

Pretransplant Gelişmiş HLA Sınıf I ve II Panel Reaktif Antikorların Böbrek Allogrefti Üzerine Klinik ve Patolojik Düzeyde Etkileri

The Influence of Preformed HLA Class I and II Panel Reactive Antibodies on Clinical and Pathological Outcomes of Kidney Allograft

ÖZ

AMAÇ: Böbrek nakli öncesi gelişmiş ve tepe-PRA düzeyleri kullanılarak değerlendirilen anti-HLA Sınıf-I ve II antikorlarının, klinik sonuçları ve histopatolojik düzeyde allogreft üzerine olan etkileri araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Merkezimizde böbrek nakli olan 111 hastanın verileri geriye dönük olarak değerlendirildi. Tepe-PRA düzeyinin $>15\%$ olması, HLA Sınıf-I ve/veya Sınıf-II antikorlar için pozitif kabul edildi. Lenfosit çapraz karşılaştırma (LÇK) ve PRA düzeyi ölçümlerinde akım sitometri yöntemi kullanıldı. Preoperatif bütün hastalarda LÇK negatifti. Histopatolojik olarak allogreft biyopsileri Banff 2011 kriterlerine göre HLA antikorlarının etkileri açısından değerlendirildi.

BULGULAR: PRA Sınıf-I $21,5\%$, PRA Sınıf-II ise $22,5\%$ hastada pozitif. PRA Sınıf-II pozitif hastalar, negatif olanlarla kıyaslandığında anlamlı olarak greft kaybı ($p=0,028$), ölüm-dışı greft kaybı ($p=0,008$), akut rejeksiyon ($p=0,016$) ve kronik rejeksiyon gelişimi ($p=0,029$) daha fazla bulundu. Histopatolojik olarak, PRA Sınıf-II pozitif olan hastalarda, negatif olanlara göre peritubular kapillerit skorunun daha yüksek ($0,44\pm 0,78$ 'e karşı $1,55\pm 1,12$, $p=0,008$) ve glomerülit+peritubular kapillerit skorunun ≥ 2 olan hastaların daha fazla olduğu bulundu (64% 'e karşı 36% , $p=0,026$). PRA Sınıf-I ve PRA Sınıf I+II pozitif olanlarda ise klinik veya histopatolojik düzeyde negatif olanlara göre anlamlı bir farklılık yoktu.

SONUÇ: Böbrek nakli öncesi PRA yöntemi ile saptanmış HLA Sınıf-II antikorları olan hastalar, LÇK negatif olsa bile allogreft rejeksiyonu ve azalmış greft sağ kalımı riski taşırlar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Böbrek nakli, Panel reaktif antikor, Akım sitometri

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of the study was to investigate the influence of preformed anti-HLA antibodies that are represented by peak PRA levels on clinical and histopathologic outcomes of kidney allograft.

MATERIAL and METHODS: The study was a retrospective cohort that consisted of 111 kidney transplant recipients. A peak PRA level greater than 15% was accepted positive for HLA class I and II antibodies. Flow cytometric assay was used for PRA and lymphocyte cross-match (LCM). All recipients were LCM negative. Allograft biopsies were indication biopsy and evaluated according to Banff 2011 criteria to investigate the influence of HLA antibodies.

RESULTS: PRA was positive in 21.5% of patients for Class-I and 22.5% for Class-II antibodies. PRA Class-II positive patients had significantly more graft failure ($p=0.028$), death censored graft failure ($p=0.008$), acute rejection ($p=0.016$) and chronic rejection ($p=0.029$). Regarding the pathological evaluation, peritubular capillaritis score was significantly higher in PRA Class-II positive patients (0.44 ± 0.78 vs. 1.55 ± 1.12 , $p=0.008$) and more patients had a glomerulitis+peritubular capillaritis score ≥ 2 (64% vs. 36% , $p=0.026$). These significant clinical and pathological outcomes were not observed for PRA Class-I and PRA Class I+II positive patients.

CONCLUSION: Preformed anti-HLA Class-II antibodies are responsible for increased allograft rejection and reduced graft survival despite the negative flow cytometric lymphocyte crossmatch in kidney transplantation.

