

Böbrek Naklinde Sanal (Virtual) “Cross-Match” Uygulaması

Application of Virtual Cross-Match in Kidney Transplantation: Review

Dr. Gonca Emel KARAHAN,^a
Dr. Çiğdem KEKİK,^a
Dr. Mahmut ÇARİN^a

^aTıbbi Biyoloji AD,
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 01.09.2010
Kabul Tarihi/Accepted: 08.11.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Gonca Emel KARAHAN
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji AD, İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
gonca.karahan@gmail.com

ÖZET Transplantasyonun hümorale teorisine göre allogreftlerin rejeksiyonu antikorların etkisiyle gerçekleşir. Bugüne dek yayınlanan pek çok çalışmada anti-HLA antikorlarının böbrek, kalp, karaciğer ve akciğer transplantasyonlarında akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon ve greft sağkalımı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Anti-HLA antikorlarının tespitinde tek HLA molekülleri ile kaplı solid faz immün (SFI) testlerin kullanıma girmesi antikor tespitinde özgüllüğü ve hassasiyeti artırmıştır. Bu kapsamda olan tek antijen akım sitometrik boncuklar ya da lumineks yöntemlerinin hassasiyetinin ELISA gibi renk değişimine bağlı yöntemlerden çok daha hassas olduğu, Lumineks yönteminin ELISA ile tespit edilenden iki kat daha fazla sıklıkta antikor tespit ettiği bildirilmiştir. Bir bireyde potansiyel bir donöre karşı oluşan antikorları yüksek hassasiyetle tespit edebilen bu yeni teknikler, “cross-match” sonuçlarının doğru bir şekilde öngörülmesini sağlama kapasitesindedir. “Sanal (virtual) cross-match (vXM)” terimi kullanıma yeni girmiş olmasına rağmen, bu uygulama aslında gerek Eurotransplant, gerekse “United Network for Organ Sharing (UNOS)” kapsamındaki merkezlerde uzun yıllardır izlenen bir yaklaşımdır. vXM, bir alıcının anti-HLA antikor spesifisitesinin, potansiyel bir vericinin HLA doku grubu ile karşılaştırılması sonucu, bu verici ile yapılacak olan “cross-match” test sonucunun önceden tahmin edilmesidir. Bu derleme, sanal “cross-match” yaklaşımının böbrek nakli öncesi risk değerlendirmesi ve organ dağıtımındaki rolü üzerine odaklanırken, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri’nde yüksek oranda sensitize hastalara nakil yapılabilmesi için izlenen stratejiler hakkında genel bilgi vermeyi hedeflemektedir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek transplantasyonu; doku uyumluluğu testi

ABSTRACT According to the humoral theory of transplantation, allografts are rejected by the action of antibodies. Many studies upto date have demonstrated the significant association of anti-HLA antibodies with acute rejection, chronic rejection and graft survival in kidney, heart, liver and lung transplantations. Sensitivity and specificity of anti-HLA antibody detection have dramatically increased by the introduction of solid phase immune tests covered with single HLA molecules. It has been demonstrated that bead based fluorometric assays are more sensitive than colorimetric enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), and the presence of DSA detected by Lumineks based testing is nearly twice as often as by ELISA. These techniques which can detect anti-HLA antibodies with high specificity have the potential to provide accurate prediction of cross-match outcome of a patient with a particular donor. Use of virtual cross-match (vXM) is not new, although the term has only been applied in recent years and has been in used both in centers of United Network for Organ Sharing (UNOS) and Eurotransplant for many years. The prediction of cross-match outcomes based on precharacterized antibody specificities is referred as “virtual cross-match”. This review is focused on the role of virtual cross-match approach in pre-transplantation risk estimation and organ sharing and aims at describing the strategies for the transplantability of highly sensitized patients in Europe and United States.

Key Words: Kidney transplantation; histocompatibility testing

ANTI-HLA ANTİKORLARI VE TRANSPLANTASYON

Transplantasyonun hümorale teorisine göre allogreftlerin rejeksiyonu antikorların etkisiyle gerçekleşir. Bugüne dek yayınlanan pek çok araştırmada, anti-HLA antikorlarının böbrek, kalp, karaciğer ve akciğer transplantasyonlarında akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon ve greft sağkalımı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi olduğu bildirilmiştir.¹ Hümorale teorinin yaratıcısı Terasaki'nin pek çok yayınında referans olarak kullandığı Lee ve ark.na ait bir çalışmada, anti-HLA antikorlarının varlığına rağmen greftleri fonksiyone olan hastalarda, komplemana bağlı sitotoksikite [complement dependent cytotoxicity (CDC)] testi nakil öncesi donör spesifik antikor (DSA) tespitinde altın standart olmuştur.² Bu test nakilden sonraki dakikalar saatler içerisinde ortaya çıkan antikor aracılı hiperakut rejeksiyonu neredeyse tamamen ortadan kaldırmıştır. Ancak, CDC cross match (XM) yöntemi nakilden saatler, günler sonra oluşan allogreft rejeksiyonu ve greft kaybı ile ilişkili düşük seviyedeki DSA'ları tespit etmek için yeterli hassasiyete sahip değildir.³ Bu sebeple, daha hassas olan akım sitometri [flow cytometry (FC)] XM birçok nakil merkezinde DSA tespitinde kullanılan mevcut en iyi hücresel test olarak kabul edilmektedir. FC-XM, CDC'ye göre daha hassas olmakla birlikte, transplantasyon açısından anlamlı olmayan antikorların özgül olmayan bir şekilde hücre yüzeyine bağlanmaları nedeni ile yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir.⁴

