

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT LÖSEMİDE PANEL REAKTİF ANTİKOR (ANTI-HLA  
ANTİKOR) OLUŞUM SÜRECİNİN BELİRLENMESİ VE PANEL  
REAKTİF ANTİKORLARIN KÖK HÜCRE NAKLİ SEYRİNE  
ETKİSİNİN SAPTANMASI**

**Dr. Didem ŞAHİN EROĞLU  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Meltem KURT YÜKSEL**

**Ankara**

**2018**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT LÖSEMİDE PANEL REAKTİF ANTİKOR (ANTI-HLA  
ANTİKOR) OLUŞUM SÜRECİNİN BELİRLENMESİ VE PANEL  
REAKTİF ANTİKORLARIN KÖK HÜCRE NAKLİ SEYRİNE  
ETKİSİNİN SAPTANMASI**

**Dr. Didem ŞAHİN EROĞLU  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Meltem KURT YÜKSEL**

**Ankara**

**2018**

# KABUL ve ONAY

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

## ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI


I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı : <u>Didem Selva FİDANLI</u>	Sınav tarihi: <u>23.12. / 2014</u>
Anabilim/Bilim Dalı : <u> hematoloji</u>	
Tez Danışmanı : <u>Dr. Meltem YÜKSEL</u>	


II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: <u>Akut lösemide Panel Reaktif Antikor (Anti-HLA antikor) oluşum sürecinin Belirlenmesi ve Panel Reaktif Antikörün Kıkırcık Hücre Nakli Seyrine Etkisinin Saptanması</u>	
Tezin Niteliği: <input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu: <input checked="" type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
<input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne	
<input type="checkbox"/> Reddine	
<input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
<input checked="" type="checkbox"/> Oy birliği <input type="checkbox"/> Oy çokluğu	ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

  
Prof. Dr. Meltem Yüksel  
Anabilim/Bilim Dalı

  
Prof. Dr. Gökçe Keşkin  
Anabilim/Bilim Dalı

  
Prof. Dr. Hakan Göker  
Anabilim/Bilim Dalı

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki tıpta uzmanlık eğitimimde desteğini esirgemeyen ve emeği geçen bütün değerli öğretim üyelerine öncelikle teşekkür ederim.

Hekimliği, bilim insanlığı ve kişiliği ile örnek aldığım, gerek tez sürecimde gerekse de hekimlik hayatımda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Meltem KURT YÜKSEL'e ayrı bir teşekkürü borç bilirim.

Tezimin hazırlanma sürecinde özellikle laboratuvar aşamasında desteğini esirgemeyen laborant Semahat AKBAY'a, teknolojik konularda bana her daim yardımcı olan Dr. Ali GÖKÇE'ye ve uzmanlık sürecinde zorluklara beraber göğüs gerdiğimiz ve bu sürecin keyifli geçmesinde katkıları olan Dr. Dilara TURAN GÖKÇE, Dr. Şura ÖZTEKİN ve Dr. Ender KALACI'ya ve tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Araştırmamın bütçesini karşılayan Ankara Üniversitesi BAP'a ayrıca teşekkür ediyorum.

Ve en önemlisi tanıştığımız ilk günden itibaren, sevgisiyle hayata daha sıkı tutunmamı sağlayan, bütün zorlukları beraber aştığımız sevgili eşim Dr. Mustafa Alparslan EROĞLU'na en içten sevgilerimi sunuyorum. Son olarak bugünlere gelmemi sağlayan, desteğini hep arkamda hissettiğim annem Neziye ŞAHİN ve babam Cafer ŞAHİN'e teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	iv
TABLolar DİZİNİ .....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Akut Lösemi Tanımı, Alt Tipleri, Tedavisi ve Prognuzu .....	4
2.1.1. Akut Myeloid Lösemi .....	4
2.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi .....	8
2.2. Major Histocompatibility Complex (MHC) .....	10
2.2.1. MHC genleri .....	10
2.2.2. MHC'nin işlevleri .....	11
2.3. Anti-HLA Antikorlarının Tespitinde Kullanılan Yöntemler .....	12
2.4. Alloimmünizasyon ve Transplantasyon İmmünolojisi .....	14
3. GEREÇLER VE YÖNTEM.....	19
3.1. PRA Tarama ve Tanımlama .....	20
3.1.1. Yöntem .....	20
3.2. İstatistiksel Analizler .....	21
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	36
6. ÖZET.....	43
7. SUMMARY.....	44
8. KAYNAKLAR .....	45

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>HLA:</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>MHC:</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>PRA:</b>	Panel Reaktif Antikor
<b>AML:</b>	Akut Myeloid Lösemi
<b>ALL:</b>	Akut Lenfoblastik Lösemi
<b>GVHD:</b>	Graft versus Host Disease
<b>GIS:</b>	Gastrointestinal Sistem
<b>CDC:</b>	Complement Dependent Cytotoxicity
<b>SAB:</b>	Single Antigen Bead
<b>MFI:</b>	Mean Fluorescence Intensity
<b>DSA:</b>	Donör Spesifik Antikor
<b>RSA:</b>	Recipient Spesifik Antikor (Alıcı Spesifik Antikor)
<b>ATG:</b>	Anti Timosit Globulin
<b>Csa:</b>	Siklosporin
<b>MMF:</b>	Mikofenolat Mofetil
<b>MTX:</b>	Metotreksat
<b>RIC:</b>	Reduced Intensity Conditioning (Yoğunluğu Azaltılmış Hazırlık Rejimi)
<b>ES:</b>	Eritrosit Süspansiyonu
<b>TS:</b>	Trombosit Süspansiyonu

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2-1: Dünya Sağlık Örgütü Akut Myeloid Lösemi Sınıflaması .....	6
Tablo 2-2: İyi ve Kötü Prognostik Faktörler .....	7
Tablo 2-3: MHC Gen Bölgesi ve Ürünleri .....	11
Tablo 4-1: Hastaların Demografik Özellikleri-1 .....	23
Tablo 4-2: Hastaların Demografik Özellikleri-2 .....	24
Tablo 4-3:HLA Sınıf I Antikor için Grupların Aldığı Transfüzyon Miktarı .....	27
Tablo 4-4:HLA Sınıf II Antikor için Grupların Aldığı Transfüzyon Miktarı .....	28
Tablo 4-5: Allojeneik Kök Hücre Nakli Olan Hastaların Nakile İlişkin Özellikleri .	30
Tablo 4-6: Allojeneik Kök Hücre Nakli Olan Hastaların ve Vericilerinin Özellikleri, Hastaların Nakil Öncesi ve Sonrası PRA durumları .....	31
Tablo 4-7: Sınıf I HLA'ya Karşı Saptanan Antikorlar .....	34
Tablo 4-8: Sınıf II HLA'ya Karşı Saptanan Antikorlar .....	35



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

HLA (human lökosit antijen) 1958 yılında insan lökositleri üzerinde bulunan bir alloantijenin saptanması ile tanımlanmış, o dönemde MAC ismi ile anılmış (1), daha sonra bu antijen HLA-A2 olarak isimlendirilmiştir. O dönemde bu lökosit antijenlerinin doku ve kemik iliği nakillerinde büyük bir öneme sahip olabileceği düşünülmüş ve çalışmalar 1980 yılında Nobel ödülü ile taçlandırılmıştır. Yapılan çalışmalar farklı doku uygunluk kompleksinin (Major Histocompatibility Complex= MHC) proteinlerinin farklı antijen fragmanlarını bağladığını ve hücrelere sunduğunu göstermiştir. Yine T hücrelerinin MHC proteinlerini de antijen gibi tanıdığı ortaya konulmuştur. PRA (panel reaktif antikor) ise organ ya da doku vericilerinin hücrelerinin yüzeyindeki HLA antijenlerine karşı oluşan antikorlardır. Bu antikorların klinik önemi transfüzyon tıbbında tanımlanmış olup, varlığının trombosit transfüzyon refrakterliğinin önemli nedenlerinden biri olduğu gösterilmiştir (2). Her topluluğun farklı demografik HLA antijenleri olacağından, PRA sonuçları da ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir.

PRA özellikle solid organ nakillerinde kullanılan immunolojik laboratuvar testidir ve panel hücre havuzuna karşı alloreaktif antikorların gösterilmesi esasına dayanır. PRA skoru % olarak belirtilir, bu pozitif hücre oranını gösterir ve %0-99 arasında değişir. PRA skorunun yüksek oluşu hastaların “sensitize” olduğunu yani “duyarlı” hale geldiğini gösterir. Duyarlı hale gelmiş bireylerde rejeksiyon riski yüksektir, daha yoğun bir immunsupresyon gerekir ve transplant sağkalım başarıları düşüktür (3-5).

Anti-HLA antikorlarının neden, nasıl, ne zaman ve ne kadar sürede oluştuğu bilinmemektedir. Kan transfüzyonları, gebelik, önceki transplantasyonlar gibi kendinden olmayan “non-self” antijenlerle karşılaşması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Ancak her transfüzyon yapılan kişide görülmediği gibi daha önce transfüzyon almayan kişilerde de görülebilmektedir (6).

PRA taraması solid organ transplantasyonlarında, özellikle böbrek nakli öncesinde alıcıda vericinin HLA antijenlerine karşı antikor varlığını saptamak amacı ile uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalarda greft rejeksiyonu PRA pozitifliği olan olgulara yapılan nakillerde PRA negatif olan gruba göre anlamlı olarak daha sık görülmektedir (7-8). Alıcının HLA tiplendirmesi allojeneik nakil öncesi rutin olarak

uygulanmaktadır, fakat PRA (anti-HLA antikor) taraması rutinde kullanılmamaktaydı. Bunun nedeni greft rejeksiyonunun daha çok T hücre aracılı yanıtlar ile gerçekleştiğinin düşünülmesiydi, fakat yapılan çalışmalarla T hücre aracılı rejeksiyonun yanında antikor aracılı rejeksiyonunda greft kaybında önemi olduğu gösterilmiştir (9,10). Ancak hematolojide allojeneik kök hücre nakillerinde uyumlu vericisi olmayan hastalarda son yıllarda hızla artan haploidentik ve kordon kanı kök hücre nakilleri ile birlikte PRA taraması gündeme gelmiştir. Allojeneik kök hücre nakillerinde graft yetersizliği en korkulan komplikasyonlardan biri olup bu antikorların varlığında bu risk daha fazla artmaktadır. Çalışma grubumuzu oluşturan akut lösemi olgularında ise tedavi sürecinde multipl kan transfüzyonu ihtiyacı olmakta bu da anti-HLA antikor oluşması açısından risk oluşturmaktadır. Bu antikorlar hem transfüzyon refrakterliği açısından önem taşımakta hem de kök hücre nakli sonrasında engraftman ve sağ kalım üzerine olumsuz etkiye neden olmaktadır (4,11).

Allojeneik kök hücre nakli sonrasında hastalık relapsında HLA kaybının önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (12,13). Tanı anında HLA ile ilgili değişikliklerin AML gelişim sürecinde etkili olabileceği fikrinden yola çıkılarak yeni tanı almış akut lösemi hastalarında doku tiplendirmesi yanı sıra HLA'ya karşı antikorların tespiti de planlandı.

Tüm dünyada uygulanan allojeneik kök hücre nakillerinde PRA sıklığı bilinmemektedir. PRA taraması sadece haploidentik kök hücre nakillerinde rutin olarak yapılmaktadır. Bu çalışmada akut lösemi tanısı almış hastalarda tanı anında PRA varlığı tespiti, tedavi süresince uygulanan transfüzyonlar sonucu oluşabilecek PRA'ların saptanması, tespiti halinde bu halde PRA'ların identifiye edilmesi ve bu antikorların kök hücre nakline etkisinin incelenmesi hedeflendi. PRA oluşumuna neden olabilecek gebelik, transfüzyon, transplantasyon verileri kaydedildikten sonra, indüksiyon ve konsolidasyon kemoterapileri boyunca ve kök hücre nakli yapılan hastalarda transfüzyon ile ilişkili veriler kaydedilerek, üç ayda bir PRA taraması yapıldı.

Çalışmanın birincil amaçları:

1-Akut lösemili hastalarda tanı anında PRA insidansını belirlemek.

2-İndüksiyon ve konsolidasyonlarda uygulanan transfüzyonlar sonrası PRA oluşum süresini ve sıklığını tespit ederek, literatürde de halen tam olarak açıklanamayan bu sürece ışık tutmak.

3-Allojeneik kök hücre nakli yapılan lösemili hasta grubunda, doku tipi tam uyumlu kardeş, akraba dışı tam uyumlu ya da haploidentik kök hücre nakli yapılanlarda PRA varlığının nakil sürecine engraftman, rejeksiyon, GVHD (graft versus host hastalığı), relapsa etkisini değerlendirmek.

Çalışmanın ikincil amaçları:

1-Akut lösemili hasta grubunda ilk kez Türk popülasyonunda PRA insidansı, oluşum hızı ve miktarını tespit etmek.

2-Akut lösemilerde PRA varlığının transfüzyon sonrası oluşabilecek, trombosit ya da eritrosit alloimmünizasyonuna etkisini belirlemek.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Akut Lösemi Tanımı, Alt Tipleri, Tedavisi ve Prognuzu

Akut lösemi myeloid (AML) veya lenfoid (ALL) kökenli hematopoetik prekürsör hücrelerin kan, kemik iliği ve diğer dokuları infiltrasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Kemik iliğinin lösemik blastlarla infiltrasyonu normal eritrositler, trombositler ve matür granülositlerin üretiminde azalma ile sonuçlanarak klinik olarak kemik iliği yetmezliği bulguları ile prezente olurlar.

Normal hematopoez dinamik bir süreçtir, büyüme faktörleri ve transkripsiyon faktörlerinin kontrolü altında hücresel proliferasyonun ve lineage spesifik yönelimin ve farklılaşmanın gerçekleştiği bir süreçtir. Akut lösemiler ise hematopoez esnasında hematopoetik prekürsör hücrelerde meydana gelen çeşitli genetik mutasyonlar sonucunda matürasyon defekti ile karakterize tek bir hücrenin klonal proliferasyonu sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar lösemik hücrelerin kendilerinden daha immatür lösemik kök hücrelerden kaynaklanabiliyor olacağını göstermektedir.

#### 2.1.1. Akut Myeloid Lösemi

AML erişkinlerde daha sık görülen lösemi tipi olup erişkin vakaların yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (14,15). Ortanca tanı yaşı 65'tir. Görülme insidansı yaşla beraber artmaktadır. AML gelişimine yatkınlık yaratan çevresel ve genetik faktörler bulunmaktadır. Çevresel faktörler arasında benzen gibi çeşitli kimyasallar, radyasyon maruziyeti, sigara ve alkilleyici ajanlar gibi çeşitli kemoterapötiklere maruziyet yer almaktadır. Genetik faktörler arasında ise down sendromu, fankoni anemisi, Bloom's sendromu yer almaktadır.

Klinik manifestasyonları belirtildiği gibi kemik iliği yetmezliği bulguları ile karakterizedir. Hastalar halsizlik, ciddiyeti değişiklik gösterebilen enfeksiyonlar, epistaksis, gingival kanama ve ekimozlar ile prezente olabilirler. Fizik muayenede de solukluk, ateş, peteşi veya ekimozlar gibi nonspesifik bulgular saptanabilir. Bazı hastalar onkolojik bir acil olan tümör lizis sendromu ile de başvurabilirler.

