

FLOW CYTOMETRY İLE PANEL REAKTİF ANTİKORLARIN BELİRLENMESİ

Tülay K. AYNA¹, A.Sarper DİLER^{1,2}, Hayriye ŞENTÜRK¹,
Mehmet GÜRTEKİN¹, Mahmut ÇARİN¹.

ÖZET

Böbrek nakillerinde anti-donör antikorlar graft sağkalımını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bu antikorlar, red olmuş nakiller, gebelik ve kan transfüzyonları nedeniyle oluşabilmekte ve genel olarak Panel Reaktif Antikor (PRA) adını almaktadır. PRA genellikle serolojik yöntemlerle saptanmaktadır. Ancak son yıllarda PRA' lar, Flow cytometry (FC) yöntemleriyle pozitiflik oranının daha doğru ve ayrıntılı biçimde belirlenebildiği flow-PRA özgül yöntemi ile oluşmuş antikorun hangi Human Leucocyte Antigen (HLA)'ine özgül olduğu tespit edilmektedir. Bu çalışmada, FC cross-match (FCXM) yapılmış 11 hastanın Flow-PRA' ları araştırılmıştır. FCXM sonucu negatif olan 8 hastanın, Flow-PRA tarama sonucu negatif olarak bulunurken, FCXM sonucu pozitif olan üç hastanın da PRA inceleme sonucunun pozitif olduğu görülmüştür. Bu antikorların Flow-PRA özgüllüğü araştırıldığında, birinci hastada HLA-A11, A26 ve B18'e spesifik HLA antikorları saptanırken, ikinci hastada antikor özgüllüğü belirlenememiştir. Üçüncü hastada ise, HLA-Bw4 ve Bw6'ya özgül anti-HLA antikorları saptanmıştır. HLA Sınıf I ve Sınıf II antikorlarını basit, hızlı ve özgül bir yöntemle belirleyen Flow-PRA yöntemlerinin gelecekte daha fazla kullanım alanı bulacağını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: ASCM, Flow-PRA, böbrek nakli, anti HLA antikorları

SUMMARY

FLOW CYTOMETRIC DETECTION OF PANEL REACTIVE ANTIBODIES

Anti donor antibody is one of the main parameters affecting graft survival. The antibodies can be formed following a rejection of a transplantation, gestation and transfusion and has been termed as Panel Reactive Antibodies (PRA). PRA has conventionally been analysed with serological methods. Flow Cytometric (FC) analysis has been the chosen method in recent years for its well known accuracy. Flow PRA screening analysis is used to detect the percentage of antibody presence, where as, specificity of the HLA antibody can be evaluated by Flow PRA specific assay.

This study investigates the Flow PRA of 11 patients who had already been tested for FC Cross Match (FCXM). Eight results were comperable and interpreted as negative (ie. FCXM vs. Flow PRA screening), where as 3 positive results were seen for patients who had positive results with FCXM.. Flow PRA specific analysis of these patients depicted HLA specificities of HLA A11, HLA A26 and HLA B18 in the first patient, no specific HLA was detected for the second patient and HLA Bw4 and HLA Bw6 were observed for the third patient. The preliminary results of this study implies a routine usage of this method in transplantation immunology laboratories, though warrants further studies with larger patient groups though prominent indications with the existing specificities.

Key words: FCXM, Flow PRA, kidney transplantation, anti HLA antibody.

GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), hastaları diyalize bağımlı hale getiren, maddi ve manevi açıdan son derece yıpratıcı bir hastalıktır. Bu kişilerin sağlıklı bir yaşama dönebilmeleri, ancak böbrek nakli ile mümkündür (1,2). Gerek kadavradan, gerekse yakın akrabalarından yapılan canlı nakillerde, hasta ve verici arasında kan gruplarının, HLA'lerinin uyumlu olması gerekir. Yine nakil öncesinde, hastada anti-donör HLA antikorlarının varlığını belirleyen cross-match testinin yapılması da zorunludur. Aksi takdirde graft sağkalımı tehlikeye girmektedir (3).

