

Akım Sitometrisi ile Böbrek Nakli Sonrası Vericiye Özgü Antikorların Monitorizasyonu

Flow Cytometry Monitoring of Donor Specific Antibodies after Kidney Transplantation

ÖZ

AMAÇ: Bu çalışmada, akım sitometrisi ile çaprazlama (ASCM) yöntemi ile saptanan vericiye özgü antikorların oluşumu, bu antikorların hedef hücresi ve devamlılığı ile rejeksiyon, graft sağkalımı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Çalışmaya böbrek nakli olmuş 50 hasta ve onların akraba vericileri dahil edilmiştir. Nakil sonrası 1., 7., 14. gün ve 1., 3., 6. ve 12. aylarda hastalardan serum elde edilerek vericilerin taze hücreleri ile T ve B ASCM uygulanmıştır.

BULGULAR: Nakil sonrası yapılan test sonuçları değerlendirildiğinde, 1., 7. ve 14. gün testlerinin, 8 (%16)'inin, 1. ay 9 (%18)'unun, 3. ay 7 (%14)'sinin, 6. ay ve 12. ay 6 (%12)'sının pozitif olduğu saptanmıştır. Hastalardan 5'inin tüm çalışma süresince ASCM sonuçları (+) iken, 6 hastanın farklı test günlerinde sonuçlarının (+) olduğu saptanmıştır. Tüm çalışma süresince ASCM sonuçları (+) olan 5 hastadan 2'si (her ikisinde de tüm çalışma günlerinde T, B +) akut rejeksiyon sonucu böbreklerini kaybetmişler. Farklı test günlerinde (+) olan 6 hastanın 3'ü (3 hastanın sonucu da B ASCM +) kronik rejeksiyon nedeniyle takip edilmektedir. Çalışma süresince 2 hasta graftlarını kaybetmiştir. Altı aylık ve 1 yıllık graft sağkalımı %96 olarak saptanmıştır. Ayrıca, hastaların test günlerindeki kreatinin düzeyleri ile ASCM (+) ve (-) sonuçlar arasında ilişki bulunmuştur.

SONUÇ: Nakil sonrasında ASCM testi yaptığımız tüm günlerde elde edilen test sonuçlarını hedef hücrelerin pozitifliğine göre değerlendirdiğimizde; T,B ASCM (+) sonuçların tüm çalışma günlerinde, akut rejeksiyon ve graft sağkalımı, ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlı iken, bu kronik rejeksiyon ile anlamsız bulunmuştur. Nakil sonrası ilk 1 ay içindeki B ASCM (+) sonuçların ise, kronik rejeksiyon ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlıdır. Nakil sonrası tüm test günlerinde saptanan T, B ASCM (+) sonuçların akut rejeksiyon ve graft sağkalımı konusunda, ilk 1 ay içindeki tüm B ASCM (+) sonuçların ise, kronik rejeksiyon konusunda kliniğe ışık tutabileceği görülmektedir. ASCM (+) olan hastaların devamlı ve aralıklı test günlerindeki pozitiflik ile rejeksiyon ve graft sağkalımı arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur. ASCM (+) olan hastaların kreatinin düzeylerinin ortalaması ASCM (-) olan hastalardan daha yüksek olarak bulunmuştur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Akım sitometrisi ile çaprazlama, Böbrek nakli, Verici özgü antikor

ABSTRACT

OBJECTIVE: In this study, we purpose that the screening of posttransplant donor specific antibodies (DSA) and target of these antibodies by flow-cytometry. We also try to investigate that the relationship with the DSA's and the graft survival.

MATERIAL and METHODS: Fifty renal transplant patients and their related donors were included to study. Serum samples were taken 1., 7.,14. days and 1., 3., 6 and 12. posttransplant months. T and B cell flow cytometric cross-match tests were performed with the donor derived fresh cells.

RESULTS: We determined as positive FCXM results of posttransplant 1., 7., 14. days as 16%, and 1., 6., 9. and 12. months 18%, 14%, 12% and 12% respectively. While 5 patients results are positive in whole study time, 6 patients results were positive different test days. Two of five patients who had whole study days FCXM positive lost their allografts due to acute rejection episodes in posttransplant second and third day. Chronic allograft dysfunction was occurred in three of 6 patients who had FCXM

Tülay KILIÇASLAN AYNA¹
Hayriye ŞENTÜRK ÇİFTÇİ¹
Yaşar ÇALIŞKAN²
Mehmet GÜRTEKİN¹
Aydın TÜRKMEN²
Mahmut ÇARİN¹

1 İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

2 İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı,
Nefroloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

Geliş Tarihi: 06.01.2010

Kabul Tarihi: 29.03.2010

Yazışma Adresi:

Tülay KILIÇASLAN AYNA
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi,
Temel Bilimler 3. kat Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye
Tel : 0 212 635 11 68
Gsm : 0 532 343 24 09
Faks : 0 212 635 11 68
E-posta : tulayayna@gmail.com

positive (B cell FCXM positive) in the different day. Two patients lost their grafts during the study period. Graft survival was found 96% and 96% in 6 and 12 months respectively. There was a relationship between the test days creatinine levels and FCXM results.

