

Böbrek nakli bekleme listesindeki hastalarda anti-HLA antikollarının tanımlanması

Identification of anti-HLA antibodies of patients in kidney transplantation waiting list

* Mustafa Soyöz,
* Tülay Kılıçaslan Ayna,
* Burcu Çerçi Gürbüz,
* Derya Güleç,
* Murat Kılıçoğlu,
* Ceren Yüksel,
* İbrahim Pirim

* Doku Tipleme Laboratuvarı,
Tepecik Eğitim ve Araştırma
Hastanesi, İzmir

Öz

Amaç: Kronik böbrek yetmezliğinin kesin tedavisinin böbrek nakli olduğu bilinmektedir. Bu yüzden böbrek nakil bekleme listesindeki hastaların nakil şansını düşüren veya nakil sonrası rejeksiyona sebep olabilen anti-HLA antikollarının profillerinin çok iyi belirlenmesi gerekmektedir. Anti-HLA antikollarının panel reaktif tarama ve tanımlama testlerinin sonuçlarına göre uygun donör seçilebilmekte, yüksek oranda duyarlılaşmış hastaların bile nakil şansı artırılabilir. Bu çalışmanın amacı, panel reaktif sınıf I ve sınıf II antikör tarama test sonuçları pozitif olan kronik böbrek yetmezliği tanısı konulan hastaların antikollarını tanımlayarak profillerini ortaya koymaktır. Gereç ve Yöntemler: Kronik böbrek yetmezliği tanısı ile laboratuvarımıza başvuran ve panel reaktif antikör tarama test sonuçları pozitif çıkan 150 hastanın serum örnekleri antikör tiplerinin tanımlanması için kullanıldı. 54 hasta yüksek oranda duyarlılaşmış olarak değerlendirildi. 96 hastanın antikör profilleri Luminex'e dayalı yöntemle tanımlandı. Lifecodes CI/II ID Kitleri kullanıldı ve çalışma prosedürü firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Bulgular: En fazla tespit edilen sınıf I anti-HLA antikolları A2 (%11,6), B7 (%5,2), sınıf II anti-HLA antikolları ise DR4 ve DR7 (%9,9) olduğu belirlendi. Ayrıca kadınlarda en çok DR4 (%12,4), erkeklerde ise DR11 (%9,7) tespit edildi. Hem kadın hem de erkek hastalarda en sık tespit edilen sınıf I antikörü ise A2 olarak tanımlandı (sırasıyla %11,5 ve %12,9). Sonuç: Elde edilen sonuçlar, toplumdaki antijen frekanslarıyla ilgili çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, birbirlerine paralel olduğu belirlendi. Fakat çalışmamızda yüksek oranda tanımlanan bazı antikolların (A33, A68, B7, DR9, DR10, DR8, DR17, DQ9, DR1) toplumda nadir görülen antijenlere karşı geliştirildiği tespit edildi. Bu HLA antijenlerinin diğerlerine göre daha antijenik olabileceğinin göz önünde bulundurulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kronik böbrek yetmezliği, anti-HLA antikolları, İnsan Lökosit Antijenleri

Abstract

Aim: It is known that the absolute treatment of chronic renal failure is renal transplantation. Therefore anti-HLA antibody profiles of the patients which can cause rejections after transplantation or diminish the transplantation chance of the patients in kidney waiting list should be broadly identified. According to the panel reactive screening and identification test results appropriate donor can be chosen and the transplantation chance of the highly sensitized patients can be diminished. The aim of this study is the detection of the antibody profiles of chronic renal failure patients whose panel reactive class I and class II antibody screening test results were positive. **Material and Methods:** In this study the blood samples of 150 chronic renal failure patients who were consulted to our laboratory and had positive panel reactive antibody positive test results were taken and the sera of the patients were obtained. 54 patients were evaluated as highly sensitized. Antibody profiles of 96 patients were identified by

Yazışma Adresi:
Yard. Doç. Mustafa Soyöz
İzmir Tepecik Eğitim Araştırma
Hastanesi Doku Tipleme
Laboratuvarı A Blok Kat 1,
Yenişehir, İzmir
Tel: (0232) 433 0608-1670/1671
e-mail: msoyoz@gmail.com

Luminex based methods. Lifecodes CI/II ID Kits were used and procedures were performed according to the instructions manuel. Results: According to results the most detected class I antibodies were against A2 (%11,6), B7 (%5,2), class II antibodies were against DR4 ve DR7 (%9,9) antigens. Moreover, DR4 (%12,4) and DR11(%9,7) were identified mostly in women and men, respectively. The most frequent detected class I antibody in both women and men patients were identified as A2 (%11,5 and %12,9, respectively). Discussion: It was estimated that the results were in parallel with the antigen frequency studies in Turkish population. But it was detected that some of the antibodies were produced against rare antigens in population (A33, A68, B7, DR9, DR10, DR8, DR17, DQ9, DR1). Thus it should be considered that these antigens could be more antigenic than the others.