Anti-HLA antikorları, red edilmiş böbrek nakli ve kan transfüzyonları sonrasında veya kadınlarda gebelik döneminde gelişebilir. PRA adı verilen bu antikorlar, çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir. Bunlardan mikrolenfositotoksosite yöntemi, en eski ve tüm transplantasyon merkezlerinde uygulanan bir testtir. Ancak bu test ile, düşük düzeydeki Sınıf I antijenlerine özgül antikorlar ve Sınıf II antijenlerine özgül antikorlar belirlenmemektedir (4,5). Mikrolenfositotoksosite yöntemi ile, sadece aktivasyonu komplemana bağlı olan antikorlar (IgG1, IgG3) saptanabilmektedir. Graft sağkalımını etkileyen ve aktivasyonu

1 İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

2 Ulusal Kemik İliği Bankası

komplemandan bağımsız olan antikorlar tespit edilememektedir. (6, 7). Bütün bu olumsuzluklar bilim adamlarını daha hassas yöntemler araştırmaya yöneltmiştir. Sonuçta, Flow sitometre (FC) ile daha hassas, kolay uygulanabilen ve özgül sonuç veren HLA antikorunu taramasını sağlayan Flow-PRA inceleme testi ve Flow-PRA spesifik testi geliştirilmiştir (8). Bu test yöntemi ile, HLA antikorlarının tiplerinin ve yüzdesinin tespiti yapılmakta, organ naklinden sonra hastada gelişebilecek anti-donor antikorları belirleme fırsatı elde edilmektedir. Her iki testte de insan serumundaki HLA antikorlarının FC yoluyla taranması için, saflaştırılmış HLA antijeni ile kaplı mikro boncuklardan yararlanılmaktadır. Flow-PRA inceleme testinde, Sınıf I ve Sınıf II antijenleri ile kaplı boncuklardan oluşan bir havuz kullanılarak serumdaki antikor yüzdesi belirlenmektedir. Antikor tipini tespit etmek için de Flow-PRA spesifik testi uygulanmaktadır (8,9).

Çalışmamızda, FCXM yapılan 11 hastanın Flow-PRA Sınıf I antikorları araştırılarak, mevcut antikorların anti-donor antikor olup olmadığı saptanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, İstanbul Tıp Fakültesi (İTF) Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda, akrabadan canlı nakil planlanan ve FCXM yapılan 11 hasta alınmıştır. Bu hastaların 6'sı kadın, 5'i erkektir. Vericilerin ise 5'i kadın, 6'sı erkektir. Hastaların yaş ortalaması 26 ± 5.67 , vericilerin yaş ortalaması 48.9 ± 15.04 'dür. Hastalardan alınan serum örneklerine Flow-PRA İnceleme testi ve Flow-PRA Spesifik testi uygulanmıştır.

Flow-PRA İnceleme Testi: 20 μ l hasta serumuna, 5 μ l Flow-PRA Sınıf I inceleme boncuk grubu eklenir. Hafifçe karıştırılarak 20-25 0C'de, 30 dakika inkübe edilir. Boncuk-serum karışımına 1X yıkama çözeltisi eklenerek vor-

teksle karıştırılır. 1500 g'de 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılır. Yıkama çözeltisi ile tekrar santrifüj edilip üstsıvı uzaklaştırılır. 100 μ l 1X FITC ile konjuge edilmiş keçi anti-human IgG eklenerek hafifçe karıştırılır ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilir. İki kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Tüplere 0.5 ml fiksasyon çözeltisi eklenerek FC' de analiz edilir.

Serumda anti-HLA antikoruna varsa Flow-PRA boncuklarına bağlanır. Floresan işaretli anti-human IgG antikoruna boyandıktan sonra, anti-HLA IgG pozitif serumu, negatif seruma kıyasla bir floresan kanal geçişi gösterir. Yüzde PRA, serumla pozitif reaksiyona giren boncukların, yüzde oranı olarak belirlenir.