CONCLUSION: As a result; while positive results of B and T cell FCXM in whole study days are related with the acute rejection and graft survival but there is no relationship with chronic rejection. It was also found that no relationship between the only T cell positive FCXM and acute rejection, graft survival and chronic rejection. In the first posttransplant month, the relationship between positive B cell FCXM tests and chronic rejection were found statistically significant. It is shown that the posttransplant B and T cell FCXM and first month B cell FCXM tests are predictive for acute rejection, graft survival and chronic rejection respectively. Permanent and intermittent FCXM positivity were not found related with acute rejection and graft survival. The creatinine levels of patients with FCXM positivity were found to be higher than the patients with FCXM negative.

KEY WORDS: Flow cytometry, Renal transplantation, Donor specific antibody

GİRİŞ

Böbrek nakli planlanan alıcılarda gelişen antikorlar vericinin insan lökosit antijenlerini (human leukocyte antijen-HLA) tanıyabilir ve graft rejeksiyonunu yönlendirebilir. Bu antikorlar, önceki nakiller ve kan transfüzyonları sonrasında oluşabileceği gibi gebelik döneminde babaya ait HLA antijenlerine karşı da gelişebilir. Eğer vericiye özgü antikor (donor specific antibody-DNA) saptanırsa; bunların IgG mi yoksa IgM mi olduğu, hangi hedef hücreye (T, B) mi özgü olduğunun bilinmesi önemlidir. Nakilden önce bu antikorların saptanması, rejeksiyon riski olan nakillerin belirlenmesine yardım eder. Çünkü lenfositler HLA antijenlerini yüksek oranda ekspres eder ve DNA'ların belirlenmesi için hedef hücre olarak seçilirler (1).

Birçok araştırmacı, böbrek nakillerinde allograft rejeksiyonu ve graft sağkalımı üzerinde nakilden sonra vericiye özgü hassasiyetin etkisi konusunda aynı fikirdedir. Grafttaki uyumsuz HLA antijenlerine karşı hümmoral immün cevap farklı alloantikorların üretilmesine sebep olabilir. Bu antikorların bazıları sınıf I, bazıları ise sınıf II antijenlerinin ortak (publik - 2 veya daha fazla HLA spesifitesi tarafından paylaşılan epitop) veya özel (private - bir HLA antijeni üzerindeki tek epitop konfigürasyonu) yapılarına özgü olabilir (2,3,4). Bazı literatürlerde de, HLA sınıf I DNA'lar erken graft yetmezliği ile ilişkili iken HLA sınıf II DNA'ların ise uzun dönem graft yetmezliği ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (5,6,7,8). Nakil sonrası uygulanan farklı tedavi protokollerinin DNA oluşumu ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca nakil sonrası oluşan antikorların rejeksiyon ile ilişkili olmadığını belirten çalışmalar mevcuttur (5,6,7). HLA-DR 3, 4, 5 lokusları tarafından kodlanan antijenlere (DR52, DR53, DR51) özgü antikorlar daha zor elimine edilen antikorlardır. HLA sınıf I ve sınıf II DNA'lı hastalarda nakil sonrası genellikle tek rejeksiyon atağı mevcutken, DR51, 52, 53'e özgü DNA'lı hastalarda birden fazla rejeksiyon atağı vardır. Bu antikorlar vücutta daha uzun süre kalmasına rağmen, graft fonksiyonlarının bozulmadan kalması tez olarak görünse de bu durum sözkonusu antikorların düşük seviyede olması ile açıklanmaktadır (8,9). Antikorlar doğrudan grafta bağlanarak aktive olan verici endotel hücrelerinde rejeksiyonu başlatabilir. Antikorların rejeksiyondan sorumlu olan gerçek faktörler olan hücresel olaylara ikincil olarak katıldığı tartışmalıdır (8). Yine