KEY WORDS: Kidney transplantation, Panel reactive antibody, Flow cytometry

Çağlar RUHİ¹
Murat TUĞCU¹
Umut KASAPÖĞLU¹
Başak BOYNUEĞRİ¹
Gülistan GÜMRÜKÇÜ²
Pınar ATA³
Süheyla APAYDIN⁴
Mesut İzzet TİTİZ⁵

- 1 Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nefroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye
- 2 Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye
- 3 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
- 4 Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nefroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye
- 5 Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye



Geliş Tarihi : 29.08.2015

Kabul Tarihi : 10.09.2015

Yazışma Adresi:
Çağlar RUHİ
Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nefroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye
Tel : +90 533 560 38 81
E-posta : drcglr@gmail.com

GİRİŞ

HLA doku gruplarının keşfedilmesi organ nakli immünolojisinde önemli bir basamak olmuştur. Böbrek ve diğer solid organ nakillerinde, alıcı immün sisteminin ana hedefi donör hücrelerin yüzeyinde yer alan insan lökosit antijenleridir (HLA). HLA Sınıf I antijenler, çekirdekli hücrelerin hepsinin yüzeyinde eksprese edilirler, A, B ve C antijenlerinden oluşur. Sınıf II antijenler ise dendritik hücreler, aktive makrofajlar ve B lenfositler gibi, antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde eksprese edilirler, temel olarak DP, DR ve DQ antijenlerini içerirler. HLA moleküllerinin görevi antijenik peptidlerin T lenfositlere sunulmasıdır (1). Böbrek nakli alıcılarında gelişen immunsupresif seçeneklerine rağmen nakil öncesi HLA antijenlerine karşı gelişmiş antikorlar halen bir sorun teşkil etmektedir. HLA Sınıf I ve II antijenlerine karşı antikorlar gebelik, kan transfüzyonları, önceki solid organ nakilleri gibi uyarılar sonucunda gelişebilir (2).

Böbrek nakli alıcısının donör antijenlerine karşı içerdiği antikorlar, donör havuzunu temsil eden HLA antijenlerini kapsayan panel reaktif antikor (PRA) testiyle saptanabilir. PRA testi duyarlılığın bir göstergesi olarak potansiyel donörlerden, pozitif lenfosit çapraz karşılaştırma (LÇK) saptanma riski olanların, yüzde olarak tahmini oranını verir. Panel reaktif antikor düzeylerinin ölçümü her ne kadar özgülüğü düşük olsa da halen yaygın olarak nakil öncesi immünolojik riskin değerlendirilmesi ve takibi amacıyla, özgülüğü daha yüksek olan kompleman bağımlı sitotoksikite (CDC), akım sitometrik çapraz karşılaştırma (FCCM) gibi yöntemlerle birlikte kullanılmaktadır. Böbrek nakli öncesinde ölçülen yüksek PRA düzeylerinin erken ve geç dönemde oluşan greft fonksiyon kaybı için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (3,4). Bu çalışmada nakil öncesi gelişmiş ve tepe-PRA düzeyleri kullanılarak değerlendirilen anti-HLA Sınıf I ve II antikorlarının; allogreft rejeksiyonu, greft kaybı, greft sağ kalım süresi gibi klinik sonuçları ve histopatolojik düzeyde allogreft üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

YÖNTEM

Organ nakli merkezimizde 2010-2014 yılları arasında kadavra veya canlıdan böbrek nakli olmuş ve en az bir yıllık takip süresini tamamlamış olan hastalar çalışmaya dâhil edildi. Bu süreç içerisinde böbrek nakli olmuş olan 111 erişkin hastanın medikal verileri ayrıntılı olarak immünolojik özellikleri, indüksiyon/idame immunsupresif tedavileri ve böbrek fonksiyonları açısından geriye dönük olarak değerlendirildi. Çalışmada anti-HLA antikorlarının klinik ve histopatolojik etkilerinin değerlendirilmesi ile birlikte antikorların sınıfsal farklılık gösterip göstermediğinin araştırılması amacıyla, ayrı ayrı olarak HLA-Sınıf I pozitif/negatif ve HLA-Sınıf II antikor pozitif/negatif olan hastaların karşılaştırmalı analizleri yapıldı.

İmmünolojik Değerlendirme Yöntem

İmmünolojik açıdan hastaların mevcut olan geçmiş verileri değerlendirilerek nakil öncesi panel reaktif antikor (PRA)

takipleri incelendi ve çalışmaya tepe PRA (geçmiş dönemde çalışılan düzeylerden en yüksek olan PRA düzeyi) yüzdeleri alındı. Tepe PRA düzeyinin >%15 olması sınıf I ve/veya sınıf II antikorlar için pozitif olarak kabul edildi.

HLA Sınıf I ve II panel reaktif antikor düzeylerinin tayini ve nakil öncesi T ile B hücre çapraz karşılaştırma analizi akım sitometrik (FCCM) yöntem ile BD FACSCALIBUR (Beckton Dickonson, LA, USA) cihazı kullanılarak yapıldı. Bütün hastalarda böbrek nakli öncesi akım sitometrik LÇK negatifti.