Anti-HLA antikorlarının tespitinde tek HLA molekülleri ile kaplı solid faz immün (SFI) testlerin kullanıma girmesi antikor tespitinde özgüllüğü ve hassasiyeti artırmıştır. Bu kapsamda olan tek antijen akım sitometrik boncuklar ya da lumineks yöntemlerinin hassasiyetinin ELISA gibi renk değişimine bağlı yöntemlerden çok daha hassas olduğu, lumineks yönteminin ELISA ile tespit edilenden iki kat daha fazla sıklıkta antikor tespit ettiği bildirilmiştir.⁵⁻⁷ Bir bireyde potansiyel bir donöre karşı oluşan antikorları yüksek hassasiyetle tespit edebilen bu yeni teknikler, "cross-match" sonuçlarının doğru bir şekilde öngörülmesini sağlama kapasitesindedir.

"Sanal (virtual) cross-match (vXM)" terimi kullanıma yeni girmiş olmasına rağmen, bu uygulama aslında gerek Eurotransplant gerekse "United Network for Organ Sharing (UNOS)" kapsamındaki merkezlerde uzun yıllardır izlenen bir yaklaşımdır. vXM, bir alıcının anti-HLA antikor spesifisitesinin, potansiyel bir vericinin HLA doku grubu ile karşılaştırılması sonucu, bu verici ile yapılacak olan "cross-match" test sonucunun önceden tahmin edilmesidir. Bu derleme, sanal "cross-match" yaklaşımının böbrek nakli öncesi risk değerlendirmesi ve organ dağıtımındaki rolü üzerine odaklanırken, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yüksek oranda sensitize hastalara nakil yapılabilmesi için izlenen stratejiler hakkında genel bilgi vermeyi hedeflemektedir.

Günümüzde transplantasyon merkezlerinin karşı karşıya kaldığı en önemli konu, yüksek oranda sensitize hastaların transplantasyonudur. Gebelikler, kan transfüzyonları ve daha önceki nakiller nedeni ile çok sayıda HLA antijenine karşı antikor geliştirmiş olan bu hastaların nakil edilebilirliğini artırmak için uzun yıllardır büyük çabalar sarf edilmektedir. Esas itibarıyla bu hastaların nakil olmasına yardımcı olacak iki yaklaşım vardır: Bunlardan biri hastaya "cross-match" negatif bir donör bulmak, diğeri ise antikorların temizlenmesi ve DSA varlığına rağmen hastaya nakil yapmaktır. Bu hastalara "cross-match" negatif donör bulmak adına organ dağıtımında Avrupa'da (Eurotransplant) hiperimmün plaklarda "cross-match" testine ek olarak kabul edilebilir uyumsuzluklar (acceptable mismatches) yaklaşımı, ABD'de (UNOS) ise preliminere "cross-match" testine ilaveten kabul edilemeyen uyumsuzluklar (unacceptable mismatches) yaklaşımı uygulanmaktadır.⁸

KABUL EDİLEBİLİR UYUMSUZLUK YAKLAŞIMI-EUROTRANSPLANT

Eurotransplant dâhilindeki ülkelerde uygulanan kabul edilebilir uyumsuzluk programının hedefi özellikle yüksek oranda sensitize hastaların hiç HLA antikoru oluşturmadığı HLA antijenlerinin belirlenmesi ve böylece bu hastalar için "cross-match" negatif olan donörlerin tanımlanması ve organ dağıtımında bu hastalara öncelik verilmesidir. Eurotransplant'ta HLA-A, -B, -C, -DR ve -DQ lo-

kusları için kabul edilebilir uyumsuzluklar belirlenmektedir. Şekil 1’de, 50 donör hücresiyle yapılan bir panel reaktif antikör testinde 2 donör hücresi ile negatif reaksiyon veren bir hasta örneği için kabul edilebilir uyumsuz antijenler görülmektedir. Kabul edilebilir uyumsuz antijenler hastanın serumunun reaksiyon vermediği, yani antikör oluşturmadığı antijenlerdir.⁹