Flow-PRA Spesifik Testi: Panel dört grupta toplam otuz iki adet saflaştırılmış HLA antijeni kaplı boncuktan oluşmaktadır. Bir serum örneğini test etmek her boncuk grubu ile ayrı ayrı serumun test edilmesi gerekir. 20 μ l hasta serumuna 5 μ l Flow-PRA spesifik boncuk grupları (Sınıf I) eklenir. Hafifçe karıştırılarak 20-25 0C'de 30 dakika inkübe edilir. Boncuk-serum karışımına 1X yıkama çözeltisi eklenerek vortekle karıştırılır. 1500 g'de 15 dakika santrifüj edilerek üstsıvı uzaklaştırılır. Yıkama çözeltisi ile tekrar santrifüj edilip üst sıvı uzaklaştırılır. 100 μ l 1X FITC ile konjuge edilmiş keçi anti-insan IgG eklenerek hafifçe karıştırılır ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilir. İki kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Tüplere 0.5 ml fiksasyon çözeltisi eklenerek örnek FC'de analiz edilir. Pozitif bir reaksiyon, negatif reaksiyona oranla boncukların FL1 histogramında yer değiştirmesi ile saptanır.

BULGULAR

Bu çalışmaya alınan ve FCXM yapılan 11 hastanın yaşı, cinsiyeti, kan grubu, kan transfüzyonu bilgileri ve transplantasyon bilgileri Tablo 1 de görülmektedir.

Tablo 1: Hastaların yaş, cinsiyet, kan grubu, kan transfüzyonu ve transplantasyon bilgileri

No	Yaş	Cinsiyet	Kan gurubu	Kan transfüzyonu	Transplantasyon bilgisi
1	32	E	0	10Ü-92	89'da nakil 92'de red.
2	28	K	0	----	----
3	18	K	A	2Ü-Eylül 99	----
4	23	E	A	2Ü-Ocak 00	----
5	17	K	A	2Ü-93	93-6.gün ve 96-6.ay red.
6	25	K	0	8Ü-Tem 99	----
7	35	E	0	----	----
8	26	K	0	4Ü-Nisan 98	----
9	27	E	0	2Ü-Mayıs 97	----
10	23	E	0	----	----
11	32	K	0	8Ü-Şubat 99	----

Tablo 2' de hastaların FCXM ve Flow-PRA inceleme testi sonuçları görülmektedir. FCXM negatif olan 8 hastanın (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10), Flow-PRA inceleme sonuçları da negatif olarak bulunmuştur. FCXM pozitif olan 3 hastanın da (1, 5, 11), Flow-PRA Sınıf I inceleme sonuçları izlendiğinde Sınıf I antikorlarının yüzdesinin negatif kontrole göre yüksek olduğu bulunmuştur.

Tablo 2: Hastaların FCXM ve Flow-PRA Sınıf I inceleme testi sonuçları

Flow-PRA Sınıf I inceleme Testi:		
Serum no	FCXM	HLA Sınıf I (%)
1	T, B (+)	49.0
2	T, B (-)	0
3	T, B (-)	0
4	T, B (-)	0
5	T,B (+)	83.0
6	T, B (-)	0
7	T, B (-)	0
8	T, B (-)	0
9	T, B (-)	0
10	T, B (-)	0
11	T,B (+)	93.75

Tablo 3: Flow-PRA Sınıf I inceleme test sonuçları yüksek olan hastaların Flow-PRA Spesifik test sonuçları

Serum no	Flow-PRA HLA Sınıf I	Spesifik
1	HLA-A11,26; B18	
5	Spesifite saptanamadı.	
11	HLA Bw4, w6	

Tablo 3'de Flow-PRA İnceleme Sınıf I test sonuçları yüksek çıkan hasta serumlarındaki antikor özgüllüğünü belirlemek için uygulanan Flow-PRA Sınıf I spesifik test sonuçları görülmektedir. Flow-PRA sonucu (+) olan 1 no'lu hastada, HLA-A11, A26 ve B18'e spesifik HLA antikorları saptanırken, 5 no'lu hastada antikor özgüllüğü belirlenmemiştir. 11 no'lu hastada ise, HLA-Bw4 ve Bw6'ya spesifik anti-HLA antikorları saptanmıştır.

