

Böbrek Nakli Sonrası Birinci Yılda Panel Reaktif Antikorların Akım Sitometri ile Takip Edilmesi

Follow up of Panel Reactive Antibodies by Flow Cytometry During the First Year of Renal Transplantation

Tülay KILIÇASLAN AYNA,^a
Hayriye ŞENTÜRK ÇİFTÇİ,^a
Dr. Yaşar ÇALIŞKAN,^b
Dr. Hilmi TOZKIR,^c
Dr. Mehmet GÜRTEKİN,^a
Dr. Aydın TÜRKMEN,^b
Dr. Mahmut ÇARİN^a

^aTıbbi Biyoloji AD,

^bNefroloji BD,

İstanbul Üniversitesi

İstanbul Tıp Fakültesi,

İstanbul

^cTıbbi Biyoloji AD,

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Edirne

Geliş Tarihi/Received: 14.06.2010

Kabul Tarihi/Accepted: 20.12.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:

Tülay KILIÇASLAN AYNA

İstanbul Üniversitesi

İstanbul Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji AD, İstanbul,

TÜRKİYE/TURKEY

tulayayna@gmail.com

ÖZET Amaç: Böbrek naklinde insan lökosit antijen (HLA)'lerine özgü antikorların önemli rolü 40 yıldır bilinmektedir, ancak son 10 yılda nakilden sonra oluşan anti-HLA antikorlarının greft yetmezliği ve rejeksiyon gelişimi ile ilişkisini araştıran çalışmalar ağırlık kazanmaktadır. Bu çalışmada canlı akraba vericiden böbrek nakli yapılan hastalarda nakil sonrası bir yıl içinde gelişen anti-HLA antikorların araştırılması ve bu antikorların nakil sonrası rejeksiyon atakları, greft sağkalımı ve serum kreatinin düzeyleri ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya 2001-2007 tarihleri arasında böbrek nakli yapılan 50 hasta alınmış, nakil sonrası 1., 6. ve 12. aylarda alınan serum örneklerinde akım sitometri yöntemi kullanılarak anti-HLA antikorlar [panel reaktif antikorlar (PRA)] ölçülmüştür. **Bulgular:** Hastaların 17 (%34)'inde nakil sonrası dönemde PRA (+) iken, 33 (%66) hastada ise PRA sonucunun (-) olduğu görülmüştür. Nakil sonrası 12 ay takipleri yapılan hastalardan PRA (+) olan grupta 8 (%47) hastada, PRA (-) olan grupta ise 5 (%15) hastada akut rejeksiyon (AR) atağı saptanmıştır (p= 0.021). Nakil sonrası birinci ayda oluşan sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorlara sahip olan 6 hastadan 5 (%83.3)'ünde, AR atağı (p= 0.049) gelişirken, 6. ve 12. aylarda oluşan anti-HLA antikorları ile AR arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. PRA konsantrasyonlarını değerlendirdiğimizde, sınıf I ve sınıf II PRA > %10 olan grupta hastaların sırası ile %62.5'i ve %57.1'i AR atağı yaşarken, sınıf I ve sınıf II PRA ≤ %10 olan her iki gruptaki hastaların %33.3'ü AR atağı geçirmiştir (p> 0.05). **Sonuç:** PRA (+) grupta daha fazla rejeksiyon ataklarının olması nakil sonrası dönemde PRA yöntemi ile HLA antikorlarının izlenmesinin greft sağkalımı açısından önemli bir prognostik belirteç olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek transplantasyonu; akım sitometri; reddetme (psikoloji)

ABSTRACT Objective: The important role of antibodies against human leukocyte antigen (HLA) in renal transplantation has been known over the last 40 years. However, in the last 10 years the association of anti-HLA antibodies produced after renal transplantation with graft failure and rejection has gained importance. In this study we aimed to investigate anti-HLA antibodies and the relation of these antibodies with rejection episodes, graft survival and serum creatinine during one year period after renal transplantation in patients underwent living related renal transplantation. **Material and Methods:** A total of 50 living related donor kidney recipients transplanted between 2001 and 2007 were enrolled in this study and anti-HLA antibodies [panel reactive antibodies (PRA)] were measured by using bead based flow-cytometry assays in serum samples taken at 1., 6. and 12. months after transplantation. **Results:** In 17 (34%) patients, PRA was positive after transplantation, however, in 33 (66%) patients PRA was found negative. Eight (47%) patients with post-transplantation HLA-reactive antibodies [PRA (+)] and 5 (15%) patients with no detectable anti-HLA antibodies [PRA (-)] were developed acute allograft rejection (p= 0.021). While 5 of 6 (83.3%) patients who had HLA class I and II reactive anti-HLA antibodies at the first month were developed acute rejection episodes (p= 0.049), no significant relation was found between anti-HLA antibodies detected at the 6th and 12th month and acute rejection. When the concentration of PRA was assessed, in patients with class I and II PRA levels >10% the acute rejection episodes developed in 62.5% and 57.1% of the patients respectively and the acute rejection rates of patients with class I and II PRA levels ≤10% were 33.3% in both (p> 0.05). **Conclusion:** In conclusion, the higher occurrence of rejection episodes in PRA (+) group may show the importance of anti-HLA antibody monitoring using flow-PRA after renal transplantation as a prognostic marker in terms of graft survival.

