, çeşidinin ve etkinliğinin belirlenmesi, potansiyel risklerin öngörülmesinde ve uygun tedavi protokollerinin seçilmesinde önemli katkı sağlar. Ayrıca, nakil öncesi zaman kazandıran ‘sanal çapraz eşleştirme’ (VXM) testleri için olanak sağlar^{1,10}. Nakil öncesi rejeksiyon riskinin değerlendirilmesi HLA (Sınıf I ve II) antikorları yanı sıra, HLA dışı ve ABO antikorlarının, izotiplerinin ve otoantikorların karakterinin değerlendirilmesini içerir. Bu tespit yöntemlerinin güçlü yönleri ve sınırlamaları dikkate alınarak, panel reaktif antikor (PRA) düzeyleri, çapraz eşleştirme (crossmatch; CXM) sonuçları ve greft alıcısında duyarlanmaya neden olabilecek özgeçmiş bilgileri (geçirilmiş transfüzyonlar, hamilelikler ve önceki transplantasyonlar gibi) elde edilerek AMR riskini azaltmayı hedefler. Bu kapsamlı değerlendirme, nakil işleminden önce hastanın rejeksiyona karşı duyarlılığının belirlenmesine yardımcı olur¹.

1.1.1 HLA doku tipleme testleri

Nakil için bekleme listesinde olan hastalar için, belirli aralıklarla, düşük çözünürlüklü moleküler yöntemler kullanılarak, HLA doku tipleme testleri uygulanır. HLA alt gruplarından sınıf-I (HLA-A, -B, -C) ve sınıf-II (HLA-DRB1 ve -DQ), her iki grubun belirlenmesi iki basamakta önem arz eder. Nakil için organ bulunduğunda, alıcı ile vericinin doku grubu uyumunun bilinmesi sürece hızlıca başlanmasını sağlar. Böylece olası rejeksiyon risklerini öngörmemizi sağlayan basamaklardan birisi gerçekleşmiş olacaktır. Kalp nakillerinde, çoğu zaman ideal doku grubu uyumunu arama şansı yoktur. İkinci basamakta, HLA doku gruplarının bilinmesi, nakil öncesinde alıcıda zaten mevcut olan anti-HLA antikorları ile verici doku grubunun karşılaştırılarak potansiyel risklerin belirlenmesine olanak sağlar. HLA doku grubu testleri günümüzde çoğunlukla moleküler yöntemlerle çalışılmaktadır. Doku grubu testleri için tam kan örneğinden elde edilen DNA, moleküler yöntemlerle çoğaltılarak 2 basamaklı düşük çözünürlüklü veya 4 basamaklı yüksek çözünürlüklü sonuçlar elde edilebilmektedir. Donörün doku gruplarının yüksek çözünürlüklü olarak bilinmesi, yüksek oranda sensitize hastaların nakil öncesi rejeksiyon riskini hızlıca belirleyebilmek için VXM testi kullanımına da olanak tanır¹.

1.1.2. Panel reaktif antikor (PRA) tarama ve tanımlama testleri

Bekleme listesindeki hastalara, duyarlılık durumlarının belirlenebilmesi için, 3 ya da 6 ayda bir antikor tarama testleri uygulanır. PRA olarak tanımlanan bu anti-HLA antikorların belirlenmesinde günümüzde solid faz yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu testler sadece antikor varlığını gösteren testlerdir. Antikor saptandıktan sonra PRA tanımlama ve/veya tek antijen tanımlama (LSA) testleri çalışılarak antikorun tipi (IgG, IgM gibi), MFI düzeyi, kompleman aktivasyonu yapıp yapmadığı gibi parametreler belirlenir. PRA tanımlama testleri panel içerisinde yer alan antikor yüzde oranlarını verirler. Yüksek PRA pozitifliği olan hastalar için uygun donör bulma şansı çok azdır. Örneğin %70 PRA pozitif hasta için uygun donör şansını, diğer %30 oranındaki donör havuzu belirleyecektir. Sensitize hasta tanımı merkezler arasında belirgin değişkenlik göstermektedir; bazı merkezler için %10, bazı merkezler için %25 olarak belirlenmiştir¹¹. Solid faz yöntemlerinin gelişmesi, LUMİNEX teknolojisinde LSA testlerinin kullanılabilmesi, akan hücre ölçer (flow cytometry) yöntemiyle antikorların tanımlanabilmesi, MFI değerlerinin daha net belirlenmesi, kalp bekleyen veya greft kalpli hastaların bu değerler üzerinden gruplandırılmasını sağlamıştır. Her merkez kendi eşik değerini belirlemektedir. Genellikle düşük bağlanma gücü olan antikorlar için eşik değer

MFI $\leq$ 1000 olarak kabul edilmektedir. Kabul edilebilir değer 3000 $\leq$ MFI $\leq$ 5000 arasındadır. Nakil için uygun olmadığı düşünölen değer 5000>MFI olup, 10.000>MFI değerlerinin hücre ölümlüyle (sitotoksosite) uyumlu olduğu kabul edilmektedir¹². Hastaların nakil öncesi ve sonrasında PRA takipleri, desensitizasyon veya rejeksiyon tedavisi gerekliliğine karar verilmesinde önemli rol oynar. Tedavi sonrası takiplerinde de güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

1.1.3. Çapraz eşleştirme (XM) testleri

Serolojik olarak yapılan komplemana bağımlı hücrel sitotoksosite çapraz **karşılaştırma** (complement dependent cytotoxic crossmatch: CDC-XM), ve akan hücre ölçer yöntemiyle çalışılan XM testleri özellikle böbrek nakillerinde oldukça sık kullanılan ve güvenilir sonuçlar veren testlerdir. Pozitiflikleri halinde nakil için kontrendikasyon oluştururlar. Özellikle T hücre pozitifliği nakil için %100 engel teşkil ederken B hücre pozitifliği için kabul edilebilirlik eşiği %40 sınırındadır. Kalp nakli öncesi de XM testlerinin yapılması önerilmekle birlikte, karar verme süresinin çok kısa olması nedeniyle, uygulamak her zaman mümkün olamamaktadır. Günümüzde, gelişen teknolojiler ile, tek antijen tanımlama yöntemiyle belirlenen LSA, ve bunların DSA olup olmadığı ve MFI değerleri saptanabilmektedir. Böylece, saptanan antikorlarla vericinin doku grupları karşılaştırılarak VXM yapılabilir. VXM testleriyle hiperakut rejeksiyona neden olabilecek antijen antikor birliktelikleri belirlenebilir^{13,14}.

1.2. Allogreft Kalplerin Nakil Sonrası İzlemi ve Karşılaşılan Sorunlar

1.2.1. Allogreft nakil kalplerde akut rejeksiyonların sıklığı ve sonuçları

Akut rejeksiyonlar, nakil sonrası ilk aylarda sık görölen bir komplikasyondur. Bu rejeksiyon ataklarının çoğunluğu akut T hücre aracılı (hücrel) rejeksiyonlardır (ACR) ve günümüzde, rutin immünsupresyon tedavisinin güçlendirilmesi ile kolayca kontrol altına alınabilmektedir¹⁵. Antikor aracılı rejeksiyon (AMR) atakları, diğer ifadelerle hüморal veya vasküler rejeksiyon atakları ise, klinik ve histomorfolojik olarak daha zor tanınan ve tedavi yönetimi daha tartışmalı olan süreçler oluřturur¹⁶. Nakil sonrası dakikalar içinde gelişen hiperakut rejeksiyonlar dahil, AMR atakları ilk aylarda veya yıllar içinde görölebilir. Nakil öncesi önlemler ve duyarsızlaştırma tedavileri sayesinde hiperakut rejeksiyonlar günümüzde nadiren görölmektedir. ‘Uluslararası Kalp ve Akciğer Nakli Derneği’nin (ISHLT) 2009

raporunda, 2004-2008 yılları arasında kalp nakilli hastaların %21 ile 30'unun ilk 1 yıl içinde tedavi gerektiren rejeksiyon atakları geçirmiş oldukları bildirilmiştir¹⁷. ISHLT 2014 raporuna göre, nakil sonrası ilk bir yıl içinde herhangi bir tipte rejeksiyon atağı geçirme sıklığı, 2004-2006 yılları arasında %30 iken, 2010-2011 yıllarında bu oran %25'e gerilemiştir. Hafif dereceli (grade 1R) ACR atakların sadece izlem gerektirmesi nedeniyle, akut tedavi gerektiren rejeksiyon sıklığı 2004-2006 arasında %23 iken, 2010-2011 yıllarında ise %13'e gerilemiştir¹⁸. ISHLT 2009 raporunda, 1992-2008 arasında meydana gelen ölümlerde akut rejeksiyonların payı, ilk bir ayda %6, bir ay ile bir yıl arasında %12, bir yıl ile üç yıl arasında ise %10 ve beş yıldan sonra %2'den az olduğu bildirilmiştir¹⁷. Bu verilere dayanarak, nakil sonrası ölümlerde rejeksiyonların payının zamanla azaldığı sonucuna varılabilir. Bu, zaman içinde rejeksiyonların tanı ve tedavisindeki gelişmelerin başarısı olarak değerlendirilebilir¹⁹. Bununla birlikte, kronikleşmiş AMR ataklarının greft kalbe verdiği immün hasar önemli bir klinik sorun oluşturmaya devam etmektedir. ISHLT 2014 raporuna göre, akut rejeksiyonlar ilk 3 yıldaki ölümlerin %11'inden sorumlu tutulurken, kronik hasar greft yetmezliklerine neden olmaktadır¹⁸. Böylece, tekrarlayan rejeksiyon atakları kalp nakilli hastalar için tüm yaşam boyunca ölüme yol açabilecek bir tehdit olmayı sürdürmektedir. Tekrarlayan AMR atakları, hızlandırılmış greft arteriosklerozu olarak bilinen kronik allograft vaskülopatisine (CAV) neden olarak fonksiyon veya organ kaybı ile sonuçlanan ağır morbidite ve mortaliteden sorumlu tutulmaktadır⁴⁻⁸. AMR atakları sırasında, epikard arterlerinden miyokardial interstisyel kılcal damarlara kadar tüm kalp vasküler ağında meydana gelen endotelial hasar bazı morfolojik değişikliklere de yol açmaktadır. Kılcal damarlarda kapillerit, epikardial koroner arterler, delici arterler ve miyokardiyal arteriollerde ise, endotelit, intimit, transmural arterit gibi çeşitli derecelerde inflamatuvar reaksiyonlara ve konsantrik miyointimal proliferasyonlara neden olmaktadır. Bu histopatolojik değişikliklerin bir kısmı radyolojik olarak da görüntülenebilmekte ve CAV olarak değerlendirilmektedir. Akut AMR ataklarının genellikle erken greft fonksiyon kaybı ile ortaya çıktığı bilinmekteydi. Ancak, son yıllarda CAV'ye ikincil olduğu düşünülen AMR ilişkili geç hemodinamik bozukluklar bildirilmektedir. Bununla birlikte, karmaşık etkileşimler ile, AMR dışı faktörlerin de CAV oluşum mekanizmalarına katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir^{20,21}. Belirti veya bulgu vermeyen AMR ataklarının klinik önemi hakkında henüz sınırlı sayıda ve çelişkili yayınlar bulunmakla birlikte, son çalışmalarda, uzun yıllar sürebilen subklinik AMR ataklarının greft kalp yetmezliği ile ilişkisi saptanmıştır²²⁻²⁴.

1.2.2. Allogreft kalplerde histopatolojik akut hücresel rejeksiyon (ACR)

ISHLT, 1990 yılında akut rejeksiyonların tanımlanması ve derecelendirilmesi için bazı histopatolojik kriterler belirledi²⁵. Böylece klinisyenin immünsupresif tedavi yönetimine patoloğların rehberlik etmesi amaçlandı. Miyokardial interstisyumda lenfosit infiltrasyonu varlığı, yaygınlığı ve şiddetini temel alan bu kriterlere göre, skor 1 veya 2 olarak derecelendirilen rejeksiyonlar düşük dereceli kabul edilmekte ve asemptomatik hastalarda sadece izlem önerilmekteydi. Ancak, skoru 2 olan rejeksiyonlar tartışmalıydı; bazı merkezler tedavi edilebilir kabul ederken, diğerleri böyle bir grubun varlığından emin değillerdi. Bu ikinci gruba göre skor 2 rejeksiyonlar hemodinamik bozukluklara neden olmuyordu ve immünsupresif tedavi güçlendirilmese de progresyon göstermiyorlardı. Bu nedenle, skor 1 ve 2 gruplarının gerçek akut rejeksiyonu temsil etmediğini ileri sürdüler²⁶. Yüksek dereceli kabul edilen skor 3A, 3B ve skor 4 rejeksiyonlarda immünsupresif tedavinin güçlendirilmesi gerekliliği genel olarak kabul gördü. Ancak, 1990 skorum sistemi zaman içinde önemli sorunlar gözlemlendi ve bu sistemi yeniden gözden geçirmek üzere, 2004 yılında ISHLT çok merkezli multidisipliner bir toplantı daha yaptı. Bu toplantıda, ACR skorumunda revizyona gidildi; eski sistemdeki Skor 1A, 1B ve 2, yeni sistemde Grade1R (hafif derecede ACR) olarak, 3A skoru Grade2R (orta derecede ACR) olarak, 3B ve 4 skorları ise Grade3R (şiddetli derecede ACR) olarak kabul edildi (Tablo 1.1). Bu toplantıda ayrıca, ‘quilty effect’ olarak bilinen subendokardial nodüler lenfoid agregatların, her iki tipinin de (A veya B) masum lenfoid agregat olduğu ve klinik öneminin olmadığı vurgulanmıştır²⁷. Bu skorum sistemi, dünya genelinde kalp nakil merkezlerinde ve bizim merkezimizde, EMB raporlarken ACR tanısında ve skorumunda halen kullanılmaktadır.

Tablo 1.1. Akut Hücresel Rejeksiyonlar (ACR) İçin ISHLT 1990 ve 2004 Skorum Sistemleri

Revize Skor (2004)	Histomorfolojik Bulgular (2004)	Skor (1990)
Grade 0R*	Rejeksiyon yok	Grade 0
Grade 1R, hafif derecede	Tek odakta miyosit hasarının eşlik ettiği interstisyel/perivasküler lenfosit infiltrasyonu	Grade 1A ve 1B Grade 2
Grade 2R, orta derecede	2 veya daha çok odakta miyosit hasarının eşlik ettiği lenfosit infiltrasyonu	Grade 3A
Grade 3R, şiddetli derecede	Multifokal miyosit hasarının eşlik ettiği diffüz lenfosit infiltrasyonu	Grade 3B Grade 4

*‘R’ revize skoru işaret eder; 1990 şemasındaki skorlardan ayırt edilebilmesi için eklenmiştir²⁷.

1.2.3. Allogreft kalplerde histopatolojik akut hümorale rejeksiyon (AMR)

Greft kalplerde AMR'un bazı histopatolojik bulgularını literatürde ilk kez 1989'da Hammond ve arkadaşları tanımlamışlardır²⁸. Bazı olgularda, hemodinamik bozukluk olmasına rağmen histopatolojik incelemelerde ACR bulguları olmadığı, ancak miyokardial kılcal damarlarda belirginleşme ve reaktif endotelial değişiklikler bulunduğu, ayrıca bazılarında immünflöresan mikroskopide damar duvarlarında immünglobulinler ve/veya kompleman depolanmaları olduğu dikkati çekmiştir. Bu bulguların eşlik ettiği olgularda, klinik tablonun ACR ataklarından daha ağır seyrettiği, üstelik ACR tedavi protokollerine yanıt vermediği bildirilmiştir. Ayrıca, bu bulguların allogreft koroner hastalığı oranlarında artış ve greft kaybı ile birliktelik gösterdiği vurgulanmıştır. 1997'de Mills ve arkadaşları çok merkezli bir çalışma ile, hemodinamik bozuklukların eşlik ettiği düşük skorlu rejeksiyonların uzun dönem sonuçlarının yüksek skorlu rejeksiyon ataklarına göre daha kötü olduğunu göstermişlerdir²⁹. Bu bulgular ışığında, ACR bulguları olmayan bu olgular, temel sorunun lenfositik infiltrasyona bağlı hasardan farklı immünolojik mekanizmalarla oluştuğu bir başka klinik antite olarak gündeme getirilmiştir. Bu gözlemler sonucunda, ISHLT 2004 toplantısında, histopatolojik AMR bulgularına netlik getirilmeye çalışılmış, ancak standart kantitatif kriterlerin oluşturulması için çok merkezli geniş serili çalışmaların gerekliliği vurgulanmıştır. ISHLT 2013 buluşmasında nakil kalp biyopsilerinde patolojik AMR (pAMR) tanısına bir standart getirebilmek için bir çalışma formülasyonu geliştirilmiştir³⁰. Önerilen ISHLT 2013 pAMR formülasyon şeması sadece histomorfolojik ve immünopatolojik bulguların kombinasyonunu esas almıştır. Nakil kalp biyopsilerinde AMR için önerilen histopatolojik kriterler, miyokardial interstisyel kılcal damarlarda endotel aktivasyonu veya denudasyonu ile lümende makrofajlar veya nötrofillerin varlığının ışık mikroskopi ile saptanmasını, kılcal damar endotelinde immünoglobulinlerin (IgG, IgM ve/veya IgA) ve kompleman bileşenlerinin (C3c, C3d, C4d, C1q) birikiminin ve antivimentin ve/veya anti-endotelial hücre antikorları gibi HLA dışı antikorların varlığının immünflöresan ve/veya immünohistokimyasal teknikler ile gösterilmesini kapsar (Tablo 1.2). 2015'de 13. Banff Buluşması'nda nakil kalp biyopsilerinde AMR tanısındaki son gelişmeler ele alınmış, sonuçlar 2017'de bir rapor halinde yayınlanmıştır. Bu raporda EMB, AMR tanısında da primer tanısal yöntem olarak vurgulanmış ve ISHLT tarafından hazırlanan son AMR sınıflandırmasının bazı sorunları bulunmasına rağmen yararlılığına dikkat çekilmiştir³¹. Böylece diğer kalp nakil merkezlerinde ve merkezimizde, patoloji rutininde, AMR tanısı, isimlendirilmesi ve derecelendirilmesinde ISHLT 2013 pAMR formülasyon şeması halen

kullanılmaktadır. Bu çalışmadaki olguların AMR sınıflaması ve skorlaması bu şemaya göre yapılmıştır.

Tablo 1.2. ISHLT 2013 Patolojik AMR Formülasyon Şeması³⁰

Derece	Tanım	Bulgular
pAMR 0	Patolojik AMR yok	Histolojik ve immünopatolojik bulgu yok.
pAMR 1 (H)	Histopatolojik AMR	Histolojik bulgu var, immünopatolojik bulgu yok.
pAMR 1 (İ)	İmmünopatolojik AMR	Histolojik bulgu yok, immünopatolojik bulgu var (CD68+ makrofaj ve/veya C4d+ endotel).
pAMR 2	Patolojik AMR	Histolojik ve immünopatolojik bulgu var.
pAMR 3	Şiddetli Patolojik AMR	İnterstisyel hemoraji, kapiller fragmentasyon, mikst inflamatuvar infiltrat, endotelyal piknozis ve/veya karyoreksis, belirgin ödem ve immünopatolojik bulgu var.

1.2.4. Allogreft kalp izleminde serolojik antikor testlerinin önemi

ISHLT, 2010 buluşmasında, subklinik AMR olgularının yakalanabilmesi için, pAMR formülasyonu kullanılırken klinik ve serolojik verilerden (greft disfonksiyonu veya DSA'dan) bağımsız karar verilmesi gerektiği vurgulanmıştır¹⁶. Ancak, nakil kalp alıcılarının özgün durumları nedeniyle, klinik ve serolojik veriler eşliğinde topyekün değerlendirilmesi hayati önem taşımaktadır. Son zamanlarda, histomorfolojik ve/veya klinik olarak AMR şüphelenilen hastaların çoğunda etken ajanlar olarak HLA veya HLA dışı antikor düzeylerine bakılmaktadır. Literatürde, birçok çalışmada, nakil kalp biyopsilerinde immüno-histopatolojik AMR tanısı ile serumda donör spesifik HLA antikorları bulunması arasında anlamlı ilişki bulunmuştur^{4,5}. Ayrıca, DSA pozitif AMR olgularında, daha sık CAV geliştirme riski^{6,7}, ayrıca daha düşük allogreft sağ kalımı ve mortalite oranları^{7,8} bildirilmiştir. Kısaca, DSA pozitifliği AMR tanısı almış allogreft kalp alıcılarında yüksek sensitivite ve negatif prediktif değere sahiptir³². Bu bulgulara dayanarak, son yıllarda, AMR izlemi için kantitatif DSA MFI düzeyleri, temel bileşen olarak sunulmaktadır. Bu çerçevede, orta ve yüksek riskli kalp alıcılarında, en az, 3, 6, 9 ve 12. aylarda, düşük riskli alıcılarda ise, 3, 6, 12. aylarda, daha sonra yılda bir kez olmak üzere, DSA testi ile serolojik tarama, eğer endikasyon varsa ek testler ile izlem önerilmektedir. Direngen yüksek DSA MFI düzeyleri saptanırsa, subklinik AMR'un dışlanması için EMB yapılması önerilmektedir. Patolojik incelemede pAMR saptanması veya allogreft kalpte fonksiyon bozuklukları bulunması durumlarında AMR tedavisi yapılması tavsiye edilmektedir³¹. Ayrıca pAMR şiddeti ile DSA korelasyonunun ve tedavinin etkinliğinin izlenmesinde DSA testinin kullanılması önerilmektedir³¹.

1.2.5. Nakil kalp alıcılarında akut hümmoral rejeksiyon (AMR) tedavi protokolleri

Kardiak AMR için tedavi protokolleri hala geliştirilmektedir ve en uygun yaklaşım konusunda bir fikir birliğı yoktur. Bununla birlikte, AMR için mevcut tedavi stratejilerinden bazıları şunlardır:

1. Plazmaferez (PF): Bu yöntem, plazmayı diğerk kan bileşenlerinden ayıran bir makine kullanarak dolaşımdaki antikorların hastanın kanından uzaklaştırılmasını sağlar. Amaç, donöre özgü antikorların (DSA) seviyelerini azaltmak ve greft sağkalımını iyileştirmektir.
2. İntravenöz immünglobulin (IVIG): Bu yöntem, dolaşımdaki antikorları nötralize etmek ve enflamasyonu azaltmak için hastaya yüksek dozda immünoglobulin uygulanmasını içerir.
3. Rituximab: Bu, antikor üretiminden sorumlu matür B hücrelerini hedef alan monoklonal bir antikordur. Rituximab, B hücrelerini tüketerek dolaşımdaki antikor seviyelerini azaltabilir ve greft sağkalımını iyileştirebilir.
4. Bortezomib: Bu, plazma hücreleri tarafından antikor üretimini azaltabilen bir proteazom inhibitörüdür.
5. Kompleman inhibitörleri: Bu ilaçlar, AMR patogeneğinde rol oynayan kompleman sisteminin aktivasyonunu engelleyebilir.
6. Duyarsızlaştırma (Desensitizasyon) protokolleri: Bunlar, DSA seviyelerini azaltmak ve yüksek derecede duyarlanmış alıcılarda transplantasyona izin vermek için immünosüpresif ilaçlar (Rituximab, Bortezomib gibi), PF ve IVIG kombinasyonunun uygulanmasını içerir³³.

Tedavi seçimi, AMR'nin ciddiyetine ve hastanın genel sağlık durumuna bağlıdır. AMR'nin optimal yönetimi için, klinisyenler, patologlar ve immünologları kapsayan, sıkı iletişim ve işbirliğini gerektiren, multidisipliner bir yaklaşım esastır.

1.3. Rejeksiyonda Rol Oynayan İmmünolojik Mekanizmalar

1.3.1. HLA sistemi

HLA, 'İnsan lökosit antijeni' veya 'majör doku uyumluluk kompleksi (MHC)' olarak da isimlendirilen, 6. Kromozomun kısa kolu üzerinde sentromere yakın genomik bölgede geniş bir gen ailesi tarafından kodlanan hücre yüzey moleküllerini ifade eder. Bu moleküller bağışıklık sistemi hücrelerinin kendi aralarında ve diğerk doku hücreleri ile etkileşimlerinde önemli işlevler görürler. Sınıf-I (HLA-A, B, C), sınıf- II (HLA-DR, DP ve DQ) ve sınıf-III

olmak üzere üç alt grup olarak sınıflandırılır. Sınıf III bölgesi, tümör nekroz faktörü (TNF), kompleman faktörleri (C3, C4 ve C5 gibi) ve ısı şoku proteinlerinin immün düzenleyici molekülleri kodlayan genleri içerir. Doku nakillerinde ağırlıklı olarak alıcı ve verici (donör) için Sınıf-I ve Sınıf-II HLA uyumu öne çıkar. Sınıf-I HLA molekülleri, tüm çekirdekli hücre yüzeylerinde ve trombositlerde ifade edilir ve hücre içi peptid yapılı antijenleri ‘CD8+ sitotoksik T hücreleri’ne sunarlar. Sınıf-II HLA molekülleri ise, monosit/ makrofaj dizisindeki histiyositik hücrelerde ve B lenfositlerde, ayrıca aktive T lenfositlerde ifade edilirler. Görevleri hücre dışında bulunan antijenik molekülleri ‘CD4+ yardımcı T hücreleri’ne sunmaktır². HLA genleri polimorfik yapıda olup, 20.01.2024 tarihi itibarıyla sınıf-I için 26.610, sınıf-II için 11.398 tanımlanmış alel varlığı bildirilmektedir³⁴. Verici bireyin doku HLA antijenlerinin alıcı bireyin T hücreleri tarafından yabancı (non-self) antijen olarak tanınması rejeksiyon sürecini başlatmaktadır. Bu nedenle, alıcı ile vericinin HLA uyumsuzluğu nakil sonrası tedavi yönetimini güçleştirmektedir. Ancak kalp nakli koşulları, doku uyumunun istenilen düzeylerde olmasını güçleştirmektedir. Bekleme listesinde bulunan alıcı adaylarının HLA doku gruplarının ve HLA antikorlarının varlığının bilinmesi, nakil sonrası ortaya çıkabilecek hem T hücre aracılı hem Antikor aracılı immün yanıtların izlenmesinde önem kazanmaktadır.

1.3.2. Kompleman sistemi

Kompleman sistemi, basamaklı (kaskad) bir akış yöntemiyle çalışan, efektör proteinlerin yanı sıra reseptörler ve düzenleyicilerden oluşan çok işlevli bir sistemdir. İmmün sistemin doğuştan gelen elemanları olarak kompleman faktörleri, hem doğal hem edinsel bağışıklığı güçlendirme kapasitesine sahiptir. Kompleman sistemini oluşturan proteinlerin sentezi fetal hayatta karaciğerde başlar ve serbest dolaşıma salınır. Günümüze kadar 30 kompleman proteini tanımlanmıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu 3 farklı mekanizma ile gerçekleşir. Birincisi, klasik yoldur ve aktive olması için antikor varlığına ve antijen-antikor kompleksinin oluşmasına gereksinim vardır. Bu yolda, kompleman aktivasyonu yapan antikorlar, IgM veya IgG (özellikle IgG1 ve IgG3 alt grupları) yapısındadır. Klasik yoldaki aktivasyonda, ilk basamakta, kompleman faktörlerinden C1q aktive olur. Daha sonra kaskad şeklinde birbirini tetikleyerek devam eden aktivasyon, diğer iki yoldaki alternatif yol ve mannoz bağlayan lektin yolu aktivasyonu ile ortak yol olan C3 aktivasyonu ile devam eder. Bu aktivasyon sürecinde ortaya çıkan C3a, C4a, C5a gibi ara ürünlerin immün yanıtta özellikle inflamatuvar hücrelerin çağrılmasında güçlü etkileri vardır. C3a, C4a, C5a, nötrofil,

monosit ve makrofajlar için kemotaktik etki gösterir ve vazoaktif cevabı tetikler. Son ürünü oluşturan C5b, C6, C7, C8 ve C9 düz kas ve endotel hücrelerinde enflamasyon başlatıcı değişikliklere neden olur. Aktive olan kompleman sisteminin son ürünü 'membran atak kompleksi (MAK)' oluşumudur. Bu kompleks molekül, hedef hücrenin yüzeyinde porlar oluşturarak lizisle parçalanmasına neden olur. Kısaca, kompleman aktivasyonunun sonucu gerçekleşen 3 temel fonksiyon; patojenlerin opsonizasyonu, enflamatuvar hücrelerin ortama çekilmesi ve hedeflenen hücre ya da patojenlerin doğrudan öldürülmesidir². Kompleman sistemi işlevselliğini iki strateji ile güçlendirir: Kompleman kaskadındaki enzimatik reaksiyonlar yanı sıra, özgün reseptörler yoluyla veya reseptörden bağımsız por oluşumu yoluyla, lökositlerin, trombositlerin ve parankimal hücrelerin uyarılması. Kompleman sisteminin, özgün olmayan enflamasyonda, antikor aracılı ve T-hücre aracılı immün yanıtlarda aracılık ettiği mekanizmalar, nakil reddinin patogeneğinde özel bir öneme sahiptir. Günümüzde, komplemanın, lökositler, trombositler ve parankimal hücreler ile etkileşimlerini sağlayan mekanizmaları anlamak, rejeksiyon tanısında ve tedavi yönetiminde bazı fırsatlar sunmaktadır. Son yıllarda, patoloji rutininde bazı kompleman faktörleri (C4d, C3d, C3c, C1q gibi) rejeksiyonla ilgili patolojik immün belirteçler olarak yer almıştır. Ancak bu testlerin özgüllüğü ve duyarlılığının yetersizliğinden kaynaklanan sınırlılıklar zaman içinde anlaşılmıştır. Feucht ve arkadaşları, erken kompleman bileşenlerinden biri olan C4'ün son bölünmüş ürünü olan C4d'nin greft böbreklerde AMR için bir belirteç olabileceğini göstermiş, böylece tanısal böbrek patolojisine önemli bir yeni yöntem eklemiştir³⁵.

Daha sonraki çalışmalarda, C4d'nin klinik olarak her zaman greft disfonksiyonu ile ilişkili olmadığı, C3d'nin daha ciddi rejeksiyonu işaret ediyebileceği bildirilmiştir³⁶. Çünkü C3 bölünmüş ürünleri C4 bölünmüş ürünlerinden daha fazla tetikleyici inflamatuvar işleve sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, C5a ve MAC'e verilen vasküler yanıtların AMR tanısında yararlı ip uçları sunabileceği ileri sürülmüştür. C5a ve MAK oluşumu sonucunda endotelial hücrelerden vonWillebrand Faktörü, P- selektin ve CD63 salınımı olur. Endotel yüzeyinde ifade edilen P-selektine trombositler bağlanırlar. Bağlanan trombositlerin aktivasyonu sonucu granüllerinde bulunan 'interlökin 1- beta', 'makrofaj inflamatuvar protein' gibi lökosit aktivasyonunu tetikleyici inflamatuvar moleküller salınır³⁶. Greft kalplerde AMR tanısında mikrosirkülasyonda izlenen reaktif endotelial değişiklikler ve kapillerit olarak tanımlanan kılcal damar lümenlerinde makrofaj veya parçalı lökositlerin varlığı tüm bu reaksiyonların morfolojik yansımalarını temsil eder.

1.3.3. Antikor aracılı rejeksiyonda B hücrelerinin rolü

B hücreleri, DSA üretiminde ve nakledilen organa karşı müteakip immün yanıtta çok önemli bir rol oynamaktadır. B hücreleri, nakledilen organda bulunan antijenleri hedef alarak doku hasarına ve greft işlev bozukluğuna yol açabilen her tipte antikor üretiminden sorumludur. İnflamatuar infiltrat içinde plazma hücreleriyle birlikte B hücrelerinin varlığı AMR'nun tipik bir özelliğidir³⁷. Ayrıca, AMR bağlamında B hücrelerinin varlığı, steroidler gibi geleneksel immünsupresif tedavilere direnci gösterebilir ve AMR tedavi yönetiminde B hücrelerini hedeflemenin önemini vurgular. B hücrelerini tüketen monoklonal bir antikor olan rituximab gibi B hücrelerini hedef alan terapötik stratejiler, AMR için potansiyel bir tedavi seçeneği durumundadır. Bu tedaviler, B hücrelerini hedef alarak DSA üretimini azaltmayı ve nakledilen organa karşı devam eden bağışıklık tepkisini hafifletmeyi amaçlamaktadır². B hücreleri rejeksiyonların bir kısmında kompleman aktivasyonu ile ilişkili olabilir çünkü C3d, CR2 reseptörleri aracılığıyla B hücrelerini aktive eder. Sarwal ve arkadaşları, pediatrik alıcılarda böbrek nakillerinin steroide dirençli rejeksiyonlarında B hücrelerinin kümелendiğini bildirmiştir³⁸. Baldwin ve arkadaşları ise, kronik rejeksiyon gelişmiş allogreft kalplerde, koroner arterlerde immünoglobulin üretimi ve plazma hücresi birikimi saptamışlardır³⁶. Bu bulgular, antikor üretimi ve kompleman aktivasyonunu içeren bir kısır döngüyü yansıtır olabilir.

1.3.4. Antikor aracılı rejeksiyonda endotelin rolü

Endotel, solid organ transplantasyonlarında, antikor aracılı rejeksiyonda kritik bir rol oynamaktadır. AMR'de, nakledilen organın endoteli humoral hasarın birincil hedefidir ve aktivasyonu ve işlev bozukluğu rejeksiyonun patogeneze katkıda bulunur.

Endotelin AMR'deki kilit rolleri şunları içerir^{37,39} :

1. Hümmoral hasarın ana hedefi endoteldir. Antikorların, özellikle donöre özgü antikorların endotelyal antijenlere bağlanarak endotelyal hücre aktivasyonuna ve hasarına yol açabildiği bilinmektedir. Deneysel kanıtlar, AMR'nin esas olarak donöre özgü HLA antikorlarının (DSA) Fc parçasının efektör fonksiyonları tarafından yönlendirildiğini, ancak endotelyal hücre aktivasyonu ve proliferasyonunun antikordan bağımsız olarak da teşvik edilebildiğini göstermektedir.

2. Tetikleyici enflamatuvar maddelerin üretimi: AMR ortamında aktive olan endotel hücreleri proinflamatuvar ve prokoagülan maddeler üreterek lokal enflamatuvar yanıt ve nakledilen organ içindeki trombotik olaylara katkıda bulunabilir.

3. Koruyucu özelliklerin kaybı: AMR durumunda endotel, antikoagülan ve anti-enflamatuvar özelliklerini kaybederek greftte immün aracılı hasarı daha da ağırlaştırabilir.

1.3.5. Antikor aracılı rejeksiyonda T hücrelerinin rolü

Solid organ nakillerinde, antikor aracılı rejeksiyon (AMR) ortamında T hücreleri, immün yanıt ve rejeksiyonun patogeneze katkıda bulunan birkaç önemli rol oynamaktadır. T hücrelerinin AMR'deki rolleri³⁷:

1. B hücresi yanıtlarının teşviki: T hücreleri, antikor üretimi de dahil olmak üzere B hücresi yanıtlarını destekleyebilir ve geliştirebilir. AMR ortamında, T hücreleri DSA üretimini uyarmak için B hücreleri ile etkileşime girebilir ve nakledilen organa karşı humoral immün yanıt katkıda bulunabilir.

2. Doğrudan vasküler hasar: T hücreleri kan damarlarında endotel ile doğrudan etkileşime girerek endotelial hasara ve vasküler patolojilere yol açabilir. Bu doğrudan etkileşim, AMR de dahil olmak üzere, her tür rejeksiyon patogeneze katkıda bulunabilir.

3. Geleneksel tedaviye direnç: AMR olgularında, özellikle B hücrelerinden zengin enflamatuvar infiltratlarda, T hücrelerinin varlığı, steroidler gibi geleneksel tedavilere direnç olduğunu gösterebilir. Bu direnç, nakledilen organa karşı bağışıklık yanıtının sürdürülmesinde T hücreleri ve B hücreleri arasındaki karmaşık etkileşimi vurgulamaktadır.

T hücrelerinin AMR'deki rolünün anlaşılması, immün yanıtın hem humoral hem de hücreli bileşenlerini ele alan hedefe yönelik terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için gereklidir. Ayrıca, T hücresi yanıtlarını modüle etmeyi amaçlayan stratejiler, AMR yönetimini iyileştirmek ve solid organ transplantasyonunda greft sağkalımını artırmak için umut vaatmektedir.

1.3.6. Antikor aracılı rejeksiyonda makrofaj ve doğal katil hücrelerin (NK) rolü

Makrofajlar, rejeksiyon sürecinde önemli bir rol oynar. İntravasküler CD68-pozitif makrofajlar AMR ile ilişkilendirilmiş ve C4d'ye kıyasla daha hassas bir histolojik belirteç

sağladığı öne sürülmüştür. Bu durum, makrofajların rejeksiyon sürecine dahil olduğunu ve AMR için bir belirteç görevi görebileceğini göstermektedir³⁹.

