

**T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBELİK SÜRECİNDE PATERAL ANTİ-HLA
ANTİKORLARIN ARAŞTIRILMASI**

**BURCU ÇERÇİ GÜRBÜZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ.DR. MUSTAFA SOYÖZ**

2016- İZMİR

**T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBELİK SÜRECİNDE PATERNAL ANTİ-HLA
ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI**

**BURCU ÇERÇİ GÜRBÜZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. MUSTAFA SOYÖZ**

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2014-TYL-TIPF-0037 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü ve Öğretim Üyesi Yetiştirme (ÖYP) Programı tarafından desteklenmiştir.

2016- İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : ... / ... /

Tez Danışmanı :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

Üye :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

Üye :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

Üye :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

Üye :

***(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (İMZA)**

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

(İMZA)

(Ünvanı, Adı Soyadı)

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince her türlü yardım esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmama ışık tutan ve kendimi geliştirmemde büyük katkısı olan başta değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ'e ve değerli hocalarım Prof. Dr. İbrahim PİRİM ve Doç. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA'ya; tez çalışma grubumu oluşturmamda bana destek olan Uz. Dr. Duygu AKKALE OKYAY'a ve tüm Kadın Doğum Polikliniği çalışanlarına; İstatistik verilerimin analizinde yardımcı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Bülent ÖZKAN'a; Tez çalışmalarını yürüttüğüm süre zarfında sabrıyla her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli dostum Arş. Grv. Aslı ÖZKIZILCIK KOÇYİĞİT'e; tez uygulama ve yazım aşamasındaki desteklerinden dolayı değerli çalışma arkadaşlarım Burcu Akman, Halime Kiraz, Ceren Yüksel'e ve tüm Doku Tipleme Laboratuvarı ekibine sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Tez çalışmalarımı sürdürdüğüm süreçte, her türlü desteğini ve sabrını esirgemeyen sevgili eşim Can GÜRBÜZ'e ve manevi desteklerinden dolayı Annem, Babam ve Ablam'a sevgilerimi ve saygılarımı sunarım. Ayrıca tezimdeki çalışma grubuna dâhil olmamı sağlayan ve bu süreçteki sabrıyla bana destek olan oğlum ARDA'ya teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ÖNSÖZ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİ.....	4
2.1. İmmunoglobulinler.....	4
2.2. Antijenler.....	7
2.3. Antikor-Antijen Etkileşimleri	9
2.4. Temel Doku Uyumluluk Kompleksi.....	11
2.5. T hücrelerine Antijen Sunulması	14
2.5.1. Endojenik (sitoplazmik) antijen işlenmesi ve MHC sınıf I sunumu	15
2.5.2. Ekzojenik (endozomal) antijen işlenmesi ve MHC sınıf II sunumu	16
2.6. Kompleman Sistemi.....	17
2.7. Organ Nakli İmmunolojisi ve Duyarlılaşma	18
2.7.1. Organ Reddi Tipleri	19
2.7.2. Nakil öncesi antikor belirleme yöntemleri	21
2.7.2.1. Komplemana Dayalı Sitotoksosite Testi (CDC).....	21
2.7.2.2. ELISA	22
2.7.2.3. Flow Sitometri.....	22
2.7.2.4. Luminex Teknolojisi	22
2.8. Gebelik	24
2.8.1. Gebelik Evreleri ve Fetal Gelişim.....	24
2.8.2. Plasentanın yapısı ve gelişimi	28
2.8.3. Placenta immünolojisi	30
2.8.4. Gebelikte Maternal İmmün Tolerans	32
2.8.4.1. Gebelikte Kompleman Sistemi	33

2.8.4.2.Fosfokolinasyon	34
2.8.4.3.Programlanmış ölüm ligandı 1 (PDL1).....	34
2.8.4.4.MHC ve trofoblastlarda ifade edilen non-klasik HLA class 1b genleri (HLA-E, HLA-G ve HLA-F)	35
2.8.4.5.İndolamin 2,3-dioksigenaz (IDO) aracılı triptofan katabolizması	37
2.8.4.6.Progesteron.....	38
2.8.4.7. Yardımcı T hücre 1 (Th1) ve 2 (Th2) Profilleri.....	39
2.8.4.8.Regülatör T hücreleri	39
2.8.5. Maternal-fetal arayüzde transport	40
2.8.6. Anti-paternal antikolar ve gebelik üzerindeki etkileri	41
3 GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1.Çalışma Grubu	44
3.2.Materyal	44
3.3.Metod.....	47
3.4.İstatistiksel Analiz.....	49
4 BULGULAR.....	50
5 TARTIŞMA	65
ÖZET.....	72
ABSTRACT.....	73
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- APC: Antijen sunan hücre
BAF: Arkaplan ayarlama faktörü
CDC: Komplemana bağımlı sitotoksisite
CDR: Kompleman belirleyici bölge
C_H: Sabit bölgedeki ağır zincir
C_L: Sabit bölgedeki hafif zincir
CLIP: Sınıf II ilişkili sabit zincir peptidi
CREG: Çapraz reaktif grup
CRP: Kompleman regülatör protein
CTL: Sitotoksik T lenfosit
DAF: Bozulmayı arttıran faktör
DN: Doğru negatif
DP: Doğru pozitif
DSA: Donöre özgü antikor
ER: Endoplazmik retikulum
EVT: Ekstravillöz trofoblast
F_{AB}: Antikora bağlanan fragment
F_C: Kristalize olan fragment
FSH: Folikül uyarıcı hormon
GVHD: Konağa karşı greftin yanıtı
hCG: İnsan koryonik gonadotropin
HLA: İnsan lökosit antijeni
hPL: İnsan plasental laktogen
IDO: İndolemin 2,3 dioksijenaz enzimi
IFN: İnterferon
IG: İmmüoglobulin
IL: İnterlökin
KIR: Öldürücü hücre immüoglobulini benzeri reseptör
KON: Kontrol değeri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAM)

- LH: Lüteinleştirici hormon
Li: Sabit zincir
LTA: Lenfotoksin alfa
MAC: Membran atak kompleksi
MCP: Membran kofaktör proteini
MFI: Ortalama floresans yoğunluğu
MHC: Temel doku uyumluluk kompleksi
NK: Doğal Öldürücü hücre
PDL: Programlanmış hücre ölümü ligandı
PRA: Panel reaktif antikor
RBC: Kırmızı kan hücresi
RER: Düz endoplazmik retikulum
SAB: Tek antijen boncuk testi
sHLA-G: Çözünebilir HLA-G antijeni
SI: Sınıf I HLA antijeni/antikoru
SII: Sınıf II HLA antijeni/antikoru
synCT: Sinsitiyotrofoblast
TAP: Antijenik peptit taşıyıcıları
TCR: T hücre reseptörü
TH: Yardımcı T hücre
TNF: Tümör nekroz faktörü
TREG: T regülatör hücre
uNK: Uterus doğal öldürücü hücresi
vCT: Villöz sitotrofoblast
VH: Değişken bölgenin ağır zinciri
VL: Değişken bölgenin hafif zinciri
YAG: yttrium alüminyum garnet
YN: Yanlış negatif
YP: Yanlış pozitif

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Antikor molekülünün yapısı.	5
Şekil 2. Farklı immunoglobulin tipleri.....	6
Şekil 3. Yardımcı T hücrelerinin yüzeyindeki T hücre reseptörleri (TCR) ve MHC Sınıf II molekülünün oluşturduğu kompleks	8
Şekil 4. Multivalan etkileşimler	10
Şekil 5. HLA Sınıf I, II ve III genlerinin yerleşimi.....	11
Şekil 6. Sınıf I ve sınıf II HLA molekülleri. –ss-, disülfid bağı.	13
Şekil 7. Triplet ve eplet kavramları.....	14
Şekil 8. Antijenin işlenmesi ve Sınıf I sunumu için endojenik yolak.	15
Şekil 9. Antijen işlenmesi ve sınıf II'ye sunum için ekzojenik yolak.....	16
Şekil 10. Kompleman Yolakları.....	18
Şekil 11. Organ reddi mekanizmaları.....	20
Şekil 12. PRA Tarama testinin prensibi.....	23
Şekil 13. PRA Tarama, Tanımlama ve SAB testlerinin şematik olarak karşılaştırılması	24
Şekil 14. Ovulasyondan döllenmeye giden sürecin gösterimi.	25
Şekil 15. İnsan gelişim evreleri.	27
Şekil 16. Trofoblast farklılaşmasının şematik diagramı.	29
Şekil 17. İmplantasyon.....	30
Şekil 18. Fetal dokularda kompleman inhibisyonu.....	33
Şekil 19. Alternatif kesim mekanizması sonucu oluşan HLA-G proteinleri	36
Şekil 20. IDO mekanizması	38
Şekil 21. Maternal-Fetal Arayüzün Şematik Gösterimi.....	40
Şekil 22. Fetal Antijenlerin Maternal İmmün Sisteme Geçiş Modeli.....	41
Şekil 23. Düzenlenmiş oranların hesaplanması	48
Şekil 24. Düzenlenmiş oran 4'ün hesaplanması	48
Şekil 25. Yüzde PRA oranlarının hesaplanması	49
Şekil 26. Trimesterlere göre PRA Sınıf I-Sınıf II pozitiflikleri	52
Şekil 27. Trimesterlere göre anti-HLA antikor tarama testi sonuçlarının pozitiflik oranları	53
Şekil 28a. Grup 1'in Gebelik Sayısına göre PRA pozitiflik yüzdeleri	54
Şekil 28b. Grup 2'nin gebelik sayısına göre PRA pozitiflik yüzdeleri.....	54
Şekil 28c. Grup 3'ün gebelik sayısına göre PRA pozitiflik yüzdeleri.....	55
Şekil 29. Grup 1 ve 2'de tanımlanan anti HLA-A antikorları MFI değerleri	59
Şekil 30. Grup 3'te tanımlanan anti HLA-A antikorları MFI değerleri.....	59
Şekil 31. Grup 2 ve 3'te tanımlanan anti HLA-B antikorları MFI değerleri	60
Şekil 32. Grup 1 ve 2'de tanımlanan anti HLA-DR antikorları MFI değerleri.....	60
Şekil 33. Grup 3'te tanımlanan anti HLA-DR antikorları MFI değerleri	61
Şekil 34. Grup 1 ve 2'de tanımlanan anti HLA-DQ antikorları MFI değerleri	61

Şekil 35. Grup 3'te tanımlanan anti HLA-DQ antikorları MFI değerleri	62
Şekil 36. PRA tanımlama yöntemi ile en fazla tespit edilen anti-HLA antikorları....	62

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Çalışma grubunun demografik özellikleri	50
Tablo 2. Çalışma grubunun gebelik, düşük, kürtaj ve doğum sayıları.....	52
Tablo 3. Gebelik Sayısına göre PRA pozitiflik yüzdeleri.....	54
Tablo 4. PRA Tanımlama Kontrol ve Örnek MFI Değerleri	56
Tablo 5. PRA Pozitiflik oranlarının istatistiksel olarak gösterilmesi.....	63
Tablo 6. Kan grupları ile PRA pozitifliği arasındaki istatistiksel ilişkinin gösterimi.....	63
Tablo 7. PRA pozitifliği ile Doğum tipi ve akrabalık arasındaki istatistiksel ilişkinin gösterimi.....	64

1 GİRİŞ

Organ ve doku nakilleri sonucunda, yabancı antijenlerle karşılaşan alıcının immün sistemi, donöre karşı yanıt oluşturur. Bu immün yanıtın oluşumundaki birincil uyarıcı sınıf I ve II Temel Doku Uyumluluk (MHC) antijenleridir. İnsanlarda, İnsan Lökosit Antijeni (HLA) olarak da adlandırılan bu antijenlerden türetilen peptitler, alıcının T ve B hücrelerine sunulurlar ve donör HLA antijenlerine karşı antikor üretimini uyarırlar (1). Anti-HLA antikorları, hiperakut, akut ve kronik redlere sebep olduklarından organ nakillerinin başarısında önemli bir rol oynamaktadırlar. Organ nakli, transfüzyon ve gebelik anti-HLA antikorlarının oluşumundan sorumludur. Organ nakli bekleme listesindeki kadınların çoğunun gebelik öykülerinin bulunması ve kan transfüzyonunun daha az görülmesi, duyarlılaşma olayları arasında gebeliği birinci sraya taşımaktadır. Gebelerin yaklaşık %30-50 'sinde anti-paternal anti-HLA antikorlarının bulunduğu bildirilmiştir(2). Fakat anti-HLA antikorlarının gebelik üzerine etkisi ile ilgili bilgiler kısıtlıdır (3).

Gebelik, paternal kökenli fetal antijenlerden etkilenmemek için, maternal immün sistemin yeniden düzenlenmesini gerektiren biyolojik bir süreçtir. Fetüs, anneye yabancı olan paternal antijenleri de ifade eder ve dolayısıyla nakledilen bir organ gibi davranmaktadır (4). Anti-paternal antikorların gebeliğin 28. haftasından sonra tespit edilmeye başlandığını belirten çalışmaların yanı sıra, 28. haftadan önce de tespit edildiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (5,6). Dolayısıyla gebelik sırasında oluşan anti-paternal antikorların üretilmeye başlandığı gebelik dönemi belirsizliğini korumaktadır.

Gebelikteki immün düzenlenmenin anlaşılması, sadece gebeliklerin başarıyla sonlanmasına değil, aynı zamanda organ nakillerindeki greft kayıplarının azaltılması ve greft ömrünün uzatılmasına da yarar sağlayacaktır. Gebelik, blastosistin desiduaaya tutunmasıyla başlar. Trofoblastların invazyonunun yeterli olması ile de normal bir plasenta gelişimi sağlanmaktadır. Plasenta fetal trofoblastlar ve maternal desidua ile etkileşim halindedir (3). Gebeliğin 13. haftasından sonra maternal kan fetal maternal arayüze akmaya başlar. Yine plasental villüslerden kopan trofoblast hücreleri de

maternal kana geçer. Bu dönemden sonra bölgesel olan anne fetüs etkileşimi tüm vücuda yayılır. Dolayısıyla maternal immün baskılamaya özellikle bu aşamadan sonra ihtiyaç duyulmaktadır. Sağlıklı gebeliklerde, trofoblastlar, klasik HLA moleküllerini değil, daha az polimorfik olan sınıf I antijenlerini (HLA-G,E,F gibi) ifade eder ve böylece fetüs T hücre yanıtından kaçabilir (7). HLA-G doğal öldürücü hücrelerin sitolitik aktivitelerini engeller. Kompleman sistemi, çeşitli mekanizmalarla bloke edilir. Trofoblastlar tarafından üretilen indolemin 2,3 dioksijenaz enzimi (IDO), triptofanı katabolize eder ve böylece lenfoid hücrelerin aktivasyonu engellenir (8). Progesteronun salgılanması ile immün sistem hücreleri inaktif hale getirilir (9). Fakat fetal reddi engellemede görev alan bu mekanizmalar her zaman işe yaramamakta ve gebelikler düşüklerle sonuçlanabilir (10). Anti-HLA antikörlerinin sürekli düşükleri olan kadınlardaki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, gebelik sayısındaki artışın anti-HLA antikörlerinin oluşumunu da arttırdığı bildirilmiştir (11).

Anti-HLA antikörlerinin belirlenmesinde kullanılan standart yöntem kompleman sitotoksitesine dayanan (CDC) hücre temelli bir yöntemdir (12). Zamanla bu yöntemin yerini, ELISA ve boncuk temelli katı faz yöntemleri almıştır (13). Luminex Teknolojisi boncuk temelli analizlerden biridir ve hem donöre özgü hem de panel reaktif antikörlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Panel reaktif antikör tarama ve tanımlanmasında bir antijen paneli kullanılmakta ve serumdaki anti-HLA antikörleri tanımlanabilmektedir. Kullanılan paneldeki antijenler boncuklar üzerine tutundurulur ve iki farklı lazer ve dedektör yardımı ile analizi yapılır. Luminex sisteminin diğer panel reaktif tarama ve tanımlama yöntemlerine göre daha özgün ve güvenilir olduğu yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (14).

Bu çalışmada İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Polikliniği'ne başvuran gebelerde, anti-HLA antikörlerinin, oluşum zamanının belirlenmesi ve tanımlanması amaçlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, toplumda sık görülen HLA antijenleri ile bu çalışmada tanımlanan antikörler arasındaki korelasyon belirlenmeye çalışılacaktır. Ayrıca gebelik, kürtaj, düşük öyküleri ve sayılarının, anti-HLA antikör üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi planlanmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bulguların, gebelik sürecinde üretilen anti-paternal HLA antikörleriyle ilgili çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

Ayrıca organ nakli bekleme listesindeki gebelik öyküsü bulunan kadın hastaların, nakil şansını arttırabilmek için yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2 GENEL BİLGİ

2.1. İmmunoglobulinler

Plazma veya serum proteinleri çözünebilme özelliklerine göre albüminler ve globülinler olarak ayrılırlar. Antikorların çoğu gama globülin yapısındadır. Bu yüzden de antikora, gama globülinlerin immunityle ilişkili kısmı anlamında immunoglobulinler (Ig) de denir ve yabancı moleküllere yanıt olarak üretilen proteinlerdir (15,16). Antikorlar oldukça çeşitlidirler ve antijene özgüdürler. Membrana bağlı ve salgılanan antikorlar olmak üzere iki formda bulunurlar. B lenfositlerin yüzeyinde membrana bağlı antikorlar antijen reseptörü olarak görev alırken, salgılanan antikorlar dolaşıma katılarak toksinleri yok ederler, patojenlerin vücuda girmesini ve yayılmasını engellerler. Salgılanan antikorlar, kompleman proteinleri, fagositler ve eozinofiller gibi diğer birçok immün sistem bileşeniyle iş birliği yaparak antijenlere bağlanırlar ve etkisini ortadan kaldırırlar.

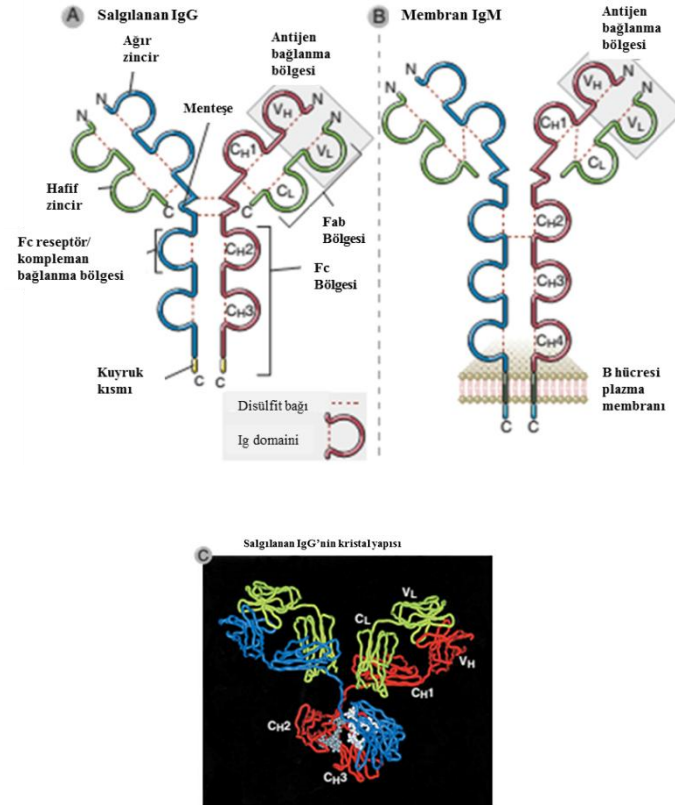
Mikroorganizmaların veya toksik mikrobiyal ürünlerin yok edilmesi, kompleman sistemin aktivasyonu, fagositozu kolaylaştırmak için patojenlerin opsonizasyonu, enfekte hücrelerin doğal immün sistem hücrelerince lizisinin sağlanması ve parazitik kurtları yok etmek için antikor ilişkili mast hücre aktivasyonu antikorların görevlerinin arasındadır (15).

B lenfositler antikor moleküllerini sentezleyen tek hücre grubudur. Bir antijenle karşılaştığında B hücresi, antikor üreten plazma hücrelerine dönüşür (15). Plazma hücreleri saniyede 5000 molekül oranında antikor salgılayabilirler. Çoğu plazma hücresi birkaç gün sonra ölür, bazıları kemik iliğinde aylar veya yıllarca canlı kalabilir ve antikor salgılamaya devam ederek uzun soluklu korumayı sağlarlar (17).

Tüm antikorlar aynı temel yapıya sahiptir fakat antijenlere bağlanan kısımlarında belirgin farklılıklar vardır (1). Antijen bağlanma bölgelerindeki bu çeşitlilik antikorların yapısal olarak çok çeşitli antijenlere bağlanmasını sağlar. Her bireyde bir milyon veya daha fazla çeşitte antikor olduğu (teorik olarak 10^{11} farklı antikor) düşünülmektedir ve her biri antijen bağlanma bölgesinde birbirinden farklı

aminoasit sekansı içermektedir. Antikorların fonksiyonları ve yaygın fizikokimyasal özellikleri ise antijen bağlanmayan kısımlarıyla ilgilidir (15).

Basit bir antikor molekülü, her biri 220 aminoasit içeren 25kDa'lık iki hafif (L) ve her biri 440 aminoasit içeren 55kDa'lık iki ağır (H) zincir olmak üzere dört polipeptit zincirden oluşmaktadır (Şekil 1) (17,18).



Şekil 1. Antikor molekülünün yapısı. A. Salgılanmış IgG molekülünün şematik görünümü. Antijen bağlanma bölgeleri V_L ve V_H ile gösterilmiştir. Ağır zincirin C bölgeleri kuyruk kısmında sonlanır. B. B lenfositlerin yüzeyinde membrana bağlı olarak bulunan IgM molekülü. IgM IgG'ye göre bir fazla C_H domaini içerir. Plazma membranına C terminal transmembran ve stoplazmik kısımlarla tutunur. C. İnsan IgG'nin x-ray kristalografisi. Salgılanmış IgG'de ağır zincirler mavi ve kırmızı, hafif zincirler yeşil, karbonhidratlar gri renkte gösterilmiştir. (Abbas ve ark. 2012'den modifiye edilmiştir)

Hafif zincirler bir değişken (V_L) ve bir sabit domain (C_L); ağır zincirler antikor sınıfına bağlı olarak bir değişken (V_H) ve 3 veya 4 sabit domain (C_H1, C_H2, C_H3, C_H4) içermektedir (5).

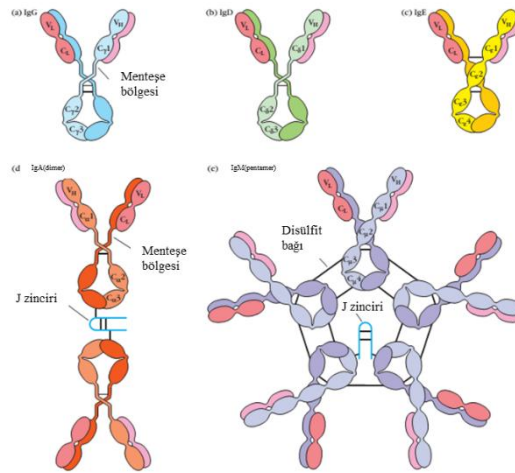
Değişken bölgelerin adları, aminoasit sekanslarındaki çeşitlilikten gelmektedir. Ağır ve hafif zincirdeki V bölgelerinden birer tanesi antijen bağlanma bölgesini oluştururlar. C bölgesi domainleri antijen tanınmasında görev almazlar. Ağır zincirin

C bölgesi, diğer immün sistem hücreleriyle ilişki kurar ve antikorun biyolojik fonksiyonunu yerine getirir (15).

Memelilerde IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM olmak üzere 5 çeşit antikor bulunmaktadır ve her biri kendi ağır zincirine sahiptir (sırasıyla $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$) (Şekil 2).

IgM mikro (μ) ağır zincirine sahiptir (Şekil 2) Gelişen B hücresinin ürettiği ve primer antikor yanıt sırasında kana salınan ilk antikordur (17).

IgD molekülleri az miktarda salınırlar ve özellikle antijenler için hücre yüzey reseptörü olarak görev yaparlar. Salgılanan IgM, beş adet 4 zincirli birimden oluşan pentamer yapısındadır. 10 tane antijen bağlanma bölgesi içerir. Her pentamer, J zinciri denen başka bir polipeptit zincirin bir kopyasını içerir. J zinciri IgM salgılayan hücrelerce salgılanır ve iki komşu kuyruk bölgesinin arasında kovalent olarak sokulmuştur (17).



Şekil 2. Farklı immunoglobulin tipleri. Hafif zincirler pembe, disülfid bağları siyah renkte gösterilmiştir. IgM ve IgA J zinciri içerirler. Bu zincir iki farklı monomerin Fc bölgesinden iki disülfid bağı ile bağlıdır. Serum IgM'i pentamer, serum IgA'sı genellikle monomerdur (Goldsby et al. modifiye edilmiştir)

Çoklu bağlanma bölgesine sahip bir antijen, pentamerik bir IgM molekülüne bağlandığında, pentamerin yapısı değişir, kompleman sistemini aktive eder. Kompleman aktivasyonu antijene verilen yanıtı artırır; antikor-antijen kompleksine bağlanan aktive olmuş kompleman, antijenin B hücreyi uyarıcı özelliğini binlerce kat artırır (17).

Kandaki temel Ig sınıfı dört zincirli bir monomer olan IgG'dir. Sekonder antikor yanıtta oldukça fazla miktarda üretilirler. Kompleman aktivasyonunu sağlamalarının yanı sıra, IgG molekülünün kuyruk kısmı, makrofaj ve nötrofillerin özgül reseptörlerine bağlanırlar (17). Fagositik hücreler bu tip reseptörler aracılığı ile IgG antikorları ile kaplı mikroorganizmaya bağlanır ve parçalarlar (17).

IgG sınıfı antikorların bazıları, anneden fetüsa plasenta yoluyla geçebilen tek antikor tiplerini oluştururlar. Annenin kanı ile ilişkide olan plasenta hücreleri, kan kökenli IgG moleküllerine bağlanan Fc reseptörleri içerirler ve doğrudan fetüsa geçerler (17).

IgA tükürük, gözyaşı, süt, solunum ve sindirim yolu salgılarında bulunur. Sağlıklı 70 kg ağırlığında bir insan günde ortalama 2-3 g antikor üretir ve bu antikorların 3'te 2'si Ig A'dır (15). Kanda 4 zincirli bir monomerdir. Salgılara verilmeden önce diğer iki polipeptit zincirinin eklenmesi ile dimer halini alır (17). Gastrointestinal ve solunum yolu duvarlarındaki plazma ve B hücrelerinde üretilirler (15).