Key Words: Kidney transplantation; flow cytometry; rejection (psychology)

Böbrek nakli sonrasında geriye dönüşümsüz olarak greft kaybına sebep olabilecek çok sayıda komplikasyon gelişebilmektedir. Nakil öncesi yapılan çeşitli immünolojik tarama testlerine ve düzenlenen immünsüpresif tedaviye rağmen hâlâ hücrenel ve humoral mekanizmalarla yönlendirilen rejeksiyonlardan dolayı greft kaybı olmaktadır.¹ Son yıllardaki birçok çalışma, böbrek naklinden sonra anti-insan lökosit antijeni (HLA) antikörlerin prevalansını ve bu antikörlerin akut ve kronik rejeksiyon riski açısından klinik önemini değerlendirmektedir. Kan nakilleri, gebelikler ve rejeksiyonlar sonrasında oluşan anti-HLA antikörler genel olarak panel reaktif antikörler (PRA) adını almaktadır. Bu anti-HLA antikörler sınıf I ve sınıf II olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikörler, farklı hücreleri aktive ederek immün yanıtı başlatmakta ve rejeksiyona katkıda bulunmaktadır. Böbrek nakli sonrasında farklı oranlarda anti-HLA antikörlerin geliştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.²⁻⁵ Bu farklı oranlar, kullanılan tekniğe bağlı olmakla birlikte hastalardan kan alma zamanının farklı olmasından da kaynaklanmaktadır.³ Nakil sonrası anti-HLA antikörlerin varlığı, daha yüksek akut rejeksiyon (AR) oranları ile ilişkili bulunmuştur.⁴⁻⁷ Nakilden sonra erken dönemde gelişen anti-HLA antikörlerin, naklin 1. yılından sonra gelişen anti-HLA antikörlardan daha fazla grefti hasarladığı belirlenmiştir.⁸ Reperfüzyon ve iskemi zamanının erken dönemdeki anti-HLA antikör oluşumunu etkileyebileceği bildirilmiştir.¹ Bu olay, endotel aktivasyonuna ve proinflatuar sitokinlerin salınımına yol açarak HLA ve adezyon moleküllerinin ifadesini artırır.^{9,10} Böylece nakil sonrası erken dönemde immün yanıtın başlamasına, sonuç olarak da anti-HLA antikör üretimine sebep olur. Nakil öncesi dönemde duyarlı hale gelmeyen (kan transfüzyonları, gebelik vb.) hastalarda bile hastanın geçmişinde yaşadığı duyarlılık nedeni ile oluşan hafıza B hücrelerinin tekrar aktif hale gelmesi, nakil sonrası erken günlerde anti-HLA antikör üretimini kolaylaştırabileceği belirtilmektedir.¹ Yine nakil sonrası 1 yıl içinde sınıf I anti-HLA antikörler bulunmaksızın sınıf II anti-HLA antikörlerin oluşumunun da greft kaybı ve kronik rejeksiyon

için önemli bir risk faktörü olduğu açıklanmıştır. Nakil sonrası donör spesifik antikör (DSA)'ların immünolojik komplikasyonlar ve greft kaybı ile korelasyonu gösterilmiş, hatta vericiye özgü olmayan antikörler (non-DSA) ile rejeksiyon bağlantısı da bildirilmiştir.⁷⁻¹³

Solid faz çalışmaları ile anti-HLA antikörlerin rejeksiyon mekanizmasındaki rolü ve klinik önemi daha iyi anlaşılmıştır. Akım sitometri tekniği, PRA'ların araştırılmasında duyarlı bir yöntem olarak dikkat çekmektedir.¹ Bu yöntemle aktivasyonu komplemana bağlı olan ve olmayan tüm anti-HLA antikörleri saptanabilmektedir. Gelişen teknolojiler sayesinde nakil öncesi gelişen alloantikörler ile böbrek sağkalımı arasındaki güçlü ilişki ortaya konmuş, bu konudaki bilgi birikimi giderek artmıştır.¹ Biz de çalışmamızda, böbrek nakli sonrasında oluşan anti-HLA antikörlerin rejeksiyon atakları ve greft sağkalımı ile ilişkisini araştırmayı planladık. Bu amaçla, canlı akraba vericilerden böbrek nakli yapılan hastalarda nakil sonrası bir yıl içinde oluşan anti-HLA antikörler akım sitometri tekniği kullanılarak ölçüldü ve rejeksiyon atakları ile ilişkisi değerlendirildi.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesinde 2001-2007 yılları arasında canlı akraba vericiden böbrek nakli olan 50 hasta alınmıştır. Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi etik kurulundan onay alınarak ve Helsinki Deklarasyonu 2008 prensiplerine uygun olarak yapılmıştır. Çalışmaya, nakil öncesi komplemana bağlı sitotoksikite [complement dependent cytotoxicity (CDC)] ve akım sitometri teknikleri ile DSA saptanmamış olan 18 yaşından büyük hastalar ve canlı akraba vericileri dâhil edilmiştir. Hastalardan nakil sonrası 1., 6. ve 12. aylarda alınan serum örneklerine akım sitometri (EPİCS-XL Coulter Corporation, Miami FL, ABD) ile PRA tarama testi (Flow-PRA screening-FL12-60; One Lambda, Canoga Park, CA, ABD) ve PRA tanımlama (Flow-PRA specific-FL1SP, FL1SP44, FL1HD, FL2SP; One Lambda, Canoga Park, CA, ABD) testi uygulanmıştır.

PRA Tarama ve Tanımlama Testi: Tarama testinde sınıf I veya sınıf II antijenleri ile kaplanmış tek boncuk grubu kullanılırken, tanımlama testinde her sınıf için dört grupta toplam 32 adet saflaştırılmış HLA antijeni kaplı boncuk kullanılmaktadır. Ölçüm için 20 µL hasta serumuna 5 µL PRA boncuk grupları (sınıf I veya sınıf II) eklenmiş, hafifçe karıştırılarak 20-25°C'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. Boncuk-serum karışımına 1X yıkama çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. İki kez yıkılarak 1500 g'da 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır. 100 µL 1X "fluoresceinisothiocyanat (FITC)" ile konjuge edilmiş keçi anti-human IgG eklenerek hafifçe karıştırılmış ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İki kez yıkama çözeltisi ile yıkılarak akım sitometride analiz edilmiştir.