Doğal öldürücü (NK) hücreler de AMR'ye katkıda bulunan kritik öneme sahip bağışıklık hücreleridir. NK hücreleri geleneksel olarak MHC-uyumsuz kemik iliği naklinde rejeksiyon ile ilişkilendirilirken, artan kanıtlar solid organ naklinde de rol oynadıklarını göstermektedir. NK hücrelerinin inhibisyonunun, kronik aşamalarda AMR'yi geciktirerek uzun süreli allograft sağkalımıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu durum, NK hücrelerinin rejeksiyon sürecinde rol oynadığını ve AMR'yi azaltmaya yönelik terapötik müdahaleler için potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir³⁹.

1.3.7. Antikor aracılı rejeksiyon ve organ uyumunun moleküler mekanizmaları

Organ naklinde greft reddinin başlıca nedenleri arasında AMR ve ilişkili mekanizmalar yer alır. Bu ret süreci, donöre özgü HLA antikorlarının (DSA) ve A/B kan grubu antikorlarının komplemana bağımlı doku hasarına neden olma ve sonuçta AMR'ye yol açmadaki rolünü içerir. Ek olarak DSA'nın endotel hücre yüzeyinde eksprese eden HLA moleküllerine bağlanması, CD4+ T hücrelerinin alloreaksiyonunu tetikleyerek inflamatuvar bir ortamı indükleyebilir ve bu da greft reddine daha fazla katkıda bulunur. Alıcı CD4+ T hücrelerinin greft HLA-sınıf II'ye karşı allo-immün yanıt mekanizması, alıcı CD4+ T hücrelerinin greft hücreleri tarafından eksprese edilen HLA-sınıf II molekülleri tarafından tanınmasını ve aktivasyonunu içerir. Geleneksel olarak, doğrudan allo-tanımının, organ naklinin erken evresinde donör antijen sunan hücrelerin alıcı CD4+ T hücreleri tarafından tanınması yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, ortaya çıkan kanıtlar, alıcı CD4 T hücrelerinin organ nakli bağlamında endotel hücreleri gibi immün olmayan hücreler tarafından ifade edilen greft HLA-sınıf II molekülleriyle de reaksiyona girebileceğini göstermektedir. Ayrıca, alıcı CD4+ T hücrelerinin anti-HLA-sınıf I ve sınıf II antikorları tarafından aktivasyonunun, endotel hücrelerinin immünojenitesinin artmasına neden olabileceği, bunun da NFκB sinyalinin artmasına ve ardından kesme stresi altında CD4+ T hücresi alımına yol açabileceği vurgulanmaktadır. Ek olarak, son bulgular anti-A/B antikor ligasyonunun ERK inaktivasyonu yoluyla endotel hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu indüklediğini ve fizyolojik koşullar altında allo-antikorlar ile allo-reaktif CD4+ T hücreleri arasında karmaşık bir etkileşim olduğunu göstermektedir³⁹.

Diğer yandan bir greftin anti-donör antikorların varlığında dahi immün aracılı hasara ve fonksiyon kaybına direndiği bir durumu ifade eden konaklama (accommodation) veya organ

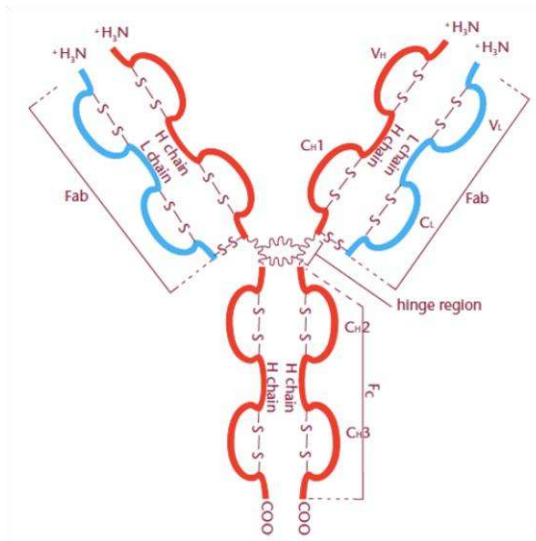
uyumu kavramını da tanımak ve konaklamanın altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak, nakledilen organların uzun süreli hayatta kalmasını teşvik etmek için terapötik stratejiler geliştirmek açısından çok önemlidir. Organ naklinde konaklamanın moleküler mekanizması, anti-donör antikorların varlığında bile nakledilen organın immün aracılı hasara karşı direncine katkıda bulunan birkaç temel süreci içerir. Endotel hücreleri üzerinde donöre özgü HLA antikor (DSA) ve anti-A/B antikor ligasyonu sonrasında PI3K/AKT sağkalım sinyallerinin aktivasyonu yoluyla antioksidan, anti-apoptotik ve kompleman düzenleyici protein genlerinin yukarı regülasyonu veya hücre dışı sinyal ile düzenlenen protein kinaz (ERK) pro-enflamatuvar sinyallerinin inaktivasyonu dahil olmak üzere, çeşitli mekanizmaların uyum sürecine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir. Özetle, uyumun moleküler mekanizması, immün aracılı hasara direnç sağlayan koruyucu genlerin ve sinyal yollarının yukarı regülasyonunu içerir ve böylece anti-donör antikorların varlığında nakledilen organların uzun süreli hayatta kalmasını teşvik eder.³⁹

1.4. İmmünglobulin G ve Alt Sınıflarının Yapısal ve Fonksiyonel Özellikleri

İmmünoglobulinlerin (Ig) organizasyonu, iki hafif zincir ve iki ağır zincirden oluşan heterodimerik glikoproteinleri içerir. Hem hafif hem de ağır zincirler, antijen (paratop) için temas bölgesini oluşturan değişken bölgeler ve protein birleşmesini sağlayan ve efektör

işlevlerine aracılık eden sabit bölgeler içerir.

İnsan Ig sistemi beş izotipe ayrılmıştır: IgM, IgD, IgA, IgE ve IgG. Bunlardan IgA ve IgG'nin ayrıca çeşitli alt sınıfları vardır. Ağır zincir sabit bölge genleri μ , δ , γ 3, γ 1, α 1, γ 2, γ 4, ϵ ve α 2 olarak sıralanır^{2,40} (Şekil 1.1).

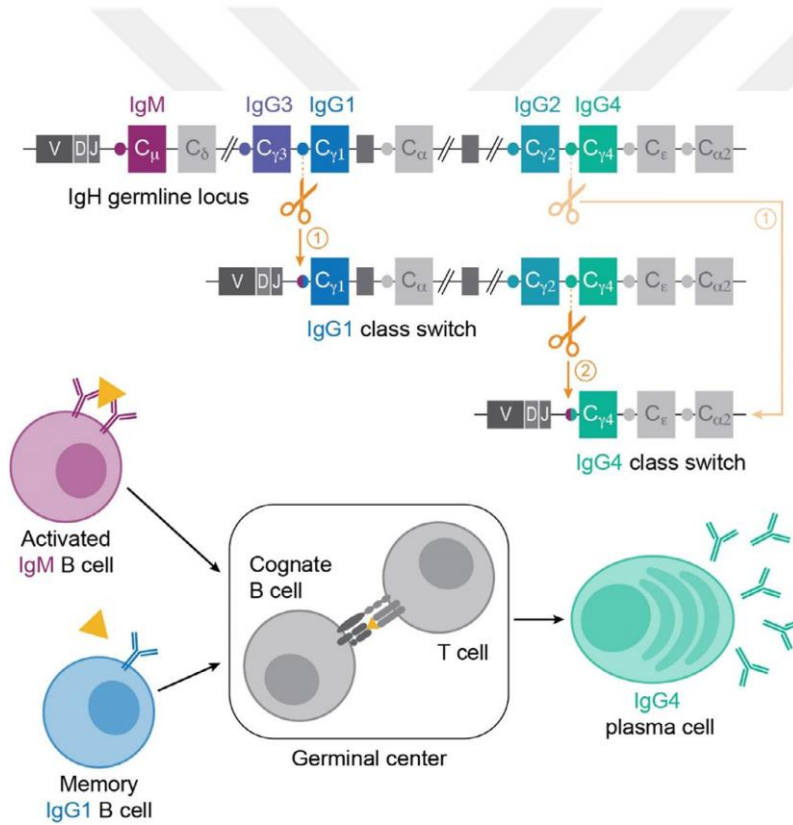


Şekil 1.1. İnsan immünoglobulin molekülünün

temel yapısının şematik çizimi. Amino terminal ucu, sırasıyla VH ve VL bölgeleri olarak adlandırılan, hem ağır hem de hafif zincirlerdeki dizi değişkenliği (V) ile

karakterize edilir. Molekülün geri kalanı nispeten sabit (C) bir yapıya sahiptir. Hafif zincirin sabit kısmı CL bölgesi veya alanı olarak adlandırılır. Ağır zincirin sabit kısmı ayrıca yapısal olarak üç farklı bölgeye bölünmüştür: CH1, CH2 ve CH3. Menteşe bölgesi ağır zincirin CH1 ve CH2 alanları arasında yer alan bir bölümdür. Karbonhidrat grupları, ağır zincirlerin (gösterilmemiştir) CH2 alanlarına bağlanır. Fab: Antijen bağlanma bölgesi; Fc: Kristalleşebilir bölge.⁴⁰

Sınıf değıştirmenin temelleri, B hücrelerinin farklı IgG alt sınıfları üretmek için sınıf değıştirmeye uğradığı moleküler mekanizmaları içerir. IgM üretilecek ilk alt sınıftır ve yalnızca antijen deneyimi olan B hücreleri diğer izotiplere sınıf değıştirir. Antijenin doğası IgG alt sınıf üretimini etkiler; timustan (T) bağımsız polisakkarit veya glikolipid antijenleri tipik olarak IgM ve IgG2'yi indüklerken protein antijenleri kanonik olarak IgG1 ve IgG3'ü uyarır. Terminal IgG4 alt sınıfının üretimi genellikle yalnızca alerji veya parazit enfeksiyonu gibi kronik antijen uyarımı ile görülür. T'ye bağı protein antijenleri foliküler B hücrelerini uyarır ve bu hücreler tipik olarak sınıf değıştirmiş Ig'ler üretmek ve hafıza B hücreleri oluşturmak için CD4⁺ T hücre sinyaline ihtiyaç duyar. T ve B hücreleri arasında bir sinaps oluşumu, B hücrelerini hazırlayan CD40-CD40L (CD154) etkileşimlerini kolaylaştırır^{40,41} (Şekil 1.2).

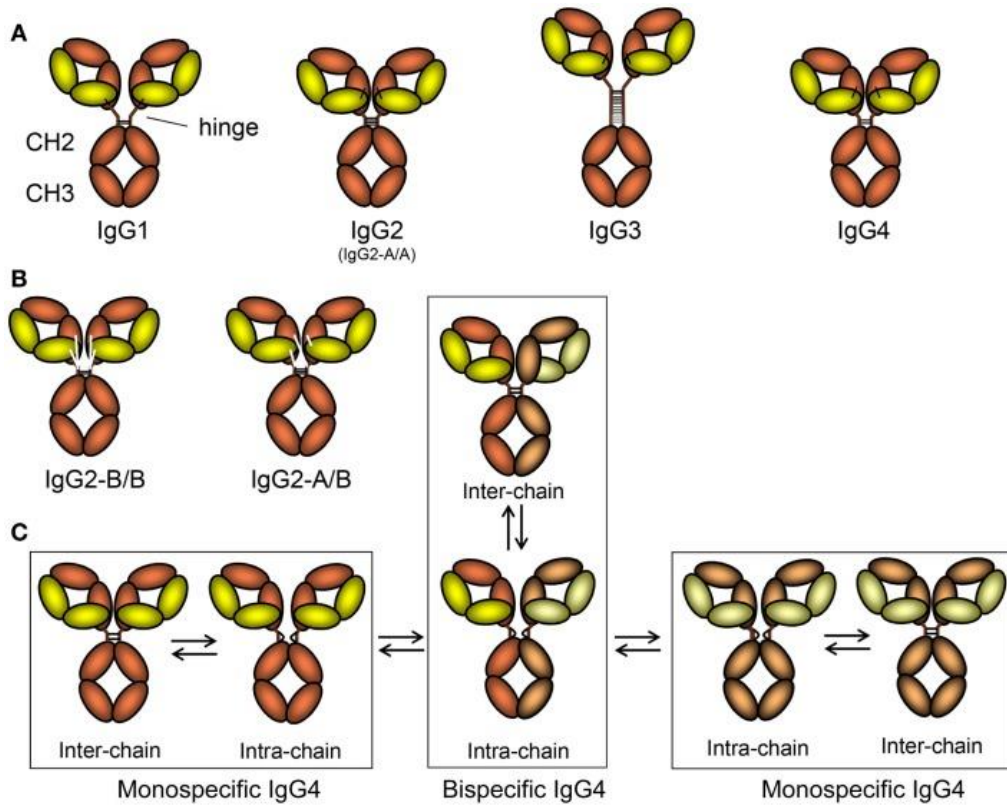


Şekil 1.2. İnsan immüoglobulin ağır zincir lokusu ve sınıf değıştirme potansiyeli. İmmüoglobulin ağır zincir lokusu (IgH), sınıf geçişini belirleyen DNA rekombinasyonunu kolaylaştırmak için her sabit bölge geninin (C) yukarı akışındaki anahtar dizilerini kullanır. Aşağı yöndeki IgG4 alt sınıfına sınıf geçişi, bir germinal merkez reaksiyonu içindeki birincil veya ikincil rekombinasyon olayından kaynaklanabilir. İkincil rekombinasyon olayları, tekrarlanan antijen maruziyetlerinden ve/veya kronik humoral immün yanıtlardan kaynaklanır⁴¹.

1.4.1. IgG'nin 4 farklı alt sınıfı, yapısal ve işlevsel farklılıkları

IgG'nin dört farklı alt sınıfı IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4'tür. Bu alt sınıflar yapısal ve efektör işlevleri bakımından farklılık gösterir. IgG1 serumda en bol bulunan alt sınıftır, IgG3 ise en kısa yarı ömürlü ve menteşe bölgesinde en fazla esnekliğe sahip alt sınıftır. IgG3 ve IgG1 klasik kompleman kaskadının en etkili aktivatörleri iken, IgG2, ancak yüksek antikor titresi veya yüksek antijen yoğunluğu koşulları altında komplemanı aktive edebilir.

IgG4 genellikle komplemanı aktive edemez. Ek olarak, ağır zincir sabit bölge 2'deki (CH2) N-bağlı glikan türlerindeki varyasyonlar antikor efektör fonksiyonunu önemli ölçüde etkileyebilir⁴² (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. IgG alt sınıflarının ve bunların izomerlerinin şematik düzeni. (A) Farklı ağır ve hafif zincirlerin nasıl bağlandığını, menteşenin uzunluğunu ve iki ağır zinciri birbirine bağlayan disülfid köprülerinin sayısını gösteren IgG alt sınıfları. Yönlendirme ve Şekil 1 ile karşılaştırma için menteşe, CH2 ve CH3 alanlarının konumu gösterilmiştir. İki ağır zincir arasında dört farklı disülfid köprüsü bulunan IgG2'nin klasik A/A izoformu burada gösterilmiştir, ancak (B)'de sadece iki disülfid köprüsü ve hafif zincirin ağır zincir formuna alternatif bağlantıları olan B/B formu, ara A/B formu ile birlikte gösterilmiştir. (C) IgG4'ün yarı molekül değişimiyle ortaya çıkan izomerleri. En solda ve en sağda, biraz farklı renklerde klasik olarak tasvir edilmiş iki IgG4 klonu B-hücrelerinden salgılandıktan hemen sonra gösterilmiştir. Bunlar iki zincir arası disülfid köprüsü ile birbirine bağlıdır. Ancak, bunlar aslında simetrik moleküller arasında kovalent bağların olmadığı formlar oluşturacak

şekilde indirgendiği bir denge halindedir. Bu form ya kovalent bağlı forma geri dönebilir ya da stokastik bir süreçte ağır zincirleri komşu IgG4 molekülü ile değiştirerek asimetrik bispesifik bir IgG4 (alt orta) oluşturabilir ve bu da akış halinde olup kovalent bağlı IgG4'e (üst, orta) geri dönebilir. Bu süreçle, insanlarda bulunan çoğu IgG4 monovalent-bispesifik molekülüdür⁴².

1.4.2. HLA antikorlarının IgG alt sınıflarının transplantasyondaki önemi

HLA antikorlarının IgG alt sınıflarının araştırılması transplantasyonda faydalı olabilir. Çünkü oldukça karmaşık ve dinamik olan HLA antijenlerine karşı humoral immün yanıt hakkında bilgi sağlayabilir. HLA antikorlarının IgG alt sınıflarını araştıran çeşitli çalışmalar vardır⁴³. Kompleman sistemini aktive etme kabiliyetine ve sınıf değiştirme yönüne bağlı olarak, üç model tanımlanmıştır: sadece kompleman bağlayıcı alt sınıflar (IgG3 ve/veya IgG1), kompleman bağlayıcı olmayan alt sınıflara genişleme (IgG3 ve/veya IgG1 artı IgG2 ve/veya IgG4) ve kompleman bağlayıcı olmayan alt sınıflara geçiş (IgG2 ve/veya IgG4) gibi. Çeşitli çalışmalar IgG alt sınıf paternini antikor aracılı rejeksiyon ve allogreft sonuçları ile ilişkilendirmiştir^{41,43}. Ancak, kullanılan IgG alt sınıf testindeki, analizlerin zaman faktörü ve sonuçların tanımındaki farklılıklar nedeniyle henüz net bir tablo ortaya çıkmamıştır.

1.4.3. IgG1 ve IgG3 alt gruplarının özellikleri ve farklılıkları

IgG1 ve IgG3 arasındaki, özellikle menteşe bölgesi ve Fcγ reseptör bağlanma bölgelerindeki yapısal farklılıklar, efektör işlevlerini doğrudan etkilemektedir. IgG3'ün daha uzun menteşe bölgesi ve benzersiz mutasyonları esnekliğini, kompleman aktivasyonunu ve Fcγ reseptörlerine bağlanmasını etkileyerek IgG1'e kıyasla farklı efektör işlevlerine katkıda bulunur. IgG1, antikora bağlı hücre aracılı sitotoksosite (ADCC) ve komplemana bağlı sitotoksositeye (CDC) aracılık etme yeteneği ile bilinir. Fcγ reseptörlerine, özellikle de bu efektör fonksiyonları için çok önemli olan FcγRI, FcγRIIa ve FcγRIIIa'ya yüksek bir afinitesi vardır. IgG3 ise, güçlü kompleman aktivasyonu ve patojenlerin etkin nötralizasyonu ile karakterize edilir. IgG3, daha fazla esneklik sağlayan ve IgG antikorunun Fab kollarının ve Fc kuyruğunun göreceli yönelimini ve hareketini etkileyen daha uzun bir menteşe bölgesine sahiptir. Yapı ve işlevdeki bu farklılıklar, bağışıklık tepkisinde ve antikor aracılı faaliyetlerde önemli bir rol oynayan alt sınıfa özgü varyasyonları vurgulamaktadır⁴².

1.4.4. IgG4 alt sınıfı ve diğer IgG alt sınıfları ile farklılıkları

IgG4, IgG1'e kıyasla daha kısa bir menteşe bölgesine sahiptir ve esnekliği IgG1 ve IgG2'ninki arasında orta düzeydedir. IgG4, iki farklı IgG4 antikorunun ağır zincirlerinin yer değiştirebildiği ve bispesifik antikorlarla sonuçlanan "Fab-kol değişimi" adı verilen bir süreçten geçebilir. Bu süreç, benzersiz bir ağır zincirler arası disülfid bağı modelinin varlığıyla kolaylaştırılır. IgG4, yarı molekül değişiminin tersine çevrilebilir oluşu nedeniyle farklı izoformlarda bulunabilir ve bu da monovalent-bispesifik moleküllerle sonuçlanır. IgG4, bloke edici bir antikor olarak hareket ederek alerjen toleransında rol oynar. Alerjenlere bağlanmak için IgE ile rekabet eder, böylece alerjik tepkilerde rol oynayan mast hücrelerinin ve bazofillerin aktivasyonunu önler. IgG4 immün modülatör fonksiyonlarla ilişkilidir ve immün yanıtların düzenlenmesinde rol oynar. Yüksek serum IgG4 seviyelerinin ve IgG4-pozitif plazma hücreleri tarafından doku infiltrasyonunun gözlemlendiği IgG4 ile ilişkili hastalıklar gibi durumlarla bağlantılıdır. IgG4, diğer IgG alt sınıflarına kıyasla Fcγ reseptörlerine daha az bağlanma sergileyerek, antijen bağlanması için diğer alt sınıflarla rekabet ederek, onların antikora bağlı hücre aracılı sitotoksisite (ADCC) ve komplemana bağlı sitotoksisite (CDC) gibi efektör fonksiyonlarını baskılayabilir⁴³. IgG4'ün menteşe bölgesi, disülfid bağı modeli ve Fab-kol değişimine uğrama yeteneği gibi benzersiz yapısal özellikleri, alerjen toleransı ve immün modülasyon gibi farklı işlevsel özelliklerine katkıda bulunur. Ayrıca, azaltılmış Fcγ reseptör bağlanması efektör fonksiyonlarını etkileyerek onu diğer IgG alt sınıflarından ayırır.

1.3.4. Araştırmamızın hipotezi ve amacı

Bizim çalışmamıza başlarken ortaya attığımız ilk tez; nakil kalplerin tekrarlayan sinsi AMR ataklarında IgG4 alt sınıf anti-HLA antikorlarının immün modülatör rolünün öne çıkıyor olabileceğiydi. Bunu araştırmak amacıyla yola çıktığımızda, kronik AMR sürecinde olduğunu düşündüğümüz küçük bir hasta grubu ile bir ön çalışma yaptık. AMR ve/veya ACR tanılı EMB spesmenlerinde, pozitif kontrollü yapılan IgG4 immün-boyamalarında, IgG4 pozitif plazma hücresine rastlanmadı. Bu hastaların biyopsileri ile eşzamanlı alınmış serum örneklerinde saptanmış DSA ve MFI düzeylerinin IgG pozitif plazma hücre sayıları ile ilginç bir şekilde korelasyon gösterdiği dikkatimizi çekti. Bu bulgular, renal transplantlarda, allograft kötü prognozu ve tedaviye direnç ile ilişkilendirilmiş olan 'plazma hücresinden zengin akut rejeksiyonların nakil kalplerdeki yansıması olabilirdi. Bu düşünce ile, direngen AMR ataklarıyla izlenmekte olan daha geniş bir hasta grubunda, EMB'lerde plazma hücrelerinin sıklığının ve IgG alt sınıf profilinin önemine odaklandık. Bu kez, immün-

tetikleyici rolü ile bilinen IgG1 ve IgG3 pozitif hücreleri immünohistokimyasal yöntemle aramayı ve olguların klinik, serolojik ve histomorfolojik özellikleriyle ilişkilerini araştırmayı hedefledik. Ayrıca, allogreft kalp biyopsilerinde, artan plazma hücre oranlarının histomorfolojik olarak tanı güçlüğü yaratan sinsi seyirli AMR ataklarında tanısal ve prognostik değere sahip olabileceği düşüncesiyle, daha geniş olgu serilerinde kontrollü yapılacak çalışmalar ile plazma hücre sıklığı için anlamlı bir eşik değeri belirlemek istedik.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmaya Kabul Edilen Olgu Profili

2003 ile 2023 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi'nde allograft kalp nakli yapılmış hastaların tüm biyopsi raporları ve Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi İmmünoloji Anabilim Dalı Transplantasyon İmmünolojisi Laboratuvarı arşivindeki kalp nakil hastalarına ait PRA ve DSA tanımlama testlerine ait sonuçlar ve test yapılmadan arşivlenmiş serum örnekleri elektronik ortamdaki kayıtlardan tarandı. Protokol veya endikasyon EMB'de ikiden çok pür veya ACR eşlik eden 'miks' AMR tanısı almış 16 hasta ve kontrol grubu oluşturmak üzere, ikiden çok pür ACR tanısı almış 1 hasta, ayrıca hiç rejeksiyon tanısı almamış 2 hasta, toplam 19 hasta mercek altına alındı. Böylece, bu çalışmaya 19 allograft kalp nakil hastasından alınmış 91 endomiyokardiyal biyopsi spesmeni dahil edilmiştir.

Vaka grubunu oluşturan 16 alıcının, farklı zamanlarda alınmış hem protokol hem endikasyon biyopsilerinden 85 adet EMB spesmeni, merkezimiz immünoloji laboratuvar arşivinde senkron serum örnekleri bulunan ve patoloji arşivimizde en az 2 endomiyokardiyal doku örneği ile temsil edilen parafin blokları bulunan olgulardan seçilmiştir. Bu olguların bir kısmı farklı tiplerde ve derecelerde histopatolojik rejeksiyon tanısı almış olgular iken küçük bir kısmı ise histopatolojik olarak herhangi bir rejeksiyon tanısı almamış olgulardır.

Kontrol grubunu oluşturan 2 alıcıdan birinin 13., diğerinin 4. protokol EMB spesmeni çalışmaya dahil edildi. Ayrıca, tekrarlayan pür ACR atakları olan ve hiç AMR tanısı almamış 1 alıcının pür ACR tanılı 3 adet ve rejeksiyon saptanmamış 1 adet olmak üzere, toplam 4 adet EMB spesmeni kontrol amaçlı çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışma grubunu oluşturan hastaların, immünohistokimyasal boyama için parafin bloklarında yeterli endomiyokardiyal doku içermeyen ve immünoloji laboratuvarında PRA/DSA tanımlama testlerini çalışmak için yeterli senkron serum örneği olmayan EMB spesmenleri çalışma dışında tutuldu.

Başvuru ve takip ile ilgili klinik veriler klinisyenden ve hastane kayıtlarından elde edildi. Hastalar ekokardiyografi ve dobutamin stres ekokardiyografi ile takip edildi.

2.2. Olgu Grubunu Oluşturan Kalp Alıcılarının Rutin Takip ve Tedavi Protokolleri

Merkezimizde kalp nakli almış hastalarda nakil öncesi ve sonrası uygulanan izlem ve tedavi protokolüne göre; alıcının nakil öncesi takiplerinde elde edilen immünolojik verilere göre, serumda tek antijen tanımlama yöntemiyle DSA olup olmadığı, varsa, MFI değerleri saptanan antikorlarla vericinin doku grupları karşılaştırılarak sanal çapraz eşleştirme (Virtual crossmatch) yapılmakta ve alıcının risk durumu belirlenmektedir. Yüksek riskli bulunan alıcılarda nakil beklerken, PF+IVIG+Rituximab üçlüsü ile duyarsızlaştırma (desensitizasyon) tedavisi uygulanmakta, diğer gruplarda nakil öncesi herhangi bir immünsupresyon kullanılmamaktadır.

Merkezimizde nakil sonrası uygulanan immünsupresyon protokolü, solid organ nakillerinden sonra çoğu nakil merkezinde uygulanmakta olan klasik protokol olup, kişiye özel belirlenmiş dozlarda, ‘mikofenolat mofetil+Takrolimus+Prednizolon’ üçlü tedavisinden oluşmaktadır. İyi seyirli greft kalp alıcılarında nakilden 1 yıl sonra prednizolon doz azaltılarak tedavi protokolünden çıkartılmaktadır.

Merkezimizde rutin uygulanan protokollere uygun olarak, bu çalışmaya dahil edilen kalp nakil hastaları, nakil sonrası ilk 2 hafta içinde bir veya iki, ikinci ve onuncu hafta arasında aylık ve 10 hafta ile 1 yıl arasında her 3 ayda bir protokol biyopsileri ve immünolojik tetkikler için senkron serum örnekleri alınarak izlenmişlerdir. Merkezimiz transplantasyon immünoloji laboratuvarına ait, PRA/DSA testleri için rutin uygulama protokolleri Ek 1 ve Ek 2’de sunulmuştur.

2.3. Histopatolojik Değerlendirme

Merkezimiz patoloji arşivinden, 19 greft kalpten alınmış 91 endomiyokardiyal biyopsi spesmenine ait Hematoksilen&Eozin (H&E) boyalı hazır preparatlar ve patoloji rutininde raporlama öncesi immünohistokimyasal (İHK) CD68, C4d, CD31 ve HLA-DR antikorları ile boyanmış hazır preparatlar çıkartılarak deneyimli bir patolog tarafından tekrar gözden geçirildi. Tüm biyopsi örnekleri, ışık mikroskobu ile 6 veya daha fazla mikroskopik seri kesitler ile değerlendirildi. Bu olgularda, akut hücrel rejeksiyonlar 2004 ISHLT revize skorlama sistemine²⁷ göre, akut humoral rejeksiyonlar ise ISHLT 2013 patolojik AMR formülasyon şemasına³⁰ göre derecelendirilmiştir. İmmünglobulinler (IgG, IgA, IgM), kompleman faktörlerine (C3c, C1q) yönelik yapılmış ve arşivlenmiş immünflöresan

mikroskopik inceleme preparatları zaman aşımı nedeniyle optimal değerlendirilemeyeceği için, olguların patoloji raporlarındaki sonuçlar dikkate alındı.

Çalışma spesmenlerine ait tüm parafine gömülü dokulardan, ek immün-belirteçler (CD138, IgG, IgG1 ve IgG3) ile boyanmak üzere, poly-L-lysine kaplı lamlara 5 mikron kalınlıkta kesitler alındı. İmmün-boyama için kesit alınan parafin bloklar en az 2 en çok 6 doku örneği içermektedir. İHK boyamaları 'DAKO/OMNİS stainer' otomatik boyama cihazında yapılmıştır. Kullanılan antikorlar, üretici firma, ürün klonu ve uygulanan teknik bilgileri Tablo 2.1'de özetlenmiştir. Birincil antikorlar avidin-biotin peroksidaz kompleksi yöntemi kullanılarak görünür kılındı. Substrat olarak diaminobenzidin kullanıldı. Kesitlerin hematoksilin ile karşı boyaması yapıldı. IgG1 hariç, tüm antiserumlar antijen alımı için sitrat ile ön işleme tabi tutuldu.

Nicel değerlendirme, tüm ek İHK antikorları için, işaretlenmiş plazma hücrelerinin ve endotel hücrelerinin en sık bulunduğu bir büyük büyütme alanı seçilerek bu alanda sayılmış ve diğer negatif inflamatuvar hücrelere veya negatif endotel hücrelerine göre yüzde oranı hesaplanmıştır.

Tablo 2.1. İmmünohistokimyasal inceleme için kullanılan antikorlar

Antikor	Üretici Firma	Klon	Uygulama
IgG	Protintech	poliklonal	1:100, Low PH
IgG1	Affbiotech	poliklonal	1:100, High PH
IgG3	Merck	monoklonal	1:100, Low PH
CD138 (Syndecan 1)*	Dako	monoklonal	Hazır dilüsyon, Low PH
CD68 (PGM1)**	Dako	monoklonal	Hazır dilüsyon, Low PH
C4d***	Medaxis	monoklonal	1:150, Low PH

*CD 138: Çeşitli normal ve tümöral dokularda ifade edilen bir transmembran proteoglikan'dır. Hücre çoğalmasının, göçünün ve hücre iskeletinin organizasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan bir hücre yüzeyi proteini olan sindekan ailesinin dört üyesinden biridir. Hematolenfoid dokulardaki plazma hücrelerini ayırt etmek ve miktarını belirlemek için rutin tanısal patolojide immünohistokimyasal bir biyobelirteç olarak kullanılır⁴⁴.

**CD68: Çeşitli normal ve tümöral dokularda bulunan ve öncelikle histiyositleri ve histiyositik tümörleri tanımlamak için rutin tanısal patolojide immünohistokimyasal bir biyobelirteç olarak kullanılan bir lizozomal transmembran glikoproteindir. KP1 ve PGM1 en sık kullanılan 2 antikor klonudur; PGM1 biraz daha spesifik işaretleyicidir⁴⁵.

***C4d: Kompleman parçalanma ürünleri, solid organ nakillerinde, antikor aracılı reddin yararlı belirteçleri olarak kullanılmaktadır. Bu ürünlerden biri olan C4d, artık renal ve kardiyak allograftlarda antikor aracılı rejeksiyon için rutin tanısal patolojide immünohistokimyasal bir biyobelirteç olarak geniş çapta kabul edilmektedir^{35,46}.

İmmünolojik tetkikler; Başkent Un. İmmünoloji A.D. Transplantasyon İmmünolojisi Laboratuvarında hastaların biyopsi ile eşzamanlı alınmış serumlarında gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu sekansına özgü oligonükleotid (PCR-SSO) tiplemesi, karşılık gelen DNA sekanslarının analizi yoluyla en iyi HLA spesifikliklerini tanımlama yeteneğini, normal ve etkilenmiş bireylerden oluşan geniş popülasyonların çalışılma olasılığı ile birleştirir. Merkezimizde uygulanan SSO Çalışma Prosedürü EK 1’de, PRA Tarama Sınıf I ve Sınıf II HLA Testi Çalışma Talimatı EK 2’de sunulmuştur.

2.4. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için SPSS, Version 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir. Sürekli değişkenler ortalama standart sapma olarak ve kategorik değişkenler yüzde olarak sunuldu ve olguların klinik ve histopatolojik parametreleri ile kullanılan immünohistokimyasal belirteçlerin işaretlenme indeksleri Pearson ve Fisher Exact ki-kare testleri, Student's t-testi, tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis varyans analizi testleri gibi tek değişkenli ve çok değişkenli istatistiksel yöntemlerle karşılaştırıldı. Değişkenler arasındaki doğrusal ilişkinin önemi ve gücü Pearson ve Spearman korelasyon analizi ile incelenmiştir. CD138, IgG, IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayısının AMR tanısındaki önemini belirlemek için ROC eğrileri kullanıldı.

3. SONUÇLAR

3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Kalp Alıcı Hasta Profilini Tanımlayan Bulgular

Çalışmamıza dahil edilen hastalar, 2007-2018 yılları arasında ilk kez allogreft kalp nakli yapılmış alıcılardı. Bu çalışmaya 19 allogreft kalp nakil hastasından alınmış 91 endomiyokardiyal biyopsi spesmeni dahil edildi. 19 hastanın %53'ü erkek olup (10 erkek ve 9 kadın), ortalama nakil olma yaşı 29,9 (Minimum 3 yıl, maksimum 53 yıl; SS = 14.9) olarak hesaplandı. Hastaların hastane kayıtlarındaki son başvuru tarihleri ve ölüm tarihlerine göre hesaplanan greft sağ kalım süresi ortalama 101,11 aydı (maksimum 198 ay, minimum 49 ay). Güncel kayıtlara göre olgu grubundaki 5 hasta kaybedilmişti. Çalışma grubunda 6 hasta ve kontrol grubundan 1 hasta olmak üzere toplam 7 hasta, nakil sonrası minimum 3 yıl maksimum 9 yıl içinde (median 8 yıl) CAV geliştirmişti (Tablo 3.1.1). Bunlardan tekrarlayan AMR atakları (en az 2, en çok 21 atak) olan 15 hastaya ait 81 EMB spesmeni çalışma grubunu oluşturdu. Bu grupta hafif derecede AMR (AMR-1) tanılı 20 adet spesmen (%22), orta ve şiddetli derecelerde (AMR2 ve AMR3) tanılı 16 adet (%17,6) ve miks AMR+ACR tanılı 32 adet (%35,2) ve rejeksiyon tanısı almamış 16 adet (%17,6) biyopsi spesmeni değerlendirildi. (Tablo 3.1.2).

Kontrol grubunu oluşturan herhangi bir rejeksiyon tanısı almamış 3 alıcıdan (16, 18 ve 19 numaralı hastalar) biri (18 numaralı) 6 yıl takip edilmiş ve bu süre içinde 13 adet protokol EMB spesmeni değerlendirilmiş, diğeri (19 numaralı) 6 ay takipli olup, 4 adet protokol EMB spesmeni değerlendirilmiştir. Nakil sonrası histopatolojik herhangi bir rejeksiyon tanısı almamış bu iki alıcının sadece son alınan biyopsi spesmenleri çalışmaya dahil edildi. 16 numaralı hasta ise rejeksiyonsuz 6 yıl takip sonunda AMR-1 tanısı almış ve rejeksiyonsuz 3 biyopsi spesmeni ve hasta bazında gözlemler yapabilmek için, AMR-1 tanılı son biyopsi spesmeni çalışmaya alınmıştır. Ayrıca sadece tekrarlayan pür ACR atakları olan ve hiç AMR tanısı almamış 1 alıcının (15 numaralı) pür ACR tanılı 3 adet ve rejeksiyon saptanmamış 1 adet olmak üzere, toplam 4 adet EMB spesmeni kontrol amaçlı çalışmaya alınmıştır (Tablo 3.1.1).

Olguların %37,4'ü herhangi bir zamanda AMR tedavisi almamış hastalardan alınmış biyopsilerdi. Olguların %39,6'sı 1 yıldan uzun süre önce, %15,4'ü 6 ay ile 1 yıl arasında bir süre önce, %7,7'si ise 6 aydan daha kısa bir süre önce PF +IVIG+Rituximab üçlü tedavisi almış hastaların biyopsileriydi. Olguların sadece %11'i 2 aydan kısa bir süre önce immünsupresyonu güçlendiren ve 'puls' metil prednizolon ile yapılan ACR tedavisi almıştı.