Olası akut lösemi kliniği ile başvuran hastalar CAP-ASH kılavuzuna göre değerlendirilmelidirler (16). Periferik yaymada lösemik blastların görülmesi tanıyı desteklemesine rağmen kesin tanı kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi ile konulmaktadır. Bazı hastalarda aspirasyon esnasında 'dry-tap' izlenebilir. Bu durum AML-M7 gibi yaygın ilik fibrozisi ile giden durumlarda izlenir. Bu durumda uygun bir şekilde alınmış kemik iliği biyopsi materyali tanının doğrulanmasında yardımcı olacaktır. Akım sitometri, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar her hastada uygulanmalıdır. Tanının doğrulanması için kemik iliği aspiratının en az %20'sini myeloid kökenli blastik hücreler oluşturmalıdır. Bazı genetik anormalliklerin olduğu durumlarda ve myeloid sarkom varlığında ise blast oranından bağımsız olarak AML tanısı konulabilmektedir. Bu anormallikler t (8; 21), inv (16), t (15; 17) varlığıdır. Tanının doğrulanmasından sonra Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasına (tablo 2.1) uygun bir şekilde alt tip belirlenerek hastalığın prognozu ve seçilecek uygun tedavi modalitesi belirlenebilir (17,18).

DSÖ sınıflamasında belirtilen çeşitli translokasyonların varlığı prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Bunun yanında yaş, performans durumu gibi hasta ilişkili faktörler de hastalık prognozunu etkilemektedir. İyi ve kötü prognostik faktörler tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tam remisyon sağlanması AML'nin eradikasyonu açısından önemlidir. Remisyon indüksiyonu AML'li hastalarda surviyi uzattığı gibi yaşam kalitesini de artırmaktadır. Ancak tedavi hedefi hastanın yaşı, klinik durumu ve komorbiditeleri göz önünde bulundurularak planlanmalıdır. Ağır kemoterapiyi kaldıramayacak hastalarda destek tedavisi uygulanması ve semptom palyasyonu sağlanması daha mantıklıdır.

AML tedavisi remisyon indüksiyonu ve post remisyon tedavi olarak 2 ayrı faza ayrılır. İndüksiyon tedavisinin amacı tam remisyonu sağlamaktır. Genç ve performans durumu iyi olan hastalarda 7 gün sitarabin infüzyonu ile beraber 3 gün antrasiklin infüzyonu indüksiyon tedavisi olarak uygulanır. Bu tedavi 7+3 rejimi olarak isimlendirilir. Akut promyelositik lösemi de ise retinoik asit içeren kemoterapi rejimi uygulanır. İndüksiyon tedavisinin ciddi yan etkileri görülebilir. Enfeksiyonlar, kanama diyatezi, tümör lizis sendromu ve metabolik anormallikler

açısından dikkatli olunmalıdır. Yaşla beraber tedavi komplikasyonlarında artış görülebilir.

Tablo 2-1: Dünya Sağlık Örgütü Akut Myeloid Lösemi Sınıflaması

<b>Akut Myeloid Lösemi (AML) ve İlişkili Neoplaziler</b>
<b>Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>t(8;21)(q22;q22.1);<i>RUNX1-RUNX1T1</i> ile AML</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22);<i>CBFB-MYH11</i> ile AML</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li><i>PML-RARα</i> ile akut promyelositik lösemi</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>t(9;11)(p21.3;q23.3);<i>MLL3-KMT2A</i> ile AML</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>t(6;9)(p23;q34.1);<i>DEK-NUP214</i> ile AML</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> ile AML</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>t(1;22)(p13.3;q13.3);<i>RBM15-MKL1</i> ile AML (megakaryoblastik)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>AML with mutated <i>NPM1</i></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li><i>CEBPA</i>'nın biallelik mutasyonu ile AML</li></ul>
<b>Myelodisplazi ile ilişkili AML</b>
<b>Tedavi ilişkili AML</b>
<b>Sınıflanamayan AML (NOS)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>Minimal diferansiyasyon ile AML</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Matürasyonu olmayan AML</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Matürasyonu olan AML</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Akut Myelomonositik Lösemi</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Akut Monoblastik/Monositik Lösemi</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Saf Eritroid Lösemi</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Akut Megakaryoblastik Lösemi</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Akut Bazofilik Lösemi</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>Myelofibrosis ile Akut Panmyelozis</li></ul>
<b>Myeloid Sarkom</b>
<b>Down Sendromu ile İlişkili Myeloid Proliferasyonlar</b> (Geçici Anormal Myelopoezis ve Down Sendromu ile İlişkili Myeloid Lösemi)

Tablo 2-2: İyi ve Kötü Prognostik Faktörler

İyi Prognostik Faktörler	Kötü Prognostik Faktörler
<ul style="list-style-type: none"> <li>Yaş &lt; 50</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Age &gt;60</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Karnofsky Skoru &gt; %60</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Karnofsky Skoru &lt; %60</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>MDR 1-negatif fenotip</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>MDR 1-pozitif fenotip</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Altta yatan hematolojik hastalık olmaması ve kemoterapi-radyoterapi maruziyeti olmaması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tedavi ilişkili AML, MDS zemininin olması ve myeloproliferatif veya diğer hematolojik hastalıkların varlığı</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(15;17)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kompleks karyotip, -5, -7, 3q26 aberasyonu, t(6;9), t(9;11) hariç 11q23 aberasyonu, monozomal karyotip</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>NPM1 veya CEBPA mutasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>FLT3/ITD mutasyonu, MLL kısmi tandem duplikasyonu, BAALC overekspresyonu, IDH1 ve/veya IDH2 mutasyonu</li> </ul>

Tedaviye yanıtın değerlendirilmesi kemoterapi bitiminden 7-10 gün sonra yapılmalıdır. Nötrofil ve trombosit sayılarında düzelme sonrasında remisyonun dokümantasyonu açısından tekrar biyopsi yapılması uygun olacaktır.

Tam remisyon sağlanan hastalarda post remisyon tedavi verilmez ise relaps neredeyse kaçınılmazdır. Tedavinin amacı rezidüel tümöral hücreleri yok etmek ve kür sağlamaktır. Post remisyon terapide kemoterapi, otolog veya allojeneik kök hücre nakli kullanılabilir. Allojeneik kök hücre nakli kararı verirken prognostik faktörlerin göz önünde tutulması gerekmektedir.

Relaps komplet remisyon sağlandıktan sonra hastalığın tekrar ortaya çıkması durumudur. Refrakter hastalık ise 2 standart indüksiyon tedavisine yanıt alınamamasıdır. Bu hasta grubunda kür sağlanması için en iyi seçenek allojeneik kök hücre naklidir. Ancak allojeneik kök hücre nakli sonrasında da hastaların %30-40'ı hastalık nüksü yaşamaktadır. Nakil sonrasında rezidüel lösemik hücrelerdeki HLA kaybının graft versus lösemi etkisini azaltarak lösemi relapsına yol açtığı bilinmektedir (19).

## 2.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi

AML'nin aksine ALL erişkinlerde daha az sıklıkta görülmektedir. Akut lenfoblastik lösemi B hücre kökenli ve T hücre kökenli olmak üzere 2 farklı gruptan oluşmaktadır.

B-ALL sıklıkla çocukluk çağında görülen bir akut lösemi tipi olup erişkinlerde daha az sıklıkta görülmektedir. Ortanca görülme yaşı 39'dur (20). Klinik olarak AML'ye benzer şekilde kemik iliği yetmezliği bulguları ile karakterizedir. AML'den farklı olarak hepatosplenomegali, lenfadenopati ve santral sinir sistemi tutulumu daha sık olarak eşlik eder. Tanı kemik iliği biyopsi ve aspirasyon örneklerinin morfolojik, histokimyasal, genetik ve akım sitometrik bulgularının değerlendirilmesi ile konur. Histokimyasal olarak PAS pozitifliği ve myeloperoksidaz negatifliği dikkat çekicidir. Akım sitometride terminal deoksitranferaz (TdT) pozitifliği ve değişen oranlarda CD19, CD20, CD22 ve CD79a gibi B hücre markerları ve CD45, CD10 (CALLA) saptanır. T hücre markerı olan CD3 negatiftir. %14 vakada CD13 ve %16 vakada CD33 gibi myeloid antijenlerin ekspresyonu saptanabilir (21).

Philedelphia kromozomu varlığı erişkin B-ALL'lerinde en sık görülen gen rearanjmanıdır. Yaşla beraber t (9; 22) görülme sıklığı artar (22). Tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımı ile beraber prognozda iyileşme sağlanmıştır (23,24). t(v;11q23) varlığı kötü prognoz ile ilişkili iken, t (12; 21) varlığı iyi prognostiktir.

Yaş ve sitogenetik/genetik bulgular sağkalımın en önemli belirleyicileridir. 1 yaşın altındaki çocuklarda ve erişkinlerde prognoz 1 yaşın üzerindeki çocuk hastalara kıyasla daha kötüdür. Yukarıda da bahsedildiği gibi bazı translokasyonların varlığı ve hipodiploidi kötü prognozla ilişkilidir.

T-ALL ise sıklıkla adolesan dönemde ve genç erişkin dönemde ortaya çıkar. Erkek/kadın oranı: 2/1'dir. Klinik bulgular B-ALL'ye benzer. Farklı olarak %50-75 oranında mediastinal kitle de eşlik edebilir. Mediastinal kitle varlığına bağlı olarak da superior vena kava sendromu, trakeal obstrüksiyon gibi bulgular ile prezentasyon gösterebilir. Tanı aynı şekilde kemik iliği biyopsi ve aspirasyon örneklerinin morfolojik, histokimyasal, genetik ve akım sitometrik bulgularının



değerlendirilmesiyle konur. Akım sitometride CD7 varlığı tipiktir. NOTCH1 mutasyonu T-ALL'de en sık mutasyona uğrayan onkogendir (25). B-ALL'nin aksine sitogenetik prognozu etkilememektedir. Ancak yaş ve p53 mutasyonu varlığı prognozu etkilemektedir (26).

ALL tedavisi indüksiyon kemoterapisi ve post remisyon tedaviden oluşmaktadır. Bir çok indüksiyon rejimi geliştirilmiştir ve bu tedavi rejimlerinin birbiri üzerine belirgin bir üstünlüğü yoktur. Bu rejimler çoğunlukla vinkristin, kortikosteroid ve antrasiklinleri içermektedir. Tüm rejimlerde santral sinir sistemi profilaksisi yapılmaktadır. CALGB 8811/9111 ALL, BFM rejimi, Hyper CVAD kullanılan rejimlerden bazılarıdır. Ph + ALL olgularında tirozin kinaz inhibitörlerinin eklenmesi sağ kalıma olumlu katkıda bulunmuştur.

Post remisyon tedavi olarak 3 temel seçenek bulunmaktadır; konsolidasyon ve idame tedavisi, olog kök hücre nakli ve allojeneik kök hücre nakli. Hangi tedavi modalitesinin seçileceği hastanın klinik durumu ve tümör özelliklerine göre karar verilmelidir. Yüksek riskli ve genç hastalarda allojeneik kök hücre nakli 10 yıllık süreçte %45 oranında sağ kalım ile sonuçlanmaktadır. Yüksek risk ve intermediate risk grubuna dahil olmayan tümörler ise standart riskli olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu tedavi seçeneklerinin birbirlerine üstünlüğünün olup olmadığı net değildir.

Yüksek riskli hastalığı predikte eden durumlar;

- Tanı anında beyaz küre sayısının B-ALL için >30,000/microL, T-ALL için >100,000/microL olması.
- t(4;11), t(1;19), t(9;22) or BCR-ABL gen pozitifliği gibi klonal sitogenetik anormalliklerin bulunması.
- CD10 haricinde CD19, CD79a, sitoplazmik CD22 gibi progenitör B hücre fenotipi özellikleri olan blastların varlığı.
- İndüksiyon tedavisi sonrasında tam remisyonun 4 haftadan daha uzun sürede sağlanması.
- >60 yaş yüksek riskli iken, 30-59 yaş aralığı orta risklidir.
- Remisyon sonrası minimal rezidüel hastalık varlığı.

## 2.2.Major Histocompatibility Complex (MHC)

İnsan MHC (major histocompatibility complex) sistemi, bir diğere adıyla HLA (human lökosit antijen) kompleksi 6. kromozom üzerinde (6p21.3) bulunan 4-megabazlık bir bölgedir. MHC adını 2 farklı birey arasında yapılan organ transplantasyonunda aktarılan dokunun kabulü veya reddini belirleyen proteinleri eksprese eden bu gen bölgesinden almıştır. Benacerraf, Snell ve Dausset organ naklinin seyri ve antijene karşı immün sistem yanıtı gibi MHC sistemi tarafından kontrol edilen fonksiyonları tanımlamış ve bu çalışmalar 1980 yılında tıp ve fizyoloji alanında Nobel Ödülü almıştır (27). Daha sonra yapılan çalışmalar bu genler tarafından kodlanan proteinlerin kazanılmış immünitede önemli bir rol oynadığını göstermiş, farklı MHC proteinlerinin farklı antijen fragmanlarını bağladığını ve hücrelere sunduğunu göstermiştir (28). Yine T hücrelerinin MHC proteinlerini de antijen gibi tanıdığı ortaya konulmuştur (29).

### 2.2.1. MHC genleri

MHC gen bölgesi üç farklı sınıf molekülün ekspresyonuna göre organize edilmiştir;

1. Sınıf I MHC genleri neredeyse bütün çekirdekli hücrelerin membranında eksprese edilen glikoproteinleri kodlamaktadır. Sınıf I genlerin ürünlerinin major fonksiyonu endojen peptid antijenlerini CD8+T hücrelerine sunmaktır.
2. Sınıf II MHC gen ürünleri antijen sunan hücrelerin (makrofajlar, dendritik hücreler ve B lenfositler) membranı üzerinde eksprese edilmekte ve ekzojen peptid antijenlerini CD4+T hücrelerine sunmaktadırlar.
3. Sınıf III MHC genleri birçok farklı protein sentezlemekte ve bunların bazıları kompleman sistem komponenti veya inflamasyonda rol oynamaktadırlar.

MHC gen bölgesindeki genlerin en çok bilinenleri MHC sınıf I ve sınıf II genleri olup bunların ürünleri immünolojik spesifite, transplantasyonda doku uyumu ve birçok otoimmün hastalıkta kritik rol oynamaktadırlar. Bu gen bölgesinin

sentezlediği sınıf I ve II MHC molekülleri hücre membranına bağlı glikoproteinler olup yapısal ve fonksiyonel açıdan benzerlikler göstermektedirler. MHC gen bölgesi ve ürünleri tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2-3: MHC Gen Bölgesi ve Ürünleri

	HLA							
MHC sınıf	I			III		II		
Bölge	B	C	A	C4, B2, BF		DP	DQ	DR
Gen ürünleri	HLA-B	HLA-C	HLA-A	C’ proteinleri	TNF- $\alpha$ Lenfotoksin- $\alpha$	DP $\alpha\beta$	DQ $\alpha\beta$	DR $\alpha\beta$

### 2.2.2. MHC’nin İşlevleri

Sınıf I MHC molekülleri bütün çekirdekli hücrelerin membranında eksprese edilmektedir. Sınıf I MHC molekülleri self antijenler, hücre içi patojenler, tümör antijenleri ve allograft antijenleri gibi hücre sitozolünden kaynaklanan antijenler ile kompleks oluşturarak pMHC kompleksi ile bu antijenleri hücre membranında eksprese etmekte ve CD8+T hücrelerine sunmaktadırlar. CD8+T hücrelerin aktivasyonu da MHC proteinini eksprese eden hücreye karşı sitotoksositeye yol açmaktadır.