Serumda anti-HLA antikor varsa antijen kaplı boncuklara bağlanmakta ve floresan işaretli anti-human IgG antikor ile inkübasyondan sonra anti-HLA IgG pozitif serumu, negatif serumla kıyasla bir floresan kanal geçişi göstermektedir. PRA tarama testinde, serumla pozitif reaksiyona giren boncukların yüzde oranı belirlenmekte FL1 histogramındaki IgG-(FITC) sinyalizasyonu analiz edilmektedir. PRA tanımlama testinde ise negatif reaksiyona oranla boncukların FL1 histogramında yer değiştirmesi derecelendirilerek ilgili yazılımda (Flow-PRA software version beta 9, One Lambda, Canoga Park) değerlendirilmektedir.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler SPSS for Windows VER 15.0 (SPSS., Chicago IL, ABD) ile yapılmıştır. Klinik ve laboratuvar parametrelerin karşılaştırılmasında gruplar arasındaki sayısal verilerin karşılaştırılması için Student-t testi, kategorik verilerin karşılaştırılması için ki-kare ve Fisher'in kesinlik testi kullanılmıştır. Greft sağkalımı Kaplan Meier analizi ile belirlenmiştir.

BULGULAR

Hasta grubunun yaş ortalaması 38 ± 10 (aritmetik ortalama \pm standart sapma), verici grubunun yaş ortalaması 53 ± 11 (aritmetik ortalama \pm standart sapma) olarak bulunmuştur. Çalışmaya dâhil edilen hastaların 33'ü erkek, 17'si kadındır. Vericilerin ise 18'i erkek, 32'si kadındır. Ayrıca vericilerin 17'si anne, 13'ü kardeş, 12'si baba, 4'ü eş, 3'ü yeğen ve 1'i teyzedir. Hasta ve vericiler arasında en az 1A, en fazla 2A, 2B, 2DR uyum olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).

Hastaların 25 (%50)'inin nakil öncesi dönemde immünizasyon hikâyesi vardı: 20'sinin kan transfüzyonu, 4'nün kan transfüzyonu ve gebelik, 1 hastanın ise sadece gebelik. Nakil öncesi 4 (%8) hastanın PRA sonucu (+)'di. Nakil sonrası takiplerde hastaların 17 (%34)'sinde PRA sonuçları (+), 33 (%66)'ünde PRA sonuçları (-) olarak bulunmuştur (Tablo 2). PRA (+) ve PRA (-) olan hasta grupları arasında; yaş, hasta ve verici cinsiyeti, nakil öncesi PRA açısından değerlendirilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. PRA (+) olan grupta hastanede kalma süresi, PRA (-) olan gruptan daha fazla bulunmuştur (Tablo 2).

Canlı akraba vericiden böbrek nakli yapılan hastaların 13'ünde rejeksiyon atağı gelişmiştir (Tablo 3). PRA (+) olan 17 hastanın 8 (%47)'inde rejeksiyon atağı görülürken, PRA (-) olan 33 hastanın 5 (%15)'inde rejeksiyon atağı görülmüştür, PRA (+) ve (-) gruplar arasında AR oranları bakımından farklılık, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 3). Çalışma süresince PRA (+) olan sadece bir hastada gecikmiş greft fonksiyonu ve sonrasında greft kaybı gelişmiştir. Bu hasta, sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorlara sahipti. PRA (+) ve PRA (-) olan hasta grupları arasında greft sağkalımı açısından anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Bir yıllık greft sağkalımı %98 olarak bulunmuştur. Na-

TABLO 1: Hasta ve vericiler arasındaki doku uygunluğu ve dağılımı.

Doku uyumu	1A	1B	1B1DR	1A1B1DR	2A1B1DR	1A2B1DR	1A1B2DR	2A2B2DR
Hasta sayısı	1	2	2	34	1	2	4	4

TABLO 2: PRA (+) ve PRA (-) olan hasta gruplarının demografik, klinik ve laboratuvar karakteristikleri.

Parametreler	PRA (+) n: 17 (%34)	PRA (-) n: 33 (%66)	p
Yaş (yıl)	41.47	36.03	>0.05
Hasta cinsiyet kadın/erkek	5/12 (%41.6)	12/21 (%57.1)	>0.05
Verici cinsiyet kadın/erkek	11/6 (%54.5)	21/12 (%57.1)	>0.05
Hastanede kalma süresi	35.21	22.31	0.047
Nakil Öncesi			
CDC	-	-	-
ASCM	-	-	-
PRA	4/17 (%23.5)	8/33 (%24.2)	>0.05
Temel tedavi protokolleri			
MMF + Tac+Pred	10 (%34.5)	19 (%65.5)	>0.05
MMF+Cyc+Pred	5 (%33.4)	10 (%66.6)	>0.05
Aza+ Tac+ Pred	-	3 (%100)	>0.05
Aza+ Cyc+ Pred	2 (%66.6)	1 (%33.4)	>0.05

ASCM: Akım sitometri "cross match", MMF: Mikofenolat mofetil, Tac: Takrolimus, Pred: Prednizolon, Cyc: Siklosporin, AZA: Azatioprin.

kil sonrası diğer komplikasyonlar ile PRA sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

PRA (+) ve PRA (-) olan hasta gruplarının nakil sonrası 1., 6. ve 12. aylardaki serum kreatinin düzeyleri karşılaştırıldığında, PRA (+) hastaların 6. aydaki serum kreatinin düzeyleri, PRA (-) hastalardan istatistiksel bakımdan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Tablo 3).

Nakil sonrası PRA (+) olan 5 kadın hastanın tümü alloimmünizasyon hikâyesine sahipken, PRA (-) 12 kadın hastanın sadece 6'sında alloimmüni-

zasyon öyküsü vardı. PRA (+) olan kadın hastalarda rejeksiyon atağının PRA (-) olan kadın hastalardan önemli oranda yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 4). Farklı anti-rejeksiyon tedavisi alan hastalar, alloantikör oluşumu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

PRA (+) olan 17 hastanın 7'sinde sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorların, 7 hastada sınıf I anti-HLA antikorların, 3 hastada ise sınıf II anti-HLA antikorların geliştiği tespit edilmiştir. Diğer hastalarda ise antikor gelişmemiştir (Şekil 1, Tablo 5).

TABLO 3: PRA (+) ve PRA (-) olan olgularda nakil sonrası komplikasyonlar ve kreatinin düzeyleri.

