TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

DONÖR SPESİFİK ANTİKOR POZİTİF VE NEGATİF RENAL TRANSPLANT ALICILARINDA NEUTROPHIL GELATINASE ASSOCIATED LIPOCALIN'İN REJEKSİYON AÇISINDAN DİAGNOSTİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr.ERNST MAMATOV

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. ACAR TÜZÜNER

ANKARA
2012

ONAY SAYFASI

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

"DSA POZİTİF VE NEGATİF RENAL TRANPLANT ALICILARINDA NEUTROPHİL GELATİNAZE ASSOCİATED LİPOKALİNİN REJEKSİYON TRANPLANT AÇISINDAN PREDİKTİF ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI"

başlıklı,

Dr. Ernst MAMATOV'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.01.2013

Prof. Dr. Semih BASKAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Tuğbay TUĞ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Üye

Doç. Dr. Acar TÜZÜNER
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Üye / Tez Danışmanı

TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı'ndaki eğitimim süresince emeği geçen Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı başkanı Prof. Dr. Semih Baskan hocama ve diğer tüm Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı öğretim üyelerine, tez çalışmamın her türlü aşamasında desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr.Acar Tüzüner'e, İmmünoloji Laboratuvarı sorumlusu Prof. Dr. Hüseyin Tutkak'a, Nefroloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Kenan Keven'e , İmmünoloji Laboratuvarı çalışanlarından Semahat Akbay ve diğer çalışanlarına, ihtisasım boyunca beraber çalıştığım tüm mesai arkadaşlarıma, çalışmaya katılmaya kabul eden değerli hastalarımıza teşekkürü borç bilirim. Ayrıca hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan aileme, ihtisas süresince desteğini esirgemeyen sevgili anneme ve babama teşekkür ederim.

Dr.ERNST MAMATOV

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
TABLO LİSTESİ vi
KISALTMALAR LİSTESİ vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 Renal Transplantasyon Tarihçesi: 3
2.1.1 Donör Spesifik Antikorlar (DSA) 4
2.1.2. Neutrophil Gelatinase – Associated Lipocalin (NGAL) 4
2.1.3. Transplantasyon İmmünbiyolojisi 5
2.1.4. Naturel ve Adaptif İmmünite 6
2.1.5. T Hücre Aktivasyonu 6
2.1.6. MHC Klas I ve Klas II Moleküllerinin Yapısı ve Doku/Hücre Dağılımı 7
2.1.7. MHC / HLA Moleküllerinin İmmünolojik Yanıtta Rolü 8
2.1.8. Alloantijenin Tanınması 9
2.1.9. Direkt Yol 9
2.2. İndirekt Yol 10
2.3. DSA antikorların oluşma mekanizması 10
2.4. Rejeksiyon 11
2.4.1. Antikor Aracılı Rejeksiyonlar 13
2.4.2. Gecikmiş Greft Fonksiyonu (GGF) 13
2.4.3. Kronik allogreft nefropatisi (KAN) 14
2.5. İmmünsüpresyon 16
2.6. Human Lökosit Antijen Uyumu 17
2.7. Lenfosit Crossmatch Testi (LCM) 18
2.8. Panel Reaktif Antikor (PRA) 19
2.9. Elisa yöntemi 20
3. MATERYAL – METOD 22
3.1.1.Tahmini GFR hesaplanması 23

3.1.2. DSA çalışılması 23
3.1.3.İstatistiksel yöntemler 23
3.1.4.Etik Kurul Onayı 24
4. BULGULAR 25
4.1. Hasta Özellikleri: 25
4.2. Çalışmaya katılan hastaların genel özellikleri 25
5. TARTIŞMA 34
6. ÖZET 39
7. SUMMARY 41
8. KAYNAKLAR 42

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. DSA'nın oluşma mekanizması 10
Tablo 2.2. Banff 97 Sınıflaması 12
Tablo 2.3. Kronik Allogreft Nefropati Gelişimi / Progresyonunda Etkili Faktörler . 16
Tablo 4.1. DSA pozitif ve negatif grupların karşılaştırılması 26
Tablo 4.2. DSA grubunda NGAL'in oranları 26
Tablo 4.3. DSA gruplarında NGAL'in ortalama değerleri 24
Tablo 4.4. DSA pozitif ve negatif hastalarda rejeksiyon oranları 24
Tablo 4.5. NGAL >50 ve <50 olan hastalarda rejeksiyonun karşılaştırılması 28
Tablo 4.6. NGAL gruplarında kadavradan renal alıcılarında rejeksiyonun karşılaştırılması 28
Tablo 4.7. DSA pozitif ve negatif hastalarda gecikmiş greft fonksiyonu 29
Tablo 4.8. NGAL'in gecikmiş greft fonksiyonu ile ilişkisi 29
Tablo 4.9. DSA pozitif ve negatif hastalarda eş zamanlı kreatinin değerleri 30
Tablo 4.10. DSA pozitif ve negatif hastalarda eş zamanlı MDRD-GFR 30
Tablo 4.11. DSA pozitif ve negatif hastalarda zamanla MDRD-GFR'nin progresif karşılaştırılması 31
Tablo 4.12. NGAL gruplarında eş zamanlı kreatinin karşılaştırılması 31
Tablo 4.13. NGAL >50 ve <50 olan hastalarda kreatininin zamanla progressyonu . 37
Tablo 4.14. NGAL gruplarında eş zamanlı MDRD-GFR karşılaştırılması 37
Tablo 4.15. Rejeksiyon grubunda eş zamanlı kreatinin ve MDRD-GFR değerleri .. 33
Tablo 4.16. NGAL'in böbrek fonksiyonların göstermede sensivitesi 33

KISALTMALAR LİSTESİ

HLA : Human leukocyte antigen
MHC : Major histocompatibility complex
NGAL : Neurophil geltinase associated lipocalin
TCR : T cell receptor
IL : Interlökin
PRA : Panel reaktif antikor
ELISA : Enzyme linked immunosorbant assay
DGF : Delete greft function
GGF : Gecikmiş greft fonksiyonu
PCR : Polymerase chain reaction
MDRD : Modification of diet in renal disesase
CMV : Cytomegalovirus
DNA : Deoxyribonucleicacid
HD : Hemodializ
CAPD : Continuous ambulatory peritoneal dialysis
FMF : Familial Mediterranean Fever
DM : Diabetes mellitus
HT : Hipertansyon
FSGS : Focal segmential glomerulosclerosis
İg : Immunglobulin
SLE : Systemic lupus erythematosus
MMF : Mycophenolate mophetil
MPA : Mycophenolate sodium
AZA : Azathioprine
CsA : Cyclosporine
MM : Mismatch
GFR : Glomerular filtration rate
DSA : Donor spesifik antikor
KAN : Kronik allogreft nerfropatisi
KNİ : Kalsinörin inhibitörleri
AMR : Antibody mediated rejection

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Böbrek nakli, son dönem böbrek yetmezliğinin tedavisinde diyaliz yöntemlerine göre hastaya daha iyi yaşam kalitesi ve daha fazla yaşam süresi sağlaması nedeniyle en seçkin tedavi seçeneğidir. Böbrek transplantasyonundaki cerrahi teknik, 50 yıl önce yapılan ilk başarılı böbrek naklinden beri değişmeden uygulanmaktadır. Ancak bu başarılı tekniğe karşın tüm organ transplantasyonlarında olduğu gibi böbrek naklinde de immünolojik sorunlar tamamen çözülememiştir (1). Böbrek nakli sonrasında akut rejeksiyon, kullanılan immünsüpresif ilaçlara bağlı olarak ortaya çıkabilen enfeksiyonlar, kardiyovasküler komplikasyonlar, ilaç yan etkileri önemli sorunlar olarak dikkati çekerken, geç dönemde en sık karşılaşılan sorun greft kaybı ile sonuçlanan kronik rejeksiyon veya diğer adıyla kronik allogreft nefropatidir (KAN) (2). Kalsinörin inhibitörü (KNİ) ilaçların kullanımı immünolojik olmayan sebeplerin başında yer alırken, nakil öncesi ve sonrasında ortaya çıkan immün duyarlaşma ve bunun neden olduğu akut ve subklinik rejeksiyonlar KAN gelişiminde en önemli immünolojik mekanizmalardır. Bilindiği gibi immünolojik sensitizasyon için öne sürülen en önemli risk faktörleri HLA antijenlerinde uyumsuzluk ve bu antijenlere karşı gelişen antikorlardır. Sensitizasyon nakil öncesi olabileceği gibi nakil sonrasında da ortaya çıkabilmektedir. Nakil öncesi immünolojik duyarlaşma daha önce transplantasyon yapılan hastalarda, gebelik, kan transfüzyonları gibi nedenlerden dolayı gelişebilirken, nakil sonrasında ise daha çok geçirilen akut rejeksiyonlar, yetersiz immünsupresyon ve doku antijenlerinde gözlenen uyumsuzluklar temel faktörlerdir. Transplantasyon sonrası allogreft böbrekte hiçbir immünolojik sorun olmayacağına inanılacak hiçbir dönem yoktur.

Renal greft biyopsisi, böbrek greftlerin izleminde kullanılan bir yöntemdir. Rejeksiyon tanısında altın standarttır. Ancak yöntemin içerdiği invaziv karakteri nedeni ile bu yönteme soğuk bakılabilmektedir. Bazen de ciddi komplikasyonları sebebiyle birçok merkez rutin protokol biyopsi uygulamalarından uzaklaşmaktadır. Serum kreatinin düzeyi maalesef renal transplant izleminde hasarın erken saptanmasında duyarlı bir yöntem değildir. Kronik hasar bulguları ciddi düzeye ulaştığında serum kreatinin düzeyi artmakta ve bu nedenle klinik takipte süregelen hasara yönelik yeterli bilgi vermemektedir (3,4,5,6). Dolasıyla klinik takipte

kullanılabilecek ve hastanın immünolojik durumu ile korelasyon gösteren parametrelere ihtiyaç duyulmaktadır. NGAL (neutrophil gelatinase–associated lipocalin) son zamanlarda araştırılmaya başlanan biyomarkerlardan biridir. Akut böbrek hasarı, akut böbrek yetmezliği, gecikmiş greft fonksiyonu, IgA nefropatisi gibi durumlarda diagnostik değeri yaygın olarak araştırılmıştır. Ancak kronik süreçte takip amaçlı kullanılabileceği yönünde çok veri yoktur (7).

Biz bu çalışmamızda, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Transplantasyon Ünitesinde 2006 ile 2010 yılları arasında böbrek nakli ameliyatı geçiren hastalarda ameliyat sonu dönemde donör spesifik antikor (DSA) ile ilişkili olarak NGAL'in rejeksiyon açısından prediktif önemini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Renal Transplantasyon Tarihçesi:

Renal transplantasyon, ilk kez 1954 yılında Dr.Joseph Murray ve ekibi tarafından tek yumurta ikizleri arasında gerçekleştirilmiştir. O dönemde, tek yumurta ikizleri dışında yapılan nakillerde immun sistemin baskılanması amacıyla tüm vücut ışınlaması ve steroidler kullanılmıştı. Schwartz ve Damesheck'in 6-merkaptopürin, Medawar'ın prednizolon üzerine yaptıkları çalışmalar, bu ajanların immun sistemi baskıladığını ve greft sağkalımı üzerine olumlu etkilerini kanıtlamıştır. Takip eden yıllarda, 6-merkaptopürin'in yerini daha az toksik bir ajan olan azatiyopirinin almasıyla, 1962 yılından sonra, azatiyopirin ve prednizolon standart ikili immünsüpresif tedavi olarak kullanılmaya başlandı. Bu tarihten sonra da, özellikle rejeksiyona uğrayan greft böbrek histopatolojisi üzerine çalışmalar sürdürüldü. 1966'da hiperakut rejeksiyonun önüne geçilmesi amacıyla Kissmeyer ve Nielsen tarafından direkt cross-match yönteminin uygulanmasına başlandı ve kadavradan renal transplantasyonu tekrar gündeme taşıdı. Ting ve Morris Klas-I antijenler ve HLA-DR grubunun önemini ortaya çıkaran çalışmalar yaptılar. Calne ve arkadaşları, 1978'den itibaren anti-timosit globulini kullanmaya başladılar. Siklosporin-A 1983 yılında immunsupresif tedaviye dahil oldu. Steroid, azatiyopirin ve siklosporin-A kombinasyonu ile, beş yıllık greft sağkalım oranları % 80'in üzerine çıktı. Bu büyük başarı oranı, renal transplantasyonu da daha yaygın ve tercih edilen bir tedavi haline getirdi. Sonraki yıllarda, FK-506 (Tacrolimus), Mikofenolik asid 4 (Mycophenolate Mophetyl), ve Rapamisin (Sirolimus) immunsupresif tedavi ajanları olarak tedavide yer almaya başladı ve beş yıllık greft sağkalımı oranları % 90'ı aştı. Türkiye'de ise, canlıdan ilk başarılı allogreft böbrek nakli 1975'te, ilk kadavradan böbrek nakli ise 1978'de Dr. Mehmet Haberal tarafından gerçekleştirildi. Üzerinden geçen yarım asrı aşkın süre içerisinde, böbrek nakli, son dönem kronik böbrek yetmezliği gelişmiş hastaların tedavisinde, hemodiyaliz ve periton diyaliziyle birlikte, başlıca tedavi seçeneği olarak yerini almıştır. Ülkemizde halen birçok merkezde böbrek nakli operasyonu yapılmaktadır (8).