MHC sınıf II molekülleri MHC sınıf I moleküllerinden farklı olarak antijen sunan hücrelerin (APCs) yüzeyinde eksprese edilmektedirler. Antijen sunan hücreler immün sisteme ait hücreler olup (dendritik hücreler, makrofajlar, B hücreleri) herhangi bir tehdit varlığında immün sistemi harekete geçiren ve T hücre cevabını kontrol eden hücrelerdir. MHC sınıf II ekspresyonu ile beraber ko-stimülâtör moleküller ile CD4+T (T helper) hücre aktivasyonu gerçekleşmektedir (30).

1. Kendi hücre yüzeyinde kendine ait sınıf I molekülü eksprese ederek hücrenin sağlıklı olduğunu göstermek.

2. Yabancı antijeni sınıf I molekül üzerinde eksprese ederek hücrenin enfekte olduğunu göstermek ve sitotoksik T hücreleri aktive etmek. Yine sınıf II moleküller üzerinde bu yabancı antijenleri eksprese ederek yardımcı T hücrelerini aktive etmek.
3. Primer lenfoid organlarda self peptidleri sınıf I ve II molekül üzerinde eksprese ederek T hücrelerinin otoreaktif olmamalarını sağlamak.
4. Sekonder lenfoid organlarda self peptidleri sınıf I ve II molekül üzerinde eksprese ederek T hücrelerinin otoleransını devam ettirmelerini sağlamak.

MHC sınıf I ve MHC sınıf II molekülleri polimorfizm göstermektedirler. Polimorfizm; farklı bireylerdeki genetik lokuslarda yüksek düzeydeki allelik varyasyon anlamına gelmektedir. Allelik varyasyon protein molekülünün hangi fragmanının sunulacağını belirlemektedir. Yani bireyler arasındaki allelik varyasyonlar farklı bireylerin aynı virüsün farklı peptidlerini hücre yüzeyinde eksprese etmelerine yol açarlar. Dolayısıyla allelik varyasyon immün cevabın sonuçları açısından önemli rol oynamaktadır. Yine T hücrelerinin self olmayan MHC proteinlerini de antijen gibi tanıdığı ortaya konulmuştur. Transplantasyon gündeme geldiği zaman bu polimorfizmin varlığı greft reddi ile sonuçlanacaktır.

Çeşitli nedenlerle oluşan bu antikorların klinik sonuçları transplantasyon immünolojisi kısmında ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

### **2.3. Anti-HLA Antikorlarının Tespitinde Kullanılan Yöntemler**

Daha önce bahsedildiği gibi HLA antikorlarının önemi transfüzyon tıbbında bilinmektedir. HLA antikorlarının varlığı trombosit transfüzyon refrakterliğinin en önemli nedenlerinden birisidir (2). Yine bu antikorların transfüzyon ilişkili en korkulan komplikasyonlardan biri olan transfüzyon ilişkili akut akciğer hasarında rol oynadığı bilinmektedir (31). Ayrıca solid organ transplantasyonlarında anti-HLA antikorların varlığı hiperakut, akut ve kronik rejeksiyon ile ilişkilendirilmiştir.

Yukarıda bahsedilen klinik olarak hayati olan nedenlerden ötürü yıllar içerisinde bu antikorların tespitinde kullanılan yöntemler gelişim göstermiştir. Hücre

temelli (cell-based immunoassays) ve solid faz immün yöntemler (solid-phase immunoassays) HLA antikorlarının tespitinde kullanılan yöntemlerdir.

Hücre bazlı yöntemler içerisinde en sık kullanılan CDC (complement dependent cytotoxicity test) dir. Bu test uzun yıllar boyunca altın standart test olarak kullanılmıştır. Alıcıdaki antikorlar ile donör lenfositlerinin yüzeyindeki antijenlerin birleşerek kompleman aktivasyonu yapması esasına dayanır. Ucuz bir yöntemdir ancak test için donör lenfositlerinin gerekmesi, non-HLA antikorların tespit edilebilmesi, yine sınıf I ve II antikorların ayırımı için özel yöntemler kullanılması ve zaman alması dezavantajlarındandır.

ELİSA ve boncuk temelli immün yöntem (Luminex) ise solid faz immün yöntemler içerisinde yer almaktadırlar. Bu methodların canlı hücrelere ihtiyaç duymayışları nedeni ile bu yöntemler retrospektif olarak dondurularak saklanmış örneklerin analizinde kullanılabilirler. Hücre bazlı yöntemlere göre daha sensitif ve spesifik olmalarına rağmen maliyetlidirler. Bu yöntemlerde çözünebilen HLA antijenleri trombositlerden, ya da transfeksiyon veya rekombinasyon yöntemi ile elde edilirler. Çalışmamızda kullandığımız Luminex yönteminde 3 farklı panel kullanılabilir. Bunlardan birincisi birçok bireyden elde edilen sınıf I ve II antijenlerin havuzlandığı panellerdir. Tarama amaçlı kullanılmaktadır. İkincisi tek bir bireyin sınıf I veya II antijenlerinin bulunduğu panellerdir. Üçüncüsü ise rekombinan tek allelik HLA molekülünün emdirildiği boncukların (single antigen beads= SAB) bulunduğu panellerdir. Son 2 yöntem HLA antikor spesifitesini yarı niceliksel olarak belirleyen yöntemlerdir. Mean floresan intensity (MFI) değerinin hem solid organ hem allojeneik kök hücre naklinde graft rejeksiyonu ihtimalini artırdığı gösterilmiştir (32,33). Bu çalışmalardan MFI'nın antikor yoğunluğu ile korele olduğu sonucu çıkarılabilir. Ancak çok duyarlı hastalarda prozon veya hook fenomenine benzer şekilde normalden düşük MFI değerlerinin de ortaya çıkabileceği gösterilmiş ve bu fenomeni önlemek amacı ile çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (34,35). Yine boncuk temelli immün yöntemlerde HLA antijenlerinin saklı epitoplarının parçalanmış HLA antijenlerinde hedef haline geleceği ve yalancı pozitiflik ortaya çıkarabileceği bilinmektedir (6). Ayrıca özellikle SAB panellerinde in-vivo olarak hücre yüzeyinde daha az eksprese edilen HLA-C, HLA-DP ve DQ'nun ekspresyonunun daha fazla olacağı ve klinik olarak önemi az olan antikorların

yüksek MFI değerlerinde saptanabileceği bilinmektedir. Ancak akraba dışı allojeneik kök hücre nakillerinde HLA-DP'ye karşı gelişmiş antikorların graft yetersizliğinde rol oynadığı bilinmesi nedeni ile SAB kullanımını hematoloji pratiğinde faydalı sonuçlar sağlayabilir (36).

#### **2.4. Alloimmünizasyon ve Transplantasyon İmmünolojisi**

MHC proteinleri bir diğer adıyla HLA sistemi de kendileri ile beraber eksprese edilen peptid fragmanları gibi antijenik özellik taşımaktadırlar. Bireylerin kendilerine ait olmayan (non-self) antijenlerle karşılaşması ise gebelik sırasında annenin semiallojeneik antijenlerle teması sonucunda, klinik pratikte sık kullanılan kan ürünü transfüzyonları ile ve organ transplantasyonları ile gerçekleşecektir. 6-7 haftalık gebeliklerde fetal hücrelerin anne dolaşımında bulunduğu bilinmektedir. Tekrarlayan bir şekilde yabancı HLA antijeni ile karşılaşan immün sistem de bu antijenlere karşı antikor oluşumuna neden olmaktadır.

Eritrosit veya trombosit süspansiyonu verilen kişilerde mevcut ürünlerdeki residüel lökositlerin yüzeyinde bulunan antijenlere karşı immünizasyon gelişmektedir. Lökosit miktarı azaltılmış kan ürünü verilen kişilerde immünizasyon oranı %13.5'den %4'e kadar düşmüştür (37,38). Trombositlerin yüzeyinde sadece HLA sınıf I antijenleri bulunmaktadır ve eritrositlerinde retikülosit aşamasında üretilen HLA sınıf I antijenlerini yüzeylerinde eksprese ettikleri bilinmektedir. Trombosit süspansiyonlarında yapılan lökoreduksiyonun eritrosit süspansiyonlarına uygulanana oranla HLA immünizasyonunu azalttığı bilinmektedir. Eritrositlerin yüzeylerinde daha az HLA sınıf I eksprese edilmesine rağmen lökositler kadar HLA sınıf I antijeni içerdiği gösterilmiştir (39). Ayrıca eritrositlerin plazmada sirkülasyonunun trombositlere oranla daha uzun olması alıcı T hücrelerinin indirekt olarak uyarılmasını kolaylaştırmaktadır. Kan ürünü toplama ve saklama tekniklerindeki gelişmelere rağmen HLA'ya karşı antikor gelişimi halen sorun teşkil etmektedir.

Yoğun bir şekilde transfüzyon uygulanan hastalarda altta yatan hastalığa bağlı olarak bu antikorların oluşum sıklığı ve miktarı değişmektedir. Aplastik anemili hastalarda akut lösemili hastalarda olduğu gibi immün sistemin intrensek ve ekstrensek nedenlerle baskılandığı durumlara kıyasla daha sık ve fazla antikor

oluştugu bilinmektedir. Schiffer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tanı anındaki antikor titreleri ile kemoterapi ve transfüzyonlar sonrası antikor titreleri karşılaştırıldığında antikor titrelerinde artış olduğu ancak yoğun alloantijen maruziyetine karşın normal kontroller kadar artışın gerçekleşmediği tespit edilmiştir (40). Dutcher ve arkadaşlarının 1981 yılında yayınlanan çalışmasında da akut lösemili hastalarda anti-HLA antikor oluşumunun transfüze edilen trombosit süspansiyonu miktarı ile ilişkisi olmadığı bulunmuştur (41). Schoneville ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise antikor gelişimine genetik bir yatkınlık olabileceği düşünülmüştür. HLA DRB1\*15 taşıyan hastaların daha sık ve multipl HLA antikorları geliştirdiği gösterilmiştir (42). Aksine alloantijenler ile karşılaşmamış sağlıklı bireylerde de anti-HLA antikorların varlığı gösterilmiştir (6). Bu antikorların gelişim sürecine ilişkin net bir veri bulunmamaktadır.

Gebelik sonrası veya kan ürünü transfüzyonu sonrası oluşan antikorların plazmada bulunma süreleri de farklılık göstermektedir. Gebelik sonrası oluşan HLA antikorlarının uzun yıllar plazmada tespit edilebildiği bilinmektedir. Transfüzyon sonucu oluşan antikorların düzeyi ise 6 ay içerisinde düşmeye başlamaktadır. Gebelik sonrası oluşan bu antikorların fetal mikrokimerizm nedeni ile uzun süre üretildiği düşünülmektedir.

HLA uyumunun derecesinin ve çeşitli nedenlerle nakil öncesi ortaya çıkan anti-HLA antikorların varlığı özellikle solid organ nakillerinde rejeksiyon ve survi ile ilişkili bulunmuştur (8,43,44). Yine böbrek ve kalp nakli sonrası donör spesifik antikor üretiminin kronik antikor aracılı rejeksiyonda önemli olduğu gösterilmiştir (3,45). Anti-HLA antikorlar çeşitli yollarla allo HLA antijenlere sahip hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Kompleman aracılı lizis, antikor aracılı direkt sitotoksikite veya makrofajlar tarafından gerçekleştirilen fagositoz bu antikorların uygun HLA'ya bağlanması sonucunda aktive olan yollarıdır (46). Bu yolların aktive olması nakledilen dokunun destrüksiyonuna neden olmaktadır.

Takiplerinde yoğun transfüzyon gereksinimi olan hematoloji hastalarında da kür amacıyla allojeneik kök hücre nakli gündeme gelebilmektedir. Allojeneik hematopoietik kök hücre nakli olacak hastaların yaklaşık %30 kadarının HLA tam uyumlu vericisi bulunamaması nedeni ile son yıllarda haploidentik kök hücre nakli ve kordon kanı kök hücre nakli gündeme gelmiştir. Ayrıca HLA kısmi uyumlu

vericiden kök hücre nakli yapılmasıgraft *versus* lösemi etkisini artırarak tedavi etkinliğini artırmaktadır (47-49). Ancak bilinmektedir ki kök hücre nakli olan hastalarda HLA uyumsuzluğu korkulan komplikasyonlardan biri olan primer graft yetersizliği ile ilişkilidir (50). Allojeneik kök hücre naklinde graft rejeksiyonunun hazırlık rejimine rağmen hayatta kalan alıcıya ait T ve NK hücrelerinin verici antijenlerine karşı sitotoksik yanıtı sonucu ortaya çıktığı düşünülmekte idi (51-54). Yapılan preklinik çalışmalarda antikor aracılı rejeksiyonda graft yetersizliğinde rol aldığı gösterilmiştir (9,10). Pretransplant anti-HLA antikor varlığının kısmi uyumlu allojeneik hematopoietik kök hücre nakline etkisinin klinik sonuçları ise son 8-9 yılda önemli bir konu haline gelmiştir.

Kordon kanı kök hücre naklindekısmi HLA uyumsuzluğunun varlığı ve infüze edilen hücre sayısının diğer nakil alt tiplerine oranla daha az olması engraftman yetmezliği açısından risk oluşturmaktadır (55). Bu nakil alt tipinde donör spesifik antikorların varlığının tek veya çift ünite kordon kanı kök hücre nakline etkisine ilişkin bir çok çalışma yapılmıştır. Takanashi ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınlanan çalışmasına myeloablatif hazırlık rejimi sonrası tek ünite kordon kanı kök hücre nakli olan 386 vaka dahil edilmiştir. Bu hastaların 89'unda (%23.1) anti-HLA antikor pozitifliği saptanmıştır. Bu hastaların 20'sinde de donör spesifik antikorlar tespit edilmiştir. Bu çalışmada eşik MFI değeri >1000 olarak alınmıştır. Bu çalışmada donöre spesifik olmayan ve donör spesifik antikor bulunduran hastalarda nötrofil toparlanmasının antikor saptanmayan hastalara oranla antikor varlığından etkilendiği saptanmıştır. Trombosit toparlanması ise sadece DSA bulunduran hastalarda antikor bulundurmayanlara göre antikor varlığından negatif olarak etkilenmiştir (11). Cutler ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise çift ünite kordon kanı nakli olan 73 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların büyük çoğunluğu yoğunluğu azaltılmış hazırlık rejimi sonrası nakil olmuştur. Eşik MFI değeri >1000 olarak alınan grupta 11 hastada tek 7 hastada her iki üniteye karşı DSA varlığı tespit edilmiştir. Engraftman yetersizliği toplamda 9 hastada izlenmiştir. Antikor negatif, tek üniteye karşı pozitiflik veya her iki üniteye karşı pozitiflik olan hastalarda engraftman yetersizliği görülme yüzdeleri sırasıyla %5.5, %18.2 ve %57.1 olarak saptanmıştır. İnfüze edilen hücre miktarı da göz önüne alındığında DSA varlığı DSA saptanan hastaların MFI değerleri karşılaştırıldığında ise MFI düzeyi ile



engraftman yetersizliğinin ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada dikkat çeken başka bir nokta ise DSA bulunduran hiçbir hastanın grade II-IV akut GVHD geliştirmemiş olmasıdır (33). Ruggeri ve arkadaşlarının yayınlanan çalışmasında da DSA varlığının engraftman yetmezliği ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. MFI değeri yüksek olanlarda da graft yetersizliğinin daha sık olduğu ortaya konulmuştur (56). Brunstein ve arkadaşları ise çift ünite kordon kanı kök hücre nakli yapılan 126 hastanın 50 'sinde (%41) anti-HLA antikor pozitifliği saptanmıştır. Bu hastalarında 12'sinde tek üniteye karşı 6'sında da çift üniteye karşı DSA saptamışlardır. 12 hastanın 9'unda ve 6 hastanın 5'inde engraftman sağlanmıştır. Diğer çalışmaların aksine nötrofil toparlanması açısından antikor negatif ve donör spesifik olmayan antikor bulunduran hastalara kıyasla DSA varlığının anlamlı farklılık yaratmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada eşik MFI değeri >500 olarak alınmıştır. Tek üniteye karşı antikor bulunduran ve uzun dönem değerlendirmeye dahil edilebilen 10 hastanın 7'sinde ise DSA olmayan ünite engraftmanının izlendiği görülmüştür. Çift ünite kordon kanı nakillerinde DSA varlığının uzun dönemde ünite predominansında etkili olabileceği düşünülmüştür (57).