Yüksek oranda sensitize hastalar, CDC testinde %85 ve üzeri oranda panel reaktif antikora sahip hastalar olarak tanımlanır. Ancak, yüzde panel reaktif antikör (PRA) değeri daha önceden tanımlandığı kadar güvenilir bir belirteç değildir. Eurotransplant dâhilinde yapılan kalite kontrol testleri aynı serumun yüzde PRA değerinin farklı laboratuvarlar arasında %5-80 arasında değişiklik gösterdiğini, buna karşılık HLA antikör spesifitesinin oldukça uyumlu olduğunu ortaya koymuştur. Sensitizasyon derecesini tanımlamanın en iyi şekli, bir hastanın HLA antikörlerinin bir donör popülasyonundaki hedef antijenlerin frekansına göre değerlendirilmesidir ki, buna “sanal (virtual) PRA” denmektedir (%PRA= % popülasyon reaktif antikörler). Sanal PRA uygulaması ile yüzde PRA değerleri arasındaki fark ortadan kalkmakta ve bir hastanın anti-HLA antikoru geliştirdiği allellerin gen frekanslarının bilinmesi ile geleneksel PRA değerinden daha doğru bir şekilde anti-HLA reaktivitesini yansıtan “sanal PRA yüzdesi” hesaplanabilmektedir. Eurotransplant virtual PRA hesaplama programına <http://eurotransplant.nl/cms/index.php> adresinden erişilebilmektedir.¹⁰

Sanal PRA değerleri %85 ve üzeri olan hastaların nakil olabilmeye ihtimalleri kabul edilebilir

Hasta	A3	A24	B8	B35	Cw2	Cw8
1. donör	A2	A24	B7	B35	Cw2	
2. donör	A11	A24	B39	B39	Cw4	Cw8

Kabul edilebilir uyumsuz antijenler

↓

A2, A11, B7, B39, Cw4

ŞEKİL 1: Yüksek oranda sensitize bir hasta için kabul edilebilir uyumsuz antijenler.

uyumsuzluk programına dâhil edilmeleri ile anlamlı derecede artmıştır. Bu hastaların %60’ı programa dâhil olduktan sonraki 2 yıl içerisinde nakil olmuştur. Nakil olan hastalarda yalnızca kısa dönem değil, uzun dönem sonuçların da mükemmel olduğu bildirilmiştir.¹¹

KABUL EDİLEMEYEN ANTİJENLERİN TANIMLANMASI-UNOS

Kabul edilemeyen antijenlerin tanımlanması ve buna bağlı olarak potansiyel bir donörle yapılacak nihai “cross-match” sonucunun öngörülmesi ilk olarak Terasaki tarafından isteğe bağlı kullanımı olan bir bilgisayar programı vasıtasıyla uygulanmış, sonrasında ise bu program kullanılarak alıcı-verici eşleştirmesi yapmak UNOS tarafından zorunlu hale getirilmiştir.¹²

Kabul edilemeyen antijenler transplantasyon için kontrendikasyondur. Bu antijenlerin immünolojik riski nakilden sağlanacak potansiyel faydadan çok daha fazladır. Bu antijenlere bağlı risk değerlendirmesi yapılırken, uygulanan transplant protokolü ile hasta ve donörün özellikleri beraber değerlendirilmelidir. İmmünolojik riski etkileyen faktörlere Tablo 1’de yer verilmiş olup, DSA varlığı riski artıran faktörlerin en başında gelmektedir.¹³ Nakil öncesi dönemde DSA varlığı ya da bu antikörlerin nakil sonrası dönemde gelişimi antikör aracılı rejeksiyon için anlamlı bir risk faktörüdür. Kabul edilemeyen antijenler ve buna bağlı DSA varlığı ile immünolojik riskin değerlendirilmesi basit bir EVET-HAYIR cevabı değildir. DSA’nın titresi, immünglobulin tipi, hasta ve donörün HLA grupları, hastanın sensitizasyon geçmişi ile daha önceki periyodik PRA durumu ve kullanılan teknikler risk değerlendirmesinde önemli yer tutar (Tablo 2).

SANAL (VİRTUAL) "CROSS-MATCH" UYGULAMASI

Lumineks ya da flow sitometri tek antijen boncuklar kullanılarak yapılan anti-HLA antikör testlerinden elde edilen ayrıntılı HLA spesifisite ve buna bağlı olarak kabul edilebilir/kabul edilemez antijenlerin tanımlanarak, potansiyel bir donörün HLA fenotipine göre bu donörle yapılacak nihai “cross-match” sonucunun öngörülmesine “**sanal**

TABLO 1: İmmünolojik riski etkileyen faktörler.