2.1.1 Donör Spesifik Antikorlar (DSA)

Donör spesifik antikorlar (DSA) alıcıda donör antijenlerine karşı spesifik antikorları tanımlamaktadır. Böbrek nakli yapılan hastalarda greft fonksiyonu normal dahi olsa de-novo anti-HLA antikorların gelişebildiği ve bunun uzun dönem izlemde greft disfonksiyonunu öngörebildiği gösterilmiştir (3,4). Yapılan 2 çalışmada donör spesifik antikorların gelişimi ile uzun dönem greft fonksiyonunun olumsuz etkilendiği ortaya konmuştur. Bazı literatürlerde de, HLA sınıf I DSA'lar erken greft yetmezliği ile ilişkili iken HLA sınıf II DSA'ların ise uzun dönem greft yetmezliği ile ilişkili olduğu açıklanmıştır.

Daha önceki yapılan çalışmalarda DSA pozitif hastalarda DSA negatif hastalara göre rejeksiyon riskinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Kılıçarslan ve ark. yaptığı çalışmada böbrek nakli sonrası 1.ayda %18, 6.ayda %14 oranında DSA pozitifliği görülmüştür. Genellikle alloimmünizasyonlu bireylerin mevcut HLA'ların %33'üne karşı oluşmuş antikorlar ile oluşur (9). Terasaki ve arkadaşlarının yürüttükleri prospektif çok merkezli bir araştırmada renal transplant hastalarının yaklaşık %20'si DSA pozitif saptanmıştır ve 1 yıllık greft sağkalımını azalttığını göstermişlerdir. Bazen greftin antikorları absorbe etmesine bağlı olarak DSA saptanmayabilir ve dolayısıyla yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir (10).

2.1.2. Neutrophil Gelatinase – Associated Lipocalin (NGAL)

Maalesef kreatinin böbrek fonksiyonlarını göstermede her zaman güvenilir bir parametre değildir. Birincisi, doğru böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için serum kreatinini kullanmak iyi bilinen bir yanlışlık ve kısıtlamadır. GFR'deki düşme kreatinin seviyesinde yükselme olmadan meydana gelmiş oluyor, yani kreatinin değerindeki değişiklikler yansımadan böbrek fonksiyonlarında zaten %40-50 civarında kayıp olmaktadır (3,4,5,6). Böbrek hastalıklarının monitörizasyonunda kullanılabilecek belirteç sayısı sınırlıdır. Onlardan biri yakın zamanda nötrofillerden izole edilen ve biyomarker olarak kabul edilen NGAL'dir (neutrophil gelatinase–associated lipocalin). NGAL diğer isimleri ile siderokalin ve/veya lipokalin-2 ve/veya onkogen 24p3; renal epitelyal hücreleri, nötrofiller ve böbrek proksimal

tübülleri tarafından salgılanan proteindir. NGAL'in demir taşıyan proteinlere bağlanma özelliğinden dolayı siderokalin ismini de almıştır. Protein gruplarından Lipokalin ailesine ait olup, yapısında 178 amino asit vardır ve ortalama ağırlığı 28 dalton kadardır. Akut böbrek yetmezliği, nefrotoksisite, gecikmiş greft fonksiyonu gibi durumlarında yapılan hayvan deneyleri ve insanlarda yapılan klinik çalışmalar mevcut olmasına rağmen, böbrek nakli sonrası NGAL'in rolü ile ilgili olarak çok az bilgi mevcuttur. Ayrıca uzun dönem takiplerinde kullanılıp kullanılamayacağına dair yapılmış klinik çalışmalara dayalı kanıt ve oybirliği yoktur. (11). Haase ve arkadaşlarının 2500 hastayı değerlendirdikleri bir çalışmanın meta-analizine göre; NGAL'in akut böbrek yetmezliğinde erken bir belirteç olduğu doğrulanmıştır (12). NGAL kolayca idrarla atılmaktadır. Başlıca serumda ve idrarda ölçülen s-NGAL ve u-NGAL formları bilinmektedir. Mevcut çalışmalarda akut böbrek hasarında s-NGAL'in plazmada 7-16 kat ve idrarda u-NGAL'in 25 kat yükseldiği gösterilerek akut faz reaktanı olarak kabul edilmiştir. Parikh ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmanın sonucunda u-NGAL'in erken dönemde gecikmiş greft fonksiyonunda prediktif öneminin olduğunu göstermişlerdir. Heyne ve arkadaşları u-NGAL'in rejeksiyonu diğer akut böbrek yetmezliğine neden olan patolojilerden (İlaç toksisitesi, hastalığın rekürrensi, bakterial ve/veya viral infeksiyon) ayırımında rolü olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak postoperatif dönemde anürik hastalarda yararsızdır. Kronik böbrek hastalıklarındaki progresyonu ile ilgili sınırlı bilgi mevcut olup, NGAL'in akut böbrek yetmezliğindeki gibi yükselme göstermemekdir. Leblowska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada postoperatif 1.günde 398.9 $\pm$11.1 ng/mL, postoperatif 10.günde 206 $\pm$90.2ng/mL olarak ölçülmüştür (13).

2.1.3. Transplantasyon İmmünbiyolojisi

Son yıllarda transplantasyon immünolojisi, immünsüpresif tedavi, infeksiyonların kontrolü ve cerrahi teknikte sağlanan gelişmeler renal transplantasyonu son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda en başarılı tedavi yöntemi haline getirmiştir. İmmünsupresyonda sağlanan gelişmeler ve nakil böbreğin erken dönem sağ kalımındaki iyileşme ne yazık ki uzun dönem greft fonksiyonuna

yansımamakta ve halen KAN, nakil böbrek yetmezliklerinin başlıca sebebi olarak kalmaktadır.

Memeli immün sistemi karmaşık bir sistem olup 2 grupta incelenebilir.

Naturel immunite; nonspesifik immün yanıtı yansıtır. Adaptif immünite; spesifik antijene yanıtı yansıtır. Organ transplantasyonunda grefte immün yanıtın birinci hedefi verici hücre yüzeylerinde eksprese olan Major Histocompatibility Complex (MHC) molekülleridir. Bu adaptif immünitenin bir formudur. Transplante dokuya immün yanıtı anlamak için genel immün yanıttan kısaca bahsetmek yerinde olacaktır.

2.1.4. Naturel ve Adaptif İmmünite

Adaptif immünite; makrofaj, nötrofil, naturel killer hücreleri, sitokinleri bazı belirli sellüler reseptörleri ve kompleman bileşiklerini içeren ve gerektiren nonspesifik immün sistemi ifade eder (14). Adaptif immünite spesifik antijeni tanımayı ve T ve B lenfosit hafıza ve spesifitesini ilgilendirir. T hücreleri MHC proteinine bağlanan peptit formunda antijeni tanır (15). B hücreleri intakt molekülün antijenik parçalarını tanıyan immünglobulin reseptörlerini içerir. Naturel ve adaptif immün sistemin kendi aralaranda sıkıca biri ilişkileri vardır. Antijen-spesifik T hücre aktivasyonu naturel immün sistemin parçaları olan sitokin ve kemokinlerin üretim ve sekresyonuna yol açarken kompleman komponentlerinin lokal doku üretimi T hücre aktivasyonu için gereklidir (16). Adaptif immüniteye bir örnek B hücrelerini ilgilendiren ABO antijenleridir. Önceden olası alıcı verici arasındaki ABO uyuşmazlığı transplantasyona kontrendikasyon oluştururken, günümüzde desensitizasyon protokolleri, plazmaferez, belki splenektomi ve agresif immünsüpresif rejimlerle bu antikorlar uzaklaştrılabilmektedir.

2.1.5. T Hücre Aktivasyonu

T hücresinin antijeni tanıması immün yanıtın etkili mekanizmalarını başlatan primer olaydır. Bu anahtar basamak iki farklı sinyali gerektirir. İlk sinyal antijen

sunan hücre (APC) tarafından peptit olarak sunulan antijen ile T hücre reseptörünün TCR) etkileşimi ile olur. İkinci sinyal T hücre / APC yüzeyinde reseptör / ligand etkileşimi ile kositümülan olarak sağlanır (17). Aktivasyon bir kez başladığında, T hücreleri mitojenik büyüme, interlökin–2 gibi diferansiyasyon faktörlerinin etkisi altında klonal çoğalmaya gider, daha sonra aktive T hücreleri:

- CD 8 pozitif T hücre ilişkili sitotoksisiteyi indükler
- B hücelerine antikor üretimi için yardım eder
- Gecikmiş tipte hipersensitivite yanıtı indüklemek için makrofajlara yardım eder

2.1.6. MHC Klas I ve Klas II Moleküllerinin Yapısı ve Doku/Hücre Dağılımı

Renal transplantasyonda en önemli doku uyum sistemi ABO kan grubu ve insan lökosit antijenleri (HLA) dir. Bu HLA antijenleri hücrelerin yüzeyine yerleşmiş glikoproteinlerdir ve 6. kromozomun kısa kolundaki major doku uyumu kompleksi (MHC) diye bilinen bir grup gen tarafından kodlanır. MHC'nin protein ürünleri çeşitli hücrelerin yüzeyleride eksprese edilir. İnsandaki sistem HLA olarak adlandırılır. Farelerdeki H-2, ratlardaki RT-I ile analogdur. HLA olarak adlandırılmalarının sebebi öncelikle beyaz kürelerin yüzeyinde saptanmış olmalarıdır. Polimorfik özelliğinden dolayı çoğunlukla belli bir alıcı için tam uyumlu bir donör bulunması çok zordur. MHC tam uyumlu bireyler arasındaki organ naklinde rejeksiyon gözlenmezken (identik ikizler), MHC farklı bireyler arasında immünsüpresif yokluğunda rejeksiyon meydana gelir. Bu proteinlerin normal biyolojik rolleri 1970'lerden beri bilinmektedir. MHC molekülleri klas I ve klas II olmak üzere iki majör gruba ayrılır. Klas I HLA antijenleri HLA-A, HLA-B ve HLA-C genlerinin ürünleri olup, farklı düzeylerde de olsa eritrositler hariç antijen-sunucu hücreler (APC), dendritik hücreler, makrofajlar, B lenfositler ve vasküler endotelyal hücreler gibi birçok hücrede eksprese edilir. Bunlar üç alfa (a-1,a-2 ve a-3) polipeptidi ve beta-2 mikroglobulinden (b2-m) oluşmaktadır Antijen bağlayan bölge a-1 ve a-2 arasında yer alır. Klas I MHC molekülleri peptid antijenleri CD-8 pozitif T hücrelerine sunar. CD-8 pozitif T hücreleri ardışık olarak apopitozu indükleyerek veya sitotoksik proteinleri salma yoluyla hücre lizisini indükler. MHC

klas II HLA antijenleri HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP genlerinde kodlanır, egzojen proteinleri bağlar. Klas II molekülleri, intesitnal dendritik hücreler, makrofajlar ve B lenfosit gibi immün yetenekli bir grup hücrede eksprese edilirler. Bu ekspresyon IL-2 and IFN-gamma gibi proinflamatuar sitokinlerle temastan sonra güçlü bir şekilde regüle olur. Klas II molekülleri birbirine non kovalan bağlarla bağlanmış iki polipeptid zincirinden (a ve b) oluşur, antijen bağlayan bölge, a-1 ve b-1 arasında yer alır. Bu bölgede amino asit dizileri bireyler arasında çeşitlilik (polimorfizm) gösterir (18).