Parametreler	PRA (+) n: 17	PRA (-) n: 33	p
Rejeksiyon atağı	8 (% 47.1)	5 (% 15.1)	0.021
Erken enfeksiyon	5 (% 29.4)	7 (% 21.2)	0.155
Akut tübüler nekroz	1 (% 5.88)	1 (% 21.2)	0.508
Gecikmiş greft fonksiyonu	1 (% 5.88)	-	0.340
Greft kaybı	1 (% 5.88)	-	0.340
Hasta kaybı	-	-	-
Kreatinin düzeyleri (mg/dL)			
1. ay	1.57 ± 0.58	1.33 ± 0.45	0.284
6. ay	1.56 ± 0.46	1.28 ± 0.35	0.048
12. ay	1.6 ± 0.70	1.30 ± 0.29	0.129

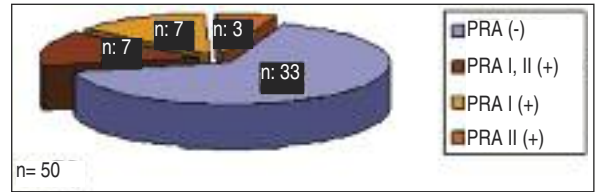
PRA: Pael reaktif antikorlar.

TABLO 4: PRA (+) ve PRA (-) gruplarda rejeksiyon atağı geçiren hastaların cinsiyetleri ve anti-rejeksiyon tedavi protokolleri.

	PRA (+) /AR(+) 17/8	PRA (-)/AR(+) 33/5	p
Kadın	5/3	12/0	0.015
Erkek	12/5	21/5	0.433
Anti rej. tedavi protokolleri			
Pred ^a	3 (%37.5)	3 (% 0)	0.075
ATG ^b	2 (%25)	1 (%20)	0.053
Pred + ATG	1 (%12.5)	-	0.074
Pred + IVIG ^c	2 (%12.5)	-	0.269
Pred +ATG + IVIG	-	1 (%20)	0.261

^aPrednizolon (Pred) (500 mg/gün, 3 gün üst üste), ^bAntitimosit globulin (ATG) (2-5 mg/kg/gün), ^cIntravenöz immünglobulin (IVIG) [0.5 g/kür (ilk üç kür), 0.25 g/kür (4. ve 5. kür) toplam 5 kür].

PRA (+) olup AR(+) olan hastaların 5'inde sınıf I ve II, 2'sinde sınıf I, 1'inde ise sınıf II anti HLA antikor oluşmuştur. PRA (+) olup AR (-) olan hastalar incelendiğinde: 2'sinde sınıf I ve II, 5'inde sınıf I, 2'sinde ise sınıf II anti-HLA antikor gelişmiştir. Sınıf I ve II anti-HLA antikorlarına sahip 7 hastanın 6'sında nakil sonrası 1 ay içinde 1 hastanın ise 6. ayda (+) olduğu saptanmıştır. Sınıf I anti-HLA antikorlarına sahip 7 hastanın 5'inde nakil sonrası 1 ay içinde, 1 hastanın 6. ay ve 1 hastanın da 12. ayda (+) olduğu görülmüştür. Sınıf II anti-HLA an-

**ŞEKİL 1:** Nakil sonrası oluşan sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorlarının dağılımı.

tikorlarına sahip 3 hastanın 1'inde nakil sonrası 1 ay içinde 2 hastanın ise 6. ayda (+) olduğu saptanmıştır (Tablo 5).

TABLO 5: PRA pozitif olan hastaların anti-HLA antikor özgüllüğü.

Hasta No	Anti-HLA antikor özgüllüğü	Vericinin uyumsuz HLA antijeni	Anti-HLA antikorun saptanma zamanı	Rejeksiyon atağı
1	1C,5C,DR13,DQ5,DQ6	A2,B51,DR13	1.ay	+
2	A69,B49	A2 ,B8,DR03	1.,6.,12. ay	+
7	7C	B55,DR01	6.ay	+
8	DR1,DR103,DR7	A23,B15,B51,DR14	6., 12.ay	-
9	2C,5C,DR16,DR14,DR15	A24,B51,DR11	1., 6.ay	+
10	5C,DR16,DQ7	A24,B35,DR4	1., 12.ay	+
11	% 80 sınıf I	A2,B44,DR07	1.,6.,12.ay	-
12	DR7,DR03	A69,B35,DR03	6.ay	+
13	A1,DR13,DR18	A3,A68,B7,DR14,DR15	6.ay	-
14	DR13,DR14,DR16,DR03,DQ7	A1,B51	1.,12.ay	-
15	7C,DR03	A2,B41,DR03	1.,6.,12.ay	+
22	12C	A2,B55,DR11	1.,12.ay	-
23	A1,DR53	A3,B7,DR04	1.,6.,12.ay	-
30	A36,B53,DQ5,DQ6	A1,B57	1. ay	+
33	12C,	A24,B35	1.,6.,12.ay	-
34	A36,B53,B60,B59	-	1.,6.,12.ay	-
38	B44	A2,B44,DR16	12.ay	-

PRA: Pael reaktif antikorlar.

TABLO 6: Nakil sonrası PRA (+) olan hastalarda anti-HLA antikor oluşum zamanlarının karşılaştırılması.

PRA (+)	AR (+)		AR (-)		Toplam		p
	n	%	n	%	n	%	
1. ay							
Sınıf I, II	5	83.3	1	16.7	6	100	0.049
%95 GA: 0.7029-27.090							
Sınıf I	1	20	4	80	5	100	† 0.05
Sınıf II	0	0	1	100	1	100	† 0.05
6. ay							
Sınıf I, II	0	0	1	100	1	100	† 0.05
Sınıf I	1	100	0	0	1	100	† 0.05
Sınıf II	1	50	1	50	2	100	† 0.05
12. ay							
Sınıf I, II	0	0	0	0	0	0	-
Sınıf I	0	0	1	100	1	100	† 0.05
Sınıf II	0	0	0	0	0	0	-

PRA: Pael reaktif antikorlar.

Sadece bir hastada nakil sonrası birinci yıl serumunda sınıf I DSA tespit edilmiştir. On altı hastada vericinin uyumsuz HLA antijenlerinin çapraz reaksiyon veren gruplarına [cross reactive group (CREG)] özgü anti-HLA antikorlar gelişmiştir (3 hastada CREG'lere özgü anti-HLA antikorların yanı sıra, sınıf II DSA'lar da gelişmiştir).