Haploidentik kök hücre naklinde de kordon kanı kök hücre nakli gibi DSA varlığının engraftman üzerine olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir (5,58,59). Bu çalışmalarda da benzer şekilde MFI değerinin graft yetersizliği ile ilişkisi gösterilmiştir. Ancak çalışmalarda graft yetersizliği ile ilişkili eşik MFI değeri konusunda ortak bir görüş yoktur (58,59). Yine bu çalışmalardan elde edilen dikkat çekici bir bilgi de DSA bulunduran ve DSA varlığına rağmen engraftman gerçekleşen hastalarda nakil sonrasında antikor düzeylerinin hızlı bir şekilde düşmesi idi. Engraftman gerçekleşmeyen hastalarda ise DSA düzeyleri pretransplant dönemde olduğu gibi nakil sonrasında da yüksek seyretmişti. Bu bilgiler ışığında nakil sonrası seri olarak DSA düzeylerine bakılmasının antikor aracılı graft yetmezliğini predikte edebileceği sonucu çıkarılmıştır (58).

Benzer şekilde tam uyumlu veya kısmi uyumlu akraba dışı kök hücre nakillerinde de DSA varlığının engraftman yetersizliğine neden olabileceği gösterilmiştir<sup>4</sup>. Tam uyumlu akraba dışı nakillerde de HLA-DP1'e karşı antikor varlığının graft yetmezliğini predikte ettiği gösterilmiştir (36).

Detrait ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise nakil öncesi saptanan donör spesifik olmayan anti-HLA antikorların varlığının nakil ilişkili mortaliteyi ve vasküler komplikasyonları artırdığı gösterilmiştir. Antikor pozitif olan hastaların %20'sinde nakil sonrası böbrek yetmezliği, %5'inde mikroanjiopati nedeni ile kardiyak hasar ve %3'ünde venookluziv hastalık gözlenmiştir. Ancak bu antikorların graft yetersizliği ve GVHD gelişimi ile ilişkisi bulunamamıştır (60).

Nakil sonrası alıcılarda ortaya çıkan DSA'ların böbrek ve kalp nakli sonrasında kronik rejeksiyona neden olduğu bilinmektedir (3,45). Allojeneik kök hücre nakli sonrasında ise anti-HLA antikorların ortaya çıkma nedeni, serumda pozitiflik süreleri ve uzun süre etkileri konusunda net bir veri bulunmamaktadır. Nakil sonrası anti-HLA antikor gelişimi alıcının ya da vericinin hafıza B hücre yanıtı sonucu görülebilir. Bir diğer teori ise vericinin HLA uyumsuz alıcıya veya alıcının nakil sonrası aldığı transfüzyonlara karşı denovo ürettiği antikorlardır (61). Yine donör kaynaklı anti-HLA antikorların kronik GVHD gelişimi ile ilişkisi olabileceği düşünülmektedir (62).

### 3. GEREÇLER ve YÖNTEM

Çalışmaya 29.12.2015-21.12-2017 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalına başvuran yeni tanı almış 80 akut lösemili hasta dahil edildi. Prospektif olarak kan örnekleri toplanan bu hastalardan takiplerine bilim dalımızda devam eden 35 hastanın 147 serum örneğinde sınıf I ve sınıf II'ye karşı antikor taraması yapıldı.

Çalışma öncesinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alındı (Tarih: 28 Aralık 2015 ve Karar No: 20-864-15). Çalışmaya alınan tüm hastalar, bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ile bilgilendirildi ve onamları alındı. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamayan veya ağır psikiyatrik bozukluğu olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmanın rutin incelemeler dışındaki bütçesi Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından karşılandı.

Hastaların demografik özellikleri, eşlik eden hastalıkları, varsa kullandıkları ilaçları kaydedildi. Daha önce transfüzyon alıp almadıkları, gebelik öyküsü olup olmadığı ve öykü var ise ilk trimester düşüklükleri de dahil olmak üzere gebelik sayısı öğrenildi. Hastaların indüksiyon tedavileri başlamadan önce serum örnekleri alındı ve takiplerinde 3 ayda bir olmak üzere son takip sürelerine kadar serum örnekleri toplanmaya devam edildi.

Hastaların 3 ayda bir toplanan serum örneklerinden sınıf I ve sınıf II'ye karşı antikor varlığı araştırıldı. 35 hasta takiplerinde allojeneik kök hücre nakli olsun olmasın beraber değerlendirildi. Aldıkları transfüzyon miktarının anti-HLA antikor oluşumuna etkisinin incelenmesi açısından hastalar 4 gruba ayrıldı. Negatif iken negatif kalmaya devam eden grup Negatif-Negatif (N-->N), negatif iken pozitifleşme izlenen grup Negatif-Pozitif (N-->P), pozitif iken pozitif kalmaya devam eden grup Pozitif-Pozitif (P-->P) ve pozitif iken bir sonraki örnekte negatifleşen grup Pozitif-Negatif (P-->N) olarak sınıflandırıldı. Tanı anı 0. ay olarak kabul edildi. 0-3, 3-6, 6-9, 9-12, 12-15, 15-18, 18-21 ve 21-24 aylar arası antikor negatif veya pozitif olma durumu karşılaştırıldı. Aynı sınıflama takiplerinde allojeneik kök hücre nakli olan hastalarda da yapıldı. Allojeneik kök hücre nakli olan hastalarda farklı olarak tanı anındaki sonuçlar nakil günü ile karşılaştırıldı, ayrıca nakil sonrası 1. ay da karşılaştırmaya dahil edildi.

Hastaların takip süresince aldıkları kan ürünü transfüzyonu miktarı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Serpil Akdağ ve İbni Sina Kan Merkezleri verilerinden öğrenildi. Aldıkları eritrosit ve trombosit süspansiyonu sayısı ve taze donmuş plazma sayısı karşılaştırılan serum örnekleri tarih aralığına uygun olarak kaydedildi.

Takipleri boyunca 35 hastanın 14'ü allojeneik kök hücre nakli oldu ve bu hastaların posttransplant 1, 3, 6, 9 ve 12. ay serumları beraber incelemeye alındı. Donör özellikleri, kök hücre kaynağı, hazırlık rejimi, GVHD profilaksisi ve infüze edilen CD34 miktarı kaydedildi. Ardışık olarak mutlak nötrofil sayısının  $>500/\text{mm}^3$  olduğu ilk gün nötrofil engraftmanı, trombosit sayısının desteksiz ardışık 3 gün boyunca  $>20.000/\text{mm}^3$  olduğu ilk gün trombosit engraftmanı olarak kabul edildi.

### **3.1.PRA Tarama ve Tanımlama**

Çalışmaya dahil edilen olgulardan aseptik teknikle alınan serum örneklerinde HLA sınıf I ve II'ye karşı IgG tipi antikor varlığı araştırıldı. Lifecodes LifeScreen Deluxe (Luminex® Screening Assay) ile çalışılarak taramaları yapıldı.

#### **3.1.1. Yöntem**

300 ul distile su plakların kullanılacak boş kuyularına eklendi ve kuyular ısıtıldı. 2-5 dakika sonra vakumlandı ve bu sırada tarama kitine ait boncuklar 30 saniye santrifüj edildi ve sonrasında vortexlendi. Her bir kuyuya sırasıyla 40 ul wash buffer, 12,5 ul serum örneği, 5 ul HLA I/II boncuklar eklendi. Plakların üzeri kapatılıp karanlıkta, oda ısısında 30 dakika karıştırıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında phycoerythrin içeren konjugat+wash buffer (her bir kuyu için 45 ul wash buffer+5 ul konjugat) hazırlanarak karanlıkta saklandı. 30 dakika inkübasyon sonrasında plakların üzeri açılarak 100 ul wash buffer her bir kuyuya eklendi. Plakların kenarından nazikçe aspire edildi. 250 ul wash buffer her bir kuyuya eklenerek aspire edildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Daha önce hazırlanan konjugat+wash buffer her bir kuyuya 50 ul olarak eklenerek plakların üzeri kapatıldı ve 5-10 dakikada bir nazikçe vortexlendi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Her bir kuyuya 150 ul wash buffer eklenerek karıştırıldı. İnkübe edilen plaklar Lifematch Fluoroanalyser kullanılarak antikorların bağlandığı boncuklar HLA tipine

göre sınıflandırıldı. Lifematch Fluoroanalyser iki lazer içeren mini digital akım analiz sistemidir. Sıvı lazerden geçtiğinde ilk geçişte boncuklar HLA tipine göre sınıflanır. İkinci geçişte phycoerythrin işaretli anti human IgG bağlı HLA moleküllerine göre boncuklar tarandı ve Quick-type programında analiz edildi.

Sınıf I veya II karşı MFI değeri >1000 olan örneklerde LIFECODES LSA™ Class I ve II kitleri kullanılarak tanımlama yapıldı. Tarama yöntemi ile aynı talimatlar izlenerek MFI sonuçları elde edildi. Tanımlama sonuçlarında da herhangi bir antijene karşı MFI değeri 1000 ve üzerinde olan hastalar pozitif olarak kabul edildi.

### **3.2.İstatistiksel Analizler**

Verileri analiz SPSS 11.5 Windows sürümünde yapılmıştır. Tanımlayıcı olarak nicel değişkenler için ortalama±ss ve ortanca (min-maks), nitel değişkenler için ise vaka sayısı (yüzde) verilmiştir. Nicel değişken için iki kategoriye sahip nitel değişkenin kategorileri arasında fark olup olmadığına, normal dağılım varsayımları sağlanmadığı için Mann-Whitney U testi kullanılarak bakılmıştır. Nicel değişken için ikiden fazla kategoriye sahip nitel değişkenin kategorileri arasında fark olup olmadığına bakmak için ise, normal dağılım varsayımları sağlanmadığı için Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır. İki kategorik değişken arasında ilişki olup olmadığı araştırılmak istendiğinde ise Ki Kare ve Fisher Exact testleri kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya 23'ü (%65.7) erkek, 12'si (%34.3) kadın toplam 35 akut lösemili hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların toplamda 147 serum örneği çalışıldı. 27 (%77.1) hasta AML, 8 hasta (%22.9) ALL [5 (%14.3) hasta ve 3 (%8.6) hasta T-ALL] tanısı aldı. Tanı yaşı için tüm hastalara ait ortalama±SS değerli 50.5±16.9 yıl olarak bulundu.35 hastadan 14'ü takiplerinde allojeneik hematopoietik kök hücre nakli oldu.

147 serum örneğinin 22'sinde sınıf I için MFI değeri 1000 ve üzerinde iken, 23'ünde sınıf II için MFI değeri 1000 ve üzerinde idi. Bu örneklerde tanımlama yapıldı. Tanımlamada ise 12 örnekte sınıf I için MFI değeri >1000 olarak izlenirken, 9 örnekte de sınıf II için MFI değeri >1000 olarak saptandı.

Tanı anında sınıf I'e karşı anti-HLA antikolar 31 (%88,6) hastada negatif saptanırken, 4 (%11,4) hastada pozitif olarak saptandı. Tanı anında sınıf II'ye karşı anti-HLA antikolar ise 32 (%91.4) hastada saptanmadı, 3 (%8.6) hastada ise pozitif olarak sonuçlandı. Tanı anında sınıf I'e karşı anti-HLA antikor saptanmayan hastalarda tanı anındaki yaş ortalama±SS 50.2±16.9 olarak izlenirken, antikor pozitifliği saptanan hastalarda 53.0±19.5 olarak bulundu. (p=0.760). Tanı anında sınıf II'ye karşı antikor saptanmayan hastalarda tanı anındaki yaş ortalama±SS 49.9±16.2 olarak izlenirken, antikor pozitifliği saptanan hastalarda 56.3±27.2 olarak izlendi. (p=0.541). Tanıda her iki sınıf antikor 2 (%5.7) hastada tespit edildi.

Tanıda sınıf I ve II için antikor negatif ve pozitif saptanan hastaların özellikleri tablo 4.1 ve tablo 4.2'de verilmiştir.

Erkek hastalarda tanı anında HLA sınıf I'e karşı antikor pozitiflik yüzdesi %4.3 iken gebelik öyküsü olan kadın hastalarda tanı anında HLA sınıf I'e karşı antikor pozitiflik yüzdesi %33.3 olarak bulunmuştur, gebelik öyküsü olmayan kadın hastalarda ise pozitif olan hasta yoktur. Erkek hastalarda tanı anında HLA sınıf II'ye karşı antikor pozitifliği olan hasta yok iken, kadın hastalarda tanı anında HLA sınıf II'ye karşı antikor pozitiflik yüzdesi gebelik öyküsü olanlarda %33.3 olarak bulunmuştur, gebelik öyküsü olmayan kadın hastalarda ise pozitif olan hasta yoktur.

Tablo 4-1: Hastaların Demografik Özellikleri-1

Değişkenler		Sınıf 1				p değeri
		Negatif		Pozitif		
		N	%	N	%	
Cinsiyet	Erkek	22	71.0	1	25.0	0.106 <sup>b</sup>
	Kadın	9	29.0	3	75.0	
Gebelik Öyküsü	Yok	25	80.6	1	25.0	0.044 <sup>b</sup>
	Var	6	19.4	3	75.0	
Kan Grubu	A Rh +	15	48.4	1	25.0	0.181 <sup>b</sup>
	B Rh +	6	19.4	2	50.0	
	AB Rh +	2	6.5	1	25.0	
	0 Rh +	8	25.7	0	0.0	
Tanı	AML	24	77.4	3	75.0	0.665 <sup>b</sup>
	B-ALL	4	12.9	1	25.0	
	T-ALL	3	9.7	0	0.0	
Eski Transfüzyon	Yok	8	25.8	2	50.0	0.561 <sup>b</sup>
	Var	23	74.2	2	50.0	
Son Durum	Ex	14	45.2	2	50.0	1.000 <sup>b</sup>
	Sağ	17	54.8	2	50.0	
Nakil Durumu	Nakil Olmayan	19	61.3	2	50.0	1.000 <sup>b</sup>
	Nakil Olan	12	38.7	2	50.0	

a:Chi-square test

b:Fisher exact test

Tablo 4-2: Hastaların Demografik Özellikleri-2

Değişkenler		Sınıf 2				p değeri
		Negatif		Pozitif		
		N	%	N	%	
Cinsiyet	Erkek	23	71.9	0	0.0	0.034 <sup>b</sup>
	Kadın	9	28.1	3	100.0	
Gebelik	Yok	26	81.2	0	0.0	0.013 <sup>b</sup>
	Var	6	18.8	3	100.0	
Kan Grubu	A Rh +	15	46.9	1	33.3	0.328 <sup>b</sup>
	B Rh +	7	21.9	1	33.3	
	AB Rh +	2	6.2	1	33.3	
	0 Rh +	8	25.0	0	0.0	
Tanı	AML	25	78.1	2	66.7	0.553 <sup>b</sup>
	B-ALL	4	12.5	1	33.3	
	T-ALL	3	9.4	0	0.0	
Eski Transfüzyon	Yok	9	28.1	1	33.3	1.000 <sup>b</sup>
	Var	23	71.9	2	66.7	
Son Durum	Ex	14	43.8	2	66.7	0.582 <sup>b</sup>
	Sağ	18	56.2	1	33.3	
Nakil Durumu	Nakil Olmayan	19	59.4	2	66.7	1.000 <sup>b</sup>
	Nakil Olan	13	40.6	1	33.1	

a:Chi-square test

b:Fisher exact test

Tanı anında sınıf I anti-HLA antikor varlığı için negatif ve pozitif kategorilerine ait değerler gebelik sayısı için ortalama±SS sırasıyla 3.7±4.2 ve 4.3±0.6 (p=0.401), sınıf II anti-HLA antikor varlığı için negatif ve pozitif kategorilerine ait ortalama±SS değerleri ise sırasıyla 2.9±3.3 ve 6.7±3.8 (p=0.124) olarak saptandı.