2.1.7. MHC / HLA Moleküllerinin İmmünolojik Yanıtta Rolü

Antikor veya diğer adıyla İmmünoglobülin (Ig) TCR'nin T hücrelerinde oluşması mekanizmasına benzer olarak ağırlıklı olarak B hücrelerinde oluşmaktadır. Daha sonra kemik iliğinde matürasyonu devam etmektedir (19). İmmün sistemin antijeni tanımasında klas I ve klas II MHC moleküllerinin önemli rolü vardır. Yabancı antijeni bağlama özelliği olan MHC molekülleri ile birlikte antijen T lenfositlerinin farklı alt gruplarına sunulur. Genel olarak CD4(+) T hücreler klas II moleküllerine, CD8(+) hücreler ise klas I moleküllerine bağlanmış olan antijenleri tanır. Endojen antijenler örneğin virus ile enfekte hücrede oluşan viral peptid klas I molekülüne bağlanarak hücre yüzeyinde eksprese olur ve CD8(+) T hücreler bu peptidi tanır. Daha sonra immün yanıtın diğer aşamaları gerçekleşerek virus ile enfekte hücre öldürülür. Egzojen antijenler MHC klas II molekülüne bağlandığında CD4(+) T hücreler tarafından tanınarak bu hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu ile immün yanıt gerçekleşir. HLA moleküllerinin ortak terminolojisi uluslararası HLA workshop 'da alınan kararlara göre düzenlenir. Serolojik olarak tayin edilmiş antijenler için, HLA ön ekini takiben genetik lokusun adı yazılır (HLA-A.. gibi), onu takip eden sayılar antijenin saptandığı zaman verilen tanıtım sayısıdır (HLA-A3 gibi) Çalışmaların devam ettiği bazı moleküllerde 'w' (workshop) işareti bulunur (CwI,Cw2 gibi). Çalışmalar tamamlanıp antijen hakkında bilgi kesinleştiğinde 'w' işareti kaldırılır. Moleküler yöntemle tayin edilen HLA antijenleri için lokusun adını takiben bir asteriks (*) işareti vardır (moleküler çalışmayı ifade eder), örneğin (HLA-

A*...) ve bunu takip eden ilk iki rakam genellikle serolojik karşılığı olan tipi tanımlarken 3.ve 4. rakamlar alt tipleri belirler (HLA-A*2402 gibi) .

2.1.8. Alloantijenin Tanınması

T hücrelerinin alloantijeni tanıması transplante organın rejeksiyonuyla sonuçlanan olaylar kaskadının primer ve santral olayıdır. Her bir T hücresi veya kolonisi MHC yapısı içinde sunulan bir peptid antijeni tanıyan monospesifik yapıdadır. Direkt ve indirekt olmak üzere iki tane alloantijen tanıma yolu vardır. Her biri allospesifik T hücre klonlarının üretimine yol açar.

2.1.9. Direkt Yol

Konakçı T hücreleri donör veya stimülator hücre yüzeyindeki intakt allo-MHC moleküllerini tanır. Peptid tarafından bağlananan MHC molekülü unstabil olduğundan T hücreleri tarafından tanınamaz. Donör MHC sarmalına bağlı endojen proteinlerden derive peptidler alloantijeni tanımanın bu modunda rol oynarlar. Bu yolun erken alloimmün yanıtta dominant yol olduğu düşünülür (10). Transplante organ çeşitli sayıda interstisyel dentritik hücre formunda APCs taşır. Bu APCs'ler yüksek yoğunlukta allo-MHC molekülünü ve alıcının T hücrelerini direk stimüle etme yeteneğine sahiptir. Bu profesyonel APCs'ler T hücrelerinin tam aktivasyonu için gerekli olan kostimülatör sinyalleri sağlar. Donör MHC hücrelerinde eksprese olabilen parankimal hücreler genellikle kostimülatör moleküllerden yoksundur ve genellikle T hücrelerini tam aktive etme yetenekleri zayıftır ("profesyonel olmayan APC"). Bunun yanında, transgenik hayvanlardaki kanıtlar bazı profesyonel olmayan APC 'lerin, özellikle vasküler endotelyal hücrelerin, T hücrelerini aktive etmek için yeterli olabileceğini göstermiştir (20). Genel olarak bu hipotezin sonucu olarak organ yerleştirildikten sonra donör kaynaklı APC ' lerin sayısı azaldıkça immün yanıta direk yol tarafından sağlanan göreceli katkı azalır.

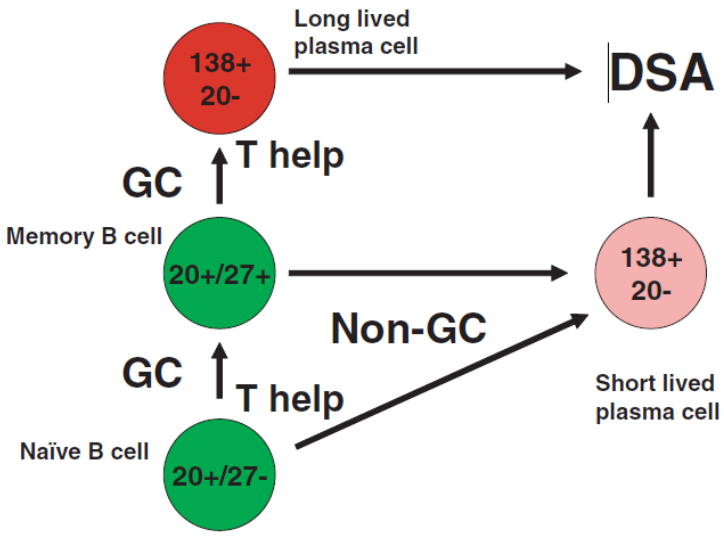
2.2. İndirekt Yol

T hücreleri, self APC (host-APC) hücreleri tarafından peptid olarak sunulan işlenmiş alloantijenleri tanır (21). Alloantijen tanınmasında temel faktör, greftten salınan MHC moleküllerinin APC hücreleri tarafından alınıp T hücrelerine sunulmasıdır. Organ transplantasyonunda MHC'nin polimorfik gen bölgesine bağlı peptidler alloimmün yanıtı güçlü bir şekilde indüklerken, nonpolimorfik genlere bağlı peptidler bu indüksiyonu yapamaz. İndirekt yolda ilginç bir şekilde peptidler nispeten daha basit ve daha kolay sentezlenebilen bir yapıdadırlar.

2.3. DSA antikorların oluşma mekanizması

Doğal B hücreler (CD20+ / CD 27-) ve hafıza B hücreleri (CD20+ / CD 27-) sekonder lenfoid dokuda yerleşmektedir. HLA antijenleri tanındığı zaman yardımcı T hücreleri aracılığı ile germinal merkezler oluşmaktadır. Bu merkezlerde B hücreleri proliferasyona ve diferansiyasyona uğrayarak uzun ömürlü DSA üreten plazma hücrelerine (CD138+ / CD20−) dönüşürler. Daha sonra buradan kemik iliğine veya kısa ömürlü DSA üreten plazma hücrelere dönüşürler (17).

Tablo 2.1. DSA'nın oluşma mekanizması



2.4. Rejeksiyon

Greft fonksiyon kaybının en önemli nedeni rejeksiyonlardır. Bu nedenle takipte en önemli konulardan biri rejeksiyonların erken tanımlanmasıdır. Böbrek transplantasyonu sonrası erken dönemde akut rejeksiyon komplikasyonu %10-20 civarında görülmektedir. Akut rejeksiyon kısa dönem için greft kaybına, uzun vadede greftin saykalımın etkilemektedir. Akut rejeksiyonda kreatininin yükselmesi prediktif önem taşımamaktadır, ancak greft disfonksiyonunun diğer sebeplerinin (infeksiyon, dehidratasyon disfonksiyonu, üreter obstruksyonu, kalsinörin inhibitörü toksisitesi ve renal arter stenozu) ekartasyonunda yeri vardır (4).

Geçmişte akut ve kronik reddin morfolojik kriterleri tanımlanmıştır ve red klasifikasyonu için Banff ve CCTT şemaları kullanılmıştır. (21,22) Ancak zaman içinde şemalarda yapılan tüm düzenlemelere rağmen bazı konularda eksiklikler hep devam etmiştir. Humoral red ayırımında zorluk, antikor yanıta bağlı olarak böbrekte tipik morfolojik ve immunohistokimyasal değişikliklerin bulunmaması olmuştur. (13) Genellikle antikor aracılı red tam olarak sınıflandırılamamış ve tanısı konamamıştır. (14) Bu nedenle neredeyse tüm akut red epizodları geçmişte hücresel red olarak tanımlanmıştır. Ancak humoral reddin prognozunun daha kötü olması ve tedavisinin akut selüler redden farklı olması nedeni ile daha spesifik ve sensitif tanı yöntemlerin bulunması çok daha öncelikli ve önemli olmuştur.

Böbrek nakli sonrasında gerek direkt gerekse de indirekt yolla oluşan alloantijenlerin tanınması sonrasında gelişen durum rejeksiyon oluşumudur. Bu durum aktive T lenfositlerin, monositlerin, makrofajların, naturel killer hücrelerin, B lenfositlerin aktif rol oynadığı doku hasarı ve organ kaybı ile neticelenen bir tablodur. Olayın şiddeti immünolojik yanıtın tipine göre değişiklik göstermektedir.

Renal allogreft redde şimdiye dek birçok gradeleme sistemi kullanılmıştır. En yaygın kullanılan sistem ise Banff şemasıdır. Kanada'da Banff'ta Kim Solez, Philip Halloran, Lorraine Racusen liderliğinde yapılan toplantıda FDA tarafından kabül gören ilaç testleri ve rutin tanı aşamasında kullanılan kriterler kabul edilmiştir. Zaman içinde birçok kez önemli revizyonlardan ve modifikasyonlardan geçirilmiştir. En son yapılan revizyon 1993'tedir. NIH Cooperative Clical Trials in Tranplantation (CCTT) kriteri 1999 yılında dahil edilmiştir ve endarterit kategorisinden ayrılmıştır

ve 2003 yılında antikor aracılı redde eklenmiştir. Bugün böbrek nakli sonrasında gözlenen rejeksiyonlar tablo 2.4.1'de görüldüğü gibi Bannf 97 sınıflamasına göre tanımlanmaktadır.

Tablo 2.2. Banff 97 Sınıflaması

Normal

Antikor aracılı rejeksiyon

Anti-donor Ab gösterilmeli

Akut Ab aracılı rejeksiyon

Tip (grade)

I. ATN like C4d (+), minimal inflamasyon

II. Kapiller marjinasyon ve/veya tromboz, C4d (+)

III.Arteriel V3, C4d (+)

Kronik aktif Ab aracılı rejeksiyon

Glomerüler double kontur ve/veya peritubuler kapiller bazal membran multilayering ve/veya IFTA ve/veya arterlerde fibröz intimal kalınlaşma, C4d(+)

3. Borderline değişiklikler

Akut T hücre aracılı rejeksiyon IA, IB, IIA, IIB, III

4. Kronik T hücre aracılı rejeksiyon

Kronik allogreft arteriopati (fibrotik alanda mononükleer hücre infiltrasyonu ile arterioler intimal fibrozis)

5. IFTA, herhangi spesifik bir etiyoloji yok

Grade I IFTA <%25 kortikal bölge

Grade II IFTA 25-50, III IFTA>%50

Görüldüğü gibi antikor aracılı rejeksiyonlar son dönemde dikkati çekmekte ve özellikle gerek akut rejeksiyon gerekse kronik antikor aracılı rejeksiyonların tanınması bu sınıflamada vurgulanmaktadır. Son dönemde antikor aracılı rejeksiyonlar Consensus Opinion from the Antibody Working Group tarafından net olarak sınıflandırılmıştır (23).

2.4.1. Antikor Aracılı Rejeksiyonlar

Antikor aracılı rejeksiyonun ayırt edici özelliği yoktur, ancak genelde transplantasyon sonrası ortaya çıkar ve hızlı allogreft fonksiyon bozukluğuna yol açar. Prognostik anlamda T hücre aracılı rejekyondan daha kötüdür (4).

Hiperakut Antikor Aracılı Rejeksiyon (AMR; antibody mediated rejection): Nakil öncesinde yüksek miktarda donor spesifik antikor varlığında gelişir (DSA); hemen hemen tüm olgular ilk 24 saatte greft kaybına uğrar.

Akselere AMR: Nakil öncesinde düşük DSA varlığında geilişir; ilk 24 saatten sonra rejeksiyon meydana gelir ve standart tedaviye dirençlidir.

Akut AMR: Nakil sonrasında 'de novo' DSA gelişimi sorumlu faktördür. 1 hafta 3-6 ay sonra oluşur. Standart tedaviye dirençlidir

Geç veya Kronik AMR: Nakil sonrasında 'de novo' DSA oluşumu neticesi gelişir. 1 yıldan sonra yaklaşık % 20-30 oranında görülmekle birlikte yavaş fakat progresif seyirli greft disfonksiyonuna neden olur. Tedaviye dirençlidir. Donor spesifik anti-HLA antikorlar büyük oranda AMR ile ilişkilidir (8). AMR'nin kesin kantı olarak kanda dolaşan DSA antikorlarının olması ve antijen antikor bağlanması sonucu oluşan kompleman aktivasyonuna bağlı olarak greft endotelinde gelişen C4d (+) kopleman komponentidir (24).

2.4.2. Gecikmiş Greft Fonksiyonu (GGF)

Gecikmiş greft fonksiyonu nedeniyle akut böbrek yetmezliği, transplantasyon sonrası ilk hafta içinde diyalize ihiyaç duyuluyorsa gecikmiş greft fonksiyonun tanımlamaktadır. Canlı vericiden yapıldığında %4-10 arasında ve kadavradan yapıldığında %5-50 civarında görülmektedir. GGF akut rejeksiyon için predispozandır ve kronik allogreft nefropati riskini artırmaktadır (10,11).

