

T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ'DE DOKU GRUBU ANTİJENLERİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Arş. Gör. H. Hakan İNCE

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ekrem MÜFTÜOĞLU

DİYARBAKIR - 1994

TEŞEKKÜR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Bölümü İmmünoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans öğrenimim süresince devamlı yardımını, ilgi ve alakasını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof.Dr.Ekrem MÜFTÜOĞLU'na, tezimin hazırlanmasında gerekli ilgi, tenkit ve tavsiyeleriyle bana yardımcı olan hocam sayın Doç.Dr.Şeyhmus ERTOP'a, deneysel çalışmalarına yardımcı olan hocam sayın Yrd.Doç.Dr.Sabri BATUN'a ve hematoloji laboratuvarı çalışanlarına şükranlarımı arz ederim.

Tez çalışmam sırasında katkılarını ve ilgilerini gördüğüm başta D.Ü.Eğitim Fakültesi Dekanı hocam sayın Prof.Dr.Ali SÖNMEZ olmak üzere Fen Bilimleri Bölüm Başkanı hocam sayın Yrd.Doç.Dr.Hasan AKBAYIN'a ve Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma saygılarımı arz ederim.

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. KRONİK MYELÖSİTER LÖSEMİ	3
TANIM.....	3
TARİHÇE	3
ETYOLOJİ.....	4
İNSİDANS	5
PATOGENEZ	5
SEMPTOM VE BULGULAR.....	7
DOĞAL GİDİŞ.....	8
LABORATUVAR BULGULARI	9
KİMYASAL BULGULAR.....	11
KML'NİN DOĞASI.....	12
2.2. HLA (HUMAN LEUKOCYT ANTİGENS.).....	13
TANIM.....	13
TARİHÇE	13
HLA VE MHC	14
HLA ANTİJEN MOLEKÜLLERİ	16
CLASS I HLA MOLEKÜLÜ.....	17

CLASS II HLA MOLEKÜLÜ.....	21
HLA TAYİN YÖNTEMLERİ.....	23
3. MATERYAL VE METOD	
3.1. MATERYAL	25
3.1.1.KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	25
3.1.2. KULLANILAN CİHAZ VE ALETLER.....	25
3.1.3. KULLANILAN BİYOLOJİK MATERYAL.....	27
3.2. METOD	27
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇLAR.....	37
7. ÖZET	38
8. KAYNAKLAR	39

1. GİRİŞ

Kronik myelositer lösemi için, allogeneik kemik iliği nakli yakın zamana kadar tek küratif tedavi metodu olarak görülmekteydi (1,2,3). Ancak olguların 50 yaşının altında olması ve uygun HLA doku grubunun bulunması gereklidir. Son birkaç yıldan beri de interferonların inhibitör etkisinin olduğu gösterildi (4). Deneysel ve klinik çalışmalar insanın kendinden olanı olmayandan ayırmasını sağlayan tanıma düzeninde en önemli rolü, doku uyuşum antijenlerini belirleyen sistemin (=MHC = Major Histocompatibility Complex) oynadığını göstermiştir. Başta böbrek ve kemik iliği olmak üzere transplantasyonları günümüzde artık bir araştırma olmaktan çıkıp, olağan tedavi yöntemleri içinde yerini alması HLA antijenlerinin önemini arttırmıştır (5,6). Diğer yandan HLA moleküllerinden antijen sunulumundaki önemi ve seçiciliği, HLA antijenlerini kodlayan genetik bölgenin immün yanıt özelliklerimizi belirlemedeki önemli rolü daha iyi anlaşılmıştır (7,8,9,10).

KML'li olguların büyük çoğunluğunda hastalık, hayatın 3. ile 5. dekatları arasında ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığın, pksripotent hemotopoietik stem hücre düzeyinde klonal neoplastik transformasyon sonucunda ortaya çıktığı kanıtlanmıştır (11,12). Sonuçta, kemik iliği ve periferik kanda myeloid hücrelerde aşırı proliferasyon ile akümülyasyon meydana gelmektedir. Bazen de blastik hücre oluşumuna rastlanmaktadır (13). Hastaların %90'ından fazlasında 9. ile 22. kromozom arasında resiprokal translokasyon ile karakterize olan Philadelphia kromozomu pozitifdir (14).

KML, genellikle iki farklı klinik faza doğru gidiş gösterir. Kronik fazda genellikle 3-6 ayda sonlanan akut (akselere veya blastik) fazla biter (15). Bu fazda da, ateş, ağırlık kaybı, dirençli splenomegoli, özellikle blast ve promyelositer hücrelerin artması ve klonal özel sitogenetik değişiklikler saptanır (16).

Bu alışmada, Kronik Myelositer Lösemi olgularında, insan Doku Antijenlerinin (HLA), belli bir uygunluk taşıyıp taşımadığı kontrol edilmiştir. Yapılan bu araştırmalar sonucunda Kronik Myelositer Lösemi tanısı koyabilmek amacıyla Doku Grubu tayini istenen bir hastanın uygun antijenleri karşılaştırılarak o kişinin bu hastalığa yakalanma riskinin belirlenmesine çalışılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ

TANIM

Kronik Myelositer Lösemi (KML), anemi, yüksek kan beyaz küre sayısı ile granülositoz, trombositoz ve granülositlerin immatüritesi ile karakterize, ileri derecede dalak büyüklüğü ile seyreden bir hematopoyetik kök hücre hastalığıdır.

TARİHÇE

1845 yılında İskoçya'da Bennet ile Almanya'da Virchow dalak büyüklüğü, ağır anemi ve kanda granülosit konsantrasyonunda ileri derecede artışla karakterize olguların otopsi raporunu yayınladılar. Daha sonra Craige ve diğerleri ile 1847'de yine Virchow, "Leukemia" tanımı kullandı. 1878 de Neumann için yalnızca normal kan hücrelerinin üretim yeri olmadığı, aynı zamanda lösemik hücrelerinde kaynağı olduğunu ileri sürerek, "Myelogenous Leukmia" tanımını kullandı. 1960 yılına kadar çeşitli klinik ve laboratuvar araştırmalar artarak devam etti, ancak, aynı yılda Nowell ve Hungerford iki hastada 21.ya da 22.kromozomun uzun kolunda kopma olduğunu rapor ettiler ve Philadelphia kromozomu olarak isimlendirdiler. Daha sonra Rowley tarafından daha sensitif metodlar kullanılarak 22. kromozomun kopan parçasının 9. kromozomla resiprokal translokasyon oluşturduğu ortaya çıkarıldı.

