

HLA-DP Uyumsuzluğuna Bağlı Mikst Lenfosit Kültür Testindeki Pozitiflik

Positive Mixed lymphocyte Culture Test Result Due to HLA-DP Mismatch

Tülay Kılıçaslan Ayna¹, Hilmi Tozkır², Hayriye Şentürk Çiftçi¹, Hakan Gürkan², Emre Tekgündüz³, Çetin Algüneş², Mehmet Gürtekin¹, Mahmut Çarın¹

¹İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

³Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Edirne, Türkiye

ÖZET

Graft Versus Host Hastalığı (GVHH) allojenik kök hücre nakli (KHN) sırasında halen önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Mikst lenfosit kültür (MLC-Karışık Lenfosit Kültür) testi, genellikle HLA- D bölge uyumunu saptayan standart bir test olarak kabul edilir. Bu çalışmada allojenik KHN'ne hazırlanan ve HLA-A, -B, -Cw, -DR, -DQ lokusları uyumlu ve -DP lokusu uyumsuz olan akraba hasta-verici çiftine MLC testi yapılmıştır. Test sonucu pozitif olarak saptanmış ve HLA-DP farklılığının MLC testindeki proliferasyon değerlerindeki artışlardan sorumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Mikst lenfosit kültürü, HLA-DP, kök hücre nakli

Geliş tarihi: 16.06.2009

Kabul tarihi: 18.08.2009

ABSTRACT

Graft Versus Host Disease (GVHD) remains a major cause of morbidity and mortality in allogeneic stem cell transplantation (SCT). The MLC assay has been generally accepted as a standard test for determining HLA-D region compatibility. In this study, the MLC test has been carried out on the related recipient-donor couple who were prepared for allogeneic SCT and were found to be matched for HLA-A, -B, -Cw, DR, DQ but not for -DP. The result of the MLC test was positive. We observed that HLA-DP mismatch was responsible for the increased proliferation values in MLC test.

Key Words: Mixed lymphocyte culture, HLA-DP, stem cell transplantation

Received: 16.06.2009

Accepted: 18.08.2009

1960'lı yıllardan beri KHN birçok hematolojik hastalığın tedavisinde artan sıklıkta kullanılmaktadır (1). KHN sırasında transfüze edilen kök hücreler otolog veya allojenik (İnsan Lökosit Antijenleri-Human Leukocytes Antigen-HLA) uyumlu kardeşler, akraba olmayan vericiler ve kordon kanı kaynaklardan elde edilmektedir. Bu kaynaklardan en çok kullanılan ve çoğu endikasyonda en başarılı olanı HLA tam uyumlu kardeşlerden yapılandır (1, 2). GVHH graftta bulunan immünokompetan T lenfositlerinin konağın dokularına karşı reaktivite kazanması sonucu oluşur. KHN'deki başarının artmasında, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi yanında hasta ve vericinin HLA uygunluklarını saptamak amacıyla yapılan çeşitli moleküler testler de önemli yer tutmaktadır (1, 3). HLA (sınıf I ve sınıf II) antijenlerini belirlemede başlangıçta serolojik yöntemler kullanılırken, teknolojik gelişmeler neticesinde günümüzde moleküler yöntemler tercih edilmektedir (4). MLC ise, hasta ve verici arasındaki özellikle HLA-sınıf II (HLA-D) antijenlerinin uygunluğunda hücrel bağışık yanıtın ölçülmesinde kullanılan bir test yöntemidir. Genetik açıdan birbirinden farklı kişilerin lenfositleri *in vitro* karşılaştırıldığında, lenfosit yüzeyinde ifade edilen HLA-D grubu antijenleri diğer lenfosit grubunda DNA sentezini uyarmaktadır. DNA sentezindeki artış, hasta ile verici arasındaki uyumsuzluğun derecesi ile orantılıdır (5). HLA-D bölgesi DR, DQ ve DP, olmak üzere 3 önemli alt bölgeye ayrılmaktadır. Sınıf II molekülleri α ve β polipeptit zincirlerinin

birlikte oluşturduğu moleküllerdir. DR bölgesi sadece bir α zincir genini kapsar (DRA). Buna karşılık bazıları fonksiyonel olan (DRB1, 3, 4 ve 5), bazıları fonksiyonel olmayan (DRB2, 6, 7, 8, 9) β zincir geni vardır (DRB). Fonksiyonel olan DRB1 genlerinin her biri farklı β zincirini kodlar. DQ bölgesinde hem α , hem de β zincirleri polimorfiktir. DP bölgesinde ise, DP α zinciri düşük polimorfizm gösterirken, DP β zinciri büyük oranda polimorfiktir (6). Çalışmamızda, Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu- PCR)-Sequence Specific Primers (Diziye Özgü Primerler-SSP) yöntemi ile DP allel uyumsuzluğu MLC pozitifliği tespit ettiğimiz bir akraba hasta-verici çifti sunulmaktadır.