TARTIŞMA

Anti HLA antikorları donörün HLA antijenlerine özgül olarak bağlanarak grafitin harabiyetine sebep olmaktadır. Bu nedenle de böbrek nakli planlanan KBY'li hastalarda oluşan anti-HLA antikorları grafit sağ kalımını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bu durumda nakil öncesinde hasta serumundaki antikorların yoğunluğunun ve türünün tespit edilmesi son derece önemlidir (10). Ülkemizde organ bağışının düşük oranda olması nedeniyle kadavradan böbrek nakli oldukça azdır. Genellikle akraba vericilerden canlı nakil yapılmaktadır. Organ bulmanın son de-

rece güç olduğu bu koşullarda nakledilen organın hastada mümkün olduğunca uzun süre işlev görebilmesi için tüm araştırmaların detaylı bir şekilde yapılması gerekmektedir. Bu nedenle de klasik lenfotoksiste PRA yöntemleri yerini Flow -PRA uygulamalarına bırakmaktadır. Birçok literatürde Flow-PRA ve lenfositotoksiste yöntemleri karşılaştırıldığında Flow-PRA'nın daha hassas olduğu belirlenmiştir (9,10,11,12).

Rebibou ve arkadaşları, FC ile gebelik sonrasında anti-HLA antikorlarının oluşma olasılığını araştırmış. kadınların yaklaşık %50'sinde 3. gebelik sonrasında bu antikorların oluştuğunu belirlemişlerdir. Bekleme listesindeki 28 kadın hastadan FCXM pozitif olan 9 tanesine Flow-PRA uygulanmıştır. T ve B FCXM pozitif olan 3 hastadan ikisinin hem Sınıf I hem de Sınıf II anti-HLA antikoruna, birinin ise Sınıf I antijenine özgül bir antikora sahip olduğu belirlenmiştir. B FCXM pozitif olan 6 testin de 1'i Sınıf I ve II'ye, 3 tanesi Sınıf II'ye ve 1 tanesi de Sınıf I'e spesifiktir. Bir serumda ise anti-HLA antikor tespit edilememiştir (13).

Rebibou ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada kadavradan böbrek bekleyen hastalara Flow PRA uygulanmış, FCXM (+) mikrolenfositotoksik cross-match (-) olan tüm serumlar Flow PRA ile de pozitif olarak bulunmuştur. Sonuçlar Flow PRA Spesifik teste göre değerlendirildiğinde Sınıf I HLA antikorların saptanmasında hata yokken, Sınıf II antikorların tesbitinde % 8.3 oranında hatalı pozitif sonuç elde edilmiştir (14).

Çalışmamızda, FCXM yapılmış 11 hastanın Flow-PRA Sınıf I antikorları araştırılmıştır. FCXM sonucu negatif olan 8 (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10) hastanın, Flow-PRA Sınıf I inceleme neticesi negatif olarak bulunurken, FCXM sonucu pozitif olan 3 (1, 5, 11) hastanın da PRA Sınıf I inceleme neticesinin pozitif olduğu görüldü. Bu antikorların Flow-PRA Spesifitesi araştırıldığında, 1 no'lu hastada HLA-A11, A26 ve B18'e spesifik antikorlar tespit edilmiştir. Vericide ise A3 antijeni mevcuttu. A3 ve A11 aynı cross-reaktif grup içindedir. FCXM pozitifliğinin bu antijenik benzerlikten kaynaklandığı öne sürülebilir. 5 no'lu testte antikor spesifitesi belirlenmemiştir. Bu hasta iki kez nakil olmuş ve ilk nakil sonrası hiperakut rejeksiyon, ikinci nakil sonrası ise akut rejeksiyon geçirdiği bildirilmiştir. Ayrıca çok sayıda kan transfüzyonu olan bu hastada, HLA spesifitesinin belirlenmemesini, çok sayıda antijene karşı antikor oluşmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. 11 no'lu testte ise, HLA-Bw4 ve Bw6'ya özgül anti-HLA antikorları belirlenmiştir.