PRA çalışması için, hastaların serumları, toplum HLA antijenlerinin karışımını taşıyan 32 farklı PRA boncuğu ile inkübe edildikten sonra floresan izotiyosiyanit (FITC) işaretli anti-human IgG ile boncuklara bağlanan antikorlar işaretlendi. Akım sitometride ileri ve yana saçılma analiz salonundan kapılanarak seçilen kapıdan geçen boncuk FITC floresans miktarı negatif kontrol bazal floresansına göre yüzde olarak analiz edildi. Akım sitometrik LÇK analizinde; tam kan alımı sonrası santrifüj ile oluşan bulutumsu katmandan periferik T ve B lenfositler izole edilip (10^6 donör hücresi /mikrolitre), hasta serumu ile oda ısısında inkübe edildi. Sonrasında, FITC işaretli anti-human IgG (Jackson, USA) işaretli antikorlar eklenip iki dakikalık inkübasyonu takiben anti CD3 PerCP (T hücreler için), anti CD19 PE (B hücreler için) eklenerek 4°C ' de, 30 dakikalık beklemeyi takiben BD FACSCALIBUR (Beckton Dickonson, LA, USA) cihazı kullanılarak değerlendirildi.

Patolojik Değerlendirme Yöntem

Hastaların takiplerinde, kreatinin düzeylerinde bazale seviyeye göre %20'den fazla yükselme olması ve 24 saat idrar toplama ile hesaplanan kreatinin klirensinde girişimsel olmayan yöntemlerle açıklanamayacak bir düşme olması veya yeni ortaya çıkan ve günde 1 gr'dan fazla olan proteinüri saptanması durumunda tanısız değerlendirme amacıyla böbrek biyopsisi yapıldı. Allogreft biyopsilerinin hepsi endikasyon biyopsisiydi. Biyopsiler tecrübeli bir patolog tarafından Banff-2011 kriterleri doğrultusunda değerlendirildi. Toplamda 31 hastaya böbrek biyopsisi uygulandı ve Banff 2011'e göre yapılan ayrıntılı skorlamanın tepe PRA düzeyi ile ilişkisi araştırıldı. Greft kaybı geri dönüşümsüz greft fonksiyon kaybı ve herhangi bir diyaliz modalitesine dönüş olarak tanımlandı. Ölüm-dışı greft kaybı, fonksiyonel greft ile hayatını kaybedenler olarak kabul edildi ve ilgili istatistiksel analizlerde greft kaybı olarak değerlendirilmedi.

İmmunsupresif Tedavi

İndüksiyon immunsupresif olarak hastaların immünolojik risklerine göre 500 mg metilprednizolon (günlük %50 doz azaltımı ile üç gün intravenöz) ile birlikte anti-timosit globulin (ATG) veya anti-CD25 antikor basiliximab kullanıldı. ATG, indüksiyon amacıyla kullanıldığında üç gün süreyle 2 mg/kg/gün dozunda, gansiklovir profilaksisi ile birlikte verildi. İdame immunsupresif olarak ise steroid, mikofenolat ve kalsinörin inhibitöründen oluşan üçlü tedavi uygulandı. Steroid dozu ilk ay 20 mg olup sonra altıncı ayda 5 mg olacak şekilde kademeli

olarak azaltıldı. Mikofenolat mofetil 1000 mg günde iki kez dozunda kullanılırken, Mikofenolik asit kullanıldığında ise doz 720 mg günde iki kezdi. Takrolimus plazma hedef düzeyi ilk üç ay için 7-9 ng/ml iken sonrasında 5-7 ng/ml, Siklosporin plazma hedef düzeyi ilk üç ay 250-300 ng/ml sonrasında ise 100-150 ng/ml idi.

İSTATİSTİK

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 20,0 istatistik paket programı kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama (\pm SD) ile belirtilip, verilerin karşılaştırmasında Student's t-test kullanılırken, kategorik değişkenler yüzde oran (%) olarak ifade edilip ki-kare veya Mann-Whitney-U testi uygun olduğu şekilde kullanıldı. Greft kaybı risk faktörlerinin değerlendirilmesi için multivaryans uygulandı. Korelasyon analizinde Spearman-rho testi kullanılarak klinik parametreler üzerine PRA pozitifliğinin etkileri değerlendirildi. Allogreft sağ kalım süresi değerlendirilip antikor varlığı ve HLA sınıflarının etkilerinin karşılaştırılması için Kaplan Meier testi kullanıldı. P değeri <0,05 (çift-tarafli) olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo I: Ölüm dışı greft kaybı üzerine etkili faktörlerin multivaryans analizi.