Olgu Sunumu

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) nedeniyle tedavi edilmekte olan 52 yaşında bir erkek hasta ile 49 yaşında olan erkek kardeşinin HLA uyumu araştırılmıştır. Hasta ve vericinin HLA doku tiplemesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.'nda belirlenmiştir. Her birinden EDTA'lı tüpe 5 cc periferik venöz kan alınarak QIAMP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Cat. No:51104) ile DNA izolasyonları yapılmıştır. HLA- A, -B, -Cw, -DRB, -DQB ve -DPB lokuslarının genotiplendirmesinde düşük rezolüsyonlu Olerup SSP A,B, Cw, DR, DQ, DP SSP Combi Tray, Lot. No.: V99) kiti kullanılmıştır. Amplifikasyon-

da GeneAmp PCR Sistem 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California) kullanılarak; 1 siklus 94°C'de 2 dak., 10 siklus 94°C'de 10 sn., 65°C'de 1 dak., 20 siklus 94°C'de 10 sn., 61°C'de 50 sn., 72°C'de 30 sn. ve (+) 4°C'de sonsuz PCR programı uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünlerine %0.5 TBE ile %2 agaroz jelde, 160 volt, 450 amp., 10 dakika elektroforez uygulanmıştır. Daha sonra UV. transilluminatör yardımı ile agaroz jel değerlendirilerek amplifikasyon gerçekleşen kuyucuklar belirlenmiş ve Score bilgisayar yazılım programında değerlendirilmiştir. Hastanın HLA allelleri; A*02, 03, B*27, 35, Cw*02, 07, DRB1*01, 16, DQB1*05, 05 ve DPB1*0201, 0401 olarak saptanırken, vericinin HLA allellerinin A*02, 03, B*27, 35, Cw*02, 07, DRB1*01, 16, DQB1*05, 05 ve DPB1*0401, 0402 olduğu belirlenmiştir.

Hasta ve verici çiftine İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda MLC testi uygulanmıştır. Test için, hasta ve vericiden lityum heparinli tüpe 8 cc periferik venöz kan alınarak lenfositler Ficoll-hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ) gradient tekniği ile izole edilmiştir. Elde edilen lenfositler RPMI 1640 (glutaminli, hepesli, Sigma-50 u/ml penisilin ve 50 µg/ml streptomisin) ile üç kez yıkandıktan sonra hücreler RPMI 1640 ve insan serumu (9:1) içeren medyuma 1×10⁶ olacak şekilde sayılmıştır. Hasta hücreleri 5000 rad'da (cGy) ışınlanmıştır. Hücreler 96 kuyulu plaklarda 96 saat 37°C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edildikten sonra, her bir kuyuya ³H Thymidine koyulmuş ve 16 -18 saat sonra tüm hücreler toplanmıştır. Kültürün sonlanmasından sonra likit sentilasyon sayacında sayım yapılmıştır. Tek yönlü MLC test sonucunda iki ayrı değerlendirme, Stimülasyon indeksi (SI) ve Göreceli Cevap İndeksi (Relative Response Index - RRI) hesaplanmıştır (Formül 1, Formül 2). MLC testinde SI değerinin ≤1 olması ve RRI değerinin negatif olması vericinin hasta için uygun olduğunu belirtmektedir. Tek yönlü MLC testi hasta hücre sayısı yetersiz olduğundan verici yönünde çalışılmıştır. SI: 2.66 ve RRI değerleri + (2.2) ile + (4.4) arasında bir dağılım göstermiştir.