2.4.3. Kronik allogreft nefropatisi (KAN)

Renal transplantasyon ile 1 yıllık hasta yaşamı % 95-98, 5 yıllık hasta yaşamı ise % 80-90 civarındadır. Renal transplantasyon ile 1 yıllık greft yaşamı canlı vericide % 90-95 ve kadavra vericide % 75-85'dir. 5 yıllık greft yaşamı canlı vericide % 60-90 ve kadavra vericide % 50-60'dir. Diyaliz tedavisi ile karşılaştırıldığında maliyet, yaşam kalitesi, ve yaşam süresi yönünden renal transplantasyon daha iyi tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak renal transplantasyon organ yetersizliği nedeniyle tüm hastalara uygulanamamakta ve bu nedenle diğer renal replasman tedavileri uygulanması zorunlu hatta yıllar geçtikçe nakil yapılan hasta sayısı benzer oranda kalırken diyaliz hasta sayıları hızla artmaktadır. Bu hastalara bir de nakil sonrası greft kaybı gelişen hastalar eklendiğinde organ bekleme listeleri gün geçtikçe artmakta ancak organ kıtlığı daha büyük boyutlara ulaşmaktadır.

KAN, hipertansiyon (HT) ve proteinüri ile birlikte nakil böbrek fonksiyonlarının ilerleyici şekilde kaybı ile karakterize bir klinik tablodur. Patogenezinde sorumlu tutulan mekanizmalar immünolojik ve immünolojik olmayanlar olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Kronik allogreft disfonksiyonu nedenleri arasında bazı spesifik hastalıklar, kronik kalsinörin inhibitör kullanımı, diyabet ve hipertansiyon gibi nonspesifik faktörler ile transplant glomerülopati sayılabilir. Spesifik hastalıkların en sık karşılaşılan nedeni alıcıdaki hastalığın nüksüdür. IgA glomerülonefriti %30 oranında nüks ederken, membranoproliferatif glomerülonefritte ve hemolitik üremik sendromda (HUS) bu oran % 60'lara kadar çıkabilir.

Renal transplantasyonun yapılabilmesi için alıcı ile verici arasında ABO kan grubu sisteminde uyum olmalıdır ve uyum kuralları kan transfüzyonu gibidir (0 grubu genel verici, AB grubu genel alıcı). Fakat son zamanlarda değişik yöntemleriyle farklı kan grubu olanlar arasında nakiller de başarı ile yapılabilmektedir. Renal transplantasyonda alıcı ile verici arasında uyum aranan ikinci sistem doku grubu olarak bilinen HLA sistemidir. HLA sistemi 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiş doku uygunluk antijenlerinin kodlandığı bölge tarafından belirlenir. HLA sistemi anne ve babadan alınan birer haplotipten

oluşur. HLA bölgesindeki antijenler I. sınıf (A,B,C) ve II. sınıf (D,DR,DP,DQ) olmak üzere ikiye ayrılır. Renal transplantasyonda önemli olan A,B ve DR antijenleridir. Renal transplantasyonda en iyi sonuç doku uygunluk antijenlerinde tam uyum olduğu durumlarda alınmaktadır. Vericide, alıcıda olmayan DR, B, A antijenleri arttıkça alıcının böbreği reddetme olasılığı artmaktadır. Alıcının nakledilen böbreği reddetmesinde minör antijenler denilen HLA A,B,DR antijenlerin dışında ki antijenlerinde rolü olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca HLA dışı antijenlerin de organ nakli sonucunu etkileyebilen 4 immün reaksiyonlara yol açtığı da bilinmektedir. Bunlar anti-endotelyal antikorlar, major histocompatibility complex (MHC) Klas I bağlantılı Chain A (MICA) antijenlerine karşı gelişen antikorlar olarak söylenebilir. Bilindiği gibi son yıllarda akut rejeksiyonun gelişimi etkin immünsupresif tedaviler ile %15'lere inerken uzun dönem greft fonksiyonu önceki yıllara göre anlamlı olarak iyileşmemiştir. Kronik allogreft rejeksiyonu terimi Kronik allogreft nefopatisi (KAN) olarak değişikliğe uğramıştır. Kronik allogreft nefropatisi (KAN) transplante böbrekte kronik interstisyel fibrozis, tübüler atrofi, tıkayıcı vasküler değişiklikler ve glomerülosklerozun eşlik ettiği, ilerleyici böbrek fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. KAN, biyopside tipik özelliklerin olmasının yanında, belirgin ilaç toksisitesi, rekürren veya de novo spesifik hastalıktan bağımsız şekilde, çoğunlukla nakilden 6 ay sonra ortaya çıkan, nakil böbrekteki fonksiyon bozukluğunu tanımlamaktadır. KAN'nin patogenezi tam olarak anlaşılmamıştır. Patogenezde suçlanan faktörler tablo 2.4.5'de gösterilmektedir. KAN gelişiminde etkileri tanımlanmış çeşitli risk faktörleri ileri donör yaşı, gecikmiş greft fonksiyonu, tekrarlayan akut rejeksiyon epizodları ve geç dönemde gelişen rejeksiyonlardır (21). KAN öncesinde sıklıkla, antirejeksiyon tedaviye kötü cevap verebilen, belirgin akut rejeksiyon epizod hikayesi bulunur. Kliniğinde hipertansiyon (HT), proteinüri ve glomerüler filtrasyon hızındaki (GFH) yavaş seyirli düşme ile geç dönem nakil böbrek fonksiyon bozukluğu yer alır.

Tablo 2.3. Kronik Allogreft Nefropati Gelişimi/Progresyonunda Etkili Faktörler

İmmünolojik Olmayan Sebepler
KNI toksisitesi
Primer hastalığın nüksü
Hipertansiyon
Dislipidemi
CMV enfeksiyonu
Diyabetes mellitus
Oksidatif stress
Kronik hipoksi
Sigara
Gecikmiş greft fonksiyonu
Donor yaşı veya kötü greft kalitesi
İmmünolojik Sebepler
HLA mismatch
Yüksek PRA
Daha öncesinde rejeksiyon olması
Yetersiz immünosupresyon
Subklinik rejeksiyon

2.5. İmmünsüpresyon

Tek yumurta ikizleri arasındaki transplantlar ayrı tutulduğunda, sürekli immunsupresyon transplante organların uzun dönem fonksiyonu için mutlak gereklidir.

Akut rejeksiyon atağı tüm renal transplant hastalarının % 15-45'inde görülebilir ve renal allogreftın fonksiyonuna ve sonuçlarını olumsuz etkiler. Günümüzde immunsupresyon protokolleri merkezler arasında değişiklik göstermekte ve her merkez en düşük akut rejeksiyon ve en yüksek hasta ve greft fonksiyonunu amaçlamaktadır. Transplantasyon uygulamalarında immünsupresif ilaçlar, indüksiyon ve idame tedavide kullanılmak üzere geliştirilmektedir (22).

İndüksiyon Ajanları

Bu ilaçlar T hücre deplesyonu yapan ve yapmayan ilaçlar olarak iki grupta toplanabilir.

T hücre deplesyonu yapan ilaçlar:

- Anti-timosit globulin
- OKT3
- Anti-CD52
- Rituximab (anti-CD20)

olarak sayılabilir.

T hücre deplesyonu yapmayan indüksiyon amaçlı kullanılan ilaçlar ise:

- Basiliximab
- Daclizumab

olarak göze çarpmaktadır.

İdame Tedavide Kullanılan İlaçlar

- Kortikosteroidler
- Azatiopürin
- Mikofenolat mofetil
- Siklosporin A
- Takrolimus
- Sirolimus
- Everolimus

2.6. Human Lökosit Antijen Uyumu

Transplantasyon öncesi alıcı ile vericinin uyumunu değerlendirmek için HLA-A,HLA-B ve HLA-DR tiplemesi yapılır. Böbrek naklinde uzun dönem sonuçlar halen doku uyum oranı ile paralellik göstermektedir. Her ne kadar yeni ve

etkin immünsupresif ilaçlar pratik uygulamaya girse de doku uyumu en iyi nakil ile daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Saptanan ve alıcıda olmayan her donör antijeni mismatch olarak adlandırılır ve total 2 adet A, 2 adet B, 2 adet DR olmak üzere 6 doku antijeni üzerinden mismatch sayısı belirlenir (25,26). Eğer alıcının serumunda kan transfüzyonları, gebelik veya daha önceki transplantasyondan kaynaklanan HLA antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar varsa bu anti-HLA antikorları böbrek vericisinin antijenlerine spesifik ise buna donor spesifik antikorlar denir. Bu tür anti-HLA antikorlarının oluşması için kişinin kendine yabancı antijenlerle karşılaşmış olması gerekir. Solid organ transplantasyonu öncesinde alıcıda donör HLA antijenlerine karşı oluşmuş anti-HLA antikorlarının varlığı in vitro koşullarda tarama testleri ile gösterilebilir. HLA antijenleri bilinen kişilerin lenfositlerinden oluşan paneller kullanılarak gösterilebilen bu antikorlar, 'panel reaktif antikorlar' olarak tanımlanırlar Antijen-antikor etkileşimine bağlı olarak panelde saptanan antikor pozitiflik oranı PRA yüzdesi olarak ifade edilir

2.7. Lenfosit Crossmatch Testi (LCM)

1966 yılında Kismeyer-Nielsen ve arkadaşları renal transplantasyonlarda alıcının serumunda vericinin HLA antijenlerine karşı antikor varsa hiperakut rejeksiyon gerçekleştiğini bildirmişlerdir (27). Pretransplant verici HLA antijenlerine karşı alıcıda antikorların var olup olmadığının saptanması amacıyla yapılır. Böylece hiperakut rejeksiyonun önceden öngörülmesini sağlayan spesifik bir testtir. Hasta serumu ile verici B ve T lenfositlerinin karşılaştırıldığı bir testtir. Burada T hücre crossmatch vericinin klas I HLA antijenlerine karşı alıcının antikor geliştirip geliştirmediği, B hücre crossmatch ise alıcıda klas II HLA antijenlerine karşı antikor olup olmadığını test etmektedir. Antikorlar donör lenfosit yüzeyine tutunduğunda üzerine kompleman (tavşan serumu) ilave edildiğinde C1 aktivasyonu ile klasik kompleman aktivasyonu ve membranı perfore olan alıcının lenfositlerinde lenfoliz oluşacaktır. Eosin veya tripan mavisi gibibir boya kullanılırsa hücre membranı bozulmasına bağlı hücre sitoplazması boya tutacaktır. Membranı sağlam hücreler boyayı hücre içine almazlar. Sonuçlar invert mikroskopla okunur. Pozitif test sonucu transplantasyon için kontrendikasyondur. Bugün crossmatch testinin

duyarlılığını arttırmak ve bu antikorları daha iyi tanımlamak için bir çok teknik geliştirilmiştir. Sumittran-Karrupan grubunun yaptığı çalışmada bir çok teknik karşılaştırılmış flow sitometri yöntemi daha hassas bulunmuştur. Flow sitometrik crossmatch yukarıdaki serolojik komplemana bağlı sitotoksisite yöntemle sensitize çıkmayan hastalarda daha düşük düzeydeki antikorları saptayabilmektedir. Flow ile kompleman fiske etmeyen anti-HLA antikorları da ortaya çıkarılabilmektedir (28).

2.8. Panel Reaktif Antikor (PRA)

Renal transplantasyon, bir kısmı geri dönüşümsüz greft fonksiyon kaybına neden olan çok sayıda komplikasyonla ilişkilidir. Nakil öncesi dönemde rutin olarak yapılan panel reaktif antikor (PRA) tarama ve tanımlama testleri ve immünsüpresif tedavilerdeki gelişmelere rağmen böbrek allogreftlarının önemli bir kısmı hücresel ve/veya humoral aracılı rejeksiyonlarla kaybedilmektedir (29). Yüksek oranda sentisitize hastalar (PRA>85) bekleme listesinde uzun yıllar kalırlar ve bu hastaların cross-match testleri negatif olan donör bulma ve dolayısıyla nakil olma ihtimalleri düşükür. Presensitizasyonun araştırılmasında kullanılan bir testtir. Gönüllü kan vericilerinden izole edilen farklı MHC'li T ve B lenfositler alıcı serumu ile karşılaştırılır. Pretransplant dönemde donör organ bulunduğunda muhtemel crossmatch pozitif sonuç verecek hastaların otaya çıkarılması böylece aktif ve pasif bekleme liselerinin oluşturulması amacıyla yapılır. Panel reaktif oluşumu temelde 3 nedene dayanmaktadır.

Kan transfüzyonları

Gebelik

Daha önce yapılan transplantasyonlar.