Olguların %53,8'inde klinik belirti veya bulgu yoktu, %1,1'inde sadece klinik şüphe vardı, %45,1'inde ise klinik bulgu ve/veya belirti vardı. Olguların hemen biyosi öncesi senkron yapılmış transtorasik ekokardiografisine göre, sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonları (LVEF) olguların %72,5'inde %50 ve üzeri, yani kabul edilebilir sınırlarda iken, %18,7'si %40-49 arasında ve %8,8'i ise %40'dan az olmak üzere, belirgin düşüşler göstermişti.

Tablo 3.1.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik ve klinik profili

Hasta No	Cinsiyet	Nakil Yaşı (yıl)	Primer Etiyoloji	NÖ desensitizasyon	CAV /NS gelişme zamanı	Greft sağ kalım (Ay)	AMR atakları (En az 2)
1	Erkek	14	ARVD	yok	yok	165	var
2	Kadın	45	Bilinmiyor	yok	yok	87*	var
3	Kadın	3	Bilinmiyor	yok	yok	124*	var
4	Erkek	12	Bilinmiyor	yok	Var/ 8 yıl	198	var
5	Erkek	11	DKM	yok	Var/ 8 yıl	143	var
6	Kadın	15	DKM	yok	Var/ 8 yıl	107*	var
7	Erkek	53	İskemik KM	yok	yok	56*	var
8	Kadın	21	RKM	var	yok	57*	var
9	Erkek	30	DKM	yok	Var/ 9 yıl	149	var
10	Erkek	50	Miyokardit	yok	Var/ 5 yıl	96	var
11	Kadın	26	Eozinofilik Miyokardit	yok	Var / 3 yıl	83	var
12	Erkek	26	Doğumsal KH	yok	yok	49	var
13	Erkek	47	İskemik KM	yok	yok	81	var
14	Erkek	17	Eozinofilik Miyokardit	yok	yok	81	var
15	Kadın	47	DKM	yok	yok	67	yok
16	Erkek	45	DKM	yok	Var/ 8 yıl	102	yok
17	Kadın	44	DKM	yok	yok	86	var
18	Kadın	42	DKM	yok	yok	95	yok
19	Kadın	21	Ailevi KM	yok	yok	95	yok

NÖ: Nakil öncesi, NS: Nakil sonrası, CAV: Kardiak allogreft vaskülopati, ARVD: Aritmojenik sağ ventrikül displazisi, DKM: Dilate kardiomyopati, KM: Kardiomyopati, RKM: Restriktif kardiomyopati, KH: Kalp hastalığı. *Ölüm ile kayıp

Tablo 3.1.2. Tanı gruplarına göre olgu dağılımı

Patolojik Tanı	N	%
Rejeksiyon yok	16	17.6%
AMR1(h veya i)	20	22.0%
AMR 2veya3	16	17.6%
miks AMR+ACR	32	35.2%
ACR1	3	3.3%
ACR2veya3	4	4.4%
Toplam	91	%100

3.2. Patolojik Tanı Gruplarına Göre Yapılan Analizlerde Elde Edilen Bulgular

Patolojik tanı gruplarını ‘Rejeksiyon yok, AMR1, AMR2 ve3, miks AMR+ACR, ACR-1R, ACR-2R ve 3R’ şeklinde 6 grupta topladık. Çalışma grubunu oluşturan AMR ataklarıyla seyreden 85 hastaya ait 86 adet EMB spesmeni (rejeksiyonlu veya rejeksiyonsuz) ile kontrol grubunu oluşturan rejeksiyonsuz 3 hastaya ait 5 adet spesmen karşılaştırıldığında, iki grup arasında CD138, IgG, IgG1, IgG3 pozitif inflamatuvar hücre sayıları ya da endotelial hücrelerde izlenen IgG, IgG1 ve IgG3 yönünden anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tüm rejeksiyonlu olgular ile rejeksiyon tanısı almamış (çalışma veya kontrol grubuna ait) olgular T testleri ile karşılaştırıldığında, endotelde IgG1 ($p = .072$) ve IgG3 ($p = .000$) pozitif hücre oranlarının %10 ve üzerinde olması ile herhangi bir tipte ve derecede rejeksiyon bulunması arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptandı.

Bağımsız örneklem T-test sonuçlarına göre rejeksiyon olan ve olmayan vakalar arasında DSA değerlerinde anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ($t(35) = -2.95, p = 0.006$). Rejeksiyon olan vaka grubunun DSA değerlerinin ($M = 2.06, SD = .72$) rejeksiyon olmayan vaka grubu değerlerine ($M = 2.06, SD = .72$) göre daha yüksek olduğu saptandı. İki vaka grubunun endotelde IgG1 ($t(88) = -2.90, p = .005$) ve IgG3 ($t(88) = -2.78, p = .009$) değerleri karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık göstermiştir. Herhangi bir tipte veya derecede rejeksiyon olan vaka grubunun IgG1 ve IgG3 endotelde pozitiflik değerlerinin rejeksiyon olmayanlara kıyasla daha yüksek olduğu görüldü.

Yapılan ANOVA analizi sonuçları vakaların patolojik tanı gruplarına göre karşılaştırıldığında, LSA ($F(4, 37) = 3.228, p < .05$) ve DSA ($F(3, 33) = 3.332, p < .01$) değerlerinin anlamlı bir şekilde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.1 ve 3.2). Pür ACR tanılı olgularda LSA veya DSA pozitifliği yoktu. DSA ve LSA pozitifliği baskın olarak

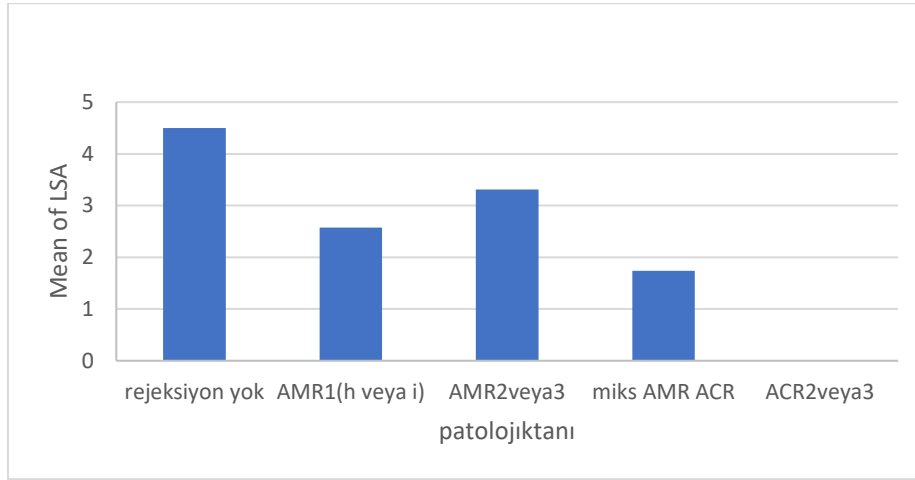
pür veya miks AMR olgularında yoğunlaşmış, bir kısmı ise histopatolojik rejeksiyon bulgusu olmayan olgularda saptanmıştır.

Tanı grupları arasında karşılaştırıldığında, sadece IgG1 pozitif hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdi; ACR-2R ve ACR-3R olgularında daha yüksek sıklıkta IgG1+ inflamatuvar hücre tespit edildi ($F(5, 85) = 2.517, p < .05$). Diğer parametrelerde tanı grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Rejeksiyonsuz olgularda IgG3 pozitif hücre saptanmadı (Tablo 3.2.1).

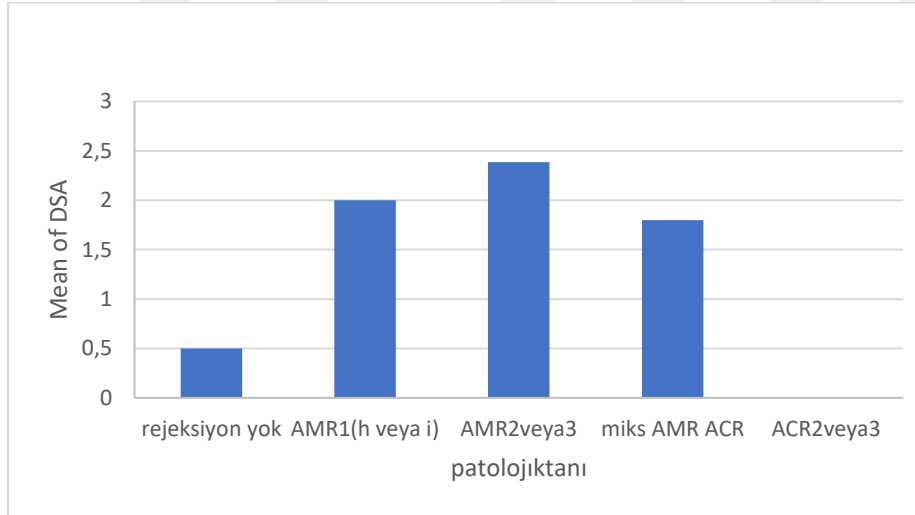
Tablo 3.2. Tanı gruplarına göre, CD138, IgG, IgG1 ve IgG3 (+) hücre sayıları dağılımı

Hücre sayısı	Tanı Grubu	N	Ortalama	Minimum	Maksimum
CD138+/1BBA*	rejeksiyon yok	16	2.1875	.00	8.00
	AMR1(h veya i)	20	14.9000	.00	85.00
	AMR2veya3	16	20.5000	.00	220.00
	miks AMR ACR	32	14.5938	.00	150.00
	ACR1	3	.3333	.00	1.00
	ACR2veya3	4	13.7500	.00	30.00
	Total	91	13.0110	.00	220.00
IgG+/1BBA*	rejeksiyon yok	16	5.3125	.00	30.00
	AMR1(h veya i)	20	12.7500	.00	60.00
	AMR2veya3	16	27.0000	.00	310.00
	miks AMR ACR	32	17.9063	.00	80.00
	ACR1	3	1.6667	.00	5.00
	ACR2veya3	4	2.7500	.00	6.00
	Total	91	14.9560	.00	310.00
IgG1+/1BBA*	rejeksiyon yok	16	.7500	.00	12.00
	AMR1(h veya i)	20	15.3500	.00	160.00
	AMR2veya3	16	12.4375	.00	105.00
	miks AMR ACR	32	21.5625	.00	120.00
	ACR1	3	3.3333	.00	10.00
	ACR2veya3	4	69.0000	.00	250.00
	Total	91	16.4176	.00	250.00
IgG3+/1BBA*	rejeksiyon yok	16	.0000	.00	.00
	AMR1(h veya i)	20	3.2000	.00	20.00
	AMR2veya3	16	3.3750	.00	15.00
	miks AMR ACR	32	7.5938	.00	80.00
	ACR1	3	3.3333	.00	10.00
	ACR2veya3	4	6.7500	.00	20.00
	Total	91	4.3736	.00	80.00

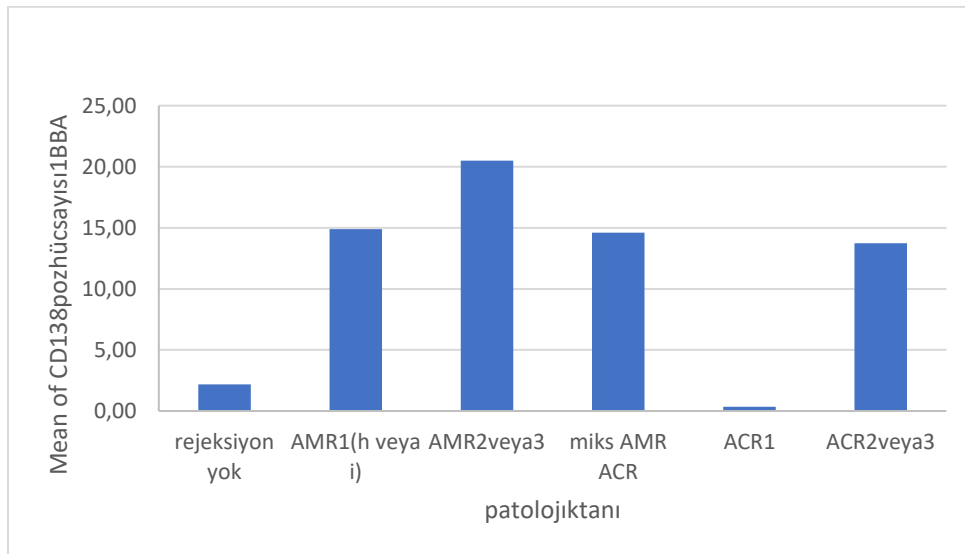
*+/1BBA: Bir büyük büyütme alanındaki (x400) pozitif hücre sayısı.



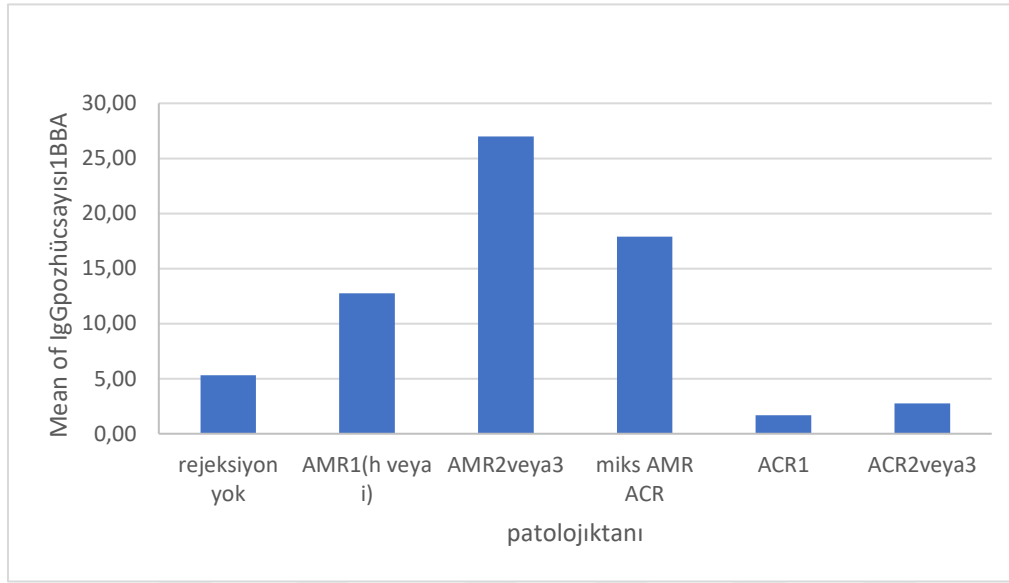
Şekil 3.2.1. LSA pozitif olguların tanı gruplarına göre dağılımı.



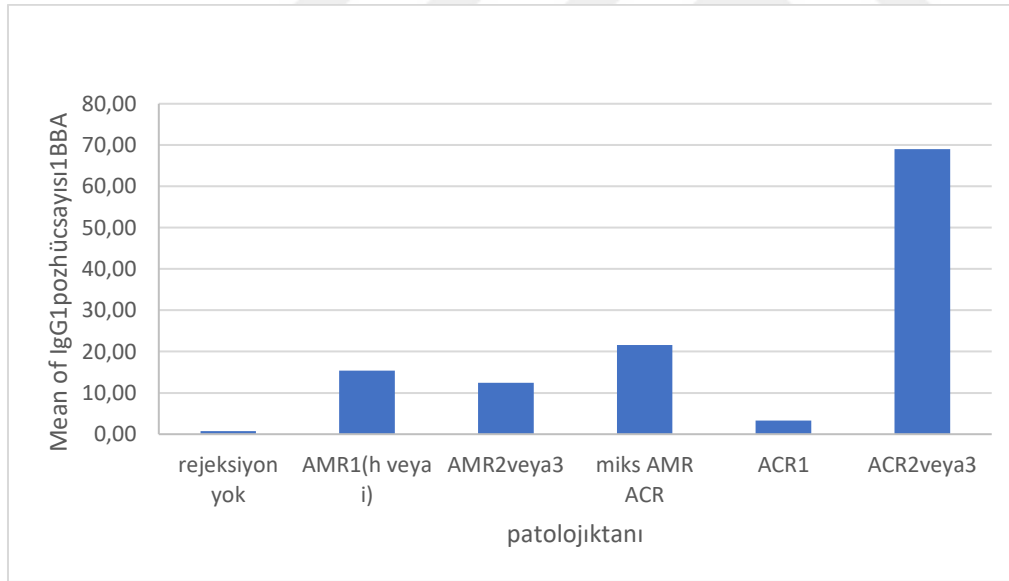
Şekil 3.2.2. DSA pozitif olguların tanı gruplarına göre dağılımı.



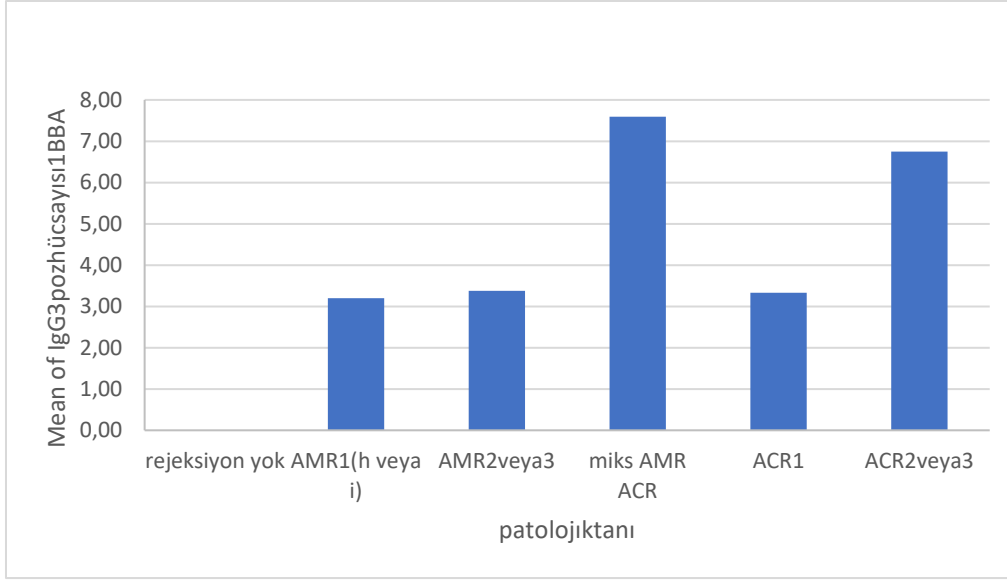
Şekil 3.2.3. CD138 + plazma hücre sayısının tanı gruplarına göre dağılımını gösteren grafik.



Şekil 3.2.4. IgG+ inflamatuvar hücre sayısının tanı gruplarına göre dağılımını gösteren grafik.



Şekil 3.2.5. IgG1+ hücre sayısının tanı gruplarına göre anlamlı değişkenliğini gösteren grafik (p <0.05).



Şekil 3.2.6. IgG3 + hücre sayısının tanı gruplarına göre dağılımını gösteren grafik.

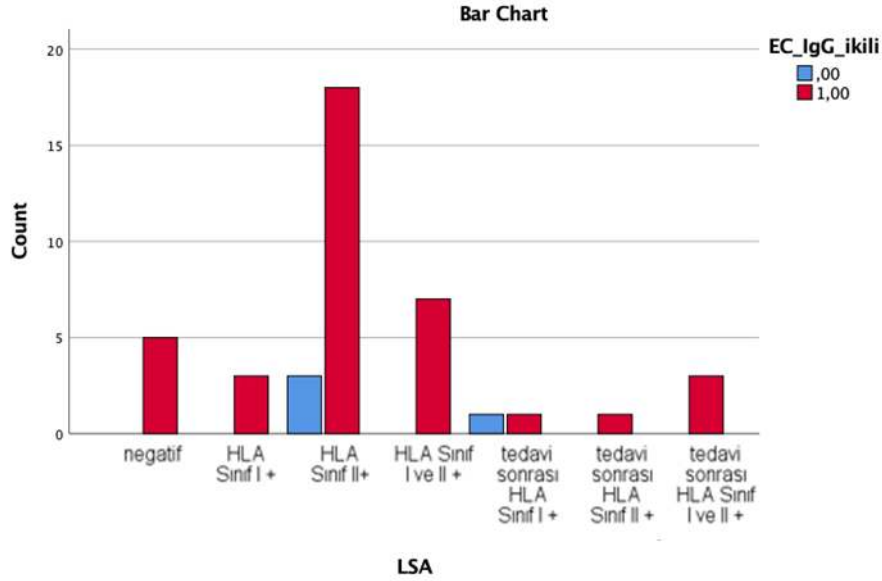
3.3. LSA, DSA ve MFI Düzeyleri ile İlişkili Analiz Sonuçları

LSA veya DSA pozitif ve negatif olgular klinik (bulgu var, yok, şüpheli) gruplara göre Pearson ki-kare testleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermedi.

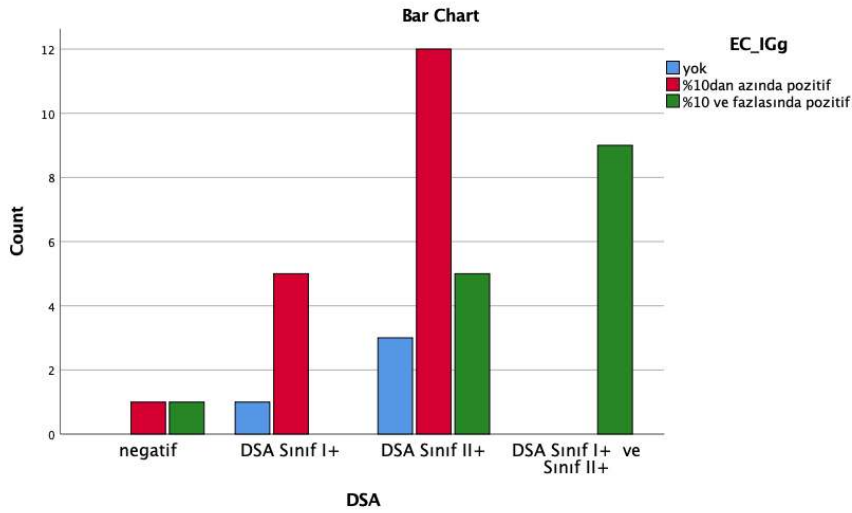
EMB ile senkron serumunda herhangi bir tipte Anti-HLA antikoru (LSA) bulunan ve donör doku uyumluluğu bilinmeyen 37 alıcının LSA pozitifliği ile endotel hücrelerdeki herhangi bir yüzde orandaki IgG, IgG1, IgG3 pozitiflikleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak, HLA sınıf II antikorların bulunduğu hastalarda, herhangi bir oranda endotel IgG pozitifliğinin görülme olasılığı diğerlerine göre daha yüksek gözlemlendi (Şekil 3.3.1). HLA sınıf I, sınıf II, sınıf I ve II tipinde DSA saptanan ve DSA saptanmayan hastalarda, endotel IgG pozitifliğinin yüzde oranlarına göre dağılımı (Şekil 3.3.2) veya IgG1 pozitifliğinin herhangi bir oranda varlığına göre dağılımı (Şekil 3.3.3) istatistiksel anlam göstermedi, ancak her ikisinin de HLA sınıf-II pozitif olgularda yoğunlaştığı gözlemlendi.

Ayrıca senkron serumlarında LSA MFI düzeyleri 1000 ve üzerinde saptanmış 34 hasta ile 1000'den düşük MFI düzeyine sahip 3 hasta, endotel hücrelerinde IgG, IgG1 ve IgG3 pozitifliğinin bulunma durumuna göre Pearson ki-kare testleri ile karşılaştırılmış; istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak, özellikle IgG pozitif endotel hücre saptanan olgular MFI düzeyleri yüksek olan grupta kümelendiği gözlenmesine karşın, MFI düzeyi düşük hasta grubunun çok küçük olması nedeniyle MFI düzeyleri ile endotel IgG pozitifliği arasında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 3.3.4). Senkron serumlarında sınıf-I ve/veya sınıf -2 DSA saptanmış 37 hasta ile DSA negatif 25 hasta kapiller endotel hücrelerinde, herhangi bir orandaki IgG, IgG1 (Şekil 3.3.5 ve Şekil 3.3.6) ve IgG3 pozitifliği

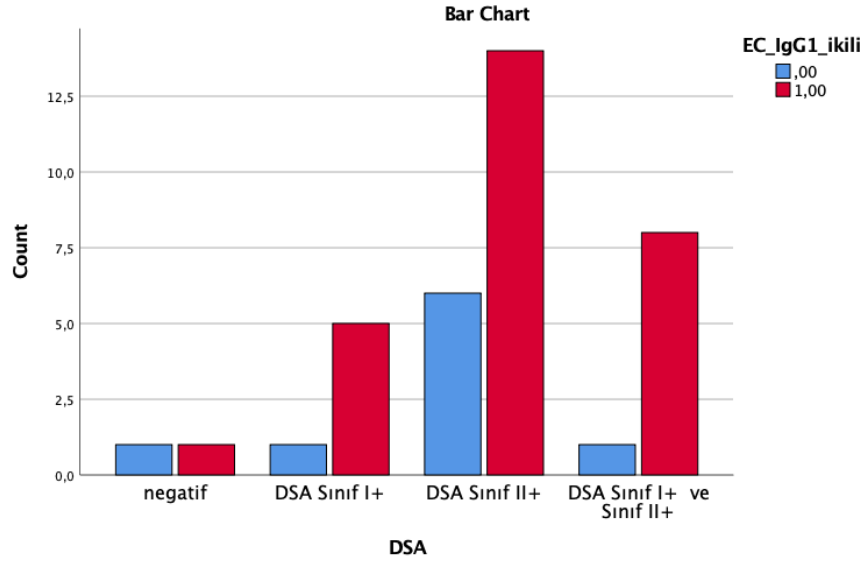
yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak, DSA pozitifliği ile endotelial IgG3 pozitifliği anlamlı ($p = .044$) birliktelik göstermiştir (Şekil 3.3.7).



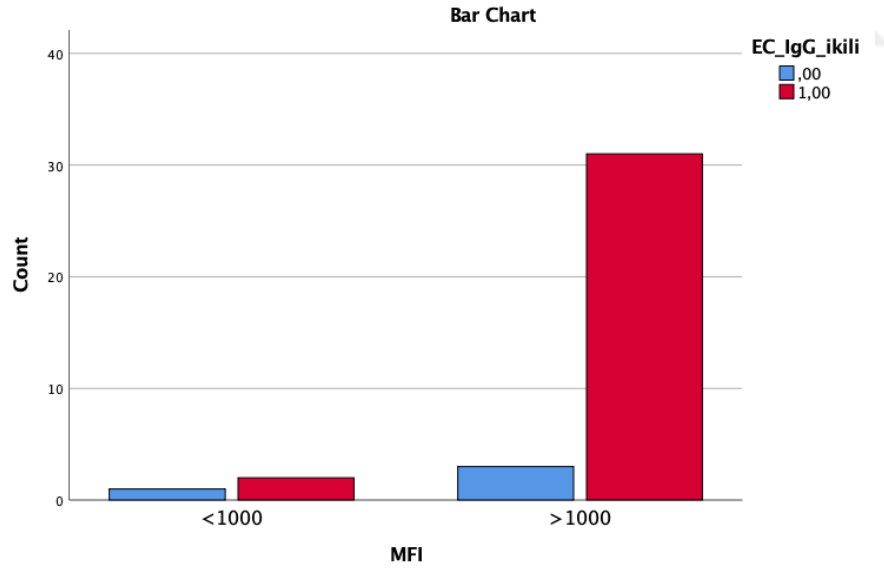
Şekil 3.3.1. Donöre özgüllüğü bilinmeyen HLA sınıf I, sınıf II, sınıf I ve II antikorlar (LSA) saptanmış hastalarda, herhangi bir oranda endotelial IgG pozitifliğinin görülme sıklığının, tedavi ilişkisiz ve ilişkili olma durumuna göre dağılımını gösteren bar grafik.



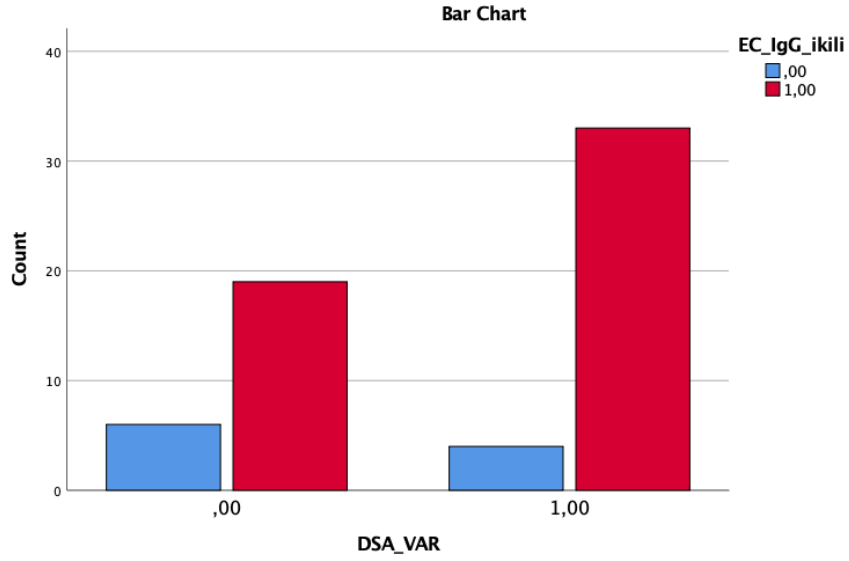
Şekil 3.3.2., HLA sınıf I, sınıf II, sınıf I ve II tipinde DSA saptanan ve DSA saptanmayan hastalarda, endotelial IgG pozitifliğinin yüzde oranlarına göre dağılımını gösteren bar grafik.



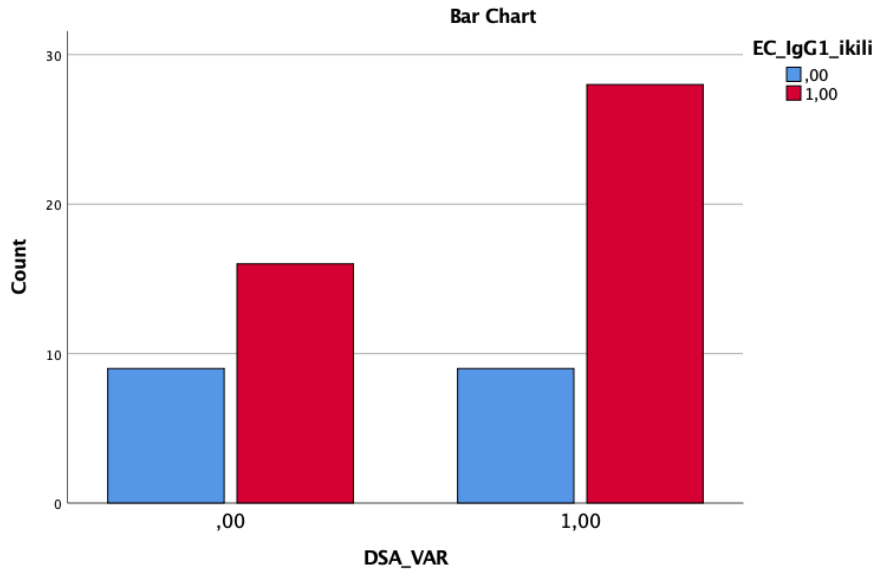
Şekil 3.3.3. HLA sınıf I, sınıf II, sınıf I ve II tipinde DSA saptanan ve DSA saptanmayan hastalarda, endotelial IgG1 pozitifliğinin herhangi bir oranda varlığına göre dağılımını gösteren bar grafik.



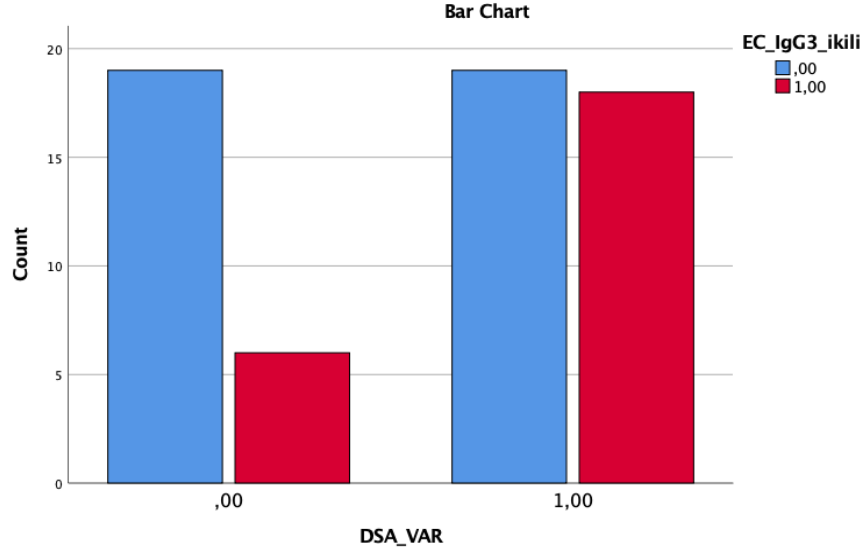
Şekil 3.3.4. LSA MFI düzeyleri 1000 ve üzerinde veya altında saptanmış hastalarda endotelial hücrelerde herhangi bir oranda IgG pozitifliğini gösteren bar grafik.



Şekil 3.3.5. Senkron serumlarında sınıf-I ve/veya sınıf -2 DSA saptanmış 37 hasta ile DSA negatif 25 hastada, herhangi bir oranda IgG pozitif endotel hücrelerinin bulunma sıklığına göre dağılımı gösteren bar grafik.



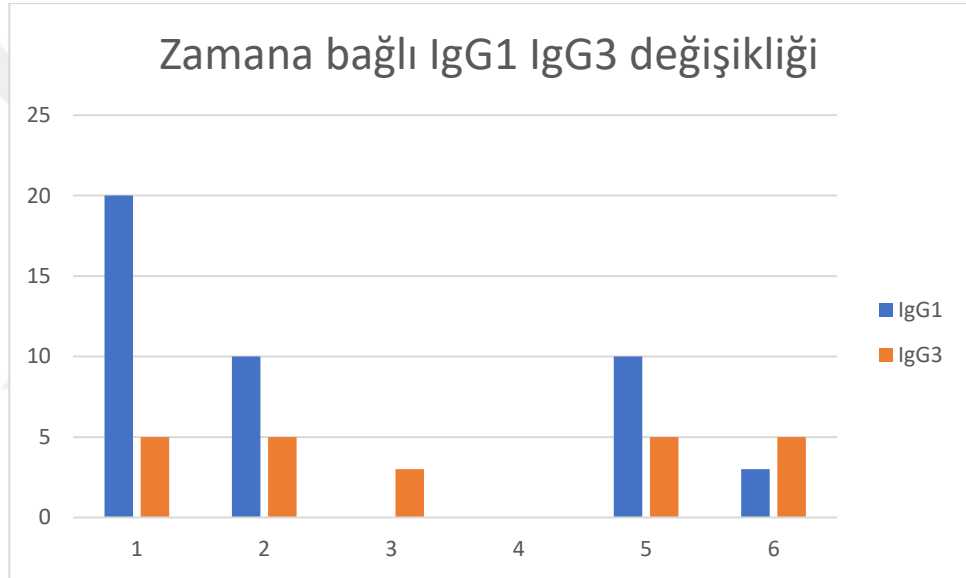
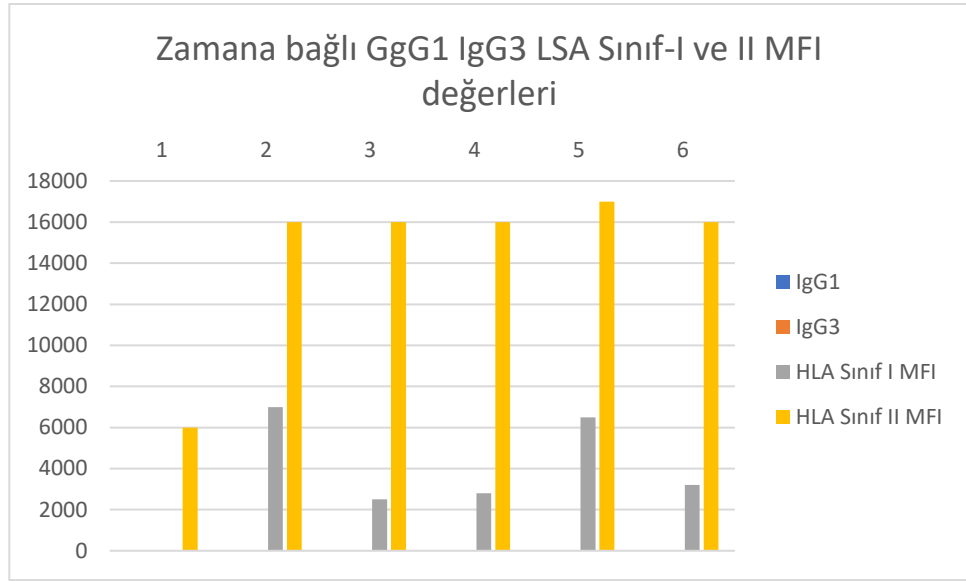
Şekil 3.3.6. Senkron serumlarında sınıf-I ve/veya sınıf -II DSA saptanmış 37 hasta ile DSA negatif 25 hastada, herhangi bir oranda IgG1 pozitif endotel hücrelerinin bulunma sıklığına göre dağılımı gösteren bar grafik.