Formül 1:
SI= VH*/VV

Formül 2:
RRI = (VH*-VV /VK*-VV) ×100

*: ışınlanmış hücreler

VH*: Verici hücreleri ile hastanın ışınlanmış hücreleri

VV: Sadece verici hücreleri

VK*: Verici hücreleri ile ışınlanmış kontrol (hasta ve verici ile akrabalığı olmayan sağlıklı kişilerden elde edilen hücreler) hücreleri

Tartışma

Günümüzde çeşitli hematolojik neoplaziler, bazı kalıtsal hastalıklar ve kemik iliği yetersizliği sendromları KHN ile tedavi edilmektedir. Hasta ve verici arasındaki HLA uyumu graft reddi, GVHH hastalığı ve yetersiz immün yapılanma ile ilişkilidir. Serolojik HLA tiplemesi, hasta ve vericilerinin HLA karşılaştırmasını saptamada yetersizdir. Serolojik sonuçlar hasta ve verici uyumunun allel düzeyinde karşılaştırılmasına imkan vermez. Bu sebeple, HLA polimorfizmini saptamak için moleküler biyoloji

tekniklerinin kullanımına izin veren daha ileri metodlara ihtiyaç vardır. PCR SSP metodu ile diziyeye özgü sentetik oligonükleotidler kullanılarak hasta verici çiftleri arasındaki uyum araştırılmaktadır. MLC ise, sınıf II molekülleri (HLA-DR, DQ ve DP) arasındaki farklılığı saptayan bir metoddur (7). Hasta- alıcı çiftleri arasındaki HLA-DRB1 uyumsuzlukları MLC testlerinde proliferatif cevapların en önemli nedenidir. Ancak, DRB1 uyumlu olsa bile, hasta ve verici arasında DRB3, DQ ve DP uyumsuzlukları da MLC testinde proliferasyona sebep olabilir (9). Özellikle akraba olmayan vericilerden yapılan KHN'lerinde HLA-C, E, DP gibi bölgelerindeki uyumsuzluklar da, KHN sonrası GVHH riskinin artmasına katkıda bulunabilmektedir. Bu durum akraba olmayan KHN'lerinde akut GVHH ve rejeksiyon ihtimalinin neden daha yüksek olduğunu açıklayabilir (9-11). Bizim vakamızda, KLL tanılı hasta ve verici kardeşinin PCR-SSP yöntemi ile HLA-A,-B,-C,-DR,-DQ ve -DP lokusları çalışılmış, hasta ve verici arasında sadece DP uyumsuzluğu saptanmıştır. MLC testinde ise hasta-verici hücrelerinin proliferasyonlarındaki artış nedeni ile test sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Böylece, HLA-DP uyumsuzluğu MLC testi ile de doğrulanmıştır.

Olerup ve ark.'ları, akraba olan ve olmayan, DP uyumlu olan ve olmayan çiftlere MLC testi yaptıklarında, DP uyumsuzluğu olan 3 (%100) akraba çiftin hepsinin MLC sonucunun pozitif olduğunu görmüşlerdir. Akraba olmayan HLA-DP uyumsuz bireylerden elde edilen hücrelerle uygulanan MLC testinde ise %9.8 oranında pozitiflik saptanmıştır. Araştırmacılar MLC testini değerlendirme de, RRI sonuçlarını esas almışlardır. RRI değeri %8 veya üzerinde ise sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir. Akraba olmayan grupta MLC testi yapılan vakalarda pozitif sonuçların az olmasının sebebini de kabul edilen yüksek RRI değerlerinden kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada iki DP uyumsuzluğu olan hasta verici çiftlerinde, tek DP uyumsuzluğuna göre RRI değerlerinde daha fazla artış olduğu görülmüştür (8). Vakamızdaki DP uyumsuz akraba çiftin MLC sonucunun pozitif bulunması Olerup ve ark.'larının akraba çiftlerde gözlemledikleri uyumsuz DP ile MLC pozitifliği ilişkisi açısından uyumludur.

Penzes ve grubu yaptıkları çalışmaya, KHN için akraba uygun vericisi olmayan 28 Macar hasta ve bu hastalara serolojik olarak HLA-A, -B, -DR uyumlu 61 (26 hasta için birden fazla potansiyel verici var) akraba olmayan vericiyi dahil etmişlerdir. Çiftlerin sadece %11.5'inde moleküler yöntemlerle HLA uyumu saptanmıştır. Bu çiftlere MLC testi yapıldığında, daima (-) MLC sonucu saptanırken, HLA-DPB1*0201-0301 ve DPB1*0301-0401 allel kombinasyonunun ise, tüm vakalarda reaktif olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak, araştırmacılar MLC testinde bazı DP allel kombinasyonlarının düşük immüjenite gösterebileceğini, bazı kombinasyonların ise, pozitif sonuçlar ortaya çıkarabileceğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlarında, KHN için uygun vericinin seçilmesine yardım edeceğini açıklamışlardır (12).