Gebelik öyküsü olan hastalarda gebelik sayısının tanıda negatiflik veya pozitiflik durumu ile arasında ilişki olup olmadığı değerlendirildi. Sınıf I antikor için negatif ve pozitif olan hastalarda gebelik sayısı ortalama±SS değerleri sırasıyla 5.5±4.1 ve 4.3±0.6 olarak bulundu. Sınıf I anti-HLA antikor varlığının gebelik sayısı



ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı ( $p=1.000$ ). Tanıda sınıf II antikor için negatiflik saptanan hastaların gebelik sayısı ortalama $\pm$ SS 4.3 $\pm$ 3.1, pozitiflik saptanan hastaların gebelik sayısı ortalama $\pm$ SS 6.7 $\pm$ 3.8 idi. Sınıf II anti-HLA antikor varlığının gebelik öyküsü olanlarda gebelik sayısı ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı ( $p=0.350$ ).

Tanı sonrası 3. Ayda 30 hasta takipte kaldı. HLA sınıf I için anti-HLA antikor 27 (%90.0) hastada negatif saptanırken, 3 (%10.0) hastada pozitif saptandı. Sınıf I antikor pozitifliği olan 3 hasta tanı anında pozitiflik saptanan hastalardı. Tanıda sınıf I'e karşı antikor saptanan erkek hasta ise tedavi başlangıcından 10 gün süre sonra mezenter iskemi nedeni ile ex oldu. Pozitiflik saptanan hastaların birinde tanı ve 3. ay serumunda aynı antikorlar izlendi. MFI değerlerindeki düşüş ise dikkat çekiciydi (MFI: 14266 vs. 8847). Bir diğer hastada ise her iki serum örneğinde de benzer antikorlar benzer MFI değerleri ile tespit edildi, tanı anındaki bazı antikorlar ikinci örnekte saptanmazken ikinci örnekte yeni antikorların ortaya çıktığı izlendi. Üçüncü hastada ise tanıda en yüksek 1830 en düşük 1339 MFI ile antikor pozitifliği izlendi. İkinci örnekte ise tanıdaki antikorların MFI değerlerinin 1000'in altına indiği ve en yüksek 10498 MFI ile A\*24:2'ye karşı saptanan MFI değeri >5000 olan 3 yeni antikor gelişimi tespit edildi. Tanıdan sonra 3. ayda sınıf II anti-HLA antikor ise 28 (%93.4) hastada negatif, 2 (%6.6) hastada pozitif olarak izlendi. Pozitiflik izlenen 2 hastada tanı anında da sınıf I ve sınıf II'ye karşı antikor tespit edilen ve sınıf I antikor pozitifliği 3. ayda azalma trendinde olan hastalar idi. Bu hastaların birinde ise sınıf I antikorların aksine sınıf II antikorların MFI değerinde belirgin değişiklik izlenmedi (20898 vs. 20462). Bu hasta 4 kür azasitidin sonrasında remisyona girmedi ve tanı sonrası yaklaşık 6. ayda sepsis nedeni ile ex oldu. Diğer hastada ise MFI değeri sınıf I'de olduğu gibi gerileme eğilimindeydi. Bu hastada indüksiyon tedavisi sonrasında remisyona girmedi ve erkek kardeşinden allojeneik kök hücre nakli oldu. Tanıda pozitiflik saptanan 1 hastada ise antikor saptanmadı. (Tanıda ve takiplerinde antikor gelişen hastalar bölüm sonunda tablo 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir.)

Tanıdan sonra 6. Ayda HLA sınıf I anti-HLA antikor takipte kalan 26 hastanın tamamında saptanmadı. 6. Ayda HLA sınıf II anti-HLA antikor için ise 24 (%92.3) hastada negatif ve 2 (%7.7) pozitiflik izlendi. Pozitiflik saptanan hastalardan birisi tanı anında herhangi bir sınıfa karşı antikor saptanmayan erkek hasta idi. En yüksek

MFI değeri 2122 olarak sonuçlandı. Hastada aynı zamanda AML açısından minimal rezidüel hastalık bulguları mevcuttu.

6. aydan sonra sınıf I veya II'ye karşı antikor pozitifliği saptanan hastaların tümü allojeneik nakil sonrası pozitiflik saptanan hastalardı. 9. ayda sınıf I antikor 21 (%95.5) hastada negatif, 1 (%4.5) hastada pozitif olarak izlendi. Pozitif saptanan hasta nakil sonrası üçüncü ayında olan erkek hasta idi. 9. Ayda sınıf II antikor ise 21 (%95.5) hastada negatif, 1 (%4.5) hastada pozitif saptandı. Pozitiflik saptanan bu hasta ise tanıda da her iki sınıfa karşı antikor saptanan ve nakil sonrası üçüncü ayında olan kadın hasta idi. Bu hastanın sonraki takip serumlarında antikor saptanmadı.

Tanıdan sonra 12. Ayda sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikor 15 hastanın tamamında negatif saptanmıştır. 15. Ayda takipte kalan 10 hastanın tamamında da HLA sınıf I ve II için antikor saptanmamıştır. 18 ayda takipte olan 5 hastanın tamamında sınıf I ve II'ye karşı antikor izlenmemiştir. 21. ay ve 24. ayda izlenen 1 hastada da her iki sınıfa karşı antikor saptanmamıştır.

Negatif-Negatif, Negatif-Pozitif, Pozitif-Negatif ve Pozitif-Pozitif gruplarında her bir grup için aldıkları ES ve TS miktarı açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Her 3 aylık periyot için hastaların aldıkları transfüzyon miktarları tablo 4.3 ve tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4-3:HLA Sınıf I Antikor için Grupların Aldığı Transfüzyon Miktarı

Değişkenler	Negatif-Negatif		Negatif-Pozitif		Pozitif-Pozitif		Pozitif-Negatif		p değeri
	Ort.±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	Ort.±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	Ort.±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	Ort.±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	
İlk 3 Ay ES	9.9±7.0	9.0 (1.0-33.0)			12.7±5.7	11.0 (8.0-19.0)			0.405
İlk 3 Ay TS	24.2±17.4	23.0 (1.0-64.0)			26.0±9.9	26.0 (19.0-33.0)			0.667
İkinci 3 Ay ES	4.8±3.4	4.0 (1.0-14.0)					2.0±0.0	2.0 (2.0-2.0)	0.180
İkinci 3 Ay TS	15.2±20.9	11.0 (1.0-91.0)					3.0±-	3.0 (3.0-3.0)	0.520
Üçüncü 3 Ay ES	4.8±3.9	4.0 (1.0-13.0)	6.0±-	6.0 (6.0-6.0)					0.330
Üçüncü 3 Ay TS	12.2±17.6	5.0 (1.0-66.0)	5.0±-	5.0 (5.0-5.0)					0.846
Dördüncü 3 Ay ES	7.7±7.2	6.0 (1.0-22.0)							
Dördüncü 3 Ay TS	30.7±25.8	36.0 (4.0-65.0)							
Beşinci 3 Ay ES	10.5±10.2	7.5 (1.0-29.0)							
Beşinci 3 Ay TS	31.1±38.2	19.0 (1.0-108.0)							
Altıncı 3 Ay ES	6.0±7.1	6.0 (1.0-11.0)							
Altıncı 3 Ay TS	30.0±-	30.0 (30.0-30.0)							
Yedinci 3 Ay ES	3.0±-	3.0 (3.0-3.0)							
Yedinci 3 Ay TS	7.0±-	7.0 (7.0-7.0)							
Sekizinci 3 Ay ES	7.0±-	7.0 (7.0-7.0)							
Sekizinci 3 Ay TS	35.0±-	35.0 (35.0-35.0)							

Tablo 4-4:HLA Sınıf II Antikor için Grupların Aldığı Transfüzyon Miktarı

Değişkenler	Negatif-Negatif		Negatif-Pozitif		Pozitif-Pozitif		Pozitif-Negatif		p değeri
	Ort.±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	Ort.±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	Ort.±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	Ort.±SS	Ortanca (Min.-Maks.)	
İlk 3 Ay ES	10.1±6.9	11.0 (1.0-33.0)			13.5±7.8	13.5.0 (8.0-19.0)			0.437
İlk 3 Ay TS	24.7±16.9	23.0 (1.0-64.0)			33.0±-	33.0 (33.0-33.0)			0.420
İkinci 3 Ay ES	4.1±2.4	3.0 (1.0-8.0)	14.0±-	14.0 (14.0-14.0)	2.0±-	2.0 (2.0-2.0)			0.179
İkinci 3 Ay TS	14.5±21.4	11.0 (1.0-91.0)	27.0±-	27.0 (27.0-27.0)	3.0±-	3.0 (3.0-3.0)			0.371
Üçüncü 3 Ay ES	5.0±3.9	4.0 (1.0-13.0)			3.0±-	3.0 (3.0-3.0)			0.559
Üçüncü 3 Ay TS	12.4±17.5	5.0 (1.0-66.0)			2.0±-	2.0 (2.0-2.0)			0.244
Dördüncü 3 Ay ES	7.7±7.2	6.0 (1.0-22.0)							
Dördüncü 3 Ay TS	30.7±25.8	36.0 (4.0-65.0)							
Beşinci 3 Ay ES	10.5±10.2	7.5 (1.0-29.0)							
Beşinci 3 Ay TS	31.1±38.2	19.0 (1.0-108.0)							
Altıncı 3 Ay ES	6.0±7.1	6.0 (1.0-11.0)							
Altıncı 3 Ay TS	30.0±-	30.0 (30.0-30.0)							
Yedinci 3 Ay ES	3.0±-	3.0 (3.0-3.0)							
Yedinci 3 Ay TS	7.0±-	7.0 (7.0-7.0)							
Sekizinci 3 Ay ES	7.0±-	7.0 (7.0-7.0)							
Sekizinci 3 Ay TS	35.0±-	35.0 (35.0-35.0)							

Takiplerinde allojeneik kök hücre nakli yapılan 14 hasta ayrı olarak tekrar analiz edilmiştir. Hastaların tanı anında toplanan serumları, nakil öncesi hazırlık rejiminden önce anti-HLA antikor pozitifliği, nakil günü ürün verilmeden önceki ve posttransplant takip sürelerince 1, 3, 6, 9 ve 12. aydaki antikor pozitifliği değerlendirilmiştir. 14 hastadan 2'sinin nakil sonrası 1. ay serumları incelemeye dahil edilmemiştir. Hastaların tanıları, kan grubu, verici cinsiyeti, kök hücre kaynağı, hazırlık rejimi, engraftman süreleri vs. gibi özellikler tablo 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Nakil olan 14 hastanın tanıda yaş ortalama±SS değeri 43.0±14.1 yıl idi. Tanıdan nakile kadar geçen süre ortalama±SS değeri 205.1±105.3 gün idi. Nakil yaşı ortalama±SS değeri ise 43.7±13.9yıl idi. Son takip yaşı ortalama±SS değeri ise 44.4±14.0 yıl idi.

Hazırlık rejimi olarak 3 hastaya (%21,4) yoğunluğu azaltılmış hazırlık rejimi (RIC) ve 11 hastaya (%78,6) myeloablatif rejim uygulandı. Hazırlık rejiminde ATG kullanılan hasta sayısı 6 (%42,9) idi. GVHD profilaksisi amacıyla siklosporin+mikofenolat mofetil, mikofenolat mofetil+takrolimus, metotreksat+siklosporin için 14 hasta sayısı sırasıyla 3 (%21.4), 2 (%14.3) ve 9 (%64.3)'dur. Allojeneik nakil olan hastaların 11'ine (%84,6) kök hücre kaynağı olarak periferik kan kök hücre nakli, 2'sine (%15,4) kemik iliği kök hücre nakli yapıldı. .

Cinsiyeti erkek olan 8 hastanın vericisinin 4'ünün cinsiyeti erkek, 4'ünün ise kadındır. Cinsiyeti kadın olan 6 hastanın vericisinin 3'ünün cinsiyeti erkek, 3'ünün kadındır. Hasta cinsiyeti ile kök hücre vericisinin cinsiyeti kategorilerinin oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (p=1.000).

Nakil olan hasta grubunda tanı anında HLA sınıf I antikor 12 (%85.7) hastada negatif olarak saptanırken, 2 (%14.3) hastada pozitif olarak izlenmiştir. Bu 2 hastada daha önce gebelik öyküsü olan kadın hastalardır. Tanı anında HLA sınıf II antikorları ise 13 (%92.9) hastada negatif olarak saptanırken, 1 (%7.1) hastada pozitif olarak izlenmiştir. Sınıf II'ye karşı antikor bulunduran 1 hasta ise sınıf I'e karşı da antikor bulunduran ve gebelik öyküsü bulunan kadın hastadır.

Nakil günü nakil ürünü verilmesinden önce alınan serumda 14 hastada sınıf I anti-HLA antikor saptanmaz iken, sınıf II anti-HLA antikor tanıdan itibaren pozitiflik bulunduran 1 hastada pozitif olarak izlendi.

Tablo 4-5: Allojeneik Kök Hücre Nakli Olan Hastaların Nakile İlişkin Özellikleri

No	Tanı	Nakilde Hastalık Durumu	Donör Tipi	HLA uyumu	KH Kaynağı	Hazırlık Rejimi	CD34 10 <sup>6</sup> /kg	Nötrofil Engraftmanı	Trombosit Engraftmanı	Akut/Kronik GVHD	Nakil Sonrası Hastalık Durumu	Son Durum
1	AML	Remisyon	AV	Tam	Pk	RIC	6.56	23	12	-/-	Nüks	Ex
2	AML	Rezidüel Hast.	AV	Tam	Pk	RIC	3.59	16	12	-/-	Nüks	Sağ
3	AML	Aktif Hast.	ADV	9/10	Pk	Ablatif	6.11	16	13	-/+	Nüks	Ex
4	AML	Rezidüel Hast.	AV	Haploidentik	Ki	Ablatif	2.68	23	-	+/-	Remisyon	Ex
5	AML	Remisyon	AV	Tam	Pk	Ablatif	7.85	14	13	-/+	Remisyon	Sağ
6	AML	Remisyon	AV	Tam	Pk	Ablatif	6.40	13	12	-/-	Nüks	Ex
7	AML	Remisyon	AV	Tam	Pk	Ablatif	5.80	21	17	-/-	Remisyon	Sağ
8	T-ALL	Rezidüel Hast.	AV	Tam	Pk	Ablatif	5.60	12	12	-/-	Nüks	Sağ
9	B-ALL	Remisyon	AV	Tam	Pk	Ablatif	6.70	14	12	+/+	Remisyon	Sağ
10	AML	Remisyon	ADV	9/10	Pk	Ablatif	5.19	20	12	-/+	Remisyon	Sağ
11	AML	Remisyon	AV	Haploidentik	Ki	Ablatif	1.00	-	-	-/-	Engraftman yetersizliği	Sağ
12	AML	Remisyon	ADV	Tam	Pk	RIC	8.00	14	*	-/+	Nüks	Sağ
13	AML	Remisyon	AV	Tam	Pk	Ablatif	6.05	17	14	-/+	Remisyon	Sağ
14	AML	Remisyon	AV	Tam	Pk	Ablatif	7.30	20	*	-/-	Remisyon	Sağ

\*Hastaların trombosit değerleri nakil günü ve sonrasında >20 bin üzerinde seyretmiştir.