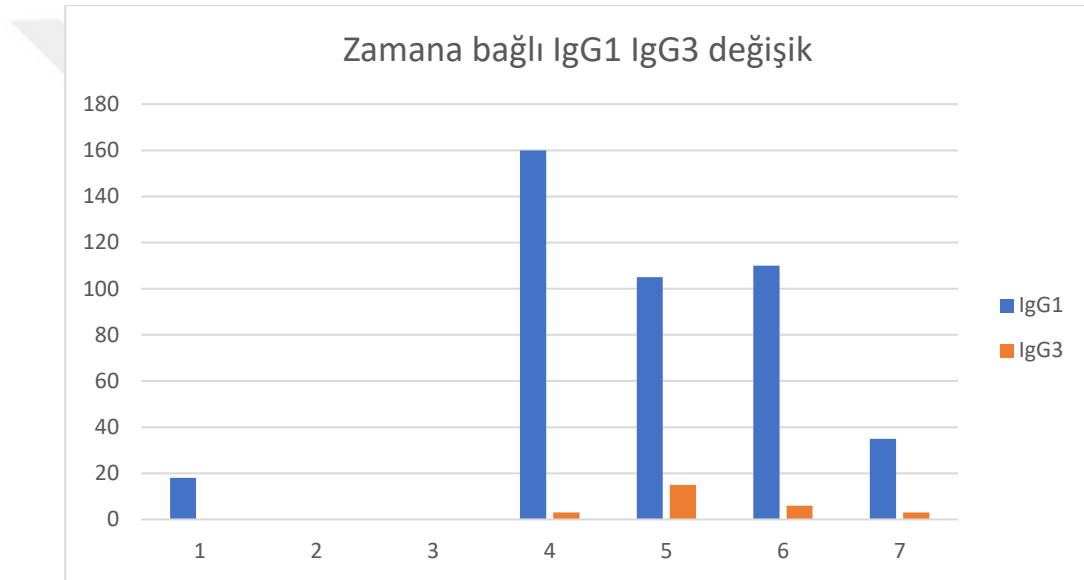
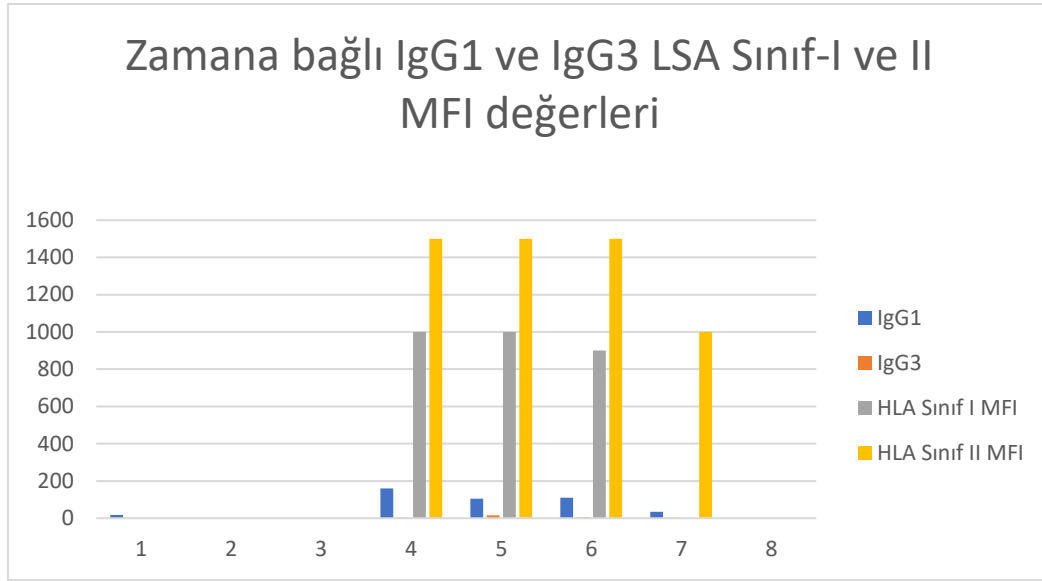
Şekil 3.3.7. Senkron serumlarında sınıf-I ve/veya sınıf -2 DSA saptanmış 37 hasta ile DSA negatif 25 hastada, herhangi bir oranda IgG3 pozitif endotel hücrelerinin bulunma durumuna göre anlamlı ($p = .044$) farkı gösteren bar grafik.

3.3.1. Çalışma grubundan iki hastanın, hasta bazlı LSA, DSA ve MFI düzeylerinin IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayılarıyla bağıntısını araştıran analiz sonuçları

Klinik, immünolojik ve histopatolojik verileri birlikte değerlendirildiğinde, kronik seyir gösteren, elimizde daha uzun süre hem histopatolojik hem immünolojik verileri bulunan iki hasta mercek altına alındı ve hasta bazında yapılan istatistiksel analizler sonucunda, IgG1 ve IgG3 pozitif inflamatuvar hücre sayıları ile hem LSA ve DSA'nın varlığı hem de MFI düzeyleri anlamlı bir korelasyon gösteriyordu (Şekil 3.3.1.1 ve Şekil 3.3.1.2).



Şekil 3.3.1.1. Tek hastanın (9 no'lu) izleminde, 6 farklı zaman diliminde alınmış EMB'lerdeki IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayıları (/1BBA) ile senkron serumlarında bulunan Sınıf-I, Sınıf-II LSA MFI düzeylerinin korelasyonunu gösteren sütun grafikler. İkinci grafikte IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayılarının zaman dilimlerine göre dağılımı daha yakından gösterilmiştir.

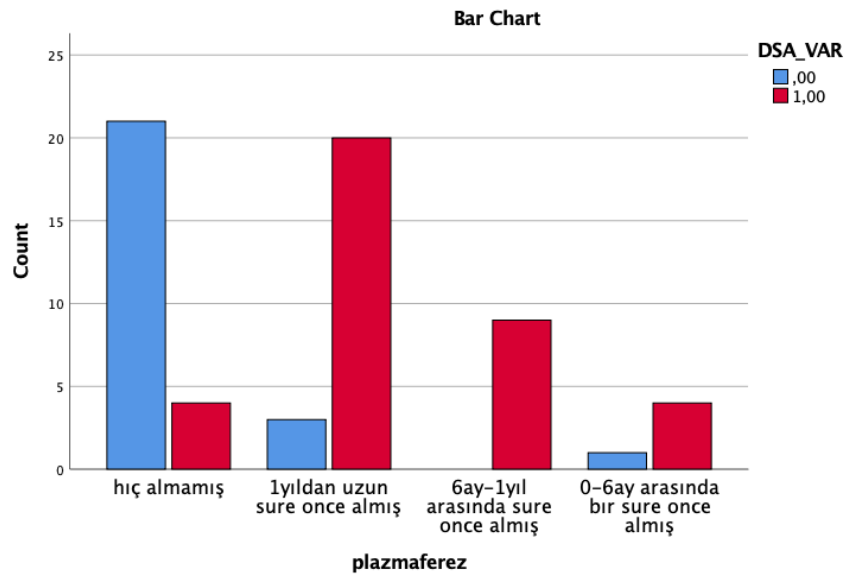


Şekil 3.3.1.2. Tek bir hastanın (11 numaralı) izleminde, 8 farklı zaman diliminde alınmış EMB’lerdeki IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayıları (/1BBA) ile senkron serumlarında bulunan Sınıf-I, Sınıf-II LSA MFI düzeylerinin korelasyonunu gösteren sütun grafikler. İkinci grafikte IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayılarının zaman dilimlerine göre dağılımı daha yakından gösterilmiştir [Not: Hastanın 2. ve 3. Biyopsileri tedavi altında alınmış kontrol biyopsileri iken, 1. ve 8. biyopsilerinde hafif şiddette ‘miks AMR+ACR’ tanısı almıştır].

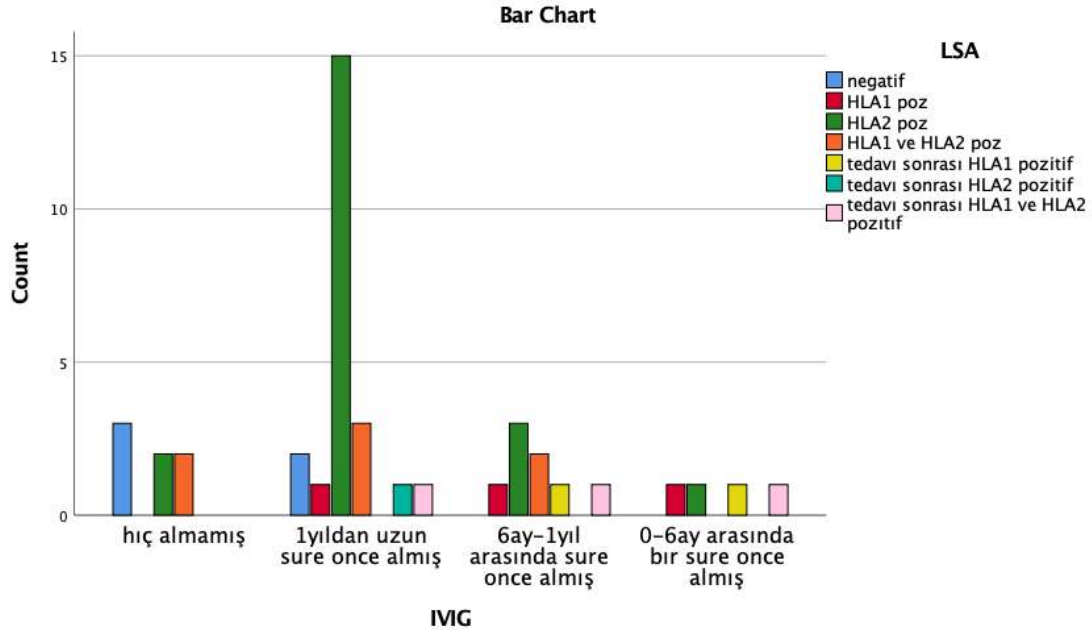
3.4. Tedavi ilişkili Analiz Sonuçları

Araştırdığımız parametreler üzerindeki tedavi etkisini gözlemleyebilmek için, Plazmaferez+IVIG ve/veya Ritüksimab ikili veya üçlü tedavisi almış hastaların tedaviyi biyopsiden ne kadar süre önce almış olduklarına göre olgular şu şekilde gruplandırıldılar: Hiç almamış, 1 yıldan uzun süre önce almış, 6 ay ile 1 yıl arasındaki zaman diliminde almış, 6

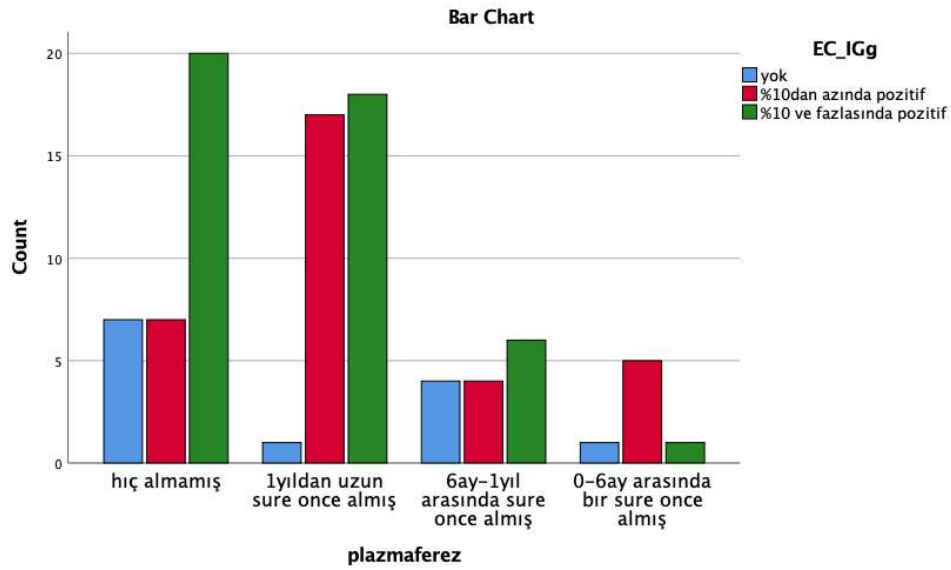
aydan kısa süre önce almış. Olguların 34'ü 'PF+IVIG ve/veya Ritüksimab' tedavisi hiç almamış hastalardan, 36'sı 1 yıldan uzun süre önce almış hastalardan, 14'ü 6ay -1 yıl arasındaki dönemde almış ve 7'si 6 aydan kısa süre önce tedavi almış hastalardan alınmış biyopsi spesmenlerinden oluşmaktaydı. Yapılan Pearson ki-kare testlerinde, 0-1 yıllık zaman diliminde bu tedaviyi almış hastaların DSA düzeylerinde anlamlı ($p = .000$) düşüş saptanmıştır (Sekil 3.4.1). DSA HLA sınıflarına göre tedavi etkisi ile ilk 1 yıl içinde baskılanmış gruplarda ise, özellikle sınıf II HLA' ların direngen sebadı dikkati çekmiştir (Sekil 3.4.2). İlk 1 yıllık dönemde tedavi etkisinde, DSA'ya paralel olarak, endotel hücrelerinde IgG, IgG1 ve IgG3 pozitiflik oranlarında belirgin düşme gözlenmiştir (Şekil 3.4.3, Şekil 3.4.4 ve Şekil 3.4.5), ancak, gruplar arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.



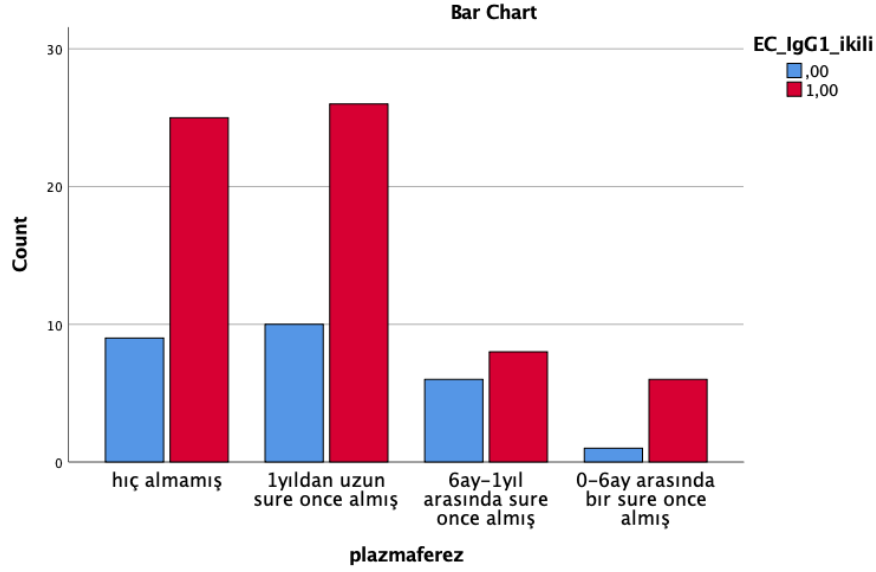
Şekil 3.4.1. Plazmaferez+IVIG ve/veya Ritüksimab üçlü tedavisi almış hastaların tedaviyi biyopsiden ne kadar süre önce almış olduklarına göre biyopsilerin gruplandırılmaları ve bu gruplardaki Serum DSA düzeylerinin anlamlı dağılımını gösteren bar grafik ($p = .000$).



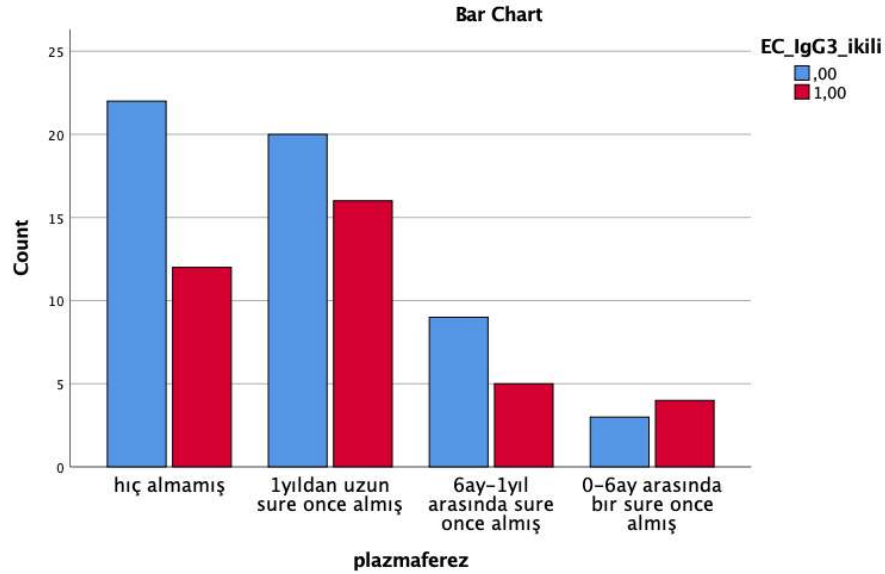
Şekil 3.4.2. DSA HLA sınıflarına göre alt gruplarda, (PF+IVIG ve/veya Rituksimab) tedavi etkisi ile baskılanma ve direnci gösteren bar grafik.



Şekil 3.4.3. Plazmaferez+IVIG ve/veya Ritüksimab tedavisi almış hastaların tedaviyi biyopsiden ne kadar süre önce almış olduklarına göre biyopsilerin gruplandırılmaları ve bu gruplarda endotelial hücrelerdeki IgG % oranlarını gösteren bar grafik.



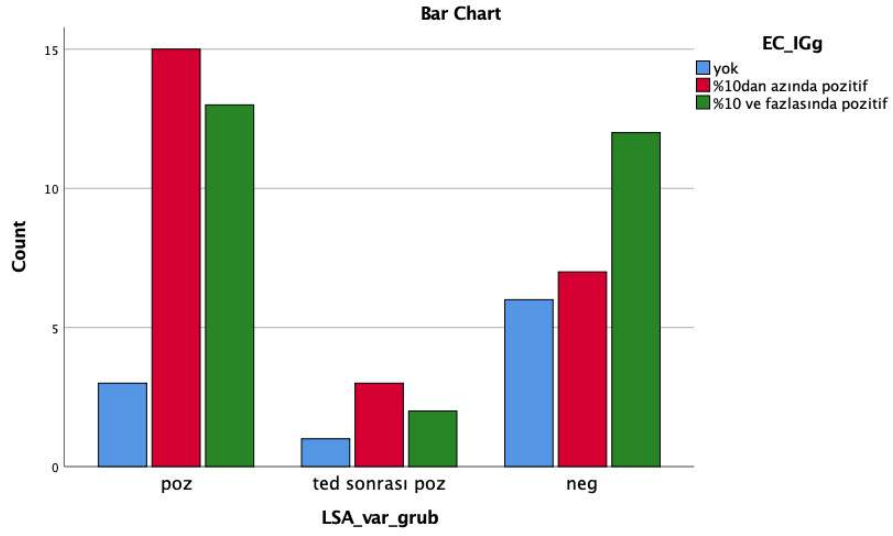
Şekil 3.4.4. Plazmaferez+IVIG+Ritüksimab üçlü tedavisi almış hastaların tedaviyi biyopsiden ne kadar süre önce almış olduklarına göre biyopsilerin gruplandırılmaları ve bu gruplarda endotelyal hücrelerdeki herhangi bir oranda IgG1 pozitifliğini gösteren bar grafik.



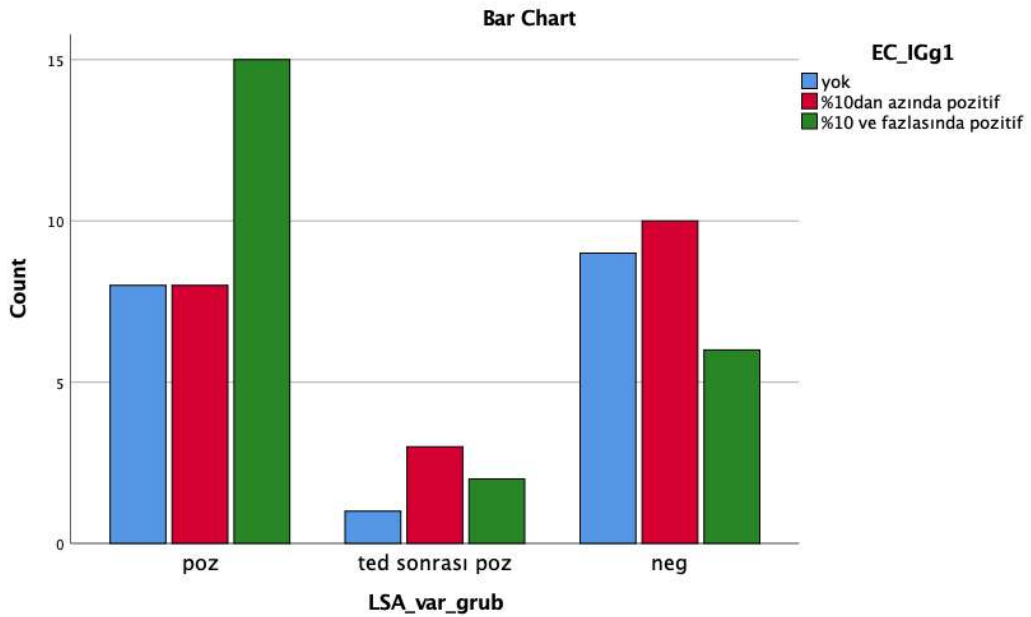
Şekil 3.4.5. Plazmaferez+IVIG+Ritüksimab üçlü tedavisi almış hastaların tedaviyi biyopsiden ne kadar süre önce almış olduklarına göre biyopsilerin gruplandırılmaları ve bu gruplarda endotelyal hücrelerdeki herhangi bir oranda IgG3 pozitifliğini gösteren bar grafik.

LSA durumu bilinen 62 olgu LSA pozitifliğine göre; negatif (n=25), pozitif (n= 31) ve tedavi (PF+IVIG+Ritüksimab) sonrası (ilk 6 ayda) pozitif (n= 6) olarak gruplandırılmıştır. Buna göre LSA pozitif olguların endotelyal hücrelerindeki tedavi ilişkili IgG (Şekil 3.4.6),

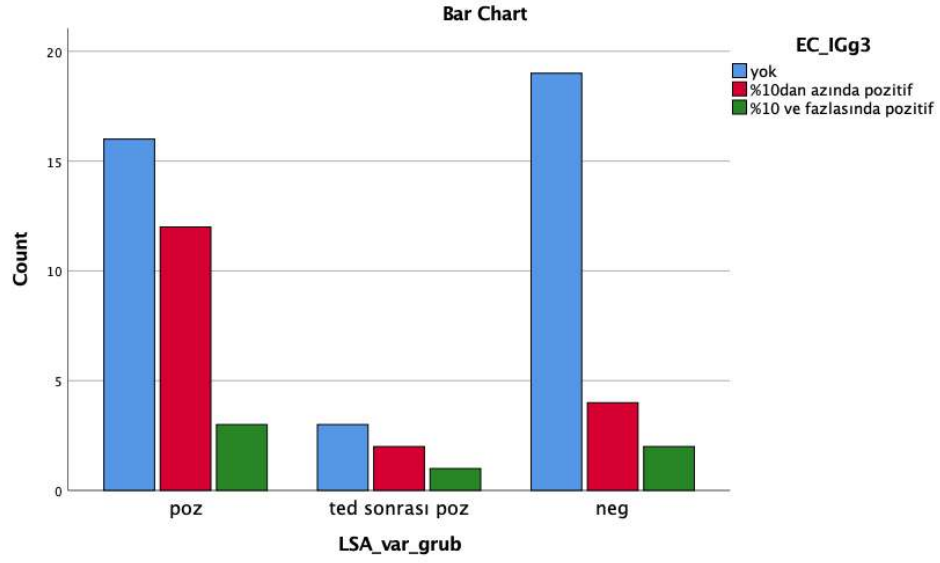
IgG1 (Şekil 3.4.7) ve IgG3 (Şekil 3.4.8) pozitiflik yüzde oranları da test edilmiştir. Pearson ki-kare testleri ile yapılan karşılaştırmalarda tedavi sonrası LSA pozitif olgularda tüm parametrelerde belirgin düşme gözlenmiş ancak istatistiksel anlam bulunamamıştır. Aynı şekilde, ACR tedavisi (Metil prednizolon) almış ve 2 ay içinde kontrol amaçlı alınmış 10 biyopsi spesmeninde, endotelyal hücrelerde tedavi ilişkili IgG (Şekil 3.4.9), IgG1 ve IgG3 pozitiflik % oranlarında belirgin düşme gözlenmiş, istatistiksel anlam bulunamamıştır.



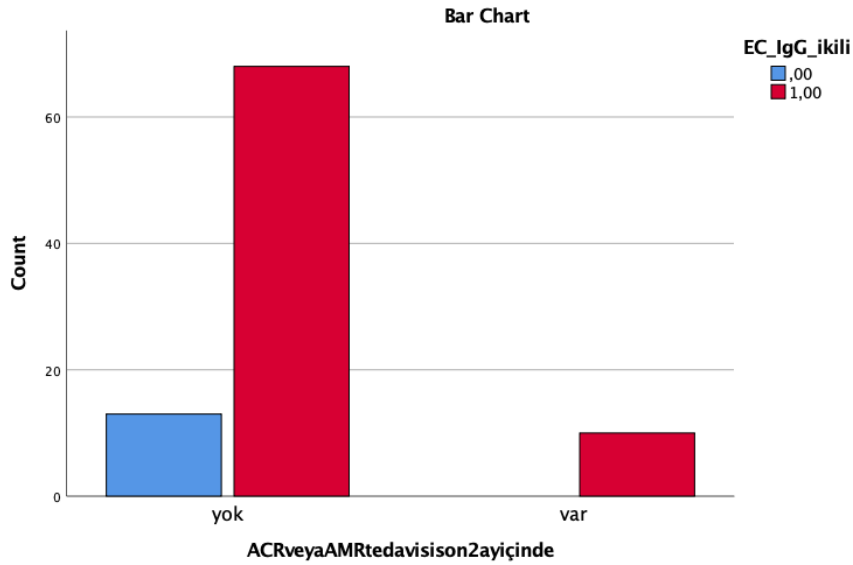
Şekil 3.4.6. LSA durumu bilinen 62 olgu, tedavi ilişkili LSA pozitifliğine göre, endotelyal hücrelerindeki tedavi ilişkili IgG pozitiflik % oranları gösteren bar grafik.



Şekil 3.4.7. LSA durumu bilinen 62 olgu, tedavi ilişkili LSA pozitifliğine göre, endotelyal hücrelerindeki tedavi ilişkili IgG1 pozitiflik % oranları gösteren bar grafik.



Şekil 3.4.8. LSA durumu bilinen 62 olgu, tedavi ilişkili LSA pozitifliğine göre, endotelial hücrelerindeki tedavi ilişkili IgG3 pozitiflik % oranları gösteren bar grafik.

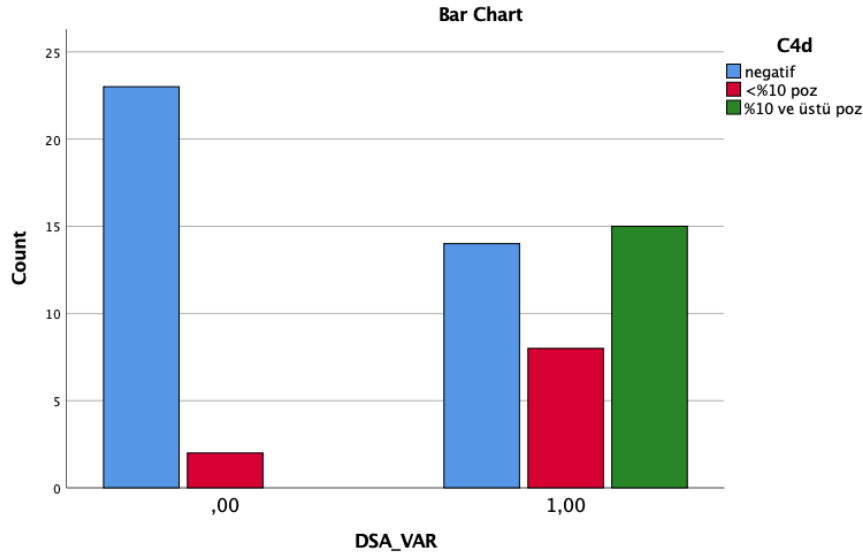


Şekil 3.4.9. ACR tedavisi (Metil prednizolon) almış ve 2 ay içinde kontrol amaçlı alınmış 10 biyopsi spesmeninde, endotelial hücrelerde tedavi ilişkili IgG pozitiflik durumunu gösteren bar grafik.

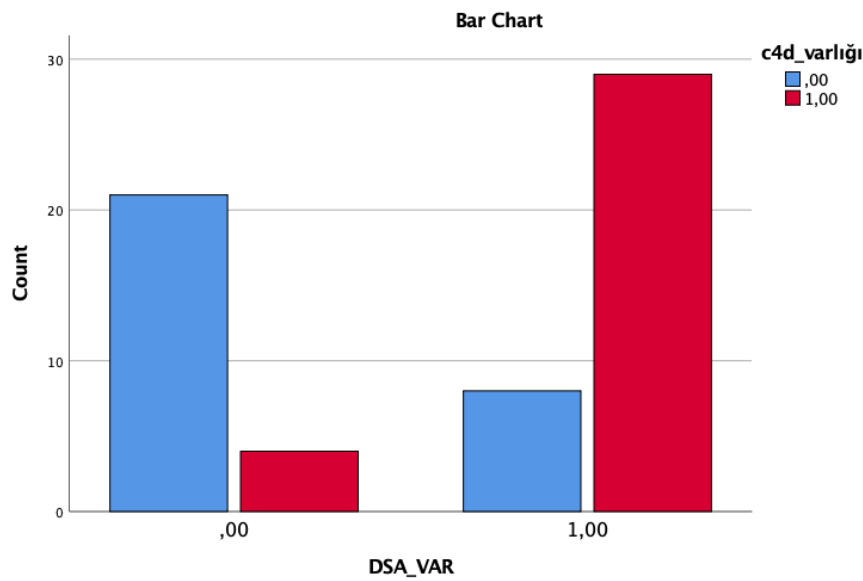
3.5. C4d ilişkili Analizlerde Elde Edilen Bulgular

DSA durumu bilinen 62 hasta üzerinde yapılan Pearson ki-kare testlerinde, DSA pozitif ve negatif gruplarda, %10 eşik değere göre derecelendirilen (0, 1, 2) C4d pozitiflik dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken (Şekil 3.5.1), DSA pozitifliği ile herhangi

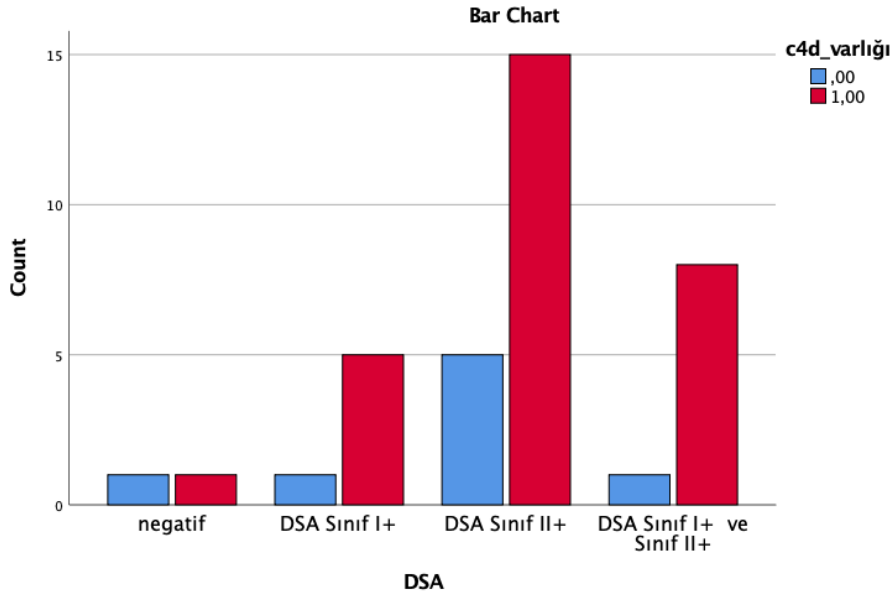
bir orandaki C4d pozitifliği (var/yok) oldukça anlamlı fark gösterdi (p:0,000) (Şekil 3.5.2). C4d pozitif olguların önemli kısmında HLA sınıf II antikor varlığı gözlemlendi. DSA pozitifliği HLA sınıflarına göre gruplandırıldığında C4d pozitifliği ağırlıklı olarak (Sınıf I HLA eşlik eden veya etmeyen) sınıf II HLA ile birliktelik gösterdi (Şekil 3.5.3).



Şekil 3.5.1. DSA pozitif ve negatif gruplarda %10 eşik değere göre derecelendirilen (0, 1, 2) C4d pozitiflik dağılımını gösteren bar grafik.

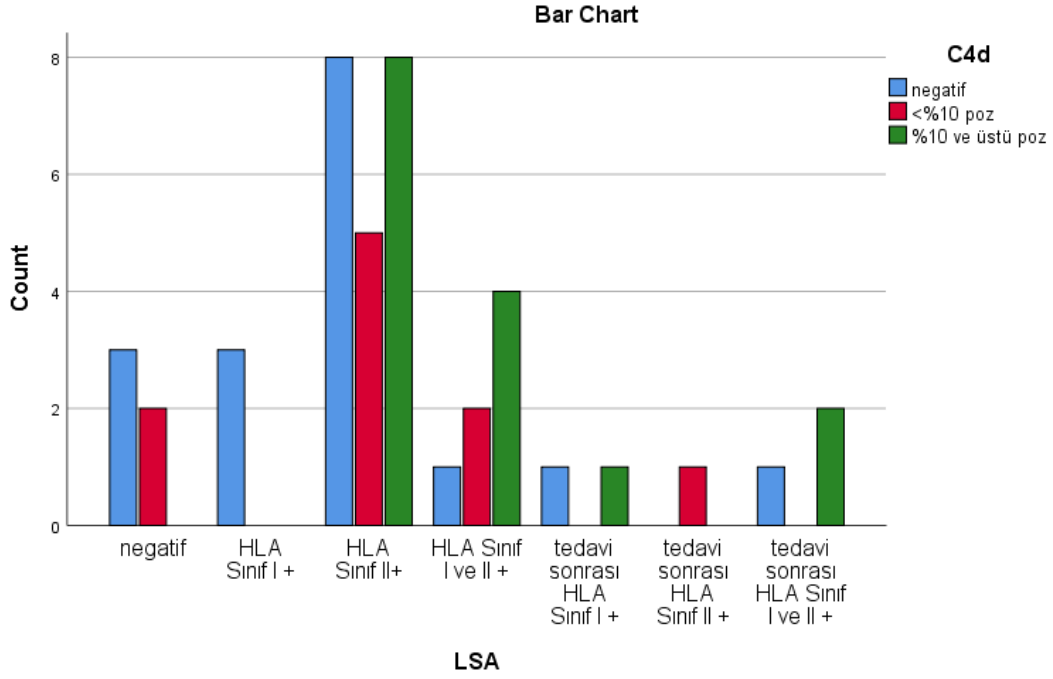


Şekil 3.5.2. DSA pozitifliği (var/yok) ile herhangi bir orandaki C4d pozitiflik (var/yok) dağılımının anlamlı korelasyonunu gösteren bar grafik (p= .000).

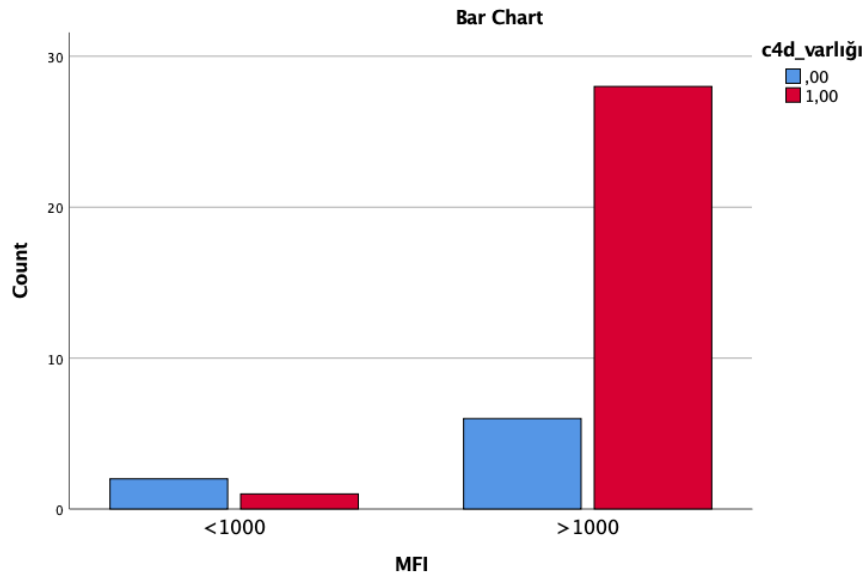


Şekil 3.5.3. DSA pozitifliği HLA sınıflarına göre gruplandığında C4d pozitifliği ağırlıklı olarak (Sınıf-I HLA eşlik eden veya etmeyen) sınıf-II HLA ile birliktelik gösterdi.