Vakamızda hastanın HLA-DP'si DPB1*0201-0401 vericinin HLA-DP'si ise, DPB1*0401-0402'dir. MLC testi sonucunda, DPB1*0201-0402 allel kombinasyonunun da reaktif olduğunu belirledik. Penzes ve ark.'larının çalışması ile vakamızı değerlendirdiğimizde, HLA-DPB1*0201-0301 ve DPB1*0301-0401 kombinasyonlarına ilave olarak DPB1*0201-0402 kombinasyonunun da MLC testinde pozitif sonuç ortaya çıkarabileceğini

saptadık. Ancak DPB1*0201-0402 allel kombinasyonu daima yüksek immun cevaba sahiptir diyebilmek için test sayısını artırmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, moleküler yöntemlerle HLA bölgesi allel düzeyinde belirlenmektedir. MLC testi ile de, HLA-DR, DQ antijenlerinin yanı sıra DP antijen farklılıklarının da saptanması ile, HLA sınıf II antijenlerinin uygunluğu doğrulanmaktadır. HLA uyumlu kardeşler aynı haplotiplere sahip olduklarından dolayı genellikle allel uyumsuzluğu beklenmez. Bu çiftteki DP uyumsuzluğu crossing over esnasında gelişmiş olmalıdır. Ayrıca yaptığımız çalışma doku tiplendirmesi yaparken her lokusun ayrı önemi olduğunu ve KHN öncesinde DP lokusların araştırılmasının önemini vurgulamaktır. Bu değerlendirmenin, nakil için uygun vericinin seçilmesine katkıda bulunacağı ve nakil sonrası GVHH riskini de azaltacağı düşüncesindeyiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Appelbaum FR. Marrow transplantation for hematological malignancies: A brief review current status and future prospect. *Semin Hematol* 1988;25:16.
2. Mosaad YM, Kamel H. HLA-DPB1 mismatch and acute graft-versus host disease in HLA-identical sibling donors. *Egypt J Immunol* 2005;12:21-8.
3. Pere S, Reinsmoen NL, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, Barbosa JJ, Faras AJ, McGlave PB and Rich SS. Frequent HLA class I and DP sequence mismatches in serologically (HLA-,B,DR) and molecularly (HLA-DRB1, DQA1,DQB1) HLA identical unrelated bone marrow transplant pairs. *Blood* 1994;83:280-7.
4. Tiercy JM, Morel C, Freidel AC, Zwahlen F, Gebuhrer L, Betuel H, et al. Selection of unrelated donors for bone marrow transplantation is improved by HLA class II genotyping with oligonucleotide hybridization. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88:7121-5. [\[CrossRef\]](#)
5. Mickelson EM, Guthrie LA, Etzioni R, Anasetti C, Martin PJ, Hansen JA. Role of mixed lymphocyte culture reaction in marrow donor selection: matching for transplants from related haploidentical donors. *Tissue Antigen* 1994;44:83-92. [\[CrossRef\]](#)
6. Peakman M., Vergani D. The human Leukocyte Antigens. In: Peakman M., Vergani D. eds. *Basic and clinical immunology*. 1st ed. Hurchill Livingstone 1997;53-66.
7. Baxter LA, Eckels DD, Ash R, Casper J, Hunter JB, Gorski J. The predictive value of HLA-DR oligotyping for MLC responses. *Transplantation* 1992;53:1352-7.
8. Olerup O, Moller E, Persson U. HLA-DP incompatibilities induce significant proliferation in primary mixed lymphocyte cultures in HLA-A,-B,-DR and-DQ compatible individuals: implications for allogeneic bone marrow transplantation. *Tissue antijen* 1990;36:194-202.
9. Santamaria P, Reinsmoen NL, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, Barbosa JJ, Faras AJ, McGlave PB, Rich SS. Frequent HLA class I and DP sequence mismatches in serologically (HLA-A,-B,-DR) and molecularly (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1) HLA-identical unrelated bone marrow transplant pairs. *Blood* 1994;83:280-7.
10. Beatty PG, Hansen JA, Longton GM, Thomas DE, Sanders JE, Martin PJ. Marrow transplantation from HLA-matched unrelated donors for treatment of hematologic malignancies. *Transplantation* 1991;51:443-7. [\[CrossRef\]](#)
11. Mosaad YM, Kamel H. HLA-DPB1 mismatch and acute graft-versus host disease in HLA-identical sibling donors. *Egypt J Immunol.* 2005;12:21-8.
12. Péntzes M, Rajczy K, Gyódi E, Petrányi GG. Influence of HLA-DPB1 mismatches on MLR responses: the role of high resolution HLA class II typing and MLC in unrelated donor selection for BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:34-7.