Keywords: Chronic renal failure, anti-HLA antibodies, Human Leucocyte antibodies

Giriş

Duyarlılaşma, immün sistemin antijenik özellikli proteinlerle karşılaşmasından sonra gelişen bir dizi olaylar sonucu B lenfositlerde kalıcı hafıza oluşması ve tekrar karşılaşıldığında güçlü bir humoral cevabın verilmesi halidir (1). Kendinden olmayan insan lökosit antijenleri (HLA) ile duyarlılaşma, gebelik, kan transfüzyonları ve daha önceki nakil öyküsü ile oluşabilir (2). Antikorun sınıfı, aviditesi ve afinitesi, konağın immün durumu, immün savunmadaki hücre sunumunun tipine ve immünizasyonun gidiş yönüne göre farklılık gösterir.

Böbrek bekleme listesindeki hastalarda HLA antijenlerine karşı önceden oluşmuş antikorlar, hiperakut ve akut retlere sebep olmaktadır (3). Bunu önlemek için, rastgele bir antijen paneline karşı antikorların varlığını belirlemek amacıyla panel reaktif antikor (PRA) taraması yapılmaktadır (4). PRA testi ile duyarlılaşmanın derecesi ve antikor seviyesi belirlenebilir (5). PRA değerleri yüksek olan kişilerin düşük olanlara göre nakil başarısının daha az olduğu belirtilmektedir (4). PRA tanımlamaları hücre panelinin kompozisyonuna göre değişmektedir. Panelin boyutu yetersizse, toplumda bulunan yaygın doku uyumluluk antijenlerinin orantısız frekansını etkileyebilir (6). Günümüzde hem organ hem de kök hücre nakillerinden önce HLA antikorlarını belirlemede pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bu teknikler sayesinde daha detaylı bir antikor taraması yapılarak potansiyel immünolojik risk azaltılabilmektedir (7). Bu çalışmada kronik böbrek yetmezliği tanısı ile laboratuvarımıza başvuran, HLA sınıf I ve sınıf II antikorları bulunan hastaların antikorlarının tanımlanarak profillerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hasta Grubunun Demografik Bilgileri

Çalışma grubu, 2013-2015 yılları arasında Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarına kronik böbrek yetmezliği tanısı ile gelen ve hem sınıf I hem de sınıf II PRA sonucu pozitif olan 150 hastadan oluşturuldu. Hastaların demografik Bilgileri Tablo 'da verildi.

Tablo: Demografik Bilgiler

Toplam Hasta sayısı	150
Yaş ortalaması	47(±15)
Diyalize girenlerin sayısı	141 (%94)
Hemodiyaliz	137 (%97)
Periton Diyaliz	4 (%3)
Ortalama Diyaliz Süresi	7,8±5,2
Kadın hastaların sayısı	104 (%73)
Gebelik öyküsü pozitif olanları sayısı	80 (%77)
Doğum sayısı (ortalama-Std Sapma)	1,54 (±1,7)
Kürtaj sayısı (ortalama-Std Sapma)	0,39 (±0,8)
Düşük Sayısı (ortalama-Std Sapma)	0,31(±0,6)
Kan transfüzyonu öyküsü olanların sayısı	85 (%81,7)
Transplantasyon öyküsü olanların sayısı	34 (%32,7)
Kadavradan nakil	19 (%55,8)
Canlıdan nakil	15 (%44,2)
Erkek hastaların sayısı	46 (%27)
Kan transfüzyonu öyküsü olanların sayısı	35 (%76)
Transplantasyon öyküsü olanların sayısı	31 (%67)
Kadavradan nakil	17 (%54,8)
Canlıdan nakil	14 (%45,1)

Yöntem

Laboratuvarımızda rutin olarak PRA tarama testi yapılan hastalardan pozitif olanlar belirlenenlerden 150 kişinin -200C'de muhafaza edilen serumları antikor tanımlama testleri için kullanıldı. Çalışmadan bir gece önce serumlar +40C 'ye alınarak çözündürüldü ve testten önce oda sıcaklığına getirildi. Serumlar 15000 rpm'de 30 dakika çevrilerek teste hazır hale getirildi.