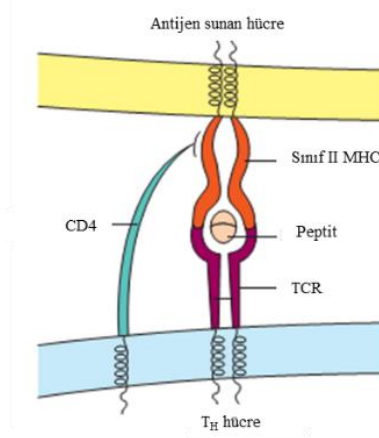
IgE molekülleri 4 zincirlidirler. Dokulardaki mast hücrelerinin ve kandaki bazofillerin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanırlar ve antijenler için pasif reseptörler olarak görev yaparlar (17).

2.2. Antijenler

Antijen, immün sistem tarafından tanınabilen bir organizma, molekül veya molekülün bir parçası olarak tanımlanır. Antijenler, basit veya karmaşık yapılı, protein, karbonhidrat veya sentetik kaynaklı olabilirler (19). T ve B lenfositler üzerinde bulunan çok sayıda reseptör tarafından tanınırlar (20). Bu reseptörler, bir antijenin tanınan en küçük parçası olan antijen bağlanma bölgesi veya epitoplara farklı bölgelerini tanırlar. Farklı lenfositler aynı antijende farklı epitoplara tanıyabilirler (19).

Antijenlerin T ve B hücreler tarafından tanınma mekanizmaları farklıdır. B hücreleri, çözünebilir antijenleri tanıyabilir. T hücrelerininse büyük çoğunluğu

sadece antijen sunan hücrelerin yüzeylerindeki MHC moleküllerine bağlı antijenleri tanıyabilir (Şekil 3) (18).



Şekil 3. Yardımcı T hücrelerinin yüzeyindeki T hücre reseptörleri (TCR) ve MHC Sınıf II molekülünün oluşturduğu kompleks (Goldsby ve ark.2002'den modifiye edilmiştir). T hücreleri MHC'ye bağlı peptitleri tanıyabilirler. T_H hücrelerindeki koreseptör olan CD4 MHC molekülleriyle etkileşimde görev alır. T_C hücreleri ise MHC Sınıf I ile aynı kompleksi oluşturur. Koreseptörleri CD8'dir (Goldsby ve ark.2002'den modifiye edilmiştir).

Tetiklenen immün yanıtın yapısına bağlı olarak antijenler üç fonksiyonel tipe ayrılır: İmmünojen, hapten ve tolerojen (19).

İmmünojenler, hem immün yanıtı indükleyen hem de bu yanıtın hedefini oluşturan epitoplara içerirler. Doğal immün yanıtta, aynı immünojenle tekrar tekrar karşılaşıldığında bile yanıtın şiddeti aynıdır. Edinsel immün sistemde ise aynı immünojenle tekrar karşılaşma epitopa özgü immün yanıtın yoğunluğunu artırır (19). İmmünojenlerin büyüklük, yapı ve şekli, reseptörler tarafından tanınmalarında önemli olan özelliklerindedir (20).

Molekül boyutu immünojenliğin önemli unsurlarındandır. Örneğin düşük molekül ağırlıklı bileşikler yani haptenler immün yanıtı uyaramazlar fakat antikorlara bağlanabilirler. Dolayısıyla haptenler immünojenik olmasa da antijeniktirler. Taşıyıcı büyük bir molekülle birleştiğinde haptenler immünojen halini alırlar. Proteinler gibi karmaşık polimerler ve karmaşık karbonhidratlar etkin immünojenlerdir. Nükleik asitler, basit polisakkaritler ve lipitler, tekrarlayan monomerlerden oluştukları için zayıf immünojendirler. Çözünmez veya kümeleşmiş formdaki (ör: ısıyla presipite edilen proteinler) karmaşık yapıdaki makromoleküller genellikle mükemmel

immünojenlerdir. Bu çözünmez materyal fagositlerce kolaylıkla alınıp, bir immün yanıtı yol açarlar. Buna karşın, çözünür formdaki moleküller, fagositlerce alınmaz ve dolayısıyla zayıf immünojendirler (20).

2.3. Antikor-Antijen Etkileşimleri

Antikorlar çok farklı çeşitte moleküle, farklı kuvvetlerin etkisiyle bağlanabilirler fakat kovalent bağlarla bağlanmazlar (21).Antikorlar bağlandıkları antijenleri geri dönüşümsüz olarak değiştirmezler. Dolayısıyla prensipte reaksiyonlar geri dönüşümlüdür (22).

Antijenlerde iki sınıf epitop vardır. Dizisel epitoplar kısa aminoasit dizileridir (10-18cm uzunluğunda). Solüsyonda serbest halde veya bir proteine bağlı haldeyken antikorlar tarafından tanınırlar. Konformasyonel epitopların, etkileşime gireceği molekül üç boyutlu yapıda olmalıdır. Konformasyonel epitoplar, bağlanacakları bölgedeki aminoasitlerin belirli bir sırada olmasına gerek duymazlar. Antijenlerin denatürasyonu, bu tip epitopların yapılarının bozulmasına sebep olmaktadır (21).

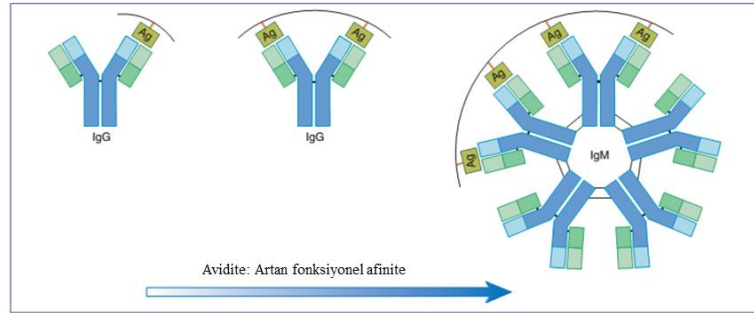
Bir epitopa özgü olan antikorlar, benzer yapıları tanıyarak çapraz reaktiflik gösterebilirler. Fakat özgül olduğu antijene benzer yapıya olan bağlanma afinitesi daha düşüktür (21).

Antijen- antikor etkileşiminin kuvveti antijen bağlanma bölgelerinin sayısı ve afinitesine bağlıdır. Hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve iyonik ilişkileri içeren zayıf non-kovalent bağların hepsi, bu bağlanmanın kuvvetini belirler. Bu zayıf etkileşimler sadece antijen molekülü antikorun yüzeyine yeteri kadar yaklaştığında etki göstermektedir. Antikorlar antijenin üzerindeki bağlanma bölgelerini tanır. Antijenlerin çoğu birçok farklı antijenik bağlanma bölgesi içerir ve multivalan olarak adlandırılırken, iki veya daha fazla bağlanma bölgesine sahip antijene polivalan denir (17).

Antikoru antijenik bir bağlanma bölgesine afinitesi, tek bir antikoru, tek bir antijen bağlanma bölgesine olan bağlanma gücüdür. Bivalan veya polivalan bir antikoru polivalan bir antijene total bağlanma kuvvetine avidite denir. Eğer IgG ve

IgM moleküllerinin afinitesi aynıysa, IgM molekülü (10 bağlanma bölgesi içerir) IgG molekülüne göre (iki bağlanma bölgesi) çok daha fazla aviditeye sahiptir (Şekil 4).

Aviditedeki bu farklılık önemlidir, çünkü immün yanıtta ilk üretilen antikorların afinitesi çok daha azdır. Toplam aviditesi yüksek olan IgM erken evre antikorlarından olduğu için, bağlanma bölgelerindeki afinitesi zayıf bile olsa etkili bir şekilde fonksiyon gösterebilir (17).



Şekil 4. Multivalan etkileşimler antijen-antikor bağlanmasındaki afiniteyi artırırlar (Actor 2012'den modifiye edilmiştir)

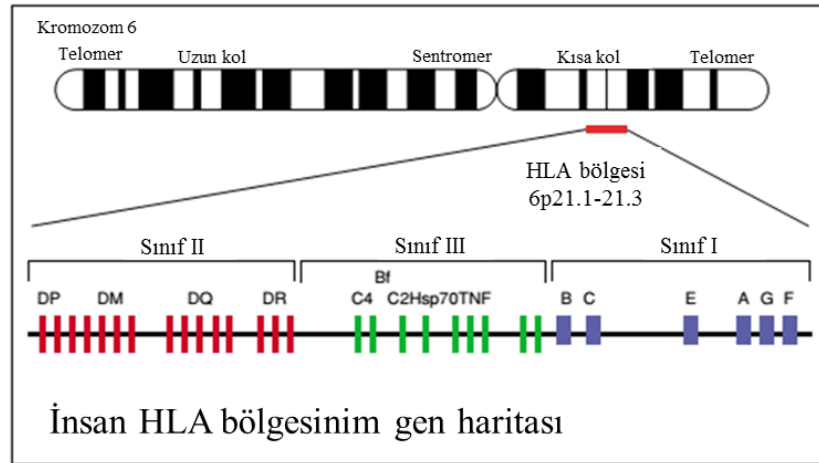
Hafif ve ağır zincirlerin N-terminal uçları antijen-bağlanma bölgesi oluşturmak için bir araya gelir. Aminoasit sekanslarının çeşitliliği antijen bağlanma bölgelerinin yapısal çeşitliliğini sağlar (17). Aminoasit sekansındaki farklılıklar, değişik Ig'lerin değişken bölgelerini (V bölgesi-variable region) oluşturur (23). Altı tane yüksek değişkenlikte bölge komplementerliği belirleyici bölgeler (CDR-complement determining region) olarak adlandırılır çünkü bu bölgelerin oluşturdukları yüzey, bağlandıkları antijene komplementerdir (24). CDR'ler antijenle moleküler temasın çoğunu sağlar. Ağır ve hafif zincirlerdeki her V kısmının üç CDR'si vardır. CDR1 ve CDR2 bölgeleri farklı immunoglobulinler arasında bir ölçüde farklıdır, fakat CDR3'lerin birbirinden farklılığı oldukça fazladır. Ağır zincirin CDR3'ünün özellikle kompleks bir yapısı vardır ve epitop tanınmasında temel rol oynar (23). Protein sekans karşılaştırmaları CDR3'ün V kısmının karboksi terminal kısmı, bunu izleyen 3 aminoasitlik kısa bir 'farklılık' kısmı ve yaklaşık 13-15 aminoasit uzunluğunda daha uzun bir 'birleştirici' kısımdan oluştuğunu gösterir. Hafif zincirin kendi CDR3'ü için benzer bir düzenlemesi vardır, fakat D bölgesi yoktur. Tüm CDR'ler antijen-bağlamayla ilgilidir (20).

Antijen bağlama, ağır ve hafif zincir polipeptit zincirlerinin Ig katlanma modelinin bir fonksiyonudur. Sonuç, özgün bir antijen-antikor etkileşimidir (20).

2.4. Temel Doku Uyumluluk Kompleksi

MHC (Major histocompatibility complex-Temel Doku Uyumluluk Kompleksi), 220 gene sahip, yaklaşık 4Mb uzunluğunda, insan genomunun en polimorfik bölgelerinden biridir (25, 26, 27, 28). MHC, organ ve hemotopoetik kök hücre nakillerinde, enfeksiyöz hastalıklarda, otoimmün hastalıklarda (diyabet, romatoid artrit, çölyak gibi) ve ilaç duyarlılık reaksiyonlarında önemli rol oynayan klasik insan lökosit antijenlerini (HLA) kodlar (29).

HLA kompleksi 6. Kromozomun kısa kolunda, 6p21.3 bölgesinde bulunur (30, 31) (Şekil 5). Bu bölgenin proteinleri özellikle çekirdekli hücrelerin yüzeylerinde ifade edilirler ve hem bağışıklık sisteminde enfeksiyonlara karşı görev alırken, hem de hücre ve organ nakillerini etkilemektedirler (25, 26).



Şekil 5. HLA Sınıf I, II ve III genlerinin yerleşimi (Mehra ve ark. 2003'den modifiye edilmiştir.)

HLA bölgesinde üç ayrı kısım belirlenmiştir. Kromozomun telomerik tarafına doğru HLA'nın Sınıf I bölgesi konumlanmıştır (32). Bu bölge, HLA-A, -B, -C'den oluşan klasik HLA 'ları ve klasik olmayan HLA-E, -F, G'yi, MICA ve MICB gibi Sınıf I benzeri molekülleri kodlar. Sınıf II bölgesi HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ

moleküllerini ve antijen sunmada görevli proteinleri kodlamaktadır (Şekil 5) (33). Sınıf I ve sınıf II HLA molekülleri sırasıyla CD8⁺ ve CD4⁺ T lenfositlere antijen sunmada görevlidirler (34). Sınıf I molekülleri aynı zamanda doğal öldürücü (NK) hücrelerin yüzeylerindeki öldürücü hücre immunoglobulin benzeri reseptörleri (KIR-killer cell immunoglobulin-like receptor) tarafından da tanınırlar. Bu özellik HLA moleküllerinin doğal immün yanıtta da görev almalarını sağlar (34).

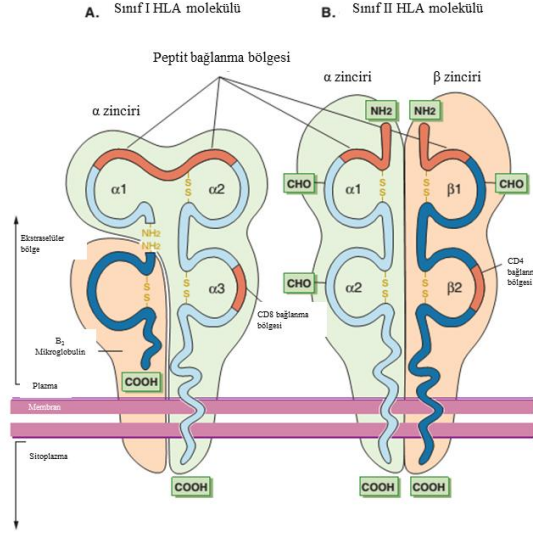
Sınıf I ve Sınıf II arasında Sınıf III bölgesi bulunur. Bu bölgede, immün yanıtta görevli HLA-dışı genler bulunur (25, 33). HLA Sınıf III bölgesi, C₂ ve C₄B kompleman faktörlerini, sitokinleri, tümör nekroz faktörünü (TNF), lenfotoksinleri (lenfotoksin α -LTA) ve ısı şok proteinlerini kodlar (33, 34). HLA sistemi, 1950'lerin ilk yıllarında, birden fazla doğum yapmış ve birden fazla kan transfüzyonu olmuş kişilerin serumlarında keşfedilmiştir. HLA sistemindeki farklı lokusların bulunması bir Nomenklatür Komitesinin kurulmasını sağlamıştır (26).

Sınıf I HLA antijenleri tüm çekirdekli hücrelerde bulunurlar (35). Kromozom 6 üzerindeki HLA-A, HLA-B ve HLA-C lokuslarındaki genler tarafından kodlanan 45kd'luk ağır zincirden; kromozom 15 üzerindeki genler tarafından kodlanan 12 kd'luk β 2-mikroglobulinden oluşur (28). Bu iki alt birim kovalent olmayan bağlarla bağlıdır (35). β 2 mikroglobulin polimorfik değildir. Bu protein ağır zincire destek verir. HLA molekülünün 3 bölgeye ayrıldığı bilinmektedir: hüçredışı, membran içi ve hücre içi. Hücre dışı bölge 3 domainden oluşur; genin 2. ve 3. ekzonu tarafından kodlanan alfa 1, alfa 2 domaini, bu iki domain arasında, polimorfik olan ve antijenik peptitlere bağlanıp T hücre reseptörleri ile ilişki kuran peptit bağlanma bölgesi (26).

HLA Sınıf II antijenleri, B lenfositler, aktive olan T lenfositler, monositler ve makrofajlar, Langerhans hücreleri, dendritik hücreler, endotelyum ve epitel hücrelerinde ifade edilirler (35). HLA sınıf II antijenlerinin her biri, HLA-D bölgesindeki genlerce kodlanan yaklaşık 230 aminoasitlik, nonkovalent olarak bağlı α ve β zincirlerden oluşan heterodimerdir (28). Beta zinciri alfa zincirine göre daha polimorfiktir. Bu sebeple de HLA tiplemesi genellikle beta zinciri temel alınarak yapılır (26).

Alfa zinciri, 2 hücre dışı domain içermektedir: alfa1 ve 2. Her biri üzerinde oligosakkaritlere bağlanma bölgesi içerir (Şekil 6). Beta zinciri, beta 1 ve 2 adında

iki ekstraselüler domain içerir. Aminoasit dizileri alfa1 ve beta 1 domainlerinin daha polimorfik olduğunu göstermiştir (36).



Şekil 6. Sınıf I ve sınıf II HLA molekülleri. –ss–, disülfid bağı. (Johnson ve ark.2012’den modifiye edilmiştir)(36)

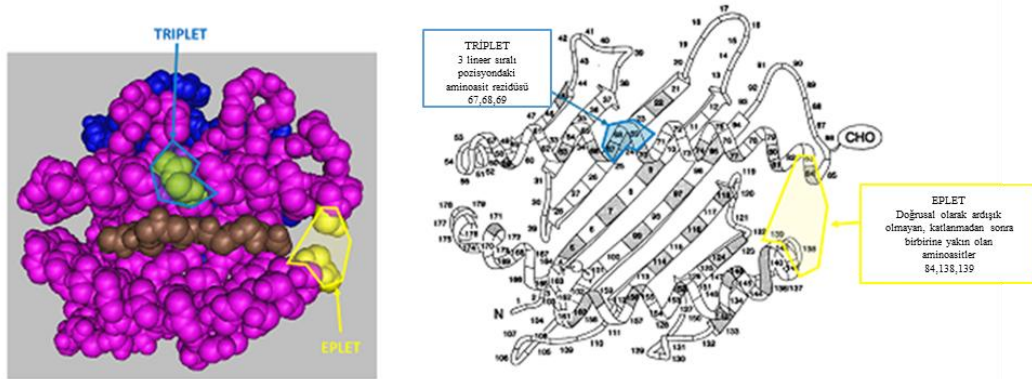
HLA antijenleri Mendelin dominant kalıtım şekline göre kalıtılırlar. MHC’nin farklı lokuslarının birbirine olan yakınlığı ve düşük krossover sıklığından dolayı, HLA genleri beraber kalıtılırlar (28).

Bireyin bir kromozomunda bulunan genetik bağlantı bölgesinin kombinasyonlarına haplotip denir. Kromozom 6 otozomdur ve bu sebeple tüm bireyler iki HLA haplotipine sahiptirler (her bir kromozomda bir tane). Dolayısıyla iki ebeveynin çocuğunda sadece 4 farklı kombinasyonda haplotip oluşabilir. Bu sebeple, biyolojik kardeşlerin aynı HLA allelerine sahip olma olasılığı %25’tir (28).

HLA Sınıf II lokusundaki en polimorfik motifler ekzon 2 ‘de bulunur. Ekzon 2 peptid bağlanma bölgelerini kodlar, peptid ve T hücre reseptörleri ile ilişki kurar. Bu sebeple sınıf II genlerinin ekzon 2 sekanslarının analizleriyle allelik çeşitliliğin çoğu yakalanır. HLA sınıf I için de en polimorfik bölgeler Ekzon 2 ve 3 ‘tür. Son 30 yılda ilk HLA geninin izolasyonundan itibaren HLA genlerinde tanımlanan polimorfizmler, isimleri ve sekansları IMGT/HLA veri tabanına girilmektedir (37).

Her HLA antijeni kendine özgü ve diğer antijenlere benzemeyen epitop kombinasyonlarına sahipken, aynı zamanda bu epitopların çoğu diğer HLA antijenlerince paylaşılırlar (38).

HLAMatchmaker, HLA allelleri arasındaki sekans farklılıklarına dayanarak oluşturulmuş teorik bir algoritmadır. HLA epitoplarının yapısal özelliklerini tanımlamayı sağlar (23). Bu veritabanı, HLA moleküllerinin aminoasitlerin üçlü gruplarını lineer bir dizi olarak ele alır. Veritabanı donör ile alıcı arasındaki 3-AA motiflerini karşılaştırır ve uyumsuz üçlü grupları bulur. Temel hipotez, donör ve alıcı arasındaki aminoasit polimorfizminin immunojenik olmadığı ve bu yüzden antikor üretilmediğine dayanır. Bu programın son sürümlerinde eplet olarak tanımlanan bölgelere yoğunlaşmıştır (Şekil 7). Yapısal epletler lineer dizilerle sınırlı değildir. 3A° çapındaki yamalar olarak tanımlanmıştır. Bu sebeple, üçlü gruplara zıt olarak epletler lineer olarak devam etmeyen, küme halinde duran aminoasitlerden oluşur (38).



Şekil 7. Triplet ve eplet kavramları (Tambur ve ark.2015'ten modifiye edilmiştir)(38)

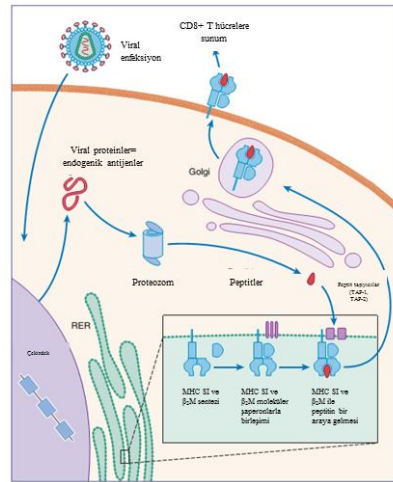
2.5. T hücrelerine Antijen Sunulması

T hücreleri antijeni HLA proteinleri tarafından sunulduğunda tanımaktadır. Farklı antijen parçalanma ve işlenme yolları ile MHC-peptit kompleksleri oluşturulur. Bunlardan biri Sınıf I molekülleri ile ilişkili olan endojenik (stoplazmik) peptitler, diğeri ise sınıf II molekülleri ile ilişkili olan ekzojenik (endozomal) peptitlerdir. MHC sınıf I endojenik antijen epitoplarını CD8+ T sitotoksik hücrelere,

sınıf II ise ekzogenik antijenleri CD4+ T_H hücelere sunar. Tüm çekirdekli hüceler MHC sınıf I sunumu yaparken, sadece özelleşmiş fagositik hüceler MHC sınıf II sunumu yapar (21).

2.5.1. Endojenik (sitoplazmik) antijen işlenmesi ve MHC sınıf I sunumu

MHC sınıf I molekülleri, hücrenin içinde endojenik olarak sentezlenen, proteolitik olarak parçalanmış proteinlerden kaynaklanan peptit parçalarına bağlanırlar. Örneğin hücre içindeki viral replikasyon sırasında üretilen proteinler endojenik olarak üretilen proteinlerdir. Küçük peptitler endoplazmik retikuluma taşınır. Burada olgunlaşmamış MHC sınıf I molekülleri ile birleşirler ve golgi aygıtına gönderilirler. Ardından hücre yüzeyine giderek sitotoksik T lenfositlere sunulurlar. Antijen sunumunda görev alan taşıyıcılar sitozolik proteazlardır. Bunlar olgunlaşmamış MHC sınıf I molekülleri ile ilişki kurmaları için peptitleri taşırlar. Adenozin trifosfat bağlayıcı transporter süperailisinin iki üyesi olan TAP-1 (peptit taşıyıcı-transporters of antigenic peptides) ve TAP-2, ATP kullanarak molekülleri hücre membranları arasında taşıyan önemli proteazlardır(Şekil 8) (21).

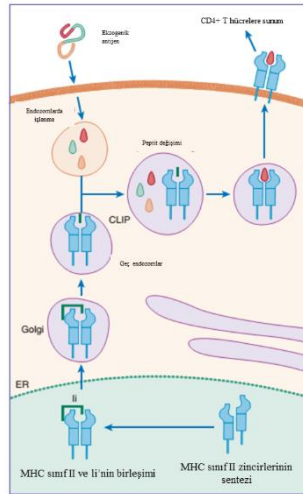


Şekil 8. Antijenin işlenmesi ve Sınıf I sunumu için endojenik yolak. Sınıf I MHC molekülleri proteozomlarca parçalanan peptitlerle etkileşime girerler. Parçalanan peptitler düz ER'ye taşınır (TAP-1 ve TAP-2 ile) Peptidin bağlanmasından sonra MHC sınıf I α zinciri ile β_2 -mikroglobulin etkileşimi ile stabilizasyon sağlanır ve kompleks golgi aygıtında paketlenerek plazma membranına gönderilir (Actor 2012'den modifiye edilmiştir).

MHC sınıf I molekülleri 8-10 aminoasit uzunluğundaki küçük antijenik peptitlere bağlanırlar. T hücre reseptörleri tarafından tanınmaları ile birlikte, CD8+ molekülü sınıf I alfa zincirindeki sabit domaine bağlanarak etkileşimi stabil hale getirir. T hücre reseptörü antijen-MHC sınıf I kompleksine bağlandığı zaman, kostimulatör sinyal oluşur ve T hücre reseptörü aktive olarak bağlandığı hücreyi öldürmek için toksin üretip salgılar (21).

2.5.2. Ekzojenik (endozomal) antijen işlenmesi ve MHC sınıf II sunumu

MHC sınıf II molekülleri, ekzojenik olarak parçalanmış proteinlerden türevlenen peptit parçalarına bağlanırlar. Örneğin fagosite edilmiş bakteriyel ajanlar ekzojenik antijenlerdir. Peptit parçaları endozomda bölümlere ayrılırlar ve hücre yüzeyine gönderilmeden önce bu kompartmanlarda MHC sınıf II molekülleri ile etkileşirler. MHC sınıf II molekülleri 13-25 aminoasitlik daha büyük antijenik peptitlere bağlanırlar. Sınıf II MHC molekülleri sınıf I'ler gibi düz ER'da sentezlenirler (Şekil 9).



Şekil 9. Antijen işlenmesi ve sınıf II'ye sunum için ekzojenik yolak. Sınıf II α ve β polipeptitleri ER'de sentezlenir, birleşir ve sabit zincirle bağlanması bölgesi kapatılır. Kompleks endozomal bölgeye gider. Sabit zincir lizozomlarca parçalanır. Böylece Sınıf II MHC molekülleri peptitlere bağlanabilirler (Actor 2012'den modifiye edilmiştir).