ETYOLOJİ

Genellikle KML'de suçlayıcı bir ajan bulunamaz. Ancak ionize radyasyona maruziyet KML'nin oluşumunda arttırıcı bir risk faktörü olarak görülmektedir. 1945 yılında Japonya'da atom bombasına maruz kalanlardan, yaşayanlarda KML insidansında artış gözlenmiştir. Bu artış genellikle ekspojudan sonra 5-12 yıl içinde pik yapmış ve hastalık gelişimin dozla ilgili olduğu görülmüştür. Rölatif risk şu anda düşmüştür, fakat hala Japonya için bu oran umulandan yüksektir. Yine İngiltere'de Ankilozan Spondilit ve Servikal Kanser için radyasyon tedavisi görenlerde KML sıklığı artmıştır. Ankilozan Spondilit'te ortalama latent periyot 4 yıl iken (ki bunlardan lösemi geliştirenlerin %20'si KML idi) . Servikal Kanserlerde ortalama 9 yıl (bunların %30'u KML idi) ve Japonya'da da ortalama süre 11 yıl olup, lösemik hastaların %30'unda KML gözlenmiştir. 1940 yılından önce yeterli korunma tedbirleri olmayan radyoterapistlerde de myeloid lösemi gelişti, ancak son çalışmalarda bu tür bir gelişim yoktur.

Kimyasal lökomojenlerden bir suçlayıcı neden olarak herhangi bir ajanın identifikasyonu yapılamamıştır. Benzen Akut Myeloplastik Lösemiye yol açarken KML'de arttırıcı bir riski yoktur. Ayrıca diğer kanser türlerinin radyasyon ve/veya alkile edici ajanlarla tedavisini takiben gözlenen sekonder lösemiler arasında KML gözlenmemektedir. KML'li olgularda daha çok HLA Cw3 ve Cw4 doku gruplarının gittikçe artan bir sıklıkla gözleniyor olması, bu lösemi için yatkınlık oluşturduğu düşüncesinin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

İNSİDANS

KML, ABD'de tüm lösemik vakaların 1/5'ini oluşturmaktadır. Her yıl 100.000 de bir ya da iki kişi KML tanısı almaktadır ve erkeklerde kadınlara göre hafif bir yükseklik söz konusudur. Bu insidans birçok dekatta değişmeden kalmıştır. KML yaşla artış göstermektedir ve ortalama tanı yaşı 45 ile 50 dir. 60 yaşının üzerindeki olgular kötü prognoza sahiptirler. KML'de belli ailelerde sıklık olup olmadığı araştırılmış ancak bir birliktelik gösterilememiştir.

PATOGENEZ

KML bir kök hücrenin malign transformasyonu sonucu oluşur. Hastalık akkiz olup somatik mutasyon sonrası meydana gelir. Çünkü bu hastalığa yakalananların identik ikizleri ile annelerinde ne Ph1 kromozomu taşıyıcılığı ne de hastalık gelişimi söz konusu değildir. KML' nin tek bir kök hücrenden kaynak aldığını gösteren bulgular şunlardır:

1. Kırmızı kürelerde, nötrofillerde, eozinofiller, bazofiller, trombositler ve monositlerde tek bir G6PDH izoenzimi saptanırken KML'li kadınlarda fibroblast ya da diğer somatik hücrelerde izoenzim A ve B için heterozigottur.

2. Eritroblastlarda nötrofilik, eozinofilik ve bazofilik granülositlerde, makrofajlarda ve megakaryositlerde Ph1 kromozomunun saptanması tek bir kök hücreden kaynak aldığını düşündürmektedir.

3. Turner Sendromunda seks kromozomu için mozaik formunun bulunmaması, bu düşünce lehinedir.

4. KML'li farklı olgularda 22. kromozomun kırılma noktasında farklı varyasyonlar gösteren moleküler çalışma yanında, aynı olguda aynı kırılma noktalarının saptanması.

5. 9.ya da 22.kromozom çifti içinde 9.ya da 22.kromozoma yapısal olarak benzemeyen bazı olgu analizlerinde her bir hücrede yalnızca bu kromozomlarda saptanan Ph kromozomu varlığı tespit edilmiştir.

6. Kronik Faz KML'de eritropoez, granülositopoez, eozinofilopoez, bazofilopoez, monositopoez ile trombositopoez vardır, yani tüm seriler tutulmaktadır.

Lösemik transformasyon, özellikle granülositik progenitorlarda olmak üzere progenitor populasyonunda belirgin bir artış ile beraber olguların belirgin bir artış ile beraber progenitorların regülasyona azalan hassasiyeti ve progenitor hücrelerin matürasyonunda bozulmasıyla sonuçlanır. Granülosit progenitorlarının proliferatif kapasitesi normal hücrelere kıyasla azalır. Bundan dolayı ilik ve kanda progenitor hücre populasyonu granülositopoezdeki artışa göre çok daha fazla çoğalış gösterir. Oysa progenitorlar, normal progenitorlara göre çok parlak fakat açık renklidir, fakat, bir onkofetal proteini andıran hepatikfetal granülopoietik progenitorlara benzemektedir. Bununla beraber, kültürde, granülosit progenitorlarının matürasyonu normale benzemektedir. Total kan granülosit havuzunun belirgin artışı, uzamış intravasküler dolaşım zamanının daha az olmak üzere, özellikle granülositopoezde total artışın bir sonucudur.

Eritrosit prokürsör matürasyonu bazofilik eritroblast evresinde bloke edilmiştir ve eritropoezin bozulmasının yaygınlığı total beyaz küre sayısı ile ters orantılıdır. KML'nin patogenezinde çelişen bir noktada hastalığın devamında splenik hematopoezin rolüdür. Dalakta tam otonom hematopoez varlığının olup olmadığı açık değildir. Yalnız splenik radyasyon alan hastaların uzamış remisyonu ve splenik hematopoez kinetik çalışmaları KML'nin lökomogenezde dalağın primer ya da koprimer rolü olduğuna dair düşüncelere yol açmıştır.

SEMPTOM VE BULGULAR

KML'li çoğu asemptomatik hasta diğer hastalıklar değerlendirilirken veya günlük rutin fizik muayene ile tesadüfen tanı alınır. Bu olgularda genellikle tanı zamanında beyaz küre sayısı rölatif olarak düşük olabilir. Beyaz küre sayısı ile dalak büyüklüğü birbirine paralelizm gösterebilir. Yüksek beyaz küre ve büyük dalak daha fazla semptom verir.

KML'nin semptomatolojisi genellikle nonspesifik olup anemiye, dalak büyüklüğüne, artan bazal metabolizmanın hızına sekonderdir. Fakat çoğu hasta asemptomatiktir ya da hafif semptom verirler. Halsizlik, bitkinlik, ağırlık kaybı, kolay doyum hissi, sol kadranda dolgunluk hissi esas semptomlardır. Daha az sıklıkta, kanama (trombositopeni ya da trombosit fonksiyon bozukluğ) ya da tromboz (trombositoz veya belirgin lkositozda) oluşur.

