

Karaciğer veya Böbrek Transplantasyonu Olan Hastalarda HLA Klas II ve HLA-G İlişkisi

B. Baştürk¹, A. Haberal², D. Bal², F. Koçer², H. Karakayalı³, M. Haberal³

Özet

Amaç: İmmün sistemin hastalıklara karşı cevabında önemli rol oynayan insan lökosit antijenleri transplantasyonda dokunun kabulünde veya reddedilmesinde etki eden en önemli faktörlerden birisidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar HLA-G molekülünün toleransla ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada klasik HLA molekülleri ile HLA klas I molekülleri içinde yer alan ve klasik olmayan HLA-G molekülünün ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmaya karaciğer veya böbrek transplantasyonu olmuş 40 hasta alındı. Hastaların doku grupları PCR-SSP yöntemi belirlendi. HLA-G serum seviyeleri ELIZA yöntemi ölçüldü. İstatistiksel değerlendirmelerde ki kare testi kullanıldı.

Sonuçlar: Serumda solubl HLA-G seviyeleri ölçülen 40 hastadan HLA-G serum seviyesi düşük bulunan 13 hastanın (%32) 7'sinde (%53.8) HLA DRB1 *11 allel varlığı, 5 hastada (%38.4) HLA DRB1 *04 allel varlığı saptandı.

Yorum: Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde HLA DRB1 *11 allel sıklığı ile sHLA-G serum seviyesi düşüklüğü arasında ilişki olduğu saptandı. Bu ilişkinin bilinmesi DRB1 *11 alleli taşıyan kişilerin immün toleransının daha az olabileceğini ve DRB1 *11 alleli ile birlikteliği sık görülen hastalıklara karşı, transplantasyon hastalarında, otoimmün hastalıklarda ve malign hastalıklarda immün sistem cevabının önceden bilinmesini sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: HLA-G, HLA-DR, transplantasyon

Summary

HLA-G associated with HLA-Class II antigens in liver and kidney transplant patients

Background: Recent studies suggest that the immunogenicity of human leucocyte antigen (HLA) incompatibility should be considered in the context of the HLA phenotype of the recipient. The HLA DR phenotype of the responder is thought to be predictive of the strength of the alloimmune response. The HLA-G molecule, a nonclassic MHC class I antigen, exhibits limited tissue distribution and exerts multiple immunoregulatory functions.

Aim: We sought to analyze the correlation between soluble HLA-G levels and the HLA-DR phenotype by studying 40 liver/kidney transplant patients. sHLA-G levels were measured with ELISA, and HLA-DR phenotyping was performed using a standard PCR-SSP method.

Results: sHLA-G levels decreased in 13 of 40 patients (32%), 7 of them (53.8%) carried the HLA DRB1 *11 (DR5) antigen, and 5 of them (38.4%) carried the HLA-DRB1 *04 antigen. When patients with increased levels of sHLA-G were examined, it was found that only 3 of them (11.1%) carried the HLA DRB1 *11 (DR 5) antigen.

Discussion: We found a positive correlation between presence of the HLA DRB1 *11 (DR5) antigen and decreased levels of sHLA-G. Patients with the HLA DRB1 *11 (DR5) antigen had decreased immune functioning. Testing for this phenotype may be a positive indicator for progression of autoimmune diseases, malignancies, and rejection risk in transplantation.

Key words: HLA-G, HLA-DR, transplantation

Giriş

İnsan lökosit antijenlerinin (HLA) alıcı ile verici arasındaki uyumu nakledilen dokunun yaşamasındaki en önemli faktördür. İstenilen tam uyumlu vericinin bulunabilmesi mümkün olmasına rağmen, HLA sistemindeki polimorfik bölgelerin çok fazla olması nedeni ile Eurotransplant listesindeki hastaların sadece %22'sine HLA uyumu tam olan verici bulunabilmektedir. Hastaların büyük çoğunluğu bir veya daha fazla uyumsuz HLA grupları olan vericilerden organ almaktadır. Yapılan çalışmalar canlı vericiden alınan dokuda tek bir HLA-A, B veya DR antijeninin uyumsuzluğunun kabul edilebilir olduğunu ve tam uyumlu nakillerle arasında greftin yaşam şansı açısından bir fark olmadığını göstermiştir (2). Greftin reddedilmesinde rol oynayan akut ve akselere reaksiyonlar crossmatch çalışmaları ile saptanabilir. Kronik ve geç dönem humoral reaksiyonlarda rol oynayan mekanizma ise alıcının antijen sunan hücreleri yüzeyinde bulunan klas II molekülleri ile vericinin HLA antijenlerinin CD4+ T hücrelerine sunulması ve bu antijenlere karşı B hücrelerinden IgG tipi antikor üretiminin oluşması ile meydana gelir (3, 4). Bu etkileri nedeni ile HLA molekülleri, özellikle HLA DR fenotipi, oluşabilecek humoral alloimmün cevabın önceden bilinmesini sağlayabilir.