PRA (+) olan hastaların %70.5'inde ilk bir ay içinde, %23.5'inde ise 6. ayda ve %6'sında ise 12. ayda anti-HLA antikorları saptanmıştır (Tablo 6). Nakil sonrası 1. ayda anti-HLA antikorlara sahip olan 12 hastanın 6'sında (%50) rejeksiyon atağı mevcuttu. Birinci aydan sonra PRA (+) olan 4 hastanın 2 (%50)'sinde rejeksiyon atağı gelişmiştir. On ikinci ayda ise PRA (+) olan 1 hasta belirlenmiştir, bu hasta rejeksiyon atağı geçirmemiştir.

Nakil sonrası 1. ayda AR (+) olan 5 hastada sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikor saptanmış olup, AR (-) olan sadece 1 hastada sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikor bulunmuştur. Nakil sonrası 1. ayda sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorlarına sahip hastalarda daha yüksek oranda AR gelişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Altıncı ve 12. ayda AR (+) olan hastalarda sınıf I ve sınıf II

anti HLA antikorları saptanmamıştır. Birinci ayda AR (+) olan 1 hastada sınıf I anti-HLA antikorları olup, AR (-) olan 4 hastada sınıf I anti-HLA antikorları belirlenmiştir. Altıncı ayda, AR (+) olan bir hastada sınıf I anti-HLA antikor olup, AR (-) olan hastalarda sınıf I anti-HLA antikor saptanmamıştır. Birinci ayda AR (+) olan hastalarda sadece sınıf II anti-HLA antikor saptanmazken, AR (-) olan hastalardan birinde sınıf II anti-HLA antikor bulunmuştur. Altıncı ayda hem AR (+) olan hem de AR (-) olan grupta 1'er hasta sınıf II anti-HLA antikoruna sahipken, 12. ayda her iki grupta da anti-HLA antikor belirlenmemiştir.

HLA antikorlarının frekansları ve rejeksiyon arasındaki ilişkiyi araştırdığımızda, PRA >%10 olan hastalardaki rejeksiyon oranları ile PRA ≤%10 olan hastalardaki rejeksiyon oranları arasında istatistiksel açıdan anlamlılık saptanmamasına rağmen, PRA >%10 olan hastalardaki rejeksiyon oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 7).

PRA (+) olan hastalardan 6 tanesi (%35) tüm test günlerinde (1., 6. ve 12. ay), 11 (%65)'i ise farklı test günlerinde pozitif sonuçlara sahipti. Sürekli pozitif hastalardan 2 (%12)'sinde rejeksi-

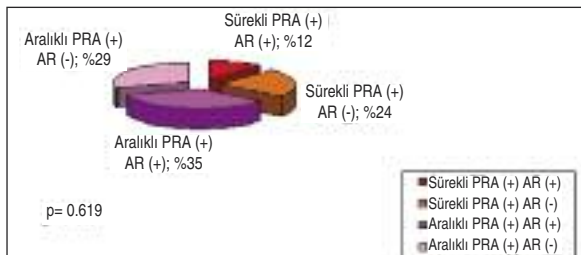
TABLO 7: PRA frekanslarına göre rejeksiyon sıklığının karşılaştırması.			
	PRA		p
Sınıf I	PRA >%10 (n= 8)	PRA ≤%10 (n= 6)	
Rejeksiyon (+)	5 (%62.5)	2 (%33.2)	0,592
Sınıf II	PRA >%10 (n= 7)	PRA ≤%10 (n= 3)	
Rejeksiyon (+)	4 (% 57.1)	1 (%33.3)	0.500

PRA: Pael reaktif antikorlar.

yon atağı gelişmişken, 4 (%24)'ünde rejeksiyon atağı gelişmemiştir. Farklı test günlerinde PRA (+) olan 6 hastada (%35) rejeksiyon atağı gelişmişken, 5'inde (%29) rejeksiyon atağı gelişmemiştir (Şekil 2).

TARTIŞMA

Son yıllarda anti-HLA antikorlarının saptanmasında solid faz tekniklerinin kullanımı giderek artmaktadır.¹ Bu çalışmada canlı akraba vericiden böbrek nakli olan hastalarda akım sitometri ile saptanan anti-HLA antikorların sıklığını ve klinik önemini değerlendirdik. Hastaların %34'ünde PRA (+) olup, %66'sında PRA (-) bulunmuştur. PRA (+) olan hastalarda PRA (-) olan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek oranda AR atağı görülmüştür. Greft fonksiyonları normal olan böbrek nakli olmuş hastaların yaklaşık %20'sinde anti-HLA antikorların bulunduğu bildirilmiştir. Ancak nakilden itibaren düzenli olarak serum örneklerinde anti-HLA antikorlarının izlenmesi ile AR ve greft yetmezliği olan hastalarda büyük oranda anti-HLA antikorlarının geliştiği görülmüştür.¹¹ Deneysel hayvan modellerinde de, dolaşımda alloantikörlerin tespit edilmesinden 6-28 ay sonra böbrek kesit-



ŞEKİL 2: Sürekli veya aralıklı PRA (+) olan olgularda AR sıklığı.

