

Anti-HLA Antikorlarının Saptanmasında Akım Sitometrik Yöntemlerin Önemi

The Importance of Flow Cytometric Methods in the Detection of Anti-HLA Antibodies: Case Report

Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA,^a
Prof.Dr. Aydın TÜRKMEN,^b
Dr. Hayriye ŞENTÜRK ÇİFTÇİ,^a
Prof.Dr. Mehmet GÜRTEKİN^a

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

Geliş Tarihi/Received: 03.08.2011
Kabul Tarihi/Accepted: 13.12.2011

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji AD, İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
tulayayna@gmail.com

ÖZET Böbrek naklinde alıcılarda tespit edilen vericiye özgü HLA antikorlarının varlığı [donor spesifik HLA antibody (DSA)] graft reddi/graft kaybı için önemli bir risk faktörüdür. Eğer bir kadın hastanın vericisi çocuğu veya kocası olacaksa paternal HLA'lara karşı oluşmuş duyarlılık dikkatlice araştırılmalıdır. Nakil öncesi akım sitometri tekniği ile yapılan çapraz uyum testleri (AS-CM) diğer yöntemlerle saptanamayan DSA'ları saptayabilir. Ayrıca akım sitometri ile, hastada oluşan tüm anti-HLA antikorlarının araştırıldığı panel reaktif antikor (PRA) testleri de yapılabilir. Bu olgu sunumunda, eşinden böbrek nakli olmak amacıyla kliniğe başvuran son dönem böbrek yetersizliği olan 55 yaşındaki kadın hastanın AS-CM sonuçları değerlendirilmiştir. AS-CM sonucu pozitif olan hastaya plazmaferez yapılmıştır. Plazmaferez öncesi serumun 1/500 dilasyonunda anti-HLA antikorları saptanırken, plazmaferez sonrası 1/200 serum dilasyonunda PRA sonucunun pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu da bize dolaşımdaki antikorların uzaklaştırılmasında daha duyarlı yöntemlere ihtiyacımız olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek yetmezliği, kronik; akım sitometri

ABSTRACT The presence of donor specific HLA antibodies (DSA) detected in recipients of renal transplant is an important risk factor for graft rejection/graft loss. If the donor of a female patient is going to be her child or her husband, hypersensitivity developed against paternal HLAs must be investigated thoroughly. Cross-match tests performed with flow-cytometry (FC-CM) before transplantation may detect DSAs that cannot be identified with other methods. Besides, by using flow-cytometry, panel reactive antibody (PRA) tests may be performed in which all anti-HLA antibodies in the patient are investigated. In this case study, the FC-CM results of a 55-year-old-woman, with end stage renal disease, who applied to the clinic for the aim of receiving a renal transplant from her husband were evaluated. Plasmapheresis was performed to the patients whose results for FC-CM were positive. While anti-HLA antibodies were detected before plasmapheresis in the 1/500 diluted serum, PRA results were found positive after plasmapheresis in 1/200 diluted serum. Thus, this shows us that more sensitive methods for eliminating antibodies in the circulation are necessary.

Key Words: Kidney failure, chronic; flow cytometry

Türkiye Klinikleri J Nephrol 2012;7(1):27-30

İlk kez 1969 yılında Patel ve Terasaki tarafından böbrek hastaları ve vericilerine nakil öncesi dönemde yapılan çapraz uyum [cross match (CM)] testinin hiperakut rejeksiyon bakımından önemi anlaşılmıştır. Bu testte, böbrek hastalarından elde edilen serum ile olası verici hücreleri bir araya getirilerek inkübe edilmektedir. Kompleman ilavesi ile inkübasyondan sonra, vital boya eklenerek ölü hücreler mikroskopta değerlendirilir.

rilmektedir. Bu yöntem komplemana bağlı sitotoksik çapraz uyum [complement dependent cytotoxic cross-match (CDC-CM)] olarak adlandırılır.¹ Nakil öncesi CDC-CM sonucu pozitif olan hastaların %80'inde nakil sonrası 48 saat içinde böbrek fonksiyon görememektedir. 1980'li yılların başında böbrek transplantasyonundan sonra graft yetmezliği oranı %35-50 civarındaydı. Günümüzde klinikte kullanılan yeni immünsüpresif ajanlar ve vericiye özgü antikorları [donor spesifik HLA antibody (DSA)] tespit eden yeni yöntemlerin kullanılması bu oranın düşmesine katkı sağlamıştır. 1980'li yılların başlarından beri akım sitometri ile yapılan çapraz uyum testleri (AS-CM) organ nakli laboratuvarlarına önemli bir teknik olarak girmiştir.² Bu testin önemi, CDC-CM'de belirlenemeyen düşük yoğunluktaki sınıf I antikorların ve sınıf II antikorların yanı sıra, tüm IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) alt grup anti-HLA antikorları da saptayabilmektedir. Tüm IgG anti-HLA antikorlarının saptanması, antikorun Fc bölgesine özgü ikincil antikor kullanılması ile olmaktadır. Goravay ve ark., AS-CM'nin CDC-CM'ye dayalı tekniklerden 10-100 kat duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.^{3,4}