Sınıf II alfa ve beta zincirleri sabit zincir (Ii) denilen bir polipeptidin de eklenmesi sonucunda burada bir kompleks oluştururlar. Sabit zincir sınıf II molekülün oluşunu bloke eder ve endojenik antijenlerin bağlanmasını engeller.

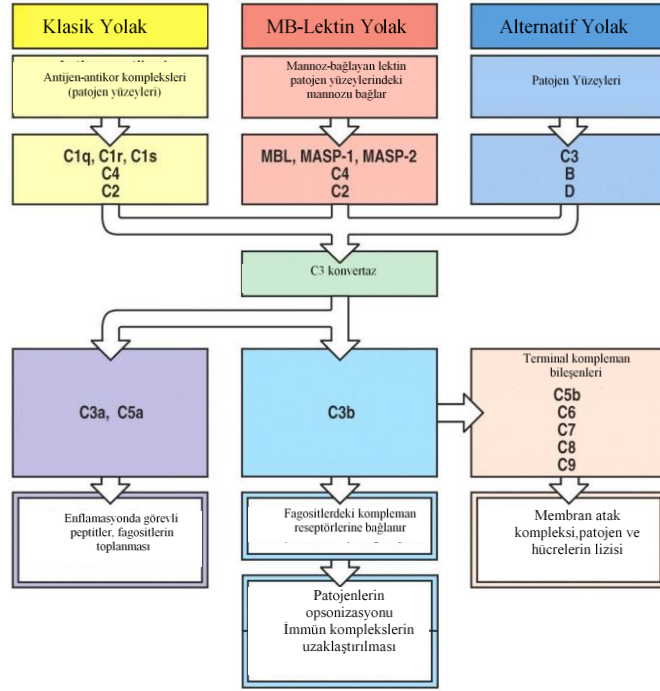
MHC-sabit zincir kompleksi asidik endozomal veya lizozomal bölgeye taşınırlar. Burada parçalanmış antijenik peptit ile karşılaştıklarında sabit zincir ayrılarak antijenik peptidin bağlanması için oluk bölgesini açar. Sınıf II antijen-peptit kompleksi antijen sunan hücrelerin (APC) yüzeyine taşınarak burada CD4+T_H hücreleri ile etkileşirler. CD4+ TCR antijen-MHC sınıf II kompleksini bağladığında ve kostimulatör moleküllerin de bağlanması ile birlikte CD4+T hücresi aktive olur, çoğalır ve sitokin salgılar. Sitokinler, humoral veya hücrel immün yanıtı oluşturan diğer immün sistem hücrelerini aktive eder (Şekil 9)(21).

B hücreleri mükemmel ekzojenik peptit sunan hücrelerdir. B hücreleri yüzey immünoglobulinlere bağlanma yolu ile antijeni fagosite edebilir. Antijen özümser ve MHC sınıf II moleküllerinin peptit bağlanma oyuklarında, B hücre yüzeyinde sunulacak olan peptitlere parçalanırlar. Birincil T hücresi ile B hücre etkileşimi sonucunda peptit-sınıf II kompleksi tanınır, çoğalma ve aktivasyon yolağına girilir. Bu yolda B hücreleri antikor sentezleyen plazma hücrelerine dönüşür. Tüm çekirdekli hücreler sınıf I moleküllerini ifade ederken, B hücreleri, sınıf I veya II sunum yollarında, peptitlerin birleşmesi için antijeni işleme yeteneğine sahiptir (21).

2.6. Kompleman Sistemi

Kompleman sisteminde 30'dan fazla protein görev alır ve konağı istilacı organizmalara karşı korur. Kompleman kaskadının aktivasyonu ile, inflamatuvar hücreler, membran komplekslerini oluşturan bakteriyel ve memeli hücrelerinin lizisini sağlar. İmmün sistemi, yabancı veya kanserli hücreyi öldürmesi için teşvik eder. Kompleman kaskadı, kompleman regülatör proteinlerle (CRP) düzenlenir. CRP'ler hücrelerin yüzeyinde ifade edilirler ve kompleman aktivasyonuna yanıt olarak ortaya çıkan enflamasyondan dokuları korumak için önemli bir rol üstlenirler (9).

Kompleman kaskadı, klasik, mannoz bağlayıcı lektin ve alternatif yol olmak üzere 3 yolla aktive olur (Şekil 10).



Şekil 10. Kompleman Yolakları (<http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/students/spring2006/finley/c3.html> sitesinden modifiye edilmiştir)(39)

Klasik yolak, hedef antijene tutunan antikorla uyarılır. Lektin yolağı mikrobiyal yüzeylerdeki karbonhidratlarla, alternatif yolak ise kendiliğinden uyarılır ve yabancı antijenlere karşı yanıtta hızlı bir kompleman aktivasyonu için plazmada ve diğer vücut sıvılarında aktive olur (9).

Bu üç yol izi de C3 bileşeninin parçalanmasına ve C3a ve C3b parçalarının oluşmasına yol açar. C3a histamin gibi inflamatuvar bileşenlerin aktivasyonuna ve salınmasına sebep olur. C3b kompleman kaskadının ek üyelerini aktive eder. C5b membran atak kompleksinin (MAC) oluşumunu başlatır. MAC, hücre lizisini aktive eden, por oluşturan lipofilik komplekstir. Hücre membranında porlar açar ve hücre ölümüne sebep olur (9).

2.7. Organ Nakli İmmunolojisi ve Duyarlılaşma

Hastalıklı bir organ veya dokunun sağlıklı dokularla yer değiştirmesi (nakli) tıbbın uzun süredir üzerinde çalıştığı konulardan biridir fakat başka bir bireyden

alınan dokulara karşı immün yanıtın reddi problem yaratmaktadır. T hücrelerinin büyük bir kısmı allo-MHC antijenleri için özgül reseptörler taşır. Nakledilen doku veya organlardaki kendinden olmayan antijenlere karşı da antikor üretilebilmektedir. Bu kısıtlamalar, genetik olarak farklı bireylerden yapılacak olan nakilde, doku tiplerindeki uyumu ve immün sistemin baskılanmasını gerektirmektedir (40).

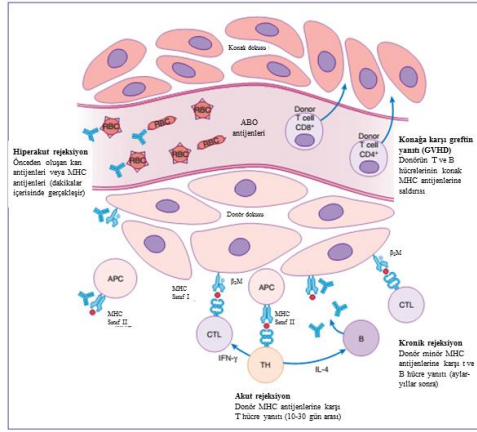
HLA Sınıf I ve II gibi polimorfik proteinlere karşı duyarlılaşma, gebelik, transfüzyon veya organ nakli gibi olaylar sonucu, farklı bireylerden gelen hücrelerin aktarıldığı kişilerde meydana gelmektedir (41). Özellikle donöre özgül antikorlar (DSA) HLA sınıf I, II veya MICA ve MICB gibi minör doku uyumluluk moleküllerine veya endotel ve epitel hücrelerin yüzeylerinde ifade edilen HLA-dışı antijenlere karşı oluşturulmaktadır. Birçok çalışmada panel reaktif (belirli bir antijen paneline karşı yapılan antikor tarama testi) veya donöre özgül antikora sahip hastalarda greft ömrünün 3-5 yıl ile sınırlı kaldığı gösterilmiştir (42).

Gebelik, organ nakli, transfüzyon öyküsüne sahip olmasa da sensitize olmuş kişilerle karşılaşmaktadır. Bunun sebebinin bazı mikroorganizmalar ve allerjenlerde bulunan çapraz-reaktif epitoplar olabileceği belirtilmektedir (43).

2.7.1. Organ Reddi Tipleri

Alıcının immün sistemi MHC sınıf I ve II molekülleri tarafından sunulan peptitleri tanır. Nakledilmiş dokularda, nakledilen hücrelerin genleri kendilerine ait olmayan molekülleri kodlarlar ve bunlar da alıcı immün sistemi tarafından saptanıp doku uyumluluk antijenleri olarak işlev görebilirler. T hücreleri doku uyumluluk antijenlerini iki farklı yol ile saptayıp bunlara karşı etkin olabilir: doğrudan ve dolaylı tanıma. Doğrudan tanıma alıcının T hücrelerine vericinin antijen sunan hücreleri tarafından; dolaylı tanıma ise alıcının antijen sunan hücreleri tarafından antijen sunumunu kapsar (19). Böylece alıcının immün sistemi nakledilen hücrelerin kendinden olmadığını anlar ve tepki verir. Red yanıtları gelişme zamanı ve yoğunluğuna bağlı olarak üçe ayrılır: kronik, akut ve hiperakut. Kronik red en yavaş seyreden ve en zayıf red tipidir. Nakledilen dokular ya da organlar damar bağlantısı kurarlar ve immün atağa bağlı kötüye gidiş bulguları ortaya çıkmadan önce

işlevlerini haftalar, aylar, hatta yıllar boyu sürdürebilirler (44). Reddin ilk belirtilerinin ortaya çıkmasından sonra bile, yama dokusunun yerini hücre içi matriks ve skar dokusu alır iken, yama zedelenmesi yavaş ve kademeli olarak ilerler (19). Antijenlere karşı hem T hücreleri hem de antikörler etki ederler. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin infiltrasyonu ile sitokinler salgınır, hedef dokunun lizisi başlar ve sonuçta greft reddi gerçekleşir (Şekil 11) (32).



Şekil 11. Organ reddi mekanizmaları. RBC, Kırmızı kan hücreleri; APC, antijen sunan hücreler, CTL, sitotoksik T lenfositler (Actor 2012’den modifiye edilmiştir.)

Akut redde, HLA antikörleri görev alır fakat hiperakut rejeksiyondan farklı olarak greftin direkt olarak damar yapısına etki eden sitotoksik bir reaksiyondur(45).Aktarılan doku, iki-dört hafta gibi bir süre aralığında normal işlevini görür. Daha sonra red atakları ortaya çıkmaya başlar (19).

Hiperakut redde neden olan antikörler koagülasyona ve kan akımının engellenmesine sebep olarak süreci başlatırlar (34).Yani immün atak yama damar yapılarına yönelir (19). Eğer endotelyum konak hücreleri tarafından sarılmaya başlarsa “uyum” denen süreç başlamıştır. Eğer greft antijenleri endotelyumda tekrar ifade edilirse bu sefer de yıkım döngüsü başlar (45).

Greftin immün baskılayıcı ilaçlar sayesinde iyi bir şekilde kabulünün sonuçlarından biri greftin konağa karşı etkisi (GVHD-graft versus host disease) olarak bilinir. Bu bir ters rejeksiyondur. Sağlıklı donörün lenfositleri hastanın dokularını yabancı olarak tanır. Zamanla da bu lenfositler deriye, karaciğere ve diğer dokulara saldırırlar(21).

2.7.2. Nakil öncesi antikor belirleme yöntemleri

HLA antijenlerine karşı önceden oluşmuş antikorlar hiperakut rejeksiyona neden olmaktadır ve organ nakillerinde engel teşkil eder (46). Bunu önlemek için yapılan panel reaktif antikor (PRA) taraması, nakil listesindeki hastalarda, rastgele bir antijen paneline karşı antikorların varlığını belirlemek için yapılır. Bu antikorlar serumda HLA-A,B,DR'ye karşı oluşturulanlardır (47). PRA çoğunlukla sensitizasyonun derecesini belirlemek için kullanılmaktadır (48). PRA değerleri yüksek olan kişilerin düşük olanlara göre nakil başarısının daha az olduğu belirtilmektedir (47). PRA tanımlamaları hücre panelinin kompozisyonuna göre değişmektedir. Panelin boyutu yetersizse popülasyonda bulunan yaygın doku uyumluluk antijenlerinin orantısız frekansını etkileyebilir (49).

Günümüzde hem solid organ hem de kök hücre nakillerinden önce HLA antikorlarını belirlemede pek çok yöntem kullanılmaktadır. Daha da önemlisi son gelişmelerle antikor belirlenmesi ve tanımlanması çok daha kolaylaşmıştır. Bu teknikler sayesinde daha detaylı bir antikor taraması yapılarak potansiyel immünolojik risk azaltılabilmektedir (50).

2.7.2.1. Komplemana Dayalı Sitotoksosite Testi (CDC)

Donör hücrelerindeki antijenlere karşı (HLA ve HLA olmayan) alloantikorların varlığını belirlemek için komplemana dayalı sitotoksosite (CDC) testi çok uzun yıllardır uygulanmaktadır (50, 51).

CDC'de test serumu, HLA tipi bilinen hücrelerle inkübe edilir, kompleman olarak tavşan serumu eklenir. Hücre ölümünün derecesini belirlemek için de boya kullanılır. Duyarlılığını arttırmak için bu testte farklı değişiklikler yapılmıştır. Örneğin, ikinci bir antikor olarak anti-insan globulini ve daha farklı inkübasyon süreleri gibi.

Son yıllarda nakil öncesi sensitizasyonun belirlenmesi için katı-faz yöntemleri daha sık olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler kabaca ikiye ayrılır, ELISA'ya dayalı yöntemler ve antijen kaplı boncuklara dayalı yöntemler (Flow

sitometri veya luminex platformu gibi). Bu yöntemler CDC'ye göre çok daha duyarlıdır (52).

2.7.2.2. ELISA

ELISA yönteminde plastik kuyulara tutunmuş tek veya grup HLA moleküllerinden oluşur. Test serumu eklenir ve HLA molekülüne bağlanır İkinci bir enzim bağlı anti-insan IgG antikoru eklenir ve renk değişimi okunur (52).

2.7.2.3. Flow Sitometri

Flow sitometrik yöntemde saflaştırılmış HLA partikülleri mikroboncuklara tutundurulurlar. Oldukça duyarlıdır ve en önemlisi de hücre kalitesine bağlı değildir (53).

2.7.2.4.Luminex Teknolojisi

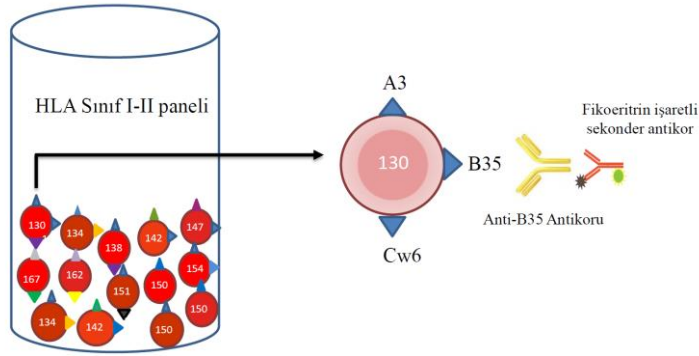
Luminex xMAP Teknolojisi (Austin, TX) tarafından geliştirilen, 5,6 µm polistren mikroboncuklara dayalı, multipleks, flow sitometrik analiz yöntemidir (54). Bu mikroboncukların içi spektral olarak farklı iki florokromla boyalıdır. Bu florokromların her birinden hassas miktarda kullanılarak, özgül spektral özelliklerde 100 farklı boncuk seti oluşturulmuştur. Her boncuk seti yüzeyinde farklı bir reaktan taşır. Boncuk setleri spektral özellikleriyle ayrıldığı için, tek bir reaksiyon kuyusunda 100 farklı analiti ölçebilir. Üçüncü bir florokrom reporter moleküle bağlıdır ve boncuğun yüzeyindeki biyomoleküler etkileşimi ölçer. Mikrosferler hızla akan bir sıvı nehrinden tek tek geçer ve luminex analiz cihazındaki iki farklı lazer tarafından tanınır. 635 nm'lik 10mW kırmızı diodlazer mikroboncuktaki iki florokromu uyarır. 532 nm 13mW'luk yttrium aluminum garnet (YAG) lazeri ise mikroboncuğun yüzeyine tutunmuş olan haberci (reporter) florokromu uyarır (R-fikoeritrin, Alexa 532, Cy3). Yüksek hızlı dijital sinyal toplanır, mikroboncuğa dayalı olarak

sınıflandırma yapılır ve yüzeydeki reaksiyonu ölçülür. Saniyede 1000 mikroboncuk analiz edilebilmektedir (55).

Luminex Antikor testinde üç tipte boncuk grubuyla farklı seviyelerde antikor tanımlaması yapılır.

1. Luminex PRA Tarama

Boncuklar pozitif ve negatif sonuç verecek şekilde sınıf I veya sınıf II molekülleri ile kaplıdır. Birden fazla ve farklı etnik kökenden gelen bir donör havuzundan elde edilen HLA antijenleri polistren boncuklar üzerine tutturulurlar. Sınıf I anti-HLA taramasında kullanılan bir boncuk üzerinde, birden fazla HLA-A, HLA-B ve HLA-C antijenleri bulunabilir. Aynı durum Sınıf II boncukları için de geçerlidir (Şekil 12).



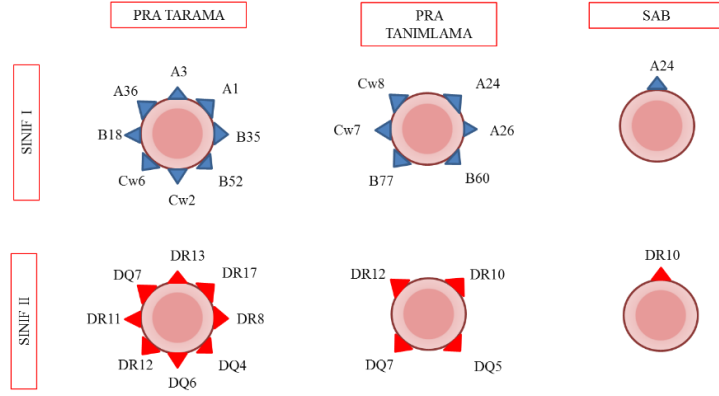
Şekil 12. PRA Tarama testinin prensibi (Pirim ve ark.2015'ten modifiye edilmiştir)

2. Luminex PRA Tanımlama

Her bir boncuk üzerinde sadece tek bir donöre ait HLA antijenleri bulunmaktadır. Sınıf I ve Sınıf II anti-HLA antikorları tanımlaması için, taramadan farklı olarak iki ayrı boncuk karışımı ve pozitif kontrol serumu vardır.

3. Luminex Tek Antijen Boncuk (SAB) Testi

Bu testte kullanılan boncukların üzerinde sadece tek antijen bulunmaktadır (Şekil 13). Özellikle yüksek PRA'ya sahip serumlardaki antikor spesifitesi belirlenebilmektedir (46, 52).



Şekil 13. PRA Tarama, Tanımlama ve SAB testlerinin şematik olarak karşılaştırılması (Pirim ve ark.2015'ten modifiye edilmiştir) (56)

Antikor taramaları sonucunda elde edilen test sonuçlarını yorumlarken bazı klinik faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar alıcıyla-vericinin akrabalığı, hastalığın başlangıç sebebi, sensitizasyon olayları, diyaliz zamanları, yaş gibi faktörlerdir (57).

2.8. Gebelik

2.8.1. Gebelik Evreleri ve Fetal Gelişim

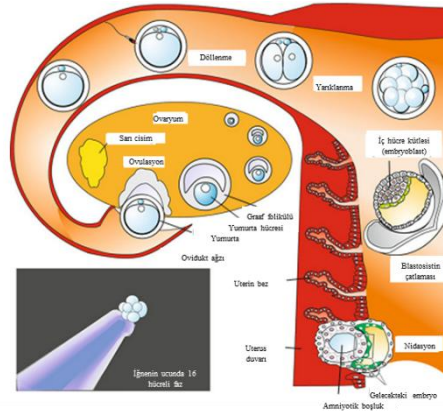
Gebelik, erkek üreme hücresi spermatozoon ve dişi üreme hücresi oositin birleşerek zigot adı verilen yeni bir organizma oluşması anlamına gelen fertilizasyonla başlar (58) (Şekil 14). İnsan gelişimi, döllenmeden doğuma kadar yaklaşık 266 gün sürer ve bu süre trimester denen üç periyoddan oluşur(59).

İlk Trimester:

İlk Ay: İnsanlarda yumurta, ovulasyondan hemen sonra, henüz oviduktun yukarı kısmındayken döllenir (60). Döllenme sonucunda yarısı anneden yarısı babadan gelen kromozomlara sahip zigot oluşur ve yarıklanma (cleavage) başlar. Her yarıklanmadan sonra hacmi giderek küçülen blastomer denilen hücreler oluşur (Şekil 14). Üç dört bölünme sonunda zigot morula evresine geçer (58).

Morula, döllenmeden sonraki 3. gün civarında oluşur ve iç hücre kütesi (embriyoblast) denen, merkezde yerleşmiş hücre grubundan ve bu hücre grubunu çevreleyen dış hücre kütesinden (trofoblast) oluşur. Embriyoblastlardan embriyonun

dokuları, trofoblastlardan da plasenta oluşur. Zigot gelişerek blastosist adını alır. Gelişimin 1. haftasının sonunda zigot morula ve blastosist evrelerinden geçmiş ve uterus mukozasına gömülmeye başlamıştır (implantasyon) (Şekil 14) (58,59). Başarılı bir embriyo implantasyonu için trofoblast ile maternal uterusun etkileşimi gerekmektedir ve HLA-G de maternal desidua ya invaze olan trofoblastlara yardımcı olmaktadır (61).



Şekil 14. Ovulasyondan döllenmeye giden sürecin gösterimi. Döllenme ve yarıklanma ovidukta gerçekleşir. Embriyo uterusu geldiğinde blastosist safhasındadır. Blastosist zona pellucida denilen zarından ayrılır ve uterus duvarına tutunur (Mueller ve ark.2015'ten modifiye edilmiştir).

Döllenmenin ardından ikinci haftada, gelişen koryon dallanan uzantılar oluşturur. Buna koryonik frondosum (fetal plasenta) denir ve endometriuma girintiler yapar. Bu uzantılar etrafındaki endometriyal dokuyu indükler, değişime uğramasını sağlar ve desidua bazalisi (maternal plasenta) oluşturur. Koryonik frondosum ve desidua basalis birlikte plasentayı oluştururlar. Plasentanın içinde annenin kanı ile embriyonun kanı karışmaz. Oksijen ve karbondioksit anneden embriyoya ve embriyodan anneye difüze olur (59).

Aynı zamanda plasenta embriyoyu korur, embriyonik dolaşıma karışabilecek molekülleri detoksifiye eder ve hormon salgılar. Alkol, ilaçlar ve antibiyotikler plasenta tarafından durdurulamaz ve annenin kanından fetüse geçer (59).

Plasenta tarafından salgılanan hormonlardan biri koryonik gonadotropindir (hCG). Bu hormon trofoblastlar koryon haline gelmeden önce bile trofoblastlar tarafından salgılanır ve gebelik testlerinde bu hormon seviyelerine bakılır. hCG'nin görevi korpus luteumu korumaktır. Korpus luteumda estradiol ve progesteron

salgılanmasının devamını sağlayarak menstruasyonun ve ovulasyonun devamını engeller (59).

Gastrulasyon döllemenin ardından ikinci haftada da devam eder. Embriyonun yüzeyinde primitif çizgi görülür ve üç germ tabakası (ektoderm, mezoderm ve endoderm) farklılaşır (59).

Üçüncü haftada nörolasyon oluşmaya başlar. Bu safhada embriyonun dorsal aksisinde nöral tüp oluşur. İlk ense halkaları gözüktür ki bu somitler, kasları, omurgayı ve bağ dokuyu oluşturur. Bu haftanın sonunda bir düzineden fazla somit oluşur ve ardından kan damarları ve bağırsak gelişmeye başlar. Embriyo bu haftada 2 milimetre uzunluğundadır (Şekil 15) (59).

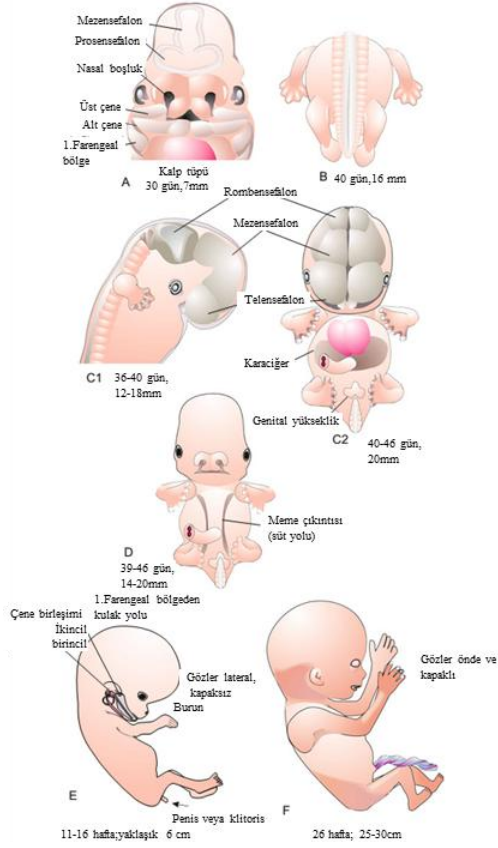
Dördüncü haftada organogenez başlar. Gözler oluşur. Tübüler kalp oluşur ve ritmik olarak atmaya başlar. Bu haftanın sonunda 30 çift somit görülür ve kol ve bacak tomurcukları oluşmaya başlar. Embriyo yaklaşık 5mm'dir (59).

Erken gebelik çok kritik bir süreçtir çünkü birçok olay bebeğin gelişimini olumsuz etkileyebilir. Spontan düşüklükler bu periyotta gerçekleşir (59).

İkinci ay: Morfogenez (şeklin oluşması) ikinci ayda devam eder. Embriyonun küçük organları yetişkinlikteki şekle dönüşür. Kollar, bacaklar, dizler, parmaklar görülebilir (Şekil 15). Abdominal kavitede karaciğer, pankreas ve safra kesesi oluşur. İkinci ayın sonunda embriyo 25 mm uzunluğunda ve 1 g ağırlığında ve insan görünümündedir (59).

Üçüncü ay: Sinir sistemi ve duyu organları gelişir ve eller kollar hareket etmeye başlar. Embriyo emme ve irkilme refleksleri ile yüz mimikleri göstermeye başlar. 8. hafta embriyodan fetüsa geçme dönemidir. Bu sürede artık tüm organlar gelişmiştir (59).