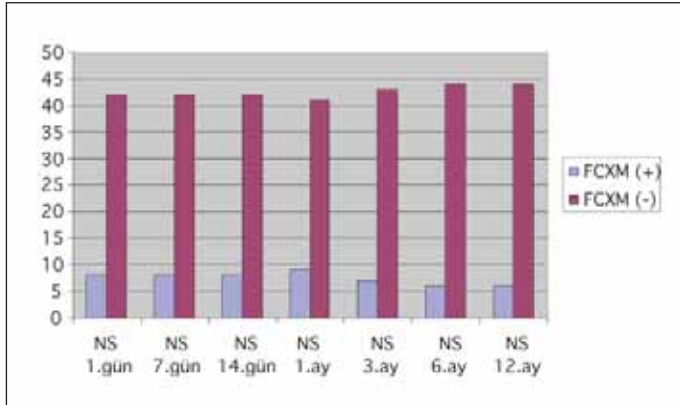
bu antikorların üretimini akut rejeksiyon ataklarından çok organ fonksiyonu ve sağkalımı üzerindeki etkisinin daha kötü olduğu belirtilmektedir. Kronik graft yetmezliğinin gelişiminde en önemli risk faktörlerinden biri erken akut rejeksiyon ataklarının ve DNA'ların oluşumudur (7). Böbrek nakli sonrasında DNA'ların saptanması rejeksiyon tedavisine başlanması için bir gösterge olabilmektedir. (8,9,10).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Mart 2001 - Nisan 2004 tarihleri arasında canlı akraba vericiden böbrek nakli yapılan 50 hasta-verici çifti çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunun yaş ortalaması $29,18 \pm 8,68$ (7-51), verici grubunun yaş ortalaması $51,68 \pm 11,05$ (23,74) olarak bulunmuştur. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda hasta-verici çiftlerine iki renkli akım sitometrisi ile çaprazlama-cross match (ASCM) testi uygulanmıştır. T hücrelerini tanımak için CD3-PE, B hücrelerini tanımak için ise, CD20-PE monoklonal antikorları kullanılmıştır. IgG antikorlarını tanımak amacıyla ise IgG-FITC ikincil antikorunu kullanılmıştır. Hastaların nakil sonrası 1. gün, 7. gün, 14. gün, 1. ay, 6. ay, ve 12. ayda kanları alınarak santrifüj ile serumları elde edilmiş ve tüm serumlar etiketlenerek -20°C 'de saklanmıştır. Bu hastaların vericilerine ulaşılarak randevu verilmiş ve belirlenen günde ficol hypaque gradient santrifüj yöntemi verici lenfositleri elde edilerek 5×10^5 hücre/ml'ye ayarlanmıştır. Verici hücreleri negatif kontrol serumu, pozitif kontrol serumu ve hastanın nakil sonrası elde ettiğimiz serumları üzerine ilave edilerek 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Yıkama aşamalarından sonra uygun tüplere CD3-PE, CD20-PE ve tüm tüplere IgG-FITC ilave edilerek buzdolabında 20 dakika inkübasyon yapılarak test tüpleri analizi yapılmıştır. Analiz sonrasında, tek parametrelili IgG-FITC histogramındaki % floresan değeri, negatif kontrolün IgG-FITC histogramındaki % floresan değeri ile karşılaştırılmıştır. T ASCM için %5'in, B ASCM için %7,5'un üzerindeki bir artışta sonuç pozitif olarak yorumlanmıştır. İstatistiksel analiz, Fisher'in Exact testi, Mann Whitney U testi, eşlenmemiş test ve Kaplan-Meier testi kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

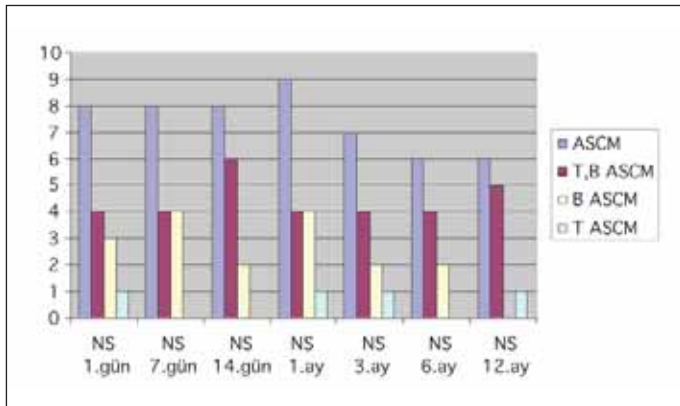
Çalışmaya dahil edilen hasta-verici çiftleri arasında en az 1A 1B 1DR doku uyumu mevcuttu. Nakil öncesi 46 çiftin



Şekil 1. Nakil sonrası farklı günlerde yapılan ASCM sonuçları

ASCM sonucu (-) iken, 4 hastaya ASCM çalışılmamıştır. Nakil sonrası immünesupresif tedavi olarak hastalardan 25'i takrolimus (Tac), mikofenolat mofetil (MMF), prednizolon (Pred), 17'si siklosporin (Cyc), MMF, Pred, 2'si Cyc, azatioprin (Aza), Pred, 2'si Tac, Aza, Pred, 2'si rapamisin (Rapa) MMF, Pred, 1'i anti timosit globulin (ATG), 1'i OKT3 ve IL-2R kullanmıştır. Hastaların nakil sonrası 1., 7., 14. günlerdeki 1., 3., 6 ve 12. aylardaki serumları ve canlı verici hücreleri ile T ve B ASCM uygulanmıştır. Canlı akrabadan böbrek nakli olmuş 50 hastadan toplam 11 (%22)'inin nakil sonrası ASCM sonuçlarının (+) olduğu görülmüştür. Farklı günlerde yapılan test sonuçları değerlendirildiğinde, 1., 7. ve 14. gün testlerin 8 (%16)'inin, 1. ay 9 (%18)'unun, 3. ay 7 (%14)'sinin, 6. ve 12. ay 6 (%12)'sının pozitif olduğu saptanmıştır (Şekil 1).