Serum rik asit düzeyi sıklıkla tanı esnasında yükselmiştir ve akut gut artriti tedaviyi takiben oluşabilir. Bazofil hücre kitlesi ile ilgili olarak yükselir. Kan histamin düzeyi üst gastrointestinal sistemde kanamaya neden olabilir. Nötrofil fonksiyonları genellikle normaldir, ya da hafif azalmış olabilir; nötrofil sayısı belirgin lde artmıştır, bundan dolayı enfeksiyonlar tanı sırasında nadirdir. Başağrısı, kemik ağrısı, atralji, splenik infarktsten kaynaklanan ağrı ve ateş erken dönemde daha az sıklıkta saptanır. Fakat hastalık ilerledikçe daha sık gözlenir. Priapizm özellikle belirgin lökositoz ve trombositoz olan olgularda kaydedilmiştir. Lkostatik semptomlar arasında dispne, sersemlik, koordinasyon kaybı ya da konfüzyon yanında pulmoner ya da serebral damarlardaki stazada neden olabilir. Bu semptomlar benign fazda değil de daha çok daha geç dönemde (akselere veya blastik fazda) ortaya çıkar. Bütün semptomlar efektif tedavinin bir sonucu olarak beyaz küre sayısının azalması ve dalağın küçülmesi ile kaybolur.

DOĞAL GİDİŞ

Olguların %90'ından fazlası benign gidiş gösterir. Bu dönemde tedaviyi takiben anormal kan bulguları ile birlikte fizik bulgular düzelir. Elde edilen bu tatmin edici cevap geçicidir. Tüm olguların gidişatı sonunda farklı bir davranış içine girerler. Çok sıklıkla akut lösemiye benzeyen blastik krize girerler. Bu başlangıç ani olabilir, yalnız bazende beyaz küre sayısının 20.000 civarında tutulmasında güçlük oluşur, giderek artan bir şekilde dalak ve karaciğerin büyümesi, nodların kemiğin ve diğer organların infiltrasyonu periferik kanda blastik hücreler ve bazofillerin ortaya çıkması, anemi ve/veya trombositopeni gelişimi ya da ateş, halsizlik ve ağırlık kaybının oluşu ile progressif gidiş gösterir. Bu tablo KML'de akselere faz olarak kabul edilir ve iliğin yeniden değerlendirilmesini gerektirir. Bu fazda blast ile bazofil sayısının %5-29 civarında olduğu görülür. Kemik iliği aspirasyonu güç olabilir, çünkü, KML sonrası myelofibroзда gelişebilir. Ayrıca ilikte myeloid lineage'te ve diğer serilerde de myelodisplastik değişimler gözlenebilir Ph1'a ek olarak akselere fazda diğer kromozomal anormalliklerde gözlenebilir. Blastik krizde de blastik hücrelerin periferik kan ya da kemik iliğinde miktarı %30'un üzerindedir.

Akselere ya da blastik faza doğru gidiş olduğu zaman hasta 2-4 hafta içinde değerlendirilmelidir. Çünkü kan ve kemik iliğindeki blastlar özellikle hidroküre ya da interferon tedavisinin kesilmesinden sonra blastlar artabilir. Hastaların blastik ya da akselere fazda olduğunu değerlendirmek çok önemlidir. Çünkü prognoz ona göre değişmektedir.

KML'de akselere ya da blastik faz gelişimi tanı esnasında ilk iki yıl içinde oldukça nadirdir(yıl başına %10) Ancak Kemik İliği Transplantasyonu gibi tedaviler kullanılmadığından giderek artış gösterir ve yıl başına %15-20 gibi bir rakam oluşur.

LABORATUAR BULGULARI

KAN

En belirgin bulgu lökositozdur. Ortalama 100.000 civarında saptanmasına karşın bu sayı 10.000 ile 1.000.000/ml arasında değişir. Özellikle belirgin olan seri nötrofiller olup bu seride de özellikle segmente nötrofil ile myelosit kategorilerinde artış gözlenir. Promyelosit ve mleyoblast blastik kriz hariç genellikle küçük bir miktarı teşkil ederler. Eozinofiller ve bazofiller tanı sırasında çarpıcı bir yükseliş gösterebilirler. Monositler hafifçe artmış olabilir (özellikle Kr. Myelomonositer Lösemide). Hem helper hem de supressor T lenfositlerinde olmak üzere T lenfositlerinde artış saptanır. B lenfositlerinde artış yoktur. Bazı yayınlarda özellikle tedavi edilmeyen olgularda lökositlerin sayısında siklik varyasyonlar kaydedilmiştir. Bu varyasyon sayılarda 2-4 aylık sürelerde artış ve azalış ile karakterizedir. Bu da anormal stem hücreden kaynaklanmaktadır. Retikülosit düzeyi normaldir veya hafifçe artmış olabilir. Yine çekirdekli eritrositlerin sayısında artış gözlenir. Eritrositler genellikle normositer normokromdur. Otoimmün hemolitik anemi ve trombositopeni nadirdir. Fakat trombositoz vakaların çoğunda saptanır.

KML'li olguların %90'ının üzerinde lökosit alkalen fosfataz (LAP) aktivitesinde azalma ya da kaybolması söz konusudur. Aktivite nötrofil sayısı iyice azaldığı zaman veya tedavi sonrası ya da enflamasyon veya enfeksiyon varlığında normale döner ya da artar. LAP'ın azaldığı diğer durumlar arasında Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri, Hipofosfatazia, Myeloid Metaplazili olguların 1/4'ünde sayılabilir. Öteyandan arttığı haller arasında, P.Vera, gebe kadın, M.Metaplazili %25 olgu ve enfeksiyon ve enflamasyon söylenebilir. Anemi normokrom normositik olup aneminin ağırlığı lökositozun fazlalığı ile yakından ilgilidir.

KML'li hastalarda Naturel Killer Aktivitesi defektiftir ve in vivo olarak bu hücrelerin maturasyonunun azalmasından kaynaklanmaktadır.

Nötrofillerin fonksiyonel olarak anormaliteleri hafif düzeydedir (adezyon, emigrasyon ve fagositoz). Bu yüksek nötrofil sayısı ile kompanse olmaktadır ve hastalar enfeksiyona yatkın değillerdir.

Trombosit disfonksiyonu oluşabilir, ancak bu spontan kanamalara yol açmaz. Epinefrin ile oluşturulan trombosit iki dalga agregasyonunda azalma vardır ve storage poolda da adenozin nükleotidlerinde yetersizlik saptanır.

KEMİK İLİĞİ

İlik belirgin ölçüde hipersellülerdir ve iliğin %75-90'ı ilik hacmi tarafından doldurulmuştur, yağ belirgin ölçüde azalmıştır. Granülositopoez dominant olup E/M oranı 1/30'a kadar yükselebilmektedir. Eritropoez genellikle azalmışken, megakaryositler genellikle normaldir veya sayıca artmış olabilir. Eozinofil ve bazofiller artabilir. Mitotik formlarda artış gözlenir. Makrofajlar görünüm olarak Gaucher hücrelerini andırabilir ve bazende normal glikoserebrosidal aktivasyonun yetersizliğinden artan sellüler turnover ile beraber artan glukoserebrosit yüklenmesiyle bozulma neticesinde oluşmaktadır. Öte yandan makrofajların lipitlerle dolmasıyla ve bunlarında polikrom boyama ile mavi görünüm vermesiyle "sea blue histiosit" adını almalarına neden olmuştur.