Onuncu haftada plasenta tarafından insan koryonik gonadotropin (hCG) salgılanması azalır ve korpus luteum geriler. Fakat menstruasyon gözlenmez çünkü plasenta estradiol ve progesteron salgılamaktadır. Plasenta tarafından salgılanan bu iki hormonun miktarı ovaryum tarafından salgılanandan çok çok fazladır. Gebelik esnasında kanda yüksek miktarda bu iki hormonun bulunması folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) salgılanmasını inhibe eder ve ovulasyonu engeller. Aynı zamanda uterusu doğuma hazırlarlar. Meme bezlerini de uyararak doğum sonrasında süt salgılanmasını sağlarlar (59).



Şekil 15. İnsan gelişim evreleri. (A-D) 30-46 gün. (E-F) 11-26 hafta. Embriyo amniyon tabanındaki bir blastodiskten gelişir. Blastodisk epiblast ve hipoblasttan oluşmuştur. Ekstraembriyonik organlar yolk kesesi, alantois, villöz trofoblastlar ve plasenta görülmektedir (Mueller ve ark.2015'ten modifiye edilmiştir).

İkinci trimester

Ondördüncü haftada kemikler gelişmiştir ve bu ayın sonunda bebeğin hareketlerini anne hissedebilir. Beşinci ay sırasında baş ve vücut lanugo denilen tüylerle kaplıdır. Daha sonra bu tabaka kaybolur. Bu ayın sonunda steteskop ile fetüsün kalp atışları duyulabilir. Fetüsün boyu 175 mm ağırlığı ortalama 225gramdır. Altıncı ayda fetüs 600 grama ulaşır. Bu dönemde erken doğumlar meydana gelebilmektedir fakat bebek uterus dışında kendi kendine yetebilecek durumda değildir, medikal desteğe ihtiyaç duyulur (59).

Üçüncü trimester

Gelişmeden çok büyüme evresidir. Fetüsün ağırlığı iki katına çıkar. Beyindeki nöronlar gelişir. Gelişen beyin dakikada 250000'den daha fazla hızla nöron üretir.

Doğum öncesinde tamamlanır. Eğer fetüs nörolojik gelişim tamamlanana kadar uterusda kalırsa, pelvisten güvenli bir şekilde geçebilmek için fazla büyümüş olur. Bunun yerine, doğumdan sonraki aylar boyunca yeni nöronların gelişimi devam etmektedir (59).

2.8.2. Plasentanın yapısı ve gelişimi

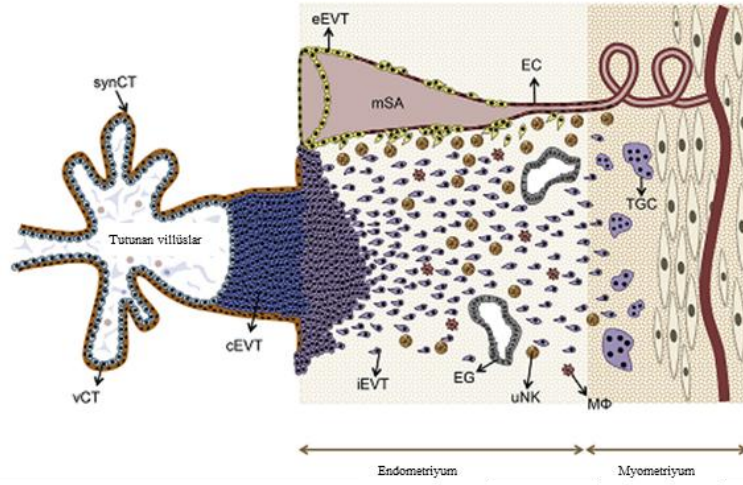
Plasenta, embriyonun tutunduğu ve anneyle madde alışverişini sağladığı, fetal trofoblastlarla maternal desiduanın etkileşimi sonucu oluşan, dinamik bir organdır (62, 63, 64, 65). Fetal maternal bölümler arasında vasküler bir devamlılık yoktur. Fetüs maternal kanla direkt olarak değil, plasenta yolu ile iletişim kurar (66).

Blastosist evresindeki embriyo iki tip hücreden oluşur. Dış epitel tabaka (trofektoderm) plasentanın hücresel birimlerini oluştururken, iç kütle embriyo gelişimini sağlayan birçok hücre tipine farklılaşır. Erken plasental gelişimde, trofektodermal tabakadaki progenitör sitotrofoblastlar, villöz ve invazif olmak üzere iki hücresel yolakla farklılaşırlar. Mitotik olarak aktif villöz sitotrofoblastlar (vCT) sinsitiotrofoblastlar(synCT) denen çok hücreli yapıyı oluşturur (67). synCTler, besin ve gaz alışverişini kolaylaştırırken, sitokinler ve hormonlar gibi birçok büyüme faktörünün primer kaynağıdır (67,68).

İnvasiv yolaktaki farklılaşma, plasentanın uterus duvarına tutunduğu belirli bölgelerde başlar. Bu bölgelerde çoğalan vCT'ler dallanarak trofoblastların çok hücreli gruplarını oluştururlar (artık ekstravillöz trofoblast (EVT) olarak adlandırılır). EVT'ler maternal uterus stroması ve spiral arterlerin şeklini değiştirip invaze olur (Şekil 16).

İntersitiyal EVT'ler dev trofoblast hücrelerine dönüşürler ve apoptoza uğrarlar (Şekil 16). Eğer uğramazlarsa myometriuma fazla giriş olur. Dev hücrelerin görevleri bilinmemektedir. İnsan plasental laktogen (hPL) ve insan koryonik gonadotropinin (α -hCG) lokal olarak salgılanmasından sorumlu oldukları düşünülmektedir (67).

Endometriyal arterlerin trofoblastlarca yeniden düzenlenmesi sonucunda buraya kan akışı artar. Aksi durumda plasenta yeteri kadar beslenemez ve pre-eklamsi veya intrauterin büyüme geriliği gibi sorunlar oluşabilir (67).



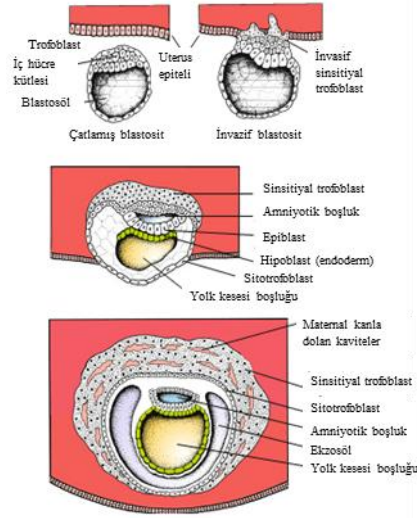
Şekil 16. Trofoblast farklılaşmasının şematik diagramı. Tek çekirdekli villöz sitotrofoblastlar çok çekirdekli sinsitiotrofoblastlara veya invazif EVT'lere farklılaşırlar. İnvazif yollaıyla farklılaşırlarken, desidua stroma ve arteriollerin şeklini yeniden oluşturular. Bu değişimle birlikte fetüse kan akışı artar. vCT: villöz sitotrofoblast; synCT: sinsitotrofoblast; cEVT: kolon ektravillöz sitotrofoblastları; eEVT: endovasküler ektravillöz sitotrofoblastları; iEVT: intersitiyal ektravillöz sitotrofoblastları; mSA:maternal spiral arter; EC: endotel hücre; EG: endometriyal bez; uNK: uterin doğal öldürücü hücreler; Mφ: makrofajlar, TGC: dev trofoblast hücreleri (Aghababaei ve ark. 2015'ten modifiye edilmiştir).

Villöz trofoblastların sabit bir dönüşümü vardır. Plasentada, sitotrofoblastların proliferasyonu ve farklılaşması ile başlayan fizyolojik bir apoptoz döngüsünü, sitotrofoblast ve sinsitiotrofoblastların füzyonu izler (Şekil 17). Daha sonra farklılaşma ve apoptotik materyalin atılımı gerçekleşir (69). Normal gebeliklerde, inflamasyona sebep olmadan günlük gramlarla ölçülebilecek kadar miktardaki plasental materyal maternal dolaşıma katılır. Bu plasental materyal nükleozom ve kromatinlerden oluşmaktadır (63).

Yirmi haftalık gebelikte, trofoblastlar $15m^2$ lik bir alanı kaplarlar. Bu yüzden de immünolojik olarak koruyucu bir rol oynamaktadırlar (66).

Memeli embriyoları gelişimlerinden önce annelerine trofoblastlar yardımı ile sinyal göndererek gebeliğin başladığını bildirirler. Bu hücreler embriyonun vücudunu oluşturmasalar da, maternal uterin ile iletişim kurarak, implantasyon bölgesine yeterli kanı sağlarlar ve yarı-allojenik fetüsün reddedilmesini önlerler. Gebelik ilerledikçe, trofoblastlar fetüsa besinlerin etkili transportunu ve atıkların

geçişini sağlarlar. Bu hücreler endokrin organı halini alarak annenin fizyolojisini gebeliğe programlar (70).



Şekil 17. İmplantasyon. Uterus duvarına invazyon trofoblastlar sayesinde gerçekleşir. Trofoblastlar hücre membranlarını çözerek sinsitiyum denilen yapıyı oluştururlar. Amniyotik kavite, iç hücre kütesindeki hücrelerin ayrılması ile oluşur. Hipodermal hücreler (endodermal) yolk kesesinin kaviyesini çevreler ve boş bir kese oluştururlar. Embriyo henüz oluşmamıştır (Mueller ve ark.2015'ten modifiye edilmiştir).

2.8.3. Plasenta immünolojisi

Gebelik sırasında anne ile fetüs arasındaki immünolojik etkileşim farklı seviyelerde görülmektedir. Maternal doku ile desiduada fetal trofoblastlar arasındaki fiziksel etkileşim fetal-maternal arayüz olarak adlandırılır. Gebelikte desiduada temel hücre grubu, uterus doğal öldürücü hücreleri (uNK), dendritik hücreler, T lenfositler ve makrofajlardan oluşur (71,72). Bu hücreler, özellikle implantasyon bölgesinde ve plasenta bazaliste bulunurlar (72). Buradaki immün yanıt ekstravillöz trofoblastlar ile uNK hücreleri arasındaki etkileşimle düzenlenir. uNK hücreleri, trofoblast hücrelerindeki HLA sınıf I moleküllerini tanıyan hem aktive edici hem de inhibe edici reseptörleri ifade ederler. EVT hücreleri HLA-C, HLA-E, HLA-F ve HLA-G'yi ifade eder ve bunlar bazal desiduada uNK ile etkileşirler. Erken gebelikte uNK hücreleri desiduada total hücre popülasyonunun %30'unu oluştururlar. Fakat bu oran ikinci ve üçüncü trimesterde düşer (71).

Maternal immün hücrelerle fetal trofoblastlar arasındaki etkileşimler gebeliğin sağlıklı ilerlemesini sağlamaktadır. Gelişen embriyo, genlerinin yarısını babadan alır. Dolayısıyla embriyo, yarı-allojenik bir greft gibidir ve maternal immün sistem tarafından reddedilebilir. İmmunokompetent bir uterusu birçok farklı mekanizma ile fetüse immunolojik tolerans gösterilebilir. Bunlardan biri HLA-G ekspresyonudur. Desidua fetal trofoblast hücreleri tarafından ifade edilen HLA-G molekülleri monositler/makrofajlar ve doğal öldürücü hücrelerin reseptörlerine bağlanırlar (72).

Monosit/makrofajlar maternal immün hücrelerdeki en yaygın immün hücrelerdendir. Vasküler büyümeyi ve plasental gelişimi düzenlerler. Ayrıca intraselüler patojenleri ve tümör hücrelerini yok ederler. Trofoblastlarda, diğer polimorfik HLA moleküllerinin ekspresyonu baskılanırken, HLA-G ifade edilmektedir (72).

Fetal-maternal arayüzde HLA-G ekspresyonu gebelik için gerekli sitokinlerin oluşturulmasını sağlar. HLA-G, IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi Th2 antiinflamatuvar sitokinlerin seviyesini artırırken, IL-2, TNFalfa ve IFN gama gibi proinflamatuvarların üretimini düşürür. Tüm bu sitokinler, fetüse kan sağlayan vaskülarizasyonda, trofoblast invazyonunda ve lokal immünsupresyonda görevlidirler (72).

Ayrıca HLA-G'nin az ya da anormal ekspresyonunun düşüklere veya gebelik komplikasyonlarına sebep olduğu bilinmektedir. Preeklempside, HLA-G'nin ekspresyonundaki değişim görülür. Preeklampsi maternal immün sistemin plasentaya anormal yanıtıyla oluşan bir sendromdur. Bu sendromda, trofoblastlar HLA-G'den yoksundur. Zarar gören trofoblast hücreleri maternal spiral arterlere yeterli derecede invaze olamaz ve plasentayı besleyecek damarların gelişimi yeterli olmaz(72).

Fetal-maternal arayüzde desidual monositler /makrofajlar birçok anahtar role sahiptirler. Desidual homeostaziye, plasental gelişimi ve yarı-allojenik trofoblastlara toleransı sağlarlar. Çok az seviyede kostimulatör molekülleri salgıladıkları için maternal T hücrelerinin toleransını arttırırlar (72).

HLA-G'nin polimorfizmi çok düşüktür. Bu yüzden de maternal ve paternal HLA-G birbirine benzemektedir (71).

2.8.4. Gebelikte Maternal İmmün Tolerans

Plasental memelilerde anne ve embriyo arasındaki ilişkinin başlaması, genetik olarak farklı iki bireyin aynı anda var olması durumundan kaynaklanan problemi yaratır. Bu, gebelik boyunca annenin immün sisteminin, plasenta ve/veya fetüsteki paternal alloantijenleri tolere etmesi anlamına gelmektedir. Bu açıdan, gebelik benzersiz bir immünolojik meydan okumadır ve doku veya organ nakilleri ile karşılaştırılabilir. Genetik anlamda farklı bireylerden transplante edilen hiçbir doku immün yanıtı kaçamaz. Fetüs-Plasentaya ait birimlere karşı gösterilen bu tolerans oldukça ilgi çekicidir ve tam anlamıyla açıklanamamaktadır (9).

Fetüsün annenin immünolojik cevabını nasıl uyarmadığına ilişkin üç hipotez ileri sürülmüştür: 1. Fetüsün anneden anatomik olarak ayrımı, 2. fetüsün antijenik anlamda olgunlaşmamış olması, 3. Annenin immünolojik durgunluğu (9,73).

Anne ve fetüs arasındaki hücresel elemanların çift yönlü taşınımı, plasentanın mükemmel bir bariyer olduğunu göstermemektedir. Hemokoriyal plasentasyona sahip türlerde (insanlar ve kemirgenler gibi) anne ve fetüs tam bir epitel hücre tabakasıyla ayrılmaz ve bu yüzden plasental trofoblast hücreleri maternal immün hücrelerine maruz kalırlar. İnsanlarda ve sıçan gebeliklerinde anne ile fetüs arasında çift yönlü hücre transferi mikrokimerizme sebep olmaktadır (9).

Fetal antijenlere karşı geliştirilen antikörlerin gebe kadınların serumunda belirlenmesi, fetal antijenlerin anne tarafından tanındığını gösterir. Normal gebeliği olan kadınlarda tip2 yardımcı T hücre (Th2) sitokinleri salınırken, sürekli spontan düşükleri olan kadınlarda tip 1 yardımcı T hücre (Th1) sitokinlerinin salındığı bilinmektedir. Böylece maternal immün sistem sadece gebeliği tanımaz, aynı zamanda gebeliğin başarısını da belirler (9).

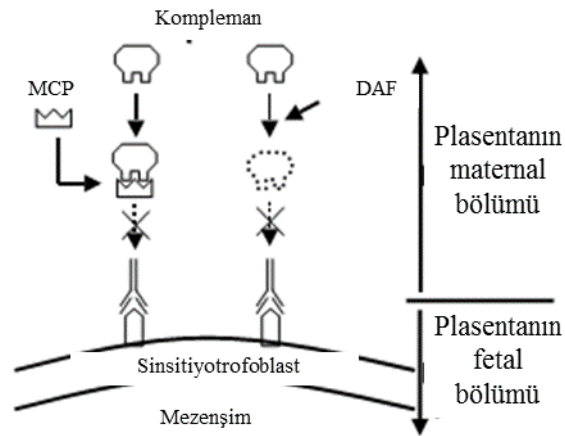
Organ nakli çalışmalarında yarı-allojenik greftler alıcının immün sisteminin farmakolojik kontrolü ile rejeksiyondan kurtulurken, yarı-allojenik fetüs normal bir gebelikte immünolojik yanıt oluşturmaz. Bu immünolojik yanıtı engellemesi, gelişen fetüsün bazı mekanizmalarla maternal immün yanıtın oluşmasını engelleyerek sağladığı düşünülmektedir. Aslında, gebelik çalışmalarında paternal alloantijenlerin maternal immün rejeksiyonu engellediği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, hamile farelerin babadan alınan allojenik tumor greftini reddetmediği, fakat farklı bir

donörden alındığında reddedildiği bulunmuştur. Daha sonra fareler doğum yaptıktan sonra babadan alınan tümörlerin reddedildiği görülmüş ve bu toleransın sadece gebelik esnasında olduğu anlaşılmıştır (9).

Yarı-allojenik fetüsün gebelik sırasında anne tarafından immünolojik olarak tolere edilmesinin fizyolojik mekanizmalarının anlaşılması sadece üreme immünolojisi için değil, aynı zamanda immün sistem hastalıklarının (otoimmün ve astım/alerji), kanser ve hücre ve organ nakillerinin de anlaşılmasını sağlayacaktır (9).

2.8.4.1. Gebelikte Kompleman Sistemi

Başarılı bir gebelik için yeterli kompleman inhibisyonunun gerekli olduğu belirtilmiştir. Trofoblast hücreleri kompleman aktivasyonunu engelleyen koruyucu mekanizmalara sahiptir. Plasenta 3 CRP ifade eder: bozulmayı arttıran faktör (DAF), membran ko-faktör proteini (MCP) ve CD59 (9). Bu düzenleyici proteinler, kompleman aktivasyonunu belirli basamaklarda inhibe eder (Şekil 18) (8). DAF ve MCP, C3 aktivasyonunu kontrol ederek kompleman kaskadını erken evrede etkilerken, CD59 MAC inhibitörüdür. Böylece, maternal/fetal arayüzde CRP ekspresyonu fetüsü, kompleman aktivasyonunun sebep olduğu inflamasyonun vereceği hasardan korur (9).



Şekil 18. Fetal dokularda kompleman inhibisyonu (Thellin ve ark. 2003'ten modifiye edilmiştir)

DAF ve CD59'a sahip olmayan bireyler bildirilse de, MCP nin olmadığı bireye rastlanmamıştır. DAF ve CD59'dan yoksun kişilerde hasarsız gebelikler gelişmiştir, MCP nin olmadığı bireyler içinse çalışma yapılamamıştır. Bu proteinin gebelikte kompleman inhibisyonu için önemli bir rol oynadığı muhtemeldir. Preeklamsiyle sonuçlanan hastalarda, MCP'de mutasyon belirlenmiştir ve kompleman aktivasyonunun düzenlenememesinin preeklamsiye sebep olabileceği düşünülmektedir (9).

2.8.4.2.Fosfokolinasyon

Fosfokolinasyon bir post-translasyonel modifikasyondur. Küçük haptenik molekül olan fosfokoline, belirli sekresyon glikoproteinlerinin polisakkarit kısımlarının eklenmesiyle oluşur (9).

Yapılan çalışmalarla, plasentada, plasental polipeptit ve proteinlerin büyük bir kısmının dokuya özgü fosfokolin içerdiği görülmüş ve fosfokolin gruplarının varlığının, gebelikte maternal immün toleransta önemli bir rol oynadığını belirlenmiştir. Plasentadan salgılanan peptit ve proteinlere fosfokolin eklenmesinin çok önemli olduğu ve gebelikte maternal immün toleransta önemli bir rol oynadığını belirtilmektedir (9).

2.8.4.3.Programlanmış ölüm ligandı 1 (PDL1)

T lenfositlerin aktivasyonu iki sinyali gerektirir. Birincisi, antijen tanınmasının ardından T hücre reseptörü kompleksi tarafından üretilen, diğeri ise kostimulatör reseptörler tarafından üretilendir. İkinci sinyal inhibitör veya aktivatör olabilir. İnhibitör kostimulatör reseptör molekülü olan programlanmış ölüm 1 (PD1) ve ligandları (PDL1 ve PDL2) in vivo da immün yanıtın düzenlenmesinde rol alır (9).

PD1 55kDa luk bir tip 1 transmembran reseptörüdür ve CD28 IgG süperailisinin bir üyesidir (74) . PD1 ligandları antijen sunan hücrelerce ifade edilir. PDL-1 aynı zamanda aktif T hücrelerinin alt popülasyonunda da bulunur. Ayrıca

ligandlar, kalp, böbrekler, pankreas ve plasenta gibi parenkimal veya endotel hücrelerde de indüklenir veya ifade edilir (9).

T hücre sinyalini engellemelerinin bir sonucu olarak, PD1/PDL(1/2) sinyalinin, maternal immün toleransta önemli bir rol oynadığı hipotezi öne sürülmüştür. Gebelik sırasında, PDL1 tüm trofoblast populasyonlarında ifade edilirlerken, PDL2 erken gebelikte sinsitiyotrofoblastlarda ifade edilirler. İlk trimesterde PDL1 ekspresyonu düşükken, doğumdan sonra artar. PDL2 ise, sinsitiyotrofoblastlarda erken gebelikte yaygınken, doğumdan sonra azalmaktadır (9).

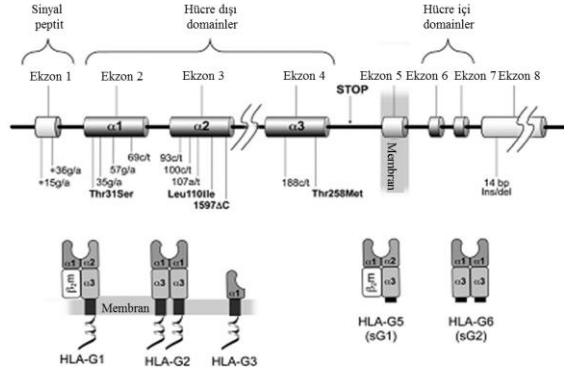
2.8.4.4.MHC ve trofoblastlarda ifade edilen non-klasik HLA class 1b genleri (HLA-E, HLA-G ve HLA-F)

Organ nakillerinde, MHC sınıf I ve II moleküllerindeki farklılıklar transplant rejeksiyonunun temelini oluştururlar. Bu sebeple, plasentadaki trofoblast hücreleri eşsizdir. Çünkü MHC sınıf II antijenlerini ifade etmeyen çok az memeli hücre tiplerinden biridir. Bu durum, gebelikteki immün koruma stratejilerinin en önemlilerinden biri olduğu düşünülmektedir (9).

Villöz trofoblastlar ve sinsitiyotrofoblastlar, HLA ekspresyonu yapmazlar ve bu yüzden de T hücrelerin hedefi değildirler. Dolaşıma katılan sinsitiyotrofoblast mikropartikülleri monositlere bağlanırlar ve inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına sebep olurlar. Bu da gebelikte sistemik inflamatuvar yanıtta ve pre-eklempsiye sebep olur. Ekstravillöz trofoblastlar, HLA-C, -E, HLA-F ve HLA-G moleküllerini ifade ederler (75). Bu sınıf Ib antijenleri, protein seviyesinde farklılık gösteren az sayıda allele sahiptirler. Örneğin HLA-E 2 allelele, G ise 5 allele sahiptir. HLA-F'nin literatürde yayınlanmış herhangi bir allelik varyasyonu yoktur fakat veritabanında (<http://genome.ucsc.edu>) rapor edilmiş iki sinonim olmayan aminoasiti vardır (76). NK hücreleri, hücre yüzeyinde HLA ekspresyonu yapmayan hücreleri öldürürler. Ekstravillöz trofoblastlar bu HLA moleküllerini ifade ederek NK hücrelerinin hedefi olmaktan kurtulurlar. Fakat HLA-C ve HLA-E, maternal T hücrelerinin hedefi olabilirler (75).

HLA-G, 4 membrana bağlı (HLA-G1-G4) ve 3 de çözünebilir (HLA-G5-G7) forma sahiptir (Şekil 19) (76). Ayrıca hücre yüzeyinden ayrılarak çözülebilir sHLA-

G1(soluble HLA-G1) oluşur. EVt hücreleri hem membrana bağlı hem de çözünebilir HLA-G ifade edebilir. Sitotrofoblastlar ve sinsitiyotrofoblastlardaki HLA-G ekspresyonu hala bilinmemektedir. Çözünebilir HLA-G gebe ve gebe olmayan kadınların ve erkeklerin kan plazmalarında, folükular ve amniyotik sıvıda ve sperm sıvısında belirlenmiştir (77).



Şekil 19. Alternatif kesim mekanizması sonucu oluşan HLA-G proteinleri (Hunt ve ark.2005'ten modifiye edilmiştir) (76)

HLA-G ekspresyonunun gebelikten önce ve gebelik sırasında az olmasının gebelik komplikasyonlarına sebep olabileceği düşünülmektedir (77).

sHLA-G seviyeleri gebe ve gebe olmayan kadınların periferik kanlarında değişmektedir. Bu varyasyonun sebebi bilinmemekle birlikte genetik faktörlerin önemli olduğu bildirilmiştir. HLA-G geninin 3' transle edilmeyen bölgesinde (3'utr) lokalize olan 14bp insersiyon/delesyon polimorfizmi (14bp ins/del) olduğu bilinmektedir. 14bp ins/14bp ins genotipine sahip gebe olmayan bireylerde, diğer 14 bp genotiplerine göre kandaki sHLA-G1/G5 seviyelerinin düşük olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu polimorfizmin plazmadaki sHLA-G konsantrasyonunun en önemli genetik göstergesi olduğu görülmektedir (77).

Fetal kandaki sHLA-G, villüslerdeki fetal kapillerlerden gelen trofoblast orjinli sHLA-G, fetal immün hücrelerce üretilen sHLA-G ve maternal dolaşımdan fetüse geçen sHLA-G'den oluşmaktadır (77).