HLA klas I molekülleri hücre yüzeyinde veya solubl halde dolaşımda bulunan glikoprotein yapıları moleküllerdir. HLA klas I molekül grubu içinde yer alan, polimorfik bölgelerinin azlığı ve farklı etkileri ile klas I grubunun diğer elemanlarından farklı olan HLA-G molekülünün, bilinen, 4 tane (G1, G2, G3, G4) membrana bağlı (5), 3 tane (G5, G6, G7) solubl formu vardır (6). HLA-G molekülü ilk olarak HLA A ve B molekül ekspresyonunun bozuk olduğu ekstra villoz trofoblastlarda gösterilmiştir. Ekstra villoz trofoblastlarda bulunan bu molekülün fetus ile anne arasındaki toleranstan sorumlu olduğu düşünülmektedir (7). HLA-G molekülünün potansiyel immünosupresif etkisi CD8+ sitotoksik hücreleri, CD4+ T hücre proliferasyonunu ve antijen spesifik sitotoksik cevabını inhibe etmesi ile oluşmaktadır (8, 9). HLA-G molekülünün doğal öldürücü hücreler üzerinde de onların sitotoksitelerini inhibe edici etkileri vardır (10).

Bu çalışma toleran etkili HLA-G molekülü serum seviyesi ile HLA klas II molekülleri arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla planlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmaya karaciğer veya böbrek nakli olmuş 40 hasta alınmıştır. Hastalardan alınan kan örneklerinden elde edilen lenfositlerden genomik DNA izolasyonu yapıldı (Macherey Nagel, Almanya). Elde edilen DNA örnekleri sekans spesifik primerler (One Lambda, USA) kullanılarak polimerize zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltıldı ve etidyum bromid ile boyanarak %2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemi ile ilerletildi. Ultraviyole ışık altında pozitif bantlar saptandı ve yazılım programında değerlendirilerek HLA klas II grupları belirlendi. Hastaların solubl HLA-G serum seviyeleri nakil öncesi, 15. gün ve 30. gün olmak üzere toplam 3 kez ELIZA yöntemi ile (Exbio, Prag) çalışıldı ve 450 nm dalga boyundaki spektrofotometrede ölçüldü.

Sonuçlar

Karaciğer veya böbrek nakli olmuş 40 hastadan toplam 120 serum örneğinde HLA-G serum seviyesi ölçüldü. 13 hastada (%32.4) transplantasyon öncesi, 15.gün ve 30. gün HLA-G ölçüm değerleri sıfır bulundu. Her üç ölçümü de sıfır olan bu hastaların 7 tanesinin (%53.8) HLA DRB1 *11 (DR 5) grubunda olduğu, HLA-G serum seviyeleri yüksek olan hasta grubunda ise sadece 3 hastanın (%11.1) HLA DRB1 11 (DR 5), grubunda olduğu saptandı. Sonuçlar istatistiksel olarak Fisher exact testi kullanılarak değerlendirildiğinde χ^2 değeri 6.42, p:0.0065, OR:9.33 güvenlik aralığı 1.49<OR< 67.16 olarak belirlendi.

Yorum

Fetusta veya vericide aynı HLA uyumsuzluğu bulunan hamilelerin veya transplantasyon hastalarının sadece bir kısmında humoral immün yanıt geliştiği gözlenmiştir (2, 11). Yapılan çalışmalar alıcının HLA DR antijenlerinin, HLA klas I uyumsuzluğuna karşı oluşan immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rolü olduğunu göstermektedir (12,13). Marlies ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bazı klas II grup-

ları ile sunulan HLA klas I antijenlerine karşı antikor oluşumu riskinin daha fazla olduğu, örneğin; DR 4 grubunda olanların klas I grubundan A3, B5, B7, B8, B12'ye karşı, DR 5 grubunda olanların A11'e karşı artmış sıklıkla antikor ürettiği bildirilmiştir (14). HLA-G molekülü immünotolerogenik fonksiyonu nedeni ile nakledilen dokunun kabulünde etkin rol oynayabilir. Yapılan çalışmalar HLA-G molekülünün greftde ekspresyonunun saptanması ile rejeksiyon riskinin azaldığını göstermiştir (15). Bu etkileri doğal öldürücü hücrelerin sitotoksitesini azaltmasına ve migratuvar fonksiyonları inhibe etmesine bağlı olarak meydana gelir. Antijen sunan hücrelerin fonksiyonel gelişmesini baskılayarak greftin yaşam süresini uzatır (16). HLA-G, tolerogenik etkisini, hem hücresel hem humoral sistem üzerinde göstermektedir.