-Hastalarda engraftman olmamıştır.

AV: Akraba verici, ADV: Akraba Dışı Verici, Pk: Periferik kan, Ki: Kemik iliği

Tablo 4-6: Allojeneik Kök Hücre Nakli Olan Hastaların ve Vericilerinin Özellikleri, Hastaların Nakil Öncesi ve Sonrası PRA durumları

No	Tanı	Alıcı Yaş	Donör Yaş	Cinsiyet (Donör/Alıcı)	Kan Grubu (Donör/Alıcı)	Donör Alloimmünizasyonu	Nakil Öncesi PRA	Nakil Sonrası 1. Ay PRA
1	AML	49	29	E/K	A+/0+	Yok	Negatif	Negatif
2	AML	40	41	E/E	0+/0+	Yok	Negatif	Negatif
3	AML	56	26	K/K	A-/A+	Var (Gebelik)	Negatif	-
4	AML	59	34	K/E	AB+/B+	Var (Gebelik)	Negatif	Pozitif
5	AML	27	21	E/K	B+/B+	Yok	Pozitif	Pozitif
6	AML	35	26	K/E	A-/A+	Yok	Negatif	Negatif
7	AML	57	54	K/E	A+/A+	Var (Gebelik)	Negatif	Negatif
8	T-ALL	45	52	E/E	B+/AB+	Yok	Negatif	Negatif
9	B-ALL	59	66	K/K	B+/B+	Var (Gebelik)	Pozitif	Pozitif
10	AML	32	44	E/E	A+/0+	Yok	Negatif	Negatif
11	AML	57	33	E/E	A+/A+	Yok	Pozitif	Negatif
12	AML	62	31	E/K	A+/0+	Yok	Negatif	Pozitif
13	AML	28	32	K/E	0+/0+	Var (Gebelik)	Negatif	Pozitif
14	AML	20	35	K/K	AB+/A+	-	Negatif	-

Posttransplant 1. ayda sınıf I'e karşı 8 (%66.7) hastada antikor saptanmaz iken 4 (%33.3) hastada antikor pozitifliği saptandı (4/9/12/13 numaralı hastalar). Bu 4 hastanın 3'ünde tanıda sınıf I ve II'ye karşı antikor saptanmamıştı. Tanıda da sınıf I HLA'ya karşı antikor saptanan 9 numaralı hastada ise nakil sonrası 1. ayda tanıda pozitiflik saptanan antikorların hedef aldığı antijenlerden tamamen farklı antijenlere karşı antikorlar izlendi. Aynı hastanın nakilden 2 ay önceki serumunda da nakil sonrası tespit edilen 2 farklı antijene karşı antikor saptanmıştı (A\*24:02: 10.498 vs. 771, A\*68:01: 941 vs. 1180). 9 numaralı hastadan daha sonra alınan 3 serum örneğinde de antikor saptanmadı, +22. günde akut GIS GVHD'si gelişen hastada tam donör kimerizmi izlendi. Hasta remisyonda, kronik cilt GVHD'si ile takip edilmektedir. 4 ve 13 numaralı hastaların ikisinin de vericisi kadındı. 4 numaralı hasta kızından haploidentik kemik iliği kök hücre nakli olurken, 13 numaralı hasta tam uyumlu kız kardeşinden periferik kan kök hücre nakli olmuştu. 4 numaralı hastada en yüksek MFI değeri 2345 iken, 13 numaralı hastada en yüksek 15304 idi. 4 numaralı hastada nakil sonrası 1. ayda %98 verici tipi kimerizm izlendi, akut GVHD ve fungal sinüzit nedeni ile +78. günde ex oldu. 13 numaralı hastanın ise nakil sonrası 3. ayda aynı antijenlere karşı antikor pozitifliği devam ederken kronik GVHD ile komplike oldu. 12 numaralı hasta ise akraba dışı erkek vericiden periferik kan kök hücre nakli yapılan kadın hasta idi. Bu hastada tek bir antijene karşı antikor gelişti ve MFI değeri 1020 idi. Daha sonraki 2 serum örneğinde antikor pozitifliği saptanmayan hastada eş zamanlı olarak kemik iliğinde rezidüel hastalık bulguları saptandı.

Nakil sonrası 1. ayda sınıf II'ye karşı sadece 5 numaralı (%8.3) hastada antikor pozitifliği saptandı. Hasta tam uyumlu erkek kardeşinden periferik kan kök hücre nakli olmuştu. Bu hastada tanıda da her iki sınıf için de antikor pozitifliği saptanmıştı. Tanıda, hazırlık rejiminden önce, nakil günü ve nakil sonrası 3. aya kadar sınıf II'ye karşı antikor pozitifliği devam etti. Tanıda en yüksek MFI değeri 9101 iken nakil günü 3990, nakil sonrası 1. ayda 5150 ve nakil sonrası 3. ayda 3968 olarak izlendi. Nakil sonrası 12 ay boyunca takibine devam edilen hastada sonraki 3 örnekte antikor pozitifliği saptanmadı. Takibinde nakil sonrası 6. ayda karaciğer



GVHD'si gelişen hasta halen tam donör kimerizmi ile remisyonda takip edilmektedir.

Posttransplant 3. ayda sınıf I ve II için 11 (%91.7) hastada antikor saptanmazken sınıf I ve sınıf II için 1'er (%8.3) hastada (5 ve 13 numaralı hastalar) antikor pozitifliği izlendi. Nakil sonrası 6. ayda takipte kalan 10 hastanın tamamında her iki sınıfa karşı antikor saptanmadı. Posttransplant 9. Ayda takipte kalan 7 hastada, posttransplant 12. ayda takipte kalan 5 hastada sınıf I ve II'ye karşı antikor saptanmadı.

Çalışmamızda takiplerinde GVHD gelişen hasta sayısı 7 (%50)'dir. Takibinde hastalık nüksü gelişen 6 hasta (%42.8) vardı. Bu 6 hastanın 5'inde takipleri boyunca antikor pozitifliği saptanmamıştı. Nakil olan 14 hastadan 4'ü (%28,6) ex oldu. Ex olan hastaların 3'ünde ilk nakil sonrası hastalık nüksü gelişmişti, bu hastalardan 2'si aynı vericiden tekrar allojeneik kök hücre nakli oldu.

Kök hücre kaynağı olarak periferik kan ve kemik iliği kullanılan hastaların tanıdaki HLA sınıf I antikor örnekleri ile nakil sonrası 1. Aydaki örnekleri negatif-negatif, negatif-pozitif, pozitif-negatif, pozitif-pozitif şeklinde gruplandırıldığında her bir grup için hasta sayısı sırasıyla 7 (%87.5) ve 1 (%12.5), 2 (%66.7) ve 1 (%33.3), 1 (%100.0) ve 0(%0.0), 1 (%100.0) ve 0(%0.0)'dır. Tanı anında ve posttransplant 1. ay'da sınıf I anti-HLA antikor grupları (negatif-negatif, negatif-pozitif, pozitif-negatif, pozitif-pozitif) ile kök hücre kaynağı kategorileri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ( $p=0.641$ ). Sınıf II anti-HLA antikor için ise kök hücre kaynağı olarak periferik kan ve kemik iliği kullanılan hastaların tanı ve nakil sonrası 1. ayda yapılan negatif-negatif, pozitif-pozitif gruplamasında ise hasta sayısı sırasıyla 10 (%83.3) ve 2 (%16.7), 1 (%100.0) ve 0(%0.0)'dır. Tanı anında ve posttransplant 1. ay'da sınıf II anti-HLA antikor grupları ile kök hücre kaynağı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ( $p=1.000$ ). Benzer şekilde hastaların aldığı trombosit veya eritrosit süspansiyonu miktarı arasında da tüm gruplar arasında her iki sınıf için anlamlı farklılık bulunamadı.

Hazırlık rejiminde ATG almayan ve alan hastalar için tanı ve nakil sonrası 1. ayda sınıf I anti-HLA antikor karşılaştırılması negatif-negatif, negatif-pozitif, pozitif-negatif, pozitif-pozitif şeklinde gruplandırıldığında her bir grup için hasta sayısı sırasıyla 3 (%37.5) ve 5 (%67.5), 2 (%66.7) ve 1 (%33.3), 2 (%100.0) ve 0 (%0.0), 1

(%100.0) ve 0 (%0.0)'dır. Gruplar ile ATG alan ve almayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (p=0.497). Tanıda ve nakil sonrası 1. ayda sınıf II anti-HLA antikor negatif-negatif, pozitif-pozitif gruplarında ise ATG almayan ve alan hasta sayısı sırasıyla 7 (%53.8) ve 6 (%46.2), 1 (%100.0) ve 0(%0.0)'dır. Her 2 grup ile ATG alan ve almayan hastaların oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (p=1.000).

Tablo 4-7: Sınıf I HLA'ya Karşı Saptanan Antikorlar

Hasta No	4		5				9			12	13		16		17
	7.ay	0.ay	3.ay	6.ay	7.ay	9.ay	0.ay	3.ay	7.ay	7.ay	7.ay	9.ay	0.ay	3.ay	0.ay
A*02:02															
A*02:05															
A*23:01															
A*24:02															
A*24:03															
A*33:01															
A*33:03															
A*36:01															
A*68:01															
B*07:02															
B*07:03															
B*08:01															
B*13:02															
B*27:08															
B*35:01															
B*38:01															
B*39:01															
B*44:02															
B*44:03															
B*45:01															
B*50:01															
B*51:01															
B*53:01															
B*54:01															
B*55:01															
B*57:01															
B*67:01															
B*78:01															
B*82:02															
B*15:12															

MFI<1000
  MFI 1001-5000
  MFI 5001-10000
  MFI >10001

7.ay: Posttransplant 1. Ay

Tablo 4-8: Sınıf II HLA'ya Karşı Saptanan Antikorlar

Hasta No	5					15	16		18
	0.ay	3.ay	6.ay	7.ay	9.ay	0.ay	0.ay	3.ay	6.ay
DRB1*01:02									
DRB1*04:01									
DRB1*04:02									
DRB1*04:03									
DRB1*04:04									
DRB1*04:05									
DRB1*11:04									
DRB1*08:01									
DRB1*13:03									
DRB5*02:02									
DPB1*01:01									
DPB1*04:01									
DPB1*15:01									
DQA1*01:03									
DQA1*06:01									
DQB1*02:01									
DQB1*02:02									
DQB1*03:03									
DQB1*03:01									
DQB1*06:01									
DQB1*06:03									

MFI<1000 MFI 1001-5000 MFI 5001-10000 MFI>10001

7.ay: Posttransplant 1. Ay

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışma grubumuzda tanı anında sınıf I'e karşı anti-HLA antikorlar 4 (%11,4) hastada pozitif olarak saptandı. Bu hastaların 3'ü gebelik öyküsü olan kadın hasta iken, 1'i daha önce transfüzyon ve transplantasyon öyküsü olmayan erkek hasta idi. Erkek hastada A\*33:01 (MFI: 3610) ve A\*33:03 (1193)'e karşı antikor pozitifliği izlenmişti. Morales ve arkadaşlarının sağlıklı erkek kan bağışçılarında yaptığı bir çalışmada sınıf I'e karşı antikorlar %42 vericide tespit edilmişti. Vericilerin hiçbirinin transfüzyon ve transplantasyon öyküsü yoktu ve bizim hastamızda da pozitiflik izlenen antijenlere karşı antikor izlenmişti. Bu antikorların bakteriyal veya viral ajanlara maruziyet sonucu gelişen doğal antikorlar olduğu düşünülmüştü, ancak donör seçimi ve transplantasyon sonuçlarına etkileri konusunda net bir karara varılamamıştı (6). Yine çalışmamızda tanı anında sınıf II'ye karşı anti-HLA antikorlar 3 (%8.6) hastada pozitif olarak sonuçlandı. Bu 3 hastada öncesinde gebelik öyküsü olan kadın hastalar idi. Bu hastaların serumlarında saptanan antikorların bazıları Morales ve arkadaşlarının çalışmasında saptanan ve doğal antikor olduğu düşünülen antikorlardı. Doğal antikorlardan biri olarak değerlendirilen DRB1\*04:04'e karşı hastamızda ölçülen MFI değeri 20774 idi. Morales ve arkadaşlarının çalışmasında ise ölçülen en yüksek MFI değeri 5000 idi. Gebelik öyküsü de olan bu hastalarda saptanan bu antikorların alloantikor olarak mı yoksa doğal antikorlar olarak mı değerlendirilmesi gerektiği ve saptanan antikorların anlamlı olarak kabul edilmesi için belirlenmesi gereken MFI eşik değeri yapılacak ileri çalışmalarla açıklık kazanabilecektir.

Erkek hastalarda tanı anında HLA sınıf I'e karşı antikor pozitiflik yüzdesi %4.3 iken gebelik öyküsü olan kadın hastalarda tanı anında HLA sınıf I'e karşı antikor pozitiflik yüzdesi %33.3 olarak bulunmuştur, gebelik öyküsü olmayan kadın hastalarda ise pozitif olan hasta yoktur. Erkek hastalarda tanı anında HLA sınıf II'ye karşı antikor pozitifliği olan hasta yok iken, kadın hastalarda tanı anında HLA sınıf II'ye karşı antikor pozitiflik yüzdesi gebelik öyküsü olanlarda %33.3 olarak bulunmuştur, gebelik öyküsü olmayan kadın hastalarda ise pozitif olan hasta yoktur.

Bu veriler daha önce yapılan çalışmalarda gebelik öyküsü olan kadınlarda %25-40 arasında antikor pozitifliği görülmesi ile uyumludur (63,64).

Gebelik öyküsü olan hastalarda gebelik sayısının tanıda negatiflik veya pozitiflik durumu ile arasında ilişki olup olmadığı değerlendirildi. Sınıf I antikor ve sınıf II anti-HLA antikor için gebelik öyküsü olanlarda gebelik sayısı ile pozitiflik görülme oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı ( $p= 1.00$ ,  $p=0.350$ ). Densmore ve arkadaşlarının kan bağışçısı kadın vericilerle yaptığı çalışmada ise gebelik sayısının antikor görülme oranını artırdığı gösterilmiştir (65). Çalışmamıza dahil ettiğimiz kadın hastaların canlı doğum yanı sıra 1. trimester düşük ve kürtajları ile ölü doğum hikayeleri de gebelik sayısına dahil edildi. Bizim çalışmamızda gebelik sayısı ile antikor pozitifliği arasında ilişki bulunmamış olması bununla ilişkilendirilebilir. Ancak 6-7. gebelik haftasından itibaren fetusa ait hücrelerin maternal dolaşımında bulunduğu bilinmektedir (66). Bu nedenle 1. trimester düşük ve kürtajlarının da gebelik öyküsü sorgulanırken dikkate alınmalıdır. Çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların immünsüpresif olması da sonucu etkilemiş olabilir.