lerinde C4d'nin birikimlerinin olduğu, glomerüler değişikliklerin geliştiği ve kreatinin düzeylerinde artışlar ortaya çıktığı bildirilmiştir.¹⁴ Çalışmamızda PRA (+) olan hastaların %70.5'inde ilk bir ay içinde, %23.5'inde 6. ayda, %6'sında ise 12. ayda anti-HLA antikorları saptanmıştır, ancak, literatüre bakıldığında greft sağkalımları üzerine anti-HLA antikor oluşum zamanının etkisi tartışmalıdır.¹³ Bizim sonuçlarımız, Abe ve ark. ile uyumlu değilken, çalışmamızda Mihaylova ve ark.nın çalışması ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.^{1,15} Abe ve ark. canlı akraba vericilerden böbrek nakli olan hastalarda nakil sonrası 1. ayda oluşan anti-HLA antikorların kronik rejeksiyon ile ilişkili olmadığını açıklamışlardır. Ancak bu çalışmanın yapıldığı dönemde solid faz tekniklerinin kullanılmaması anti-HLA antikorların tamamının tespit edilememesine neden olmuş olabilir. Nitekim CDC yöntemi ile PRA çalışmalarında klinik ile ilişkili tüm anti-HLA antikorların tespit edilemediği bilinmektedir.¹⁶ Mihaylova ve ark.nın çalışmalarında ise kadavradan böbrek nakli olan hastaların %22'sinde anti-HLA antikor geliştiği bildirilmiştir. Bu anti-HLA antikorların %81.2'si nakil sonrası ilk haftada belirlenmiştir. Nakil sonrası PRA (+) olan hastalar da AR oranı daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca PRA (+) olan hastalarda daha yüksek oranda gecikmiş greft fonksiyonu tespit edilmiştir. İki çalışma arasındaki gecikmiş greft fonksiyonu açısından farklılığın greft kaynağından dolayı olduğunu düşünmekteyiz. Kadavradan yapılan böbrek nakillerinde soğuk iskemi zamanının uzaması, gecikmiş greft fonksiyonu ile sonuçlanmaktadır.¹ Erken dönemde (nakil sonrası birinci ayda) oluşan anti-HLA antikorların greft üzerinde daha büyük bir olumsuz etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Çünkü erken dönem boyunca alıcı hücreleri tarafından greft endotel zarının replasmanı, grefti daha duyarlı hale getirmektedir.¹¹ Çalışmamızda sadece bir hastada greft kaybı yaşanmıştır. Bu hasta, nakil sonrası 1. aydan itibaren anti-HLA antikorlara sahip olan tek hastaydı. Ancak çalışmamız sadece nakil sonrası birinci yıldaki klinik sonuçları kapsamaktadır. Uzun dönemde PRA (+) olan hastalarda greft kaybı görülme riski mevcuttur.

PRA (+) olan grupta hastanede kalma süresi, PRA (-) olan gruptan daha fazla bulunmuştur. PRA (+) olan hasta grubunda AR daha yüksek oranda görüldüğünden, klinik açıdan daha fazla desteğe ihtiyaç duyulmasından dolayı hastanede kalma süresi uzamıştır.^{17,18} Deka ve ark.nın da nakil sonrası PRA (+) olan hastaların hastanede kalma sürelerinin daha uzun olduğunu belirten sonuçları çalışmamız ile uyumludur.¹⁹

Çalışmamızda nakil sonrası 6. aydaki kreatinin düzeylerinin, PRA (+) olan hastalarda PRA (-) olanlardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Fritsche ve ark.nın 1981-2004 yılları arasında böbrek nakli olan hastaları dâhil ettikleri çalışma da, nakil sonrası 6. aydaki kreatinin düzeyinin, nakil sonrası 4 yıldaki greft yetmezliği ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.²⁰ Bizim çalışmamızda da PRA (+) olan grupta 6. ay kreatinin düzeylerinin yüksek olması, bu hastalarda birinci yıldan sonra daha fazla greft yetmezliği riski olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Fritsche ve ark.nın çalışmaya dahil ettikleri tarihler dikate alındığında değişen immünsüpresif tedavilerin de sonuçları etkileyebileceğini düşünmekteyiz.²⁰

Anti-HLA antikor gelişen kadın hastalarda, anti-HLA antikor gelişen erkek hastalara oranla daha fazla AR görülmüştür. Bu kadınlarda yüksek PRA oranına, kan transfüzyonu ve rejeksiyonlar yanında gebelik hikâyesinin de katkısı göz ardı edilemez. PRA (+) olan gruptaki kadın hastalardan sadece birinin gebelik öyküsü yokken; PRA (-) olan grupta ise, sadece bir hasta gebelik öyküsüne sahipti. Bu bize gebelikten dolayı erken duyarlanma hikâyesine sahip olan kadınların böbrek nakli sonrasında hafıza hücrelerinin aktive olarak, PRA (+)'liğine sebep olduğunu düşündürmektedir. Daha önce yaptığımız bir araştırmada, eşlerinden veya çocuklarından böbrek nakli planlanan kadınların %47'sinde DSA geliştiğini tespit ettik.²¹ Morales ve ark., özellikle 1992'den beri immünsüpresif tedavilerdeki gelişmeler sayesinde anti-HLA antikor oluşumundaki azalmalara rağmen, bu koruyucu etkinin dışı cinsiyeti çok etkilemediğini belirtmektedir.²²

Çalışmamızda PRA (+) ve (-) olan hastalardan AR geçiren hastalara uygulanan anti rejeksiyon tedavisi protokülleri arasında, istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. PRA (+) ve PRA (-) olan hasta grupları nakil sonrası aldıkları immünsüpresif tedavi bakımından da benzerdir.

Çalışmamızda, PRA (+) olan 17 hastadan 7'sinde, sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorların, 7 hastada sınıf I anti-HLA antikorların, 3 hastada ise sınıf II anti-HLA antikorların geliştiği tespit edilmiştir. Mihaylova ve ark.nın çalışmasında PRA (+) olan 16 hastanın 6'sında sınıf I, II anti-HLA antikorları, 7'sinde sınıf I ve 3'ünde sınıf II anti-HLA antikorları gelişmiştir.¹ Oluşan anti-HLA antikorları sınıf özelliği açısından değerlendirildiğinde iki çalışmanın sonuçlarının uyumlu olduğu görülmektedir. Sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorların, saptanma zamanı ile AR ilişkisi değerlendirildiğinde, sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorların her ikisinin de 1. ayda saptandığı hasta grubunda akut rejeksiyon görülme oranı daha yüksek bulunmuştur.