Luminex PRA Yöntemi

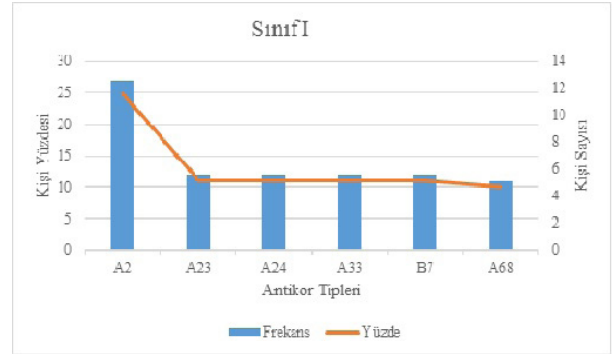
Bu yöntemde, Lifecodes CI/II ID Kitleri kullanıldı ve prosedür firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi (LIFECODES LifeScreen Deluxe for screening, class I and class II ID for identification, GenProbe, Stamford, CT, United States). Sınıf I/Sınıf II boncuk karışımındaki her bir boncuğun üzeri bir kişiden elde edilen HLA antijenleri ile kaplıdır. Test sürecinde boncuk karışımı ile inkübe edilen hasta serumu, bağlanmayan antikorların ve boncukların uzaklaştırılması için yıkandı ve her bir kuyuya konjugat eklendi. Luminex 200 Fluoroanalyzer cihazı (ABD) ve Lifecodes Matchit Antibody Software v1.2 programı kullanılarak analiz yapıldı.

Sonuçların Analizi

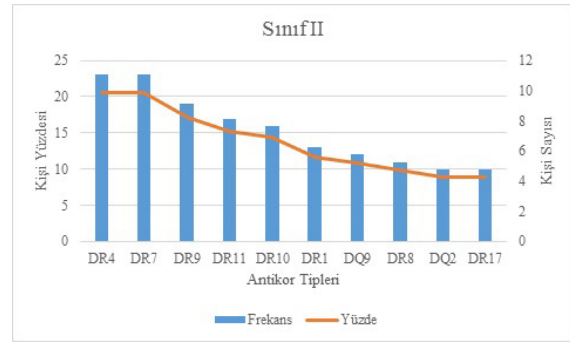
Kategoriye dayalı veriler n (%) olarak belirtildi. PRA pozitiflik oranları Pearson Ki Kare testi ve Frekans analizi ile yapıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.0 SPSS, (Chicago, Illinois) sürümü kullanılarak yapıldı.

Bulgular

PRA sınıf I ve II tarama sonucu pozitif olan 150 hasta serumu, HLA antijenlerine karşı oluşturulmuş antikorların tanımlanması için kullanıldı. 54 kişi sınıf I ve sınıf II antikor seviyelerine göre yüksek oranda duyarlılaşmış olarak değerlendirildi (>%90PRA). 96 kişinin sınıf I ve sınıf II PRA tanımlama test sonuçları incelendi ve antikorların görülme sıklıkları kişi sayısı ve yüzdesi olarak Grafik 1 ve Grafik 2 'de gösterildi (Grafik 1, Grafik 2). Çalışmamızda en fazla tespit edilen sınıf I anti-HLA antikorları A2 (%11,6), B7 (%5,2), sınıf II anti-HLA antikorları ise DR4 ve DR7'dir (%9,9) (Grafik 1, Grafik 2).