	Değişkenler	Rölatif Risk	P değeri
Greft Kaybı	Cinsiyet	,367	0,546
	Nakil Tipi	,012	0,913
	Mismatch	3,747	0,055
	İndüksiyon	3,433	0,067
	İdame Tedavi	,025	0,874
	PRA SINIF I ve II	2,864	0,093
	PRA SINIF I	,124	0,726
	PRA SINIF II	4,956	0,028
	Akut Rejeksiyon	95,383	<0,001

BULGULAR

Çalışma kohortunda toplam 111 hasta (41 kadın/ 70 erkek) değerlendirildi, ortalama yaş 39,4 \pm 11,5/yıldı. Olguların %74'üne canlı donörden nakil yapılmıştı, ortalama mismatch sayısı 3,2 \pm 1,5 idi. Hastaların ortalama takip süresi 29,9 \pm 16,5 aydı. Takip süresince beş hasta kaybı (%4,5) ve 16 greft kaybı vardı (%14,4), ölüm-dışı greft kaybı oranı %12,6 (iki hasta sepsis nedeniyle fonksiyonel greft ile kaybedilmişti) olarak saptandı. İmmünesupresif tedavi olarak indüksiyon amacıyla %46 ATG, %15 Basiliximab kullanılmış, %39 hastada ise indüksiyon kullanılmamıştı. İdame immünesupresif tedavi olarak %93 hasta tacrolimus, %7'si ise siklosporin kullanılmaktaydı.

İmmünolojik Değerlendirme Sonuçları

Böbrek nakli öncesi çalışılmış tepe PRA değerlendirmesinde, PRA Sınıf I+II pozitifliği hastaların %8'inde, PRA Sınıf I tek başına %21,5 ve PRA Sınıf II tek başına %22,5 hastada pozitif saptandı. Hastaların PRA Sınıf I yüzdelerinin ortalaması %10 \pm 11,9 iken Sınıf II' de bu oran %12,6 \pm 19,2 olarak bulundu. ATG kullanımı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde PRA Sınıf I (%25'e karşı %75, p<0,005) ve PRA Sınıf II (%20'ye karşı %80, p<0,001) antikoru olan hastalarda daha fazla bulundu. Ölüm-dışı greft kaybı ile ilişkili risk faktörlerini ortaya koymak için yapılan multivaryans analizinde, PRA Sınıf II pozitif olmak (p=0,028) ve akut rejeksiyon atağı (p<0,001) anlamlı bulundu (Tablo I).

PRA pozitif olan ve olmayan hastaların karşılaştırmalı olarak, greft kaybı ve ölüm-dışı greft kaybı değerlendirildiğinde, PRA Sınıf II pozitif olması, negatif olanlara göre anlamlı olarak greft kaybı ve ölüm-dışı greft kaybı ile ilişkili bulundu (sırasıyla p=0,028 ve p=0,008). PRA Sınıf I ve PRA Sınıf I+II pozitif olanlarda ise negatif olanlara kıyasla anlamlı bir farklılık yoktu (Tablo II). Benzer şekilde korelasyon analizinde PRA sınıflarına göre yapılan değerlendirmede sadece Sınıf II antikor varlığı; akut rejeksiyon gelişimi (p=0,016), kronik rejeksiyon gelişimi (p=0,029), birinci aydaki kreatinin yüksekliği (p=0,001) ve düşük glomerüler filtrasyon hızı (p=0,022) ile ilişkili bulunurken diğer sınıf antikorlarda benzer korelasyon yoktu.

Tablo II: PRA ile saptanan Anti-HLA antikor sınıflarının allogreft ve ölüm dışı allogreft kaybı ilişkisi.

PRA Testi ile saptanan Anti HLA antikor	Greft Kaybı		P değeri	Ölüm Dışı Greft Kaybı		P değeri	
	Var	Yok		Var	Yok		
PRA Sınıf I	Pozitif	%16,7	%83,3	0,72	%12,6	%87,4	0,98
	Negatif	%13,8	%86,2		%12,5	%87,5	
PRA Sınıf II	Pozitif	%28	%72	0,028	%28	%72	0,008
	Negatif	%10,5	%89,5		%8,1	%91,9	
PRA Sınıf I+II	Pozitif	%33,3	%66,7	0,12	%33,3	%66,7	0,085
	Negatif	%12,7	%87,3		%11	%89	