Daha önceki çalışmalarda nakil sonrası birinci ayda oluşan DSA'ların veya DSA olmayan anti-HLA antikorların greft sağkalımını etkilediği ile ilgili sonuçlar bildirilmiştir.^{14,1} Bu mekanizmanın niçin ve nasıl olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte; hasta, kan transfüzyonları, gebelikler vb. nedenlerle duyarlı hale geldiği antijenik epitoplara benzeyen epitoplarla tekrar karşılaştığında, T hücre yanıtının oluştuğu düşünülmektedir. Nakil sonrası DSA saptanmayan hastalarda rejeksiyon ataklarının artması orijinal duyarlılığı oluşturan antijen ile paylaşılan verici kaynaklı HLA peptitlerinin dolaylı sunumu ile hafıza T hücrelerinin tekrar uyarılmasından dolayı olabilir.²³ Her ne kadar çalışmamızda anti-HLA antikorların gelişiminin greft sağkalımı üzerine etkisi belirlenemese de, uzun dönemde bu anti-HLA antikorların hücrel veya humoral mekanizmalarla greft kaybına yol açabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmalarda PRA \leq %10 olan sonuçlar düşük antikor titresi olarak değerlendirilmektedir. Bu değer, genellikle immün yanıtızlık veya zayıf immün

yanıt olarak kabul edildiğinden dolayı biz de çalışmamızda, sonuçlarımızı PRA \leq %10 ve PRA $>$ %10 olarak iki gruba ayırdık. Anti-HLA antikorların yüzde oranları göz önüne alındığında, sınıf I PRA $>$ %10 olan hastaların %62.5'i, sınıf II PRA $>$ %10 hastaların %57.2'si rejeksiyon atağı geçirirken, sınıf I PRA \leq %10 ve sınıf II PRA \leq %10 olan hasta gruplarının her ikisinde de %33.3 oranında rejeksiyon atağı yaşandığını tespit ettik. Panigrahi ve ark.nın yaptığı bir çalışmada 2 yıllık greft sağkalımı ve kronik rejeksiyon oranının PRA $>$ %10 hastalarda, PRA %1-10 olan hastalardan yüksek olduğu görülmüştür.²³ Yine literatürde nakil öncesi PRA düzeylerinin nakil sonrası erken dönemde %10'un üzerinde artış göstermesinin de klinik sonucu olumsuz etkidiği belirtilmiştir.¹⁶ Nakil sonrası dönemde düşük antikor titresine sahip olan hastaların rejeksiyon atağı yaşamaması, düşük sınıf I moleküllerinin m-TOR-2 yolunu aktive ederek greft sağkalımına katkıda bulunması ile açıklanmaktadır.^{24,25}

Çalışmamızda yüksek HLA antikor titrelerine sahip olan hastalarda AR ataklarında artış söz konusudur. Düşük titredeki anti-HLA antikorların yüksek titredikilerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 12 aylık takip süresinde daha az rejeksiyon atağına yol açtığı görülmüştür. Öte yandan, Lee ve ark. anti-HLA antikorların oluşumundan yıllar sonra greft rejeksiyonu gelişebileceğini bildirmişlerdir.²⁶ Bu açıdan hastaların daha uzun süre takip edilmesi, sonuçlarımızın daha iyi yorumlanmasına katkıda bulunabilir. Bununla birlikte bazı olgularda anti-HLA antikorları endotele bağlanarak, hızlı haraplanmaya sebep olabilir ve erken dönemde greft fonksiyonunun kötüleşmesine yol açabilir.²⁶

Çalışmamızda, tüm serumlarında (1., 6. ve 12. ay) PRA (+) olup rejeksiyon atağı geçiren hastaların %33.3'ünde anti-HLA antikorlar saptanırken, farklı test günlerinde PRA (+) olup rejeksiyon atağı geçiren hastaların oranı %54.5'tir. Bizim örneklerimizde de olduğu gibi takip boyunca bazı örneklerde anti-HLA antikorlar saptanamayabilir, ancak bu dönemde allogreft hasarı devam edebil-

mektedir. Örneğin; 6. ayda PRA (+) saptanan hastalarımızın serum kreatinin değerlerinin, saptanmayanlara göre daha yüksek bulunması nakil sonrası süregelen bir subklinik rejeksiyona bağlı olabilir. PRA (+) olan grupta daha yüksek oranda AR görülmesi, anti-HLA antikorlar oluşumunun, allogreft rejeksiyon ataklarının oluşumu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte anti-HLA antikor azalması veya görülmemesi durumunda da AR atakları görülebilir. Bu konu ile ilgili birçok açıklama vardır. DSA'lar böbrek yüzeyindeki HLA antijenlerine bağlandığı için dolaşımda saptanamayabilir. Ayrıca serumda çözünen verici HLA antijenleri anti-HLA antikorlar ile kompleks yaptığında da anti-HLA antikorlar ölçülmeyebilir. Nakil ile ilişkili olmayan diğer immünolojik olaylar da, anti-HLA antikorların nakil sonrası dönemde saptanamamasından sorumlu olabilir.¹

Ayrıca nakil öncesi anti-HLA antikorlu olmayan hastalarımızın bir kısmında nakil sonrası takiplerde anti-HLA antikor pozitifliği saptanmıştır. Bu hastaların çoğunluğu nakil öncesi dönemde alloimmünizasyon hikâyelerine sahipti. DSA dışı antikorlar, bu alıcıların bazılarında nakil sonrası dönemde inflamasyon ile birlikte hafıza yanıtının non spesifik tetiklenmesi sonucu ortaya çıkmış olabilir.^{27,28}

Tek antijen ile kaplı boncuklar kullanılarak yapılan anti-HLA antikorların analizleri sonucunda, nakil sonrası gelişen anti-HLA antikorların çoğunun vericinin hasta ile uyumsuz HLA antijenlerinin dâhil olduğu CREG'lere özgü olduğu görülmüştür. Bu durum hem sınıf I hem de sınıf II DSA'lar için benzer bulunmuştur.²⁹⁻³¹ Çalışmamızda immünolojik komplikasyon gelişen hastaların önemli kısmında vericinin hasta ile uyumsuz HLA antijenlerinin dâhil olduğu CREG'lere özgü antikorlar ya da tek başına non DSA'lar klinik takip süresinde saptanmıştır. Bu anti-HLA antikorların oluşum sebepleri hâlâ tam olarak bilinmemekle beraber daha önceki çalışmalarda DSA dışındaki anti-HLA antikorların sıklıkla immünizasyonda üretildiği bildirilmiştir.⁶

SONUÇ

HLA antikorlarının varlığının nakil sonrası dönemde devam etmesi veya yeniden gelişimi klinik açıdan AR gelişimi için risk teşkil etmektedir. HLA antikorlarının duyarlı ve uygulaması kolay bir yöntem olan akım sitometri tekniği ile araştırılmasının hasta ve kliniğe katkıda bulunacağı görülmüştür.