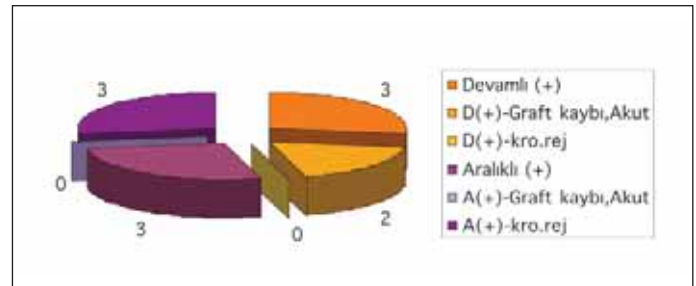
Nakil sonrası 1. gün ASCM pozitif olan testlerin 4 (%50)'ü T,B (+), 1(%12,5)'i T (+), 3(%37,5)'ü B (+)'dir. Nakil sonrası 7. gün ASCM pozitif olan testlerin 4 (%50)'ü T,B (+), 4 (%50)'ü B (+)'dir. 14. gün ASCM pozitif olan testlerin 6 (%75)'sı T,B (+) iken, 2 (%25)'si B (+)'dir. 1. ay ASCM pozitif olan testlerin 4 (%44,4)'ü T,B (+), 1 (%11,1)'i T, 4 (%44,4)'ü B (+)'dir. 3. ay ASCM pozitif olan testlerin 4 (%57,1)'ü T,B (+), 1(%14,2)'i



Şekil 2. Nakil sonrası farklı günlerde yapılan ASCM (+) sonuçların hedef hücrelerine göre değerlendirilmesi

T (+), 2(%28,5)'si B (+)'dir. 6. ay ASCM pozitif olan testlerin 4 (%66,6)'ü T,B (+) iken, 2 (%33,3)'ü B (+)'dir. 12. ay ise, ASCM pozitif olan testlerin 5 (%83,3)'i T,B (+) iken, 1 (%16,6)'sı T (+)'dir (Şekil 2).

Hastalardan 5 'inin çalışma süresince ASCM sonuçları (+) iken 6 hastanın aralıklı test günlerine sonuçlarının (+) olduğu saptanmıştır. Tüm çalışma süresince ASCM sonuçları (+) olan 5 hastadan 2'si akut rejeksiyon sonucu böbreklerini kaybetmişlerdir. Farklı test günlerinde (+) olan 6 hastanın 3'ü kronik rejeksiyon nedeniyle takip edilmektedir. Şekil 3'de devamlı ve aralıklı ASCM (+) hastalarda akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon gelişme oranı ve graft sağkalımı oranı görülmektedir.



Şekil 3: Devamlı ve aralıklı ASCM (+) sonuçlar ile akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon ve graft kaybı arasındaki ilişki

D (+): Devamlı pozitif

A (+): Aralıklı pozitif

Nakil sonrası tüm test günlerinde T,B pozitifliğinin akut rejeksiyon ve graft sağkalımı ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlı, kronik rejeksiyon ile anlamsız bulunmuştur (Tablo I).

Nakil sonrası 1. gün,1., 3. ve 12. aylardaki T ASCM (+) sonuçların akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon ve graft sağkalımı ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur. Nakil sonrası 7., 14. gün, ve 6. ayda T ASCM (+) sonuç olmadığından istatistiksel olarak değerlendirilememiştir (Tablo II).

Nakil sonrası ilk bir ay içindeki tüm test günlerindeki B pozitifliğinin kronik rejeksiyon ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlı iken, akut rejeksiyon ve graft sağkalımı ile anlamsız bulunmuştur. Üçüncü ve 6. aylarda elde edilen B ASCM (+) sonuçları ile de akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon ve graft sağkalımı arasında istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar saptanmamıştır. On ikinci ayda ise, B ASCM (+) sonuç olmadığından istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır (Tablo III).

Nakil sonrası 2. ve 3. günde akut rejeksiyon saptanan iki hasta graftını kaybetmiştir, bu iki hasta dışında graft kaybı olmamıştır. Her iki hastada graftını ilk hafta içinde kaybettiğinden Kaplan-Meier graft sağkalımı analizine göre, 6 aylık ve 1 yıllık graft sağkalımı oranları %96 olarak belirlenmiştir.

Tablo I: T,B ASCM (+) ve (-) sonuçların akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon ve graft sağkalımı ile ilişkisi.