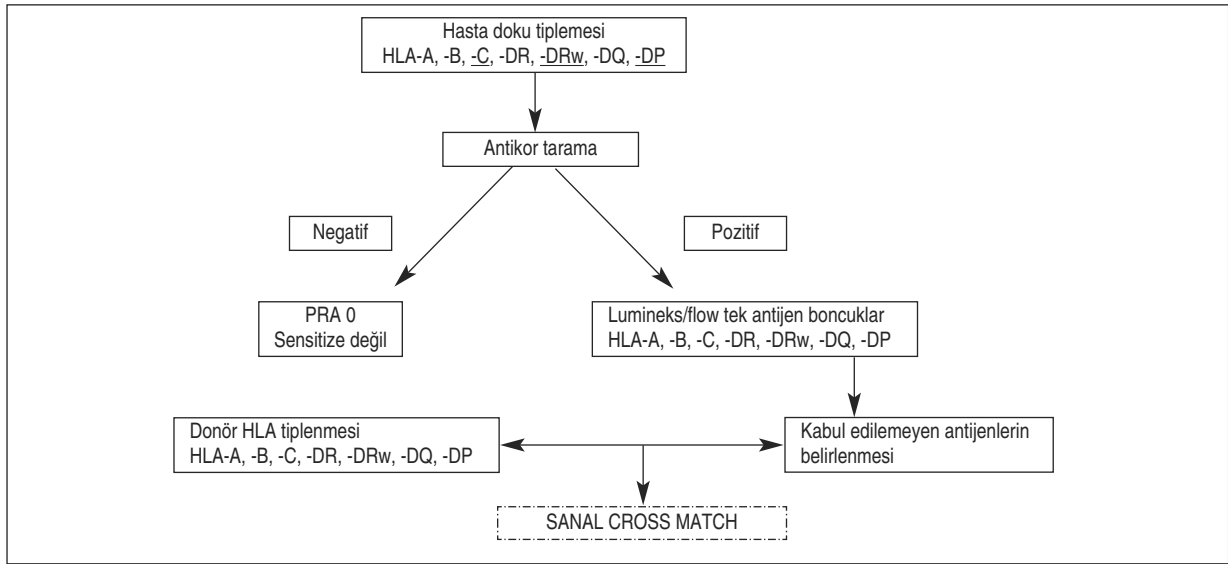
İmmünesüpresyon	Risk üzerine etkisi	Hasta	Risk üzerine etkisi	Donör	Risk üzerine etkisi
İndüksiyon tedavisi	↓	DSA varlığı	↑	Kadavra donör	↑
Desensitizasyon	↓	Sensitizasyon hikâyesi	↑	Uzun soğuk iskemi zamanı	↑
Hücre-eksiltme tedavileri (T-cell depletion)	↓	Önceki erken rejeksiyon	↑	Çok sayıda HLA uyumsuzluğu	↑
		Yüksek sCD30 seviyeleri	↑	Canlı donör	↓
		Yanıt seviyesi yüksek sitokin genotipi	↑	İyi HLA uyumu	↓
				Uyumsuzlukların "kabul edilebilir- acceptable mismatch" olması	↓

TABLO 2: Risk değerlendirmesinde dikkate alınması gereken unsurlar.

Kriter	Özellik	Risk değerlendirmesi üzerine etki
	Seviye	Risk güç ile doğru orantılıdır
DSA	Zamanlama	Aktüel antikor tam risktir, historik antikor ise potansiyel risktir
	Ig sınıfı	IgG bilinen bir risktir, IgM'nin riski bilinmemektedir
HLA tiplmesi	Donör ve alıcı	HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DRB3-5, -DQ, -DP'nin tümünün tiplenmesi tüm uyumsuzlukların tanımlanmasına olanak sağlar
Antikor tarama ve tanımlama	Solid faz immün testler	HLA'ya özgü mevcut antikorların optimum şekilde tespitine ve karakterizasyonuna olanak verir; XM sonuçlarının anlamlı bir şekilde öngörülmesini sağlar
	Fenotip hedefleri	HLA'ya özgü mevcut antikorların spesifitesinin ve gücünün belirlenmesini sağlar
"Cross-match" testleri	Tek antijen hedefler	Yüksek oranda reaktif serumda maskelenmiş spesifitesileri tanımlar
	Titrasyon	Antikor gücünün tanımlanması
	Teknik	Yüksek hassasiyetli teknikler DSA tespitini ve komplemanı aktive etmeyen DSA tespitini optimize eder
Hasta geçmişi	Bilinen ve potansiyel sensitize edici olayların tanımlanması	Risk değerlendirmesini iyileştirir
	Antikor tarama	Risk ile ilgili bilgi hastaya düzenli antikor testi yapılan süre ile doğru orantılıdır

(virtual) cross-match” denir. Başka bir deyişle, bir hastaya ait anti-HLA antikor sonucu ve sensitizasyon bilgisine bakılarak, HLA doku tipi bilinen bir donörle yapılacak “cross-match” sonucunu tahmin etmek olan vXM, her HLA laboratuvarında uygulanan eski bir yaklaşımdır (Şekil 2). En son geliştirilen test teknolojilerinin (Lumineks, flow sitometri tek antijen boncuklar) kullanıldığı anti-HLA

antikor testlerinin sonuçlarına göre yapılan sanal “cross-match” öngörülerinin aktüel CDC-XM sonuçları ile korelasyonu kötüyken, aktüel FC-XM sonuçları ile korelasyon %85'in üzerindedir. Tambur ve ark.na ait bir çalışmada, vXM'nin FCXM ile olan negatif ve pozitif prediktif değerlerinin sırasıyla %91.1 ve %94.8 olduğu bildirilmiştir.¹⁴ vXM sonuçlarının FC-XM ile yüksek, CDC-XM ile dü-



ŞEKİL 2: Sanal "cross-match" uygulamasında işlem akışı.