Kan transfüzyonları ve geçirilmiş transplantasyonlar gibi gebelik de anti-HLA antikorlarının oluşumuna katkıda bulunmaktadır.^{3,5} Üç ve daha fazla gebeliği olan kadınların %50'sinde anti-HLA antikorlarının geliştiği bilinmektedir.⁵ Eşinden veya çocuklarından böbrek nakli olan kadın hastalar böbrek sağkalımı açısından daha büyük risk altındadır.^{6,7}

OLGU SUNUMU

Biz bu olgu sunumumuzda; 55 yaşında, eşinden ilk böbrek nakli amacıyla kliniğimize başvuran kronik böbrek yetmezlik olan kadın hastayı sunduk. Hipertansiyona bağlı nefroskleroz ve neticesinde kronik böbrek yetmezliği gelişen hasta, 2004 yılından beri antihipertansif ve diğer destekleyici ilaçlarla tedavi edilmiştir. Böbrek nakli için karar verildiğinde kreatinin düzeyi 6,6 mg/dL idi. Sonuncusu 20 yıl önce olmak üzere 4 gebelik hikâyesi olan alıcı adayının kan transfüzyonu öyküsü yoktu. Hasta ve donör aday olan eşi, HLA antijenleri açısından 1DR uyumluydu. CDC-CM test sonucu negatifti. Hasta

ve vericisine, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki Akım sitometri laboratuvarında AS-CM testi uygulanmıştır. Test için, alıcıdan heparinli tüpe yaklaşık 15 cc ve vericiden ise yaklaşık 30 cc periferik venöz kan alınarak lenfositler "Ficoll-hypaque" (Pharmacia, Piscataway, NJ) gradient tekniği ile izole edilmiştir. Hücre sayısı 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca alıcıdan kuru tüpe kan alınarak serum elde edilmiştir. Negatif ve pozitif kontrol serumu, alıcı serumu ve negatif kontrol serumu ile 1/2 dilüe edilmiş hasta serumu üzerine verici hücreleri eklenmiştir. Ayrıca alıcı serumu üzerine alıcı lenfositleri ilave edilerek oto kontrol de çalışılmıştır. İnkübasyon sonrası ortamdaki bağlanmayan antikorları (varsa) uzaklaştırmak amacıyla 3 kez PBS ile yıkama yapılmış ve T hücreleri saptamak için CD3-Fikoeritrinin (PE) (Immunotech, Beckman Coulter Company, Marseille, Fransa), B hücreleri saptamak için CD19-PE (Immunotech, Beckman Coulter Company, Marseille, Fransa) ve DSA'ları saptamak amacıyla IgG-Floresin izotiyosinat (FITC) [(F(ab)'2, Fc'ye spesifik)-Dako Danimarka A/S, Glostrup, Denmark] antikor eklenmiştir. İnkübasyon sonrası 2 kez PBS ile yıkama aşamalarından sonra akım sitometrisinde (EPICS-XL Coulter Corporation, Miami FL, ABD) analiz yapılmıştır. Analiz de negatif kontroldeki IgG-FITC yüzdesi belirlenerek, bunun %5 üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edilmektedir. Hasta-verici çiftinin çapraz uyum sonucu pozitif (T ASCM %59,7, B ASCM %19,7) olarak değerlendirilmiştir.

Hastaya DSA'ları uzaklaştırmak için 10 kür plazmaferez uygulanmış ve plazmaferez sonrası DSA'lar tekrar AS-CM yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuç yine T ve B AS-CM pozitif olduğundan nakil yapılmamıştır.

DSA'ların yoğunluğunu değerlendirmek amacıyla plazmaferez öncesi ve plazmaferez sonrası hasta serumu 1/5, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000 oranında negatif kontrol serumu ile dilüe edilip akım sitometriye dayalı panel reaktif antikor (PRA) tarama (Flow-PRA screening-FL12-60; One Lambda, Canoga Park, CA, ABD) yöntemi ile test edilmiştir. Bu test ile hastanın alloantikör spesifitesi saptanmamakla birlikte, hastanın anti-HLA an-