T,B ASCM	Akut rejeksiyon		Kronik rejeksiyon		Graft sağkalımı	
	AR (-)	AR (+)	KR (-)	KR (+)	GS (-)	GS (+)
1. gün (-)	46	0	43	3	46	0
1. gün (+)	2	2	4	0	2	2
	p= 0,005		p> 0,05		p= 0,005	
7. gün (-)	46	0	43	3	46	0
7. gün (+)	2	2	4	0	2	2
	p= 0,005		p> 0,05		p= 0,005	
14. gün (-)	44	0	42	2	44	0
14. gün (+)	4	2	5	1	4	2
	p=0,012		p> 0,05		p=0,012	
1.ay (-)	46	0	43	3	46	0
1.ay (+)	2	2	4	0	2	2
	p= 0,005		p> 0,05		p= 0,005	
3.ay (-)	46	0	43	3	46	0
3.ay (+)	2	2	4	0	2	2
	p= 0,005		p> 0,05		p= 0,005	
6.ay (-)	46	0	43	3	46	0
6.ay (+)	2	2	4	0	2	2
	p= 0,005		p> 0,05		p= 0,005	
12.ay (-)	45	0	42	3	45	0
12.ay (+)	3	2	5	0	3	2
	p= 0,008		p> 0,05		p= 0,008	

Fisher'in exact testi

ASCM (+) olan hastaların devamlı ve aralıklı test pozitifliği ile graft sağkalımı ve rejeksiyon arasındaki ilişki Fisher'in Exact testine göre değerlendirildiğinde sonuçlar istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur (p=0,181 ve p=1,000).

ASCM (-) ve (+) sonuçların kreatininin düzeyleri ile bağlantısı Mann-Whitney U testi ve eşleşmemiş t testi ile değerlendirilmiştir. Nakil sonrası 7. gün kreatinin değerleri ve ASCM sonuçları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir bağlantı olduğu saptanmıştır (Tablo IV).

Hastaların nakil sonrası hastahane kalma süresi ile ASCM (+) arasındaki bağlantı, Fisher'in exact testine göre değerlendirildiğinde sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,009).

TARTIŞMA

Nakil öncesi yapılan cross match (CM) testleri sadece hastanın immünolojik yönden duyarlılığı konusunda fikir vermektedir. Nakli takiben rejeksiyonu yaşayabilecek hastaları tanımlayamayabilir (11). Günümüzde birçok araştırmacı böbrek nakli sonrasında oluşan vericiye özgü hassasiyetin, allograft

rejeksiyonunda, hatta graft sağkalımında önemli yan etkileri olacağı görüşünü savunmaktadır (8). Bu sebeple akım sitometrisi (AS) ile yapılan çeşitli çalışmalar, nakil sonrası antikorların belirlenmesinde kullanılabilmektedir. AS ile değerlendirmeler ya panel reaktif antikor (PRA) araştırmaları ya da CM çalışmaları ile yapılabilmektedir (12,13,14,15). AS yöntemlerine dayanan çalışmalar, duyarlılığın yanında başka avantajlara da sahiptir. Bunlar;

- Aktivasyonu komplemana bağlı olan antikorların dışında, aktivasyonu komplemana bağlı olmayan antikorların da tesbit edilmesi,
- Ölü hücre oranları arttığında değerlendirmenin daha kolay yapılabilmesi,
- Objektif sonuç verme özelliğine sahip olmasıdır (1,8).

ASCM'nin son derece duyarlı bir test olması nedeniyle, viral enfeksiyonlar gibi çeşitli immünolojik olaylar sırasında oluşabilen non HLA antikorları tesbit edilip, hatalı pozitif sonuçlar saptanabilir. Ayrıca test aşamasındaki işlemler esnasında nadiren antijen-antikor bağlarının kopabileceği ve bununda hatalı negatif

Tablo II: T ASCM (+) ve (-) sonuçların akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon ve graft sağkalımı ile ilişkisi.

T ASCM	Akut rejeksiyon		Kronik rejeksiyon		Graft sağkalımı	
	AR (-)	AR (+)	KR (-)	KR (+)	GS (-)	GS (+)
1. gün (-)	47	2	46	3	47	2
1. gün (+)	1	0	1	0	1	0
	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
7. gün (-)	48	2	47	3	48	2
7. gün (+)	0	0	0	0	0	0
	*		*		*	
14. gün (-)	48	2	47	3	48	2
14. gün (+)	0	0	0	0	0	0
	*		*		*	
1. ay (-)	47	2	46	3	47	2
1. ay (+)	1	0	1	0	1	0
	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
3. ay (-)	47	2	46	3	47	2
3. ay (+)	1	0	1	0	1	0
	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
6. ay (-)	48	2	47	3	48	2
6. ay (+)	0	0	0	0	0	0
	*		*		*	
12. ay (-)	47	2	46	3	47	2
12. ay (+)	1	0	1	0	1	0
	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	

Fisher'in exact testi

* :ASCM (+) sonuç olmadığından istatistiksel hesaplama yapılamamıştır.

sonuçlara sebep olabileceği belirtilmektedir (16,17,18). Genel olarak, hem nakil öncesi hem de nakil sonrası dönemde ASCM'in DSA'ları daha iyi yansıttığı bilinmektedir (18,19,20.). Ancak, böbrek fonksiyonları normal olan hastalarda da nakli sonrasında HLA antikorlarının oluşabileceği ve bu antikorların rejeksiyon açısından risk oluşturmadığı görülmektedir. Risk oluşturmayan bu antikorların düşük yoğunlukta olduğu ve sitoplazmik sinyal molekülü olan mTOR-2 yolunu uyararak hücre sağ kalımını etkilediği belirtilmektedir. mTOR2 sitoplazmadaki Akt ve Bad proteinlerini fosforile ederek apoptotik protein Bcl-2'nin aktivasyonunu sağlayarak hücre canlılığına destek verdiği düşünülmektedir (21).