Bizim çalışmamızda değerlendirmeye alınan 40 hastanın nakil öncesi, nakil sonrası 15. günde ve 30. günlerde yapılan sHLA-G serum seviyesi ölçümlerinde 13 hastanın sHLA-G seviyelerinin her üç ölçümde de hiç yükselmediği ve 0 ünite/ml seviyesinde kaldığı ve bu 13 hastanın 7'sinin HLA DRB1 11 (DR 5) grubunda olduğu saptanmıştır. Serum sHLA-G seviyesinde artış tespit edilen hasta grubu ile karşılaştırıldığında bu birlikteliğin 9.33 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Çalışma grubumuzdaki hastaların serum HLA-G seviyelerinin düşük seviyede tespit edilmesi, DR 5 varlığında, HLA klas-I A11 antijenine karşı antikor yanıtı oluşumuna benzer şekilde, HLA-G antijenine karşı artmış antikor üretimine bağlı olabilir. HLA-G molekülüne karşı oluşan antikor ile sHLA-G antijeni birleşerek serbest halde dolaşan antijen sayısının azalmasına ve ELIZA yöntemi ile saptanamamasına neden olabilir.

Tolerojenik etkili HLA-G antijeninin serum seviyesinin düşüklüğü ile birlikteliği sık görülen DR5 grubu varlığının bilinmesi transplantasyon hastalarında, otoimmün hastalıklarda, malign hastalıklarda ve DR5 grubu ile ilişkili hastalıklarda prognozunun tahmininde de rol oynayacaktır. Nakil öncesi alıcıların ve vericilerin doku gruplarının bilinmesi hem hücresel hem de, belli doku gruplarına karşı artmış antikor yanıtının desteklediği, humoral rejeksiyon riskinin azaltılabilmesini sağlayacaktır. HLA-G'ye karşı oluşmuş antikor varlığının gösterilmesi çalışmanın sonuçlarını destekleyecektir.

Literatür taramalarımıza göre non-klasik bir molekül olan HLA-G ile HLA klas II ilişkisini değerlendirmek amacıyla yapılmış olan bu ilk çalışmanın sonuçları belli klas-II grubunda olan kişilerin immün toleransının daha az olabileceğini göstermektedir. Bu hastalarda daha sık aralıklarla takip ve farklı tedavi protokollerinin uygulanması beklenen risklerin azaltılmasını sağlayabilir.

Kaynaklar

1. Persijn G.G., Smits J.M.A., Smith M., Frei U. Five-year experience with the new Eurotransplant kidney allocation system, 1996 to 2001. *Transplant Proc* 2002; 34: 3072-3074
2. Maruya E, Takemoto S, Terasaki PI: HLA matching: identification of permissible HLA mismatches. In Terasaki PI, Cecka JM (eds.): *Clinical Transplants*. Los Angeles, CA: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1993
3. Suciu-Foca N., Liu Z., Harris P.E., Reed E., Cohen D.J., Benstein J.A., Benvenisty A.I., et al. Indirect recognition of native HLA alloantigens and B-cell help. *Transplant Proc* 1995; 27: 455-456
4. Papassavas A.C., Barnardo M.C, Bunce M., Welsh K.I. Is there MHC class II restriction of the response to MHC class I in transplant patients? *Transplantation*. 2002; 73: 642-651.
5. Ishitani A, Geraghty DE. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89: 3947-3951
6. Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Quiles RM, Bermond F, Dausset J, Carosella ED. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol*. 2000; 61:1138-1149
7. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;21:11520-11525.
8. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol*. 1999;8: 1351-1356.
9. Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol*. 2000;1:17-26.
10. Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol*. 2001;8: 5018-5026.

11. Dankers M.K.A, Roelen D.L, Korfage N., P. de Lange, Witvliet M.D, Sandkuijl L, Doxiadis I.I.N, Claas F.H.J. Differential immunogenicity of paternal HLA class I antigens in pregnant women. *Hum Immunol.* 2003;64: 600-606
12. Fuller T.C., Fuller A. The humoral immune response against an HLA class I allodeterminant correlates with the HLA-DR phenotype of the responder. *Transplantation* 68 (1999), p. 173-182
13. Cook D.J, Cecka J.M, Terasaki P.I. HLA-DR1 recipients have the highest kidney transplant survival. *Transplant Proc.*1987; 187: 675-677
14. Dankers MK, Roelen DL, Nagelkerke NJ, de Lange P, Persijn GG, Doxiadis II, Claas FH. The HLA-DR phenotype of the responder is predictive of humoral response against HLA class I antigens. *Hum Immunol.* 2004; 65:13-19
15. Creput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J, Charpentier B, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol.* 2003;4:587-594.
16. Horuzsko A, Lenfant F, Munn DH, Mellor AL. Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. *Int Immunol.* 2001;13: 385-94.