Anti-HLA antikor oluşum sürecinde alloantijenlere maruziyetin önemli olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla tedavi sürecinde yoğun transfüzyon ihtiyacı olan lösemili hasta grubunda bu antikorların daha sık saptanacağı sonucu çıkarılabilir (67,68). Bizim çalışma grubumuzda ise transfüzyon sonrasında her iki sınıf için antikor pozitifliği görülme oranı ise %3.3-7.7 arasında değişmekte idi. Ayrıca transfüzyon miktarının antikor pozitifleşme oranı ile ilişkisi saptanmadı. Bu veriler Dutcher ve arkadaşlarının lösemili hasta grubunda yaptığı çalışma ile uyumlu idi (41). Allojeneik kök hücre nakli olacak hastalarda anti-HLA antikor görülme sıklığı ise %40'lara kadar çıkabilir (57). Bizim hasta grubumuzda da allojeneik kök hücre nakli olacak hastalarda nakil öncesi antikor pozitifliği %21'dir.

Leffell ve arkadaşlarının 2009'da yayınlanan çalışmasında kısmi HLA uyumlu vericiden allojeneik kök hücre nakli olan 140 hastanın nakil sonrasında 8'inde(%5.7) donör spesifik antikor (DSA)saptanmıştır. Nakil öncesi ise bu hastaların sadece birinde DSA pozitifliği saptanmıştır. Nakil sonrası DSA pozitifliği saptanan hastaların tamamı ise myeloablative olmayan hazırlık rejimi sonrasında haploidentik nakil olan (8/51) hastalardır. Allel düzeyinde uyumsuzluk olan hastaların ise

hiçbirinde DSA gelişimi izlenmemiştir. Alıcı spesifik antikor ise nakil sonrası sadece 1(%0.7) hastada pozitif saptanmıştır. Donör veya alıcı spesifik antikor dışında anti-HLA antikorlar ise 51 hastanın 15'inde izlenmiştir. Yine nakil sonrası HLA sınıf I'e karşı antikor titresinde daha fazla yükselme saptanmış, bu durum da nakil sonrası trombosit transfüzyonu ile gerçekleşen alloimmünizasyon ile ilişkilendirilmiştir (61). Bizim çalışma grubumuzda yer alan 14 hastanın tamamında nakil öncesi ve sonrası DSA saptanmamıştır. Leffell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer olarak ise nakil sonrası 1. ayda sınıf I HLA'ya karşı antikor pozitifliği sınıf II'ye göre daha fazla izlenmiştir (4 vs 1). Nakil sonrası trombosit transfüzyonları ortanca (min-maks) değeri pozitiflik saptanan hastalarda 5.0(2.0-25.0) ünite olarak saptanırken, nakil sonrası sınıf I'e karşı antikor saptanmayan hastalarda 4.0 (2.0-29.0) olarak saptanmıştır (p= 0.938). Çalışmamızda hasta sayısı az olmasına karşın nakil sonrası sınıf I'e karşı antikor pozitifliği açısından trombosit transfüzyon miktarı açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ancak hastaların donörlerinde antikor varlığına bakılmamış olması çalışmamızın kısıtlılıkları arasındadır.

Lapierre ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada periferik kan kök hücre nakli ve kemik iliği kök hücre nakli olan hastaların nakil öncesi ve sonrası anti-HLA antikor varlığı CDC ve akım sitometri (flow-PRA) ile değerlendirilmiştir. Akım sitometri yöntemi ile daha fazla hastada antikor pozitifliği saptanırken G-CSF ile mobilize edilmiş periferik kan kök hücre nakli olan hastalarda nakil sonrası 30. günde antikor pozitifliği anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (69). Bu durum her iki kaynak arasındaki hücre içeriği ile ilişkilendirildiği gibi, G-CSF'in CD45RO ekspresyonunu artırarak matür B hücrelerin plazma hücrelerine dönüşümünü artırması ile de ilişkilendirilmiştir (70,71). Bizim çalışmamızda ise nakil sonrası 1. ayda serumları bulunan periferik kan kök hücre nakli olan 10 hastanın 3'ünde (%30), kemik iliği kök hücre nakli olan 2 hastanın ise 1'inde (%50) antikor pozitifliği izlenmiştir. Lapierre ve arkadaşlarının aynı çalışmasında donör cinsiyetinin antikor pozitifleşme olasılığını artırıp artırmadığına dair yapılan analizde ise periferik kan kök hücre nakli olan hastalar için verici cinsiyetinin kadın veya erkek olması arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Ancak gebelik öyküsü olan kadın vericilerden ürün alan hastalarda pozitifleşme ihtimalinin erkek veya gebelik öyküsü olmayan kadın vericiden ürün alanlara göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (69). Bizim

çalışmamızda ise sınıf I HLA'ya karşı antikor saptanan 4 hastanın 3'ünün vericisi de kadındır. 3 vericinin de öncesinde gebelik öyküsü mevcuttur. Daha önce transfüzyon almamış akraba dışı erkek vericisinden nakil olan kadın hastanın ise öncesinde gebelik öyküsünün bulunması dikkat çekicidir.

Fasano ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınlanan çalışmasında yoğunluğu azaltılmış hazırlık rejimi (RIC) sonrası HLA tam uyumlu kardeş vericisinden G-CSF ile mobilize edilmiş periferik kan kök hücre nakli yapılan 16 hasta değerlendirilmiştir. Pretransplant anti-HLA antikor pozitifliği olan 8 hastanın 3'ünde nakil sonrası antikorların 100 gün ve daha uzun süre sebat etmesinin pretransplant MFI değerleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu 3 hastada nakil sonrası 100. ve 180. günlerde %100 verici tipi plazma hücre kimerizmi saptanmıştır. Nakil sonrası alıcı tip antikor pozitifliği devam eden bu hastalarda pozitifliğin hazırlık rejimine ve T hücre aracılı graft *versus* host etkisine dirençli plazma hücreleri ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (72). Bizim çalışmamızda da 2 hastada nakil sonrası pretransplant dönemde de saptanan antikorlar saptanmış, 1 hastada +29, diğer hastada ise +93. güne kadar antikor pozitifliği izlenmiştir. Her iki hastada da donör tip T hücre kimerizm izlenmiş, ancak plazma hücre kimerizmi değerlendirilmemiştir. Yine aynı çalışmada pretransplant anti-HLA antikor saptanmayan 8 hastanın 3'ünde *denovo* antikor gelişimi saptanmıştır. Bu 3 hastanın vericilerinin 2'sinde de alıcılarda gelişen antikorlar saptanmıştır ve antikor pozitifliğinin verici kaynaklı antikor üreten hücrelerin nakil esnasında aktarımı ile ilişkilendirilmiştir. Bu 3 hastanın 2'sinde trombosit transfüzyon refrakterliği gelişmiştir (72). Benzer şekilde çalışmamızda nakil sonrası 3 hastada (4/12/13 numaralı hastalar) *denovo* antikor gelişimi izlenmiştir. 4 numaralı hastada nakil sonrası trombosit transfüzyon refrakterliği gelişmiştir. 4 ve 13 numaralı hastaların vericileri gebelik öyküsü bulunan kadın donörler iken 12 numaralı hastanın vericisi transfüzyon ve transplantasyon öyküsü olmayan erkek donör idi.

Taniguchi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 123 kök hücre vericisinin serumları anti-HLA antikor pozitifliği açısından incelenmiş ve 1'i erkek toplam 7 donörde antikor pozitifliği saptanmıştır. Pozitiflik saptanan donörlerden kök hücre nakli yapılan 4 hastada da nakil sonrası sınıf I'e karşı, 4 hastanın 2'sinde de sınıf II'ye karşı vericilerinin antikorlarına benzer antikor pozitifliği saptanmıştır. 4

hastanın 2'si kemik iliğinden kök hücre nakli olurken 2'si periferik kan kök hücre nakli olmuştur. 4 hastada da antikorlar nakilden sonra 1. haftadan itibaren serumda görülmeye başlamış, 10-21. günler arası en yüksek seviyelerine ulaşmış ve sonrasında da tedricen azalmıştır. 4 vericinin 2'sinde alıcının HLA antijenlerine karşı da antikor pozitifliği saptanırken bu 2 alıcıda da bu antikorlar pozitifleşmemiştir (73). Bizim çalışmamızda nakil sonrası 1 ve 3. aylarda antikor pozitifliği devam eden 2 hastanın (5 ve 13 numaralı hastalar) MFI değerleri 1. ayda pik düzeye ulaşmış 3. ayda düşüş trendine girmiştir. 5 numaralı hastada nakil sonrası 6. ve 12. ayda antikor saptanmaz iken 13 numaralı hastanın çalışma sonlandırıldığına nakil sonrası 6. aya henüz ulaşmamış olması nedeni ile sonraki değerleri bilinmemektedir. Donörlerin anti-HLA antikor bulundurup bulundurmadığı ise bilinmemektedir.

Delbos ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise akraba dışı kısmi uyumlu allojeneik kök hücre nakli yapılan hastalarda donör kaynaklı antikorların kronik GVHD gelişimi ile ilişkisi olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada sınıf II MHC uyumsuzluğu daha fazla olması nedeni ile sadece sınıf II anti-HLA antikorların etkisi değerlendirilmiş ve çok yönlü analizde kronik GVHD'nin antikor bulunduran donörlerden kök hücre nakli yapılan hastalarda antikor bulundurmeyen donörlerden nakil yapılan hastalara göre daha sık ortaya çıktığı saptanmıştır. Akut GVHD açısından ise istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da antikor bulunduran donörlerden nakil olanlarda insidansın arttığı gösterilmiştir (62). Bizim çalışmamızda ise donörlerin antikor bulundurup bulundurmadığı bilinmemekle beraber pretransplant antikor saptanmayan ancak nakil sonrası yüksek MFI değeri ile antikor oluşumu gerçekleşen 13 numaralı hastamızda nakil sonrası kronik karaciğer ve GIS GVHD'si gelişmiştir. Kök hücre nakli vericilerinde bu antikorların varlığının pretransplant değerlendirilmesi konusunda ortak bir görüş olmamakla beraber yapılacak daha geniş çalışmalarla açıklık kazanabilecektir.

Hoshino ve arkadaşlarının 2012'de yayınlanan 3 vakalık olgu serisinde ise nakil sonrası gelişen antikorların minimal rezidüel hastalık (MRD) ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (74). Hastaların 3'ü de kordon kanı kök hücre nakli olan hastalardır. Nakil öncesi MFI değeri 1000-5000 arasında DSA'sı olan 2 hastanın engraftman sonrasında DSA'ları hızlı bir şekilde kaybolmuştur. Ancak nakil öncesi serumda da yüksek titrede pozitif olan ve nakil sonrasında da MFI değeri bir miktar



düşen antikorlar ise nüks ile beraber tekrar yüksek titrede pozitiflik göstermiştir ve 2. hastada salvage kemoterapi ile antikor titresinde tekrar düşüş saptanmıştır. Myeloablative hazırlık rejimi sonrası nakil olan bu 2 hastada antikor düzeylerinin hastalık durumu ile paralel seyrettiği gözlenmiştir. Son hastada ise nakil öncesi DSA saptanmamıştır. Ancak A\*24:02'ye karşı MFI değeri 18887 olan ve MFI değeri değişiklik gösteren multipl antikor düzeyleri nakil sonrasında daha düşük MFI düzeyinde pozitif olarak seyretmeye devam etmiştir. 4 yıllık takibinde ise bu hastada nüks izlenmemiştir. Son hastada nüks olmamasına rağmen antikor pozitifliğinin devam etmesi myeloablative olmayan hazırlık rejimi ile nakil hazırlığı yapılması ile ilişkilendirilmiştir (61). Yoshihara ve arkadaşlarının haploidentik kök hücre nakli olan hastalarda yaptığı çalışmada da engraftman gerçekleşen hastalarda nakil öncesi mevcut olan donör spesifik antikorların hızlı bir şekilde düşmeye başladığı graft yetersizliği olan hastalarda ise DSA'ların benzer titrede pozitif olduğu gösterilmiştir (58). Bizim çalışma grubumuzda ise tanıdan itibaren alloimmünize olan ve nakil sonrasında remisyonda takip edilen 2 hastanın uzun dönem takiplerinde antikor saptanmamıştır. Her iki hasta da myeloablative rejim sonrasında tam uyumlu kardeş vericilerinden nakil olmuşlardır ve pretransplant DSA saptanmamıştır. Takibinde posttransplant 1. ayda rezidüel hastalık saptanan hastada ise eş zamanlı olarak düşük titrede antikor pozitifliği saptanmış, ancak nakil sonrası 6. aya kadar ki takibinde antikor pozitifliği saptanmamıştır. Anti-HLA antikor pozitifliği veya negatifliğinin nakil sonrası engraftman, minimal rezidüel hastalık veya remisyon varlığı açısından takip kriteri olarak kullanılması açısından net veri bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın başlıca kısıtlılıkları hasta sayısının az olması, örneklemin heterojen olması ve sağlıklı kontrol grubunun olmamasıdır. Hastalara verilen kan ürünlerinin bağışçılarının bazılarının cinsiyet bilgilerinin olmayışı da kısıtlılıklar arasındadır. Yine kök hücre nakli olan ve nakil sonrası antikor pozitifliği saptanan hastaların vericilerinin serumlarının antikor varlığı açısından değerlendirilmemiş olması ve bu hastalarda plazma hücre kimerizminin çalışılmamış olması da diğer kısıtlılıklardır.

Akut lösemili hastaların immün sistemlerinin çeşitli nedenlerle baskılanmış olması nedeniyle yoğun transfüzyon almalarına rağmen bu hastaların alloantijenlere

karşı antikor yanıtlarının azaldığını düşündürmektedir. Buna rağmen tedavi sürecinde bazı hastalarda denovo antikor gelişimi görülmektedir. Transfüzyon sonrası hangi bireylerin bu antikorları geliştirmeye yatkın olduğu ise bilinmemektedir. Yine allojeneik kök hücre nakli sonrasında da pretransplant pozitiflik olan hastalarda nakil sonrası aynı antikorların pozitifliği ile birlikte yeni antikor gelişimi de izlenmektedir. Benzer şekilde pretransplant antikor saptanmayan hastaların nakil sonrası antikor geliştirdikleri görülmüştür. Pretransplant donör spesifik antikorların antikor aracılı graft rejeksiyonuna neden olduğu bilinmektedir. Ancak nakil sonrası ortaya çıkan antikorların posttransplant etkileri ile ilgili net veri bulunmamaktadır. Nakil sonrası gelişen bu antikorların klinik önemi, vericilerde antikor taraması yapılıp yapılmaması konusunda görüş birliği bulunmamaktadır. Bu antikorların oluşum mekanizmaları ve immün sonuçları açısından geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. ÖZET

### **Akut Lösemide Panel Reaktif Antikor (Anti-HLA Antikor) Oluşum Sürecinin Belirlenmesi ve Panel Reaktif Antikorların Kök Hücre Nakli Seyrine Etkisinin Saptaması**

**Giriş ve Amaç:** Doku uyumu antijenlerine (HLA) karşı gelişen antikorların (PRA) varlığının önemi solid organ transplantasyonu alanında bilinmektedir. Son yıllarda gündeme gelen kısmi uyumlu kök hücre nakillerinde de bu antikorların graft yetersizliği ile ilişkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada akut lösemili hastalarda tanı anında PRA insidansını belirlemek, uygulanan transfüzyon miktarının PRA oluşumu ile ilişkisini tespit etmek ve bu antikorların allojeneik kök hücre nakli yapılanlarda engraftman, rejeksiyon, GVHD gelişimine ve relapsa etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

**Metod:** Bu tek merkezli ve prospektif çalışmaya 35 yeni tanı akut lösemili hasta dahil edildi. Hastaların demografik özellikleri, daha önce transfüzyon alıp almadıkları, gebelik öyküsü ve öykü var ise ilk trimester düşükleri de dahil olmak üzere gebelik sayısı kaydedildi. Hastaların indüksiyon tedavileri başlamadan önce serum örnekleri alındı ve takiplerinde 3 ayda bir olmak üzere son takip sürelerine kadar serum örnekleri toplanmaya devam edildi.