Kronik renal yetersizlikli hastalarda kronik anemi nedeniyle sık transfüzyon gereği hastaların bazı doku antijenlerine karşı kalıcı hassaslaşmasına yol açmaktadır. Özellikle kadavradan organ bekleyen hastalarda, kan transfüzyonundan 3 hafta kadar sonra alınan kan örneklerinin bu antikorlar açısından taranması gereklidir. Eğer hassaslaşmış doku grupları saptanırsa transplante edilecek organda bu doku antijenlerinin bulunmamasına dikkat edilmelidir. Yüksek PRA, yüksek duyarlı

hastaya ve erken greft kaybında artmış riske işaret eder (27). HLA spesifik antikorların tanınması günümüzde sensitif ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) ve flow-sitometrik testlerle kolaylaşmıştır. Böbrek nakli öncesinde hastaların böbrek vericisinin HLA antijenlerine karşı duyarlaşmaya sahip olup olmadığını ortaya koymak için lenfosit cross match (LCM) testi yapılmakta (klas I ve II antijenlere karşı) pozitif sonuç varlığında transplantasyon gerçekleştirilmemektedir. LCM testi kompleman bağımlı sitotoksisite (complemant dependent cytotoxicity CDC-cross match) ile yapılırken bugün bir çok merkez daha hassas ve non-kompleman antikorlarıda ortaya koyabilen flow cytometric cross match testi ile yapmaktadır. Bu test ile daha düşük düzeyde mevcut antikorlar ortaya konulabilmektedir. Ek olarak yine nakil öncesi HLA antijenlerine duyarlılık durumunu yansıtmak üzere, panel reaktif antikor (PRA) denilen ve değişik HLA klas I ve II antijen havuzuna karşı alıcı serumunda mevcut antikorların saptanmasını sağlayan testler de yapılmaktadır (30).

2.9. Elisa yöntemi

Elisa (Enzyme linked immunosorbant assay) – özgül antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için kullanılan enzim immüntesttir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri de laboratuvarda az zamanda çok sayıda örnekle çalışma imkanı sağlamasıdır. 1.Serumlar ve kit oda ısısına gelmesi icin dolaptan çıkarılır. 2.wash solusyonu (10X) hazırlanır :(900 ml distile su + 100 ml wash solusyonu) 3.serum ornekleri dilue edilir (145 mikrolitre dilusyon buffer+ 5 mikrolitre serum) 4.plak plani belilenerek standartlar, kontroller ve serum ornekleri plak kuyucuklarına pipetlenir. 5.plak oda ısısında ve karıştırıcıda 1 saat inkube edilir. 6.inkubasyon sonunda kuyucuklar 3.kez wash solusyonu ile yıkanır. 7.100 mikrolitre biotin kaplı antikor tüm kuyucuklara pipetlenir. 8. plak oda ısısında ve karıştırıcıda 1 saat inkube edilir. 9. inkubasyon sonunda kuyucuklar 3.kez wash solusyonu ile yikanir. 10.100 mikrolitre streptavidin-hrp conjugate tüm kuyucuklara pipetlenir. 11. plak oda ısısında ve karştırıcıda 30 dakika inkube edilir. 12. inkubasyon sonunda kuyucuklar 3.kez wash solusyonu ile yıkanır. 14.100 mikrolitre substrat solusyonu tum kuyucuklara pipetlenir, karanlikta 10 dakika beklenir. 14.100 mikrolitre stop

solusyonu eklenerek calışma sonlandırılır. 15.plak 450 nm de eliza okuyucuda okutulur, degerlendirme yapılır.

3. MATERYAL – METOD

Çalısmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Transplantasyon Ünitesinde Kasım 2006 ile Ağustos 2010 arasında canlı/kadavradan böbrek transplantasyonu yapılan 90 hasta alındı.

- Diyalize dönen hastalar
- Başka merkezde takip edilen veya polikliniğe gelmeyen hastalar
- Ölen hastalar
- Nakil öncesi PRA pozitifliği olan hastalar çalışmadan çıkarıldı.

Çalışmada ortalama yaşı 38 olan 27'si kadın 63'ü erkek toplam 90 hasta değerlendirmeye alındı. Değerlendirme ve izlem sırasında alıcı yaşı, alıcı cinsiyeti, verici yaşı, verici cinsiyeti, alıcı-verici akrabalık derecesi, canlıdan / kadavradan nakil, diyaliz tipi, diyaliz süresi, posttransplant geçen süre, pretransplant alıcı-verici CMV enfeksiyon durumu, Klas I / Klas II panel reaktif antikor, akut rejeksiyon, akut rejeksiyonun derecesi, posttransplant üriner sistem enfeksiyonu gelişip gelişmediği, posttransplant CMV enfeksiyonu gelişip gelişmediği, gecikmiş greft fonksiyonu olup olmadığı, posttransplant diabetes mellitus gelişip gelişmediği, uygulanan immünsupresif protokol, proteinüri durumu, indüksiyon tedavisi alıp almadıkları hasta dosyalarından kaydedildi. Tüm hastaların en son kontroldeki biyokimyasal parametreleri dosyalarından alınarak işlendi. Hastaların rutin kontroller esnasındaki son değerleri baz alınarak MDRD (modification of diet in renal disease) formülüne göre glomeruler filtrasyon hızı hesaplandı (10). Akut rejeksiyon tanısı olan tüm hastaların biyopsi tanısı mevcut idi. Alıcı ve vericilerin HLA-A, HLA-B ve HLA-DR 'leri karşılaştırılarak mismatch sayıları belirlendi. Posttransplant DSA pozitif ve negatif hastalar luminex yöntemiyle değerlendirildi. Daha sonraki aşamada İmmünoloji laboratuvarında NGAL kiti Elisa yöntemi ile DSA pozitif ve negatif serum örnekleri belli olduktan sonra çalışıldı. Alınan sonuçlar eş zamanlı kreatinin ve eGFR-MDRD ile korelasyonu yapıldı (31).

3.1.1.Tahmini GFR hesaplanması

Hastaların rutin kontrollerde bakılan postoperatif 1 ay, 6 ay, 1yıl ve NGAL ile eş zamanlı kreatinin değerlerine göre MDRD-eGFR (modification of diet in renal disease- eGFR=186.3x serum kreatinin $(mg/dL)^{-1.14}$ x 0.742 kadın hastalarda x1.21) formülüne göre hesaplandı (10).

3.1.2. DSA çalışılması

DSA belirleme yönteminin prensiplerine göre HLA için kaynak materyal, vericinin pariferik kanından veya dalağından izole edilen lenfositlerlerdir. Santrifüj edildikten sonra, hücre parçacıkları ve fragmanları ayrıştırılır. Daha sonra kalan lizat hemen kullanılabileceği gibi ilerde kullanılmak üzere dondurulabilir. DSA pozitif ve negatif grupların belirlenmesi Luminex yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Tanımlamada pozitif olan örneklerde daha sonra anti- HLA tipleri klas I ve klas II olarak bakıldı. HLA'lar ayrıldıktan sonra Life Match Quick Type Reanalysis Antibody Results programı ile alıcı- verici HLA'ları karşılaştırıldı. Ortak antikor olanlar donör spesifik antikor olarak kabul edildi (32,33).

3.1.3.İstatistiksel yöntemler

İstatistiksel değerlendirmeler Statiscal Package for Social Science for Windows Version 16.0 (SPSS 16.0 Inc:Chicago,11,USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Değişkenler ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Grup ortalamaları arası farklılıklar student-t testi, grup oranları farklılıkları ise ki-kare testleri ile değerlendirildi. DSA antikorları gelişimini etkileyebilecek faktörler lojistik regresyon analizi ile test edilerek bağımsız değişkenler belirlenmeye çalışıldı. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

3.1.4.Etik Kurul Onayı

Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na sunulmuş olup 150-01 numarası ile onay alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Özellikleri:

Hastaların 27'si kadın, 63'ü erkek, transplant öncesi 13 hasta CAPD, 61 hasta HD, 2 hasta önce CAPD sonra HD tedavi programında idiler. Olguların 15'ine preemptif transplantasyon yapılmıştır. Primer hastalıklara bakıldığında; 3 hastada FMF, 8 hastada DM, 16 hastada hipertansif nefropati, 2 hastada vaskülit, 4 hastada IgA nefropatisi, 25 hastada kronik glomerulonefrit, 1 hastada SLE, 2 hastada VUR, 1 hastada polikistik böbrek hastalığı, 20 hastada kronik tubulointerstisyel nefrit, 9 hastada etyoloji ortaya konulamamıştır. Donör cinsi 38 erkek, 53 kadın idi. Nakiller 70'i canlıdan (22 anne ,14 baba, 15 kardeş, 14 eş, 1 amca, 3 kuzen, 1 babaanne ve 1 hastanın çocuğundan) 20 kadavradan transplantasyon yapılmış. Alıcı ve vericilerde CMV IgG tamamında pozitif saptanmış. Ortalama kreatinin düzeyi olgularda 1.21±1.38 mg/dl olarak tespit edilmiştir. Akut rejeksiyon olguların 18'ünde saptanırken (10 hasta grade IA, 4 hasta grade IIveya III) gelişmeyen 77 hasta saptanmıştır. Total 26 hastada CMV enfeksiyonu meydanagelirken, 65 hastada CMV enfeksiyonu görülmemişti. Üriner enfeksiyon olguların 25'inde meydana gelmiş. Gecikmiş greft fonksiyonu 13 hastada gözlenmiş, hastalardan 32'si (30 interlökin-2 reseptör blokeri ve 2 'si ATG) indüksiyon tedavisi alırken 59'u indüksiyon tedavisi almamıştı. Tablo 5.3'de hastaların genel özellikleri görülmektedir:

4.2. Çalışmaya katılan hastaların genel özellikleri

Toplam 20 hastada DSA pozitif olarak saptandı. Hastalar DSA pozitif ve negatif olarak iki gruba ayrıldıklarında istatistiksel karşılaştırma Tablo 5.3'de sunulmaktadır.

Tablo 4.1. DSA antikor pozitif ve negatif grupların karşılaştırılması

	DSA pozitif	DSA negatif	*p*
	n=20	n=70	
Yaş	42±12	37±10	*0.12*
Cinsiyet (K/E)	11/9	21/49	*0.17*
Diyaliz Süresi (ay)	42±34	26±33	*0.12*
Nakil Sonrası Süre (ay)	29±12	27±12	*0.23*
Donör Yaşı (yıl)	46±17	46±13	*0.96*
GFR-MDRD	58±26	69±18	***0.05***
Canlı/kadavra	20/10	70/10	***0.004***
Akut Rejeksiyon	10 (%50)	8 (%7.8)	***0.001***
CMV infeksiyonu	5 (%41)	21(%26)	*0.31*
Üriner İnfeksiyon	6 (%50)	19 (%24)	*0.08*
İndüksiyon	7 (%58)	25 (%32)	*0.10*
Gecikmiş Greft Fonksiyonu	4 (%33)	9 (%11.4)	*0.06*
Takrolimus	10 (%83)	57 (%72)	*0.5*
CsA	1 (%8.3)	16 (%20)	*0.45*
MMF/MPA	6 (%50)	48 (%61)	*0.53*
Everolimus/Sirolimus	1 (%8.3)	4 (%5.0)	*0.51*
Azathioprin	6 (%50)	31 (%39)	*0.52*

(Student T testi ile, **p ≤0.05**)

Tablo 4.2. DSA grubunda NGAL'in oranları

DSA durumu	NGAL Grubu		Total
	<50	≥50	
Negatif	50 51.8%	20 28.5%	70 100.0%
Pozitif	5 15%	15 75%	20 100.0%
Total	55 57.3%	35 42.7%	90 100.0%

DSA pozitif hastalarda NGAL ≥50 olan hastalar fazla izlenmiştir ***(p=0.005).***

Tablo 4.3. DSA gruplarında ortalama NGAL değerleri

DSA	Mean	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum
negatif	43,23	14,86	41,12	20,00	87,87
pozitif	62,04	16,75	64,27	32,70	87,86
Total	47,41	17,11	42,48	20,00	87,87

NGAL (**Referans- 50 ng/ml** cut off) Man Whitney testi ***(p<0,001).***

Tablo 4.4. DSA pozitif ve negatif hastalarda rejeksiyon oranları

DSA durumu	Rejeksiyon		Total
	yok	var	
Negatif	62 88.1%	8 44.4%	70
Pozitif	10 13.9%	10 55.6%	20

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi DSA pozitif hastalarda rejeksiyon oranı daha yüksek olmakla beraber DSA antikorları gelişimi için anlamlı risk faktörleri olarak dikkati çekmektedir.

Fisher's Exact Test : ***p=0.001.***

Araştırmamızın hipotezlerinden biri DSA pozitif hastalarda DSA negatif hastalara göre rejeksiyon oranı daha yüksek olmasıdır.