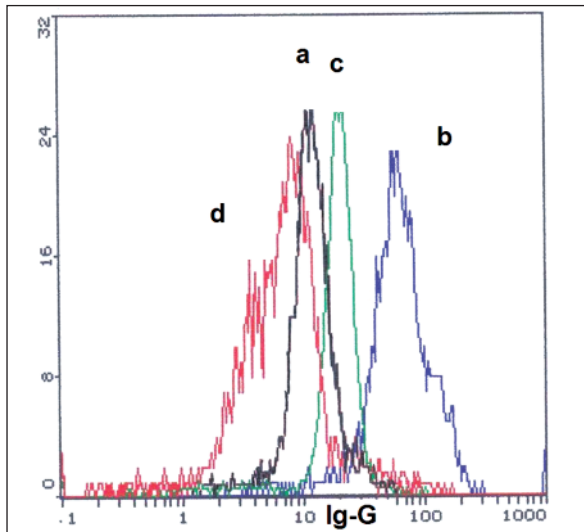
tikolarına sahip olduğu gösterilmiştir. PRA tarama testi için, 30 farklı HLA antijeni ile kaplı boncuklar hasta serumu ile inkübe edilmiş, yıkama aşamalarından sonra antikora spesifik IgG-FITC antikoru ilave edilmiştir. İnkübasyon ve yıkama sonrası akım sitometride analiz yapılmıştır. Hasta serumunun plazmaferez öncesi ve sonrası 1/500 dilüsyonlarının FL1 (IgG-FITC) histogramları, negatif ve pozitif kontrol serumlarının FL1 histogramları ile karşılaştırılmaktadır (Şekil 1). Analizde negatif kontrolün IgG-FITC yüzdesi belirlenerek, bunun %10 üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edilmektedir. Buna göre, plazmaferez öncesi hasta serumu 1/500 dilüsyonda pozitif sonuç vermiştir. Plazmaferez sonrası ise, 1/200 dilüsyonda pozitif sonuç bulunmuştur. Olgu sunumumuzda rutin değerlendirmelerdeki sonuçları kullandığımızdan, olgu bilgilendirilmiş ancak yazılı onay alınmamıştır.

TARTIŞMA

1950'li yılların sonlarından beri gebeliğin alloimmünizasyonu tetiklediği bilinmektedir. Bu alloimmünizasyon sonucunda oluşan anti-HLA antikoları, nakledilen böbreğin reddedilmesi ve özellikle de antikor aracılı rejeksiyon için risk faktörüdür.^{7,8} Akım sitometrisi, anti-HLA antikoların saptanma-

sında kullanılan duyarlı bir tekniktir. Bu yöntemde genellikle T hücreleri ve B hücreleri olmak üzere iki hedef hücre yüzeyindeki HLA sınıf I ve sınıf II antijenlerine özgü antikolar araştırılmaktadır. Genel olarak T veya hem T hem de B AS-CM sonuçları pozitifse, nakil yapılmaz.⁹ B AS-CM sonuçların pozitifliğinin önemi tartışmalıdır.¹⁰⁻¹² Ancak bu çapraz uyum sonuçlarına rağmen hastada oluşan antikor sınıfı (sınıf I ve/veya sınıf II IgG antikoları) hakkında kesin yargıda bulunmak mümkün değildir. Çünkü, sınıf I HLA antijenleri T ve B hücrelerin yüzeyinde bulunur. Ancak B hücrelerin yüzeyinde sınıf I antijen yoğunluğu, T hücrelerden daha fazladır. Bu nedenle de çok düşük düzeydeki sınıf I antikoların sadece B AS-CM pozitif sonuçlara sebep olacağı belirtilmektedir. Sınıf II antijenleri ise B hücreleri ve aktif olan T hücrelerin yüzeyindedir.³ Değerlendirdiğimiz olguda eşinden böbrek nakli planlanan ve dört gebeliği olan kadın hastada gebelik döneminde kocasının HLA sınıf I antikolarına özgü antikor geliştiği AS-CM testi ile belirlenmiştir.

Nakil öncesi DSA olduğu durumlarda intravenöz immünglobulin, plazmaferez ve/veya kimerik monoklonal anti-CD20 antikoları kullanılarak duyarlılığın azaltılması ve çapraz uyum sonucunun negatif olması sağlanır. Bu amaçla, hastaya 10 kür plazmaferez uygulanmıştır. Uygulama sonrası tekrarlanan çapraz uyum test sonucu pozitif çıktığından dolayı eşinden böbrek nakli yapılması uygun görülmemiştir. Plazmaferezin antikor miktarına etkisini görmek amacıyla plazmaferez öncesi ve sonrası serumlar dilüe edilerek antikor tarama testi yapılmıştır. PRA tarama testinde, hastanın HLA sınıf I antikoları pozitif iken HLA sınıf II antikoları negatif olarak tespit edildi. Bu da bize B AS-CM pozitif sonucun sınıf I antikolarından kaynaklanan bir pozitiflik olduğunu göstermektedir. Plazmaferez öncesi hasta serumu 1/500 dilüsyonda pozitif sonuç vermiştir. Rebibou ve ark.nın çalışmasında, akım sitometri PRA sonucu pozitif olan hasta serumunun 1/2048 dilüsyonunda bile antikor pozitifliğinin tespit edilebildiği belirtilmiştir.¹³ Bizim testimizde daha düşük bir dilüsyonda antikor pozitifliğinin (son immünizasyon zamanı 20 yıl önce) immünizasyon zamanından kaynaklanabileceğini düşünüyoruz. Plazmaferez sonrası serum ise,



ŞEKİL 1: Olgunun AS-CM sonuçları.