şik korelasyon göstermesinin nedeni CDC-XM'nin hassasiyet ve özgüllüğünün vXM için kullanılan antikor testlerinden düşük, FC-XM'nin ise benzer olmasıdır.^{15,16}

NEGATİF SANAL "CROSS-MATCH"

Bielmann ve ark.na ait bir çalışmada, negatif vXM'si olan 56 hastanın yalnızca 2'sinde (%4), nakil sonrası ilk 6 aylık dönemde klinik/ subklinik antikor aracılı rejeksiyon gözlenmiştir.¹⁷

Negatif bir vXM, erken antikor aracılı rejeksiyon açısından düşük bir risk göstergesi olsa da bu riskin sıfır olmadığı unutulmamalıdır.

YANLIŞ NEGATİF SANAL "CROSS-MATCH"İN SEBEPLERİ

vXM, HLA antikorları üzerinden yapılan bir öngörüdür. Ancak, endotelial hücre, MICA, glutatyon-S- transferaz, anjiyotensin reseptör ve minör HLA antikorları gibi erken allogreft rejeksiyon ve/veya antikor aracılı rejeksiyon ile ilişkisi bildirilmiş olan donöre özgü HLA-dışı antikorlar değerlendirme dışında kalmakta ve bunlara bağlı pozitiflikler atlanabilmektedir.¹⁸⁻²² Bu sebeple, HLA-dışı antikorlar yanlış negatif sanal "cross-match" in sebeplerinden bir tanesidir.

Yanlış negatif vXM'nin bir diğer sebebi ise donörün HLA doku tiplemesinin tam olmamasıdır. Mevcut tek antijen boncuk panelleri HLA-A, -B, -

Cw, -DR, -DQ ve -DP lokuslarına ait en yaygın HLA allelerini içerir. Dolayısıyla bir hastanın bu lokuslara ait anti-HLA spesifisiteri belirlenebilmektedir. Ancak, bir donörün yukarıda belirtilen tüm lokuslar için HLA tiplemesi yapılmadığı sürece, potansiyel DSA'ların tümü doğru bir şekilde belirlenemeyecek ve vXM öngörüsü yanlış negatif olacaktır. Yanlış negatif vXM uygulamasına ABD'den ve ülkemizden birer örnek verebiliriz.

Örnek 1: UNOS kurallarına göre, PRA'ları %20-80 olan alıcılara ya da pediatrik hastalara HLA-A, -B, -DR açısından hiç uyumsuzluğu olmayan böbrekler (0 mismatch) dağıtılmaktadır. UNOS kapsamındaki tüm kadavra donörlere 2000 yılından itibaren PCR SSP yöntemi ile HLA-A, -B, -DR tiplemesi, 2007 yılından itibaren ise bunlara ek olarak HLA-C ve HLA-DQ tiplemesi yapılması zorunlu hale getirilmiştir. Buna rağmen Şubat 2008 tarihinde bir kadavra donöre ait böbrek HLA-C tiplemesi olmaksızın (Donör HLA: A3; B8, B35; DR1, DR17; DR52) Sınıf I HLA-A, B-, C sensitizasyonu olan ve kadavra donörü ile hiç uyumsuzluğu olmayan (1. alıcı aday HLA: A2, A3, B8, B35, DR1, DR17, DR52) adayların bulunduğu bir merkeze gönderilmiştir. Bu dağıtım, bu kadavra donörün alıcı adayları ile negatif "cross-match" olacağı öngörüsüne göre yapılmış ancak, 1. alıcı adayının flow sitometrik "cross-match" sonuçları

B (+) ve T(+) çıkmıştır (soğuk iskemi süresi 19 saat). Bu hastadan vazgeçilmiş ve ikinci bir aday nakile hazırlanmıştır. Bu noktada soğuk iskemi süresi 27 saate uzamıştır. Birinci adayın negatif vXM'sine rağmen aktüel FC-XM'sinin pozitifliğini çözümlenmek adına kadavra donörün HLA-C doku grupları tiplenmiş ve donörün Cw4, Cw5'inin olduğu ve bu hasta için bu antijenlerin kabul edilemeyen C antijenleri listesinde olduğu gözlenmiştir. Kadavra donörün HLA-C doku tiplemesinin olmaması nedeni ile DSA yok gibi düşünülerek vXM negatif bulunmuştur.²³

Bryan ve ark.na ait çalışmada sensitize son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) olan hastaların %49'unda HLA-C antikoruna olduğu bildirilmiştir.²⁴ İstanbul Tıp Fakültesi (İTF) bekleme listesi hastalarında da bu oran %49'dur.^{25,26} Tüm bu veriler, kadavra donörlerde HLA-C lokusu tiplemesinin gerekliliğini gösterecek anlamlılıktadır.