Bu çalışmaya akraba canlı vericiden nakil olan 50 kronik böbrek yetmezliği hastası alınmıştır. HLA uyumu en az 1A 1B 1DR olan canlı akraba vericide böbrek nakli yapılan 50 hastanın 1. gün-12. ay arasında 7 farklı tarihe ait olan serumlarında ASCM ile DSA'lar araştırılmıştır. ASCM sonuçlarına bakıldığında, 50 hastadan toplam 11 (%22)'inin nakil sonrası ASCM sonuçlarının (+)'dir. Nakil sonrası farklı günlerde yapılan test sonuçları

değerlendirildiğinde, 1., 7. ve 14. gün testlerin 8 (%16)'inin, 1. ay 9 (%18)'unun, 3. ay 7 (%14)'sinin, 6. ve 12. ay 6 (%12)'sının pozitif olduğu saptanmıştır

Nakil sonrası tüm test günlerinde T,B pozitifliğinin akut rejeksiyon ve graft sağkalımı ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlı, kronik rejeksiyon ile anlamsız bulunmuştur. Nakil sonrası ilk 1 ay içindeki tüm test günlerindeki B pozitifliğinin kronik rejeksiyon ile ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlı iken, akut rejeksiyon ve graft sağkalımı ile anlamsız bulunmuştur.

Yedi farklı tarihteki ASCM (-) ve (+) sonuçların kreatinin düzeyleri ile bağlantısı araştırıldığında, nakil sonrası 7. gün kreatininin değerleri ve ASCM sonuçları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir bağlantı olduğu tesbit edilmiştir.

Piazza ve grubunun yaptığı bir çalışmada, kadavradan nakil olmuş hastalara nakil sonrası 3 ay (7., 14., 30., 60., 90. günlerde) içinde veya akut rejeksiyondan şüphelenildiği zaman ASCM uygulamışlardır. Tüm hastaların nakil öncesi komplemana bağlı sitotoksosite çaprazlaması (complement-dependent

Tablo III: B ASCM (+) ve (-) sonuçların akut rejeksiyon, kronik rejeksiyon ve graft sağkalımı ile ilişkisi.

B ASCM	Akut rejeksiyon		Kronik rejeksiyon		Graft sağkalımı	
	AR (-)	AR (+)	KR (-)	KR (+)	GS (-)	GS (+)
1. gün (-)	45	2	46	1	45	2
1. gün (+)	3	0	1	2	3	0
	p> 0,05		p= 0,007		p> 0,05	
7. gün (-)	44	2	46	0	44	2
7. gün (+)	4	0	1	3	4	0
	p> 0,05		p= 0,000		p> 0,05	
14. gün (-)	46	2	47	1	46	2
14. gün (+)	2	0	0	2	2	0
	p> 0,05		p= 0,002		p> 0,05	
1.ay (-)	44	2	46	0	44	2
1.ay (+)	4	0	1	3	4	0
	p> 0,05		p=0,000		p> 0,05	
3.ay (-)	46	2	46	2	46	2
3.ay (+)	2	0	1	1	2	0
	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
6.ay (-)	46	2	46	2	46	2
6.ay (+)	2	0	1	1	2	0
	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
12.ay (-)	48	2	47	3	48	2
12.ay (+)	0	0	0	0	0	0
	*		*		*	

Fisher's exact test

* :ASCM (+) sonuç olmadığından istatistiksel hesaplama yapılamamıştır.