Kollajen tip III tanı zamanında artış gösterdiğinden hastaların yarıya yakınında retiküler fibrozis artmıştır. Artan fibrozis dalak büyüklüğü, ağır anemi, blastik hücrelerin periferik yayım ve kemik iliğindeki artışı ile paralellik gösterir.

PROGENİTOR HÜCRE BÜYÜMESİ

Nötrofil kinetiği ile ilgili çalışmalar buradaki artışın artan myeloid kitleden kaynaklandığını ortaya koymuştur. CFU-C kanda normale göre 500 kat daha fazla artış gösterirken kemik iliğinde yalnızca 20 kat fazlalık gözlenir. Ayrıca kandaki CFU-C'nin S fraksiyonu daha az oluşmaktadır. Ancak beyaz kürelerde artış oluştuğunda S fraksiyonunda hızlı çoğalma gözlenmektedir.

CSF'lerin serum ve idrarda normal ya da ılımlı artış gösterdiği saptanmıştır. Ancak bu faktörlerin inhibitörlerinde de ya normal düzeylerde gözlenmiş veya herhangi bir artış tesbit edilememiştir. Nötrofillerdenizole edilen ve monositler tarafından üretilen CSF üretim inhibitöründe normalden az saptandığı gösterilmiştir. Bu inhibitör düzeyi tedavi sonrası yeniden normale dönmektedir.

KML'de myeloblastların işaretlenme indeksi normal ilikten daha düşük bulunmuştur ve oluşum zamanı uzamıştır. Bu da KML'nin bir myeloproliferatif hastalık oluşundan ziyade akümülatif bir hastalık olabileceği düşüncesine yol açmıştır. KML'deki nötrofillerin ömürlerin normale göre daha uzun bulunmuştur.

KİMYASAL BULGULAR

ÜRİK ASİT

Bu olgularda ürik asit taşları sıkça göze çarpar. Bazen latent ya da akut Gut artriti oluşabilir. Ürik asitin fazla üretiminde kaynaklanan komplikasyonlar, terleme, asidoz, renal hastalık ve diüretik kullanımı ile artar.

SERUM VİT.B12 BAĞ..LAMA PROTEİNLERİ VE VİT.B12

Nötrofiller Vit.B12'yi bağlayan transkobalamin I ve III (R-type B12 Binding Protein ya da Cobalophilin) içermektedirler. Myeloproliferatif hastalıklarda genellikle Vit.B12 taşıma kapasitesi artar ve bunun kaynağında nötrofillerdir. Serum Vit.B12 düzeyi de normale göre 10 kat artmaktadır. Nadiren bu tür olgularda pernisiöz anemide gelişebilir. Böyle durumlarda dokularda Vit.B12 düzeyi azalmıştır. Ancak serum Vit.B12 düzeyi normal olabilir çünkü transkobalamin I'in Vit. B12'ye afinitesi yüksektir.

TANI

Tipik KML tanısı güç değildir. Splenomegali ile beraber açıklanamayan beyaz küre yüksekliği ile yapılacak olan lökosit alkalin fosfataz (LAP) testi yanında uygulanacak olan kemik iliği aspirasyonu ile sitogenetik analiz tanı koyduracaktır. Sitogenetik analizlerde Ph1 kromozomu tanıyı sağlamlaştırır.

Bazofilin olmaması, yüksek LAP skoru yanında fizik muayenenin lokomoid reaksiyonu akla getirmesi gerekir. Steroidler, sola kayma yanında nadiren ileri derecede nötrofiliye neden oldular. Fakat bu yanıt sınırlıdır, kısa sürelidir ve bundan dolayı tanısız göçlüklere yol açabilir. LAP skoru yanında 25.000'in altında beyaz küre ile Ph1 negatifliği sayesinde tanıya yaklaşım sağlanır.

KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ'NİN DOĞASI

Ölüm, KML'nin kronik fazında nadiren husule gelir, fakat zaman içinde KML'de hastalığın gidişatı kötüleşir. Birçok olguda konvansiyonel ajanlar olan bisulfan ile hidroksiüre, gerek beyaz küre sayısında, gerekse splenomegalinin azalmasında cevap alınır. Bu ajanlarla elde edilen kontrolün kaybedilmesi (akselere faz) genellikle kan ve kemik iliğinde blast,

promyelosit ve bazofillerin artışı ile olur; ve anemi, trombositopeni ile birliktedir. Bazı hastalarda ise anemi ve kemik iliği yetmezliği geliştirilir, giderek artan bir şekilde displastik değişiklikler olur ve myelofibroz gelişir.

2.2. HLA (HUMAN LEUKOCYT ANTIGENS = İNSAN DOKU ANTİJENLERİ)

TANIM

Çok hücreli canlıların tümünün kendilerini koruma düzenlerinin temeli kendilerinden olanı olmayandan,son derece duyarlı bir şekilde ayırt edebilmelerine dayanır.Böylece canlı mikroorganizmalar,yabancı moleküller veya yabancılaşmış kendi hücrelerine karşı (virüsle enfekte hücre gibi) çok etkin bir şekilde korunurken kendi dokularına zarar vermemeyi başarırlar. Bu amaçla bağışıklık sistemi, duyarlı ve etkin hücre yüzeyi tanıma mekanizmaları geliştirmiştir. İmmün sistemin bunu etkin bir şekilde yapabilmesi için, immün cevap oluşturacak antijenleri kendi antijenlerinden ayırt etmesi gerekir.Bu yolla kendinden olanı,olmayandan ayırarak,olmayana yönelik etkili ve özgül (Spesifik) yıkım ve yok etme yöntemlerini kullanır.Bu ayırım Major doku tipleri antijenlerinin vasıtasıyla yapılır.

TARİHÇE

1944'te Medawar ve arkadaşları tavşanlar üzerinde yaptıkları deneylerle, organ transplantasyonunda görülen reaksiyonların gerçekte immünolojik bir temele dayalı olduğunu gösterdiler.1958'de Dausset, Snell ve Rappaport ilk kez, insanda lökositlerde doku uygunluk antijenlerini göstermeyi başardılar.Bazı araştırmacılar da kan transfüzyonu yapılmış kişilerin serumunda lökositlere karşı antikor bulunduğunu kanıtladılar.Yapılan gözlemlerde, kendilerine karşı oluşan antijenlerin, sadece lökositlerde değil, diğer doku hücrelerinde de bulunduğu anlaşıldı ve bu antijenler "Histocompatibilite (Doku Uygunluk) Antijenleri" veya

"Transplantasyon Antijenleri) olarak isimlendirildiler. 1967'de Histocompatibilite Antijenlerinin simgelenmesinde bir anlaşmaya varılarak bunlara "İnsan Lökosit Antijenleri" anlamına gelen "HLA" denildi.