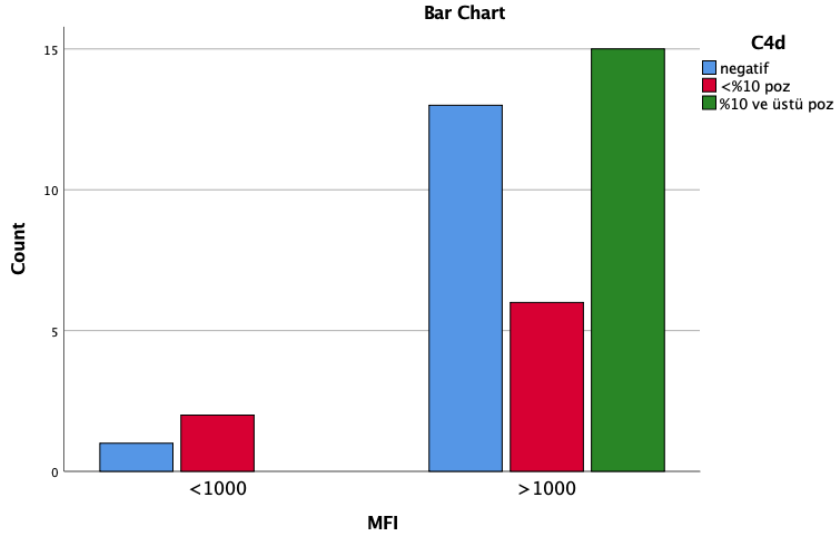
LSA durumu bilinen 42 olgu, LSA pozitifliği HLA sınıflarına göre ve tedavi durumuna göre sınıflandırıldığında, 7 olgu grubu oluştu. Bu grupların C4d pozitiflik oranına göre dağılımı Şekil 3.5.4’de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak tedavi gruplarında direngen HLA sınıf-II LSA pozitifliklerine C4d pozitifliğinin eşlik ettiği, pür HLA sınıf-I LSA+ grupta C4d pozitif olgu bulunmadığı gözlemlendi. MFI düzeyi bilinen 37 olgunun, MFI düzeyi 1000 ve üzeri olan grupta, herhangi bir oranda (var/yok) C4d pozitiflik durumu ile %10 eşik değere göre derecelendirilen (0, 1, 2) C4d pozitiflik dağılımı iki grafik ile karşılaştırılmıştır. Ki-kare testlerinde bu dağılımlar gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemekle birlikte, C4d’nin %10’un altındaki pozitiflik oranlarının da MFI ile bağıntılı olduğu gözlemlendi (Şekil 3.5.5 ve Şekil 3.5.6).



Şekil 3.5.4. LSA durumu bilinen 42 olgu, LSA pozitifliği HLA sınıflarına göre ve tedavi durumuna göre sınıflandırıldığında, bu 7 grupta C4d pozitiflik oranına göre dağılımı gösteren bar grafik.

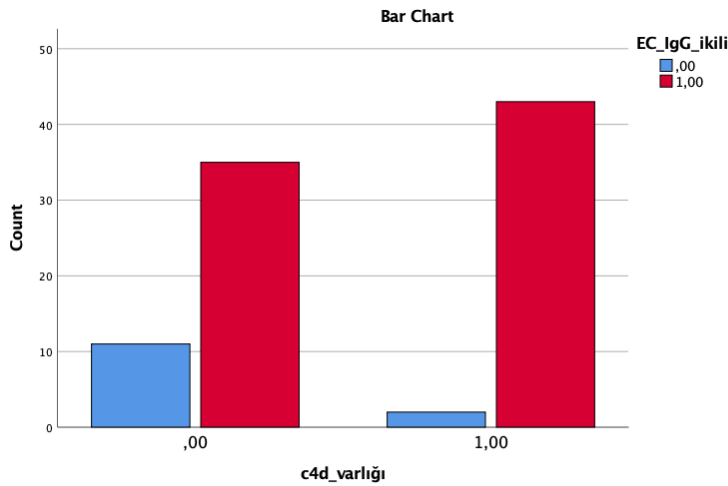


Şekil 3.5.5. MFI düzeyi 1000 altı ve üzeri olan grupta, herhangi bir oranda (var/yok) C4d pozitiflik dağılımını gösteren bar grafik.

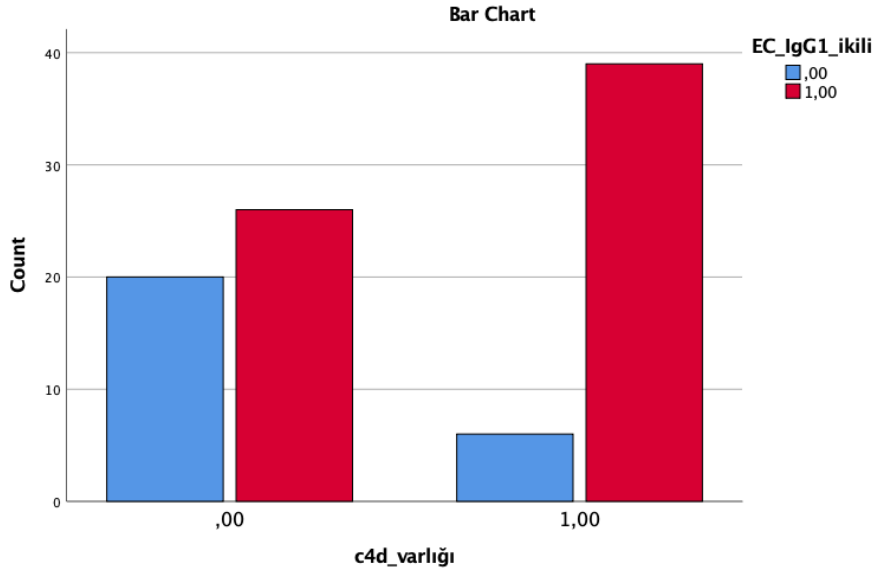


Şekil 3.5.6. MFI düzeyi 1000 altı ve üzeri olan grupta, eşik değere göre (%10 altı, %10 ve üstü) C4d pozitiflik dağılımını gösteren bar grafik.

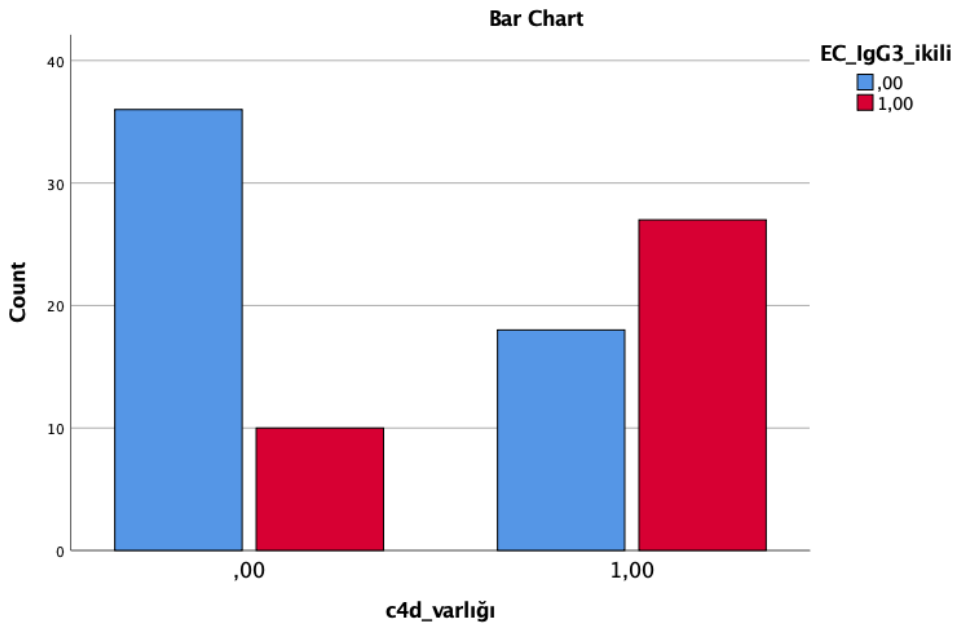
Miyokardial kapiller duvarındaki immünohistokimyasal C4d pozitifliğinin herhangi bir oranı ile endotelial hücrelerdeki herhangi bir orandaki IgG ($p = .008$), IgG1 ($p = .001$) ve IgG3 ($p = .000$) pozitifliği ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterdi (Şekil 3.5.7,8,9). Ayrıca, Anova tablolarındaki karşılaştırmalarda, C4d'nin herhangi bir derecede pozitifliğinin, mikroskopik bir büyük büyütme alanındaki ($\times 400$) plazma hücre sayısı ($p = .009$), IgG(+) ($p = .017$), IgG1(+) ($p = .003$) ve IgG3(+) ($p = .000$) hücre sayısı ile anlamlı bir ilişki gösterdiği saptandı (Şekil 3.5.10).



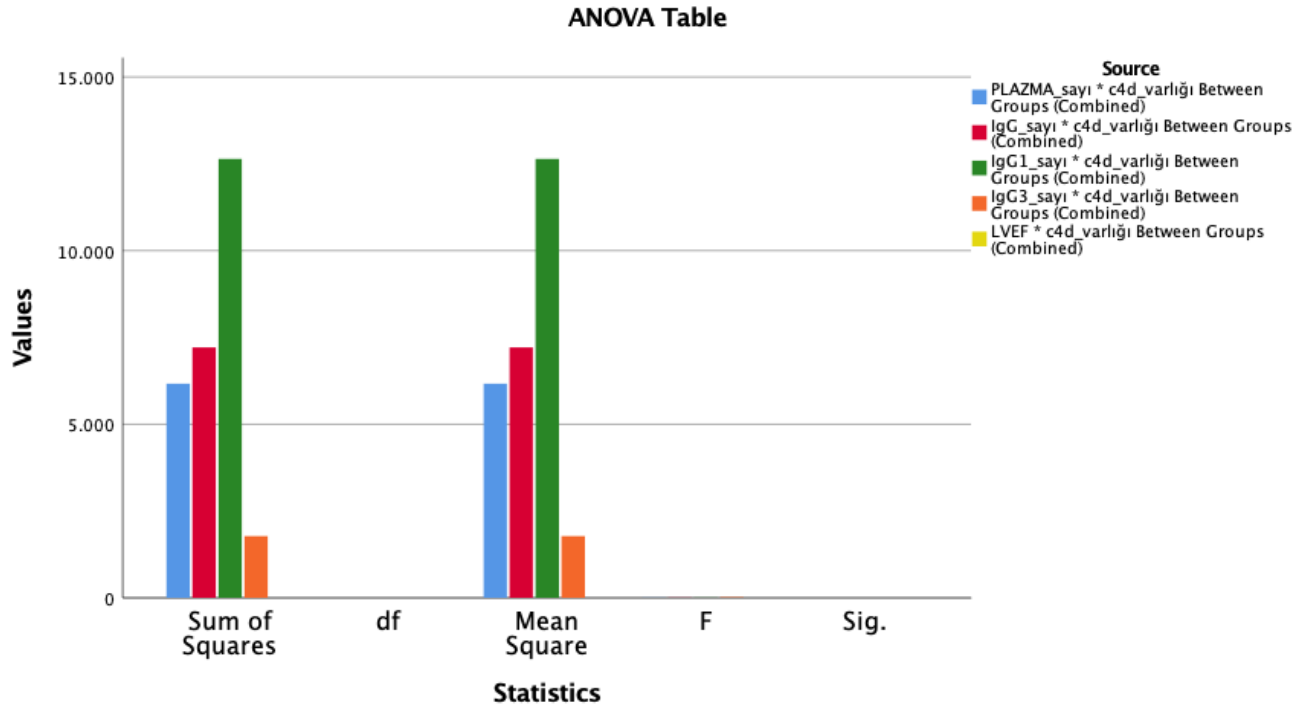
Şekil 3.5.7. Miyokardial kılcal damarlarda herhangi bir oranda C4d pozitifliği ile herhangi bir orandaki endotelial IgG pozitifliği arasındaki anlamlı bağıntıyı ($p = .008$) gösteren bar grafik.



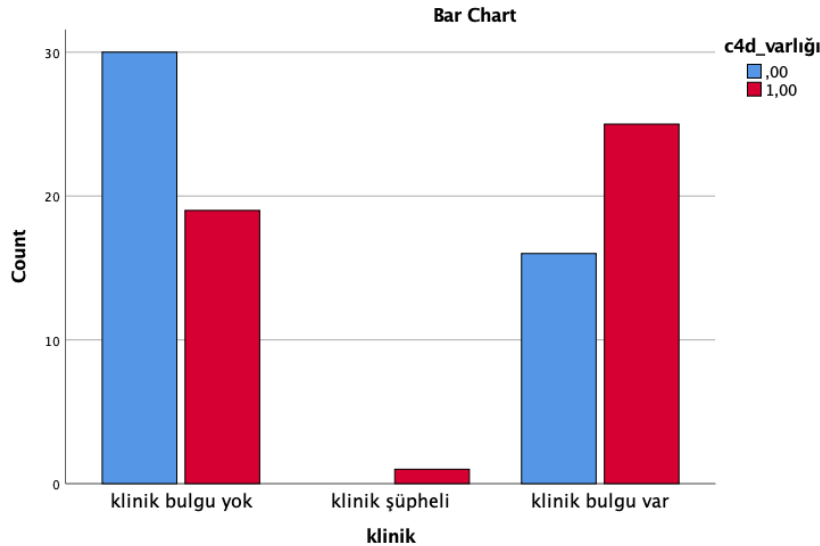
Şekil 3.5.8. Miyokardial kılcal damarlarda herhangi bir oranda C4d pozitifliği ile herhangi bir orandaki endotelial IgG1 pozitifliği arasındaki anlamlı bağıntıyı ($p = .001$) gösteren bar grafik.



Şekil 3.5.9. Miyokardial kılcal damarlarda herhangi bir oranda C4d pozitifliği ile herhangi bir orandaki endotelial IgG3 pozitifliği arasındaki anlamlı bağıntıyı ($p = .000$) gösteren bar grafik.



Şekil 3.5.10. C4d'nin herhangi bir derecede pozitifliği ile mikroskopik bir büyük büyütme alanındaki (x400) plazma hücre sayısı ($p = .009$), IgG(+) ($p = .017$), IgG1(+) ($p = .003$) ve IgG3(+) ($p = .000$) inflamatuvar hücre sayısı arasındaki anlamlı ilişkileri gösteren bar grafik.



Şekil 3.5.11. Klinik grupların dokuda C4d pozitifliği bulunması ile anlamlı bağıntısını gösteren bar grafik ($p = .053$).

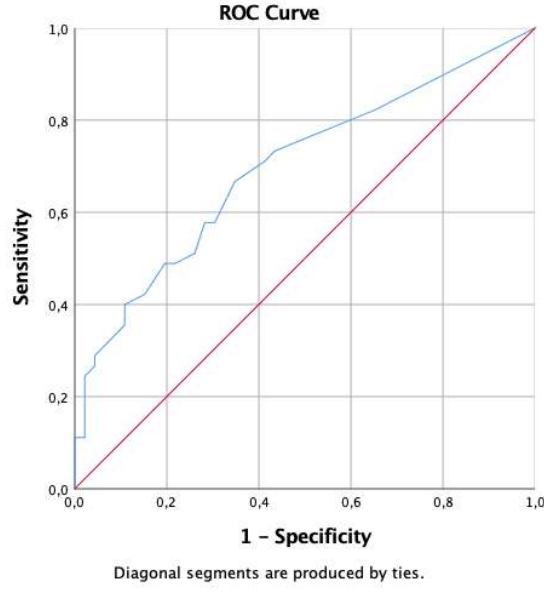
Miyokardial kapiller duvarında C4d pozitiflik oranının %10 ve üzerinde olması ile düşük (%50'nin altındaki) LVEF düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki gösterdi ($p = .013$). Ayrıca, 91 olgu biyopsi öncesi klinik durumuna göre, belirti veya bulgu olan, olmayan ve şüpheli olmak üzere, 3 gruba ayrıldığında, bu grupların dokuda C4d pozitifliği bulunması ile bağıntısı istatistiksel olarak sınırda anlamlı bulundu ($p = .053$) (Şekil 3.5.11).

3.6. ROC Eğrisi ile Eşik Değer Analiz Sonuçları

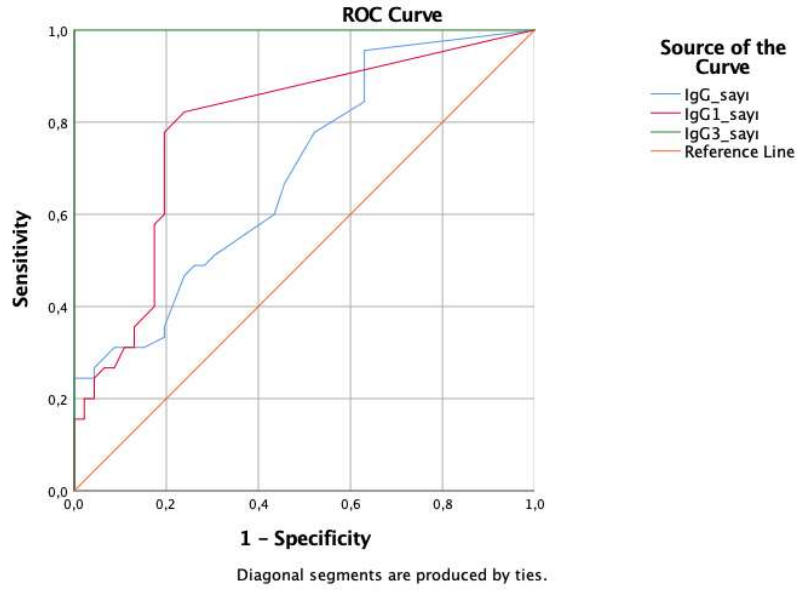
ROC eğrisi ile elde edilen risk analizi sonuçlarına göre, bu çalışmada kullanılan CD138 ve IgG, IgG1 ve IgG3 immün belirteçleri ile tüm eşik değerler 0,5 olarak hesaplanmıştır. Bu durumda, tüm bu belirteçler ile bir büyük büyütme alanında bulunacak tek bir pozitif inflamatuvar hücre AMR için anlamlı risk oluşturmaktadır; IgG3 en yüksek sensitivite ve spesifiteye sahiptir (Tablo 3.6.1 ve Şekil 3.6.1).

Tablo 3.6.1. ROC eğrisine göre, AMR için anlamlı risk oluşturan CD138, IgG, IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sayısı eşik değerleri

Risk Faktör (/1BBA)	AUC (%95) Eğri altındaki alan	Standart hata	Eşik Değer (Cutt Off point)	P	Sensitivite (%)	Spesivite (%)
CD138+ plazma hücre sayısı	0,697 (0,589-0,805)	0,055	0,5	0,001	86,7	74
IgG+ hücre sayısı	0,690 (0,583-0,797)	0,055	0,5	0,002	95,6	63
IgG1+ hücre sayısı	0,789 (0,692-0,886)	0,049	0,5	0,000	82,2	23,9
IgG3+ hücre sayısı	1,000 (1,000-1,000)	0,000	0,5	0,000	100	100



Şekil 3.6.1. ROC Eğrisi: Dokuda plazma hücre sayıları ile anlamlı eşik değerler bulmak için elde edilen ROC eğrisi.



Şekil 3.6.2. Dokuda, IgG, IgG1 ve IgG3 pozitif inflamatuvar hücre sayıları ile anlamlı eşik değerler bulmak için elde edilen ROC eğrisi.

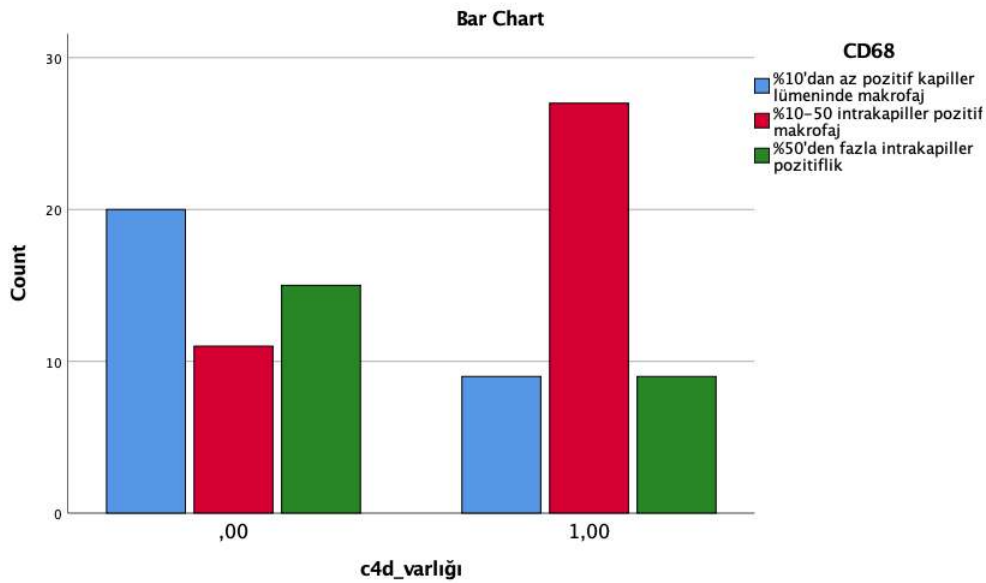
3.7. CD68 ile İlişkili Analiz Sonuçları

AMR için patoloji rutininde C4d ile birlikte kullanılan ve güncel immünohistokimyasal tanısal belirteçlerden biri olan CD68 ile kılcal damar lümenlerindeki makrofajlar sayılarak %10 eşik değerde ve üstündeki değerlerde pozitif hücre bulunması, özellikle düşük dereceli AMR tanısında yararlı bir araç olarak kabul görmüştür. Araştırmamızın temel parametreleri ile teker teker karşılaştırıldığında, öncelikle C4d'nin herhangi bir oranda pozitiflik oranları ile

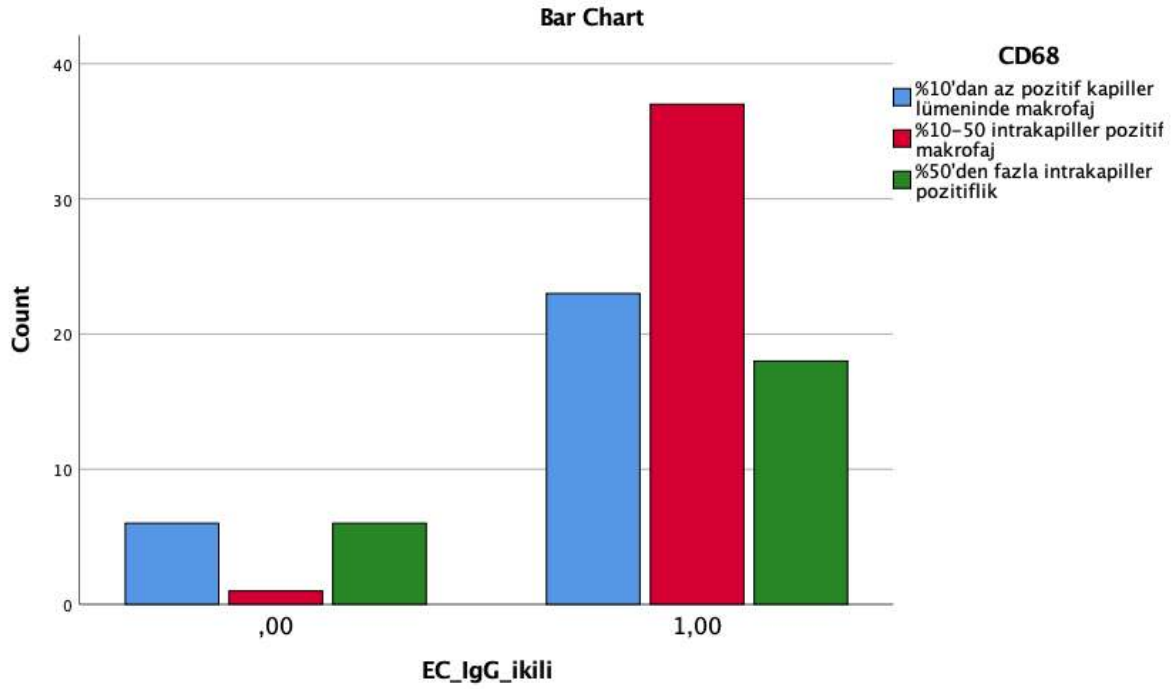
anlamli (p:0,002) korelasyon gosterdigi saptanmistir (Sekil 3.7.1). Ancak C4d'nin kategorize edilmiş 3 aşamalı (negatif, %10'dan az, %10 veya yüksek) pozitiflik değerleri ile CD68'in kategorize (negatif, %10'dan az, %10-50 arasında, %50'den yüksek) pozitiflik değerleri arasında anlamlı bağıntı bulunamamıştır.

CD68'in kategorize pozitifliği ile IgG (p:0.02) pozitif endotel hücresinin varlığı arasındaki ilişki, IgG1 (p:0.02) ve IgG3 (p:0.04) pozitif endotel hücrelerinin %10 eşik değere göre oranları arasındaki ilişki bağıntılı bulundu (Şekil 3.7.2 ve 3.7.3). IgG3 pozitif endotel hücrelerinin sayısı ile böyle bir bağıntı istatistiksel olarak kurulamadı.

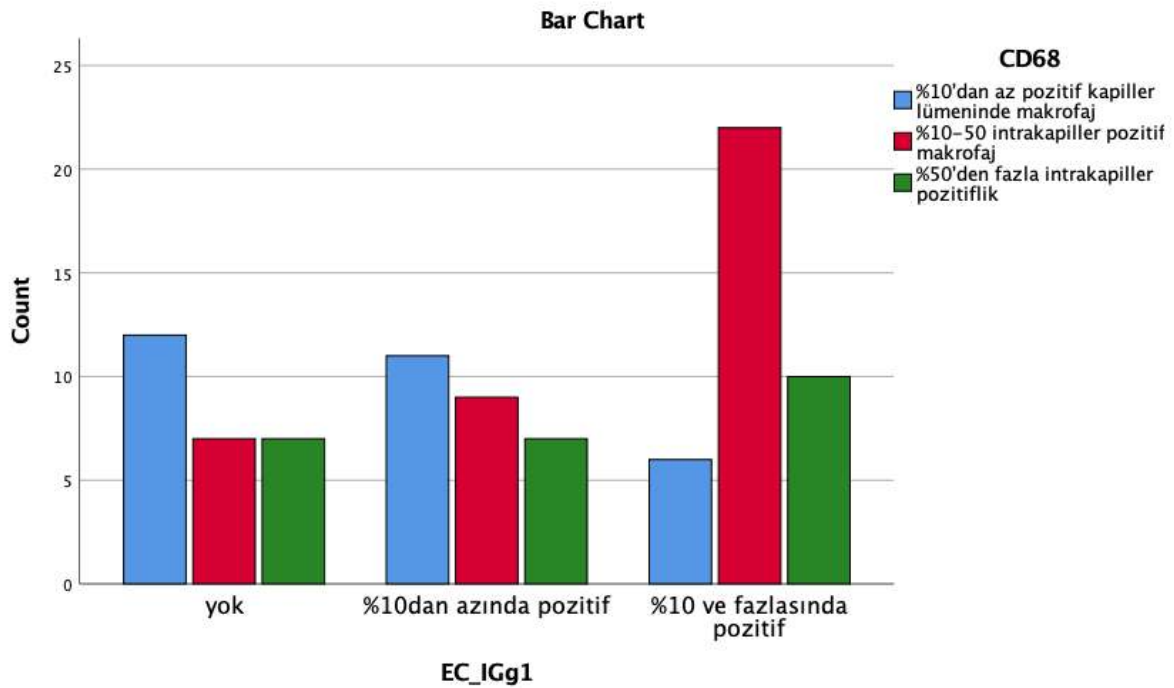
LSA pozitif olgu grubundaki HLA sınıflarına göre CD68 pozitiflik dağılımı C4d ile paralellik gösteriyordu (Şekil 3.7.4). MFI düzeyi 1000 ve üzerinde olan grupta CD68 pozitifliği anlamlı bir şekilde yükseklik gösterdi (p:0.003) (Şekil 3.7.5). CD68 ifadesinin DSA varlığı veya yokluğu ile korelasyonu gösterilemedi. Ancak HLA sınıflarına göre çizgisel dağılımı anlamlıya yakındı (p:0.073) (Şekil 3.7.6). Anova tablolarında, CD68 pozitifliği, IgG1 pozitif hücre sayıları ile anlamlı bağıntılı (p:0.026) iken IgG3 pozitif hücre sayıları ile anlamlıya yakın (p:0.063) birliktelik izlenmiştir.



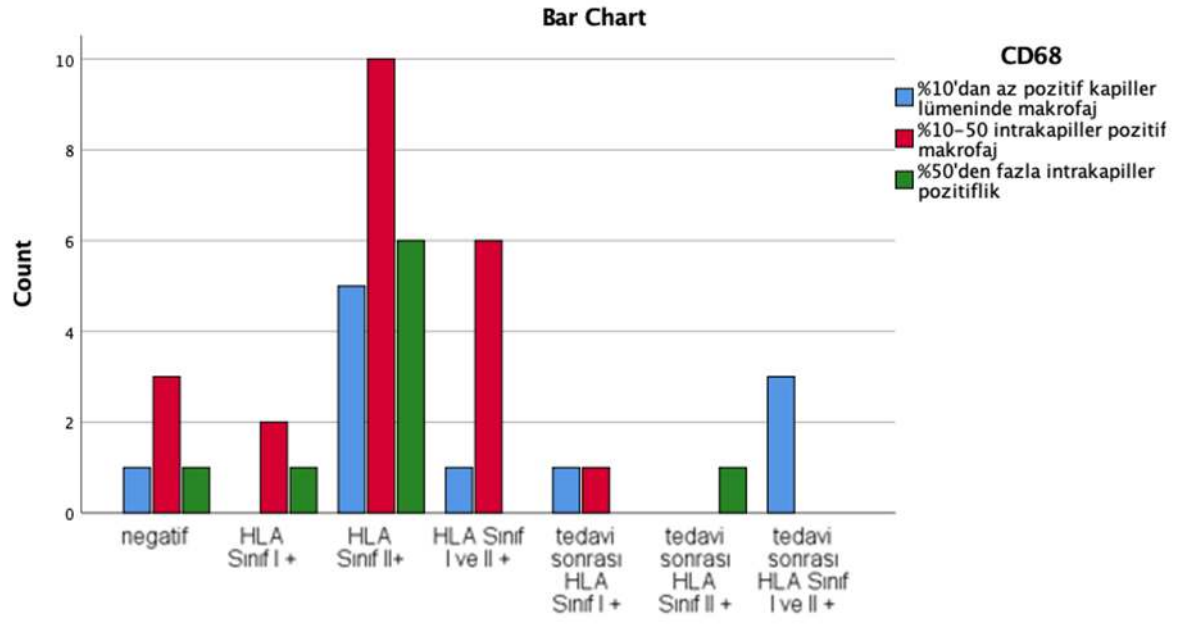
Şekil 3.7.1. CD68'in %10 eşik değere göre 3 aşamalı kategorize (0,1,2) edilmiş pozitifliği ile C4d'nin herhangi bir oran veya derecedeki immün pozitifliğini karşılaştıran bar grafik.



Şekil 3.7.2. CD68'in %10 eşik değere göre kategorizasyonunda pozitifliği ile IgG pozitif endotel hücresinin varlığı arasındaki anlamlı ilişkiyi gösteren bar grafik ($p = .02$).

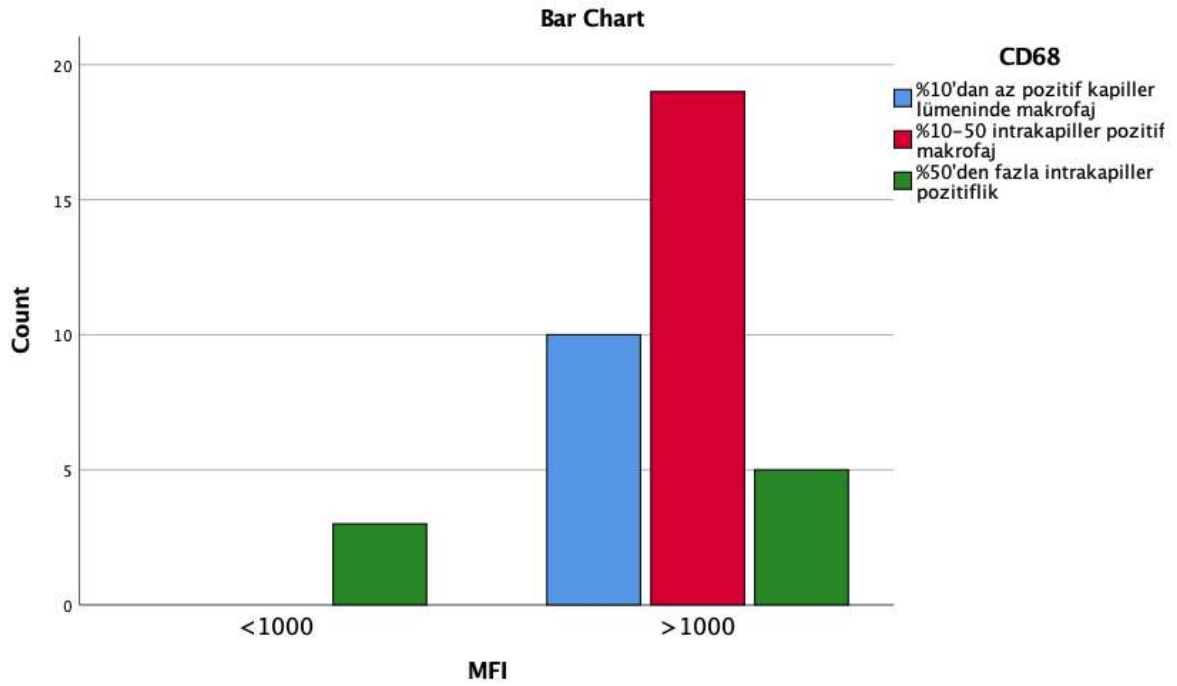


Şekil 3.7.3. CD68 pozitif makrofaj sayısının ve IgG1 pozitif endotel hücrelerinin %10 eşik değere göre pozitiflikleri arasındaki anlamlı ilişkiyi gösteren bar grafik ($p = .04$).

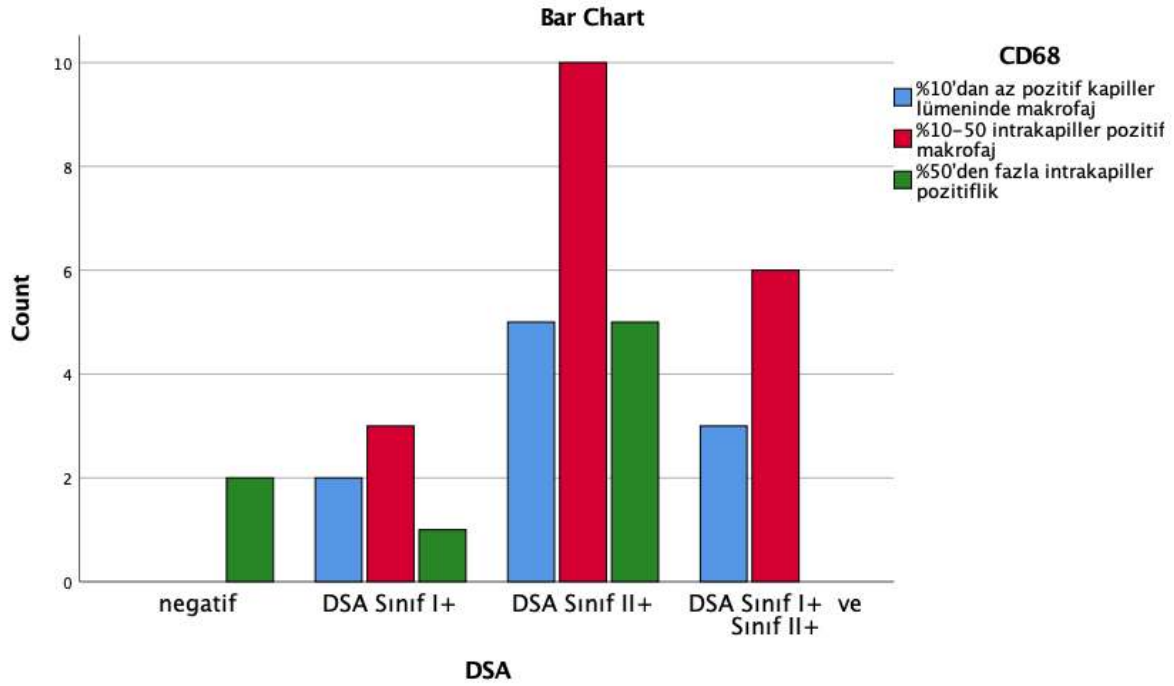


LSA

Şekil 3.7.4. LSA pozitif olgu grubundaki HLA sınıflarına göre CD68 pozitiflik dağılımını gösteren bar grafik.