Çalışmamızda FCXM (+) olan sonuçların Flow PRA Sınıf I inceleme ve Sınıf I spesifik testleri ile de pozitif olduğu

görülmektedir. Sonuçlarımızın diğer çalışmalarla uyumlu olduğu, FC yöntemlerinin HLA antikorlarını tesbit etmeye katkıda bulunduğu görülmektedir (13,14).

Sonuç olarak, HLA Sınıf I antikorlarını basit, hızlı ve özgül bir yöntemle belirleyen Flow-PRA yöntemlerinin klasik PRA yöntemlerine destek olacağı ve graft ve hasta hayatının daha uzun olmasına katkıda bulunacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Andreoli TE., Carpenter CC.J., Plum F., Smith LT. Cecil essential of medicine, second edition, WB. Saunders Company, 1990; 302-315.
2. Strom TB., Tilney NL.: Renal transplantation: Clinical aspects, in Brenner BM., Rector FJ. (eds): The Kidney Philadelphia; WB. Saunders Company. 1986; 1941-1976.
3. Stites DP., Terr AI., Parslow TG.: Clinical transplantation, Basic and Clinical Immunology, eight edition. 1994; 744-763.
4. Fernandez-Fresnedo G, Pastor JM, Lopez-Hoyos M, Ruiz JC, Zubimendi JA, Gonzalez-Cotorruelo J, Rodrigo E, de Francisco AL, Arias M. 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 May, 18 (5): 990-995
5. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, Pham PT, Danovitch GM, Gritsch HA, Reed EF. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. Transplantation 2005 Mar 15; 79 (5): 591-598
6. Muller Stainhardt M, Fricke L, Kircher H, Hoyer J, Kluter H. Monitoring of anti HLA class I and II antibodies by flow cytometry in patients after first cadaveric kidney transplantation. Clinic Transplant. 2000 Feb; 14 (1): 85-89
7. Kaufman A. de Souza Pontes LF, Queiroz, Marques MT, Sampaio SC, de Moraes Sabrino Porto LC, de Moraes Souza ER. Analysis of AHG-PRA and ELISA-PRA in kidney transplant patients with acute rejection episodes. Transp. Immunol 2003 Apr- jun 11 (2): 175-178
8. Tambur AR., Pamboukian SV., Costanzo MR., Herrera ND., Dunlap S., Montpetit M., Heroux A. The presence of HLA directed antibodies after heart transplantation is associated with poor allograft outcome. Transplantation 2005 Oct 27; 80(8): 1019-1025
9. Howard M. Gebel, Robert A. Bray and Peter Nickerson. Pretransplant assesment of donor reaktif HLA spesific antibodies in renal transplantation: contraindication vs risks. Am J Transp 2003;3: 1488-1500
10. Abbul K. Abbas Andrew H. Lichtman. Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders company. Fifth edition. Transplantation immunology. 2005; 369-391
11. Shroyer W., Deierhol H., Mink A., Cagle R., Hudson L., Rhea D. and Diethelm G. Transplantation 1995 Vol.59, 626-630 February 27
12. Scoumi D., İniotaki-Theodoraki A., Paterakis G., Ioannou S., Stravoskoufi P. and Stavropoulos-Giokas C. 14th European Histocompatibility Conference Volume 61, Supplement 1 Supplement to Human Immunology, 4-7 April 2000 France
13. Rebibou JM, Chabod J, Dupont I, Chalopin JM, Tiberghien P. 14th European Histocompatibility Conference Volume 61, Supplement 1 Supplement to Human Immunology, 4-7 April 2000 France
14. Rebibou JM, Chabod J, Bittencourt MC, Thevenin C, Chalopin JM, Herve P, Tiberghien P. Flow PRA evaluation for antibody screening in patients awaiting kidney transplantation. Transpl Immunol. 2000 Jun;8(2):125-128

İletişim

Tülay K. AYNA
0212 6351168
0532 3432409