HLA VE MHC

Deneysel ve klinik çalışmalar insanın kendinden olanı, olmayandan ayırmasını sağlayan tanıma düzeninde en önemli rolü, doku uyum antijenlerini belirleyen sistemin (MHC=Major Histocompatibility Complex) oynadığını göstermiştir. Başta böbrek ve kemik iliği olmak üzere transplantasyonların günümüzde artık bir araştırma olmaktan çıkıp olağan tedavi yöntemleri içinde yerini alması HLA antijenlerinin önemini artırmıştır. Diğer yandan son yıllarda HLA moleküllerinin antijen sunulumundaki önemi ve seçiciliği, HLA antijenlerini kodlayan genetik bölgenin immün yanıt özelliklerimizi belirlemedeki önemli rolü daha iyi anlaşılmasına başlanmıştır.

İnsan da HLA (Human Leukocyt Antigens) diye adlandırılmış olan doku antijenlerini kodlayan sistem (MHC) bir biriyle sıkı bağlantılı genleri içerir ve bir bütün olarak genetik geçiş gösterirki bu grup genlere haplotip denmektedir. HLA antijenleri ayrıcalıklar olmakla birlikte eğer allel kromozomda farsa daima hücre yüzeyinde de kendini gösterir.

İnsanda MHC (HLA-A'dan HLA-DP'ye kadar) kadar genetik bilim olarak yaklaşık 3.8 cM (centimorgan) veya rekombinasyon birimini kapsar (iki bölge arası rekombinasyon sıklığına göre ölçülür ve bir sentimorgan 100 meiosisüste bir rekombinasyon ölçüsüne eşittir). MHC içerisinde rekombinasyon oranı %2-3'tür . Başka bir deyişle MHC antijenleri %97-98 oranında bir bütün olarak (haplotip) geçiş gösterir. Rekombinasyon mayotik bölünme sırasında oluşur ve tablo-1'de gösterildiği gibi çocukta ailedeki olasılığı 4 haplotik kombinasyonundan farklı bir HLA yapısı gözlenir.

Tablo.1. Rekombinasyonun Şematik olarak Gösterilmesi.

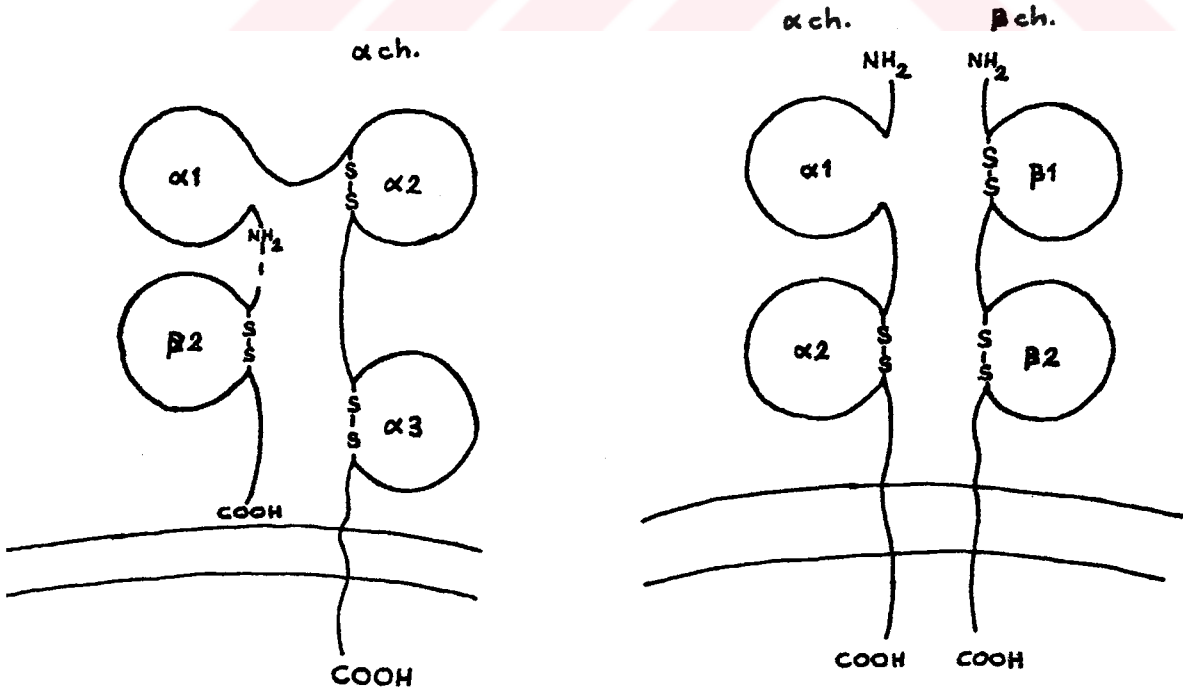
		ANNE		BABA					
		<u>H1</u>	<u>H2</u>	<u>H3</u>	<u>H4</u>				
		A1	A3	A2	A9				
		B5	B7	B12	B14				
		Cw1	Cw2-----Cw3	Cw5					
		DR1	DR3	DR4	DR7				
		DQ1	DQ3	DQ2	DQ4				
		DP1	DP2	DP3	DP4				
H*	H3	H1	H4	H2	H3	H1	H3	H2	H4
A3	A2	A1	A9	A3	A2	A1	A2	A3	A9
B5	B12	B5	B14	B7	B12	B5	B12	B7	B14
Cw1	Cw3	Cw1	Cw5	Cw2	Cw3	Cw1	Cw3	Cw2	Cw5
DR1	DR4	DR1	DR7	DR3	DR4	DR1	DR4	DR3	DR7
DQ1	DQ2	DQ1	DQ4	DQ3	DQ2	DQ1	DQ2	DQ3	DQ4
DP1	DP3	DP1	DP4	DP2	DP3	DP1	DP3	DP2	DP4

HLA ANTİJEN MOLEKÜLLERİ

İnsan doku grubu antijenleri ilk defa 1950'li yılların ortalarında fazla kan transfüzyonu yapılmış veya multipar gebelerin kanlarında leukoagülinin meydana geldiğinin keşfiyle bulunmuştur. Bu antijenlerin uyuşur olması organ transplantasyonu başarısı bakımından son derece önemlidir. Bu bakımdan bu antijenleri yapan genlerin bulunması için çaba harcanmasına hız verilmiştir. HLA molekülleri ve onları meydana getiren genleri 3 kategoriye ayırmak mümkündür. Class I, II ve III.

Class I ve Class II antijenlerinin Kasım 1987'de NewYork'ta toplanan adlandırma komitesinin tanımına göre listesi tablo II ve III'te verilmiştir.

Class I ve II molekülleri karmaşık glikoproteinlerdir, yapıları büyük oranda benzerlik gösterir ve aynı ata genden evrimleşmişlerdir. Class I ve Class II moleküllerinin temel yapısı şekil 1 a,b'de gösterilmiştir.