cytotoxicity crossmatch-CDCCM) ve ASCM sonuçları negatif olarak bildirilmiştir. İlk üç ay boyunca, hastaların %26'sının nakil sonrası IgG ASCM sonucu en az bir kez (+), %74'ünün (-) olarak bulunmuştur. ASCM (+) hastaların %73'ü hem T, hem de B ASCM (+), %27'si de sadece B ASCM (+) olarak tesbit edilmiştir. ASCM (+) gruptaki hastalardan %81,8, ASCM (-) grupta ise %9,7 hasta akut rejeksiyon tanısını almıştır. Yine ASCM (+) grupta kreatininin değerlerinin (-) gruba göre daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir (3,4 ± 2,2, 1,9 ± 0,67) (11). Çalışmamızda ise, bir yıl boyunca, hastaların %22'sinin nakil sonrası IgG ASCM sonucu en az bir kez (+), %78'inin (-) olarak bulunmuştur. ASCM (+) sonuçların, %36,3'ü hem T, hem de B ASCM (+), %36,3'si de sadece B ASCM (+), %9,1 ise sadece T ASCM (+) olarak saptanmıştır. ASCM (+) gruptaki hastalardan %9,1, ASCM (-) grupta ise %7,6 hasta akut rejeksiyon atağı tanısını almıştır. Piazza ve ark.larının yapmış olduğu çalışmada ve bizim çalışmamızda nakil sonrasında IgG ASCM (+) sonuçlar benzer şekilde bulunmuştur. Ancak ASCM (+) olan sonuçlarda hedef hücrelerin oranı farklıdır. Bu fark, çalışmamıza dahil edilen hastalara canlı vericiden nakil yapılmışken, Piazza ve ark.larının çalışmasında kadavradan böbrek nakli yapılmış hastaları

kapsamasından kaynaklanabilir. Yine Piazza ve ark.larının çalışmasında ASCM (+)'liği ile akut rejeksiyon arasında güçlü bir bağlantı görülmektedir. Bu çalışmada, akut rejeksiyondan şüphelenildiği durumlarda ASCM uygulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise, hastaların klinik durumları bilinmeksizin nakil sonrasındaki belirli günlerde ASCM uygulanmıştır. İki çalışma arasındaki dramatik akut rejeksiyon sıklıkları arasındaki farklılık, hem de diğer çalışmanın hastalarının tamamının kadavra verici nakli yapılmasından kaynaklanabilir. Piazza ve ark.larının çalışması ile uyumlu olarak çalışmamızda ASCM (+) olan hastaların kreatininin düzeylerinin ortalaması ASCM (-) olan hastalardan daha yüksek olarak bulunmuştur (11).

Utzig ve ark.larının yapmış olduğu bir çalışmada kadavradan böbrek nakli olmuş hastalara nakil sonrası ASCM uygulamışlardır. DSA'ların bir kısmı araştırma süresince mevcut iken, diğer DSA'lar farklı zamanlarda belirlenmiştir. ASCM pozitifliğinin tipi ile graft sonucu arasında ilişki saptanamamıştır (22).

Çalışmamızda, Utzig ve ark.larının çalışması ile uyumlu olarak, ASCM (+) olan hastaların %45,4'ünde araştırma süresince DSA'lar mevcutken, %54,6'sında farklı zamanlarda

Tablo IV: ASCM sonuçları ve kreatinin düzeyleri arasındaki ilişki.

	Ortalama ± SS			minimum	maksimum	p
1. gün ASCM (-)	2,25	±	0,78	1,2	4,7	0,237
1. gün ASCM (+)	3,05	±	1,89	1,8	7,6	
7. gün ASCM (-)	1,44	±	0,50	1,0	4,0	0,008
7. gün ASCM (+)	2,4	±	1,63	1,2	6,2	
14. gün ASCM (-)	1,33	±	0,25	0,8	1,9	0,256
14. gün ASCM (+)	2,29	±	1,94	0,9	6,5	
1.ay ASCM (-)	1,29	±	0,34	0,8	2,7	0,427
1.ay ASCM (+)	1,56	±	0,95	0,7	4,1	
3.ay ASCM (-)	1,29	±	0,35	0,7	2,3	0,812
3.ay ASCM (+)	1,31	±	0,31	0,9	1,8	
6.ay ASCM (-)	1,29	±	0,31	0,7	1,8	0,588
6.ay ASCM (+)	1,4	±	0,42	0,9	2,2	
12.ay ASCM (-)	1,27	±	0,29	0,7	1,8	0,386
12.ay ASCM (+)	1,41	±	0,43	0,8	2,3	

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. Proje no: T-206/06032003

belirlenmiştir. ASCM (+) olan hastaların sürekli ve farklı test günlerindeki pozitifliği ile graft sağkalımı ve rejeksiyon arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur.

Utzig ve ark.ları araştırma süresince sürekli tesbit edilemeyen antikorların, anti-idiotipik antikorların görünmesi veya üretilen DSA'ların grifte bağlanabileceği ya da graft hücreleri tarafından salınan HLA antijenleri ile şekillenerek immün kompleksler içinde maskelenebileceği öne sürülebilir (22).

SONUÇ

Çalışmamızda, nakil sonrasında T ve B ASCM testi yaptığımız tüm günlerde (1., 7., 14. günler ve 1., 3., 6. ve 12. aylar) test sonuçlarının graft sağkalımı hakkında bilgi verebileceğini görülmektedir. İlk 1 ay içindeki B ASCM sonuçlarının ise böbrek naklinden sonra ortaya çıkabilecek kronik rejeksiyon tanısına destek olabileceği ve kliniği aydınlatabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca DSA'ların tüm çalışma süresince tesbit edilmesi veya farklı günlerde mevcut olması ile graft kaybı ve rejeksiyon arasında bir ilişki saptanmamıştır. ASCM (+) ve ASCM (-) olan hastaların test günlerindeki kreatininin düzeylerinin ortalaması değerlendirildiğinde nakil sonrası 7. günde istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir (p= 0,016). ASCM sonuçları hastaların hastahane kalma süreleri açısından değerlendirildiğinde sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p= 0,009).