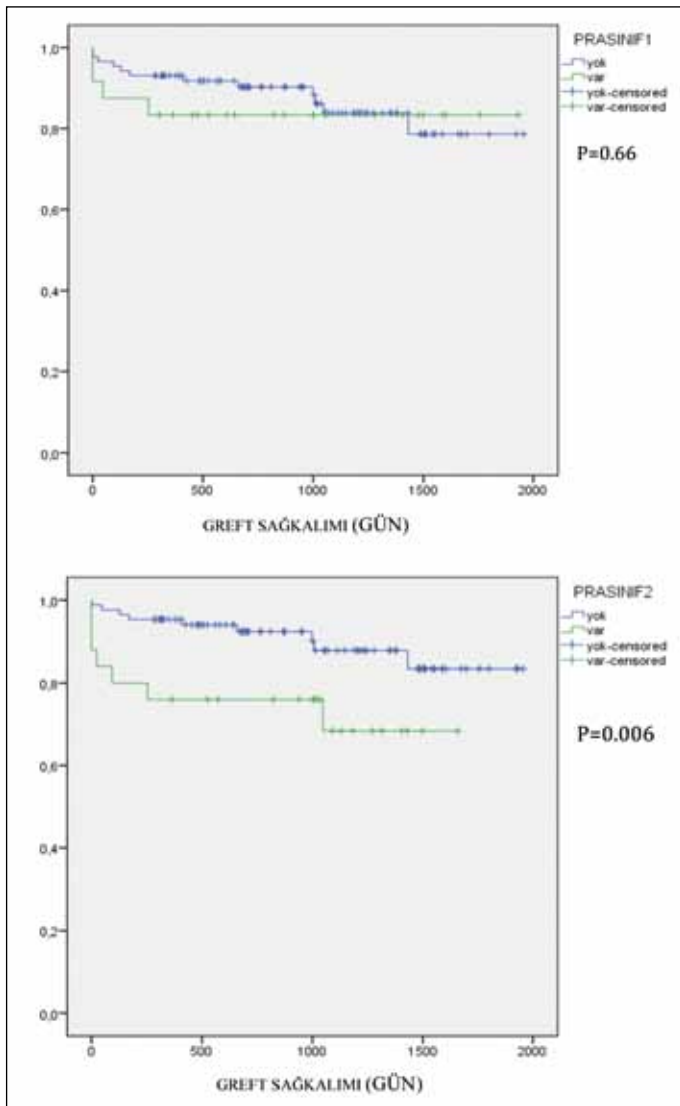
Kaplan Meier sağ kalım analizinde, ölüm-dışı greft sağ kalımı 1 ve 3. yılda sırasıyla PRA negatif hastalarda %97,6, %90 iken PRA Sınıf I pozitif olanlarda %92, %87, PRA Sınıf II pozitif olanlarda ise %76, %68 olarak bulundu. PRA Sınıf I pozitifliği greft sağ kalım süresini kısaltmazken ($p=0,66$), Sınıf II antikor varlığı bu süreyi anlamlı düzeyde kısaltmıştı ($p=0,006$) (Şekil 1). PRA Sınıf II antikor negatif olan hastalarda beklenen greft sağ kalımı ortalama 1800 ± 55 gün iken bu süre antikor pozitif olan hastalarda 1229 ± 138 gün olarak bulundu.

Patolojik Değerlendirme Sonuçları

Toplam 31 hastaya endikasyon doğrultusunda böbrek biyopsisi uygulandı. Böbrek biyopsilerinin tanısal dağılım ve özellikleri Tablo III' te verilmiştir. Patolojik tanıların panel reaktif antikor varlığına göre değerlendirilmesinde PRA Sınıf I

Tablo III: Endikasyon sonucunda yapılan böbrek biyopsilerinde patolojik tanıların dağılımı.

Tanı	Sayı/Yüzde
Akut Humoral Rejeksiyon	7- %22,6
Akut Hücresel Rejeksiyon	4- %12,9
Kronik Humoral Rejeksiyon	10- %32,2
Ürolojik/Enfeksiyöz	2- %6,5
Kalsinörin Toksisitesi	1- %3,2
BK Virüs Nefropati	1- %3,2
Diğer	6- %19,4



Şekil 1: Böbrek nakli öncesi PRA Sınıf I veya II antikoru bulunan hastaların bulunmayanlarla allogreft sağkalımı açısından kıyaslanması.