Class I ve Class II antijenlerinin işlevleri birbirinden farklı ancak çok yakın ilgilidir. Genel olarak Class I molekülüleri antijenleri CD8+ olarak adlandırılan indükleyici T-lenfositlerine sunarken, Class II molekülüleri, antijeni CD4+ olarak adlandırılan yardımcı T-lenfositlerine sunarlar. Bağışıklık yanıtının oluşabilmesi için antijenin MHC ürünlerine bağlanması ve bu kompleksin T-lenfositleri tarafından yabancı olarak tanınması gerekir. Bu durumda HLA molekülü immünojenik peptitler için bir olgaç (reseptör) olmaktadır. Henüz antijenin HLA'ya bağlanma düzeni çözümlenememiştir. T hücrelerinin (sitotoksik veya yardımcı) antijen ile etkileşen kısmı T hücre oigacıdır (T Hücre Receptör, TCR).

HLA Class I ve Class II antijenlerinin dokulardaki dağılımı tablo 4'te verilmiştir.

CLASS I HLA MOLEKÜLÜ

Class I HLA - A, B, C, antijenleri klasik olarak bilinenlerdir. Son zamanlarda Class I içinde yukardaki klasik antijenler yanında HLA-E, HLA-P5.4 ,(HLA-F), HLA-P6.0 (HLA-G) ve HLA-H olmak üzere yeni antijenlerde tanımlanmıştır. Bu yeni 4 antijen geninin de ürün verdikleri kesindir. Ancak bunlardan sadece HLA-G trofoblast hücre yüzeyinde gösterilmiştir.

Class I antijenlerinin başlıca işlevleri:

1) CD3+ CD8+(baskılayıcı/sitotoksik T hücresi) hücreleri ile yüzeyinde bulunduğu hücre arasında etkileşimi ve antijenin tanınmasını sağlamaktır. Class I molekülü, yabancı antijenlerden endojen olarak sentezlenen, örneğin viral antijenlerin sitotoksik T hücrelerine sunulmasında önemli rol oynarlar. Bu molekülü embriyojenik hücrelerin farklılaşması ile de ilgilidir.

Tablo 2. HLA ABC ANTIJENLERİNİN LİSTESİ (CLASS I)

A	B	C
A1	B5	Bw54(w22)
A2	B7	Bw55(w22)
A3	B8	Bw56(w22)
A9	B12	Bw57
A10	B13	Bw58
A11	B14	Bw59
Aw19	B15	Bw60(40)
A23(9)	B16	Bw61(40)
A24(9)	B17	Bw62(16)
A25(10)	B18	Bw63(16)
A26(10)	B21	Bw64(14)
A28	Bw22	Bw65(14)
A29(w19)	B27	Bw67
A30(w19)	B36	Bw70
A31(w19)	B37	Bw71
A32(w19)	B38(16)	Bw72
Aw33(w19)	B39(16)	Bw73
Aw34(10)	B40	Bw75(15)
Aw36	Bw41	Bw76(15)
Aw43	Bw42	Bw77(15)
Aw66(10)	B44(12)	Bw4
Aw68	B45(12)	Bw6
Aw69(28)	Bw46	
Aw74(w19)	Bw47	
	Bw48	
	B49(21)	
	Bw60(21)	
	B51(5)	
	Bw52(5)	
	Bw52(5)	
	Bw53	

**Tablo 3. HLA- D BÖLGESİ ANTİJENLERİNİN LİSTESİ
(CLASS II)**

D	DR	DQ	DP
Dw1	DR1	DQw1	DPw1
Dw2	DR2	DQw2	DPw2
Dw3	DR3	DQw3	DPw3
Dw4	DR4	DQw4	DPw4
Dw5	DR5	DQw5(w1)	DPw5
Dw6	DRw6	DQw6(w1)	DPw6
Dw7	DR7	DQw7(w3)	
Dw8	DRw8	DQw8(w3)	
Dw9	DR9	DQw9(w3)	
Dw10	DRw10		
Dw11(w7)	DRw11(5)		
Dw12	DRw12(5)		
Dw13	DRw13(w6)		
Dw14	DRw14(w6)		
Dw15	DRw15(2)		
Dw16	DRw16(2)		
Dw17(w7)	DRw17(3)		
Dw18(w6)	DRw18(3)		
Dw19(w6)	DRw52		
Dw20	DRw53		
Dw21			
Dw22			
Dw23			
Dw24			
Dw25			
Dw26			

Tablo 4. HLA ANTİGENLERİNİN DOKULARDAKİ DAĞILIMI

DOKU	CLASS I	CLASS II
B LENFOSİT	KP	KP
T LENFOSİT	KP	D
MAKROFAJ	KP	D
DENT. HÜCRE	KP	KP
SİNİR SİST.		
PERİFERİK	KP	N
MERKEZİ	N	N
DURA	KP	KP
BÖBREK		
GLOMERÜL	KP	KP
TÜBÜLÜ	KP	D
KARACİĞER		
HEPATOSİT	P	N
SİNÜZOİD	KP	KP
ENDOTEL		
KAPİLLER	KP	KP
DiĞ. DAMAR.	KP	D
MİYOKARD	ZP	N
EPİGLOT	KP	KP
TRAKEA	KP	KP

DOKU	CLASS I	CLASS II
İÇ SALG.SİS.		
TİROİD	ZP	P
HİPOFİZ	ZP	N
PANKREAS.LGR.AD.	ZP	P
MİDE BARSAK EPİT.		
DİL	KP	ZP
ÖZOFAGUS	KP	N
MİDE	ZP	N
İNCE BARSAK	KP	KP
KOLON	KP	N
DEĞİŞİK		
MEME	KP	KP
PAROTİD EPİTELİ	M	M
PAROTİS DUCTUS	KP	N
PANKREAS	N	N
KORNEA ENDOTELİ	N	N
LENFATİKLER	KP	KP
P. VİLLÖS TROFOB.	N	N
P.EPİDERMİS	ZP	N
FİBROBLAST	KP	N
KAS	ZP	N

KP= Kuvvetli +,
ZP= Zayıf +,
D= Aktivasyon Durumuna Göre
P=Patolojik durumlarda +,
N= Negatif

2) Class I antijenlerinin bazı moleküller için olgaç (reseptör) rolü oynayabileceği ve hücre zarından içine taşınma işlerinde rolü olabileceği de ileri sürülmüştür. Beta-2 mikroglobülinin sitomegalo virüs için olgaç olduğu, HLA-A3'ün hemokromatozis'te demir için olgaç görevi yaptığı görüşleri bunlardan bazılarıdır.

3) Class I antijenleri kırmızı küreler dışında, retikülositler dahil olmak üzere hemen bütün çekirdekli kan hücrelerinde ve somatik hücrelerde bulunmaktadır.

4) interferon ve Tümör Nekroz Faktör (TNF), Class I ürünlerinin hücre yüzeyinde gözlenmesinde artış neden olurken, steroidler ve prostoglandin-E2 azalmaya neden olmaktadır.