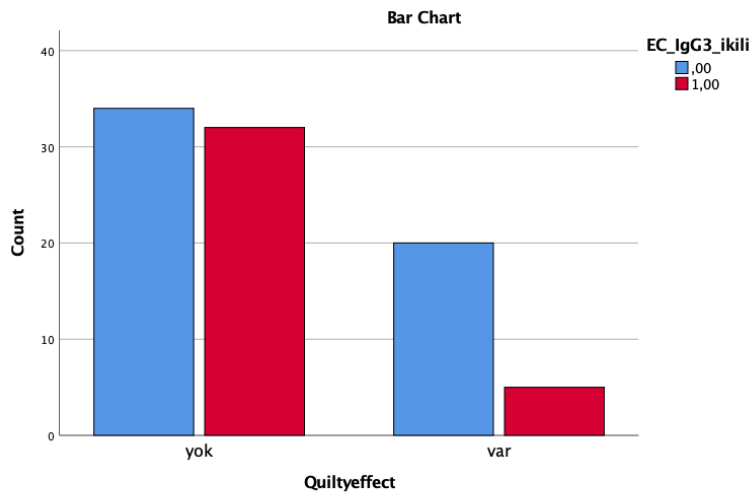
Şekil 3.7.5. LSA pozitif olgu grubundaki MFI 1000 ve üzeri ve altındaki değerlere sahip gruplarda anlamlı CD68 pozitiflik dağılımını gösteren bar grafik (p= .003).



Şekil 3.7.6. DSA ve HLA alt sınıflarına göre CD68 pozitiflik dağılımını gösteren bar grafik (p= .073).

3.8. 'Quilty Effect' İlişkili Analiz Sonuçları

EMB spesmeninde 'Quilty Effect' varlığı ile herhangi bir oranda endotelial IgG3 pozitifliği arasında istatistiksel anlamlı (p:0,011) bir ilişki olduğu (Şekil 3.8.1), IgG pozitifliği ile arasında ise, sınırda bir istatistiksel anlam (p:0.050) olduğu saptandı. Endotelial hücrelerdeki IgG1 pozitifliğinin 'Quilty Effect' varlığı ile ilişkisi anlamlı bulunmadı.



Şekil 3.8.1. 'Quilty Effect' varlığı ile herhangi bir oranda endotelial IgG3 pozitifliği arasındaki ilişkiyi (p=0 .011) gösteren bar grafik.

4. TARTIŞMA

Kardiyak allogreftin antikor aracılı reddi (AMR), patologlar ve klinisyenler için, sınırları net tanımlanamamış zorlu bir tanı olmayı sürdürmektedir. AMR, olumsuz greft sonuçları ve tedavi güçlüğü ile de ilişkili sinsi bir süreçtir. Kalp transplantasyonunda AMR teşhisi çeşitli faktörler nedeniyle zordur; immün yanıtın karmaşık doğası, dahil olan antikorların çeşitliliği ve spesifik teşhis belirteçlerinin eksikliği bunlardan bazılarıdır¹⁶. Ayrıca, AMR tanısı için, hem doku hasarının histolojik özelliklerinin hem de C4d boyaması gibi antikor etkileşiminin immünopatolojik kanıtlarının varlığını gerektiren spesifik kriterler arandığından, biyopsi örneklerinin histolojik yorumu karmaşık olabilir. Donöre özgü antikorların saptanması ise başka bir zorluk alanıdır. DSA'ların varlığı AMR için önemli bir belirteçtir, ancak yokluğu AMR varlığını dışlamaz. Dolayısıyla, doku hasarı olmaksızın DSA varlığı da AMR'yi doğrulamaz³. Ayrıca, DSA tespitine yönelik tahlillerin hassasiyeti ve özgüllüğü değişkenlik gösterebilir. Bu zorlukların üstesinden gelmek, zamanında ve doğru bir tanı koymak için klinik gözlemleri, laboratuvar testleri, görüntüleme çalışmaları ve biyopsi sonuçları ile entegre eden multidisipliner bir yaklaşım gerektirir¹. DSA'ların ve diğer immün belirteçlerin düzenli olarak izlenmesi de AMR erken teşhisi ve yönetimi için çok önemlidir. Buna ek olarak, kardiyovasküler manyetik rezonans görüntüleme ve pozitron emisyon tomografisi taramaları gibi invaziv olmayan görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler, ek tanısal bilgi sağlamaya ve biyopsiye dayalı tanının bazı sınırlamalarının üstesinden gelmeye yardımcı olabilir. Günümüzde, AMR'nin anlaşılması ve teşhisinde ilerleme kaydedilmiş olsa da, hızlı, hassas ve kolay uygulanabilen alternatif yaklaşımlara hala ihtiyaç vardır.

Kalp naklinde AMR'nin histopatolojik tanısında isimlendirme ve derecelendirmenin standardizasyonu, kalp nakli hastalarına ve patoloğlara, immünologlara ve klinisyenlere çeşitli şekillerde fayda sağlamaktadır. İlk olarak, antikor aracılı reddin morfolojik ve immünopatolojik özelliklerini tanımlamak için açık ve tutarlı bir dil sağlar; bu da zamanında müdahale ve tedavi için gerekli olan AMR'nin doğru bir şekilde tanımlanmasına ve teşhis edilmesine yardımcı olur. Ayrıca, AMR'nin diğer rejeksiyon tiplerinden ve rejeksiyonla ilişkili olmayan patolojilerden ayırt edilmesine yardımcı olarak rejeksiyon sürecinin kesin bir şekilde karakterize edilmesini sağlar. İkinci olarak, greft disfonksiyonu ve kardiyovasküler mortalite gibi kötü sonuçlar açısından risk altındaki hastaların belirlenmesine ve uygun yönetim stratejilerine rehberlik edilmesine yardımcı olur. Üçüncü olarak, antikor aracılı reddin önlenmesi ve tedavisi için kanıta dayalı kılavuzların geliştirilmesini teşvik ederek hasta sonuçlarını iyileştirebilir ve sağlık hizmeti maliyetlerini azaltabilir^{27,30}.

EMB, invaziv bir müdahale gerektirmekle birlikte, kalp naklinde akut rejeksiyon tanısı için altın standart olmayı sürdürmektedir⁹. Erken tanı ve tedavi etkinliğinin izlenmesinin yanı sıra, uzun vadeli bakımı ve greft kaybının önlenmesi, ayrıca risk sınıflandırması sağlamak için temel öneme sahiptir. Ancak, yeni tanı tekniklerinin ve terapötik yaklaşımların geliştirilmesi, kalp naklinde AMR yönetimini iyileştirmek için çok önemlidir. AMR'nin erken tespitini ve izlenmesini geliştirebilecek yeni biyobelirteçlerin ve invaziv olmayan görüntüleme yöntemlerinin potansiyelini keşfetmek için araştırma çabaları halen devam etmektedir. Anti-HLA antikor testleri, Luminex tek antijen boncukları (LSA) ve çapraz karşılaştırma, kalp naklinde ameliyat öncesi ve sonrası izleme ve tedavi yönetimi için yararlı tekniklerdir¹⁰. Buna ek olarak, yeni immünosupresif ajanların ve hedefe yönelik biyolojik ilaçların kullanımı da dahil olmak üzere, immün düzenleyici tedavilerdeki gelişmeler, AMR'nin daha etkili yönetimi ve kalp nakli alıcılarında greft kaybı riskinin en aza indirilmesi için umut vaat etmektedir. Bu yenilikçi yaklaşımlar, alıcı üzerindeki genel immün baskılayıcı yükü en aza indirirken, AMR'de rol oynayan altta yatan immün mekanizmaları özgül olarak hedeflemeyi amaçlamaktadır. Ayrıca, devam etmekte olan klinik çalışmalar, seçici olarak B-hücresi ve plazma hücresi hedefleyen tedaviler gibi yeni tedavi yöntemlerinin AMR yönetimindeki etkinliğini değerlendirmektedir. Bu hedefe yönelik yaklaşımlar, kalp nakli sonrasında AMR riski taşıyan veya AMR teşhisi konulan hastalar için daha özel ve etkili tedavi seçenekleri sunma potansiyeline sahiptir. Araştırmalar AMR patogenezi ve potansiyel terapötik hedefler konusundaki anlayışımızı geliştirmeye devam ettikçe, yeni tanı ve tedavi yaklaşımlarının klinik uygulamaya entegrasyonu, kalp nakli alıcılarının sonuçlarını ve uzun vadeli prognozunu önemli ölçüde iyileştirme potansiyeline sahiptir.

Merkezimizde uygulanan tedavi protokolüne göre; alıcının nakil öncesi takiplerinde elde edilen immünolojik verilere göre, serumda 'tek antijen tanımlama' yöntemiyle DSA olup olmadığı, varsa, MFI değerleri saptanan antikorlarla vericinin doku grupları karşılaştırılarak sanal çapraz eşleştirme yapılmakta ve alıcının risk durumu belirlenmektedir. Yüksek riskli bulunan alıcılarda nakil beklerken, PF+IVIG+Rituximab üçlüsü ile duyarsızlaştırma tedavisi uygulanmakta, diğer gruplarda nakil öncesi herhangi bir immünsupresyon kullanılmamaktadır. Bizim olgu serimizdeki 19 hastadan sadece birinde (8 numaralı hasta), nakil öncesi immünolojik takiplerinde, MFI düzeyi 10.000 üzerinde seyreden sınıf I anti-HLA antikorları saptanması nedeniyle, desensitizasyon tedavisi uygulanmıştır. Merkezimizde nakil sonrası uygulanan immünsupresyon protokolü, solid organ nakillerinden sonra çoğu nakil merkezinde uygulanmakta olan klasik protokol olup, kişiye özel belirlenmiş dozlarda, 'mikofenolat mofetil+Takrolimus+Prednizolon' üçlü tedavisinden oluşmaktadır. İyi seyirli

greft kalp alıcılarında nakilden 1 yıl sonra prednizolon doz azaltılarak tedavi protokolünden çıkartılmaktadır.

Protokol biyopsilerinde, histopatolojik olarak hafif dereceli (Grade 1R) ACR tanısı alan hastalar sadece izlenmekte iken, orta ve şiddetli derecelerde (Grade 2R veya 3R) ACR tanısı alan hastalarda, immün supreyonu güçlendirmek için, ek metil prednizolon dozlarıyla sadece 3 gün süren bir tedavi verilmektedir. Bu tedavi, tabloya eklenmiş AMR bulunmayan pür ACR olgularında genellikle yeterli olmaktadır.

Protokol veya endikasyon biyopsilerinde AMR2 ve AMR3 tanısı almış olgularda, plazmaferez ile başlayan ve IVIG ve takiben Rituximab ile devam eden ve toplamda ortalama 10 gün süren, üçlü tedavi seçeneği planlanmaktadır. Histopatolojik tanı biyopsi sonrası 24 saat içinde alındığı için, tedaviye başlanmadan önce, biyopsi ile senkron hasta serum örneği merkezimizin transplantasyon immünolojisi laboratuvarına gönderilmektedir. İmmünolojik sonuçlar beklenmeden PF ve takiben IVIG tedavisi uygulanmaktadır. Hastanın PRA ve LSA profilleri, verici doku grupları biliniyorsa DSA profilleri ve MFI düzeyleri belirlendikten sonra, immünolojik veriler ve deneyimli bir transplant immünoloğu rehberliğinde tedavi yönlendirilmektedir. Özellikle $MFI \geq 7500$ saptanan ve plazmaferez ve IVIG tedavisine dirençli seyreden DSA varlığında tedaviye, ek PF+IVIG ve takiben Rituximab ile devam edilmektedir. Histopatolojik tanı pAMR1 ise, hasta sadece yakın takibe alınarak senkron serum örneğinden elde edilecek immünolojik veriler beklenmektedir. Aynı şekilde, yeni oluşmuş pozitif DSA ve 2500 üzerinde MFI düzeyleri bulunması halinde, özellikle klinik bulgu varsa, gelişmekte olan daha şiddetli bir AMR atağının habercisi erken bulgular olarak kabul edilerek, 3 doz PF ile tedaviye başlanır, 10 gün sonra kontrol serum örneğinde MFI düzeylerinde azalma yoksa IVIG tedavisine geçilir. Direngen DSA, klinik bulgu veya belirti varsa tedavi sonrası kontrol serum örnekleri alınarak immünolojik değişikliklere göre biyopsi tekrarı ile tedavi yeniden planlanır veya hasta sadece yakın takibe alınır. Bu aşamalı immünolojik takiplerde amaç, alıcının gereksiz immünsupresyona maruziyetini önlemek, invaziv bir yöntem olan EMB sayısını azaltmak, daha kolay elde edilebilen serum örneklerinde LSA veya DSA MFI düzeylerinin tedaviye yanıtını yakından gözlemleyerek tedaviyi yönlendirmektir. Ayrıca bu takipler sayesinde, henüz histopatolojik olarak saptanabilen doku hasarına neden olmamış ama risk oluşturabilecek LSA/DSA artışlarını kontrol altında tutarak, uzun vadede greft disfonksiyonuna ve kaybına neden olan CAV gibi kronik hasarların önüne geçmek mümkün olabilir.

Bizim hasta grubumuzda tekrarlayan AMR ve/veya ACR atakları olan 17 hastanın sadece 5 tanesi 56 ay ile 124 ay arasında değişen greft sağ kalım süreleri ile kaybedilmiştir. Bunlardan birinin ölüm nedeni greft kaybı değil, geçirdiği COVID-19 enfeksiyonu sonucu gelişen komplikasyonlar olmuştur. Çalışmamıza dahil edilen 19 hastanın greft sağ kalım süresi ortalama 101,11 ay (maksimum 198 ay, minimum 49 ay) olarak hesaplandı. Çalışma grubunda 6 hasta ve kontrol grubundan 1 hasta olmak üzere toplam 7 hasta, nakil sonrası minimum 3 yıl maksimum 9 yıl içinde (median 8 yıl) kardiyak allogreft vaskülopatisi geliştirmişti (Tablo 3.1.1). Allogreft kalp alıcılarında özellikle uzun takiplerde AMR, diğer rejeksiyon tiplerine göre daha kötü sonuçlarla öne çıkmaktadır⁵. Greft kalplerde ortalama yarı ömrün 1990'lı yıllar için 9,4 yıl olduğu bildirilmiştir⁵. Bizim grubumuzdaki 19 kalp nakil hastasının 14'ü (%74) hayattaydı ve son kontrole geliş tarihlerine göre ortalama greft sağ kalımı 8,4 yıl olarak hesaplandı. Sağ kalım hesaplamaları için örneklem sayısı yetersiz olmasına karşın, çalışma grubumuzun %84'ünü kronik AMR sürecinde hastalar oluşturması da hesaba katıldığında, bu oranların başarılı bir nakil öncesi ve sonrası yönetimi temsil ettiği söylenebilir.

Merkezimizde, greft kalplerde akut rejeksiyon ataklarının saptanmasına yönelik nakil sonrası çabalar, greft fonksiyon kaybının klinik muayeneler ve radyolojik görüntülemeler ile izlenmesini, histopatolojik, immünopatolojik ve serolojik kanıtların tanımlanmasını içerir. AMR genel olarak akut hecmeler ile seyretmekle birlikte, klinik bulgu vermeden sinsi bir seyir izleyebilmektedir. Bu nedenle, kalp nakil hastalarından, belirli bir protokol dahilinde, rutin izlem için, nakil sonrası endomiyokardiyal biyopsiler alınmaktadır. Ancak rejeksiyon yönünden şüpheli klinik belirti veya bulgu varsa ek olarak endikasyon biyopsileri de alınmaktadır. Yıllar içinde, her bir kalp nakil hastasından alınmış onlarca EMB örnekleri rejeksiyon yönünden değerlendirilerek rapor edildikten sonra parafin bloklar ve rutin boyamaları yapılmış hazır preparatlar halinde hastanemizin patoloji laboratuvarında arşivlenmektedir. Kalp nakli sonrası ilk protokol biyopsisi ilk 2 hafta içinde yapılır. Sonraki biyopsi protokolleri merkezler arasında farklılık gösterir. Bizim merkezimizde yakın geçmişe kadar uygulanmakta olan EMB protokolü, ilk 1 ay içinde iki biyopsi ve sorun bulunmaması halinde, takip eden ikinci, üçüncü, altıncı, dokuzuncu ve onikinci aylarda birer biyopsi, daha sonra yılda bir biyopsi şeklinde planlanmaktaydı¹⁵. Son yıllarda tekrarlayan biyopsilere ikincil gelişen subendokardiyal fibrozis ile karakterli skar oluşumunun daha sonraki biyopsilerde tanı güçlükleri yaratması ve nadir de olsa işlem sırasında oluşabilecek klinik komplikasyonları azaltmak amacıyla bu sayılar yarıya düşürülecek şekilde protokol biyopsileri daha seyrek

planlanmaktadır. Ek olarak, alıcıda bazı klinik belirtilerin olması (nefes darlığı, çarpıntı, sistemik enfeksiyon belirtileri gibi) veya rutin klinik kontroller sırasında hemodinamik bozukluk veya ritm bozukluğu saptanması durumunda endikasyon biyopsileri alınmaktadır. Merkezimizde, sağ internal juguler ven veya sağ femoral ven aracılığıyla sağ ventriküle girilerek interventriküler septumdan ortalama 5 adet endomiyokardial doku örneği alınmaktadır. Bu örnekler bazen tamamen yağ dokudan veya subendokardial fibröz bağ dokudan oluşmaktadır. Tanısal olarak kabul edilen spesmenlerin miyokardı temsil eden en az 2 örnek içermesi beklenmektedir. Patoloji laboratuvarına taze olarak yollanan bu EMB örnekleri ışık mikroskopik inceleme için rutin boyamalar ve immünohistokimyasal çalışmalar ile değerlendirilmekte, ayrıca immünoflöresan incelemeler yapılmaktadır.

Çalışmamıza dahil edilen EMB'lerin çoğunluğunu protokol biyopsileri veya tedavi kontrolü için alınmış biyopsiler oluşturdu. Olgularımızın %45,1'inde klinik bulgu ve/veya belirti vardı, %1,1'inde sadece klinik şüphe vardı, %53,8'inde ise klinik belirti veya bulgu yoktu. Olguların senkron transtorasik ekokardiografisine göre, hemodinamik bozukluk takibinde güvenilir bir ölçüt olarak kullanılmakta olan sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonu (LVEF) olguların %72,5'inde %50 ve üzeri, yani kabul edilebilir sınırlarda iken, %18,7'si %40 -49 arasında ve %8,8'i ise, %40'dan az olmak üzere, belirgin düşüşler göstermişti. Ancak bu grupta 19 hastanın 7'sinin (%37) klinik ve anjiyografik (>%20 koroner stenozis) olarak saptanmış CAV geliştirmiş olması, hatta bunlardan birinin (16 numaralı hasta) nakil sonrası 6. yılına kadar protokol biyopsilerinde hiç rejeksiyon tanısı almamış olması dikkat çekicidir (Tablo 3.1.1). Bu hastaya ait son biyopsi spesmeninde sadece histomorfolojik şüpheli reaktif endotelyal değişiklikler ve hafif şiddette kapillerit bulguları saptanması sonucu bu hastanın “hafif şiddette AMR [pAMR_{1H}]” tanısı ile izlenmiş olması, histopatolojik değerlendirmelerin tuzaklarını vurgulaması açısından önemli bir bulgudur. İmmünohistokimyasal bulgu vermeyen bu olguları, akut rejeksiyon ataklarının greft dokuda yamasal tutulum eğilimi göstermesi ve EMB'lerin temsiliyet sınırlılığı ile açıklayabiliriz. İşte bu olgularda yapılacak erken ve düzenli DSA takipleri, daha sonra gelişmesi muhtemel şiddetli rejeksiyonların veya CAV gelişiminin habercisi olarak işlevsel olabilir⁸.

İyi bir nakil kalp takibinin immünolojik çalışmalar rehberliğinde yapılması esastır¹. Günümüzde, kalp nakil merkezlerinde, dolaşımdaki antikorları saptamak için kullanılan en yaygın yöntem, bizim merkezimizde kullanılmakta olan LUMINEX'tir¹⁶. AMR tanısı için, gerekli olması durumunda immünolojik testlerde kullanılmak üzere, biyopsi ile senkron serum örnekleri alınması ve saklanması önerilmektedir¹⁷. Hücre bazlı ve solid faz

analizlerinin her ikisi de dolaşımdaki antikorı belirlemek ve ölçmek için kullanılır. Merkezimizde kullanılmakta olan solid faz antikor tespit analizleri (SPA) oldukça hassas ve özgüdür; tespit edilen antikorların spesifikliğini ve gücünü belirlemede çok başarılıdır¹⁷. Genellikle HLA'ya özgü antikorun tespit edilip edilemeyeceğini belirlemek için başlangıçta en hassas test kullanılır. Akış tarama boncukları, sınıf I ve sınıf II boncuklarla saptanan bağlanma yüzdesini tanımlamak için kullanılır. Antikorların özgüllüğü SPA tek antijeni veya fenotip boncukları tarafından belirlenir. Antikorların bağlanma gücünü bildirmek için standart floresan yoğunluğu veya ortalama floresan yoğunluğu (MFI) kullanılmaktadır. Hücre bazlı analizler, DSA reaktivitesini belirlemek için kullanılan hem kompleman bağımlı sitotoksiteyi (CDC) hem de akış sitometrisi çapraz karşılaştırmalarını içerir.

Solid organ nakli alıcılarının nakil sonrası antikor durumunu izlemiş bazı çalışmalarda, nakil öncesi duyarlı olduğu bilinen alıcılarda, nakil sonrası de-novo DSA gelişme olasılığı daha yüksek bulunmuştur. Bu antikorların çoğu ilk 60 günde ortaya çıkar; dolayısıyla bu dönemdeki izlemler kritik öneme sahiptir. Bu zamandan sonra de-novo DSA'ların gelişimi sıklıkla HLA sınıf-II'ye yöneliktir ve bu antikorlar gelecekteki AMR ataklarından, kronik allograft disfonksiyonu gelişiminden ve greft kaybından sorumlu tutulmaktadır⁴. Ancak, son çalışmalar, HLA sınıf-I veya II'ye yönelik DSA varlığının, tek başına patolojik AMR'yi teşhis etmek için yetersiz kaldığını bildirmektedir^{4,8}. Öte yandan, AMR tanısında immünolojik testler ile saptanan DSA varlığının bir kriter olarak kullanımı merkezler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Çoğu merkez, AMR tanı kriteri olarak greft kalbin fonksiyon bozukluğunu esas almaktadır¹⁶. Ancak bu yöntem, erken tanı ve kronik süreci önleme fırsatı vermemesi nedeniyle tartışmalıdır.

2010 AMR Konsensüs Konferansı, nakil kalplerde AMR'nin daha iyi anlaşılması için klinisyenleri, patoloğları ve immünologları bir araya getirdi. Bu konferansın en önemli sonuçlarından biri, kardiyak fonksiyon bozukluğu olmayan, biyopsi ile kanıtlanmış AMR tanılarını gösteren son yayınlar nedeniyle, kardiyak fonksiyon bozukluğu ve/veya dolaşımdaki DSA varlığı ile yapılan klinik bir tanımlamanın artık yeterli olmadığına inanılmasıydı. Ayrıca, rejeksiyon atakları sırasında, dolaşan antikorların donörün kalbinde dokuya yapışmış halde olabileceğinden, DSA'nın AMR epizodları sırasında her zaman dolaşımda tespit edilemediği de kaydedildi. Bu konferansta, yeni bir patolojik AMR (pAMR) derecelendirme ölçeği önerildi¹⁶. Ancak, pAMR-1 tanısı ve takibindeki kriterler hala yoruma çok açıktır.

2009'da gerçekleştirilen 10. Banff konferansının kalp oturumunda, miyokarddaki C4d ve C3d için immünohistokimyasal boyamalarda merkezler arasında çok iyi bir

tekrarlanabilirlik olduğu vurgulanmış ve son yayınlarda bildirilen immünoglobulinler gibi duyarlılığı ve özgüllüğü düşük olan immün boyaların kullanımından kaçınılması önerilmiştir¹⁷. Ancak, bizim merkezimiz de dahil, birçok nakil merkezi, tanısal patoloji rutininde, dondurulmuş taze dokuda immünflöresan mikroskopik incelemelerde, miyokardın mikrovasküler çatısında kompleman faktörlerine eşlik eden immünglobulin pozitifliklerini ikincil tanısal belirteçler olarak kullanmaktadırlar^{5,30}.

Biz bu tez çalışması ile, hem AMR patogenezindeki mekanizmaların bir kısmına ışık tutmayı hem de rutin tanısal patolojide kullanılabilir yeni histomorfolojik ve immünhistokimyasal belirteçler bulmayı hedefledik. Patogeneizde aydınlatılan her karanlık odak potansiyel tanısal ve terapötik hedefleri de yaratabileceği inancıyla, patoloji rutin uygulamalarında, nakil kalplerden alınmış EMB'leri değerlendirirken en çok tanısal sorun yaşadığımız hasta grubuna odaklandık. Tekrarlayan sinsi seyirli AMR ataklarının kısa ve uzun vadede greft kalplerde yarattığı yıkıcı hasarları önlemek için erken tanıya yardımcı olabilecek yararlı potansiyel belirteçler olarak plazma hücreleri ve immünglobulin profilinin AMR'deki rolü üzerinde odaklandık. İki aşamalı bir çalışma yürüttük. Öncelikle, tekrarlayıcı antijen maruziyetlerinde immün modülatör görevi ile öne çıkan ve inflamatuvar reaksiyonlarda dengeleyici olduğu ileri sürülen IgG4 alt sınıfının, AMR'de sessiz klinik ve gürültüsüz histomorfolojik özelliklerden sorumlu olabileceğini düşündük. IgG4 grubu antikorların, nakil kalplerde, AMR ataklarındaki rolünü belirlemeye yönelik bir ön çalışma yaptık. Bu retrospektif çalışmada, patoloji rutin uygulamalarında kullandığımız immün belirteçlere (C4d, CD68, HLA-DR, CD31) ek olarak IgG ve IgG4 pozitif hücreleri belirlemek için immün-belirteçler kullandık. Küçük bir hasta grubunu kapsayan kontrollü immünhistokimyasal çalışmalarda değerlendirilen biyopsi spesmenlerinde IgG4 pozitif tek bir hücre varlığı gösteremedik. Ancak ışık mikroskopik değerlendirmelerde, dokuda yine immünhistokimyasal yöntemlerle belirlediğimiz IgG pozitif hücre sayılarının, eşzamanlı serum örneklerinde saptanan DSA MFI düzeyleri ile yakın ilişkili olduğunu gözlemledik⁴⁷. Böylece, daha geniş nakil kalp hasta gruplarında, EMB'lerde diğer IgG alt sınıfları ile çalışmayı planladık. Ekonomik sınırlılıklar nedeniyle immün-tetikleyici (proenflamatuvar) rolleri bilinen sadece IgG'nin iki alt grubuna ait, IgG1 ve IgG3 pozitif hücreleri aramak için immün-belirteçler kullandık. Bu kez çalışmaya patoloji rutin uygulamalarında genel plazma hücre belirteci olarak kullanılan bir başka belirteç, CD138 de eklendi. Çünkü ön çalışmamızda IgG immün belirtecinin, sadece plazma hücrelerinde ifade edilmediğini, endotel hücreleri veya diğer mononükleer enflamatuvar hücre yüzeylerinde de ifade edildiğini gözlemledik. Bu nedenle

dokudaki plazma hücre sıklığını tespit etmek için daha özgün bir belirteç gerekliydi. Böylece, hem plazma hücrelerinin endomiyokardial dokuda ne sıklıkta ve hangi durumlarda karşımıza çıktığını görmek, hem de IgG ve alt tiplerinin ifade edildiği tüm hücrelerin sıklığını kantitatif değerlendirmek mümkün olacaktı. Tüm bu belirteçler ile immün boyamalar yapıldıktan sonra yüzlerce kesitin tüm alanlarını tarayarak pozitif hücrelerin en yoğun olduğu odaklarda hücre saymak oldukça zahmetli bir süreci getireceği için, merkezimizde kullanımda olan bir yapay zeka programından yararlanabileceğimizi umarak tüm kesitler dijital ortamda kaydedildi. Ancak, bizim kullandığımız tüm belirteçler sitoplazmik ve/veya nükleer boyanma gösterdiği için, sayma denemelerinde programın başarısız kaldığı farkedilerek bu uygulamadan vazgeçildi. Tüm kesitler tek bir deneyimli patolog tarafından ışık mikroskopik inceleme ile klasik yöntemle değerlendirilerek, en yoğun odaktaki pozitif hücre sayıları kaydedildi.

Klinik bulgu olmayan protokol biyopsilerinde, C4d veya CD68 immünbelirteçleri ile beklenen düzeylerde pozitiflik elde edilemediğinde, sadece histomorfolojik bulgulara dayanarak, rejeksiyon yok (EK 3: Resim 1) veya AMR_{1H} var (EK 3: Resim 2) kararı vermek veya düşük oranlı (<%10) C4d (EK 3: Resim 3) ve/veya CD68 (EK 3: Resim 4) pozitifliklerine rağmen AMR2 tanısı vermek farklı tedavi yaklaşımlarına neden olmaktadır. Genellikle patolog alıcının son LSA/DSA durumunu bilmeksizin 24 saat içinde bir karar vermek zorunda kalır. İşte patoloji rutininde greft kalplerde EMB değerlendirmesinde patolog için en önemli zorluk budur. Özellikle nakil sonrası ilk ayda bu karar çok daha önem arz eder. Çünkü, bu kalplerde ciddi doku hasarına neden olmadan erken rejeksiyon atağını durdurmak, böylece kronik immünolojik süreçlerin tetiklenmesini önlemek mümkün olabilmektedir. Bu noktada ikincil immün belirteçlerden yardım beklenmektedir; immünflöresan tekniği ile boyamalarda IgG, IgM, IgA veya kompleman birikimlerinin aranması ya da HLA-DR, CD31 veya CD34 gibi endotelial immün belirteçler ile endotel hasarını vurgulamak bunların bazılarıdır⁵⁰. Merkezimizde de başvurduğumuz bu yöntemlerin yetersizliğini rutin uygulamalarımızda gözlemlemekteyiz. Özellikle immünflöresan uygulamalarında saptanan immünglobulin depolanmalarının sensitivitesinin düşük olduğu bu çalışmamızın da gözlemlerindendi; 91 olguluk seride, 75 rejeksiyon tanılı olgumuzun sadece 6'sında C3c veya IgM ile anlamlı pozitiflik saptanmıştı. Bunların tümü şiddetli pür AMR veya şiddetli miks AMR+ACR olgularıydı. Diğer bir deyişle, immünflöresan boyamalar, daha çok Ig veya kompleman depolanmasının şiddetli olduğu rejeksiyon ataklarını vurguluyordu. Endotelial immün belirteçlerin değerlendirmesi ise, kantitatif kriterlere dayalı olmadığı için, deneyimli patologlar arasında dahi yorum farklılıklarına neden olmaktadır. Bu nedenle, EMB'lerde, miyokardial interstisyumda veya subendokardial alanlarda veya kapiller lümenlerinde ve hatta

“Quilty effect” lezyonları içindeki plazma hücre varlığının aranması ve/veya miyokardiyal endotelde IgG depolanmalarının ve IgG alt sınıflarının profilinin immünohistokimyasal belirteçler ile gösterilmesi, ikincil yardımcı araçlar olabilir.

Patologlar için, hafif veya şiddetli derecelerde olsun, akut T hücre aracılı rejeksiyonlar (ACR), antikor aracılı rejeksiyon gruplarına göre daha açık ve tanınabilir histomorfolojik bulgular sunar (EK 3: Resim 5 ve 6). Ancak, şiddetli AMR veya ACR olgularında tanı güçlüğü yaratan faktörler, her ikisinin tanı kriterlerinin büyük oranda örtüşmesi, yalancı C4d pozitifliğinin şiddetli doku hasarına bağlı olarak daha olası hale gelmesi ya da kapiller yıkımına bağlı, C4d ile beklenen çizgisel boyanmanın olmaması (EK 3: Resim 7) ve CD68 pozitif makrofajların interstisyel alanda da bulunmasının (EK 3: Resim 8) yaratacağı değerlendirme güçlükleridir. Bu durumlarda histomorfolojik bulgulara ek olarak, mikrosirkülasyondaki makrofajların yanı sıra IgG, IgG1 veya IgG3 pozitif inflamatuvar hücrelerin ve/veya endotel hücrelerinin varlığının gösterilmesi ve hatta CD138 immün belirteci ile plazma hücre varlığının gösterilmesi (EK 3: Resim 9,10,11,12) ACR’ye eşlik eden AMR’yi tanımak için destekleyici bir morfolojik katkı sunabilir. Tedavi planının değiştirilmesini gerektiren bu durumlarda, ağır greft hasarının ve kronikleşme sürecinin önüne geçmek için, pür ACR-3 ile şiddetli ‘miks ACR+AMR’ ayırıcı tanısı özel bir öneme sahiptir. Antikor aracılı rejeksiyon grupları içinde ise, histopatolojik olarak en zor tanınan AMR1 grubudur. Histomorfolojik bulguları netleşmemiş hafif dereceli AMR’leri tanımlarken, sadece immünohistokimyasal belirteçlerin (C4d ve CD68) sonuçlarına göre karar vermekteyiz. ISHLT 2013 kriterlerine göre, bu olguları AMR-1(i) olarak tanımlamaktayız³⁰. Histopatolojik tanısal rutinde nakil kalplerin EMB’lerinde en sık karşılaşılan sorunlardan bir diğeri, ‘Quilty effect’ (yorgan etkisi) olarak tanımlanan subendokardial nodüler lenfoid toplulukların varlığıdır (EK 3: Resim 13). Kendi kapiller yatağını yapmış nodül tarzında organize olmuş bu lenfoid hücre topluluklarını tanımak ve doğru yorumlamak patolog için zaman zaman zorluk yaratır. Çünkü, ACR ataklarının miyokarda uzanan lenfosit aktivasyonundan günümüzde masum kabul edilen bu lezyonları ayırt etmek, dokunun kesit yüzünün oryantasyonuna da bağlı olarak güç olabilir. Geçmişte, bazı yazarlar bu lezyonları, miyokarda uzanım gösterebilir ya da gösteremez, “Quilty” etkisi olarak tanımladılar ve geniş olgu serilerinde şiddetli akut rejeksiyonlarla birliktelik gösterdiklerini bildirdiler. Hem ‘Quilty lezyon’ içinde, hem de akut rejeksiyonda miyokardial lifleri tutan inflamatuvar infiltratta T lenfositlerin baskınlığını gösterdiler ve akut rejeksiyonun bir tezahürü olduğu sonucuna vardılar⁴⁸. Siklosporin A’nın immünsupresyon için kullanılmasından önce ‘Quilty etkisi’ gözlenmemişti ve “Quilty”

etkisinin kalp dokusunda siklosporin A'nın toksik etkisine veya tetiklediği immünolojik reaksiyonlara bağlı olduğu öne sürülse de, bu veriler “Quilty” etkisinin siklosporin A'nın endokardiyal varlığının azalmasıyla ilişkili olduğunu, bunun da genellikle klinik olarak anlamlı olmayan, sınırlanmış endokardiyal rejeksiyon olduğu ileri sürüldü⁴⁹. Bizim çalışmamızda, tanı gruplarıyla “Quilty” lezyon arasında anlamlı bir ilişkisi gösterilememekle birlikte, kronik süreçli hastaların biyopsi spesmenlerinin çoğunda karşımıza çıktı. Çalışmamızda kullandığımız immün belirteçlerden sadece IgG3 endotel pozitifliği ile ilişkisi gösterilebildi; “Quilty” lezyon olmayan olgularda daha yüksek oranlarda endotelial hücrelerde IgG3 ifade edilmişti. Bu sonuç, IgG3 pozitiflik oranlarının ACR olgularındaki yükselişi ile ilişkili olabilir. Buradan dolayı olarak, “Quilty” etkisinin ağırlıklı olarak AMR olgularına eşlik ettiği çıkarımı yapılabilir.

Çalışmamızdaki gözlemlerimize göre, dokuda rejeksiyon yok dediğimiz olguların bir kısmında serumda LSA veya DSA varlığını sınırsız sürdürüyordu. CD138 pozitif plazma hücreleri ve IgG pozitif enflamatuar hücreler ise sadece AMR tanılı örneklerde pik yapıyordu, plazma hücrelerinin sayısı ACR tanılı örneklerde yeniden biraz yükseliyordu. Ayrıca, CD68'in %10 ve üzerindeki pozitifliği ile IgG, IgG1 ve IgG3 pozitif endotel hücresinin varlığı veya %10 ve üzeri pozitifliği anlamlı ilişki gösteriyordu (Şekil 3.7.2 ve 3.7.3). Bu bulgular, tanısal patoloji rutininde, AMR olgularında, yamasal tutulumla bağlı oluşabilen, C4d ve CD68 yalancı negatifliği sorununu aşmak için, CD138, IgG, IgG1 veya IgG3 immün boyamalarının yardımcı belirteçler olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, endotelde IgG1 (p:0.072) ve IgG3 (p:0.000) pozitif hücre oranlarının %10 ve üzerinde olması ile herhangi bir tipte ve derecede rejeksiyon bulunması arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptandı. Bu durumda, endotel hücrelerinde saptanan IgG1 ve IgG3 depolanması, dokuya yapışmış DSA'ları daha özgül olarak temsil ediyor olabilir.