İlk yapılan birkaç çalışmada gebe ve gebe olmayan kadınlardaki s-HLA-G seviyelerinde farklılık gözlenmemiştir. Daha sonraki çalışmalarda ise normal

gebeliği olan kadınlarda gebe olmayanlara göre daha yüksek seviyelerde bulunmuş ve gebelik ilerledikçe seviyesinin azaldığı belirtilmiştir. Bir çalışmada HLA-G'nin her üç trimesterde da gebe olmayanlara göre oldukça yüksek olduğu, iki çalışmada ise son trimesterde HLA-G seviyesinin azaldığı belirtilmiştir (77).

HLA-G tanımlanan ilk trofoblast HLA molekülüdür ve bu molekül gebelik sırasında fetüsü maternal immün yanıtı korumayı sağlayan çok önemli bir moleküldür. İlginç olarak, HLA-G benzeri proteinler insanların dışındaki primatlarda da tanımlanmışlardır ve bu durum HLA-G benzeri proteinlerin maternal immün toleransta önemli bir rol oynadığını desteklemektedir (9).

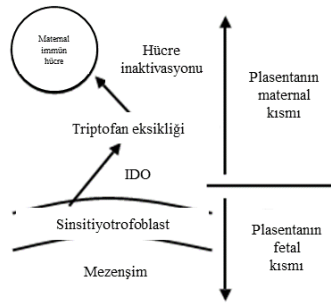
HLA-G'nin maternal arayüzde yüksek seviyelerde bulunduğu belirlendiğinden beri maternal toleransın indüklenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir. Farklı dokulardaki HLA-G'nin etkilerinin, NK öldürücü aktivite üzerinde, hücre göçü ve hücre ömrü üzerinde, proliferasyon ve IFN-gama üretimi, sitokin üretiminin regülasyonu, sitotoksik T lenfositlerin öldürücü aktivitesi ve canlılığının baskılanması, yardımcı T hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonu ve baskılanmasının indüksiyonu, dendritik hücrelerin stimule edici kapasitesinin değiştirilmesi olduğu belirtilmiştir (78).

HLA-G'nin hiçbir formunun olmadığı bir gebelik durumu rapor edilmemiştir. Ama HLA-G allelinde mutasyonlar bildirilmiştir fakat bu mutasyonların gebeliğin normal sürmesi için engel teşkil etmediği belirtilmiştir. Bu da HLA-G allellerinin gebelik için gerekli olmadığı fikrini akla getirmektedir. Diğer çalışmalar bazı polimorfizmlerin (ekzon 8 de 14 baz çiftlik insersiyon gibi) preeklamsi ve sebepsiz kendiliğinden olan düşüklere sebep olduğu belirtilmiştir. Fakat bu veriler literatürle desteklenememiştir ve farklı çalışmalar HLA-G'nin farklı etkilerini göstermiştir (9).

2.8.4.5.Indolamin 2,3-dioksigenaz (IDO) aracılı triptofan katabolizması

IDO, triptofan aminoasidini katabolize eden bir enzimdir ve trofoblastlar tarafından sentezlenir (74). IDO erkek epididim proksimalinde de ifade edilse de asıl gebelik sırasında maternal fetal arayüzde ifadesi önemlidir (79). Rango ve ark. IDO ekspresyonunun, menstruasyon döngüsünde başladığını ve ikinci trimesterin sonuna

kadar devam ettiğini belirtmişlerdir (80). IDO ekspresyonu sağlıklı memeli dokularının çoğunda yoktur fakat enfeksiyon ve enflamasyonla IFN ve diğer faktörlerin üretimi ile artabilir (9). IDO tarafından triptofan degradasyonu yapılarak maternal immün hücrelerin inhibe edildiği dolayısıyla maternal immün toleransta önemli olduğu bildirilmiştir (Şekil 20) (8). Fakat IDO'nun gebelik için gerekli olmadığı da pek çok çalışmada gösterilmiştir. Yine pek çok çalışmada sağlıklı kadınlarla düşük öyküsü olan kadınlar arasında IDO ekspresyonunda anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir (9).



Şekil 20. IDO mekanizması (Thellin ve ark.2003'ten modifiye edilmiştir.)

2.8.4.6.Progesteron

Progesteron gebeliğin oluşması ve sağlıklı ilerlemesi için gereken temel steroid hormonlardan biridir. Endometriyal gelişim ve implantasyonda görevlidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla progesteronun, maternal immün toleransta da görevli olduğu bildirilmiştir (81). Progesteron önce korpus luteum tarafından daha sonra ise trofoblastlar tarafından salgılanırlar (82). Doğumdan sonra anne kanında yavaş yavaş azalır (9).

Progesteron birçok farklı hücrel ve moleküler mekanizma ile immünolojik değişiklikler yaratır. Antikor üretimini inhibe edip T hücre aktivasyonunu ve sitotoksitesini baskırlar, doğal öldürücü hücrelerin aktivitelerini modifiye ederler ve koruyucu antikorların salgılanmasını indüklerler (9).

Gebelikte progesteronun koruyucu etkisi, konsantrasyonuyla ve lenfositlerin progesteron bağlama kapasitesiyle ilişkilidir. Gebelik sırasında maternal kandaki lenfositler progesterona oldukça duyarlıdır (9).

2.8.4.7. Yardımcı T hücre 1 (Th1) ve 2 (Th2) Profilleri

Gebelikte en çok çalışılmış periferal immün hücreler T lenfositlerdir. T lenfositler, yardımcı T hücreler ve sitotoksik T hücreler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Yardımcı T hücreler, sitokin salgılayarak diğer immün hücrelerin görevlerini yerine getirmelerini sağlarlar ve sitokin profillerine göre Yardımcı T hücre 1 (Th1) ve Yardımcı T hücre 2 (Th2) olarak ikiye ayrılırlar. Th1 hücrel immün yanıtı yöneten tümör nekrozis faktör alfa (TNF-alfa), IFN-gama ve interlökin -2(IL-2) yi, Th2 ise humoral yanıtı kontrol eden IL-4, 5, 6, 10 ve 13 ü üretir. Farelerde yapılan denemelerde gebelikte iyi düzenlemiş bir sitokin sistemi ile fetoplental birimin büyüme ve yaşam ömrünün arttırıldığı belirlenmiştir (9).

Wegmann ve ark. 1993'te yaptıkları çalışmada, Th2 sitokinlerinin Th1 yanıtını inhibe ettiği ve fetal yaşam ömrünü arttırdığı öne sürülmüş, 2007 ve 2010 'da yapılan çalışmalarda da bu hipotezin doğru olabileceği gösterilmiştir (83, 84, 85).

İnsanlarda yapılan çalışmalarla da hücrel immün yanıtın fetüse zararlı olduğu, başarılı bir gebeliğin Th2 artışına dayandığı gösterilmiştir. Sürekli spontan düşüğü olan kadınlarda yüksek oranda IFN-gama ve TNF-alfa tespit edilmiştir. Ayrıca gebelik sırasında lupus gibi humoral ilişkili otoimmün hastalıkların alevlendiği, romatoid poliartrit gibi hücre ilişkili olanlarınsa hafiflediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (9).

Sinsitiotrofoblastların ve sitotrofoblastların sitokin ürettiği ve Th1/Th2 dengesinde rol oynadığı bilinmektedir. Desidual hücreler ve uterusu boşalan lenf nodları da immün yanıtı baskılamaktadır (9).

2.8.4.8.Regülatör T hücreleri

Regülatör T hücreleri (Treg), T lenfositlerin alt grubudur (9). Bu hücreler otoimmüniteyi önlemede, allojenik organ greftlerine toleransta ve maternal-fetal immün toleransta rol alırlar (86, 87). Treg hücreleri iki ana alt gruba ayrılırlar: doğal Treg ve indüklenebilir Treg hücreleri. Doğal Treg hücreleri, timüste gelişir ve özgül olmadan görev yapar. İndüklenebilir Treg hücreleri veya CD8⁺, sitokin salınımı veya

dendritik hücelere antijen sunmada görevlidirler. Farelerde CD4⁺ Treg hücelerinin yabancı antijenlere özgül olmadığı ve yarı-allojenik gebeliklerle indüklendiği gösterilmiştir (88).

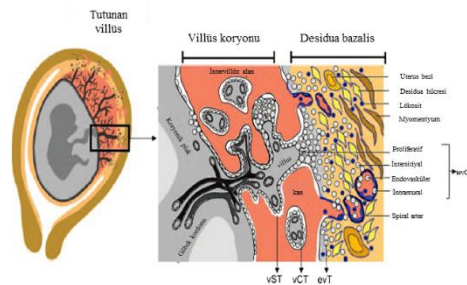
CD4⁺ regülatör T hüceleri 3'e ayrılır. Bunlar Tip 1 regülatör T hüceleri (Tr1), T-yardımcı 3 hüceleri ve CD4⁺CD25⁺ Treg hücelerdir. Her üçü de diğcr T hücelerinin çoğalmasını ve görevlerini yerine getirmelerini engeller (9).

Gebelik sırasında CD4⁺CD25⁺ Treg hücelerinde artış olduğu ve ikinci trimesterde pik yaptığı görülmüştür (74,77). Doğum sonrasında ise azalmıştır (78). Treg hücelerinin, paternal antijenler tarafından uyarılması, fetüsün rejeksiyondan korunması için gereklidir (20).

Treg hücelerinin tolerojenik etkisi nakillerde de gösterilmiştir. Doğadaki tolere edilmesi zorunlu tek transplant olayı gebeliktir. Dolayısıyla Treg hücelerinin özellikle fetal tolerans için evrildiği düşünülmektedir (7).

2.8.5. Maternal-fetal arayüzde transport

Koryonik villüs besin ve oksijeni fetal kana, atık ürünler ve karbondioksiti de maternal dolaşım taşır. synCT (sinsitiyotrofoblast) emici bir epiteldir ve taşımada önemli rol oynar. Metabolik olarak aktiftir ve oldukça fazla vakuol içerir. Bu vakuollerin çoğu plasental transferde görev alan aminoasitleri, düşük yoğunluktaki lipoproteinleri ve IgG içerir. synCT'nin yüzeyindeki mikrovilüsler villöz yüzey alanını arttırlar (Şekil 21) (89).

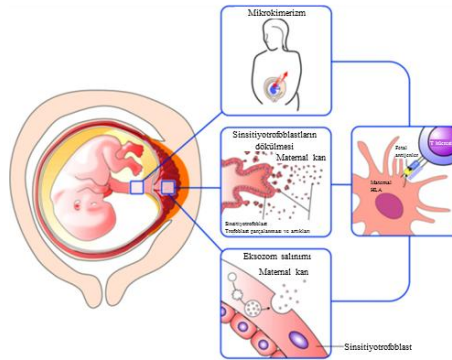


Şekil 21. Maternal-Fetal Arayüzün Şematik Gösterimi (John ve ark.2012'den modifiye edilmiştir.)

Fetüsa bu yolla geçen IgG grubu gama globülinler, difteri, çiçek, kabakulak gibi hastalıklara karşı pasif bir bağışıklık oluşturur (58). Böylece doğumdan sonra yeni doğan kendi immün sistemi gelişinceye kadar enfeksiyonlardan korunur (89).

Eritrosit antijenleri ile ilişkili olarak ortaya çıkan Rh uyuşmazlığı da önemlidir. Fetüsün Rh pozitif, annenin Rh negatif olduğu durumlarda, maternal dolaşıma geçen fetal eritrositlerin antijenlerine karşı annede oluşan antikorlar, daha sonra fetüsa dönerek bebeğin eritrositlerinin yıkılmasına yol açarlar. Fetal eritrositlerin yıkımı eritroblastozis fetalis veya fetüsün hemolitik hastalığı olarak bilinir ve fetüsün ölümüne yol açar (58).

Plasental transferde, pasif difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif transport ve pinositoz olmak üzere dört mekanizma tanımlanmıştır (65). Fetal materyal, sinsitiyotrofoblastlardan ayrılan mikropartiküllerin maternal periferel kana geçişi ile maternal dolaşıma karışır. Fetal hücreler (mikrokimerizm), fetal DNA ve apoptotik hücre kalıntıları da dolaşıma katılır (Şekil 22).



Şekil 22. Fetal Antijenlerin Maternal İmmün Sisteme Geçiş Modeli (Petroff 2005'ten modifiye edilmiştir.)

2.8.6. Anti-paternal antikorlar ve gebelik üzerindeki etkileri

Gebelik, maternal immün sisteme rağmen, yarı-allojenik fetal hücelere tolere edilmeye çalışılan fizyolojik bir durumdur (74). Paternal kökenli antijenlere karşı anne immünolojik olarak naif olsa da, gebelik sırasında tolerans göstermeyi öğrenir. Bu tolerans, uzun süreli veya geçici olabilmektedir, klinik olarak durumları çok net değildir (5). Fakat birçok araştırmacı, maternal immün sistemi aktif hale getiren plasental genlerin seçici baskılanması ile immün sistemi baskılayan genlerin aktif

hale gelmesinin maternal-fetal toleransın kilit noktası olduğunda hem fikirdir. Trofoblast hücrelerinin yüzeylerinde HLA-A ve HLA-B'nin ifade edilmemesi, maternal immün sistemin fetüsün yabancılığına tepkisiz kalmasına yol açtığı düşünülmektedir (74).

Antipaternal antikörler ilk olarak van Rood et al. ve Payne et al. tarafından 1958'de tanımlanmıştır. Bu antikörler sağlıklı kadınların 10-30% 'unun gebeliği sırasında görülmüş ve gebeliğin 28. haftasından sonra insidansının arttığı belirtilmiştir (5, 90, 91). Nadiren gebeliğin 28.haftasından önce belirlenmiştir (6).

Gebelikte paternal HLA antijenlerinin immunojenitesi annenin HLA antijenlerinden etkilenir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, paternal HLA'ya karşı antikörlerin indüksiyonu yabancı epitoplarla (paternal HLA antijenlerindeki antikörler için erişilebilir olan aminoasit sekans tripletleri) ilişkilidir. İmmünizasyondan aylar ve yıllar sonra belirlenebilir antikör miktarında azalma gözlenmekteyken, bu antijenlere özgül sitotoksik T lenfositlerin 10 yıldan fazla var olabildiği belirtilmiştir (5).

Gebelik komplikasyonlarında, HLA veya paternal antikörlerin hem varlığı hem de yokluğu tanımlanmıştır. Ayrıca, preeklemsi ve sürekli düşüklerde de paternal antikörlerin rolünün olduğu belirtilmektedir (5). Anti-paternal antikörlerin üretilmesindeki potansiyel faktörlerin plasentadan geçen fetal hücrelerin sayısı, çocuk ve anne arasındaki HLA uyumsuzlukları, anti-HLA antikörlerine karşı oluşturulan anti-idiotipik antikörlerin gelişimi veya daha önceki gebelikler olduğu belirtilmektedir (90).

Yapılan pek çok çalışmada, birden çok gebeliği olan kadınlarda allo-sensitizasyonun görüldüğü ve paternal HLA antijenlerine karşı gelişen antikörlerin varlığı tespit edilmişken, birkaç çalışmada paternal HLA antijenlerine özgül immün hücre aktivitesi belirlenmiştir (91). Daha önce yapılan çalışmalarda, paternal HLA antijenlerine özgü olarak gelişen IgG antikörlerinin, primer sitotoksik T lenfositlerle (CTLs) ilişkisi olduğu belirtilmiştir. CTL'lerin gebelikten sonra 10 yıl boyunca belirlendiği başka bir çalışmada belirtilmiştir (92).

Paternal antijenler, maternal immün sistemi, gebelik, cinsel ilişki veya paternal lökosit immünizasyonu gibi farklı yollarla uyarabilirler. Paternal antijenlere toleransın, birden fazla gebeliği olanlarda tek gebeliği olanlara göre daha fazla

olduğu belirlenmiştir. Bu durumun partnerinin spermiyle daha az karşılaşmasından dolayı ortaya çıkabileceği belirtilmiştir. Gebe kalmadan önce partnerinin spermi ile daha fazla karşılaşanlarda pre-eklempsi riskinin azaldığı belirtilmiştir (93).

Bazı transplant merkezlerinde, hamileliği olan kadınlara eşleriyle aynı HLA antijenlerine sahip donörlerden nakil yapılmamaktadır. Hamilelikten sadece humoral bileşenler değil, hücresel bileşenler de etkilenmektedir (91, 10). Günümüzde uygulanan farklı immünsupresif terapilerle bu durumun aşılması için çalışılmaktadır (94, 95, 96).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışma Grubu

Aralık 2013-Eylül 2015 tarihleri arasında İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'nde gebelik takibi yapılan 76 gönüllü gebe çalışmamıza dâhil edildi. 9 kişinin gebeliği düşükle sonlandığı, 26 kişi de çeşitli nedenlerle takiplerine gelmedikleri için çalışma grubundan çıkartıldı (n=35). Kontrollerine düzenli gelen 41 gebeden birinci (1-13 hafta), ikinci (14-26 hafta) ve üçüncü trimesterde (27-42 hafta) kan alınmış ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek serumları ayrılarak analize kadar -20°C'de saklandı. Analizden önce serumlar oda sıcaklığına getirildi ve 3500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra çalışıldı.

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Etik Kurul Komitesi'nin 19.09.2013 tarihli ve 135 nolu kararı ile çalışmanın etik kurul onayı alındı. Gebeler çalışma ile ilgili bilgilendirildi ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Formu imzalatıldı.

3.2.Materyal

Çalışmada gebelerden elde edilen serumların Luminex'e dayalı Panel Reaktif Antikor taraması ve tanımlanması yapıldı. Bu yöntemler için Lifecodes LifeScreen Deluxe (Immucor, Stanford, USA, LOT:3002119), Lifecodes Class I ID (Immucor, Stanford, USA, LOT: 3002047), Lifecodes Class II IDv2 (Immucor, Stanford, USA, LOT: 3002419) kitleri kullanıldı.

PRA Tarama Kit İçeriği (Lifecodes LifeScreen Deluxe)

Reajen	Miktar	Açıklama
Boncuk Karışımı	480 µl	HLA Sınıf I ve II glikoproteinlerinin tutturulduğu boncuklardan ve 4 kontrol boncuğundan oluşan karışım fosfat tamponunda süspanse halde bulunur.
Konsantre Konjugat	550 µl	Fikoeritrin ile işaretli keçiden elde edilen anti-human IgG'nin 10x stoğundan oluşur ve kullanmadan önce 1/10 oranında seyreltilmesi gerekmektedir.
Yıkama Tamponu	150ml	Kullanıma hazır fosfat taponundan oluşur.
Pozitif Kontrol Serum	80 µl	HLA antijenlerine karşı duyarlılaştığı bilinen bireylerden elde edilen serum karışımıdır.
Negatif Kontrol Serum	80 µl	HLA antijenlerine karşı antikor içermeyen bireylerden elde edilen serum karışımıdır.

PRA Tanımlama Sınıf I Kit İçeriği (Lifecodes Class I ID)

Reajen	Miktar	Açıklama
HLA Sınıf I Boncuk Karışımı	120 µl	Farklı bireylerden elde edilen HLA Sınıf I glikoproteinlerinin tutturulduğu boncuklardan ve 4 kontrol boncuğundan oluşan karışım, fosfat tamponunda süspanse halde bulunur.
Konsantre Konjugat	170 µl	Fikoeritrin ile işaretli keçiden elde edilen anti-human IgG'nin 10x stoğundan oluşur ve kullanmadan önce 1/10 oranında seyreltilmesi gerekmektedir.
Yıkama Tamponu	30 ml	Kullanıma hazır fosfat taponundan oluşur.
Pozitif Kontrol Serum	80 µl	HLA antijenlerine karşı duyarlılaştığı bilinen bireylerden elde edilen serum karışımıdır (>85% PRA).
Negatif Kontrol Serum	80 µl	HLA antijenlerine karşı antikor içermeyen bireylerden elde edilen serum karışımıdır (<10% PRA).

PRA Tanımlama Sınıf II Kit İÇeriği (Lifecodes Class II ID)

Reajen	Miktar	Açıklama
HLA Sınıf II Boncuk Karışımı	120 µl	Farklı bireylerden elde edilen HLA Sınıf II glikoproteinlerinin tutturulduğu boncuklardan ve 4 kontrol boncuğundan oluşan karışım, fosfat tamponunda süspanse halde bulunur.
Konsantre Konjugat	170 µl	Fikoeritrin ile işaretli keçiden elde edilen anti-human IgG'nin 10x stoğundan oluşur ve kullanmadan önce 1/10 oranında seyreltilmesi gerekmektedir.
Yıkama Tamponu	30 ml	Kullanıma hazır fosfat taponundan oluşur.
Pozitif Kontrol Serum	80 µl	HLA antijenlerine karşı duyarlılaştığı bilinen bireylerden elde edilen serum karışımıdır (>85% PRA).
Negatif Kontrol Serum	80 µl	HLA antijenlerine karşı antikor içermeyen bireylerden elde edilen serum karışımıdır (<10% PRA).

Test sonuçlarının analizi LUMINEX Fluoroanalyzer 200 cihazında, sonuçların değerlendirilmesi LIFECODES MATCH IT Antibody Software v1.2 veritabanı kullanılarak yapıldı.

Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Cihaz Adı	Marka-Model (Menşei)	Menşei
Fluoroanalyzer	Luminex 200	ABD
Buzdolabı	Indesit TIAA12	İtalya
Derin dondurucu	Vestel FT245B	Türkiye
Vorteks	Biosan V1	İtalya
Santrifüj	Hettich Rotina 46R	Almanya
Santrifüj	Hermle Z233	Almanya
Vakum cihazı	Millipore WP6122050	Almanya
Mikropipetler	Discovery	Güney Afrika

3.3. Metod

Luminex'e dayalı Panel Reaktif Antikor Tarama Yöntemi

Bu test için prosedür üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Test kitinin içeriğini HLA Sınıf I ve II boncukları, konsantre konjugat, yıkama tamponu, pozitif ve negatif kontrol serumları oluşturmaktadır. PRA test plağında kullanılmayan kuyuların üstü seal ile kapatılır. Kullanılacak olan kuyular 200µl distile su ile ıslatılır. 2-3 dakika beklendikten sonra plak vakumlanır. 40 µl Wash buffer, 12,5 µl oda sıcaklığına getirilen serum örneği ve 5 µl boncuk süspansiyonu kuyulara paylaştırılır. İlk kuyuya negatif kontrol serumu, ikinci kuyuya pozitif kontrol serumu eklenir. 30 dakika rotatorda 200 devir/dk karanlıkta inkübe edilir. Her kuyuya 100µl wash buffer konarak hafifçe karıştırılır ve vakumlanır. Her kuyuya 250 wash buffer eklenerek vakumlanır ve bu işlem 3 kere tekrarlanır. Konjugat 1/10 oranında seyreltilerek kullanıldığı için, kuyu başına 5 µl konjugat/45 µl wash buffer olacak şekilde hesaplanır ve her kuyuya paylaştırılır. 30 dakika rotatorda 200 devir/dk karanlıkta inkübe edilir. İnkübasyonun ardından 150 µl wash buffer tüm kuyulara eklenir ve luminex cihazına plak yüklenir.

Sonuçların Analizi

Bir örneğin pozitif veya negatif olarak değerlendirilmesi için her bir boncuğun sinyal yoğunluğu (Ortalama Floresans Yoğunluğu = MFI) üç farklı kontrol boncuklarının (KON) sinyal yoğunluğu ile karşılaştırılır. Boncuk karışımındaki her bir boncuk için 3 farklı oran bulunur. Arka plan düzenleme faktörü (BAF) boncuk/KON oranından çıkartılarak, her boncuk/KON oranı için düzenlenmiş oran (adjusted ratio) bulunur (Şekil 23). BAF değeri, her lot için önceden belirlenmiştir ve yöntemdeki arka planın kompenzasyonu için kullanılır. HLA sınıf I için 7 sınıf I boncuğundan biri, sınıf II için 5 boncuktan biri pozitifse sonuç pozitifdir.

$$\frac{\text{Boncuk MFI değeri}}{\text{Negatif Kontrol Boncuğu 1}} - \text{BAF} = \text{Düzenlenmiş oran 1}$$

$$\frac{\text{Boncuk MFI değeri}}{\text{Negatif Kontrol Boncuğu 2}} - \text{BAF} = \text{Düzenlenmiş oran 2}$$

$$\frac{\text{Boncuk MFI değeri}}{\text{Negatif Kontrol Boncuğu 3}} - \text{BAF} = \text{Düzenlenmiş oran 3}$$

şekil 23. Düzenlenmiş oranların hesaplanması

Luminex'e dayalı Panel Reaktif Antikor Tanımlama Yöntemi

Bu yöntem PRA Tarama sonucu pozitif çıkan serum örneklerindeki anti-HLA antikorlarının tanımlanması için kullanılmıştır. Yöntemin basamakları PRA Tarama yöntemi ile aynıdır. Bu yöntemde sınıf I ve sınıf II için ayrı HLA boncuk karışımları bulunmaktadır. Her bir boncuk üzerinde tek bir donörden elde edilen antijenler bulunmaktadır.

Sonuçların Analizi

PRA Tanımlama yönteminde dördüncü bir negatif kontrol hesaplaması ise hesaplanmış kontrol olarak adlandırılır ve bu değer reaksiyon göstermeyen antijen-içeren boncuklara dayanır.

$$\frac{\text{Boncuk MFI değeri}}{\text{Hesaplanmış KON}} - \text{BAF} = \text{Düzenlenmiş oran 4}$$

şekil 24. Düzenlenmiş oran 4'ün hesaplanması

Düzenlenmiş oranlardan iki veya daha fazlasının pozitif olarak değerlendirilmesi, o boncuğun pozitif reaksiyon gösterdiğini belirtmektedir. Düzenlenmiş oranlardan üç veya daha fazlası negatif olarak sonuç veriyorsa, o boncuğun negatif reaksiyon gösterdiğini belirtir.

Tanımlama testinde %PRA değerleri aşağıdaki gibi hesaplanır.