Tablo 4.5. NGAL >50 ve <50 olan hastalarda rejeksiyonun karşılaştırılması

NGAL	DSA	Rejeksiyon		Total
		yok	var	
<50	negatif	47 90.4%	3 6%	50 100%
	pozitif	5 100%	0 0%	5 100%
>50	negatif	15 78.1%	5 21.9%	20 100%
	pozitif	5 33.3%	10 66.7%	15 100%

NGAL cut-off 50 nm/L. NGAL >50 olan DSA pozitif hastalarda rejeksiyon oranı daha yüksek bulunmuştur. Pearson Chi-Square ***p=0.007***

Tablo 4.6. NGAL >50 ve <50 olan kadavradan böbrek alıcılarında rejeksiyonun karşılaştırılması

NGAL	Kadavra	Rejeksiyon	%
<50	10	1	10 %
>50	10	6	60 %

Tablo 4.5'da görüldüğü gibi NGAL>50 olan kadavradan renal hastalarında rejeksiyon oranı daha fazla görülmüştür ***p=0.001.***.

Tablo 4.7. DSA pozitif ve negatif hastalarda gecikmiş greft fonksiyonu

Gecikmiş Greft Fonksiyonu	DSA		Total
	pozitif	negatif	
Var	7-70%	3-30%	10-100%
Yok	13-16.3%	67- 83,7%	80-100%

Gecikmiş Greft fonksiyonunun DSA pozitif hastalarda daha fazla oranda görüldüğü istatistiksel olarak hesaplandı. Fisher's Exact Test ***p=0.001.***

Tablo 4.5.8. NGAL'in gecikmiş greft fonksiyonu ile ilişkisi

Gecikmiş greft fonksiyonu	NGAL		Total
	<50	>50	
var	2 20%	8 80%	10 10-100%
yok	53 67,1%	27 32,9%	80 79-100%

NGAL >50 olan hastalarda gecikmiş greft fonksiyonu daha fazla olduğu görülmüşür. Fisher's Exact Test ***p=0.005.***

Lee ve arkadaşlarının NGAL ve İnterluekin-18'in Gecikmiş greft fonksiyonu konusunda yaptığı karşılaştırmalı çalışmada NGAL'in gecikmiş greft fonksiyonun göstermede hassas ve interlökin-18 sınırlı olduğu gösterilmiştir. (10)

Tablo 4.9. DSA pozitif ve negatif hastalarda eş zamanlı kreatinin değerleri

DSA durumu	Eş zamanlı kreatinin
pozitif	1,405
negatif	1,140

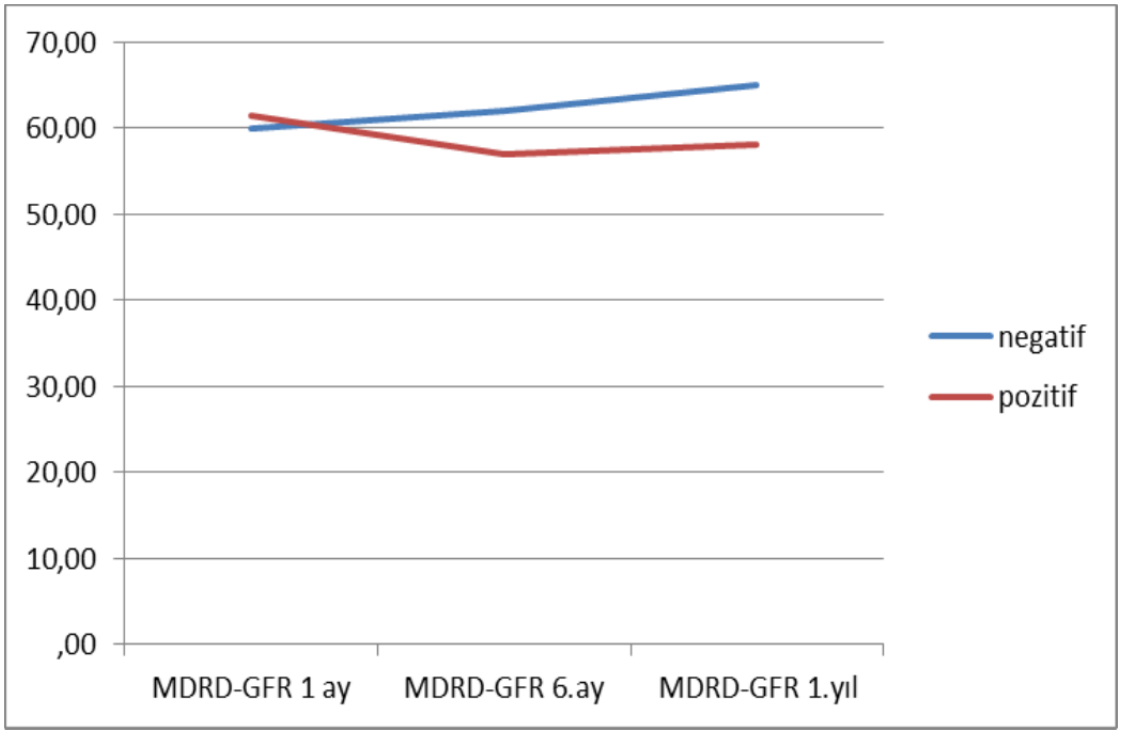
DSA pozitif hasta grubunda eş zamanlı olarak ölçülen kreatinin değerleri negatif gruba nazaran daha yüksek olarak ölçülmüştür ***p=0.03.***

Tablo 4.10. DSA pozitif ve negatif hastalarda eş zamanlı MDRD-GFR

	DSA durumu	Ortalama değeri
Eş zamanlı MDRD-GFR	negatif	51.82
	pozitif	23.83

DSA pozitif hastalarda MDRD-GFR değerleri DSA negatif hastalara göre daha düşük olarak hesaplandı ***p=0.001.***

Tablo 4.11 DSA pozitif ve negatif hastalarda zamanla MDRD-GFR'nin progresif karşılaştırılması



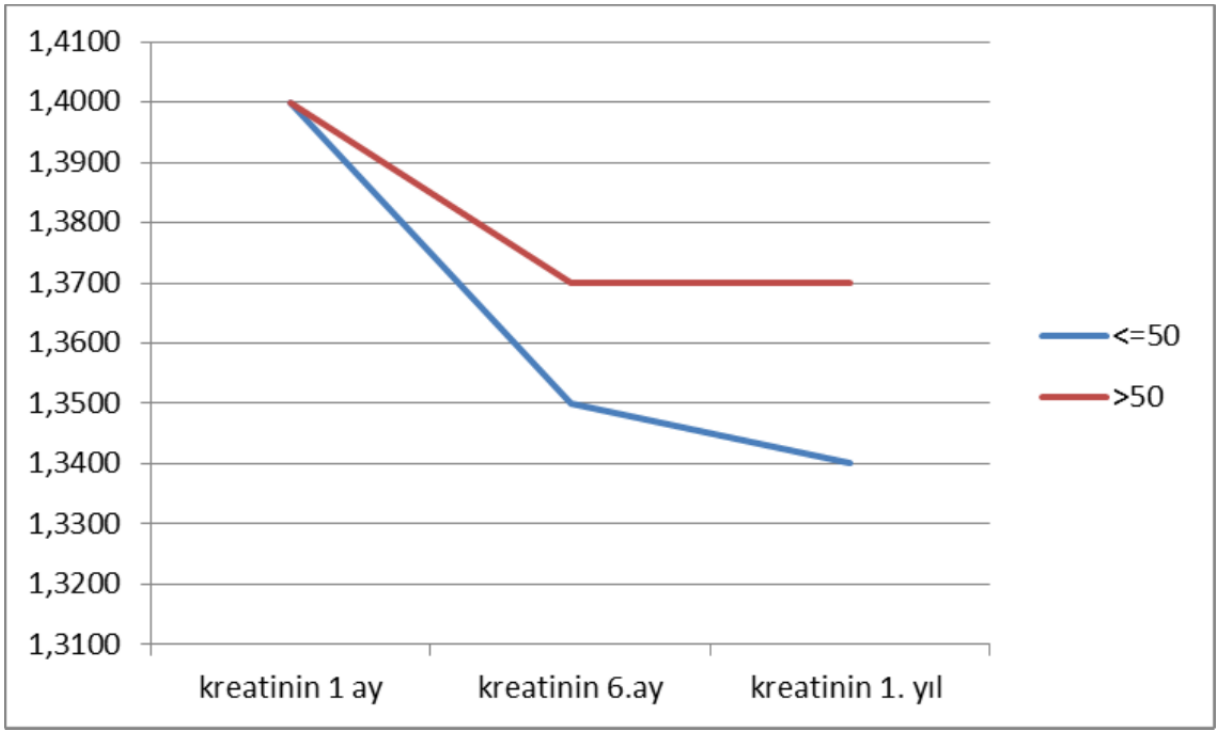
Bu tabloda görüldüğü gibi MDRD-GFR'nin zamana karşı kıyaslandığında DSA pozitif hastalarda düşme, oysa ki DSA negatif hastalarda yükselme görülmüştür. 1.ayda fark olmamakla beraber 6.ay ve 1.yılda fark vardır ***p<0.05***

Tablo 4.12. NGAL gruplarında eş zamanlı kreatinin karşılaştırılması

NGAL	Eş zamalı kreatinin (Median)
<50	1.12
>50	1.40

NGAL >50 olan alıcılarda eş zamalı ölçülen kreatinin değerleri NGAL<50 olan hastalara göre daha yüksek bulunuştur ***p=0.001.***

Tablo 4.13. NGAL >50 ve <50 olan hastalarda kreatininin zamanla progresyonu



NGAL>50 olan hastalarda kreatininin zamanla düşme oranı daha düşüktür.

Benzer şekilde 1.ayda fark olmakla beraber 6.ay ve 1.yılda fark olmuştur ***p<0.05.***

Tablo 4.14. NGAL gruplarında eş zamanlı MDRD-GFR karşılaştırılması

NGAL	Eş zamanlı MDRD-GFR
<50	68.82
>50	56.23

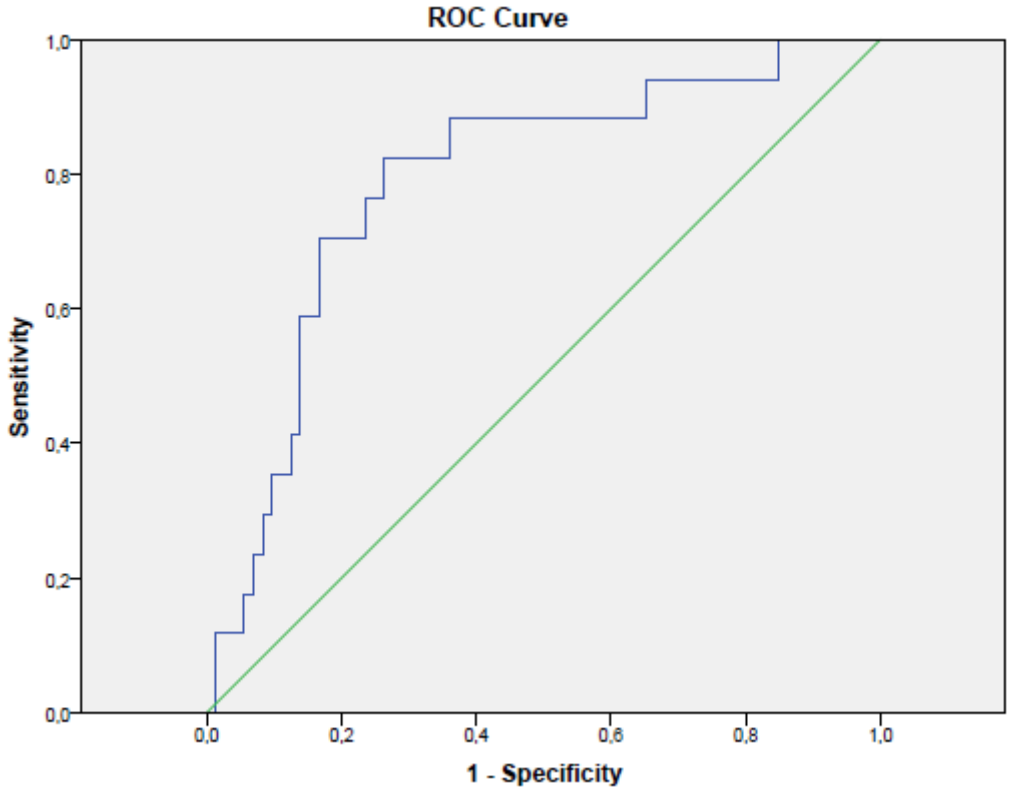
NGAL >50 olan alıcılarda eş zamalı ölçülen MDRD-GFR değerleri NGAL<50 olan hastalara göre daha düşük bulunuştur ***p=0.001.***

Tablo 4.15 Rejeksiyon grubunda eş zamanlı kreatinin ve MDRD-GFR değerleri

	Rejeksyiyon _grup	N	Mean
Eş zamanlı kreatinin	yok	73	1,134
	var	17	1,551
Eş zamanlı MDRD-GFR	yok	73	68,52
	var	17	44,18

Eş zamanlı kreatinin ve MDRD-GFR rejeksiyon grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ***p=0.001.***

Tablo 4.16. NGAL'in böbrek fonksiyonların göstermede sensivitesi



ROC-analiz sonucu (Receiver operating characteristic analysis) NGAL'in allogreft fonksiyonunda predictiftir.