Teşekkür

“Nakil Sonrası Panel Reaktif Antikorların Flow-PRA Yöntemi ile Araştırılması” başlıklı çalışmanın yapılmasında İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri merkezinden destek alınmıştır.

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmelerinde katkılarını esirmeyen Başak Gürtekin’e katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Mihaylova A, Baltadjieva D, Boneva P, Ivanova M, Penkova K, Marinova D, et al Clinical relevance of anti-HLA antibodies detected by flow-cytometry bead-based assays--single-center experience. *Hum Immunol* 2006;67(10):787-94.
- Cardarelli F, Saidman S, Theruvath T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB, Pascual M. The problem of late allograft loss in kidney transplantation. *Minerva Urol Nefrol* 2003;55(1):1-11.
- Saidman S. Significance of anti-HLA and donor-specific antibodies in long-term renal graft survival. *Transplant Proc* 2007;39(3):744-6.
- McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000;69(3):319-26.
- Fernández-Fresnedo G, Pastor JM, López-Hoyos M, Ruiz JC, Zubimendi JA, Gonzalez-Cotroruelo J, et al. Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(5):990-5.
- Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. *Curr Opin Immunol* 2005;17(5):541-5.
- Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003;3(6):665-73.
- Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* 2008;86(3):377-83.
- Stasny P, Ring S, Lu C, Arenas J, Han M, Lavingia B. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Hum Immunol* 2009;70(8):600-4.
- Lawson C, Holder AL, Stanford RE, Smith J, Rose ML. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibodies in sera of heart transplant recipients: a role in endothelial cell activation. *Transplantation* 2005;80(2):264-71.
- Everly MJ, Terasaki PI. Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. *Hum Immunol* 2009;70(8):655-9.
- Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 2001;71(8):1106-12.
- Costa AN, Scolari MP, Iannelli S, Buscaroli A, D'Arcangelo GL, Brando B, et al. The presence of posttransplant HLA-specific IgG antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay correlates with specific rejection pathologies. *Transplantation* 1997;63(1):167-9.
- Smith RN, Kawai T, Boskovic S, Nadazdin O, Sachs DH, Cosimi AB, et al. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in Cynomolgus monkeys. *Am J Transplant* 2008;8(8):1662-72.
- Abe M, Kawai T, Futatsuyama K, Tanabe K, Fuchinoue S, Teraoka S, et al. Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation* 1997;63(11):1616-9.
- Neylan J, de Smet W, Stijlemans B, Brinker K, Gonwa T, Moran J, et al. Detection of clinically relevant antibodies pretransplant and post-transplant with PRA-STAT. The Anti-CD45 Study Group. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):330-2.
- Martin S, Dyer PA, Mallick NP, Gokal R, Harris R, Johnson RW. Posttransplant antidonor lymphocytotoxic antibody production in relation to graft outcome. *Transplantation* 1987;44(1):50-3.
- Ayna TK, Diler AS, Çarın M. [Detection of post transplant donor specific antibodies against donor hlaantigens by flow cytometric cross match]. *Istanbul University Journal of the Istanbul Faculty of Medicine* 2006;69(4):93-7.
- Deka R, Panigrahi A, Aggarwal SK, Guleria S, Dash SC, Mehta SN, et al. Influence of pre-transplant panel reactive antibodies on the posttransplant sensitization status. *Transplant Proc* 2002;34(8):3082-3.
- Fritsche L, Hoerstrup J, Budde K, Reinke P, Neumayer HH, Frei U, et al. Accurate prediction of kidney allograft outcome based on creatinine course in the first 6 months post-transplant. *Transplant Proc* 2005;37(2):731-3.
- Ayna TK, Tozkır H, Ciftci HS, Karahan G, Gürtekin M, Çarın M. "Flow cytometric evaluation of pregnancy-induced anti-donor immunization." 22nd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Toulouse. *Tissue Antigens* 2000;71 (4):296.
- Morales-Buenrostro LE, Castro R, Terasaki PI. Impact of immunosuppression on HLA-antibody formation. *Clin Transpl* 2006:227-40.
- Panigrahi A, Deka R, Bhowmik D, Tiwari SC, Mehra NK. Immunological monitoring of post-transplant allograft sensitization following living related donor renal transplantation. *Transplant Proc* 200;36(5):1336-9.
- Murata K, Baldwin WM 3rd. Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev (Orlando)* 2009;23(3):139-50.
- Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009;9(11):2459-65.
- Tang AH, Platt JL. Accommodation of grafts: implications for health and disease. *Hum Immunol* 2007;68(8):645-51.

27. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002;74(8):1192-4.
28. Utzig MJ, Blümke M, Wolff-Vorbeck G, Lang H, Kirste G. Flow cytometry cross-match: a method for predicting graft rejection. *Transplantation* 1997;63(4):551-4.
29. Suciu-Foca N, Reed E, D'Agati VD, Ho E, Cohen DJ, Benvenisty AI, et al. Soluble HLA antigens, anti-HLA antibodies, and antiidiotypic antibodies in the circulation of renal transplant recipients. *Transplantation* 1991; 51(3):593-601.
30. Schönemann C, Groth J, Leverenz S, May G. HLA class I and class II antibodies: monitoring before and after kidney transplantation and their clinical relevance. *Transplantation* 1998; 65(11):1519-23.
31. Müller-Steinhardt M, Fricke L, Kirchner H, Hoyer J, Klüter H. Monitoring of anti-HLA class I and II antibodies by flow cytometry in patients after first cadaveric kidney transplantation. *Clin Transplant* 2000;14(1):85-9.