ve PRA Sınıf I-II pozitif olan ve olmayanlar arasında anlamlı bir fark bulunmazken, PRA Sınıf II pozitif olan hastalarda negatif olanlara göre anlamlı olarak daha fazla biyopsi kanıtı akut rejeksiyon (OR= 4,2, %95 güvenirlilik aralığı: 1,2-14,5, $p=0,016$) ve kronik antikor aracılı rejeksiyon (OR=4, %95 güvenirlilik aralığı: 1,07-15,3, $p=0,029$) olduğu bulundu. Banff 2011 kriterlerine göre skorlamada yer alan parametrelerin ayrıntılı olarak değerlendirmesinde (Tablo IV); PRA Sınıf II pozitif olan hastalarda anlamlı olarak peritübüler kapillerit skorunun daha yüksek olduğu ($0,44\pm0,78$ 'e karşı $1,55\pm1,12$, $p=0,008$). Benzer şekilde glomerülit+peritübüler kapillerit skorunun ≥ 2 olan hastaların daha fazla olduğu bulundu (%64'e karşı %36, $p=0,026$). HLA Sınıf II antikoru olanlarda C4d boyanması daha fazla saptanmasına rağmen farklılık istatistiksel anlama ulaşmamıştı (%26 ya %50, $p=0,187$). Transplant glomerülopati skoru ve transplant glomerülopati olanların oranı açısından üç PRA sınıfı ile PRA negatif olanlar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo IV).

TARTIŞMA

Bu çalışmada panel reaktif antikor düzeyi takibi ile saptanan tarihsel tepe PRA düzeylerinin böbrek naklinde allogreft üzerine etkileri değerlendirilmiş ve sonuçta tepe PRA Sınıf II antikor düzeyi %15' ten fazla olan böbrek nakli hastalarında akut rejeksiyon, kronik antikor aracılı rejeksiyon ve greft kaybı oranının anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur. Saptanan klinik sonuçlar, patolojik düzeyde, biyopsi kanıtı olarak HLA Sınıf II' ye karşı oluşan antikor aracılı immünolojik hasarı gösteren bulgular ile desteklenmiştir. PRA Sınıf I veya Sınıf I +II pozitif olanlarda ise greft üzerinde belirtilen olumsuz etkiler izlenmemiştir.

Böbrek naklinde her ne kadar hücresel allogenik immün yanıt anahtar rol oynasa da, antikor aracılı yanıtın etkileri göz ardı edilmeyecek düzeydedir. Pretransplant dönemde PRA yöntemi ile saptanan Anti-HLA antikorların; akut rejeksiyon, rejeksiyon sayısı, kronik rejeksiyon, greft kaybı, hatta yeni

Tablo IV: Banff 2011 Kriterlerine göre PRA Sınıf I ve II antikorların patolojik düzeyde etkileri.

	PRA Sınıf I Antikor		P değeri	PRA Sınıf II Antikor		P değeri
	Negatif	Pozitif		Negatif	Pozitif	
C4d Boyanma (+/-)	%30/%70	%50/%50	0,36	%26/%74	%50/%50	0,187
Glomerülit Skoru	0,59±0,85	0,14±0,37	0,18	0,28±0,57	0,82±0,98	0,073
Peritübüler Kapillerit	0,95±1,1	0,71±0,95	0,66	0,44±0,78	1,55±1,12	0,008
G+PTK Skoru (<2 vs. ≥2)	%60/%40	%71/%29	0,57	%78/%22	%36/%64	0,026
Transplant Glomerülopati Skoru	0,73±1,07	1,43±1,4	0,21	0,67±1,02	1,27±1,34	0,188
Transplant Glomerülopati (+/-)	%38/%62	%57/%43	0,39	%35/%65	%55/%45	0,33
İnterstisiyel İnfiltrasyon	1,45±0,74	1,01±0,2	0,07	1,33±0,77	1,36±0,50	0,90
Tubulit Skoru	0,41±0,59	0,43±0,53	0,83	0,44±0,61	0,36±0,50	0,81
İnterstisiyel Fibrozis	0,73±0,63	0,71±0,48	0,95	0,72±0,67	0,73±0,46	0,85
Tubuler Atrofi	0,91±0,75	1,01±0,57	0,73	0,83±0,70	1,09±0,70	0,33

(C4d boyanması: Peritübüler ve/veya glomerüller, zayıf veya kuvvetli boyanma, G+PTK: Glomerülit ve Peritübüler Kapillerit skorlarının toplamını yansıtmaktadır. C4d ve G+PTK skoru pozitif ve negatif hastaların yüzdesini yansıtır. Transplant glomerülopati ≥1 pozitif kabul edilmiş ve yüzde oran olarak karşılaştırma yapılmıştır.)