Sınıf I

$$\%PRA = \frac{\text{Pozitif reaksiyon veren boncuk sayısı}}{\text{Kontrol boncukları dışındaki yöntemdeki tüm boncukların sayısı}} \times 100$$

Sınıf II

$$\%PRA = \frac{(\text{Pozitif reaksiyon veren DR boncuklarının sayısı}) + (\text{pozitif reaksiyon veren DQ, negatif reaksiyon veren DR antijeni içeren boncuk sayısı})}{\text{DR antijeni içeren tüm boncukların sayılarının toplamı}} \times 100$$

Şekil 25. Yüzde PRA oranlarının hesaplanması

3.4.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Microsoft Windows uyumlu Statistical Package for Social Sciences Version 21.0 (SPSS 21.0 Inc, Chicago, USA) kullanılarak, Pearson Ki-kare testi ile yapıldı ve $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4 BULGULAR

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Polikliniğine başvuran gebelerin birinci, ikinci ve üçüncü trimesterda kanları alınıp serumları elde edildi. Her bir gebe için bir bilgi formu düzenlendi ve tüm bilgileri kaydedildi. Çalışma grubunun demografik bilgileri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışma grubunun demografik özellikleri

Hasta Kodu	D. tarihi	Kan Grubu	Akrabalık	Doğum şekli	Önceki doğumları	Rh Uyuşmazlığı	Sigara/Alkol Kullanımı
GYT8	1991	BRh+	-	N	İD	-	-
GYT10	1987	ARh-	-	N	İD	-	-
GYT12	1993	ORh+	-	N	İD	-	-
GYT21	1989	ORh-	-	S	İD	-	-
GYT24	1985	BRh+	-	S	İD	-	-
GYT25	1980	BRh+	-	N	N	-	-
GYT29	1972	ARh+	-	S	S	-	-
GYT34	1970	ABRh+	-	N	N	-	-
GYT35	1989	ARh+	+	S	S	-	-
GYT36	1990	ARh-	+	N	N	-	-
GYT38	1971	ARh+	-	S	N	-	-
GYT41	1991	BRh+	+	N	N	-	-
GYT42	1976	ABRh+	-	S	N	-	-
GYT48	1977	BRh+	-	S	1S-1N	-	-
GYT52	1994	ARh+	-	N	İD	-	-
GYT54	1988	ARh+	-	N	İD	-	+
GYT56	1994	ABRh+	-	N	N	-	-
GYT58	1983	ABRh+	-	N	N	-	-
GYT59	1982	ARh-	-	S	S	-	-
GYT62	1992	ARh-	+	N	N	-	-
GYT73	1987	ORh+	-	N	N	-	-
GYT74	1983	ARh+	-	S	S	-	-
GYT16	1987	ORh+	-	N	İD	-	-
GYT17	1988	BRh+	-	N	İD	-	-
GYT18	1986	ORh+	-	N	İD	-	-
GYT19	1996	BRh+	-	S	İD	-	-
GYT20	1991	ORh+	-	S	İD	-	-
GYT22	1980	ARh+	-	N	İD	-	-
GYT23	1971	ARh+	-	S	İD	-	-
GYT26	1987	ARh+	-	S	S	-	-
GYT27	1985	ABRh+	-	S	S	-	-
GYT28	1978	ORh+	-	S	İD	-	-
GYT30	1974	BRh+	-	S	N	-	-

N, Normal doğum; S, Sezeryan; İD, ilk doğum.

Tablo 1. Çalışma grubunun demografik özellikleri (devam)

Hasta Kodu	D. tarihi	Kan Grubu	Akrabalık	Doğum şekli	Önceki doğumları	Rh Uyuşmazlığı	Sigara/Alkol Kullanımı
GYT31	1974	ORh+	-	N	N	-	-
GYT51	1986	ORh+	-	S	S	-	-
GYT53	1991	ARh+	-	N	İD	-	-
GYT55	1985	ARh+	-	S	S	-	-
GYT57	1986	ARh+	-	S	N	-	-
GYT60	1994	ORh+	-	N	N	-	-
GYT61	1991	BRh+	-	S	İD	-	-
GYT63	1996	ARh+	-	N	N	-	-

N, Normal doğum; S, Sezeryan; İD, ilk doğum.

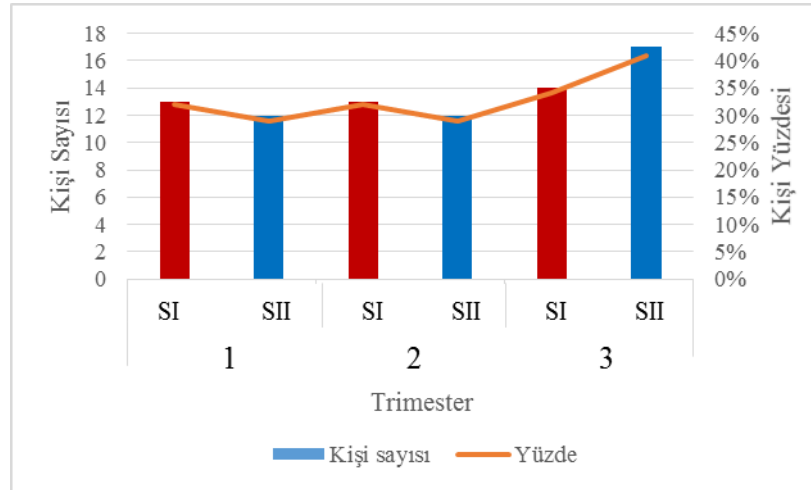
Çalışma grubunun %29,3'ünün daha önce bir gebelik öyküsü (düşük, kürtaj, doğum) yokken, %70,7'sinin gebelik öyküsü bulunmaktadır. %34'ünün 2. gebeliği (n=14), %17'sinin 3. gebeliği (n=7), %10'unun 4. gebeliği (n=4), %2'sinin 5. gebeliği (n=1), %7'sinin 6. gebeliğidir (n=3) (Tablo 2). Gebelerin %24,4'nün düşük (n=10), %7,3'ünün kürtaj (n=3), %58,5'inin doğum öyküsü bulunmaktadır. %31,7 kişinin 1, %17,1 kişinin 2 (n=7), %9,7'nin 3 veya daha fazla doğum öyküsü vardır (n=4) (Tablo 2).

Çalışma grubunu oluşturan 41 kişinin birinci, ikinci ve üçüncü trimester serumlarında anti-HLA antikorları tarandı. Buna göre I ve II. trimesterde elde edilen serumlarda benzer oranda HLA Sınıf I (%32) ve sınıf II (%29) antijenlerine karşı anti-HLA antikorları saptanırken, III. trimesterde tespit edilen anti-HLA antikor yüzdelерinin arttığı gözlemlendi (SI %34, SII %41). Bu artış hem kişi sayısı hem de yüzde oranları olarak Şekil 26'da gösterildi.

Tablo 2. Çalışma grubunun gebelik, düşük, kürtaj ve doğum sayıları

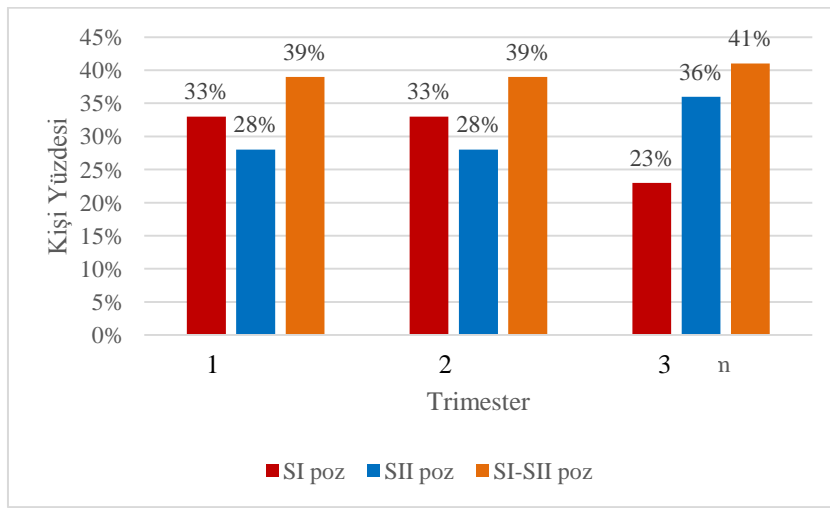
	Gebelik Sayısı*					Toplam	Düşük Sayısı		Toplam	Kürtaj Sayısı		Toplam	Doğum Sayısı					Toplam		
	0	1	2	3	4		5	1		2	1		2	0	1	2	3		4	5
Kişi sayısı n (%)	12 (29,3)	14 (34,1)	7 (17,1)	4 (9,8)	1 (2,4)	3 (7,3)	41 (100)	7 (17,1)	3 (7,3)	10 (24,4)	2 (4,9)	1 (2,4)	3 (7,3)	17 (41,5)	13 (31,7)	7 (17,1)	2 (4,9)	1 (2,4)	1 (2,4)	41 (100)

*Mevcut gebelikleri dahil değildir



Şekil 26. Trimesterlere göre PRA Sınıf I-Sınıf II pozitiflikleri

Sadece Sınıf I HLA antijenlerine, sadece Sınıf II HLA antijenlerine ve hem Sınıf I hem de Sınıf II HLA antijenlerine karşı oluşmalarına göre anti-HLA antikörleri 3 grup altında incelendi ve elde edilen veriler Şekil 27’de gösterildi. 1. ve 2. trimesterlerde elde edilen serumlarda Sınıf I anti-HLA antikörleri (%33), sınıf II ‘ye karşı oluşan antikörlerden (%28) daha fazla oranda tespit edilmiştir. Üçüncü trimesterde sınıf II HLA antijenlerine karşı geliştirilen antikör oranının arttığı (%36), sadece sınıf I pozitifliği olan bir kişinin de hem sınıf I hem sınıf II HLA antijenlerine karşı antikör geliştirdiği tespit edildi.

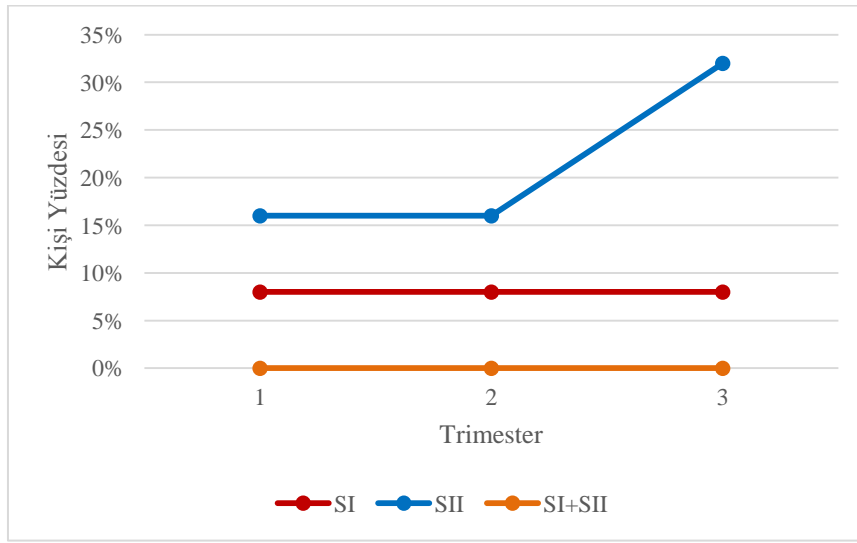


Şekil 27. Trimesterlere göre anti-HLA antikör tarama testi sonuçlarının pozitiflik oranları

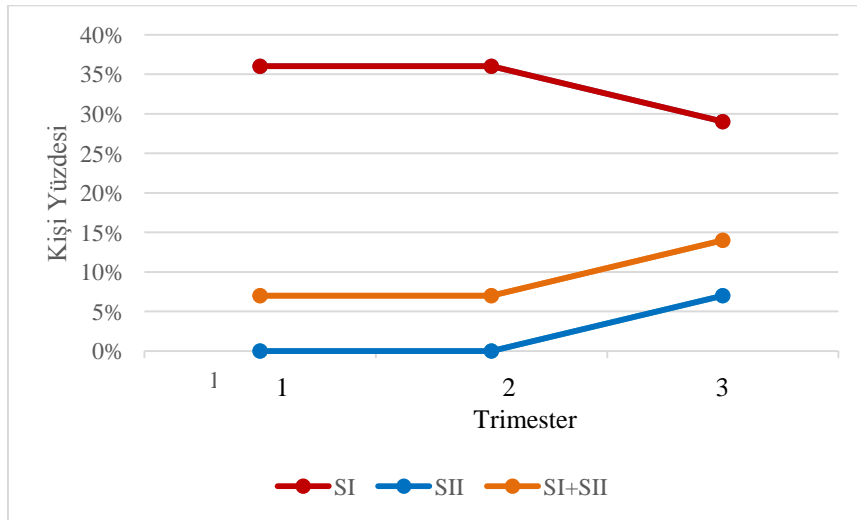
PRA pozitiflik yüzdeleri gebelik sayılarına göre incelendi. Buna göre çalışma grubu 1. Gebeliği olanlar Grup 1, 2. Gebeliği olanlar Grup 2, 3 ve daha fazla gebeliği olanlar da Grup 3 olmak üzere 3 gruba ayrıldı ve sonuçlar Tablo 3’de gösterildi. Grup 1’de sınıf II antikör oranı daha fazlayken (1.ve 2.trimesterde %16, 3.trimesterde %32), Grup 2’de sınıf II anti-HLA antikörlerinin 3. trimesterde (27. Haftadan sonra) oluşmaya başladığı tespit edildi (%7). Grup 3’te ise sadece sınıf I HLA antijenlerine karşı oluşan anti-HLA antikörleri gözlemlendi, hem sınıf I hem de sınıf II antijenlerine karşı oluşan antikör seviyesi ise diğer gruplara göre daha fazlaydı (1.ve 2.trimesterde %40, 3.Trimesterde %47). Bu artış Tablo3, Şekil 28a, Şekil 28b ve Şekil 28c’ de gösterildi.

Tablo 3. Gebelik Sayısına göre PRA pozitiflik yüzdeleri

	Grup 1 (n=12)			Grup 2 (n=14)			Grup 3 (n=15)		
Trimester/ PRA poz.	SI	SII	SI+SII	SI	SII	SI+SII	SI	SII	SI+SII
1.trimester	8%	16%	0	36%	0	7%	0	20%	40%
2.trimester	8%	16%	0	36%	0	7%	0	20%	40%
3.trimester	8%	32%	0	29%	7%	14%	0	20%	47%



Şekil 28a. Grup 1'in Gebelik Sayısına göre PRA pozitiflik yüzdeleri



Şekil 28b. Grup 2'nin gebelik sayısına göre PRA pozitiflik yüzdeleri



Şekil 28c. Grup 3'ün gebelik sayısına göre PRA pozitiflik yüzdeleri

PRA Tarama testi pozitif çıkan gebelerin serumları, anti-HLA antikorlarını tanımlayabilmek için PRA Tanımlama Testi ile analiz edildi. Toplamda 22 hastanın tanımlama testi yapıldı ve 1 kişinin tanımlama sonucu negatif olarak bulundu. 21 hastanın tanımlama test sonucunun hesaplanmasında kullanılan Kontrol1 (CON1), kontrol 2 (CON2), kontrol 3(CON3) ve hesaplanmış kontrolün (CalCON) ortalama floresans yoğunluk (MFI) değerleri Tablo 4 'te gösterildi. Yine hesaplamalar sonucunda elde edilen anti-HLA antikor tipleri ve bunların MFI değerleri, doğru pozitif (DP), yanlış pozitif (YP), doğru negatif (DN), yanlış negatif (YN) değerleri de Tablo 4'te gösterildi. ≥ 500 MFI değerine sahip antijenler PRA pozitif olarak değerlendirildi. İki hasta sınıf I anti-HLA antikoru açısından yüksek oranda sensitize (YOS) olarak değerlendirildi. Bazı antijenlerin çapraz reaktivlik gösteren grupları (CREG) da analiz sonuçlarına eklendi ve "+CREG" olarak belirtildi.

Tablo 4. PRA Tanımlama Kontrol ve Örnek MFI Değerleri

Hasta kodu	KON1 MFI	KON 2 MFI	KON 3 MFI	Hes. KON MFI	Antikor Tipi	DP	DN	YP	YN	N	MFI
GYT8	84	81	190	94	DQ4	3	29	10	0	42	822
GYT10	37	60	50	116	DR4	10	21	11	0	42	5831
					DQ8	3	21	6	0	29	4421
					DR7(DQ2)	2	21	4	0	27	3993
GYT12	60	86	117	81	A6602	1	31	2	0	34	9141
GYT21	43	22	112	60	DQ8	1	28	2	1	32	3290
					DQ7	1	27	1	1	30	748
GYT24	43	60	283	117	DR1	1	9	3	0	13	912
					DQ5	2	10	13	0	25	1000
					DQ7	1	9	5	0	15	964
GYT29	3707	248	695	188	A11	5	34	11	0	50	3182
	541	57	497	117	DR4	4	38	0	0	42	7269
GYT25	94	135	169	119	DQ2	2	38	2	0	42	2232
GYT34	78	76	95	99	DR4	6	28	4	1	42	10991
					DQ8	2	28	2	0	32	6172
	360	246	141	217	A2+CREG (A30,A80)	9	17	24	0	50	3748
					A3+CREG (A33,A29)	7	17	0	0	41	3419
GYT35	2069	834	1440	669	A2	9	24	17	0	50	9381
					A68	7	24	10	0	41	7230
					B57	1	21	0	0	22	6002
	361	130	725	133	DR7	3	33	6	0	42	6607
					DQ2	2	33	1	0	36	6170

KON, Kontrol; Hes.KON, hesaplanmış kontrol değeri; DP, doğru pozitif; YP, yanlış pozitif; DN,doğru negatif; YN, yanlış negatif; N, sayı; MFI, ortalama floresans yoğunluğu (mean fluorescence intensity); CREG, çapraz reaktif grup (cross reactive group)

Tablo 4. PRA Tanımlama Kontrol ve Örnek MFI Değerleri (devamı)

Hasta kodu	KON1 MFI	KON 2 MFI	KON 3 MFI	Hes. KON MFI	Antikor Tipi	DP	DN	YP	YN	N	MFI
GYT36	454	675	211	461	A2+CREG (A68,B17)	9	27	14	0	50	10313
	165	223	180	379	DR11	18	17	7	0	42	11442
					DR18	18	17	0	0	42	13329
					DR7	1	16	1	0	18	8456
					DR9	1	16	2	0	19	10090
GYT38	715	386	737	338	B18	2	4	0	0	6	5320
	468	154	820	184	DR13	3	12	0	0	15	4923
					DR52	16	17	7	2	42	3795
					DQ6	2	17	5	0	24	1766
GYT41	266	100	181	159	DR11	6	19	0	0	25	5328
					DR13	7	19	0	0	26	4553
					DR7	1	19	1	0	21	3263
					DQ2	2	19	3	0	24	4138
GYT42	228	68	182	107	DR7	6	0	0	0	6	10728
					DR9	6	0	0	0	6	4235
					DQ2	8	1	0	0	9	5272
					DQ9	2	11	3	1	17	3996
GYT48	1356	390	139	207	A23	5	36	1	0	42	2303
					A24	7	36	6	1	50	1500
	279	229	151	256	DR1	1	13	1	0	15	7520
					DR15	5	13	0	0	18	13825
					DQ6	2	13	3	0	18	11649
				DQ5	1	13	0	0	14	6977	

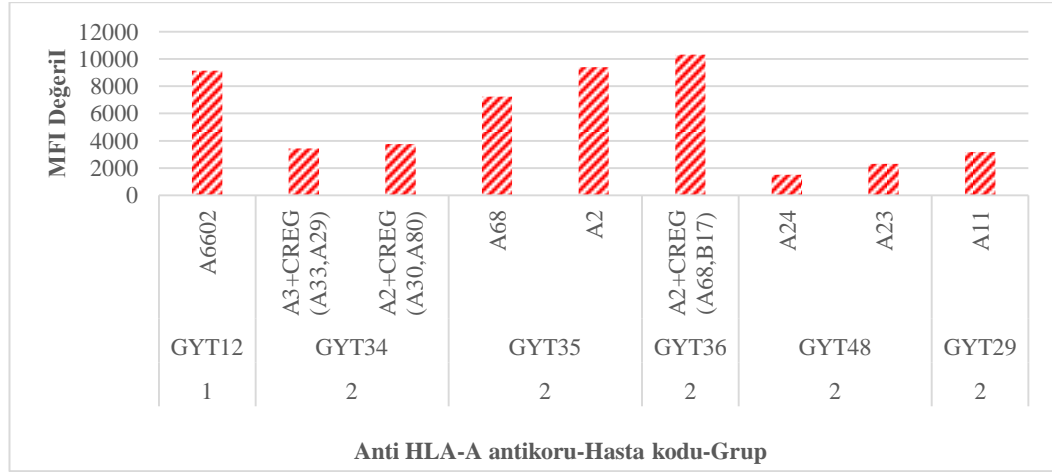
KON, Kontrol; Hes.KON, hesaplanmış kontrol değeri; DP, doğru pozitif; YP, yanlış pozitif, DN,doğru negatif, YN, yanlış negatif; N, sayı; MFI, ortalama floresans yoğunluğu (mean fluorescence intense); CREG, çapraz reaktif grup (cross reactive group)

Tablo 4. PRA Tanımlama Kontrol ve Örnek MFI Değerleri (devamı)

Hasta kodu	KON1 MFI	KON 2 MFI	KON 3 MFI	Hes. KON MFI	Antikor Tipi	DP	DN	YP	YN	N	MFI
GYT52	143	1274	362	962	CI YOS						
GYT56	334	104	65	125	A30	8	16	26	0	50	1256
					B35	6	4	0	1	11	3481
GYT58	360	449	105	1221	B8+CREG	4	1	0	0	5	18505
					B7+CREG	9	1	0	0	10	11154
					Cw7	23	1	26	0	50	13048
	100	109	131	177	DR11	4	25	13	0	42	3668
					DR14	3	25	10	0	38	3157
					DQ5	7	21	7	0	35	3215
GYT59	622	138	86	156	A2+CREGS	9	22	19	0	50	4337
					A68	7	22	12	0	41	3465
GYT62	605	1988	522	8802	CI YOS						
	225	183	477	294	DR13	5	21	16	0	42	3297
					DQ6	2	21	8	0	31	4837
GYT73	736	915	181	297	B7+CREG	8	28	14	0	50	6176
GYT74	537	299	174	244	A2+CREG	9	28	13	0	50	5206
					B44	2	28	4	0	34	5278

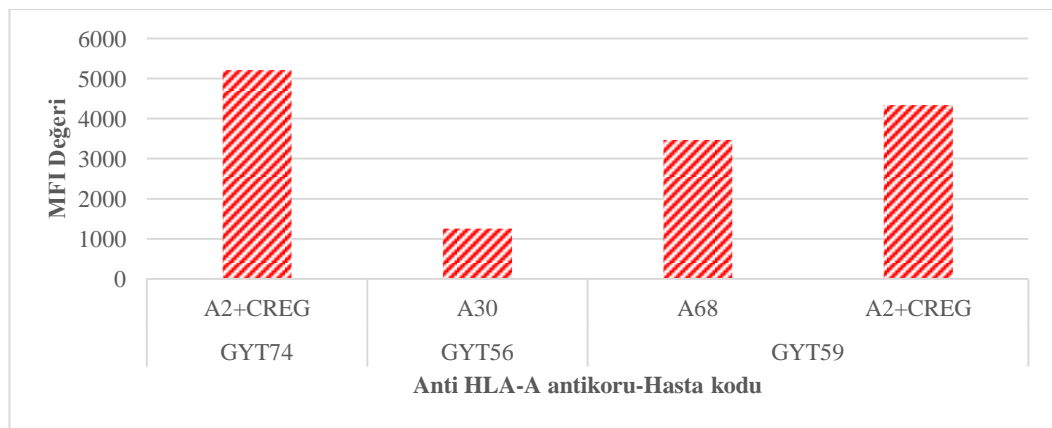
KON, Kontrol; Hes.KON, hesaplanmış kontrol değeri; DP, doğru pozitif; YP, yanlış pozitif; DN,doğru negatif, YN, yanlış negatif; N, sayı; MFI, ortalama floresans yoğunluğu (mean fluorescence intensity); CREG, çapraz reaktif grup (cross reactive group)

Tanımlanan anti-HLA antikoru gebelik sayılarına göre değerlendirildi ve HLA-A, HLA-B, HLA-DR ve HLA-DQ antijenlerine karşı oluşan antikoru ayrı şekillerde gösterildi. Birinci ve ikinci gebeliği olan kişilerde en fazla anti-HLA-A2 antikoru tespit edildi (n=3). Bu antikoru en yüksek MFI değerine sahip olduğu belirlendi (MFI >10000) (Şekil 29).



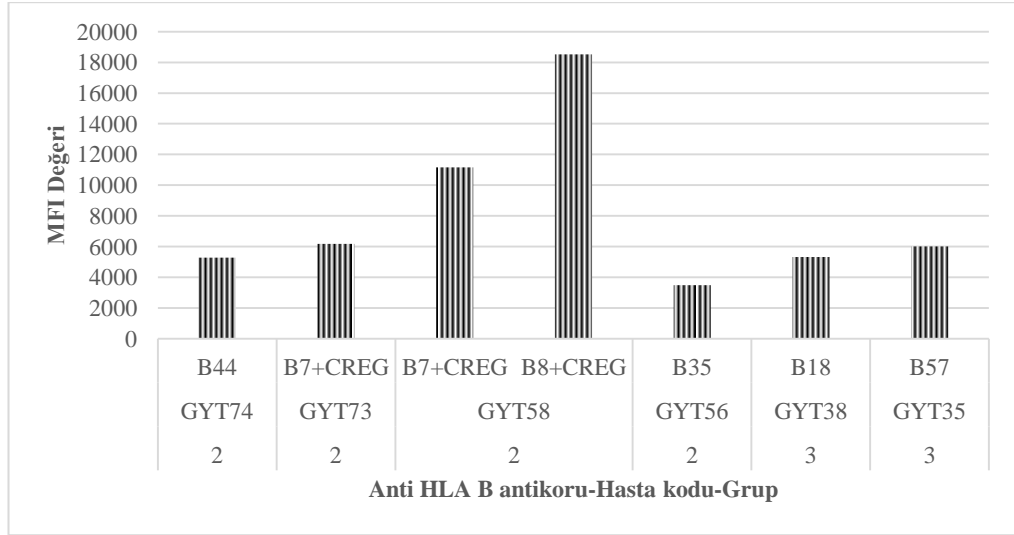
Şekil 29. Grup 1 ve 2'de tanımlanan anti HLA-A antikoru MFI değerleri

Grup 3'ün A lokusu tanımlama sonuçları Şekil 30'da gösterilmiştir. En yüksek MFI değerine sahip olan anti-HLA antikoru Grup 1 ve 2'deki gibi A2 antijenine karşı oluşturulandı (MFI > 5000).