**Bulgular:** Tanıda sınıf I'e karşı antikorlar 31 (%88,6) hastada negatif saptanırken, 4 (%11,4) hastada pozitif, sınıf II'ye karşı ise 32 (%91,4) hastada negatif, 3 (%8,6) hastada ise pozitif olarak sonuçlandı. Gebelik öyküsü olan kadınlarda her iki sınıf için tanıda antikor pozitifliği erkeklere ve gebelik öyküsü olmayan kadın hastalara oranla yüksek bulundu. Uygulanan transfüzyon miktarı ile antikor gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Nakil olan 12 hastanın 3'ünde ise +30. günde denovo antikor gelişimi izlendi.

**Sonuç:** Akut lösemili hastaların immün sistemlerinin baskılanmış olması nedeniyle yoğun transfüzyon almalarına rağmen alloantijenlere karşı antikor yanıtlarının azalmıştır. Nakil sonrası ortaya çıkan antikorların ise posttransplant etkileri ile ilgili veri bulunmamaktadır. Bu antikorların oluşum mekanizmaları ve immün sonuçları açısından daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Akut lösemi, alloimmünizasyon, panel reaktif antikor, allojeneik kök hücre nakli, engraftman yetmezliği

## 7. SUMMARY

### **The formation of PRA (panel reactive antibody) in acute leukemia and the determination of effect of PRA positivity on allogeneic stem cell transplantation.**

**Introduction and Purpose:** The importance of panel reactive antibodies in solid organ transplantation field is known. Also anti-HLA donor specific antibodies have been reported to be associated with graft failure in mismatched hematopoietic stem cell transplantation. The aim of this study was to determine the incidence of PRA positivity in newly diagnosed acute leukemia patients, the effect of amount of transfusions in the formation process of anti-HLA antibodies and the relationship between these antibodies with graft failure, GVHD and relapse.

**Methods:** This is single centered, prospective study, 35 acute leukemia patients were enrolled. Patients' demographic features, transfusion and pregnancy history including the first trimester losses and number of pregnancies were recorded. The serum samples were obtained before induction therapy and taken in every three months. HLA-specific antibodies were defined using single antigen bead assays on a Luminex™ platform with a positive cutoff value of 1000 normalized median fluorescence intensity (MFI).

**Results:** At the time of diagnosis, 4 (11.4%) patients were positive for class I antibodies and 3 (8.6%) patients were positive for class II antibodies. The antibody positivity in women with history of pregnancy were found much more than the men and the women without pregnancy. There was no relationship between the amount of given transfusions and the formation of PRA. In 3 of 12 patients, denovo antibodies were detected at 30 days posttransplant.

**Conclusions:** Because of the suppression of the immunity of patients with acute leukemia, antibody responses to alloantigens are reduced despite intensive transfusion. There are no data on the posttransplantation effects of the antibodies raised after transplantation. There is a need for broader studies of the mechanisms and immunological consequences of these antibodies.

**Key Words:** Acute leukemia, alloimmunization, panel reactive antibody, allogeneic stem cell transplantation, engraftment failure

## 8. KAYNAKLAR

1. DAUSSET, J. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol.***20**, 156–166 (1983).
2. Hod, E. & Schwartz, J. Platelet transfusion refractoriness. *Br. J. Haematol.***142**, 348–360 (2008).
3. Eng, H. S. *et al.* Donor human leukocyte antigen specific antibodies predict development and define prognosis in transplant glomerulopathy. *Hum. Immunol.***72**, 386–391 (2011).
4. Spellman, S. *et al.* The detection of donor-directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure. *Blood***115**, 2704–2708 (2010).
5. Ciurea, S. O. *et al.* High risk of graft failure in patients with anti-hla antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation. *Transplantation***88**, 1019–1024 (2009).
6. Morales-Buenrostro, L. E. *et al.* ‘Natural’ Human Leukocyte Antigen Antibodies Found in Nonalloimmunized Healthy Males. *Transplantation***86**, 1111–1115 (2008).
7. Terasaki, P. I. & Cai, J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: From association to causation. *Transplantation***86**, 377–383 (2008).
8. Gebel, H. M., Bray, R. A. & Nickerson, P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. *Am. J. Transplant.***3**, 1488–1500 (2003).
9. Taylor, P. A. *et al.* Preformed antibody, not primed T cells, is the initial and major barrier to bone marrow engraftment in allosensitized recipients. *Blood***109**, 1307–1315 (2007).
10. Xu, H. *et al.* Humoral immunity is the dominant barrier for allogeneic bone marrow engraftment in sensitized recipients Humoral immunity is the dominant barrier for allogeneic bone marrow engraftment in sensitized recipients. *Blood***108**, 3611–3619 (2011).
11. Takanashi, M. *et al.* The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood***116**, 2839–2846 (2010).
12. Crucitti, L. *et al.* Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia

- relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia***29**, 1143–1152 (2015).
13. Masuda, K. *et al.* Loss or down-regulation of HLA class I expression at the allelic level in freshly isolated leukemic blasts. *Cancer Sci.***98**, 102–108 (2007).
  14. Yamamoto, J. F. & Goodman, M. T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control***19**, 379–390 (2008).
  15. Siegel, R. Cáncer Statistics. *Ca Cáncer J.***67**, 7–30 (2017).
  16. Arber, D. A. *et al.* Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia: Guideline From the College of American Pathologists and the American Society of Hematology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* arpa.2016-0504-CP (2017). doi:10.5858/arpa.2016-0504-CP
  17. Vardiman JW, Thiele J, A. D. E. A. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood***114**, 937–952 (2008).
  18. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood***127**, 2391–2406 (2016).
  19. Vago, L. *et al.* Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.***361**, 478–488 (2009).
  20. Soslow RA, Baergen RN, W. R. B-lineage lymphoblastic lymphoma is a clinicopathologic entity distinct from other histologically similar aggressive lymphomas with blastic morphology. *Cancer***85**, 2648–54 (1999).
  21. Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, Brynes RK, Slovak ML, Murata-Collins JL, A. D. Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, French-American-British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. *Am. J. Clin. Pathol.***111**, 467–76 (1999).
  22. Moorman, A. V *et al.* A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood***115**, 206–214 (2009).
  23. Lee, K. H. *et al.* Clinical effect of imatinib added to intensive combination

- chemotherapy for newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia***19**, 1509–1516 (2005).
24. Fielding, A. K. *et al.* UKALLXII / ECOG2993 : addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood***123**, 843–850 (2014).
  25. Weng, A. P. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science (80-. )*.**306**, 269–271 (2004).
  26. Stengel, A., Schnittger, S., Weissmann, S., Kuznia, S. & Kern, W. TP53 mutations occur in 15 . 7 % of ALL and are associated with MYC - rearrangement , low hypodiploidy and a poor prognosis. *Blood***124**, 251–259 (2014).
  27. JL., M. 1980 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science (80-. )*.**210**, 621–623 (1980).
  28. Neefjes, J., Jongstra, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.***11**, 823–836 (2011).
  29. Game, D. S. & Lechler, R. I. Pathways of allorecognition: Implications for transplantation tolerance. *Transpl. Immunol.***10**, 101–108 (2002).
  30. Judith A. Owen, J. P. T-Cell Activation and the Two-Signal Hypothesis. in *Kuby Immunology* 357–366
  31. Bux, J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang.***89**, 1–10 (2005).
  32. Caro-Oleas, J. L. *et al.* Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.***27**, 1231–1238 (2012).
  33. Cutler, C. *et al.* Donor-specific anti-HLA antibodies predict outcome in double umbilical cord blood transplantation Donor-specific anti-HLA antibodies predict outcome in double umbilical cord blood transplantation. *Baseline***118**, 6691–6697 (2012).
  34. Kosmoliaptsis, V., Bradley, J. A., Peacock, S., Chaudhry, A. N. & Taylor, C. J. Detection of immunoglobulin g human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is

- compromised by the presence of immunoglobulin m human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation***87**, 813–820 (2009).
35. Zachary, A. A., Lucas, D. P., Detrick, B. & Leffell, M. S. Naturally occurring interference in Luminex® assays for HLA-specific antibodies: Characteristics and resolution. *Hum. Immunol.***70**, 496–501 (2009).
  36. Ciurea, S. O. *et al.* Donor-specific anti-HLA Abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Blood***118**, 5957–64 (2011).
  37. GROUP, T. T. T. R. A. L. T. P. S. To Prevent Alloimmunization and Refractoriness To Platelet Transfusions. *N. Engl. J. Med.***337**, 1861–1869 (1997).
  38. Vamvakas, E. C. Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of white cell reduction in preventing HLA-alloimmunization and refractoriness to random-donor platelet transfusions. *Transfus. Med. Rev.***12**, 258–270 (1998).
  39. Everett ET, Kao KJ, S. J. Class I HLA molecules on human erythrocytes. Quantitation and transfusion effects. *Transplantation***44**, 123–129 (1987).
  40. Schiffer, C. A., Lichtenfeld, J. L., Wiernik, P. H., Mardiney, M. R. & Joseph, J. M. Antibody response in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer***37**, 2177–2182 (1976).
  41. Dutcher, J. P., Schiffer, C. A., Aisner, J. & Wiernik, P. H. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose- response relationship. *Blood***57**, 395 LP-398 (1981).
  42. Schonewille, H. *et al.* HLA-DRB1 associations in individuals with single and multiple clinically relevant red blood cell antibodies. *Transfusion***54**, 1971–1980 (2014).
  43. Reinsmoen, N. L., Nelson, K. & Zeevi, A. Anti-HLA antibody analysis and crossmatching in heart and lung transplantation. *Transpl. Immunol.***13**, 63–71 (2004).
  44. Held, P. J. *et al.* The Impact of HLA Mismatches on the Survival of First Cadaveric Kidney Transplants. *N. Engl. J. Med.***331**, 765–770 (1994).
  45. Smith, J. D. *et al.* De novo donor HLA-specific antibodies after heart



- transplantation are an independent predictor of poor patient survival. *Am. J. Transplant.***11**, 312–319 (2011).
46. Barge, A. J., Johnson, G., Witherspoon, R. & Torok-Storb, B. Antibody-mediated marrow failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood***74**, 1477 LP-1480 (1989).
  47. Mielcarek, M. & Storb, R. Non-myeloablative hematopoietic cell transplantation as immunotherapy for hematologic malignancies. *Cancer Treat. Rev.***29**, 283–290 (2003).
  48. O'Donnell, P. V. *et al.* Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.***8**, 377–386 (2002).
  49. Kasamon, Y. L. *et al.* Greater HLA Disparity Is Associated with Reduced Risk of Relapse and Improved Event-Free Survival after Nonmyeloablative, HLA-Haploidentical BMT with Post-Transplantation High-Dose Cyclophosphamide. *Blood***112**, 150 LP-150 (2008).
  50. Anasetti, C. *et al.* Effect of HLA Compatibility on Engraftment of Bone Marrow Transplants in Patients with Leukemia or Lymphoma. *N. Engl. J. Med.***320**, 197–204 (1989).
  51. Murphy, W. J., Kumar, V. & Bennett, M. Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells. Differences in kinetics and target antigens recognized. *J. Exp. Med.***166**, 1499–1509 (1987).
  52. Schwartz, E., Lapidot, T., Gozes, D., Singer, T. S. & Reisner, Y. Abrogation of bone marrow allograft resistance in mice by increased total body irradiation correlates with eradication of host clonable T cells and alloreactive cytotoxic precursors. *J. Immunol.***138**, 460–465 (1987).
  53. Vallera, D. A. & Blazar, B. R. T cell depletion for graft-versus-host-disease prophylaxis: A perspective on engraftment in mice and humans. *Transplantation***47**, 751–760 (1989).
  54. Pei, J. *et al.* Generation of HLA-C-specific cytotoxic T cells in association with marrow graft rejection: Analysis of alloimmunity by T-cell cloning and testing of T-cell-receptor rearrangements. *Biol. Blood Marrow Transplant.***7**, 378–383 (2001).

55. Brunstein, C. G. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy : relative risks and benefits of double umbilical cord blood. **116**, 4693–4700 (2017).
56. Ruggeri, A. *et al.* Impact of donor-specific anti-HLA antibodies on graft failure and survival after reduced intensity conditioning-unrelated cord blood transplantation: A Eurocord, société Francophone d’Histocompatibilité et d’immunogénétique (SFHI) and Société Française de. *Haematologica***98**, 1154–1160 (2013).
57. Brunstein, C. G. *et al.* Anti-HLA antibodies in double umbilical cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***17**, 1704–1708 (2011).
58. Yoshihara, S. *et al.* Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant.***47**, 508–515 (2012).
59. Chang, Y. J. *et al.* Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies were associated with primary graft failure after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: A prospective study with randomly assigned training and validation sets. *J. Hematol. Oncol.***8**, 1–10 (2015).
60. Detrait, M. *et al.* Impact of anti-HLA antibodies on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcomes after reduced-intensity conditioning regimens. *Exp. Hematol.***40**, 792–799 (2012).
61. Leffell, M. S. *et al.* Incidence of humoral sensitization in HLA partially mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens***74**, 494–498 (2009).
62. Delbos, F. *et al.* Donor Immunization Against Human Leukocyte Class II Antigens is a Risk Factor for Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.***22**, 292–299 (2016).
63. Powers, A. *et al.* Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion***48**, 2549–2558 (2008).
64. Sachs, U. J. H., Link, E., Hofmann, C., Wasel, W. & Bein, G. Screening of multiparous women to avoid transfusion-related acute lung injury: A single centre experience. *Transfus. Med.***18**, 348–354 (2008).

65. Densmore, T. L., Goodnough, L. T., Ali, S., Dynis, M. & Chaplin, H. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion***39**, 103–106 (1999).
66. Brand, A. Immunological complications of blood transfusions. *Press. Medicale***45**, e313–e324 (2016).
67. Laundry, G. J., Bradley, B. A., Rees, B. M., Younie, M. & Hows, J. M. Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia. *Transfusion***44**, 814–825 (2004).
68. Idica A, Sasaki N, Hardy S, T. P. Unexpected frequencies of HLA antibody specificities present in sera of multitransfused patients. *Clin. Transpl.* 139–159 (2006).
69. Lapierre, V. *et al.* Increased presence of anti-HLA antibodies early after allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation compared with bone marrow transplantation. *Blood***100**, 1484–1489 (2002).
70. Tayebi, H. *et al.* Enhanced activation of B cells in a granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cell graft. *Br. J. Haematol.***114**, 698–700 (2001).
71. Jensen, G. S. *et al.* Selective expression of CD45 isoforms defines CALLA+ monoclonal B-lineage cells in peripheral blood from myeloma patients as late stage B cells. *Blood***78**, 711–9 (1991).
72. Fasano, R. M. *et al.* Persistence of recipient human leucocyte antigen (HLA) antibodies and production of donor HLA antibodies following reduced intensity allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.***166**, 425–434 (2014).
73. Taniguchi, K. *et al.* Donor-derived HLA antibody production in patients undergoing SCT from HLA antibody-positive donors. *Bone Marrow Transplant.***47**, 1338–1342 (2012).
74. Hoshino, T. *et al.* Persistence of anti-HLA antibody after cord blood transplantation engraftment in acute myelogenous leukemia: A potential marker of minimal residual disease, but not a significant factor in secondary humoral engraftment failure. *Int. J. Hematol.***97**, 535–539 (2013).