5. TARTIŞMA

Böbrek nakli sonrasında en önemli greft kaybı nedeni rejeksiyon ve sonrasında Kronik Allogreft Nefropatisidir (KAN). Bunun immünolojik ve immünolojik olmayan nedenleri vardır. İmmünolojik olmayan nedenlerin başında kullanılan kalsinörin inhibitörleri gelirken, immünolojik faktörlerin başında kronik antikor aracılı rejeksiyon neticesi gelişen KAN dikkati çekmektedir, Bu çalışmamızda ortalama 29±21 ay izlem süresine sahip olan ve nakil öncesi HLA antikorları bulunmayan ve halen fonksiyonel greft ile izlenen transplant alıcılarında DSA gelişim sıklığını %22 olarak saptanmıştır. Antikor olmayanlarla karşılaştırıldığında; akut rejeksiyon ve kadavradan böbrek nakli HLA antikor gelişimi için risk faktörü olarak ortaya konmuştur. Piazza ve ark yaptıkları bir çalışmada 120 hastada donor spesifik anti-HLA antikor sıklığını %24 olarak saptarken 1 izlemde DSA pozitif olguların %62'sinde akut rejeksiyon gözlemişler ve antikor negatif grupta ise bu oran %13 olmuştur (33). Çalışmalarda immunsupresyon uygulamaları ile anti-HLA antikor gelişimi arasında net bir ilişki ortaya konulamamıştır. Ancak takrolimus+MMF+steroid uygulamaları ile daha düşük subklinik rejeksiyon gözlendiği değişik çalışmalarda ortaya konmuştur (34,35,36) Muhtemeldir ki bu avantaj de-novo anti-HLA antikor gelişiminde de gözlenebilir. Ancak bizim çalışmamızda CsA, takrolimus, azathioprin ve MMF kullanımı ile HLA antikor gelişimi açısından herhangi bir farklılık ortaya konulamadı. Yapılan diğer bir çalışmada böbrek nakli sonrasında 3.ay protokol biyopsilerde subklinik rejeksiyon %45 saptanırken 1. yılda bu oran %25 oranında dikkati çekmiş ve her iki durumun artan HLA mismatch ile korele olduğu ortaya konmuştur (37). Böbrek hastalıklarının monitorizasyonunda kullanılabilecek belirteç sayısı sınırlıdır. Onlardan biri yakın zamanda nötrofillerden izole edilen ve biomarker olarak kabul edilen NGAL'dir (neutrophil gelatinase–associated lipocalin). NGAL diğer isimleri ile siderokalin ve/veya lipokalin-2, onkogen 24p3, renal epitelial hücreleri, nötrofiller ve böbrek proksimal tübülleri tarafından salgılanan proteindir (3). Akut böbrek yetmezliği, nefrotoksisitede, gecikmiş greft fonksiyonu gibi durumlarında yapılan hayvan deneyleri ve insanlarda yapılan klinik çalışmalar mevcuttur. Bununla beraber böbrek nakli sonrası NGAL'in rolü ile ilgili olarak çok az bilgi mevcuttur. Ayrıca

uzun dönem takiplerinde kullanılıp kullanılamayacağına dair yapılmış klinik çalışmalara dayalı kanıt ve oybirliği yoktur. NGAL kolayca idrarla atılmaktadır (4).

Kadavradan böbrek nakillerinde hem HLA doku uyumsuzluğu artmakta hem de iskemi reperfüzyon hasarı ve gecikmiş greft fonksiyonu nedeni ile immün duyarlaşma artmaktadır. Bizim çalışmamızda da kadavradan böbrek nakli de-novo anti-HLA antikor gelişimini artıran önemli bir risk olarak gözükmektedir. Bu durum kadavradan böbrek nakillerinin uzun dönem sonuçlarının canlı nakillerden neden daha olumsuz olduğunu da ortaya koymaktadır. Akut rejeksiyon de-novo anti- HLA antikor gelişiminde önemli bir risk faktörü olarak gözlenirken bu antikorların rejeksiyondan önce ortaya çıkması muhtemeldir.Uygulanan anti-rejeksiyon tedavisi sonrasında antikorların kaybolmaması uzun dönemde greft fonksiyonuna olumsuz yansımaktadır. Bu nedenle yapılan bir araştırmada rejeksiyon sonrasında rejeksiyonun yeterince etkin tedavi edilip edilmediğinin değerlendirmesinde anti-HLA antikor titrelerinin monitorizasyonunun önemli bilgiler verebileceği ileri sürülmektedir (38,39,40).

Bizim yaptığımız çalışmada NGAL'in ortalama değeri DSA negatif hastalarda 42.12 ve pozitif hasta gruplarında 64.27 olarak ölçülmüştür. Haase ve arkadaşlarının 2500 hastayı değerlendirdikleri bir çalışmanın meta-analizine göre NGAL'in akut böbrek yetmezliğinde erken bir belirteç olduğu doğrulanmıştır**.** Başlıca serumda ve idrarda ölçülen s-NGAL ve u-NGAL formları bilinmektedir. Mevcut çalışmalarda akut böbrek hasarında s-NGAL'in plazmada 7-16 kat ve idrarda u-NGAL'in 25 kat yükseldiği gösterilerek akut faz reaktanı olarak kabul edilmiştir. Ancak postoperatif dönemde anürik hastalarda yararsızdır. Kronik böbrek hastalıklarındaki progresyonu ile ilgili sınırlı bilgi mevcuttur (41). Bizim gözlemlerimize göre NGAL uzun dönemde akut böbrek yetmezliğindeki gibi yükselme göstermemektedir**.** Leblowska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada postoperatif 1.günde 398.9 $\pm$11.1 ng/mL postoperatif 10.günde 206 $\pm$90.2ng/mL olarak ölçülmüştür (12). Bizim çalışmamızda ortalama poztoperatif uzaklığı 29±21 ay olan hastalarda cut-off değeri 50 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Hastaları NGAL>50 DSA pozitif ve negatif, NGAL> 50 DSA pozitif ve negatif olarak değerlendirdiğimiz zaman NGAL >50 olan DSA pozitif hastalarda rejeksiyon oranı diğer hasta grubuna nazaran daha yüksek bulunmuştur. NGAL >50 ve <50 olan

kadavradan böbrek alıcılarında rejeksiyonun karşılaştırılmasında NGAL >50 olan hasta grubunda 10 hasta vardı ve 6 hastada (60%) rejeksiyon gözlendi, NGAL <50 olan hasta grubunda 1 rejeksiyon vardı (10%) *(p=0.001).* **Serum-NGAL'i rejeksiyon açısından değerlendiren benzer çalışmalar olmadığı için karşılaştırma yapılamadı.** Ancak Heyne ve arkadaşları u-NGAL'in rejeksiyonu diğer akut böbrek yetmezliğine neden olan patolojilerden (İlaç toksisitesi, hastalığın rekürrensi, bakterial ve/veya viral infeksiyon) ayırımında rolü olduğunu tespit etmişlerdir (42) .

Myshra ve arkadaşlarının renal transplant sonrası hastalarda protokol biyopsi uygulayıp NGAL ile boyama yöntemi ile yaptıkları bir çalışmada kadavradan alınan biyopsilerde boyanma daha yoğun olduğunu kaydetmişlerdir. Aynı şekilde boyanma yoğunluğu ile kreatinin arasında korelasyon izlenmiştir (43).

NGAL gecikmiş greft fonksiyonu olan hastalarda bakıldığında gecikmiş greft fonksiyonu olan 10 hasta vardı. Bu hastaların 8'de (80%) gecikmiş greft fonksiyonu izlenmiştir. Lee ve arkadaşlarının NGAL ve İnterleikin-18'in Gecikmiş greft fonksiyonu konusunda yaptığı karşılaştırmalı çalışmada NGAL'in gecikmiş greft fonksiyonun göstermede hassas ve interlökin-18 sınırlı olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada Parikh ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmanın sonucunda NGAL'in erken dönemde gecikmiş greft fonksiyonunda prediktif öneminin olduğunu göstermişlerdir(10).

Birçok literatür kaynaklarında kreatininin böbrek fonksiyonlarını göstermede güvenilir bir parametre olmadığından bahsedilmektedir. Serum kreatinin düzeyi maalesef renal transplant izleminde hasarın erken saptanmasında duyarlı bir yöntem değildir. Kronik hasar bulguları ciddi düzeye ulaştığında serum kreatinin düzeyi artmakta ve bu nedenle klinik takipte süregelen hasara yönelik yeterli bilgi vermemektedir. GFR'deki düşme kreatinin seviyesinde yükselme olmadan meydana gelmiş oluyor, yani kreatinin değerindeki değişiklikler yansımadan böbrek fonksiyonlarında zaten 40-50% kayıp olmaktadır (3,4,5,6). Ancak bizim yaptığımız çalışmada DSA pozitif ve negatif hastalarda eş zamanlı kreatinin değerleri ile korele olmuştur. DSA pozitif grupta ortalama kreatinin değeri 1.404 iken DSA negatif

grupta 1.140 idi. DSA pozitif hasta grubunda eş zamanlı olarak ölçülen kreatinin değerleri negatif gruba nazaran daha yüksek olarak ölçülmüştür (*p=0.03).*

DSA pozitif ve negatif gruplarda eş zamanlı MDRD-GFR incelendi. DSA pozitif hasta grubunda eş zamanlı MDRD-GFR 23.83 DSA negatif hastalarda 51.82 olarak hesaplandı. DSA pozitif hastalarda MDRD-GFR değerleri DSA negatif hastalara göre daha düşük olarak hesaplandı. *(p=0.001).* MDRD-GFR'nin zamana karşı kıyaslandığında DSA pozitif hastalarda düşme , oysa ki DSA negatif hastalarda yükselme görülmüştür. 1.ayda fark olmamakla beraber 6.ay ve 1.yılda fark vardır *(p<0.05).*

NGAL gruplarında eş zamanlı kreatinin karşılaştırılmasında NGAL <50 olan hastalarda kreatinin 1.12 iken NGAL >50 olan alıcılarda eş zamanlı ölçülen kreatinin 1.40 idi. NGAL >50 olan alıcılarda eş zamalı ölçülen kreatinin değerleri NGAL<50 olan hastalara göre daha yüksek bulunmuştur (*p=0.001*). Rahimzadeh ve arkadaşlarının yaptığı 27 hastalık çalışmada postoperatif erken dönemde hastaları 2 gruba ayırarak eş zamanlı kreatinin ve NGAL bakılmıştır. Birinci grupta postoperatif erken dönemde kreatinin seviyesi >50% üstünde düşme göstermiştir. İkinci grupta kreatinin değeri <50% düşme göstermiştir. Hasta kısıtlılığı nedeniyle tam istatistik sonuçlar alınamamıştır, ancak değerlendirilebildiği kadarıyla kreatinin değeri yavaş düşen grupta NGAL seviyesi daha yüksek bulunmuştur (43). Malyzsko ve arkadaşlarının yaptığı retrospektif çalışmada böbrek nakli operasyonu geçirmiş hastalarda NGAL'in kreatinin ile korele olarak bulunmuştur (10**).** NGAL >50 ve <50 olan hastalarda kreatininin zamanla progresyonunda NGAL>50 olan hastalarda kreatininin zamanla düşme oranı daha düşüktür. Benzer şekilde 1.ayda fark olmakla beraber 6.ay ve 1.yılda fark olmuştur *(p<0.05).*

NGAL gruplarında eş zamanlı eGFR-MDRD karşılaştırılmasında NGAL >50 olan alıcılarda eş zamanlı ölçülen MDRD-GFR değerleri NGAL<50 olan hastalara göre daha düşük bulunmuştur *(p=0.001).* Malyzsko ve arkadaşlarının yaptığı retrospektif çalışmada böbrek nakli operasyonu geçirmiş hastalarda NGAL'in MDRD-GFR ile korele olduğu görülmüştür. Örneğin 2. derecede kronik böbrek yetmezliği olan (eGFR 90-60 mL/dak) NGAL'in ortalama değerleri 100 $\pm$36.76 iken, 3.derecede (eGFR 60-30 mL/dak) 140 $\pm$47.54 olarak ölçülmüştür *(p<0.001)* (10).

NGAL'in tek başına yükselmesi böbrek hasarının bir göstergesi değildir, çünkü NGAL aynı zamanda bir akut faz reaktanıdır ve sitokinlerin yükselmesi ile yükselebilir. NGAL'in fonksiyonu tam olarak anlaşılmamış olsada bu konuda çalışmalar devam etmektedir (44).

Böbrek nakli ameliyatı sonrası hastalarda s-NGAL'in rejeksiyon açısından prediktif rolünü araştırmak amaçlı yaptığımız çalışmada renal transplant hastaların postoperatif takibinde s-NGAL'in yüksek olması hem DSA pozitifliği hem de rejeksiyon açısından anlamlı olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra s-NGAL'in klinikte rutin olarak kullanılan kreatinin, e-GFR-MDRD ve biopsi ile korelasyonu gösterilmiştir. Bu konuda dünyada araştırmalar halen devam etmektedir ve ileri çalışmalara gereksinim vardır.