yayınlanan kesitsel bir çalışmada belirtildiği üzere kanser ve tüm nedenlere bağlı mortalite riskini artırdığı gösterilmiştir (3-6). Ancak bu olumsuzlukta iki antikor sınıfından hangisinin daha etkin rol oynadığı çok net değildir. Literatürde bilgi birikimi ve araştırmalar genelde ya sınıf ayrımı olmadan ya da HLA Sınıf I antikorlar ile ilişkilidir. HLA Sınıf II antikorların; allogreftte ekspresyonun kısıtlı olması, antijenlerin böbrek mikrovasküler sistemi dışında endotel hücreleri tarafından eksprese edilmesinden dolayı teknik olarak tespiti zordur (7,8). HLA Sınıf II antikorlar, sitotoksik metotlar ile sadece yüksek titrede antikor varlığı durumunda saptanabilirken, kullanımı gittikçe yaygınlaşan ELISA ve solid faz çalışmalar sayesinde artık Sınıf I antikor varken bile Sınıf II'ye spesifik antikor olup olmadığı tespit edilebilmektedir (3). Bu sayede, greft sağkalımı üzerinde göreceli olarak daha zayıf etkileri olduğu düşünülen sınıf II antikorların hem daha doğru tanımlanması hem de kısa ve uzun dönem bağımsız etkilerinin anlaşılması sağlanmıştır.

Mevcut çalışmamızda saptadığımız HLA Sınıf II antikorların varlığı ile artmış kronik antikor aracılı rejeksiyon ve greft sağ kalımında azalma benzer şekilde birden çok çalışmada ortaya konmuştur. Campos ve ark.nın yayınladığı 512 hastalık seride, Sınıf II antikor varlığı, greft fonksiyonlarında bozulma, kronik allogreft nefropati gelişimi ve greft sağ kalımında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (9). Issa ve ark.nın yaptığı, T hücre LÇK negatif, 598 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada pretransplant Anti-HLA Sınıf II antikorların transplant glomerulopatisi için risk artışına sebep olduğu,

antikor titresinin C4d pozitifliği ile doğru orantılı olduğu ve transplant glomerülopati olanlarda greft sağ kalımının azaldığı gösterilmiştir (10). Sınıf II antikorlar genel olarak kronik antikor aracılı rejeksiyon ile ilişkili olarak düşünülmesine rağmen erken dönemdeki olumsuz etkilerini ortaya koyan yayınlarda mevcuttur. Bizim serimizde PRA pozitif olmasından dolayı riskli olarak kabul edilen hastalarda daha fazla ATG kullanılmasına rağmen saptadığımız akut rejeksiyon oranındaki artış, Song ve ark.nın yayınladığı bir çalışmada benzer şekilde ortaya konmuştur (11). Bahsi geçen çalışmadaki pretransplant mevcut olan antikorlar bizim çalışmamızdan farklı olarak donöre spesifik olsa da, T hücre FCCM negatif olduğunda bile HLA Sınıf II antikorların akut antikor aracılı rejeksiyon nedeni olabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Her ne kadar teorik olarak solid faz teknikleri ile saptanan donöre spesifik antikor olması durumunda FCCM pozitif olması beklenirse de, bu her zaman olağan bir durum değildir. Düşük konsantrasyondaki antikorların LÇK pozitifliğine neden olmaksızın greft sağ kalımını olumsuz yönde etkileyebileceği çeşitli yayınlarda gösterilmiştir (12-14). FCCM negatif iken donöre spesifik antikorların pozitif olması solid faz çalışmaların daha sensitif olmasından kaynaklanabilir, mikroboncukların üzerinde bulunan saflaştırılmış HLA antijenleri donöre spesifik antikorların erişimini kolaylaştırıyor olabilir. (12). Patel ve ark.nın yaptığı bir çalışmada pretransplant donör spesifik antikor pozitif olan, CDC ve FCCM negatif hastalarda antikor aracılı rejeksiyon riskinin anlamlı düzeyde artmış olduğu gösterilmiştir, aynı zamanda bu hastaların %75' inde preoperatif