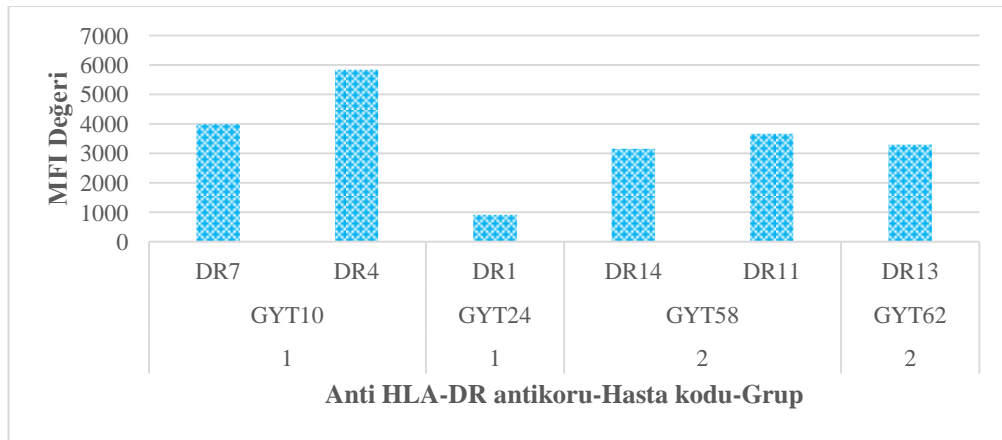
Şekil 30. Grup 3'te tanımlanan anti HLA-A antikoru MFI değerleri

Grup 1’de HLA-B lokusuna karşı geliştirilen HLA antikoruna rastlanmadı. Grup 2 ve 3 ‘te tanımlanan anti-HLA B antikorları ve MFI değerleri Şekil 31’de gösterildi. İkinci gebeliği olan kişilerde en fazla anti HLA-B7 antikoruna tespit edildi, MFI değeri en yüksek antikorun ise anti-HLA-B8 antikoruna olduğu gözlemlendi(MFI>18000).



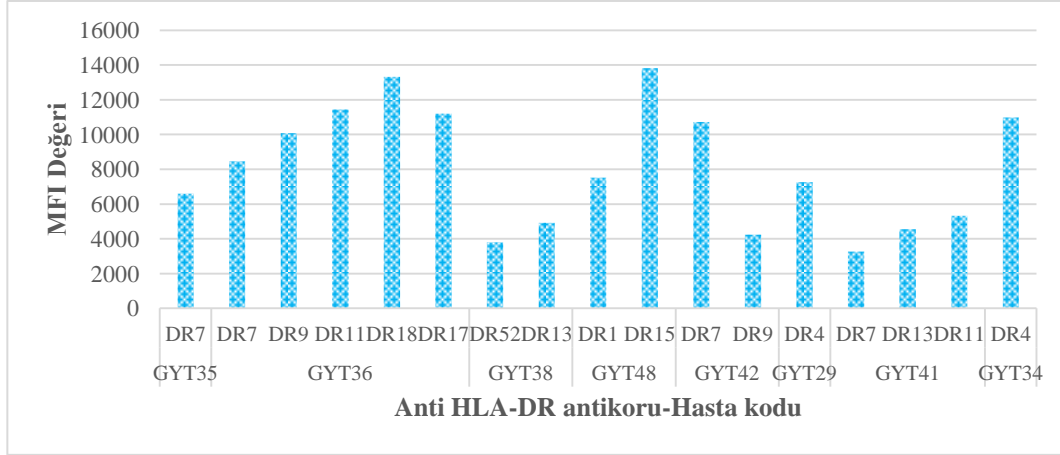
Şekil 31. Grup 2 ve 3’te tanımlanan anti HLA-B antikorları MFI değerleri

Grup 1 ve 2’de tanımlanan anti-HLA-DR antikorları tipleri Şekil 32’de gösterildi. En yüksek MFI değerine sahip antikorun anti-HLA DR4 antikoruna olduğu belirlendi(MFI>5000) (Şekil 32).



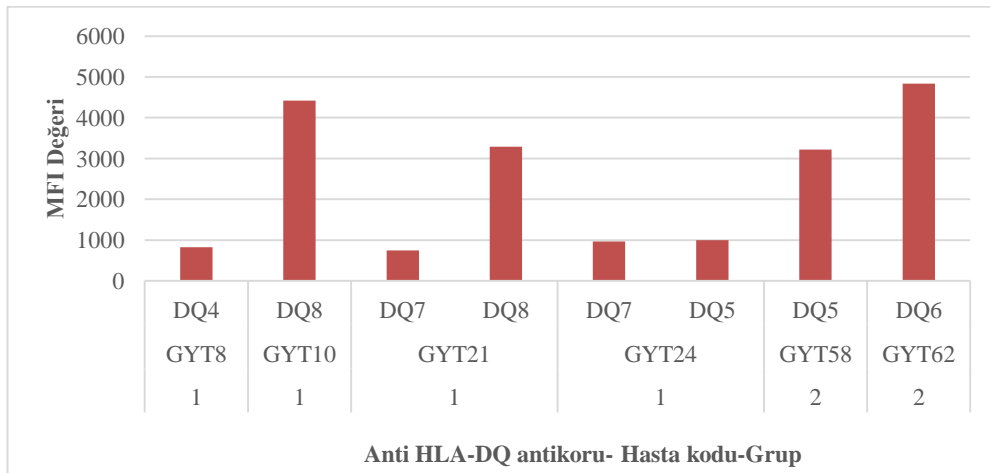
Şekil 32. Grup 1 ve 2’de tanımlanan anti HLA-DR antikorları MFI değerleri

Grup 3'te tanımlanan anti-HLA DR antikor tipleri Şekil 33'de gösterildi. Buna göre en fazla MFI değerine sahip olan anti-HLA antikorları DR15 ve DR18 'dir (MFI>12000). Bu iki antikoru DR 11 ve DR 17 izlemektedir (MFI>10000) (Şekil 33).



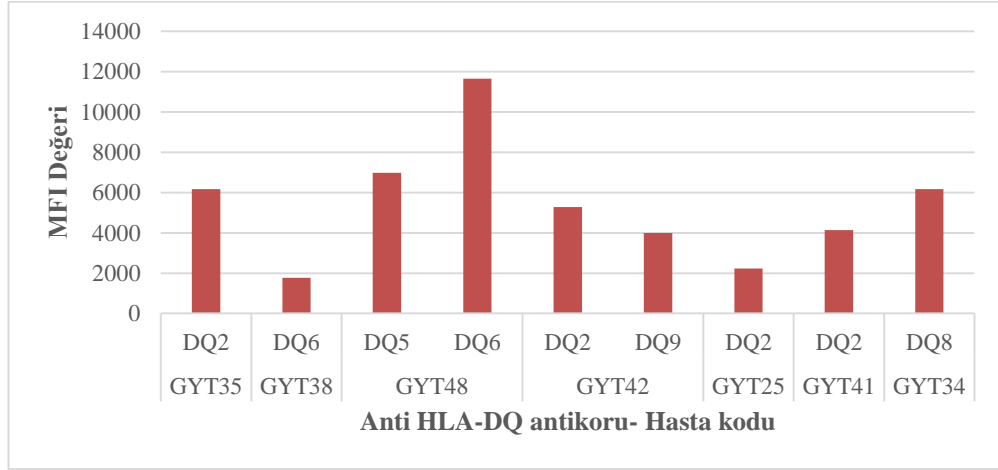
Şekil 33. Grup 3'te tanımlanan anti HLA-DR antikorları MFI değerleri

Grup 1 ve 2'de tanımlanan anti HLA-DQ antikorlarının MFI değerleri Şekil 34'de gösterilmiştir. Buna göre en yüksek MFI değerine sahip olan antikor anti HLA-DQ6. (MFI>4000) ve en sık görülen antikor tiplerinin ise DQ5, DQ7 ve DQ8 (n=2) olduğu bulundu (Şekil 34).



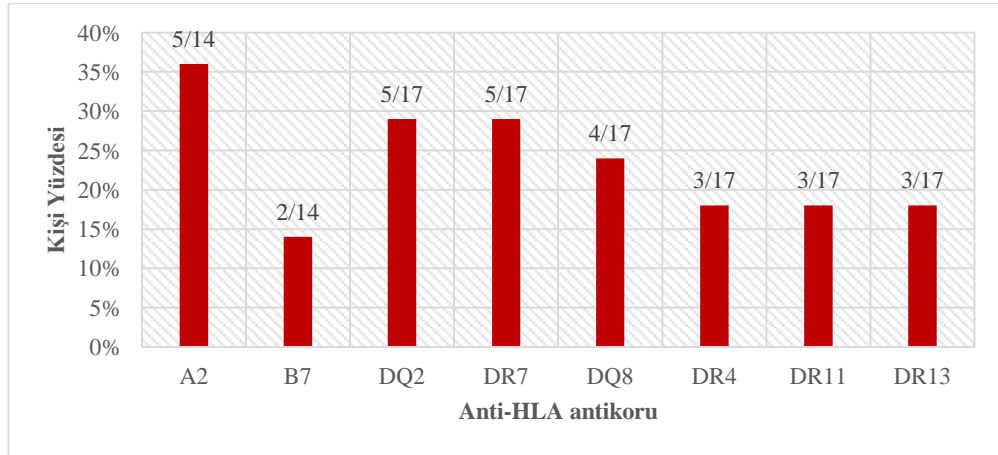
Şekil 34. Grup 1 ve 2'de tanımlanan anti HLA-DQ antikorları MFI değerleri

Grup 3'te tanımlanan anti HLA-DQ antikorlarının MFI değerleri Şekil 35'te gösterildi. HLA-DQ6 'nın en yüksek MFI değerine sahip olduğu ve DQ2'nin de en fazla tanımlanan antikor olarak bulundu (n=4).



Şekil 35. Grup 3'te tanımlanan anti HLA-DQ antikorları MFI değerleri

Tanımlanan tüm HLA antikorlarına göre en sık rastlanan anti HLA antikorları tipleri Şekil 36'da gösterildi.



Şekil 36. PRA tanımlama yöntemi ile en fazla tespit edilen anti-HLA antikorları

Sınıf I, Sınıf II ve hem Sınıf I hem de Sınıf II PRA Tarama sonucu pozitif olarak değerlendirilen kişiler PRA pozitif olarak kabul edildi ve gebelik öyküsü, doğum öyküsü, düşük öyküsü ve kürtaj öyküsü arasındaki ilişki Pearson ki-kare testi

ile istatistiksel olarak analiz edildi. Ayrıca Phi katsayısı hesaplanarak elde edilen veriler Tablo 5'te gösterildi. PRA pozitifliği ile gebelik, düşük, kürtaj ve doğum öyküleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur.

Tablo5. PRA Pozitiflik oranlarının istatistiksel olarak gösterilmesi

	GEB.	p	Φ	DOĞ.	p	Φ	DÜŞ.	p	Φ	KÜR.	p	Φ
	Ö.			Ö.			Ö.			Ö.		
	(n=29)			(n=24)			(n=10)			(n=3)		
PRA	%77,3	>.05	0,155	%68,2	>.05	0,211	%18,2	>.05	-	%18,2	>.05	0,261
POZ									0,156			

PRA POZ, PRA pozitif olarak değerlendirilen kişi oranı; GEB.Ö., Gebelik Öyküsü; DOĞ. Ö., Doğum Öyküsü; DÜŞ. Öp. Düşük Öyküsü; KÜR.Ö., Kürtaj Öyküsü; p değeri <0,05'ten küçükse istatistiksel olarak anlamlıdır; Φ, phi değeri 1'e yaklaştıkça örnek sayısının istatistiksel olarak yeterli düzeyde olduğunu gösterir

Kan grupları ile PRA pozitifliği arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Tablo 6).

Tablo 6. Kan grupları ile PRA pozitifliği arasındaki istatistiksel ilişkinin gösterimi

	KAN GRUBU						p	Φ
	0Rh-	0Rh+	AB Rh+	A Rh-	A Rh+	B Rh+		
	(n=1)	(n=9)	(n=5)	(n=4)	(n=13)	(n=9)		
PRA	4,50%	9,10%	18,20%	18,20%	27,30%	22,70%	>.05	0,484
POZ								

PRA POZ, PRA pozitif olarak değerlendirilen kişi oranı; p değeri <0,05'ten küçükse istatistiksel olarak anlamlıdır; Φ, phi değeri 1'e yaklaştıkça örnek sayısının istatistiksel olarak yeterli düzeyde olduğunu gösterir

Doğum tipi, akrabalık ve PRA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Tablo 7).

5 TARTIŞMA

Dolaşımında bulunan anti-HLA antikorları, hiperakut, akut ve kronik redlere, dolayısıyla da organ nakillerinde başarısız sonuçlara sebep olabilmektedirler (97). Anti HLA antikorlarını baskılayabilmek için çeşitli yöntemler olsa da her zaman başarılı olunamamaktadır. Dolayısıyla organ bekleme listesindeki hastalarda herhangi bir nedenle oluşmuş anti-HLA antikorlarının varlığı problem yaratmaktadır. Önceden yapılan doku veya organ nakli, kan nakilleri ve gebelik anti-HLA antikoru oluşumuna sebep olmaktadır (98).

Nakil bekleme listesindeki kadınlarda, gebelik esnasında, fetüsün ifade ettiği paternal HLA antijenlerine karşı oluşturulan antikorların sorun teşkil ettiği ve nakil şanslarını azalttığı bilinmektedir. Ayrıca anti-paternal antikorlar, babaların, anne için donör olma potansiyelini de azaltmaktadır. Bu sebeple bazı transplant merkezleri, gebelik öyküsü olan kadınlara, eşleriyle aynı HLA antijenlerine sahip donörlerden bile nakil yapmamaktadır (91).

Gebelikteki uterus ve oluşan plasenta, 135 yıl önce Van Dooremaal tarafından, köpek gözünün anterioründe, fare deri greftinin canlı kalabildiğini gözlemlemesinden beri, immünolojik olarak ayrıcalıklı bölgeler olarak tanımlanmışlardır (9). Dolayısıyla başarılı bir gebelik sürecinde, yarı paternal yarı maternal antijenleri taşıyan fetüs, annenin immün sistemi tarafından reddedilmemektedir (7). Trofoblastların klasik olmayan MHC moleküllerini ifade etmesi, triptofan katabolizması, T hücre apoptozisi, kompleman sistemi ve programlanmış hücre ölümü gibi pek çok farklı mekanizma ile fetüs maternal immün sistemden korunmaktadır (78).

Gebeliğin ilk trimesterında, maternal fetal hücrelerin etkileşimi desidua, doğal öldürücü hücreler, T hücreleri ve antijen sunan hücrelerle sınırlıdır. 2.trimesterin başında maternal kan, intervillöz arayıze sızmaya başlar. Trofoblastlar da, plasental villüslardan maternal kana sızar ve maternal kanda fetal hücreler tespit edilmeye başlanır. Bu durum, ikinci trimesterde fetal hücrelerle maternal doku arasındaki lokal

etkileşimin, tüm vücuda yayıldığı anlamına gelmektedir (7). Bu hücrelerden herhangi biri, antijen sunan hücrelerce tanınan antijenlerin kaynağını oluşturabilir (74, 99).

Sağlıklı gebeliklerde, paternal kökenli fetal antijenlere tolere edilir ve fetüs herhangi bir immünolojik redle karşılaşmaz (7). Fakat gebeliğin sorunsuz ilerlemesi annenin duyarlılaşmadığı anlamına gelmemektedir. Anne ile fetüs arasındaki özellikle ikinci trimesterden sonra hızlanan hücre trafiği, fetö-maternal arayüzdeki kanamalar ve doğumdan sonra uterus boşluğunun temizlenmesi sırasında maternal hücreler tarafından fetal HLA antijenlerinin tanınması, maternal duyarlılaşmaya sebep olabilmektedir (11). Fakat anne ile fetüs arasındaki madde alışverişi genellikle üçüncü trimesterde çalışılmıştır. Dolayısıyla erken gebelikte ilgili bilgiler kısıtlıdır ve etik kurallardan dolayı plasental transportun in vivo çalışmaları engellenmektedir (100).

Bu çalışmada gebeliği pozitif olarak belirlenen 41 kişinin takibi yapıldı, son adet tarihlerine göre gebelik haftaları hesaplandı. 1-12, 13-26, 27-42 haftalar arasında (1.,2. ve 3. Trimester) elde edilen kan örneklerinin anti-HLA antikor tarama ve tanımlamaları yapıldı. Çalışma grubunu, önceki gebelikleri dışında bir alloimmünizasyon öyküsü olmayan, yaş ortalaması 30 ± 7 olan gebeler oluşturmaktadır. Gebelerin hiçbirinde kan uyumsuzluğu ve otoimmün hastalık yoktur. Gebelerden ikisi eşiyile 1. derece, ikisi de 2. derece akrabadır. Gebelerin son trimesterdaki anti-HLA antikor üretme yüzdelerine bakıldığında, %54'ünün panel reaktif antikor tarama sonucu pozitif olarak tespit edildi (Sınıf I ve/veya Sınıf II). Foca ve ark'ları (101) 1983'te yaptıkları çalışmada, hamilelik sırasında, kadınların %10-30'unun paternal HLA antijenlerine karşı antikor ürettiğini belirtmişlerdir. Aradaki farkın anti-HLA antikorunu belirlemede kullanılan yöntem farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. Foca ve arkadaşları (101) çalışmalarını karışık lenfosit kültüründe sitoflorimetrik yöntemle gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada ise boncuk temelli luminex teknolojisi ile panel reaktif antikor seviyeleri çalışıldı. Luminex teknolojisine dayalı anti-HLA antikor tespit yönteminin özgüllüğü, duyarlılığı ve sitotoksik yöntemlere olan üstünlükleri pek çok çalışmada belirtilmiştir (52, 102,103, 104, 105).

PRA tarama testi ile yapılan analizin sonucunda, I ve II. Trimesterde PRA pozitiflik oranı değişmezken, III. Trimesterde bu oran artmıştır (I. ve II. trimesterde

n=18, üçüncü trimesterde n=22). Rogenhofer ve ark. (6) 2008'de yaptıkları çalışmada, paternal HLA haplotiplerine karşı oluşan anti-paternal antikorların gebeliğin 28. haftasından önce nadiren tanımlandığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla bu çalışma ile elde ettiğimiz veriler desteklenmektedir.

Trimesterlere göre SI, SII ve hem SI hem de SII pozitiflikleri değerlendirildiğinde (Şekil 23) ve ilk iki trimesterde herhangi bir değişiklik görülmemesine rağmen (%33 SI, %28 SII, %39 SI ve SII), III. trimesterde SI pozitifliği görülme oranının azaldığı gözlemlendi (%23). Sadece SII ve hem SI hem de SII 'si pozitif olanların sayısı ise arttığı bulundu (sırasıyla %36 ve %41). Ayrıntılı incelendiğinde I ve II. trimesterde sadece SI pozitifliği olan 1 kişinin III. trimesterde SII antijenlerine karşı da antikor ürettiği belirlendi. PRA'sı negatif olan bir kişinin III. trimesterde hem SI hem de SII antikorları, üç kişininse SII antikoru ürettiği bulundu. Özetle, gebelik haftası ilerledikçe Sınıf I ve Sınıf II anti-HLA antikoru üretiminin arttığı, SII 'ye karşı geliştirilen anti-HLA antikorlarındaki artışın SI'e göre daha fazla olduğu tespit edildi. Lee ve et al. (11) 2011'de spontan düşüklere olan kişilerle yaptıkları çalışmada, sınıf I anti-HLA antikorlarının sınıf II'ye göre daha fazla üretildiğini belirtmişlerdir. Bu durumu, HLA sınıf I antijenlerinin daha fazla hücre tipinde ifade edildiği için, sınıf II seropozitifliğine göre daha fazla görüldüğü şeklinde yorumlamışlardır. Gebelikle PRA pozitifliği arasındaki ilişkinin belirlendiği çalışmalarda, örnekler genellikle nakil bekleme listesindeki hastalardan elde edilmiş, bulgular gebelik öykülerine göre değerlendirilmiştir. Pirim ve ark. (106) 2015'te yaptıkları çalışmada farklı sensitizasyon olaylarını karşılaştırılmış ve sadece gebelik öyküsü olan kişilerde sınıf II antikor üretiminin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (SI %31,9, SII%34,1). Masson et al. (3) ise tam tersi sonuçlar elde etmişlerdir (SI %86, SII %62). Bu çalışmada, sadece önceki gebeliklerde oluşan anti-HLA antikorları değil, ilk gebeliği olan kişiler analiz edilerek, mevcut gebelikleri sırasında oluşturulan antikorlar da belirlendi.

Anti-HLA antikorları tek bir gebelikle oluşabileceği gibi, birden fazla gebeliği olan kadınlarda ise görülmeyebilir (10). Densmore et al.(107) ilk gebeliği olan kadınların %7,8'inde, 2 veya 3 gebeliği olanların %14,6'sında, 4 ve daha fazla gebeliği olanların ise %26,3'ünde anti-HLA antikorlarını tespit etmişlerdir. Viwes (108) gebelik esnasında ilk gebeliği olanların %19,2'sinde, ikinci gebeliği olanların

%22'sinde sitotoksik antikorlar tespit etmiştir. Morin et al.(109) ise ilk gebeliği olanların %18,2'sinde, ikinci gebeliği olanların %27,3'ünde, 3 ve daha fazla gebeliği olanların %50'sinde sınıf I anti-HLA antikorlarını tespit etmişlerdir. Tüm bu elde edilen veriler bizim bulgularımızla uyumludur. Fakat bu çalışmalarda yüzde oranlarıyla ifade edilen antikorların komplemana bağımlı antikorlar olduğu, Luminex'e dayalı yöntemle ise komplemana bağımsız antikorların da tespit edilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda, ilk gebeliği olan kişilerin %42'sinin, ikinci gebeliği olanların %50'sini, üç ve daha fazla gebeliği olanların ise %67'sinin anti-HLA antikorunu ürettiği tespit edildi. İlk gebeliği olan kişilerde, 27. haftaya kadar SII anti-HLA antikor görülme oranında bir değişiklik yoktu (%16), 27. haftadan sonra ise artış gözlemlendi (%32). 2. Gebeliği olan kişilerde sınıf II anti-HLA antikorları ilk iki trimesterde gözlenmezken 3. Trimesterde arttığı (%0 'dan %7'ye), sınıf I antikorlarının ise azaldığı tespit edildi (%36'dan %29'a). 3 ve daha fazla gebeliği olanlarda ise sadece sınıf I pozitifliğine sahip kişiye rastlanmazken, hem Sınıf I hem de sınıf II PRA pozitifliğinin yine 27. haftadan sonra arttığı bulundu (%40'dan %47'ye). Her üç grupta da, III. trimesterde sınıf II anti HLA antikor üretiminin arttığı gözlemlendi. Bulgularımıza göre anti-HLA antikor üretimi gebelik sayısı ile doğru orantılı şekilde artmaktadır. Gebelik sürecinde doğuma yaklaşıldıkça maternal fetal hücre geçişinin artışı ile beraber anti-HLA antikor üretiminin de artabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

PRA pozitifliği ile gebelik, doğum, düşük ve kürtaj öyküleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır Phi değerleri de hesaplanan bu değişkenlerin içinde sadece düşük öyküsü ile PRA pozitifliği arasında bir negatif bağımlılık olduğu belirlenmiştir. Diğer gebelik öyküleri için istatistiksel anlamlılığın, kişi sayısının arttırılması ile elde edilebileceği phi değerleriyle de belirlenmiştir.

Luminex'e dayalı anti-HLA antikor tarama ve tanımlama yöntemleri oldukça duyarlıdır ve MFI (ortalama floresans yoğunluğu-mean flourecent intence) değerlerine göre pozitif veya negatif olarak sonuçlar değerlendirilmektedir. Birçok kan merkezi, HLA antikorunu tanımlamada kullandığı yöntemlerin eşik MFI değerlerini belirlemekte, bu değerler merkezler arasında farklılık göstermektedir (110). Fakat son zamanlarda yapılan bir çalışmada, MFI değeri 300 civarında olan antikorların da humoral redde sebep olabileceği bildirilmiştir (111). Çalışmamızdaki

anti-HLA antikorunu ürettiği belirlenen kişilerin, antikorlarının tanımlanmasında, ≥ 500 MFI değerine sahip antijenler PRA pozitif olarak değerlendirildi. Bu değerlendirme sırasında MFI değerlerinin yanı sıra, elde edilen antijenlerin doğru negatif ve doğru pozitif olarak değerlendirilme oranları, çapraz reaktif gruplar ve maskelenmiş antijenler de dikkate alındı. Çapraz reaktivlik, bir anti-HLA antikorunun iki veya daha fazla HLA antijeni ile reaksiyona girmesidir. Bu durum, iki antijenin benzer epitoplara sahip olmasından veya benzer aminoasit polimorfizmine sahip olmasından ileri gelebilir. Çapraz reaktivliğin tanımlanması ile tam uyum olmamasına rağmen, epitoplara benzer HLA antijenlerine sahip donörlerden, organ nakli yapılabilmesi ile ilgili çalışmalar gündeme gelmiştir (112).

Yine bazı allellerin de arka plan kirliliğine sebep olabileceği belirtilmiştir. HLA matchmaker programı ile antijene özgü değil, epitoplara özgü antikorlar dokümente edilmiştir. Bu sayede antijenite önem kazanmıştır (111). Resse et al.(111) yaptıkları bir çalışmada, çapraz uyum testlerinin negatif fakat PRA seviyesinin pozitif olarak değerlendirildiği bir hasta-donör çiftin, uyumsuz doku allelleri için epitop analizini gerçekleştirmiştir. Buna göre sadece uyumsuz olan HLA antijenlerine karşı değil, hasta-donör çiftinin her ikisinde de bulunmayan antijenlere karşı da antikor geliştirildiği belirlenmiştir. Epitop analizinde ise, MFI değeri düşük bile olsa, donörün antijenleri ile aynı epitopa sahip HLA antijenlerine karşı da antikor üretilebileceğini bildirmişlerdir (111).

HLA antijenlerinin çoklu epitopa sahip olduğu, HLA moleküllerinin yapılarının modellenmesi ve aminoasit sekanslarındaki farklılıkların belirlenmesi ile keşfedilmiştir. Bir antikor, aynı eplete sahip allellerle farklı MFI değerleri gösterebilir. Bu farklılığın, aminoasit konfigürasyonundaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı eplete sahip allellerdeki MFI değerleri arasındaki farklılıktan dolayı peptite bağımlı HLA antikorları tanımı gündeme gelmektedir (113). HLA antijenleri birbirinden farklı sayılarda epitoplara sahiptir ve bu yüzden de antijeniteleri farklıdır. Yine epletlerin pozisyonunun da antijenitede önemli olduğu, moleküler yüzeye yakın olanların, daha zor ulaşılabilir pozisyonda olanlara göre antijenitesinin fazla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca aminoasitlerin elektrostatik yüklerinin ve hidrofobisitelerinin de HLA uyumsuzluklarına karşı geliştirilen antikorları etkilediği belirtilmektedir (113).