6. ÖZET

DONÖR SPESİFİK ANTİKOR POZİTİF VE NEGATİF RENAL TRANSPLANT ALICILARINDA NGAL'İN (NEUTROPHİL GELATİNASE ASSOCİATED LİPOCALİN) REJEKSİYON AÇISINDAN DİYAGNOSTİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI.

Renal transplantasyon sonrasında greft kaybının en önemli nedeni kronik allogreft nefropatidir (KAN). KAN gelişiminde immünolojik ve immünolojik olmayan faktörler rol oynar. İmmünolojik faktörlerin başında de novo oluşan anti-HLA antikorları ve buna bağlı kronik immün hasar gelmektedir. Bu çalışmaya renal transplantasyon sonrasında halen izlemde olan ve posttranplant dönemde DSA (donör spesifik antikor) gelişen hastalar çalışmaya alınmıştır. NGAL (neutrophil gelatinase–associated lipocalin) son zamanlarda araştırılmaya başlanan biomarkerlardan biridir. Akut böbrek hasarı, akut böbrek yetmezliği, gecikmiş greft fonksiyonu, İgA nefropatisi gibi durumlarda diagnostik değeri yaygın olarak araştırılmıştır. Kronik süreçte takip için kullanılabileceği yönünde çok veri yoktur (5).

Biz bu çalışmamızda, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Transplantasyon Ünitesinde 2006 ile 2010 yılları arasında böbrek nakli operasyonu geçiren, daha sonra transplantasyon polikliniğinde takip edilen hastaların Donör spesifik antikor (DSA) pozitif ve donör spesifik antikor negatif hastalarda NGAL'in rejeksiyon açısından prediktif önemini araştırmayı amaçladık. Toplam 90 (63 E, 27 K) hasta analiz edildi. 70 canlıdan ve 20 kadavradan renal

transplantasyon yapılan hataların posttransplant takip süreleri 38±31 ay idi. Ortalama mismatch sayısı 2.8 ±1.4 olup ortalama kreatinin düzeyi 1.2±0.4 mg/dl, tahmini glomeruler filtrasyon hızı 68±19 ml/dk, biyopsi kanıtlı akut rejeksiyon %15.2 ve donör yaş ortalaması 45±14 idi. Yapılan incelemede toplam 20 hastada DSA antikor varlığı ortaya kondu (%22) .

NGAL'in cut-off değeri 50 ng/ml idi. DSA pozitif olan grupla olmayan grup değerlendirildiğinde sırasıyla ; NGAL ortalaması 62.04 ve 43.23, ve tahmini e-GFR 51.82±26 ile 23.03±18 ml/dk (p=0.001), akut rejeksiyon 10/20 (%50) ve 8/70

(%10.1) ,(p=0.005), olarak saptandı. Çalışmanın sonucunda DSA pozitif renal tranplant hastaların uzun dönem takiplerinde NGAL'in şuan için kullanılmakta olan kreatinin, eGFR-MDRD , biopsi ile korele olduğunu gördük.

Anahtar kelimeler: Böbrek transplantasyonu,DSA (donör spesifik anikor), rejeksiyon, NGAL

7. SUMMARY

(THE PREDİCTİVE ROLE OF NGAL (NEUTROPHİL GELATİNASE ASSOCİATED LİPOCAL İN DONOR SPESİFİC ANTİBODY POZİTİF AND NEGATİF RENAL TRANSPLANT PATİENTS.

The most important cause of graft loss after renal transplantation is chronic allograft nephropathy (KAN). Immunological and non-immunological factors play a role in the development of chronic allograft rejection. Immunological factors are de novo anti-HLA antibodies and related chronic immune damage . This study include patiens after renal transplantation in whom the DSA (donor-specific antibody) were developed in posttranplantation period. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) has recently begun investigating one of the biomarkers. Acute kidney injury, acute renal failure, delayed graft function on, the diagnostic value of IgA nephropathy is widely investigated in such cases. Chronic process, there is no more data to be used for follow-up (5).İn this study we aimed to investigate positive predictive value in terms of rejection and donor-specific antibody (DSA) positif and negative patients, to assess the importance of NGAL of renal transplant patients underwent kidney transplant and followed-up in Ankara University Faculty of Medicine Transplantation Unit between in 2006 and 2010 years. 90 patients were analyzed. 70 living, and 20 cadaver renal transplant follow-up period was 38 ± 31 months posttransplant were mistakes made. Average number of mismatch and the mean creatinine level of 2.8 ± 1.4, 1.2 ± 0.4 mg / dL, estimated glomerular filtration rate 68 ± 19 ml / min, biopsy proven acute rejection was 15.2% and the donor mean age of 45 ± 14. DSA The examination of the total of 20 patients revealed the presence of antibodies (22%). Cut-off value of NGAL was 50 ng / ml. DSA group were evaluated with a positive group, average NGAL was 62.04 and 43.23 respectively, and estimated GFR 51.82 ± 26 and 23.03 ± 18 ml / min (p = 0.001) as well, acute rejection, 10/20 (50%) and 8/70 (10.1%) $p = 0.005$, respectively. DSA as a result of the study, patients with a positive long-term follow-up of renal tranplant using in units for now that NGAL were correlated with creatinine, eGFR-MDRD, closely biopsy.

Key words: renal transplantation, DSA (donor spesific antibody), rejection, NGAL.

8. KAYNAKLAR

1. Danovitch MG. Options for patients with end-stage renal desease. İn: Danovitch MG, Eds. Handbook of Kidney Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003; 27: 17-110
2. Heering P, Degenhardt S, Grabense B, Tubuler dysfunction following kidney tranplantation. Nephron 1996; 73: 501-511
3. Malyszko J,Malyszko JS, Mysliwiec M. Serum neutrophil gelatinase associated lipocalin correlates with kidney function in renal allogreft recipients. Clin Transplant 2009; 23: 681-686
4. Halawa A. The early diagnosis of acute renal greft dysfunction: A challenge we face. The role of novel biomarkers. Ann Transplant 2011; 16: 90-98
5. Lee Y, Kim M, Park Y. Serum Neutrophil Gelatinase associated Lipocalin and İnterleukin -18 as Predictive Biomarker for Delayed Greft Function after Kidney Transplantation. Journal of Clinical Analysis 2012; 42: 295-301
6. Mishra J, Qing M . Kelly C, Mitsnefes M, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Kidney NGAL is novel early marker of acute injury following transplantation. Pediatr Nephrol 2010; 21: 856–863
7. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. Transplantation 2008; 86: 377-83
8. Genç R. Organ transplantation surgery in Turkey and in the world: The management of transplantation logistics. National Journal of Surgery 2009; 25: 40-44
9. KılıçarslanT, Şentürk H, Çalışkan Ç, Gültekin M. Flow Cytometry Monitoring of Donor Specific Antibodies after Kidney Transplantation 2010; 10: 94-101
10. Kalathil K, Sureshkumar K, Sabiha M, Hussain N, Barbara J Carpenter, Stephen E Sandroni & Richard J Marcus. Antibody-mediated rejection following renal transplantation. Expert Opin. Pharmacother 2007; 8: 913-921
11. Heyne N, Kemmer S, Schneider C, Nadalin S. Urinary Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Detects Acute Allograft Rejection Among Other Causes of

Acute Kidney İnjury in Renal Allograf Recipients. Clinical And Transplantation Research 2012; 93: 1253-57

12. Nils E, Magnusson, Mads Hornum, Jorgensen K, Jesper Melchior H, Bistrup C, Bo Feldt-Rasmussen, Flyvbjerg A. Plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) is associated with kidney function in uraemic patients before and after kidney transplantation. BMC Nephrology 2012; 32: 8-13

13. Leblowska U, Malyzsko J, Leblowska A, Kowalewska R. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin and Cystatin C could predict Renal Outcome in Patiens undergoing Kidney Allograft Transplantation: Prospective Study. Transplantation proceeding 2009; 41: 154-157

14. Wyburn K, Jose R, Wu H. The role of macrophages in allogreft rejection. Transplantation 2005; 80: 1641-1652

15. Schnitzler MA, Hollenbeak CS, Cohen DS, et al. The economic implications of HLA matching in cadaveric renal transplantation. N Engl J Med 2000; 341:1440-46

16. Pratt, JR, Basheer, SA, Sacks, SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. National Med 2002; 8: 582-91.

17. Karuppan S, Olhman S, Moller E. Occurrence of cytotoxic and noncomplement fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection

18. Gloor J, Cosio F, Lagerb D. J and. Stegallc M. D. The Spectrum of Antibody-Mediated Renal Allograft Injury: Implications for Treatment. American Journal of Transplantation 2008; 8: 1367–73

19. Liu, Z, Colovai, AI, Tugulea, S, et al. Indirect recognition of donör HLA-DR peptides in organ allogreft rejection. J Clin Invest 1996; 98: 1150-63.

20. Kreisel, D, Krupnick, AS, Gelman, AE, et al. Non-hematopoietic allogreft cells directly activate CD8+ T hücres and trigger acute rejection: An alternative mechanism of allorekognizasyon. National Med 2002; 8: 233-45

21. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, Pratschke J, Rudolph B, Schmidt D, Salama A, Schönemann C. Anti-human leukocyte antigen

and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. Transplantation 2009; 87(10):1505-13

22. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fungs CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. N Engl J Med 2003; 349: 2326-33

23. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney International 1999; 55: 713–723

24. Hata Y, Cecka JM, Takemoto S. Effects of changes in the criteria fornationally shared kidney transplants for HLA-matched patients. Transplantation 1998; 65: 208-212

25. Leffell MS, Zachary AA. The national impact of the 1995 changes to the UNOS renal allocation system. United Network for Organ Sharing. Clin Transplant 1999; 13: 287-295

26. Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. Lancet 1999; 354:1147-52.

27. Sumittran-Karuppan S. The clinical importance of choosing the right assay for the detection of HLA-specific donör reactive antibodies. Transplantation 1999; 68: 502-509.

28. Taylor CJ, Smith SI, Morgan CH. Selective omission of the donor crossmatch before renal transplantation: efficacy, safety and effects on cold storage time. Transplantation 2000; 69: 719-723

29. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. N Engl J Med. 2001; 349: 2326-33

30. Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DR, Cheung E, Allen RD, O'Connell PJ, Chapman Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome JR Transplantation 2001; 71: 515-23

31. Gupta A, Iveson V, Varagunam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant? Transplantation; 2008; 85: 1200-4

32. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. Transplantation; 2003; 75: 1034-40

33. Rush D, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, Trpkov K, Solez K, Jeffery J. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study Department of Medicine, Health Sciences Centre and University of Manitoba, J Am Soc Nephrol. 1998; 9: 2129-34

34. Moreso F, Serón D, Carrera M, Gil-Vernet S, Cruzado JM, Hueso M, Fulladosa X, Ramos R, Iber M, Castelao AM, Grinyó JM. Baseline immunosuppression is associated with histological findings in early protocol biopsie; Transplantation. 2004; 78: 1064-8. 34

35. Rowshani AT, Scholten EM, Bemelman F, Eikmans M, Idu M, Roos-van Groningen MC. No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year. J Am Soc Nephrol. 2006; 17: 305-12.

36. Eng H.S , Bennett G, Bardy P, Coghlan P, Graeme R. Russ P. Toby H. Coates Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: Enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools Human Immunology 2009; 70: 595–599

37. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, Farrell ML, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB, Saidman SL. Acute humoral rejection in renal allogreft recipients: Incidence, serology and clinical characteristics; Transplantation 2001; 71: 652-8

38. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney greft survival. Am J Transplant 2007; 7: 408-15

39. Xiaobei Li, Ishida H, Yamaguchi Y, Tanabe K. Poor greft outcome in recipients with de novo donör-specific anti-HLA antibodies after living related kidney transplantation Transplant International 2008; 5:1145-1152

40. Thielke. J, Patricia M, West-Thielke M, Heather L. Herren, Bareato U, Ommert T, Vidanovic V, Sally A, Campbell-Lee, Ivo G. Tzvetanov, Howard N. Sankary. Living Donor Kidney Transplantation Across Positive Crossmatch: The University of Illinois at Chicago Experience. Transplantation 2009; 87: 115-129

41. 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 greft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. Transplantation; 2001; 71: 1106-12.

42. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. Transplantation; 2004; 78: 242-9

43. Allan D. Kirk, Eric A. Immunology of Transplantation. İn: Jeffrey A, Barie S, Bollinger R, Chang A, eds. Surgery: Basic Science and Clinical Evidence. New York: Springer 2010; 9: 10-110

44. Rahimzadeh N, Otukesh H, Hoseini R, Sorkhi H, Otukesh M, Hoseini S . Are serum and urine neutrophil gelatinaseassociated lipocalin predictive of renal graft function in short term. Pediatric Transplantation 2012; 16: 796–802