Elde edilen genel verilerin ışığında, uzun takipli iki hastaya ait biyopsi spesmenleri mercek altına alındığında; hasta bazında zamana dayalı klinik, immünolojik ve histopatolojik veriler birlikte değerlendirildiğinde ulaştığımız sonuçlar beklentimizin üzerindeydi. Bu hastalardan ilki (9 numaralı) 21 EMB ve senkron serum örnekleri ile 149 ay izlenmiş, bu süreçte tekrarlayan çok sayıda çeşitli derecelerde AMR atakları ve nakil sonrası ilk 9. yılda CAV geliştirmiştir. Donörüne ait detaylı anti-HLA antikor profiline ulaşamadığı için hasta, LSA HLA alt grupları esas alınarak, MFI düzeyleri ile düzenli yakın takipte kalmıştır. Bu hastanın AMR tanısı aldığı 6 farklı tarihteki LSA MFI düzeyleri zamana bağlı olarak ve tedavi durumu da dikkate alınarak, IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sıklığı yönünden

değerlendirildiğinde, IgG1 ve IgG3 pozitif inflamatuvar hücre sayıları ile hem LSA varlığı hem de MFI düzeyleri anlamlı bir korelasyon gösteriyordu (Şekil 3.3.4). Hasta bazında analiz edilen diğer hastamız (11 numaralı), 83 ay izlenmiş, yine kronik seyirli sık AMR ve/veya ACR atakları geçirmiş, 13 adet EMB ve senkron serum örnekleri ile izlenmiştir. Donörüne ait detaylı anti-HLA antikor profiline ulaşıldığı için DSA HLA alt grupları esas alınarak, MFI düzeyleri ile düzenli yakın takipte kalmıştır. Bu hastanın, dokularında çeşitli derecelerde ‘miks ACR+AMR’ tanısı aldığı 8 farklı tarihteki DSA MFI düzeyleri zamana bağlı olarak ve tedavi durumu da dikkate alınarak, IgG1 ve IgG3 pozitif hücre sıklığı yönünden değerlendirildiğinde, IgG1 ve IgG3 pozitif inflamatuvar hücre sayıları ile hem DSA’nın varlığı hem de MFI düzeyleri anlamlı bir korelasyon gösteriyordu (Şekil 3.3.5).

AMR için bilinen risk faktörlerinin (serumda LSA, DSA ve dokuda C4d pozitifliği) klinik belirti, bulgu veya hemodinamik bozukluk (düşük LVEF) ile ilişkilerine bakıldığında, sadece dokuda C4d pozitifliği ile istatistiksel anlamlılık saptandı. Miyokardial kapiller duvarlarında C4d pozitiflik oranının %10 ve üzerinde olması ile düşük LVEF (%50’nin altındaki) düzeyleri arasında anlamlı bir bağıntı saptandı (p:0.013). Serumda LSA veya DSA varlığı, klinik gruplara (belirti veya bulgu olan, olmayan ve şüpheli) göre veya LVEF düzeyleri ile anlamlı ilişki göstermedi. Klinik grupların dokuda herhangi bir oranda C4d pozitifliği bulunması ile bağıntısı istatistiksel olarak sınırda anlamlı bulundu (p:0.053) (Şekil 3.5.11). Kısaca, dokuda herhangi bir derecede C4d pozitifliğinin bulunması dahi klinik bulgu veren rejeksiyon bulunma riskine işaret ediyordu.

ISHLT 2013 AMR tanı kriterlerinde, immünohistokimyasal boyamalarda, C4d ile perimiyositik kapillerlerin %50’den fazlasında yani yaygın veya multifokal depolanma pozitif olarak değerlendirilmiştir³⁰. %10 ile 50 arasındaki oranlarda odaksal (fokal) boyanmalar da anlamsız kabul edilmiş, sadece kuvvetli fokal boyanmalarda yakın DSA takipleri için klinisyenin uyarılması önerilmiştir. Bizim günlük tanısal patoloji rutinlerimizdeki gözlemlerimize göre, özellikle CD68 genel makrofaj belirteci ile de vurgulanan mikrosirkülatuar enflamasyon ile fokal C4d pozitifliklerinin, hatta %10’un altında kalan pozitiflik oranlarının, birliktelikleri sıkça karşılaşılan bir çelişkili durum olmayı sürdürmektedir. Nakil böbreklerde, AMR tanısı için konulan C4d pozitiflik oranları zamanla küçültülerek günümüzde C4d negatif AMR tanısı kabul görmüş durumdadır²¹. Bu gözlemimizden yola çıkarak, merkezimizde 80 kalp nakil hastasının 818 EMB’den oluşan geniş bir olgu serisiyle yaptığımız bir çalışmada, %10’un altındaki zayıf kapiller pozitifliklerinin dahi DSA pozitifliği ile korele olduğunu, klinik ve EMB negatif kronik seyirli AMR tanısında ve izleminde anlamlı bir bulgu olabileceğini göstermiştik. 2018’de

düzenlenen 27. TTS uluslararası kongrede sözel bildiri olarak sunduğumuz bu çalışmamız henüz yayımlanmamıştır. Bu son çalışmamızda da C4d pozitifliğini, ISHLT 2013 önerilerinden farklı olarak; negatif, 1+ (<%10) ve 2+ (>=%10) olarak skorladık. Elde edilen sonuçlar, dokuda perimiyositik kapiller duvarlarında izlenen C4d'nin herhangi bir derecedeki immün pozitifliği yine serumdaki DSA veya LSA varlığı ile oldukça anlamlı bir şekilde ilişkilirdi (Şekil 3.5.2). Ayrıca, miyokardial kapiller duvarlarında saptanan %10 ve üzerindeki C4d depolanmalarının greft disfonksiyonu ile anlamlı ilişki göstermesi bu skorlamanın etkinliğini vurgulamıştır. Çalışmamızda CD68 pozitiflik oranları ISHLT 2013 kriterleri ile uyumlu skorlanmış, %10 ve üzeri oranlarda intrakapiller makrofaj sıklığı pozitif kabul edilmiştir. Bu skorlamaya göre, LSA pozitif olgu grubundaki HLA sınıflarına göre CD68 pozitiflik dağılımı C4d ile paralellik gösteriyordu (Şekil 3.7.4). Ayrıca, CD68 pozitif makrofaj yüzde oranlarının öncelikle C4d'nin herhangi bir oranda pozitiflik göstermesi ile anlamlı (p:0,002) korelasyon göstermekteydi. Öte yandan MFI düzeyi 1000 ve üzerinde olan olgu grubunda CD68 pozitifliği anlamlı bir şekilde yüksekti (p:0,003) (Şekil 3.7.5). Tüm bu bulgulardan çıkarımımız, C4d'nin %10'un altında kalan oranlardaki pozitifliğinin dahi DSA/LSA varlığının histomorfolojik yansıması olabileceği, hatta sinsi seyirli kronik AMR ile ilişkili olabileceği yönündeydi. Bu sonuçlar daha önceki çalışma sonuçlarımızı da destekler nitelikteydi.

Greft kalplerde C4d ve CD68 immün pozitifliklerinin ISHLT 2013 kriterlerine göre kategorizasyonlarının AMR tanısında kullanışlılığı tartışmaya açıktır. Tedavi gerektiren AMR kategorizasyonunda da belirsizlikler sürmektedir. Bizim çalışmamız gösterdi ki, AMR tanısı için yeterli kabul edilmeyen %10'un altındaki C4d immün pozitiflikleri tanı ve risk gruplarıyla anlamlı istatistiksel ilişkiler gösterdi. Ancak, hasta profilimizin önemli kısmının kronik seyir gösteriyor olması göz önünde tutulduğunda, düşük oranlardaki C4d pozitifliklerinin kronik AMR sürecini yansıttığı olabileceği düşünüldü. Tüm solid organ nakillerinde olduğu gibi, miyokardial dokuda akut rejeksiyonların yamasal ve fokal tutulum gösterme eğiliminin yalancı immün ve/veya morfolojik negatifliklere neden olabileceği açıktır. Bu nedenle, nakil böbreklerde olduğu gibi, nakil kalplerde AMR tanısında fokal C4d immün pozitifliklerin de dikkate alınması, bu konudaki çalışma verilerinin toplanması sonucu, yakın gelecekte gündeme gelebilir kanaatindeyiz.

Bizim olgu serimizde, rejeksiyon olan ve olmayan vakalar arasında DSA değerlerinde anlamlı bir farklılık olduğu görüldü (t (35) = -2.95, p =0.006). LSA pozitifliği rejeksiyon olmayan olgularda DSA pozitifliğinden daha sık saptandı. Beklendiği gibi, DSA

pozitifliğinin, rejeksiyonlarla birlikteliği LSA'ya göre daha yüksek olasılığı işaret ediyordu. Bu bulgu çalışma grubumuzdaki risk gruplarının tutarlılığını ve bağıntısını göstermek adına anlamlıydı. Senkron serumunda LSA bakılmış 42 olgu, LSA pozitifliği, HLA sınıflarına göre ve tedavi durumuna göre 7 grupta sınıflandırıldığında, muhtemelen gruplardaki olgu sayıları küçük olduğundan gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak tedavi gruplarında, dokudaki C4d pozitifliğinin serumda direngen HLA sınıf-II LSA pozitifliklerine daha çok eşlik ettiği, pür HLA sınıf-I LSA pozitif grupta C4d pozitif olgu bulunmadığı dikkati çekti (Şekil 3.5.4). Ayrıca, CAV geliştirmiş hasta grubuna ait 43 olgunun serum DSA durumu bilinen 17'sinin tümünde HLA sınıf-II antikorlar, pür veya HLA sınıf-I antikorlar ile birlikte bulunmaktaydı. Buna karşın CAV geliştirmemiş grupta ise DSA durumu bilinen 20 olgunun 15'inde HLA sınıf-II antikorlar (pür veya HLA sınıf-I ile birlikte) bulunmaktaydı. Bu sonuçlar olgu serimizin ortalama greft sağ kalım süresinin uzun (8,4 yıl) olması ve çoğunluğunu kronik seyirli hastaların biyopsilerinin oluşturması ve de-novo gelişmiş HLA sınıf-II antikorların daha çok kronik AMR sürecinden sorumlu tutulması ile ilişkilendirilebilir^{6,7}. Tedavi ilişkili analizlerde görüldü ki, AMR tedavisini takip eden ilk 1 yıllık sürede tedavi etkinliğini korumaktaydı. Tedaviye en dirençli gözükten antikor grubu HLA sınıf-I ve sınıf-II birlikteliği oldu. Endotelyal IgG ve IgG1pozitifliği ile en yakın ilişkili gözlenen antikor grubu yine HLA sınıf-II (HLA sınıf-I ile birlikte veya pür) oldu.

Loupy ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kalp nakil hastalarının, nakilden 7 yıl veya daha uzun süre sonra oluşmuş sakın klinik seyirli ACR-2R/3R atakları mercek altına alınmış; çalışma grubunun %60'ında mikrosirkülatuvar enflamasyon bulguları, %55'inde C4d pozitifliği ve %64'ünde DSA pozitifliği (MFI= 1751+/-583) olduğu bildirilmiştir. "Çok geç rejeksiyon" olarak adlandırdıkları bu tablonun sonuçlarının kontrol grubuna göre daha kötü olduğu ve CAV gelişim riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir²¹. Bizim çalışma grubumuzun %35,2'sini miks ACR+AMR olguları oluşturdu. Bunların çoğu düşük dereceli ve klinik bulgu vermeyen rejeksiyonlardı ve %37'sinde nakil sonrası 3 ile 9 yıl arasında değişen (median 8 yıl) süreler sonunda CAV gelişimi saptandı. Bu sonuçlar, çok geç gelişmiş sessiz rejeksiyonların önemli kısmının miks ACR+AMR olguları olduğunu ve uzun vadede hiç de masum olmadıklarını vurgulamaktadır.

Tanı grupları IgG, IgG1 ve IgG3 pozitif mononükleer enflamatuar hücre sayılarına göre karşılaştırıldığında, sadece IgG1 pozitif hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdi; ACR-2R ve ACR-3R olgularında daha yüksek sıklıkta IgG1+ enflamatuar hücre tespit edildi (p<0.05). Diğer parametrelerde tanı grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Bu tablolarda dikkat çekici olan, histopatolojik olarak 'rejeksiyon yok' tanısı almış olgularda

IgG3 pozitif hücre saptanmamasıydı (Tablo 3.2.1). Öte yandan, senkron serumlarında sınıf-I ve/veya sınıf-II DSA saptanmış 37 hasta ile DSA negatif 25 hasta kapiller endotel hücrelerinde herhangi bir orandaki IgG, IgG1 ve IgG3 pozitifliği yönünden karşılaştırıldığında, DSA pozitifliği ile sadece endotelial IgG3 pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı ($p = .044$) birliktelik göstermiştir (Şekil 3.3.7). Bu sonuç, IgG3'ün yüksek kompleman bağlama yeteneği de dikkate alındığında, DSA ile korelasyonu en yakın olan alt IgG grubu olması ile açıklanabilir. Lefaucheur ve ark. nakil böbreklerde IgG anti-HLA antikorları ile AMR ilişkisini araştırmışlar ve bu çalışmada DSA'nın IgG3 ve IgG4 alt sınıfları, antikor aracılı hasarla yüksek oranda ilişkiliyken, IgG3 DSA'nın varlığı daha büyük bir greft kaybı riskiyle ilişkilendirilmiştir. IgG4 alt sınıfının DSA'ları ise, subklinik kronik AMR ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Bir Cox regresyon sağkalım modeli kullanan yazarlar, IgG3 DSA'ların ve C1q+ DSA'ların allogreft yetmezliği ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlardır⁵¹.

IgG1 spesifitesinin daha düşük olması, inflamatuvar hücre reaksiyonunun daha güçlü olduğu ACR tanı gruplarında IgG1 pozitif inflamatuvar hücre ve endotelial hücre sayılarının daha yüksek olması ile ilişkilendirilebilir. IgG3 ise, rejeksiyonsuz olgularda negatif, ACR gruplarında ise IgG1'e göre daha sınırlı pozitif hücre sayıları ile kendini göstermektedir (Şekil 3.2.6.). Tanı grupları arasında karşılaştırıldığında, ACR-2R ve ACR-3R olgularında daha yüksek sıklıkta IgG1+ inflamatuvar hücre tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 3.2.1). Proenflamatuvar fonksiyonlarıyla tanınan bu iki IgG alt grubunda elde edilen farklı sonuçlar, IgG1'in IgG'nin alt tipleri içinde en yüksek oranı oluşturması ve IgG1'in (21 gün) yarılanma ömrünün IgG3'den (7 gün) daha uzun olması ile açıklanabilir². IgG3 genellikle oluşan ilk alt sınıftır ve bunu daha sonra baskın olan IgG1 yanıtları takip eder².

Çalışmamızda, akut rejeksiyon tanısı ve greft disfonksiyonu bulunması ile en anlamlı ilişkileri göstermesi nedeniyle, en etkin risk faktörü olarak kabul ettiğimiz C4d pozitifliği esas alınarak yapılan ROC eğrisi risk hesaplamalarında, CD138 ve IgG, IgG1 ve IgG3 immün belirteçlerinin her biri için, risk oluşturan anlamlı pozitif hücre sayısını veren eşik değerler 0,5 olarak hesaplanmıştır. Bu durumda, bu immün belirteçler ile boyamalarda, 1 büyük büyütme alanında bulunacak tek bir pozitif inflamatuvar hücre AMR için anlamlı risk oluşturmaktadır. Bu analizlerin sonuçlarına göre, IgG3 en yüksek sensitivite ve spesifiteye (%100, %100) sahipti. Sensitivite ve spesifite oranlarına göre, sıralamada daha sonra gelen CD138 (%86,7; %74) ve IgG (%95,6; %63) nispeten güvenilir immün belirteçler olarak öne çıkmıştır (Tablo 3.6.1 ve Şekil 3.6.1). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, EMB spesmenlerindeki histopatolojik incelemelerde, mikroskopik herhangi bir odakta bulunacak tek bir IgG3 veya

IgG pozitif inflamatuvar hücre veya CD138 pozitif tek bir plazma hücresi AMR için anlamlı risk oluşturmaktadır.

Bu bulgular bize dokudaki IgG1 ve IgG3 pozitif hücrelerin özellikle DSA ilişkili ortaya çıktığını ve MFI şiddeti ile bağıntılı artıp azaldığını göstermiştir. Özellikle tedavi ilişkili DSA ile birlikte seyirleri dikkate alındığında, IgG1 daha sensitif, IgG3 ise daha spesifik bir olası DSA belirteci olarak öne çıkmaktadır. Bu immün belirteçlerin, tanısal patoloji rutininde kullanılabilecek iki potansiyel belirteç olarak daha geniş hasta bazlı gruplarda araştırılması, tanısal, prognostik ve hatta tedaviye yönelik yeni açılımlar sağlayabilir kanaatindeyiz. Bu gözlemler ve sonuçlar bizi IgG4 ve IgG2 immün belirteçlerinin de dahil edileceği, ağırlıklı hasta bazlı olmak üzere, yeni çalışmalar planlamak için yüreklendirdi.

Bu tez çalışmasının sınırlılıklarına gelince; ilk olarak bu çalışmayı kurgularken planlanan, dokuda tüm IgG alt gruplarını gösterecek immün belirteçlerin boyanması ve tüm biyopsilerin immünoloji laboratuvarı arşivindeki senkron serumlarına immünolojik testler maliyet sınırlaması nedeniyle uygulanamadı. Sadece olguların daha önce uygulanmış LSA/DSA tanımlamaları ve MFI düzeylerine retrospektif olarak kayıtlardan ulaşılabildi. Bu durum, olgu gruplarımızın örneklem sayılarının düşmesine ve eğilimleri gözlemleyebilsek de, çoklu gruplar arası ilişkileri istatistiksel anlamlılık ile göremememize neden oldu. Diğer bir sınırlama, MFI düzeylerini sadece 1000 eşik değerine göre pozitif negatif kabul ederek genel istatistiksel analizler yapıldı. MFI düzeylerinin AMR şiddeti ve tedaviye ikincil sürekli değişkenliği sonuçlarımıza yansıtamamıştır. Hasta bazlı yaptığımız iki ayrı çalışmada, IgG1 ve IgG3 pozitif enflamatuvar hücre sayılarını DSA MFI düzeyleri ile birlikte değerlendirdiğimizde, çok daha anlamlı ilişkiler gözlemlenmesi, daha çok sayıda hastanın MFI düzeylerinin sürekli değişken olarak analiz edilmesinin önemini ortaya koydu. Önerilen histopatolojik AMR tanı kriterlerinin patolog için hala yoruma açık olması, özellikle AMR1 tanılarının rejeksiyon yok tanılarıyla örtüşmesi, ayrıca yüksek dereceli ACR'lerde eşlik eden AMR bulgularının maskelenebilmesi gibi tanı güçlükleri nedeniyle tanı gruplarının geçişkenliği ayrı bir sınırlılıktı. Uyguladığımız immün belirteçlerin tümünün sitoplazmik boyanma özelliğinden kaynaklanan, kalabalık gruplarda pozitif hücreleri ayırt ederek saymanın yarattığı zorluk ve reaktif endotel hücreleri ile mononükleer enflamatuvar hücrelerin morfolojik olarak ayırt edilmesinin zorluğu, çalışmamızdaki sayısal değerlerin güvenilirliğini azaltmış olabilir. Bunu aşmak için %10 eşik değer alınarak verilen pozitiflik oranları ve pozitif hücre var/yok şeklinde de kayıtlar alındı ve genel istatistiksel analizlerde tüm bu veriler birlikte kullanıldı.

KAYNAKLAR

1. Basturk B. Kalp Naklinde İmmünolojik Değerlendirme: Rejeksiyon Mekanizmaları ve Tedavi. Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Surg-Special Topics. 2018;10(2):130-6.
2. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4th ed. New York, USA: WB Saunders; 2000.
3. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, Webber S. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. J Heart Lung Transplant. 2013 Jan;32(1):98-105.
4. Clerkin KJ, Farr MA, Restaino SW, Zorn E, Latif F, Vasilescu ER, Marboe CC, Colombo PC, Mancini DM. Donor-specific anti-HLA antibodies with antibody-mediated rejection and long-term outcomes following heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 2017 May;36(5):540-545.
5. Taylor DO, Yowell RL, Kfoury AG, Hammond EH, Renlund DG. Allograft coronary artery disease: clinical correlations with circulating anti-HLA antibodies and the immunohistopathologic pattern of vascular rejection. J Heart Lung Transplant. 2000;19:518–21.
6. Topilsky Y, Gandhi MJ, Hasin T, et al. Donor Specific Antibodies to Class II Antigens Are Associated With Accelerated Cardiac Allograft Vasculopathy – A 3-D volumetric IVUS study. Transplantation. 2013;95:389–396.
7. Kaczmarek I, Deutsch MA, Kauke T, et al. Donor-specific HLA alloantibodies: long-term impact on cardiac allograft vasculopathy and mortality after heart transplant. Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation. 2008;6:229–35.
8. Smith JD, Banner NR, Hamour IM, et al. De Novo Donor HLA-Specific Antibodies after Heart Transplantation Are an Independent Predictor of Poor Patient Survival. American Journal of Transplantation. 2011;11:312–319.
9. Terzi A, Ozdemir BH. Kalp Naklinin İzleminde Histopatolojik Değerlendirmenin Klinik ile Uyumu; Endomiyokardiyal Biyopsi Altın Standart mıdır? Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Surg-Special Topics. 2018;10(2):109-16
10. Reinsmoen NL, Nelson K, Zeevi A. Anti-HLA antibody analysis and crossmatching in heart and lung transplantation. Transpl Immunol. 2004 Jun-Jul;13(1):63-71
11. L. U. Nwakanma, J. A. Williams, E. S. Weiss, S. D. Russell, W. A. Influence of Pre-transplant Panel Reactive Antibody on Outcomes in 8,160 Heart Transplant Recipients in Recentera. The Annals of Thoracic Surgery, 2007; 84(5):1556-62.
12. David Chang and Jon Kobashigawa. The use of The calculated Panel Reactive Antibody and Virtual Cross Match In Heart Transplantation. Current Opinion in Organ Transplantation, 2010;17(4):423-26.
13. Bray RA, Nolen JD, Larsen C, et al. Transplanting the Highly Sensitized Patient: the Emory Algorithm. American Journal Transplant 2006; 6(10):2307–15
14. Stehlik J, Islam N, Hurst D, et al. Utility of Virtual Crossmatch in Sensitized Patients Awaiting Heart Transplantation. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2009; 28(11):1129–1134.

15. Terzi A, Sezgin A, Tunca Z, Deniz E, Ayva EŞ, Haberal Reyhan N, Müderrisoğlu H, Özdemir BH. A single-center retrospective clinicopathologic study of endomyocardial biopsies after heart transplant at Baskent University Hospital in Ankara, 1993-2014. *Exp Clin Transplant*. 2015 Apr;13 Suppl 1:346-51.
16. Kobashigawa J, Crespo-Leiro MG, Ensminger SM, Reichenspurner H, Angelini A, Berry G, Burke M, Czer L, Hiemann N, Kfoury AG, Mancini D, Mohacsi P, Patel J, Pereira N, Platt JL, Reed EF, Reinsmoen N, Rodriguez ER, Rose ML, Russell SD, Starling R, Suciu-Foca N, Tallaj J, Taylor DO, Van Bakel A, West L, Zeevi A, Zuckermann A; Consensus Conference Participants. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Mar;30(3):252-69.
17. Hertz MI, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Edwards LB, Kirk R, Kucheryavaya AY, Rahmel AO, Rowe AW, Stehlik J, Taylor DO. Scientific Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: introduction to the 2009 Annual Reports. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Oct;28(10):989-92.
18. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, Dobbels F, Goldfarb SB, Levvey BJ, Meiser B, Yusef RD, Stehlik J; International Society of Heart and Lung Transplantation. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first official adult heart transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Oct;33(10):996-1008.
19. John R, Rajasinghe HA, Chen JM, Weinberg AD, Sinha P, Mancini DM, Naka Y, Oz MC, Smith CR, Rose EA, Edwards NM. Long-term outcomes after cardiac transplantation: an experience based on different eras of immunosuppressive therapy. *Ann Thorac Surg*. 2001 Aug;72(2):440-9.
20. Irving CA, Carter V, Gennery AR, Parry G, Griselli M, Hasan A, Kirk CR. Effect of persistent versus transient donor-specific HLA antibodies on graft outcomes in pediatric cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Oct;34(10):1310-7.
21. Loupy A, Cazes A, Guillemain R, Amrein C, Hedjoudje A, Tible M, Pezzella V, Fabiani JN, Suberbielle C, Nochy D, Hill GS, Empana JP, Jouven X, Bruneval P, Duong Van Huyen JP. Very late heart transplant rejection is associated with microvascular injury, complement deposition and progression to cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant*. 2011 Jul;11(7):1478-87.
22. Kfoury AG, Snow GL, Budge D, Alharethi RA, Stehlik J, Everitt MD, Miller DV, Drakos SG, Reid BB, Revelo MP, Gilbert EM, Selzman CH, Bader FM, Connelly JJ, Hammond ME. A longitudinal study of the course of asymptomatic antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Jan;31(1):46-51.
23. Wu GW, Kobashigawa JA, Fishbein MC, Patel JK, Kittleson MM, Reed EF, Kiyosaki KK, Ardehali A. Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes. *J Heart Lung Transplant*. 2009 May;28(5):417-22.
24. Loupy A, Toquet C, Rouvier P, Beuscart T, Bories MC, Varnous S, Guillemain R, Pattier S, Suberbielle C, Leprince P, Lefaucheur C, Jouven X, Bruneval P, Duong Van Huyen JP. Late Failing Heart Allografts: Pathology of Cardiac Allograft Vasculopathy and Association With Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant*. 2016 Jan;16(1):111-20.

25. Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, Kemnitz J, Marboe C, McCallister HA, Snovar DC, Winters GL, Zerbe A. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant*. 1990 Nov-Dec;9(6):587-93.
26. Fishbein MC, Bell G, Lones MA, Czer LS, Miller JM, Harasty D, Trento A. Grade 2 cellular heart rejection: does it exist? *J Heart Lung Transplant*. 1994 Nov-Dec;13(6):1051-7. PMID: 7865512.
27. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suciu-Focia N, Zeevi A, Billingham ME. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Nov;24(11):1710-20.
28. Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S, Menlove RL, Renlund DG, Bristow MR, Gay WA Jr, Jones KW, O'Connell JB. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. *J Heart Transplant*. 1989 Nov-Dec;8(6):430-43. PMID: 2693662.
29. Mills RM, Naftel DC, Kirklin JK, Van Bakel AB, Jaski BE, Massin EK, Eisen HJ, Lee FA, Fishbein DP, Bourge RC. Heart transplant rejection with hemodynamic compromise: a multiinstitutional study of the role of endomyocardial cellular infiltrate. *Cardiac Transplant Research Database. J Heart Lung Transplant*. 1997 Aug;16(8):813-21.
30. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, Bruneval P, Fedrigo M, Fishbein MC, Goddard M, Hammond EH, Leone O, Marboe C, Miller D, Neil D, Rassl D, Revelo MP, Rice A, Rene Rodriguez E, Stewart S, Tan CD, Winters GL, West L, Mehra MR, Angelini A. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Dec;32(12):1147-62.
31. Bruneval P, Angelini A, Miller D, Potena L, Loupy A, Zeevi A, Reed EF, Dragun D, Reinsmoen N, Smith RN, West L, Tebutt S, Thum T, Haas M, Mengel M, Revelo P, Fedrigo M, Duong Van Huyen JP, Berry GJ. The XIIIth Banff Conference on Allograft Pathology: The Banff 2015 Heart Meeting Report: Improving Antibody-Mediated Rejection Diagnostics: Strengths, Unmet Needs, and Future Directions. *Am J Transplant*. 2017 Jan;17(1):42-53.
32. Ware AL, Malmberg E, Delgado JC, Hammond ME, Miller DV, Stehlik J, Kfoury A, Revelo MP, Eckhauser A, Everitt MD. The use of circulating donor specific antibody to predict biopsy diagnosis of antibody-mediated rejection and to provide prognostic value after heart transplantation in children. *J Heart Lung Transplant*. 2016 Feb;35(2):179-85.
33. Kuppachi S, Axelrod DA. Desensitization strategies: is it worth it? *Transpl Int*. 2020 Mar;33(3):251-259. doi: 10.1111/tri.13532. Epub 2020 Feb 5. PMID: 31553805.
34. EFI web http://hla.alleles.org/nomenclature/nomenc_reports.html
35. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries -- the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant*. 2003 Jun;3(6):646-52.

36. Baldwin, W. M., Kasper, E. K., Zachary, A. A., Wasowska, B. A., & Rodriguez, E. R. (2004). Beyond C4d: Other Complement-Related Diagnostic Approaches to Antibody-Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation*, 4(3), 311-318.
37. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J, Kupiec-Weglinski J, Matas A, Montgomery RA, Nickerson P, Platt JL, Rabb H, Thistlethwaite R, Tyan D, Delmonico FL. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2004 Jul;4(7):1033-41.
38. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, Salvatierra O Jr. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med*. 2003 Jul 10;349(2):125-38.
39. Kenta I, Takaaki K. Molecular Mechanisms of Antibody-Mediated Rejection and Accommodation in Organ Transplantation. *Nephron*. 2020;144 Suppl 1:2-6.
40. Meulenbroek AJ, Zeijlemaker WP. Human IgG Subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence [online]. Sanquin, Laboratory for Experimental and Clinical Immunology University of Amsterdam, the Netherlands; 1996 (<http://www.xs4all.nl/~ednieuw/IgGsubclasses/subkl.htm>).
41. Jackson AM, Kanaparthi S, Burrell BE, Lucas DP, Vega RM, Demetris AJ, Feng S. IgG4 donor-specific HLA antibody profile is associated with subclinical rejection in stable pediatric liver recipients. *Am J Transplant*. 2020 Feb;20(2):513-524. doi: 10.1111/ajt.15621. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31561279.
42. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014 Oct 20;5:520.
43. Valenzuela NM, Schaub S. The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation*. 2018 Jan;102(1S Suppl 1):S7-S13.
44. Kind S, Merenkow C, Büscheck F, Möller K, Dum D, Chirico V, Luebke AM, Höflmayer D, Hinsch A, Jacobsen F, Göbel C, Weidemann S, Fraune C, Möller-Koop C, Hube-Magg C, Clauditz TS, Simon R, Sauter G, Wilczak W, Bawahab AA, Izbicki JR, Perez D, Marx A. Prevalence of Syndecan-1 (CD138) Expression in Different Kinds of Human Tumors and Normal Tissues. *Dis Markers*. 2019 Dec 23;2019:4928315.
45. Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis*. 2004 Jul;63(7):774-84.
46. Murata K, Baldwin WM 3rd. Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev (Orlando)*. 2009 Jul;23(3):139-50.
47. Terzi A, Basturk B, Ozdemir H, Kavuzlu M, Sezgin A. IgG and IgG4 positive plasma cell profile in recurrent antibody-mediated rejection of cardiac transplants. *Transplantation*. 106(9S):p S202, September 2022.
48. Pardo-Mindán FJ, Lozano MD. "Guilty effect" in heart transplantation: is it related to acute rejection? *J Heart Lung Transplant*. 1991 Nov-Dec;10(6):937-41.

49. Freimark D, Czer LS, Aleksic I, Ruan XM, Admon D, Blanche C, Trento A, Fishbein MC. Pathogenesis of Quilty lesion in cardiac allografts: relationship to reduced endocardial cyclosporine A. J Heart Lung Transplant. 1995 Nov-Dec;14(6 Pt 1):1197-203.
50. Ozdemir BH, Demirhan B, Ozdemir FN, Dalgıç A, Haberal M. The role of microvascular injury on steroid and OKT3 response in renal allograft rejection. Transplantation. 2004 Sep 15;78(5):734-40.
51. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, Verine J, Jouven X, Legendre C, Glotz D, Loupy A, Zevevi A. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. J Am Soc Nephrol. 2016 Jan;27(1):293-304.



EK 1. BAŞKENT ÜN. İMMÜNOLOJİ A.D. TRANSPLANT İMMÜNOLOJİ LABORATUVARI SSO ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

BAŞKENT ÜN. İMMÜNOLOJİ A.D. TRANSPLANT İMMÜNOLOJİ LABORATUVARI SSO ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için hastaların vericilerine ait kan örnekleri EDTA'lı kan tüpüne alınmıştır.

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

Bu cihaz özel bir kart sistemiyle çalışır. Çalışmanın yapılması iki ayrı çalışma tablasına uygun tüplerin ve kartuşun yerleştirilmesi ile olur. Bunun için cihaz açılmadan cihazın kabini açılır ve tablalar dışarı alınır ve aşağıdaki adımlar uygulanır.

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

SSO yöntemi ile HLA -A, -B, -C, -DR, -DQ doku tipleme testi

HLA -A, -B, -C, -DR ve -DQ testi için; LIFECODES HLA-A, -B, -C, -DRB1 ve – DQB1 eRES SSO TYPING KIT (IMMUCOR, Dreieich, ALMANYA) ticari kitleri kullanılmıştır.

1. DNA çoğaltılması (PCR)
 - 1.1. Hazırlık aşaması
 - 1.1.1. İzole edilen DNA örnekleri -20 °C dondurucudan çıkarılarak oda ısısına (20-25 °C) gelmesi sağlanır.
 - 1.1.2. Taq polimeraz ve master mix -20 °C dondurucudan çıkarılarak oda ısısına (20-25 °C) gelmesi sağlanır.
 - 1.1.3. DNA örnekleri, master mix ve Taq polimeraz buz aküsü üzerinde tutulmalıdır.
 - 1.1.4. TabloYA göre n (test sayısı) + 1 olacak şekilde çalışılacak örnek sayısına göre HLA -A, -B, -C, -DRB1 ve -DQB1 lokusları için ayrı ayrı master mix, Taq polimeraz ve distile su ile reaktif hazırlanır.
 - 1.1.5. Hazırlanan reaktif vortekslenir.

Tablo 0: SSO master mix hazırlama tablosu

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

1.2. Ekim aşaması

1.2.1. 0,2 ml'lik PCR tüplerine 4 μl DNA pipetlenir.

1.2.2. HLA -A, -B ve -DRB1 lokusları için ayrı olarak hazırlanan reaktiflerden ilgili PCR tüplerine 16 μl pipetlenir.

1.2.3. PCR tüplerinin kapakları kapatılır.

1.2.4. PCR tüpleri vortekslenir.

1.3. PCR aşaması

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

1.3.2. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda Tabloya göre hazırlanan ve 1. aşama olan SSO PCR amplifikasyon programı başlatılır.

1.3.3. Program 1 saat 38 dakika sürer.

Tablo: SSO amplifikasyon PCR döngüsü

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

1.4. Agaroz Jel Elektroforezi aşaması

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

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

1.4.2. Hassas terazi kullanılarak 2 gr. agaroz tartılır.

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

1.4.4. Jel tepsinin tarakları yerleştirilerek hazır hale getirilir.

- 1.4.5. Hazırlanan agaroz karışımı mikrodalga fırında 35 W da 5 dakika eritilir.
- 1.4.6. Sıvı haldeki agaroz 4 damla Gel Red eklenir.
- 1.4.7. Karışım jel tepsisine dökülür.
- 1.4.8. 15 dakika beklenerek agarozun katılaşıp jel haline gelmesi beklenir.
- 1.4.9. Jel hazır olduktan sonra içerisinde 0,5xTBE solüsyonu bulunan elektroforeze bağlı kuvvet içerisinde yerleştirilerek tarakları çıkarılır.
- 1.4.10. PCR ürünleri jelde kendileri için oluşturulan kuyulara, her kuyuya 10 µl olacak şekilde yüklenir.
- 1.4.11. Uygun kuyulara 10 µl DNA Size Marker yüklenir.
- 1.4.12. 0,5x TBE Buffer içerisinde 160 Volt'ta 16 dakika yürütülür.
- 1.4.13. Süre sonunda agaroz jel UV transilüminatöre konur.
- 1.4.14. UV ışık altında amplifiye olan DNA örnekleri görüntülenir.
- 1.5. Hibridizasyon aşaması
 - 1.5.1. 96 kuyuluk costar plate'e 5 µl PCR ürünleri pipetlenir.
 - 1.5.2. HLA A, B ve DRB1 lokuslarına özgü Probe mix kuru ısı bloğunda 56 °C'de 10 dakika ısıtılır.
 - 1.5.3. Ardından 15 saniye sonikatöre konur ve süre sonunda vortekslenir.
 - 1.5.4. Her bir Probe mix kendi lokus spesifik PCR ürününe 15 µl pipetlenir.
 - 1.5.5. Costar plate'in üzeri ısıya dayanıklı kapatıcı ile kapatılır.
- 1.6. PCR aşaması
 - 1.6.1. Costar Plate Thermal Cycler PCR cihazına yerleştirilir.
 - 1.6.2. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda tabloya'a göre hazırlanan ve 2. aşama olan SSO PCR hibridizasyon programı başlatılır.