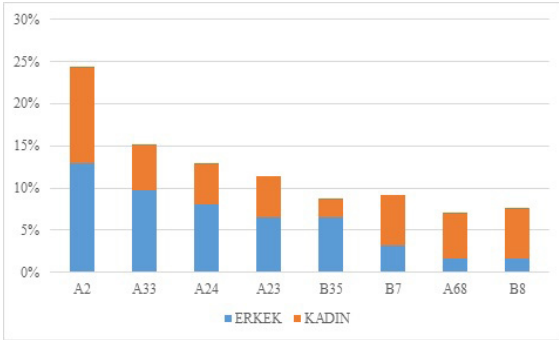


Grafik 1: Tanımlanan Sınıf I anti-HLA antikorları

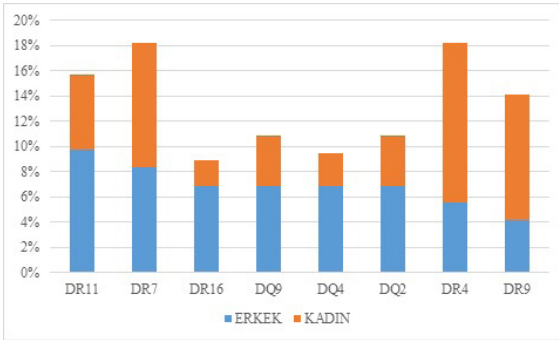


Grafik 2: Tanımlanan Sınıf II anti HLA antikorları

Tanımlanan HLA antikorları cinsiyete göre değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar Grafik 3 ve Grafik 4 'te gösterildi. Buna göre, hem kadın hem de erkek hastalarda en sık görülen sınıf I antikorları A2 (sırasıyla %11,5 ve %12,9) olarak belirlendi. Sınıf II antikorları değerlendirildiğinde kadınlarda en sık DR4 (%12,4), erkek hastalarda ise DR11(%9,7) tespit edildi. Cinsiyete göre HLA antikor üretim ilişkisi sınıf II antikorları için istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$) bulundu.



Grafik 3. Tanımlanan sınıf I antikorlarının tespit edilme oranlarının cinsiyetlere göre ayrımı



Grafik 4. Tanımlanan sınıf II antikorlarının tespit edilme oranlarının cinsiyetlere göre ayrımı

Tartışma

Kronik böbrek yetmezliği hastalarının dolaşımında bulunan anti-HLA antikorları, hiperakut ve akut retlere, dolayısıyla da organ nakillerinde başarısız sonuçlara sebep olabilmektedirler (8). Nakil öncesi yapılan 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 (4). PRA çoğunlukla duyarlılaşmanın derecesini belirlemek için kullanılmaktadır (5). PRA tanımlama testleri, hücre panelinin kompozisyonuna göre değişmektedir ve genelde popülasyonda en fazla görülen antijenler kullanılarak dizayn edilirler.

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 (9,10). 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 veya donöre özgül antikora sahip hastalarda greft ömrünün 3-5 yıl ile sınırlı kaldığı gösterilmiştir (11).

Karahan ve ark. sınıf I HLA antijenlerine karşı en sık A2, A68, Bw4, A23, A66, A69, A33, A24, B27, A26, A32, A25, A29, B57, B7 antikorlarını, sınıf II antijenlerine karşı DQ3, DR52, DR51, DQ5, DR4, DR9, DR11, DR1, DR12, DR53, DR8, DQ6 antikorlarını tanımlamışlardır (12). Özdemir ve ark. sınıf I için B56, A2, A34, A1, A23, A24, B61, sınıf II için DR11, DR14, DQ7, DR10, DQ5, DR1, DR7 antikorlarını en sık görülenler olarak tanımlamışlardır (13). Çalışmamızda en sık tanımlanan sınıf I antikor tipleri ise A2, A23, A24, A33, A68, B7 olarak sınıf II antikor tipleri ise DR4, DR7, DR9, DR11, DR10, DR1, DR8, DR17, DQ2, DQ9 olarak belirlendi ve diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında benzer sonuçların elde edildiği tespit edildi.

Erikoğlu ve arkadaşları Türkiye nüfusuyla yaptıkları bir çalışmada, en sık rastlanan HLA-A antijenlerini, A2,A24, A3, A1, A26,A11,A23 olarak tanımlamışlardır. B35, B51, B44, B18, B38, B27 ve B13 en sık görülen HLA-B antijenleri, DRB11, DRB4, DRB13, DRB3, DRB15, DRB7 ise en sık görülen DRB1 antijenleri olarak tanımlanmıştır (14). Arnaiz-Villena ve ark 2001 yılında Türkiye nüfusunda en sık A2, A24, A26, B35, B44, B51, DR4, DR7, DR11, DQ3, DQ1, DQ2 antijenlerine rastladıklarını bildirmişlerdir (15). Kayhan ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise A*2, A*24, B*35,B*52, DRB1*04, DRB1*11 en sık bulunan antijenlerdir (16). Saruhan Direskeneli ve ark da DRB1*1101 DRB1*0301, DRB1*0701, DQB1*0301, DQB1*02, DQB1*0302'yi en sık olarak tanımlamışlardır (17).