Örnek 2: Mart 2010 yılında İTF'ye gönderilen bir kadavra donör ile 1A 1B 1DR uyumu olan bir nakil adayının FC-XM sonucu T(-) ve B(+) çıkmıştır. Nakil adayının anti-HLA DQ5 ve DQ9 (3) antikorunun olması nedeni ile kadavra donöre HLA-DQB1 tiplemesi yapılmıştır. Üç saat süren testin sonucunda donörün DQB1*03 ve DQB1*06'sının olduğu ve hastanın DQ antikorlarının (DQB1*03) donöre özgü olduğu tespit edilmiş ve bu adaya nakilden vazgeçilmiştir. İTF bekleme listesindeki sınıf II HLA sensitize hastaların %56'sında anti-DQ antikoruna olduğu göz önünde bulundurulduğunda, kadavra donörlerde HLA-DQ tiplemesinin gerekliliği ortadadır.²⁵

vXM'nin yanlış negatif olma sebeplerinden bir diğeri ise alıcının donöre özgü antikorunun bir HLA allelinin spesifik bir epitopuna karşı olması ve bu epitopun antikor test panelinde olmamasıdır. Bu durum teorik olarak mümkün olsa da pratikte pek mümkün değildir, çünkü mevcut tek antijen boncuk panelleri serolojik olarak tanımlanmış tüm HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ ve -DP antijenlerinin en prevalan allellerini içermektedir.

Serumdaki IgM antikorları ve bilinmeyen diğer bazı maddeler de IgG tipi antikorların tespitini engelleyerek yanlış negatif vXM'ye neden olabilir.²⁷

POZİTİF SANAL "CROSS-MATCH"

Tek antijen boncuk testleriyle HLA-DSA tespit edilen hastalarda antikor aracılı rejeksiyon insidansı anlamlı derecede yüksektir. Çok düşük seviyelerdeki DSA'lar bile antikor aracılı rejeksiyon açısından bir risk faktörü olabilirler.²⁴ Tek antijen boncuklarla tespit edilen HLA-DSA varlığına rağmen CDC-XM veya FC-XM ile negatif sonuç veren hastalarda, transplantasyon ile ilişkili kesin riski belirleyebilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

YANLIŞ POZİTİF SANAL "CROSS-MATCH"İN SEBEPLERİ

Tek antijen boncuk test tekniği ile ilgili bazı sorunlar nedeni ile yanlış pozitif vXM'ler ortaya çıkabilir. Üretim esnasında denatüre edilen HLA moleküllerinde "in vivo" var olmayan epitopların ortaya çıkması ve DSA'ların bu epitoplara bağlanması yanlış pozitif vXM'ye neden olabilir. Ancak bu DSA'lar patojenik değildir.

İkinci bir sebep ise bu test teknikleri ile tespit edilen HLA-DSA'ların donörün HLA moleküllerine bağlanmalarına rağmen klinik anlamlılıklarının kısıtlı olmasıdır. Morris ve ark.na ait bir çalışmada, tek antijen boncuklarla tespit edilen antikorların "gücünün" klinik anlamlılık ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Tanımlanan bir HLA antikorunun "gücü" XM'nin önemli bir göstergesidir.²⁸

Antikorların gücünün belirlenmesi ortalama floresan yoğunluğu [mean fluorescence intensity (MFI)]'na göre yapılmaktadır. Bir antikorun gücünü belirlemede iki analiz tipi vardır:

- 1) Anti-HLA antikorunu tanımlayan tek bir antijen boncuğuna ait MFI,
- 2) DSA'ya ait MFI'nın pozitif kontrol MFI'sı ile bölünmesi sonucu oluşan oran.

MFI < 2000 ya da MFI oranı < 0.2 olan ve zayıf reaksiyon veren DSA'lar pozitif XM ile sonuçlanmaz ve transplantasyon için kontrendikasyon olmayabilir. Ancak bu testlerdeki eşik (cut-off) değerler için standart bir uygulama yoktur. Her laboratuvar kendi kalite kontrol testleri ve test içi kontrollerle en uygun "cut-off" değerini belirlemelidir.²⁸

HLA-DSA'ların klinik etkilerini öngörecektir olan ve tek antijen boncuk testleri ile tespit edilen tüm DSA'ların özelliklerini tanımlamak çok önem-

lidir. Bazı çalışmalar, HLA-DSA'nın miktarı klinik sonuçları ile ilişkilidir, derken başka iki çalışma bu bulguyu doğrulamamıştır.²⁹⁻³² Çalışmalarda, sensitizasyon yolunun (hamilelik, kan transfüzyonu, transplantasyon) antikor aracılı rejeksiyon gelişimi ve şiddeti ile ilişkili olmadığı ve DSA'nın Sınıf I ya da II olmasının prekdiktif olmadığı bildirilmiştir.^{29,31,32} Ancak yeni bir çalışma, pretransplant sınıf I-DSA varlığının antikor aracılı rejeksiyon gelişimi ile ilişkili olduğunu, sınıf II DSA için ise böyle anlamlı bir ilişki saptanmadığını bildirmiştir.³³ Mevcut solid faz immün testler ya da FC-XM ile HLA-DSA'ların klinik önemini öngörmek zordur.