CLASS II HLA MOLEKÜLÜ

HLA-D, DR, DQ ve DP olarak sınıflandırılmaktadır. HLA Dw antijenlerinin genetik temeli tam bilinmemekte, Dw ve DR antijenlerinin benzer hücre tiplerinde bulunması ve Dw-DR crossing-over'in hiç görünmemesi nedeniyle bunların HLA-DR genlerince kodlanıyor olması üzerinde durulmaktadır. HLA Class II bölgesinde kendisine ait mRNA (mesenjer RNA) sı gösterilmiş, ancak ürünü bilinmeyen genler de (DQ beta, DN alfa vardır.

HLA class II antijenleri her ikisinde MHC'de kodlanan glikoprotein yapısında ve polimorfik olan 33 kd alfa zinciri ile 28 kd beta hafif zincirinden oluşmaktadır. Class II antijenlerinin immün sistemde çok önemli işlevleri vardır.

HLA Class II antijenlerinin işlevleri ;

1) Timik epitel hücrelerinde bulunmaları yoluyla T lenfosit repertuarının oluşumu ve kendi antijenlerine yanıt veren (self reaktif) T lenfositlerinin elenmesinde rol alırlar.

2) Çevreden edinilmiş yabancı antijenlerin CD4+ yardıma T lenfositlerine sunulduğu ile immün yanıtın başlatılmasına aracılık ederler.

3) Pek çok antijene karşı yüksek ya da düşük immün yanıt fenotipini belirler. Değişik Class II antijenlerinin antijenlere karşı farklı afiniteye sahip olması, veya T hücre oligacının (TCR) bunu tanımasındaki değişkenlik kişiler arasındaki immün yanıt farklılıklarını açıklayabilir. Eğer bir kimsenin MHC antijenleri belirli bir peptidle birleşmiyorsa o kişi o peptide immün yanıt veremez.

4) Karışık lenfosit kültürü ve graft atılımının tetiğini çeken önemli antijenlerdir. MLC'de yanıt temelde DR'ye karşı ise de DQ ve DP antijenleri de katkıda bulunmaktadır.

5) Transmembran sinyal oluşturma işlevi ve bazı antijenlere olgaç görevi yapması üzerinde de durulmaktadır.

Class II antijenleri en fazla B lenfosit, T blast ve viral ajanlarda enfekte T hücrelerinde kendini gösterirse de, antijen sunan hücreler, dendritik hücre, doku makrofajları, Langerhans hücresi, timik epitel hücresi, kapiller endotel hücresi, renal glomerüler hücreler, hemogioetik hücreler ve bazı tümör (melanoma, glioma) hücrelerinde de bulunmaktadır. Bazı hücrelerde örneğin makrofajların bazı alt tip lerinde sadece DR molekülleri vardır, diğer yandan B lenfositlerin de her üç antijen de (DR, DQ, DP) bulunur. Her üç tipin bulunduğu hücrelerde bile bu antijenlerin bulunma yoğunluğu ve alt tipleri değişkenlik gösterir .

LİNKAGE DİSEKİLİBRİUM

Bazı HLA alelleri beklenenden çok daha sık olarak birarada bulunmaktadır, linkage disequilibrium = dengesiz bağlantı şeklinde tanımlanan bu durum değişik toplumlarda farklı özellikler gösterebilmektedir. Toplumumuzda HLA-A2 ve B5, batı toplumlarında ise A1 ve B8 buna örnek olarak verilebilir.

Dengesiz bağlantı şöyle hesaplanabilir; toplumumuzda HLA-A2 0.42, HLA-B5 ise 0.3 sıklığında bulunmaktadır. Bu durumda HLA-A2 B5 kombinasyonunun beklenen bir arada bulunma yüzdesi = $0.42 \times 0.3 = 0.126$ dir. Halbuki HLA-A2 B5 toplumumuzda 0.493 oranında bir arada bulunmaktadır. Bu durumda HLA-A2 ile HLA-B5 arası dengesiz bağlantı = Bulunan sıklık-beklenen sıklık ($=0.493-0.126$) = 0.367 dir. Dengesiz bağlantı sadece HLA-A ile B arasında değildir. DR, DQ antijenleri C2, C4, faktör B de dengesiz bağlantı gösterebilmektedir.

Bu dengesiz bağlanma özellikleri nedeniyle bazı kombinasyonlar zaman içinde korunmuştur. Bu olay HLA polimer fizminin beklenenden daha az olması sonucunu yaratmıştır.

HLA TAYİN YÖNTEMLERİ

Günümüzde HLA antijenlerinin saptanması veya genel anlamda MHC bölgesinin belirlenmesinde ve MLC en sık ve yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Ben de bu çalışmamı serolojik yöntemi kullanarak hazırlamaya çalıştım.

1. Serolojik = (genellikle mikrotoksisite, nadiren aglutinasyon)
 - a) Alloantikör
 - b) Monoklonol antikörler (Mikro-Eliza)

2. Biyokimyasal

- a) İki boyutlu jel elektrofezi (Class II)
- b) İzoelektrik fokuslama (IEF) (Class I)
- c) Komplotiplendirme
- d) Amino asit diziliminin belirlenmesi

3. Hüresel

- a) MLC (HLA-D)
- b) Primed lenfosit tiplendirmesi (HLA-DP)
- c) Hüresel kaynaklı lenfolizis (CML)
- d) Sitotoksik T hücrelerinin sıklığı

4. DNA Analizleri

- a) Restriction Fragment Length Polimorfizm (RFLP)=DNA'yı belirli bölgelerinden kron enzimlerin yardımıyla tiplendirme.
- b) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Allele Özgü
- c) Oligonükleotid (ASO) ile tiplendirme
- d) PCR-Finger printing (DNA crossmatching)
- e) DNA diziliminin belirlenmesi (sequencing)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Kullanmış olduğumuz (Histognost Test Plates) Histognost Test kutuları Behringwerke tarafından üretilmiş bir pozitif ve negatif control serum ihtiva eden liofilized HLA antiserumlandır. HLA antiserumunun ve control serumunun özellikleri ve düzeni her kutu içinde özel bir kağıt üzerinde tespit edilmiş ve verilmiştir(bkz. tablo-6).

3.1.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

A) Ficoll'sopaque (Histopaque 1077) Sigma Diagnostics, USA.

B) a) Hanks solüsyonu, Gibco Hanks Balanced Solts, U.K.

b) Fetal Calf, Gibco Paroffin liquid 7162, U.K.

C) Rabbit Komplement, Behring, W.Germany.

3.1.2. KULLANILAN CİHAZ VE ALETLER

A) Santifüj, 2400 dak/devir, Heraeus LoboFuge Ae

B) Faz kontrast mikroskop, olympus CK2

C) Hamilton Pipeti, Hamilton Company Pat.3161323, USA

D) Terasaki Plağı, Behring, W.Germany.

E) Pastör Pipeti.