Negatif kontrol (a), pozitif kontrol (b), plazmaferez öncesi hasta serumunun 1/500 (c) ve plazmaferez sonrası hasta serumunun 1/500 (d) dilüsyonlarının akım sitometrisinde analiz sonuçları.

1/200 dilüsyonda pozitifdir. Plazmaferez öncesi ve sonrası elde edilen PRA sonuçları, uygulanan plazmaferezin bu olguda nakil için yeterli olmadığını, anti-HLA antikor oranını düşük oranda değiştirdiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, gerek DSA'ların saptanmasında gerekse PRA'ların tespitinde duyarlılığı yüksek

olan akım sitometrik yöntemler transplantasyon kararının verilmesinde önemlidir. Ayrıca plazmaferez öncesi ve sonrası hasta serumunun PRA sonuçları göz önüne alındığında, plazmaferezin anti-HLA antikorlarını temizlemede etkili olmadığı, immünabsorbsiyon gibi daha farklı yöntemlerin kullanılması uygun olabilir.¹⁴

KAYNAKLAR

- Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280(14):735-9.
- Garovoy MR, Rheinschmitt MA, Bigos M, Perkins H, Colombe B, Feduska N, et al. Flow cytometry analysis: a high technology cross-match technique facilitating transplantation. *Transplant Proc* 1983;15:1939-44.
- Gebel HM, Bray RA. Laboratory assessment of HLA antibodies circa 2006: making sense of sensitivity. *Transplantation Reviews* 2006; 20(4):189-94.
- Arnold ML, Zacher T, Dechant M, Kalden JR, Doxiadis II, Spriewald BM. Detection and specification of noncomplement binding anti-HLA alloantibodies. *Hum Immunol* 2004;65 (11):1288-96.
- Rebibou JM, Chabod J, Alcalay D, Coussediere MC, Deteix P, Touchard G, et al. Flow cytometric evaluation of pregnancy-induced anti-HLA immunization and blood transfusion-induced reactivation. *Transplantation* 2002;74(4):537-40.
- Rosenberg JC, Jones B, Oh H. Accelerated rejection following offspring-to-mother and husband-to-wife transplants. *Clin Transplant* 2004;18(6):729-33.
- Bartel G, Walch K, Wahrmann M, Pils S, Küssel L, Polterauer S, et al. Prevalence and qualitative properties of circulating anti-human leukocyte antigen alloantibodies after pregnancy: no association with unexplained recurrent miscarriage. *Hum Immunol* 2011;72 (2): 187-92.
- Toyoda M, Ge S, Pao A, Vo A, Deer N, Aguiluz A, et al. Cellular allo reactivity against paternal HLA antigens in normal multiparous females as detected by intracellular cytokine flow cytometry remains elevated over years despite diminution of anti-HLA antibody levels. *Transpl Immunol* 2010;23(3):133-40.
- Scornik JC. Detection of alloantibodies by flow cytometry: relevance to clinical transplantation. *Cytometry* 1995;22(4):259-63.
- Takeda A, Uchida K, Haba T, Tominaga Y, Katayama A, Kobayashi T, et al. Acute humoral rejection of kidney allografts in patients with a positive flow cytometry crossmatch (FCXM). *Clin Transplant* 2000;14(Suppl 3): 15-20.
- Sumitran-Karuppan S. The clinical importance of choosing the right assay for detection of HLA-specific donor-reactive antibodies. *Transplantation* 1999;68(4):502-9.
- Lobashevsky AL, Senkbeil RW, Shoaf J, Mink C, Rowe C, Lobashevsky ES, et al. Specificity of preformed alloantibodies causing B cell positive flow crossmatch in renal transplantation. *Clin Transplant* 2000;14(6): 533-42.
- Rebibou JM, Carvalho Bittencourt M, Saint-Hillier Y, Chabod J, Dupont I, Chalopin JM, et al. T-cell flow-cytometry cross-match: influence in renal transplantation. *Transplant Proc* 1998;30(6):2800-1.
- Singh N, Pirsch J, Samaniego M. Antibody-mediated rejection: treatment alternatives and outcomes. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; 23(1):34-46.