Türk popülasyonundaki allel frekanslarına bakıldığında, en sık A*02, A*11 A*24, A*26, B*35, B*44, B*51, DRB1*04, DRB1*11, DRB1*7, DQB1*03, DQB1*05, DQB1*02 antijenlerine rastlandığı belirtilmektedir (114, 115). Dolayısıyla bu antijenlere karşı oluşturulan anti-HLA antikorlarının tespit edilme oranının daha fazla olması beklenmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, en sık görülen anti-HLA antikor tiplerinin, A02, A01, B07, DRB1 11 antijenlerine karşı oluşturulduğu belirtilmiştir (116). Çalışmamızda sınıf I HLA antijenlerine karşı en fazla anti HLA-A2 (n=5/14) ve HLA-B7 antikoru (n=2/14), Sınıf II HLA antijenlerinde ise en fazla DR7 ve DQ2 antikoru gözlemlendi (n=5/17). Türk popülasyonunda tanımlanan HLA allellerinin frekansı ile bu çalışmada tanımlanan anti-HLA antikorlarının sayıları doğru orantılıdır. Ayrıca yüksek oranda sensitize hastalar daha immunojenik olan HLA epitoplarına karşı alloantikor oluşturmaktadırlar (113). HLA A3 antijenine sahip kadınlarda, diğer A antijenine sahip olanlara göre alloantikor üretiminin daha fazla olduğu belirtilmektedir. Yine A2, B7, B35 'in yüksek oranda immunojenik olduğu, B15 ve B40'ın ise daha az immunojenik olduğu Dankers ve ark tarafından 2003'te belirtilmiştir (90). Dolayısıyla toplumda sık karşılaşılan HLA allellerinin yanı sıra, antijenlerin immünojenitesi de, belirli antijenlere spesifik antikorların görülme sıklığını arttırmaktadır.

Kan grupları ile çeşitli hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesiyle ilgili olan çalışmaların yanı sıra, kan grupları ile HLA antijenlerinin ifadesi arasındaki ilişki ile ilgili de çalışmalar yer almaktadır. Erikoğlu ve ark. (117)2011'de yaptıkları çalışmada HLA antijenleri ve kan grupları arasındaki ilişkiyi tespit etmeye çalışmış fakat istatistiksel olarak anlamlı bulamamışlardır. Çalışma grubumuzdaki gebelerin %32'si ARh+ (n=13), %22'si B Rh+ (n=9), %22'si 0 Rh+ (n=9), %12'si AB Rh+ (n=5), %10 A Rh- (n=4), %2 0 Rh- (n=1)'tir. ARh- ve 0Rh- kan gruplarına sahip hastaların hepsinde anti-HLA antikoru belirlenmiştir. Fakat toplumda nadir rastlanan kan gruplarındadırlar ve istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edebilmek için örnek sayısının artırılması gerekmektedir (4 kişi ARh-, 1 kişi 0Rh-). Yine akrabalık ve doğum tipleri ile PRA pozitifliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde, anlamlı bir ilişki elde olmadığı görüldü ve phi değerine göre örnek sayısının artırılması gerektiği belirlendi.

Sonuç olarak, gebelik sırasında babadan gelen HLA antijenlerine karşı üretilen anti-HLA antikorlarının gebelik sayısının artışı ile arttığı gözlemlendi. Ayrıca gebeliğin 27. haftasına kadar anti-HLA antikor görülme oranları değişmezken, 27. haftadan sonra özellikle sınıf II antikor üretiminin arttığı tespit edildi. Trofoblastlar tarafından sınıf II HLA antijenlerinin ifade edilmemesinden kaynaklanabileceği, sınıf II HLA antijenlerine karşı geliştirilen antikorların 27. haftadan sonra, anne ile fetüs arasındaki hücre geçişinin artmasıyla oluşabileceği düşünülmektedir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında, babaların HLA doku tiplerini yapılarak çalışmaya farklı bir boyut kazandırılması hedeflenmektedir. Bu çalışmanın, gebelik sırasında oluşan anti-paternal HLA antikorları tespit edilen kişilerdeki doku ve organ nakli başarısına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ÖZET

GEBELİK SÜRECİNDE PATERNAL ANTİ-HLA ANTİKORLARIN ARAŞTIRILMASI

Gebelik, organ nakillerinde redlere sebep olan duyarlılaşma olaylarından biridir. Fetal hücreler tarafından ifade edilen paternal antijenlerin maternal immün sistem tarafından tanınması ile anti-HLA antikorları üretilir. Bu çalışmada İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Polikliniğine başvuran gebelerde, trimesterlere göre anti-paternal anti-HLA antikor profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için 41 gebenin 1-13, 14-26 ve 27-42 haftalar arasında toplanmış olan serumlarındaki anti-HLA antikorları tarama ve tanımlaması, Luminex'e dayalı panel reaktif antikor yöntemi ile yapılmıştır. Gebelerin anti-HLA antikor üretme yüzdelerine bakıldığında, %54'ünün panel reaktif antikor tarama sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sınıf I ve/veya Sınıf II. PRA tarama testi ile yapılan analizin sonucunda, I ve II. Trimesterde PRA pozitiflik oranı değişmezken (n=18), III. Trimesterde bu oran artmıştır (n=22). Trimesterlere göre SI, SII ve hem SI hem de SII pozitiflikleri incelenmiş ve ilk iki trimesterde herhangi bir değişiklik görülmemesine rağmen (%33 SI, %28 SII, %39 SI ve SII), III. trimesterde sadece SII ve hem SI hem de SII 'si pozitif olanların sayısı ise artmıştır (sırasıyla %36 ve %41). Gebelik sayılarına göre anti-HLA antikoru üretim oranlarına bakıldığında, ilk gebeliği olan kişilerin %42'sinin, ikinci gebeliği olanların %50'sinin, üç ve daha fazla gebeliği olanların ise %67'sinin anti-HLA antikoru ürettiği tespit edilmiştir. Her üç grupta da, III. trimesterde sınıf II anti HLA antikor üretiminin arttığı belirlenmiştir. PRA Tarama sonucu pozitif olan hastaların antikor profilleri tanımlandığında ise en sık tespit edilen antikorlar, sınıf I HLA antijenlerine karşı anti HLA-A2 (n=5/14) ve HLA-B7 (n=2/14), Sınıf II HLA antijenlerinde ise en fazla DR7 ve DQ2 antikoru tanımlanmıştır (n=5/17). Sonuç olarak anti-HLA antikor üretiminin 27. Haftadan sonra ve gebelik sayısının artması ile arttığı belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Anti-paternal antikorlar, Anti-HLA antikorları, Panel Reaktif Antikorlar, Gebelik, Organ nakli

ABSTRACT

DETECTION OF PATERNAL ANTI-HLA ANTIBODIES DURING PREGNANCY

Pregnancy is one of the sensitization events that causes rejection in organ transplantation. Anti-HLA antibodies are produced by maternal immune system against fetus that expresses paternal antigens. In this study, it was aimed to evaluate the paternal anti-HLA antibody profiles of sera that were collected from pregnant women in 1-13, 14-26 and 27-42 weeks who registered to Izmir Tepecik Education and Research Hospital Gynaecology Clinic. Anti-HLA antibody screening and identification tests were performed by luminex based panel reactive antibody test in the sera. 54% of the women were PRA positive. It was determined that the PRA positive patient ratio increased in 3rd trimester (n=22), while it was the same in 1st and 2nd trimester (n=18). 33%, 28% and 39% of the patients were only CI, only CII and CI/CII positive in 1st and 2nd trimester, respectively. 36% and 41% of the patients were positive in 3rd trimester for CII and CI/CII, respectively. 42% of primigravidae were PRA positive. 50% of the patients with second pregnancy were PRA positivity. 67% of the women with ≥ 3 pregnancies were positive. It was observed that class II anti-HLA antibody production increased in all of the patients during 3rd trimester. There was not a statistically significant relation between PRA positivity and pregnancy, abortion and miscarriage ($p > 0.05$). The most frequently produced antibodies were against HLA-A2 (n=5/14), HLA-B7 (n=2/14), HLA-DR7 and HLA-DQ2 (n=5/17). In conclusion, anti-HLA antibody production increased after 27 weeks of gestation.

Keywords: Anti-paternal antibodies, Anti-HLA antibodies, panel reactive antibodies, pregnancy, transplantation

KAYNAKLAR

1. Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, Gebel HM. Evolution of HLA antibody detection. *Immunologic Research* 2004; 29(1): 41-53
2. Cyganek A, Nowaczyk M, Sanko-Rosmer J et al. The effect of pregnancy on humoral rejection in patients after vascularized organ transplantation. *Journal of Reproductive immunology* 2015; 112:115-119.
3. Massan E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I, Rietmulher D, Pouthier F, Mongaillard G, Chabod J, Ferrand C, Tiberghien P, Rebibou JM. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Human Immunology* 2013; 74: 946-951
4. Girardi G, Prohaszka Z, Bulla R, Tedesco F, Scherjon S. Complement activation in animal and human pregnancies as a model for immunological recognition. *Molecular Immunology* 2011; 48: 1621-1630
5. Lashley ELO, Meuleman T, Claas FHJ. Beneficial or Harmful Effect of Antipaternal Human Leukocyte Antibodies on Pregnancy Outcome? A Systematic Review and Meta-Analysis. *American J of Repro Imm* 2013; 70: 87-103
6. Rogenhofer N, Toth B, Kiessig S et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) as screening method for anti-paternal allo-antibodies in patients with recurrent pregnancy loss (RPL). *Europ J of Obstet &Gyn and Repro Bio* 2008; 136: 155-159
7. Rango U. Fetal tolerance in human pregnancy—A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. *Immunology Letters* 2008; 115: 21-32
8. Thellin O, Heinen E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology* 2003; 185: 179-184.
9. Zheng J. *Recent Advances in Research on the Human Placenta*, Intech, Rijeka, 2012: 211-232
10. Kampen CA, Maarschalk MFJ, Langerak-Langerak J, Beelen E, Roelen DL, Claas FHJ. Pregnancy Can Induce Long-Persisting Primed CTLs Specific for Inherited Paternal HLA Antigens. *Human Immunology* 2001; 62: 201-207

11. Lee JH. et al. A signature of maternal anti-fetal rejection in spontaneous preterm birth: chronic chorioamnionitis, anti-human leucocyte antigen antibodies, and C4d. *Plos One* 2011; 6(2): 1-9.
12. Lee JH, Romero R, Xu Y et al. Detection of anti-HLA antibodies in maternal blood in the second trimester to identify patients at risk of antibody-mediated maternal anti-fetal rejection and spontaneous preterm delivery. *American Journal of Reproductive Immunology* 2013; 70: 162-175.
13. Picascia A, Infante T, Napoli C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clin Exp Nephrol* 2012;16: 373-381.
14. Zeevi A, Girnita A, Duquesnoy R. HLA Antibody analysis. *Immunologic Research* 2006; 36(1): 255-264
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology* (7th ed), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012: 89-136
16. Karp G. *Cell and Molecular Biology* (6th ed), John Wiley & Sons, USA, 2010: 693
17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell* (5th ed), Garland Science, New York, 2008: 1524-1561
18. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology* (5th ed), W. H. Freeman & Company, 2002: 2-53
19. Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. *İmmünoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2014: 11-13
20. Madigan MT, Martinko JM. *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson Prentice Hall, 2006: 727-778
21. Actor JK. *Immunology and Microbiology* (2nd ed), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012: 33-38
22. Paul WE. *Fundamental Immunology* (6th ed), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 152-153
23. Duquesnoy RJ. The antibody response to an HLA mismatch: a model for nonself-self discrimination in relation to HLA epitope immunogenicity. *Int J Immunogenetics* 2011; 39: 1-9
24. Murphy K. *Janeway's Immunobiology* (8th ed), Garland Science, New York, 2012: 136-137

25. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P and Marsh SGE. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research* 2013; 41: 1222–1227
26. Bontadini A. HLA techniques: Typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. *Methods* 2012; 56: 471–476
27. Dyer P, McGilvray R, Robertson V, Turnera D. Status report from ‘double agent HLA’: Health and disease. *Molecular Immunology* 2013; 55: 2–7
28. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol* 2009;125 (2): 324-335
29. Santis DD, Dinauer D, Duke J et al. 16th IHIW: Review of HLA typings by NGS. *Int J Immunogenetics* 2013; 40: 72-76
30. Mak TW, Saunders ME. *Primer to the immun response*. Academic Press, Burlington, 2008: 104-107
31. Mahdi BM. A glow of HLA typing in organ transplantation. *Clinical and Translational Medicine*, 2013; 2: 1-6
32. Mehra KN, Kaur G. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003; 5.
33. Stavropoulos-Giokas C, Dinou A, Papassavas A. The Role of HLA in Cord Blood Transplantation. *Bone Marrow Research* 2012; 2012:1-9
34. Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D. HLA and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(2): 370-385
35. Somasundaran M, Quiroga I. *Principles in transplantation immunology . Surgery*, 2011; 29-7: 295-300
36. Johnson AG, Ziegler RJ, Hawley L. *Microbiology and immunology* (5th ed). Lippincott Williams &Wilkins, Maryland, 2010: 229-235
37. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens* 2012; 80: 1–11
38. Tambur AR, Claas FHJ. HLA Epitopes as viewed by antibodies: What is it all about? *Am.J of Trans*, 2015; 15: 1148-1154
39. WEB_1 <http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/ students/spring2006 /finley/c3.html>
40. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. *Roitt’s essential Immunology* (12th ed), Blackwell Publishing, West Sussex, 2011: 424

41. Valenzuela NM, Reed EF, Antibodies in Transplantation: The Effects of HLA and Non-HLA Antibody Binding and Mechanisms of Injury. *Methods Mol Biol* 2014;1-24
42. Zachary AA, Leffell MS. *Transplantation Immunology* (2nd ed), Humana Press, New York, 2013: 41-62
43. Fernandez MM, Guan R, Swaminathan CP, Malchiodi EL, Mariuzza RA. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin I (SEI) in complex with a human major histocompatibility complex class II molecule. *J Biol Chem*, 2006; 281: 253-56
44. Levinson W. *Review of Medical immunology* (10th ed), McGraw Hill Medical, 2005: 55-71
45. Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17: 541–545
46. Eng HS, Bennett G, Bardy P et al. Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Human Immunology* 2009; 70: 595-599
47. Nwakanma LU, Williams JA et al. Influence of Pretransplant Panel-Reactive Antibody on Outcomes in 8,160 Heart Transplant Recipients in Recent Era. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 1556-1563
48. Premasathian N, Panorchan K, Vongwiwatana A, Pornpong C, Agadmeck S, Vejbaesya S. The effect of peak and current serum Panel-Reactive Antibody on graft survival, *Trans Proceed* 2008; 40: 2200-2201
49. Cruse JM, Lewis RE. *Atlas of Immunology* (2nd ed), CRC Press, Florida, 2004: 579-610
50. O’Gorman MRG, Donnenberg AD. *Handbook of Human Immunology* (2nd ed), CRC Press, Boca Raton, 2008: 63-107
51. Elgueta S, Fuentes C et al. Effect of Implementing Anti-HLA Antibody Detection by Luminex in the Kidney Transplant Program in Chile. *Transplantation Proceedings* 2011; 43: 3324-3326
52. Tait BD, Hudson F, Cantwell L et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology* 2009;14: 247-254
53. Altermann WW, Seliger B, Sel S et al. Comparison of the established standard complement-dependent cytotoxicity and flow cytometric crossmatch assays with a

- novel ELISA-based HLA crossmatch procedure. *Histol Histopathol* 2006; 21: 1115-1124.
54. Dalva K, Beksac M. HLA Typing with sequence specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex Technology. *Methods Mol Biol* 2014;1109: 87-99
55. Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta* 2006; 363: 71-82.
56. Pirim ve ark. Transplantasyonda anti-HLA antikorları tespit yöntemleri Çalıştay Kitapçığı, 26-27 Kasım 2015: 11-18
57. Gebel HM, Liwski RS, Bray RA. Technical aspects of HLA antibody testing. *Curr Opin Organ Transplant* 2013; 18: 455-462
58. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji (6th ed), Palme Kitabevi, Ankara, 1993: 3-20.
59. Raven P, Johnson GB. *Biology* (6th ed), Mc Graw Hill Companies, 2002: 1215-1238
60. Keeton WT, Gould JL, Gould CG. Genel Biyoloji (Beşinci baskı, 2. Cilt), Palme Yayıncılık, Ankara, 2000: 989
61. Jiang F, Zhao H, Wang L, Guo X et al. Role of HLA-G1 in trophoblast cell proliferation, adhesion and invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015: 1-7
62. Mueller WA, Hassel M, Grealy M. *Development and Reproduction in Humans and Animal Model Species*, Springer, Heidelberg 2015: 173-180
63. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: Cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta* 2014;28: 64-68
64. Girardi G, Bulla R, Salmon JE, Tedesco F. The complement system in the pathophysiology of pregnancy, *Mol Imm* 2006; 43: 68-77
65. Myren M, Mose T, Mathiesen L, Knudsen LE. The human placenta – An alternative for studying foetal exposure. *Toxicology* 2007; 21: 1332–1340
66. Manyonda IT. *The Immunology of Human Reproduction*. Taylor & Francis, Oxon, 2006: 26-29

67. Aghababaei M, Beristain AG. The Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Importance of metzincin proteases in trophoblast biology and placental development: A focus on ADAM12. *Trophoblast Research* 2015;29: 11-19
68. Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human Reproduction Update* 2003; 9(6): 531-539
69. Juch H, Blaschitz A, Dohr G, Hutter H. HLA class I expression in the human placenta. *Wien Med Wochenschr* 2012; 162 (9–10): 196–200
70. John R, Hemberger M. A placenta for life. *Reproductive BioMedicine Online*, 2012; 25: 5–11
71. Beekhuizen HJ, Joosten I, Lotgering FK, Bulten J, Kempen LC. Natural Killer Cells and HLA-G Expression in the Basal Decidua of Human Placenta Adhesiva, *Placenta* 2010; 31: 1078-1084
72. Shakhawat A, Shaikly V, Elzatma E, Mavrakos E, Jabeen A, Fernandez N. Interaction between HLA-G and monocyte/macrophages in human pregnancy, *J Rep Imm* 2010; 85: 40-46
73. Benedictus L, Koets AP, Rutten VPMG. The role of placental MHC class I expression in immune-assisted separation of the fetal membranes in cattle. *J of Reproductive Immunology*, 2015:1-26
74. Petroff MG. Immune interactions at the maternal-fetal interface. *Journal of Reproduct Imm* 2005; 68: 1-13
75. Tilburgs T, Scherjon SA, Claas FHJ. Major histocompatibility complex (MHC)-mediated immune regulation of decidual leukocytes at the fetal-maternal interface. *Journ Rep Imm* 2010;85: 58-62
76. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB journal* 2005; 19: 681-693
77. Klitkou L, Dahl M, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-G during pregnancy part I: Correlations between maternal soluble HLA-G at midterm, at term, and umbilical cord blood soluble HLA-G at term. *Human Immunology* 2015; 76: 254-259.
78. Guleria I, Sayegh MH. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. *J of immunology* 2007; 178: 3345-3351.

79. Rocca CL, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunology Letters* 2014; 162: 41-48
80. Rango U, Krusche CA, Beier HM, Classen-Linke I. Indolamine-dioxygenase is expressed in human decidua at the time maternal tolerance is established. *J Repro Imm* 2007; 74: 34-45.
81. Krzymowski T, Krzymowska SS. Advances in understanding the physiological mechanism of maternal immune tolerance to the embryo. *Reproductive biology* 2012; 12: 265-270.
82. Brazao V, Kuehn CC, et al. Endocrine and immune system interactions during pregnancy. *Immunobiology* 2015; 220: 42-47.
83. Chaouat, G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007; 29: 95-113.
84. Robertson, S. A. Immune regulation of conception and embryo implantation-all about quality control? *J Reprod Immunol* 2010;85: 51-7.
85. Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353-6.
86. Alijotas-reig J, Llorba E, Gris JM. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: A new challenging role for regulatory T cells. *Placenta* 2014; 35; 241-248
87. Shima T, Inada K, Nakashima A, et al. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. *Journ of Rep Imm* 2015: 108; 72-82.
88. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cell subset. *Immunol* 2004; 112: 38-43.
89. Kumpel BM, Manoussaka MS. Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sanguinis* 2012; 102: 2-12
90. Dankers MKA, Roelen DL et al. Differential Immunogenicity of Paternal HLA Class I Antigens in Pregnant Women. *Human Immunology* 2003; 64: 600-606

91. Kampen CA, Maarschalk MFJ, Langerak-Langerak J, Roelen DL, Claas FHJ. Kinetics of the Pregnancy-Induced Humoral and Cellular Immune Response Against the Paternal HLA Class I Antigens of the Child. *Human Immunology* 2002; 63: 452-458
92. Toyoda M, Ge S, Pao A et al. Cellular allo reactivity against paternal HLA antigens in normal multiparous females as detected by intracellular cytokineflow cytometry remains elevated over years despite diminution of anti-HLA antibody levels. *Transp Imm* 2010; 23: 133-140
93. Vianna P, Chies JAB. Maternal exposure to paternal antigens can modulate the foetus immune system and is associated with reduced atopy in the childhood. *Bioscience Hyp* 2008; 1: 248-250
94. Adams DH, Fueyo-Sanchez A, Samuel D. From immunosuppression to tolerance. *Journal of Hepatology* 2015; 62: 170-185
95. Boraschi D, Penton-Rol G, Perspectives in immunopharmacology: The future of immunosuppression. *Immunology Letters* 2014; 161: 211-215
96. Matyas-Hart M, Gareau AJ, Hirsch GM, Lee TDG. De novoalloreactive memory CD8 + T cells develop following allogeneic challenge when CNI immunosuppression is delayed. *Transplant Immunology* 2015; 32: 23-28.
97. Lopes, D. et al. Effect of different sensitization events on HLA alloimmunization in kidney transplantation candidates. *Transplantation proceedings* 2015; 47: 894-897.
98. Pirim İ. Organ nakli olacak hastalarda anti-HLA antikorları. *The Euroasian Journal of Medicine* 2007; 39: 134-135
99. Petroff MG.Review: Fetal antigens-Identity, origins, and influences on the maternal immune system *Placenta* 32, Supplement B, *Trophoblast Research* 2011; 25: 176-181
- 100.Levkovitz R, Zaretsky U, Gordon Z, Jaffa AJ, Elad D. In vitro simulation of placental transport: Part I. Biological model of the placental barrier. *Placenta* 2013; 34: 699-707.
- 101.Suciu-Foca N, Reed E, Rohowsky C, Kung P, King DW: Anti-idiotypic antibodies to anti-HLA receptors induced by pregnancy. *PNAS* 1983; 80: 830

102. Worsley CM, Mayne ES, Sucard MS. Luminex-based virtual crossmatching for renal transplantation in South Africa. *SAMJ* 2012, 102:1; 40-43
103. Eng HS et al. Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Human Immunology* 2009, 70: 595-599.
104. Kurtulmuş et al. Comparison of anti-HLA antibodies of kidney transplant candidates with chronic renal failure by two different methods: flow-pa and luminex pra. *Transplantation proceedings* 2013; 45: 875-877.
105. Minucci PB, Grimaldi V, Casamassimi A, et al. Methodologies for anti-HLA antibody screening in patients awaiting kidney transplant: a comparative study. *Exp Clin Transplant*. 2011;9(6): 381–386.
106. Pirim et al. De novo produced anti-human leukocyte antigen antibodies relation to alloimmunity in patients with chronic renal failure. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2015; 19(6): 335-338.
107. Densmore TL, Goodnough LT, Ali S, Dynis M, Chaplin H. Prevalance of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion*, 1999; 39: 103-106
108. Vives J, Gelabert A, Castillo R. HLA antibodies and period of gestation: Decline in frequency of positive sera during last trimester. *Tissue Antigens* 1976; 7: 208-212
109. Morin-Papunen L, Tiilikainen A, Hartikainen-Sorri AL. Maternal HLA immunization during pregnancy: presence of anti-HLA antibodies in half of multigravidous women. *Med Biol* 1984; 62: 323-5
110. Endres RO, Kleinman SH, Carrick DM, Steele WR, Wright DJ, Norris PJ, Triulzi D, Kakaiya R, Busch MP. Identification of specificities of antibodies against human leukocyte antigens in blood donors. *Transfusion* 2010; 50: 1749-60.
111. Resse M et al. Epitope specificities of HLA antibodies: The effect of epitope structure on luminex technique dependent antibody reactivity. *Human Immunology* 2015;76(4): 297-300
112. Wade JA et al. HLA mismatching within or outside of cross-reactive groups (CREGs) is associated with similar outcomes after unrelated hematopoietic stem cell transplantation *Blood* 2007; 109(9): 4064-4070.
113. Duquesnoy RJ. HLA Epitope based matching for transplantation. *Transplant immunology*, 2014; 31(1):1-6.

114.Duquesnoy RJ. HLA Matchmaker: A molecularly based donor selection algorithm for highly alloimmunized patients. Transplantation proceedings, 2001; 33: 493-497.

115.Kayhan B ve ark. HLA-A,-B,-DRB1 allele and haplotype frequencies and comparison with blood group antigens in dialysis patients in the east Anatolia region of Turkey. Transplantation proceedings 2013; 45: 2123-2128.

116.WEB_2 <http://www.allelefreqencies.net/>

117.Erikoğlu M, Büyükdoğan M, Cora T. The relationship between HLA antigens and blood groups. Eur J Gen Med 2011; 8(1):65-68.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Manisa'nın Turgutlu ilçesinde doğdum. 2003 yılında İzmir Anadolu Lisesi'nden mezun olup, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım. 2007 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalından mezun olup aynı yıl aynı anabilim dalında yüksek lisansa başladım. 2009 yılında yüksek lisanstan mezun olup aynı bölümde doktora eğitimime başladım. 2010-2013 yılları arasında yine aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görev yaptım. 2013 yılında ÖYP programı ile İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na atandım ve yüksek lisans programına başladım. Halen aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.