Çeşitli çalışmalar, HLA-DSA'ların komplemanı aktive etme kapasitesinin, antikorların klinik etkileri açısından önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. HLA-DSA'ların kompleman aktivasyonlarını ölçen *in vitro* testlerin klinik ilişkiyi tanımlamada anlamlı olabileceği bildirilmektedir.³⁴

Nakil sonrası dönemde artmış HLA-DSA üretimi antikor aracılı rejeksiyon gelişimi ile ilişkilidir.¹ Bu bulgu alloantikor üreten hücrelerin hafıza yanıtının aktivasyon ve büyüklüğünün, sonradan ortaya çıkacak sonuçlar için anahtar bileşen olduğunu düşündürmektedir.^{32,35} Ancak, günümüzde hafıza yanıtının ortaya çıkışını ve gücünü ön görebilecek böyle bir test yoktur.

HLA-DSA'nın klinik anlamlılığını açıklamaya yardımcı olacak bir diğer unsur ise donör endotelial hücrelerinin koruyucu faktörlerinin tanımlanmasıdır. Çok düşük düzeydeki Sınıf I antikorların, endotelial hücrelerde koruyucu olabilecek sağlıklı sinyallerini tetiklediği gösterilmiştir. Bu durum koruyucu bir etki ya da akomodasyon ile sonuçlanabilir.^{36,37}

SONUÇ

Virtual "cross-match" uygulaması, nakil öncesi risk tahmini ve organ dağıtımında önemlidir. Nakil ön-

cesi risk tahmini yapılarak, organ dağıtımını (özellikle yüksek oranda sensitize hastalar için) daha hızlı bir hale gelmiş, pre-liminer "cross-match" ihtiyacı ortadan kalkmış, kadavra çalışmalarında ekstra 3 saat kazanılmış, soğuk iskemi sürelerinin de azalması sağlanmıştır.

vXM'nin doğruluğu büyük oranda, donöre ait HLA doku tiplemesinin eksiksiz ve doğru olmasına ve anti-HLA antikor analizlerinin detaylı bir şekilde yapılmasına bağlıdır. vXM uygulamasında, tek antijen boncuklarla antikor tespitinde denatüre HLA moleküllerine bağlı yanlış pozitiflikler elenmelidir. Biyolojik olarak ise DSA'nın patojenik özelliklerinin tanımlanması gereklidir.