Çalışmamızda, Türk toplumunda yapılan allel frekansı çalışmalarında nadir olarak görülen A33, A68 ve B7 antijenlerine karşı da antikor oluşumu tespit edildi. Ayrıca DR9, DR10, DR8, DR17, DQ9, DR1 antijenlerinin de toplumda nispeten daha az sıklıkta görüldüğü fakat bu antijenlere karşı daha fazla antikor tanımlandığı bu çalışma ile gösterildi. Daha önce yapılan çalışmalarda HLA antijenlerinin

antijenitelerinin farklı olduğu, bu sebeple de bu antijenlere karşı daha sık antikor oluşturulduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda elde edilen bu farklılığın, antijenite farklılıklarından ileri geldiğini düşünmekteyiz. Yine monoklonal antikorlarla belirlenen HLA antijenlerinin epitop yapılarındaki farklılığın, antijenite üzerine etkilerinin olduğu bilinmektedir (18). Dolayısıyla HLA antijeniteleri ile ilgili çalışmalarda epitop analizlerinin gerekli olduğu kanısı son yıllarda daha da önem kazanmıştır. Çalışma grubumuzda tanımlanan HLA antikorlarının Türk toplumundaki HLA allel frekansları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Toplumda nadir görülen antijenlere özgü antikorların da daha az sıklıkta tanımlanabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak polimorfik olan HLA antijenlerine karşı oluşturulan HLA antikorları da çeşitlilik göstermektedir. Fakat bazı HLA antijenlerinin diğerlerine göre daha antijenik olduğu, bu sebeple de bu antijenlere karşı gelişen antikorların daha fazla tanımlandığı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Titiz İM. Renal Transplantasyona Pratik Yaklaşım (3. Baskı) İstanbul, 2010; 25-28
2. Fuggle SV, Martin S. Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation* 2008; 86 (3): 384-390.
3. Eng HS, Bennett G, Bardy P, Coghlan P, Russ GR, Coates PTH. 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 (8): 595-599
4. Nwakanma LU, Williams JA, Weiss ES, Russell SD, Baumgartner WA, Conte JV. Influence of Pretransplant Panel-Reactive Antibody on Outcomes in 8,160 Heart Transplant Recipients in Recent Era. *Ann Thorac Surg* 2007; 84 (5): 1556-1563
5. 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 (7): 2200-2201
6. Cruse JM, Lewis RE. Atlas of Immunology (2nd ed) Florida, CRC Press 2004; 579-610
7. O'Gorman MRG, Donnemberg AD. Handbook of Human Immunology (2nd ed), Boca Raton: CRC Press 2008; 63-107
8. Lopes, D, Barra T, Malheiro J, Tafulo S, Martins L, Almeida M et al. Effect of different sensitization events on HLA alloimmunization in kidney transplantation candidates. *Transplantation proceedings* 2015; 47 (4): 894-897.
9. Massan E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I et al. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Human Immunology* 2013; 74 (8): 946-951
10. 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
11. Zachary AA, Leffell MS. *Transplantation Immunology* (2nd ed) New York: Humana Press 2013; 41-62
12. Karahan GE, Seyhun Y, Oguz F, Kekik C, Onal E, Caliskan Y et al. Anti-HLA antibody profile of Turkish Patients with end-stage renal disease. *Transplantation proceedings* 2009; 41(9):3651-3654.
13. Ozdemir FN, Sezer S, Akçay A, Arat Z, Turan M, Gülmüş S et al. Panel reactive antibody positivity and associated HLA antibodies in Turkish renal transplant candidates. *Transplant immunology*, 2004;12 (2): 185-188
14. Erikoğlu M, Büyükdoğan M, Cora T. The relationship between HLA antigens and blood groups. *Eur J Gen Med* 2011; 8(1):65-68.
15. Arnaiz-Villena A, Karin M, Bendikuze N, Gomez-Casado E, Moscoso J, Silvera C et al. HLA alleles and haplotypes in the Turkish population: relatedness to Kurds, Armenians and other Mediterraneans. *Tissue Antigens* 2001; 57 (4): 308-317.
16. Kayhan B, Kurtoglu EL, Taskapan H, Piskin T, Sahin I, Otlu G et al. 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(6): 2123-2128.
17. Saruhan-Direskeneli G, Uyar FA, Bakar Ş, Eraksoy M. Molecular analysis of HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 polymorphism in Turkey. *Tissue Antigens* 2000; 55 (2): 171-174.
18. Resse M, Paolillo R, Minucci BP, Cavalca F, Casamassimi A, Napoli C. Epitope-specificities of HLA antibodies: The effect of epitope structure on Luminex technique-dependent antibody reactivity. *Human Immunology* 2015; 76; 297-300.