Tablo:SSO hibridizasyon PCR döngüsü

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

- 1.7. Stretavidin Aşaması
 - 1.7.1. Örneklerin hibridizasyonu sırasında kuyu sayısına göre 200:1 seyreltilmiş Stretavidin karışımı hazırlanır. (Her kuyu için = 170 µl seyreltme solüsyonu + 0.85 µl 1 mg/ml Stretavidin [n+1 toplam hacimde])
 - 1.7.2. Hazırlanan karışım karanlıkta ve oda ısısında saklanır.
 - 1.7.3. Hibridizasyonun 56 °C sonsuz aşamasında, PCR'ın kapağı açılır, plate üzerindeki silikon yapışkan kapatıcı dikkatlice çıkarılır.
 - 1.7.4. Hazırlanan karışımdan her bir kuyuya 170 µl eklenir.
 - 1.7.5. Tüm kuyular 5 dakika içinde seyreltilmelidir.
- 1.8. LUMINEX aşaması
 - 1.8.1. Luminex cihazı hibridizasyon aşamasının başında açılarak 30 dakika ısınması sağlanır.

- 1.8.2. Streptavidin pipetlendikten sonra costar plate dikkatlice PCR cihazından alınır.
- 1.8.3. Luminex cihazına verilen costar plate üretici firmanın talimatları doğrultusunda okutulur.
- 1.8.4. MATCH IT DNA software programında HLA doku tiplleme analizi yapılır.



EK 2. BAŞKENT ÜN. İMMÜNOLOJİ A.D. TRANSPLANT İMMÜNOLOJİ LABORATUVARI PRA TARAMA SINIF I ve II TESTİ ÇALIŞMA TALİMATI

BAŞKENT ÜN. İMMÜNOLOJİ A.D. TRANSPLANT İMMÜNOLOJİ LABORATUVARI PRA TARAMA SINIF I ve II TESTİ ÇALIŞMA TALİMATI

PRA Tarama Sınıf I II testi için Labscreen Mixed (OneLambda, Almanya) kiti kullanılmıştır.

1. Oda sıcaklığına (20 °C – 24 °C) gelen LABScreen Mixed Bead Mix HLA boncukları kısa bir santrifüjden (600-800 g' de 30 saniye) sonra yaklaşık 1 dakika vortekslenir.
2. Her bir test kuyusuna çalışma listesine göre kontrol serumu ve hasta serumlarından 20 µl eklenir.
3. İlgili kuyulara 5 µl HLA boncuklarından konulur. Üzeri yapışkan plastik kapatıcıyla kuyular kapatılır. Çalışma plağı dikkatli bir şekilde vortekslenir. Karanlık ortamda, oda sıcaklığında ve rotator (200 dönüş/dakika) üzerinde, 30 dakika inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrasında her kuyuya 150 µl hazırlanan 1X yıkama tamponundan eklenir. Üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir. Çalışma plağı Plate santrifüj'de 1300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası plak ters çevrilip üsteki süpernatant dökülür ve aynı şekilde peçete üzerine konularak fazla suyu alınır.
5. Her kuyuya 200 µl yıkama tamponu eklenir. Üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir. Çalışma plağı Plate santrifüj'de 1300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası plak ters çevrilip üsteki süpernatant dökülür ve aynı şekilde peçete üzerine konularak fazla suyu alınır. Bu işlem toplamda iki kez yapılır.
6. Son yıkama işleminden sonra plağın üzeri tekrar plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak vortekslenir.
7. Hazırlanan konjugattan her kuyuya 100 µl eklenir. Üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir. Karanlık ortamda, oda sıcaklığında ve rotator (200 dönüş/dakika) üzerinde, 30 dakika inkübe edilir.
8. İnkübasyon sonrasında çalışma plağı dikkatli bir şekilde vortekslenir ve Plate santrifüj'de 1300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası plak ters çevrilip üsteki süpernatant dökülür ve aynı şekilde peçete üzerine konularak fazla suyu alınır.
9. Her kuyuya 200 µl yıkama tamponu eklenir. Üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir. Çalışma plağı Plate santrifüj'de 1300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası plak ters çevrilip üsteki süpernatant dökülür ve aynı şekilde peçete üzerine konularak fazla suyu alınır. Bu işlem toplamda iki kez yapılır.
10. Yıkama sonrasında üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir.
11. Her kuyuya 80 µl %1'lik PBS eklenir ve üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir.

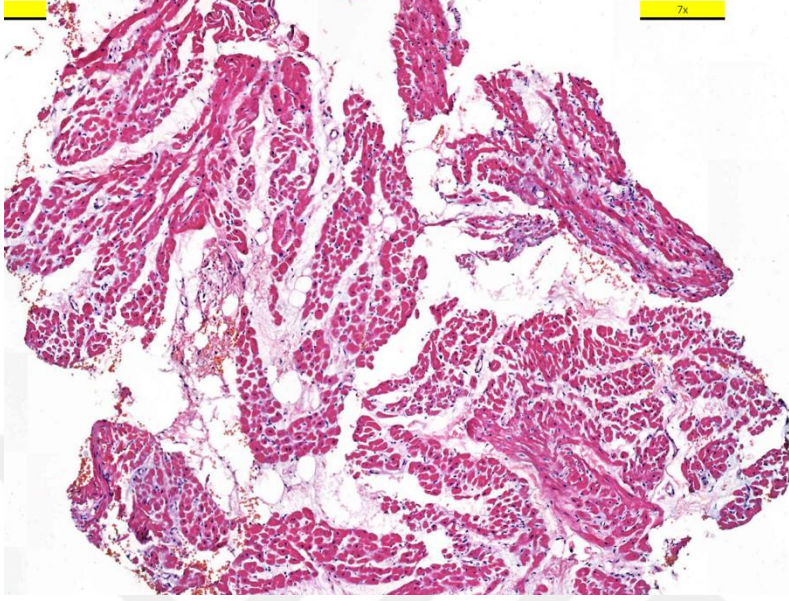
12. Luminex cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda test okutulur.

LSA SINIF I ve II TESTİ ÇALIŞMA TALİMATI

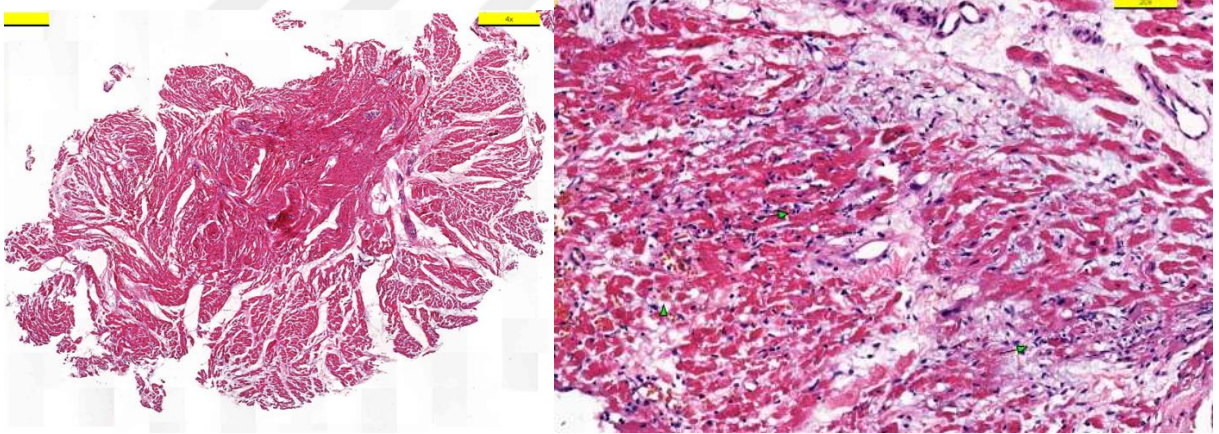
LSA Sınıf I II testi için Labscreen ClassI ve II (OneLambda, Almanya) kiti kullanılmıştır.

1. Oda sıcaklığına (20-24 °C) gelen LABScreen Class I ve/veya Class II Single Antigen HLA boncukları kısa bir santrifüjden (600-800 g' de 30 saniye) sonra yaklaşık 1 dakika vortekslenir.
2. Her bir test kuyusuna çalışma listesine göre kontrol serumu ve hasta serumlarından 20 µl eklenir.
3. İlgili kuyulara 5 µl HLA boncuklarından konulur. Üzeri yapışkan plastik kapatıcıyla kuyular kapatılır. Çalışma plağı dikkatli bir şekilde vortekslenir. Karanlık ortamda, oda sıcaklığında ve rotator (200 dönüş/dakika) üzerinde 30 dakika inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrasında her kuyuya 150 µl hazırlanan 1X yıkama tamponundan eklenir. Üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir. Çalışma plağı Plate santrifüj'de 1300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası plak ters çevrilip üsteki süpernatant dökülür ve aynı şekilde peçete üzerine konularak fazla suyu alınır.
5. Her kuyuya 200 µl yıkama tamponu eklenir. Üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir. Çalışma plağı Plate santrifüj'de 1300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası plak ters çevrilip üsteki süpernatant dökülür ve aynı şekilde peçete üzerine konularak fazla suyu alınır. Bu işlem toplamda iki kez yapılır.
6. Son yıkama işleminden sonra plağın üzeri tekrar plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak vortekslenir.
7. Hazırlanan konjugattan her kuyuya 100 µl eklenir. Üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir. Karanlık ortamda, oda sıcaklığında ve rotator (200 dönüş/dakika) üzerinde, 30 dakika inkübe edilir.
8. İnkübasyon sonrasında çalışma plağı dikkatli bir şekilde vortekslenir ve Plate santrifüj'de 1300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası plak ters çevrilip üsteki süpernatant dökülür ve aynı şekilde peçete üzerine konularak fazla suyu alınır.
9. Her kuyuya 200 µl yıkama tamponu eklenir. Üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir. Çalışma plağı Plate santrifüj'de 1300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası plak ters çevrilip üsteki süpernatant dökülür ve aynı şekilde peçete üzerine konularak fazla suyu alınır. Bu işlem toplamda iki kez yapılır.
10. Yıkama sonrasında üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir.
11. Her kuyuya 80 µl %1'lik PBS eklenir ve üzeri plastik yapışkanlı kapatıcı ile kapatılarak dikkatli bir şekilde vortekslenir.
12. Luminex cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda test okutulur.

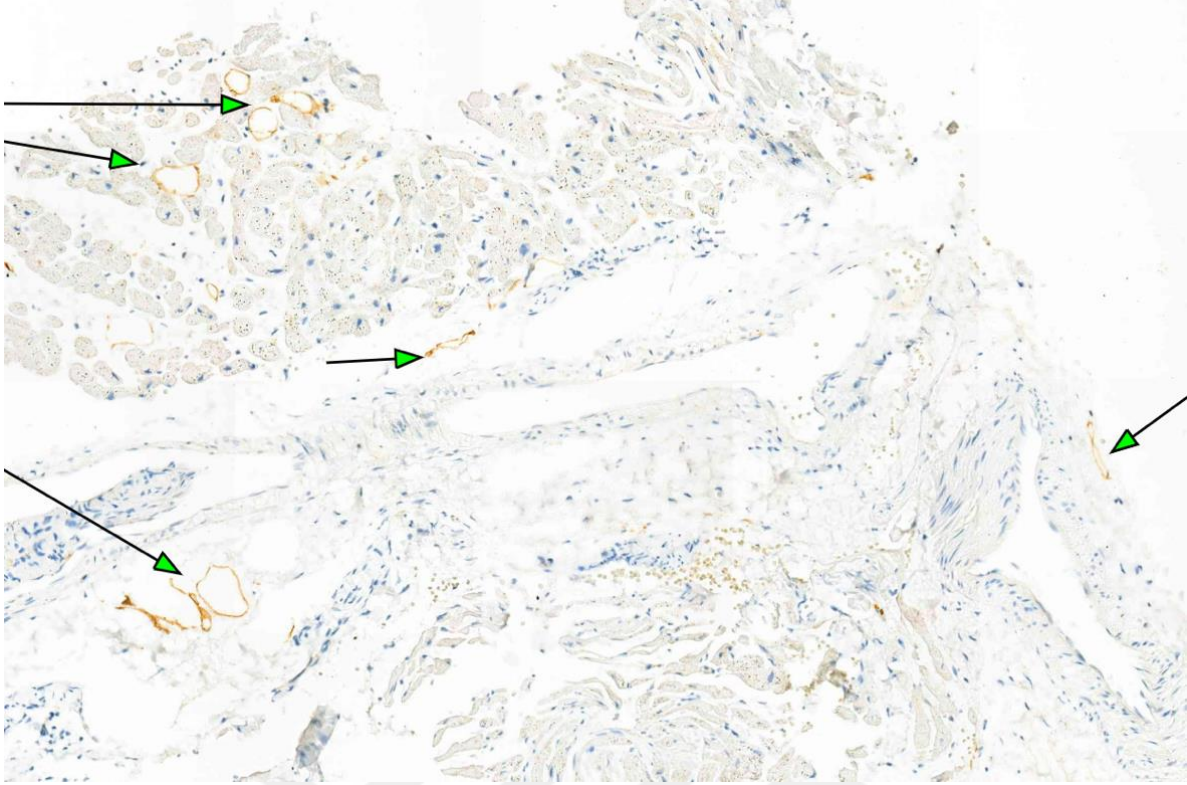
EK 3. RESİMLER



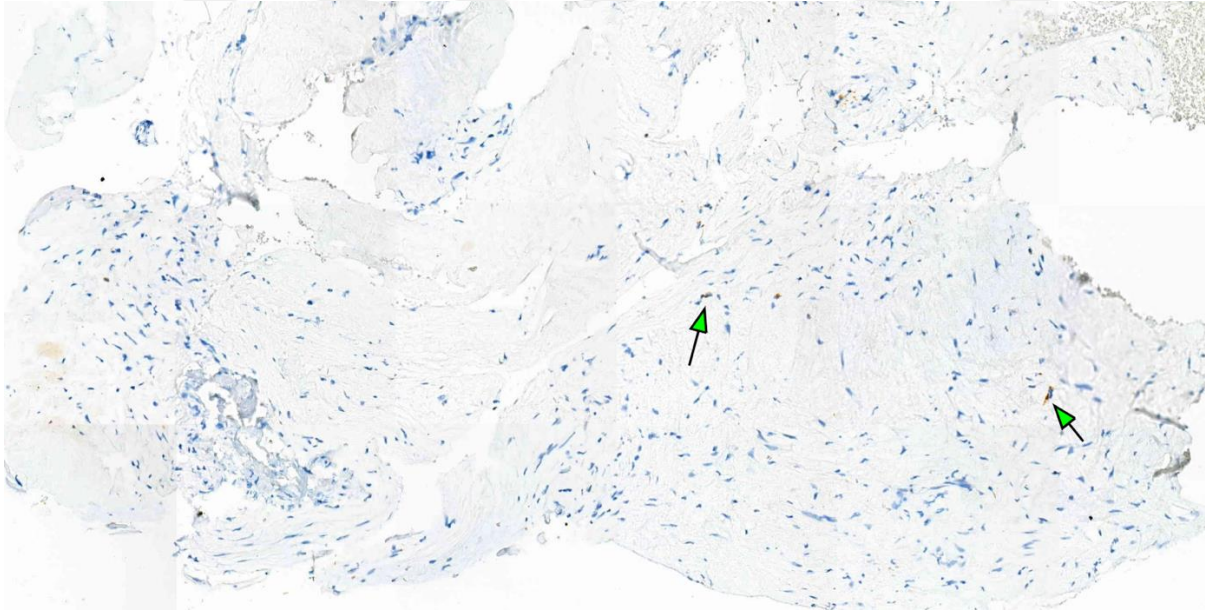
Resim 1: Rejeksiyon bulgusu izlenmeyen ödemli miyokard dokusu (x40, H&E boyalı) izlenmektedir (Hasta No:11).



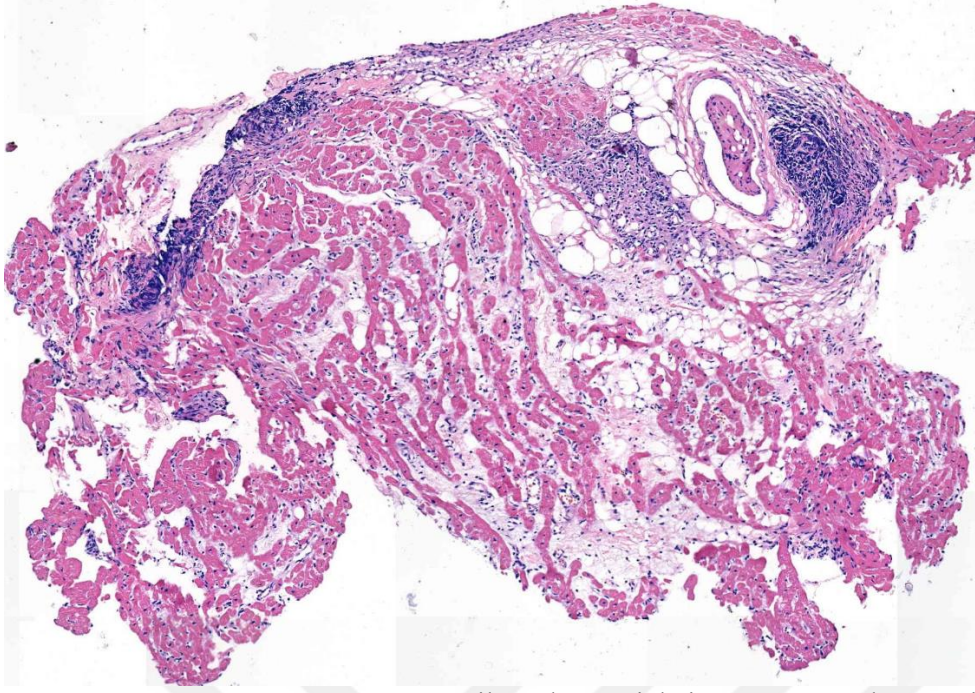
Resim 2: Histolojik AMR1 (AMR1H) bulguları içeren miyokard dokusu (H&E boyalı); küçük büyütmede (x40), ödemli interstisyum ve dilate, konjesyone perimiyositik kapiller ağ görülmektedir. Daha büyük büyütmede (x200) kapillerlerin lümenlerinde mononükleer enflamatuvar hücreler ile karakterli kapillerit bulgusu, ekstrasvaze eritrositler ve reaktif endotelyal değişiklikler görülmektedir (Hasta No:11, tedavi altında alınmış kontrol biyopsi).



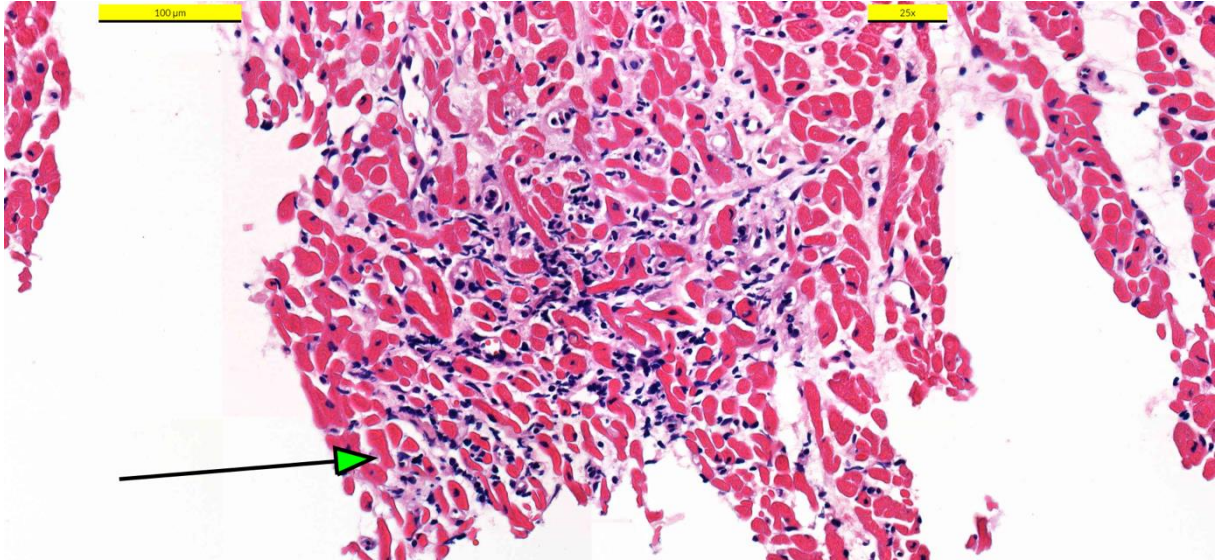
Resim 3: C4d immün belirteci ile AMR2 tanısı almış miyokard dokusunda oklar, perimiyositik kapiller duvarında fokal (<%10) zayıf boyanmayı göstermektedir (x120, İHK).



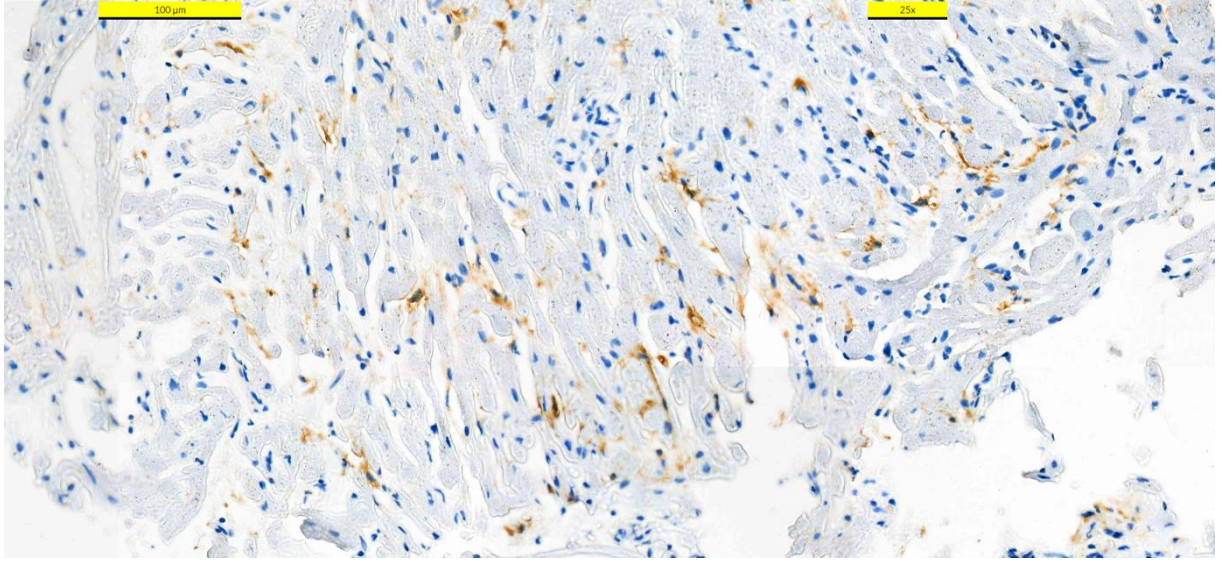
Resim 4: CD68 immün belirteci ile, AMR2 tanısı almış miyokard dokusunda oklar, perimiyositik kapiller lümenlerinde seyrek (<%10) tek tek duran makrofajları göstermektedir (x130, İHK).



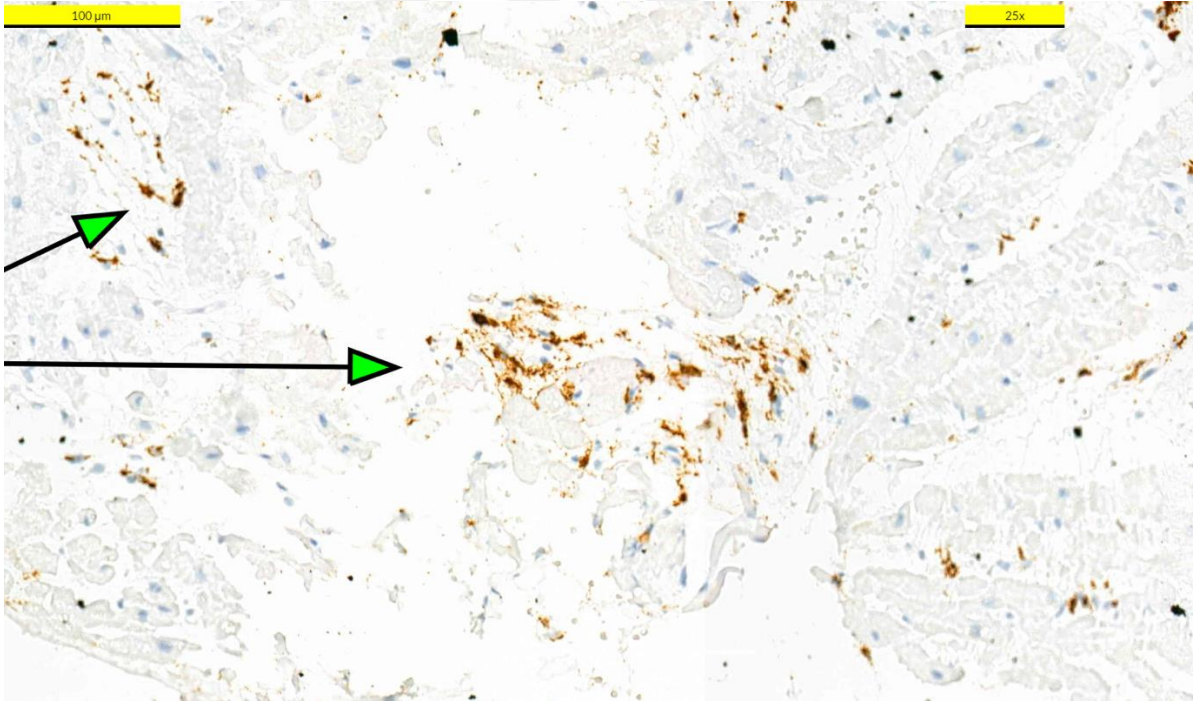
Resim 5: ACR-2R ve AMR2 mik s akut rejeksiyon tanısı almış miyokardial dokuda interstisyel lenfositik infiltrat odakları. ACR-2R için tanısal olan, miyosit nekrozlarına neden olan birden çok odakta lenfosit infiltrasyonları görölmektedir (x70, H&E) (Hasta No:11).



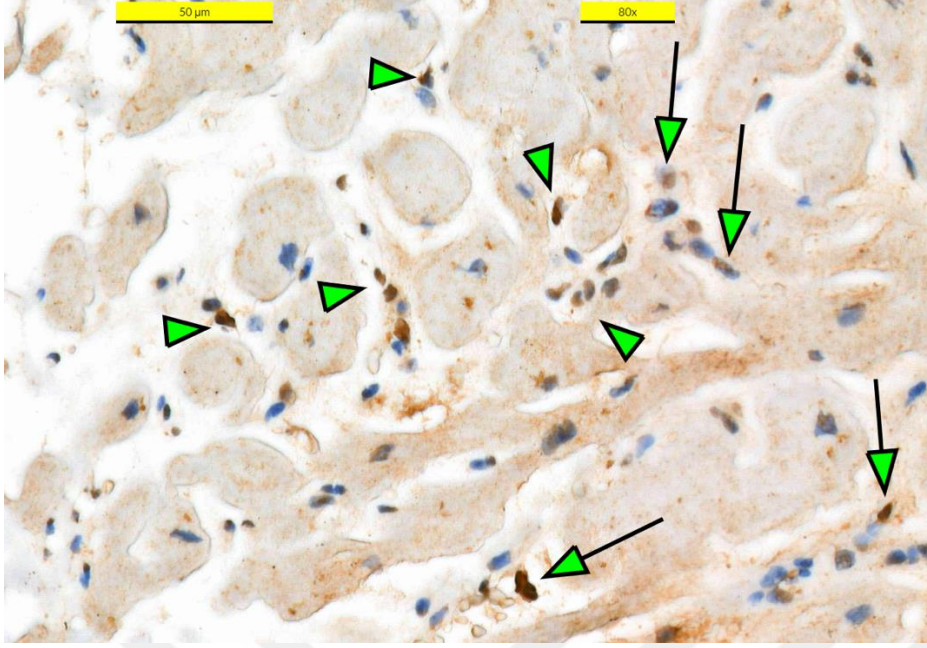
Resim 6: ACR-2R ve AMR2 mik s akut rejeksiyon tanısı almış miyokardial dokuda interstisyel lenfositik infiltrat. Ok, infiltratın hedefinin miyositler olduğunu ifade eden ve ACR için tanısal olan miyosit nekrozlarını göstermektedir. Aynı zamanda kapillerdeki şişkin endotelial hücreler ve lümenlerindeki mononükleer enflamatuvar hücrelerin varlığı eşlik eden AMR'ye dikkat çekmektedir (x250, H&E) (Hasta No:11).



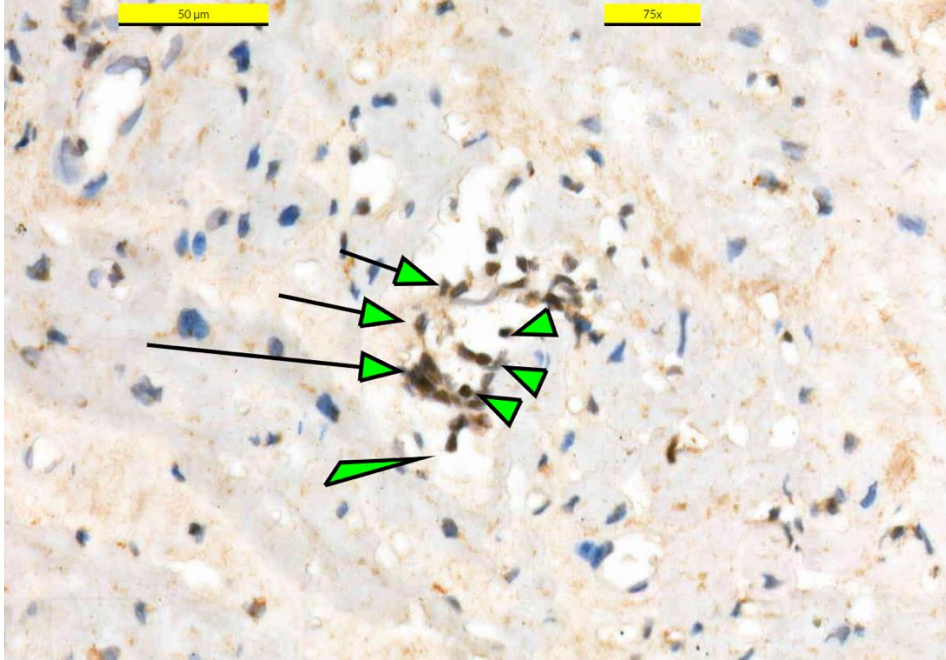
Resim 7: ACR-2R ve AMR2 miks akut rejeksiyon tanısı almış miyokardial dokuda bütünlüğü bozulmuş kapiller duvarlarındaki C4d depolanmaları (%10<) ACR'ye eşlik eden AMR'yi desteklemektedir (x250, İHK) (Hasta No:11).



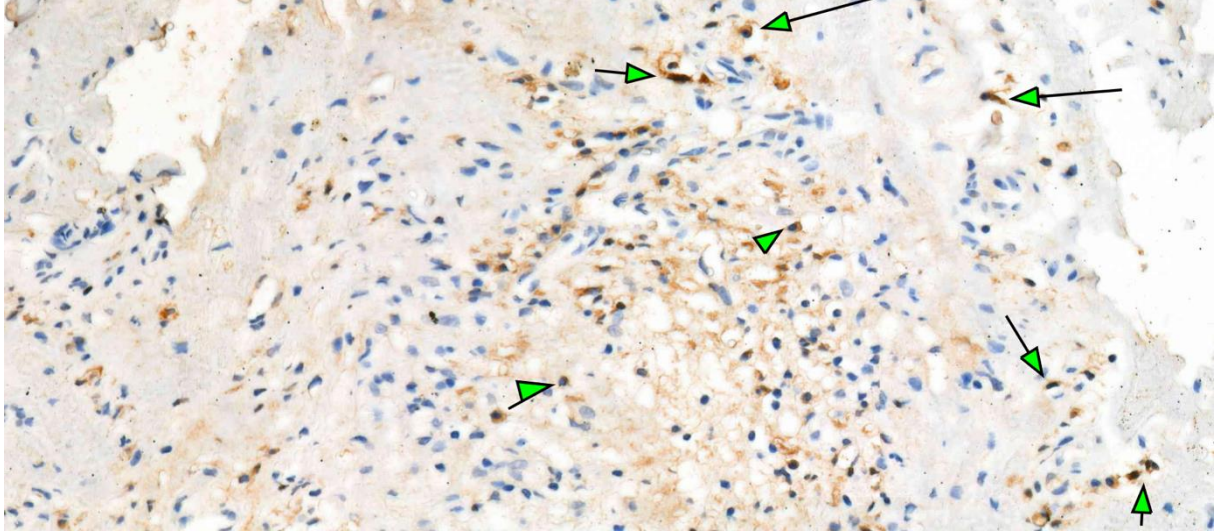
Resim 8: ACR-2R ve AMR2 miks akut rejeksiyon tanısı almış miyokardial dokuda, CD68 immün belirteci ile boyamada kısa ok, perimiyositik kapiller lümenlerinde fokal (%10-50) makrofaj dizilerini ve uzun ok, interstisyumdaki dağınık makrofajları göstermektedir (x250, İHK) (Hasta No:11).



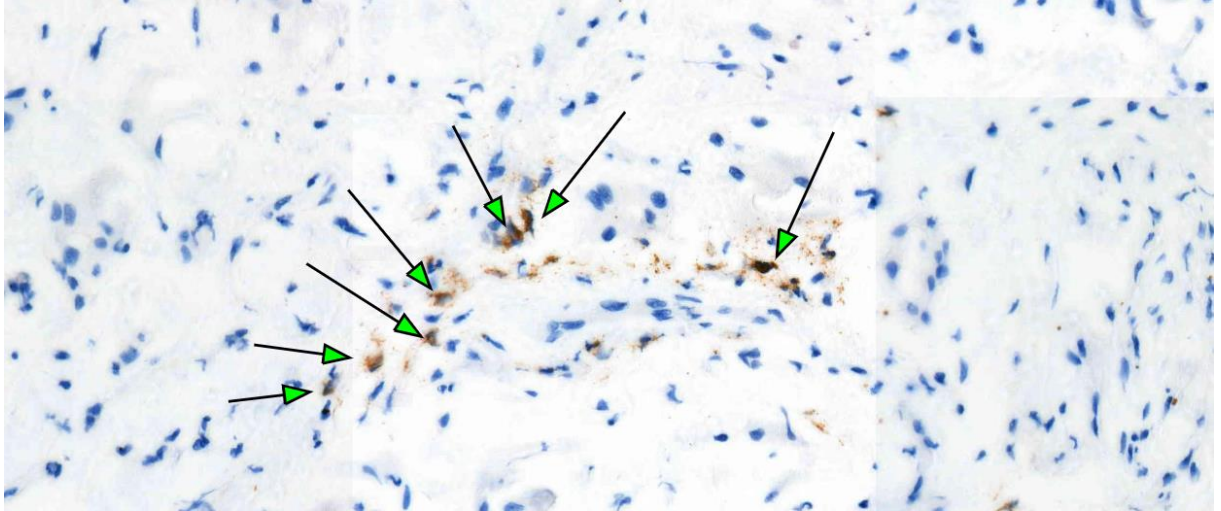
Resim 9: IgG immün belirteci ile, ok başları kapiller lümenlerindeki pozitif mononükleer enflamatuar hücreleri, oklar ise lümeni döşeyen pozitif endotel hücrelerini göstermektedir (x800, İHK) (Hasta No:11).



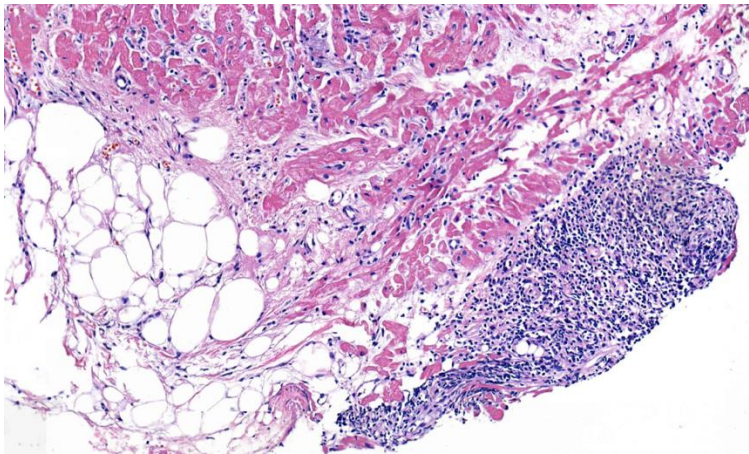
Resim 10: IgG1 immün belirteci ile, ok başları kapiller lümenlerindeki pozitif mononükleer enflamatuar hücreleri, oklar ise lümeni döşeyen pozitif endotel hücrelerini göstermektedir (x750, İHK) (Hasta No:11).



Resim 11: IgG3 immün belirteci ile, ok başları kapiller lümenlerindeki pozitif mononükleer enflamatuvar hücreleri, oklar ise lümeni döşeyen pozitif endotel hücrelerini göstermektedir (x400, İHK) (Hasta No:11).



Resim 12: CD138 immün belirteci ile, oklar kapiller lümenlerindeki pozitif plazma hücrelerini göstermektedir (x400, İHK) (Hasta No:11).



Resim 13: “Quilty effect” endokardda sınırlı nodüler lenfoid agregattan ibaret lezyonları ifade eder. (x130, H&E) (Hasta No:11)