Yüksek oranda sensitize hastaların bekleme listelerinde uzun süreler beklemeleri ve hatta nakil olmadan hayatlarını kaybetmeleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sorundur. Bu hastaların nakil olabilirliğinin artırılması için Eurotransplant'takine benzer ayrıcalıklı bir yaklaşım kullanılmalıdır. Bu amaçla öncelikle hangi hastaların gerçekten yüksek oranda sensitize olduğu, sağlıklı bireylerin popülasyondaki allel sıklıklarına oranlanarak tespit edilmelidir. Bu oranlamanın yapılabilmesi için de allel sıklıklarını içeren özel bir yazılımın tüm laboratuvarların erişebileceği şekilde internette paylaşılması gerekmektedir. Öte yandan, her laboratuvar kendi hastalarına ait anti-HLA antikor testlerini en az iki yöntem kullanarak yapıp, özellikle de yüksek oranda sensitize hastalar için kabul edilebilir uyumsuzlukları tespit etmelidir. Tüm lokuslar için kabul edilebilir uyumsuzlukların tespiti, hem hasta hem de donör adayının HLA-A,-B,-DR'ye ek olarak HLA-C ve HLA-DQ doku gruplarının tiplenmesi ile mümkün olacaktır. Bekleme listelerindeki yüksek oranda sensitize hastaların nakil olabilirliğini artırmak için kabul edilebilir antijenleri olan donörler öncelikle bu hastaların kayıtlı olduğu merkezlere yönlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003;3(6):665-73.
2. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants preceded by development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002;74(8):1192-4.
3. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pretransplant assessment of donor-reactive, HLA specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs.risk. *Am J Transplant* 2003; 3(12):1488-500.
4. Wen R, Wu V, Dmitrienko S, Yu A, Balshaw R, Keown PA, et al. Biomarkers in transplantation: prospective blinded measurement of predictive value for the flow cytometry cross-match after negative antiglobulin cross-match in kidney transplantation. *Kidney Int* 2006; 70(8):1474-81.
5. Yang J, Schall C, Smith D, Kreuser L, Zambarian M, King K, et al. HLA sensitization in pediatric pre-transplant cardiac patients supported by mechanical assist devices: the utility of luminex. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28(2):123-9.
6. Muro M, Llorente S, Marin L, Moya-Quiles MR, Gonzales-Soriano MJ, Prieto A, et al. Acute vascular rejection mediated by HLA antibodies in a cadaveric kidney recipient: discrepancies between FlowPRA, ELISA and CDC vs luminex screening. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(1):223-6.
7. Zachary AA, Montgomery RA, Simpkins CE, Warren D, Leffell MS. Impact of persistent, low levels of donor specific antibody on renal transplants. *Am J Transplant* 2005;5(S11): 245.
8. Bingaman AW, Murphey CL, Palma-Vargas J, Wright F. A virtual crossmatch protocol significantly increases Access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation. *Transplantation* 2008;86(12):1864-8.
9. Claas FHJ, Doxiadis IIN. Management of the highly sensitized patient. *Curr Opin Immunol* 2009;21(5):569-72.
10. Doxiadis IIN, Duquesnoy RJ, Claas FHJ. Extending options for highly sensitized patients to receive a suitable kidney graft. *Curr Opin Immunol* 2005;17(5):536-40.
11. Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis II. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft survival. *Transplantation* 2004;78(2):190-3.
12. Zachary AA, Sholander JT, Houp JA, Leffell MS. Using real data for a virtual cross-match. *Hum Immunol* 2009;74(8):574-9.
13. Zachary AA, Montgomery RA, Leffell MS. Defining unacceptable HLA antigens. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13(4):405-10.
14. Tambur AR, Ramon DS, Kaufman DB, Fiedewald J, Luo X, Ho B, et al. Perception versus reality?:Virtual cross-match-How to overcome some of the technical and logistic limitations. *Am J Transplant* 2009;9(8):1886-93.
15. Vaidya S, Partlow D, Susskind B, Noor M, Barnes T, Gugliuzza K. Prediction of cross-match outcome of highly sensitized patients by single and/or multiple antigen bead luminex assay. *Transplantation* 2006;82(11):1524-8.
16. Nikaiein A, Cherikh W, Nelson K, Baker T, Leffell S, Bow L, et al. Organ procurement and transplantation network/United network for organ sharing histocompatibility committee collaborative study to evaluate prediction of cross-match results in highly sensitized patients. *Transplantation* 2009;87(4):557-62.
17. Biemann D, Honger G, Lutz D, Mihatsch MJ, Steiger J, Schaub S. Pretransplant risk assessment in renal allograft recipients using virtual cross-matching. *Am J Transplant* 2007; 7(3):626-32.
18. Breimer ME, Rydberg L, Jackson AM, Lucas DP, Zachary AA, Melancon JJ, et al. Multi-center evaluation of a novel endothelial cell cross-match test in kidney transplantation. *Transplantation* 2009;87(4):549-56.
19. Panigrahi A, Gupta N, Siddiqui JA, Margoob A, Bhowmik D, Guleria S, et al. Post transplant development of MICA and anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss. *Hum Immunol* 2007;68(5):362-7.
20. Alvarez-Marquez A, Aguilera I, Gentil MA, Caro JL, Bernal G, Fernández Alonso J, et al. Donor-specific antibodies against HLA, MICA and GSTT1 in patients with allograft rejection and C4d deposition in renal biopsies. *Transplantation* 2009;87(1):94-9.
21. Dragun D. The role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in renal allograft vascular rejection. *Pediatr Nephrol* 2007; 22(7):911-4.
22. Tan JC, Wadia PP, Coram M, Grumet FC, Kambham N, Miller K, et al. H-Y antibody development associates with acute rejection in female patients with male kidney transplants. *Transplantation* 2008;86(1):75-81.
23. Amico P, Hönger G, Steiger J, Schaub S. Utility of the virtual cross-match in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14(6):656-61.
24. Bryan CF, Luger AM, Smith JL, Warady BA, Wakefield M, Schadde E, et al. Sharing kidneys across donor service area boundaries with sensitized candidates can be influenced by HLA-C. *Clin Transplant* 2010;24(1):56-61.
25. 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. *Transplant Proc* 2009;41(9):3651-4.
26. Oğuz F, Seyhun Y, Karahan G, Carin M. [Transplantation and anti-HLA antibody]. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3(8):7-10.
27. Kosmoliaptis V, O'Rourke C, Bradley JA, Taylor CJ. Improved Luminex-based human leukocyte antigen specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum Immunol* 2010;71(1):45-9.
28. Morris GP, Phelan DL, Jendrisak M, Mohanakumar T. Virtual cross-match by identification of donor specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid phase immunoassay: A 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Hum Immunol* 2010; 71(3):268-73.
29. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(8):1398-406.
30. Reinsmoen NL, Lai CH, Vo A, Cao K, Ong G, Naim M, et al. Acceptable donor specific antibody levels allowing for successful deceased and living donor kidney transplantation after desensitization therapy. *Transplantation* 2008; 86(6):820-5.
31. Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation* 2009;87(11):1681-8.
32. Burns JM, Cornell LD, Perry DK, Pollinger HS, Gloor JM, Kremers WK, et al. Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008;8(12):2684-94.
33. Riethmüller S, Ferrari-Lacraz S, Müller MK, Raptis DA, Hadaya K, Rüsi B, et al. Donor specific antibody levels and three generations of cross-matches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2010;90(2):160-7.

34. Böhmig GA, Bartel G, Wahrmann M. Antibodies, isotypes and complement in allograft rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13(4):411-8.
35. Stegall MD, Dean PG, Gloor J. Mechanisms of alloantibody production in sensitized renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2009; 9(5):998-1005.
36. Zachary AA, Montgomery RA, Jordan SC, Reinsmoen NL, Claas FH, Reed EF. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on understanding antibodies in transplantation. *Tissue Antigens* 2007;69(Supple 1):160-73.
37. Jindra PT, Hsueh A, Hong L, Gjertson D, Shen XD, Gao F, et al. Anti-MHC class I antibody activation of proliferation and survival signaling in murine cardiac allografts. *J Immunol* 2008;180(4):2214-24.