PRA pozitif saptanmıştır (15). Bu durumda PRA yöntemi ile saptanan antikorların allogreft üzerine olumsuz etkilerinin önemli bir bölümü, aslında yöntemin düşük özgüllüğü nedeniyle tam olarak tanımlanamayan donöre spesifik antikor varlığını işaret ettiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızdaki klinik-patolojik değerlendirmede klinik sonuçlarımızı destekler nitelikte; PRA Sınıf II pozitif olan hastalarda biyopsi kanıtı olarak akut rejeksiyon, kronik antikor aracılı rejeksiyon riskinin artmış olduğu göstermiştir. Banff 2011 kriterlerine göre yaptığımız detaylı analizde antikor aracılı immünolojik hasarın göstergeleri bakımından Sınıf II PRA pozitif olan hastaların biyopsilerinde, peritübüler kapillerit daha sık olduğu ve peritübüler kapillerit+glomerülit skorunun anlamlı olarak daha fazla hastada ≥ 2 olduğu gösterilmiştir. Sınıf I veya Sınıf I+II pozitif olanlarda bu etkiler izlenmemiş ve ilginç olarak her üç grupta transplant glomerülopati skoru PRA negatif olan hastalardan farklı bulunmamıştır. Daha önce Sınıf II antikorla transplant glomerülopati oranının doğru orantılı olarak arttığını belirten yayınlarla farklı olarak transplant glomerülopati sıklığının artmış olmaması nispeten çalışmamızda ki kısa takip süresine bağlı olabilir (10). Diğer bir antikor/kompleman aracılı immünolojik greft hasarını gösteren glomerüler ve/veya peritübüler kapiller C4d boyanması açısından HLA Sınıf II antikor pozitif olanlarda daha fazla pozitiflik bulunsa da istatistik anlama ulaşmamıştır. Bu durum olgu serimizdeki hasta sayısının nispeten düşük olması veya C4d boyanmasındaki metodolojik/teknik değişkenlere bağlı olabilir.

Mevcut çalışmamız her ne kadar anti-HLA sınıf II antikor varlığında, klinik olarak artmış allogreft rejeksiyon oranlarını, azalmış greft sağ kalımını gösterse ve bu sonuçlar patolojik bulgularla desteklenmiş olsa da; hasta sayısının diğer çalışmalara nispeten düşük olması, takip süresinin kısa olması ve saptanan antikorların, donöre spesifik olup olmadığının değerlendirilmemiş olması gibi limitasyonları vardır.

Sonuç olarak, PRA testi, özgüllüğü düşük olsa da nakil aday hastaların immünolojik değerlendirmesinin önemli bir parçasıdır. Pretransplant dönemde PRA yöntemi ile saptanmış HLA Sınıf II antikorları olan hastalar CDC ve/veya FCCM yöntemlerle çalışılan lenfosit çapraz karşılaştırma negatif olsa bile allogreft rejeksiyonu ve azalmış greft sağ kalımı riski taşırlar. Bu nedenle tarihsel olarak PRA pozitifliği olan hastaların, CDC/FCCM negatif olması durumunda bile Luminex, solid faz çalışmaları ile donöre spesifik antikor varlığı açısından araştırılmaları olası immünolojik risklerin tam anlamı ile değerlendirilebilmesi için gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Klein J, Sato A: The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:702-709
2. Fuggle SV, Martin S: Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation* 2008;86:384-390
3. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P: Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003;3:1488-1500
4. Terasaki PI, Ozawa M: Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: A prospective trial. *Am J Transplant* 2004;4:438-443
5. Süsal C, Döhler B, Opelz G: Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: A Collaborative Transplant Study report. *Hum Immunol* 2009;70:569-573
6. Lim WH, Chapman JR, Wong G: Peak panel reactive antibody, cancer, graft, and patient outcomes in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2015;99:1043-1050
7. Valenzuela NM, Reed EF: Antibodies in transplantation: The effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. *Methods Mol Biol* 2013;1034:41-70
8. Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM, Anderson SK: Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: Characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1336-1348
9. Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO, Gerbase-DeLima M: Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant* 2006;6:2316-2320
10. Issa N, Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Dean PG, Moore SB, DeGoey S, Stegall MD: Transplant glomerulopathy: Risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* 2008;86:681-685
11. Song EY, Lee YJ, Hyun J, Kim YS, Ahn C, Ha J, Kim SJ, Park MH: Clinical relevance of pretransplant HLA class II donor-specific antibodies in renal transplantation patients with negative T-cell cytotoxicity crossmatches. *Ann Lab Med* 2012;32:139-144
12. Gebel HM, Harris SB, Zibari G, Bray RA: Conundrums with FlowPRA beads. *Clin Transplant* 2002;16:24-29
13. Lobashevsky AL: Methodological aspects of anti-human leukocyte antigen antibody analysis in solid organ transplantation. *World J Transplant* 2014;4:153-167
14. Ishida H, Tanabe K, Furusawa M, Ishizuka T, Hayashi T, Tokumoto T, Miyamoto N, Shirakawa H, Shimmura H, Shimizu T, Toma H: Evaluation of flow cytometric panel reactive antibody in renal transplant recipients - examination of 238 cases of renal transplantation. *Transpl Int* 2005;18:163-168
15. Patel AM, Pancoska C, Mulgaonkar S, Weng FL: Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches. *Am J Transplant* 2007;7:2371-2377