Sonuç olarak; böbrek nakli sonrası özellikle akut rejeksiyonun sık görülebileceği zaman dilimlerinde, belirli aralıklarla yapılacak ASCM testi, akut rejeksiyon gelişimi ve graft sağkalımı için prediktif değer taşıyabilecek ve klinisyene yardımcı olacak önemli bir tetkik olarak yorumlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Bray RA: Flow cytometry cross matching for solid organ transplantation, Methods in Cell Biology 1994; 41:103-119
2. De Carvalho Bittencourt M, Saint-Hillier Y, Chabod J, Dupont I, Chalopin JM, Hervé P, Tiberghien P: B-cell flow-cytometry crossmatch: Influence in renal transplantation. Transplant Proc 1997; 29 (1-2):1456-1457
3. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Valeri M, Buonomo O, Servetti S, Adorno D, Casciani CU: Relevance of posttransplant HLA class I and class II antibodies on renal graft outcome. Transplant Proc 2001; 33(1-2):478-480
4. Piazza A, Borrelli L, Buonomo O, Pisani F, Valeri M, Torlone N, Felici A, Monaco PI, Adorno D, Casciani CU: Flow cytometry crossmatch and kidney graft outcome. Transplant Proc 1999; 31(1-2):314-316
5. Leffell MS, Fallin MD, Hildebrand WH, Cavett JW, Iglehart BA, Zachary AA: HLA alleles and haplotypes among the Lakota Sioux: Report of the ASHI minority workshops, part III. Hum Immunol 2004; 65(1):78-89. of Antibodies By HLA Class Specificity. Human Immunology 2004; 65:Suppl (1); 2-4
6. Michalska K, Korczak-Kowalska G, Podobińska I, Durlak M, Wyzga J, Lewandowska D, Wierzbicki P, Kłosowska D, Chmura A, Rowiński W, Nowaczyk M, Górski A: Flow cytometry crossmatch in living donor renal transplantation. Transplant Proc 2002; 34(2): 689-690
7. Akalin E, Ames S, Sehgal V, Fotino M, Daly L, Murphy B, Bromberg JS: Intravenous immunoglobulin and thymoglobulin facilitate kidney transplantation in complement dependent cytotoxicity B cell and flow cytometry cross-match-positive patients. Transplantation 2003; 76 (10):1444-1447

8. Katayama A, Kobayashi T, Uchida K, Goto N, Matsuoka S, Sato T, Haba T, Tominaga Y, Kohara S, Kamura H, Liu D, Yokoyama I, Oikawa T, Takeda A, Morozumi K, Takagi H, Nakao A: Beneficial effect of antibody removal and enhanced immunosuppression in flow cytometry cross match-positive and ABO-incompatible renal transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34(7):2771-2772
9. Scornik JC: Detection of alloantibodies by flow cytometry: relevance to clinical transplantation cytometry. *Communications in Clinical Cytometry* 1995; 22:259-263
10. Hayry P, Alatalo S, Myllarniemi M, Raisanen-Sokolowski A, Lemström K: Myllarniemi. Cellular and molecular biology of chronic rejection. *Transplant Proc* 1995 (27); 1: 71-74
11. Piazza A, Adorno D, Poggi E, Borrelli L, Buonomo O, Pisani F, Valeri M, Torlone N, Camplone C, Monaco PI, Fraboni D, Casciani CU: Flow cytometry crossmatch: A sensitive technique for assessment of acute rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30(5):1769-1771
12. Fernández-Fresnedo G, Pastor JM, López-Hoyos M, Ruiz JC, Zubimendi JA, Gonzalez-Cotruello 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; 18(5):990-995
13. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, Pham P, Danovitch GM, et al, Ablin GH, Reed EF: Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation* 2005; 79 (5):591-598
14. 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):85-89
15. 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; 11 (2):175-178
16. Bray RA, Lebeck LL, Gebel HM: The flowcytometric crossmatch. Dual-color analysis of T cell and B cell reactivities. 1989; 48:834-840
17. Bray RA: Crossmatching by flowcytometry. *Clinic immunology newsletter* 1990; 10:63-68
18. Tambur AR, Klein T: Flow cytometry application in organ transplantation. *Isr Med Assoc J* 2000; 2(4):310-315
19. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: *Transplantation immunology, Cellular and molecular immunology*. 4th ed USA: 2000, 363-383
20. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, Valeri M, Torlone N, Adorno D, Casciani CU: Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 2001; 27;71(8):1106-1112
21. Zhang X, Reed EF: Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009; 9(11):2459-2465
22. 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):551-554