Behring

Histognost®

Testplatte für den Zytotoxizitätstest nach NIH

testplate for the cytotoxicity test according to NIH

plaque pour le test de lymphocytotoxicité selon Terasaki/NIH

h.-B./Lot No.029458

Patient/patient

Testet von:
tested by
testée par

verwendetes Komplement: _____
complement used
complément utilisé
Datum: _____
date

Verzeichnis der HLA-Antisera/arrangement of HLA antisera/dénomination du antisérums HLA

Spezifität/specificity/ spécificité	Kontroll-Serum Control Serum Sérum de contrôle neg.	A1	A1	A2	A2	A2 + A28
h.-B./Lot No.	029810	020109	020108	020205	020206	8103
Ergebnis/result/ résultat						
1	A28	A3	A3	A9	A23(9)	A24(9)
	66580	020307	020308	020905	022305	022401
2	A10	A25(10)	A25 + A32	A26(10) + Aw66	A10 + Aw33	A11
	021006	022506	30989	022605	68394	021107
3	A29	A30	A30 + A31	A30 + A31	B5	B51(5)
	022903	62996	44347	029102	020507	027102
4	B35 + B51	B5 + B18 + B35	B5 + B49(21)	B7	B7	Bw22 + B7
	027802	029203	028304	020707	020706	028403
5	B7 + Bw55(22)	B8	B8	B12	B12	B44(12)
	026901	020807	020806	1203	021205	024406
6	B13	B13	B14	B14	B15	Bw62(15)
	021308	021309	021405	021406	58747	026201
7	B16 + A10	B38(16)	B17	B17	B17 + Bw63	B21
	41576	023801	021709	021708	027902	022108
8	+ 					
9	B49(21)	Bw50(21)	Bw22	Bw55(22)	B27	B27
	32957	61361	022202	025502	022718	022719
10	B37	B40	B40 + B13 + Bw47	B40 + Bw47	Bw60(40)	Bw73
	52395	024004	028802	026801	026003	027001
11	Bw4	Bw6	Cw1	Cw2	Cw2	Cw3
	020407	020607	66299	025205	025206	025303
12	Cw3	Cw4	Cw4	Cw5	Cw6	Kontroll-Serum Control Serum Sérum de contrôle pos.
	025304	025405	025406	025901	62997	029709
	A	B	C	D	E	F

[] gelegentlich schwache Reaktionen / occasionally weak reactions / éventuellement réactions faibles

Ordnung / result / résultats:

	1	2	3	9	10	11	w19	23	24	25	26	28	29	30	31	32	w33	w34	w36	w43	w66	w68	w69		
	5	7	8	12	13	14	15	16	17	18	21	w22	27	35	37	38	39	40	w41	w42	44	45	w46	w47	w48
	49	w50	51	w52	w53	w54	w55	w56	w57	w58	w59	w60	w61	w62	w63	w64	w65	w67	w70	w71	w72	w73	w74	w76	
	w1	w2	w3	w4	w5	w6	w7	w8																	

Fabriqué par Behringwerke AG, Marburg (RFA), et commercialisé en France par S.a.p.b. Hoechst-Behring, 260, Avenue Napoléon Bonaparte, 92500 Rueil-Malmaison

3.1.3. KULLANILAN BİYOLOJİK MATERYAL

A) KML tanısı konmuş hastadan alınan 10 cc heparinli kan.

B) Hastalar: Bu çalışmaya 1993 ile 1994 yılları arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Bölümü Hematoloji Anabilim Dalında kontrol hastası olarak bulunan KML tanısı konmuş 17 hasta alındı. Bu hastalardan 10'ar cc. kan alınarak HLA doku gruplarına bakıldı. Hastaların cinsiyeti, yaşı ve oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5: Hastaların Özellikleri.

Yaş	Hasta Sayısı	Oran
50 Yaş üstü	7	41.18
50 Yaş altı	10	58.82

Cinsiyet	Hasta Sayısı	Oran
Erkek	11	64.70
Kadın	6	35.30

3.2. METOD

Bu çalışmada aşağıda gösterilen yöntem kullanılmıştır. KML tanısı konmuş hastalardan alınan kanda, lenfositler ayrıldıktan sonra, bu alınan mononükleer hücreler (lenfositler) serolojik inceleme yapılabilmesi için terosaki-plağı üzerinde antijenlerle temasa sunuldu ve uygun antijenler ((+) veya (-)) arandı.

Bu yöntem 2 aşamada gerçekleşmektedir.

3.2.1. a) Lenfositlerin izolasyonu: (şema 1-A)

1- Kronik Myelositer Lösemi tanısı konulmuş hastalardan 10'ar cc heparinli kan alındı.

2- Alınan bu 10 cc heparinli kan RPM 1640 (HANKS) solüsyonu ile eşit hacimde (10 cc) karıştırıldı (=birebir).

3- 2 tane ayrı tüpe 3'er ml Ficol isopoque (Histopaque 1077) bırakıldı.

4- Hazırlanan bu tüpün üzerine 6 ml HANKS solüsyonu ile karıştırılmış heparinli kan, tüpün kenarından 45° lik bir açı ile sızdırılmak, 2 solüsyonu birbirine karıştırmamak ve kanın ficol'ün üzerinde 1 tabaka halinde kalmasını sağlamak suretiyle eklendi. 2.inci tüp içinde aynı sistem yardımıyla kan eklendi.

5- 2400 dak/devir'li santrifüjde 20-30 dak. santrifüj edildikten sonra orta kısımda bulunan mat bölgedeki mononükleer hücreler (lenfositler) Pastör pipeti yardımıyla altta kalan ficolden almamak kaydıyla vakumlandı. Bu alınan lenfositler (her iki tüpten) ayrı bir tüpe aktararak, daha saf elde edilebilmesi açısından HANKS solüsyonu ile tekrar yıkandı (10 dak. 60 x g, 1000 rpm'de).

6- Saf olarak elde edilen lenfositler ayrı bir tüpte tekrar HANKS solüsyonu ile karıştırıldı, üzerine %10'luk Fetal-Caft solüsyonu ilave edilerek 5 dak. iyice çalkalandı.

3.2.2. b) Terasaki Plağı ile HLA Tayini: (şema 1-B)

1- Üzerinde HLA antiserumlarının bulunduğu kuyucukların üzerine ıslanmasını sağlayacak kadar (1 mikrolitre) saf su eklendi ve 5 dak. karışımı için beklendi.

2- Bu kuyucukların hava ile temasını engellemek amacıyla üzerlerine kuyucukları kapatacak kadar sıvı parafin pastör pipeti kullanılarak bırakıldı. 5 dak. sallandırdıktan sonra oda sıcaklığında 30 dak. ağzı kapalı olarak bekletildi.

3- Hazırlanmış olan lenfosit süspansiyonu (bak.a-6) iyice karıştırıldıktan sonra her kuyucuğa sıvı parafinin altına konacak şekilde 1'er mikrolitre hamilton pipeti kullanılarak bırakıldı. 5 dak. sallandırdıktan sonra oda sıcaklığında 30 dak. inkübe edildi.

4- Hazırlanmış olan RABBIT komplemanından 5'er ml alınarak her kuyucuğa eklendi. 5 dak. çalkalandıktan sonra 60 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi.

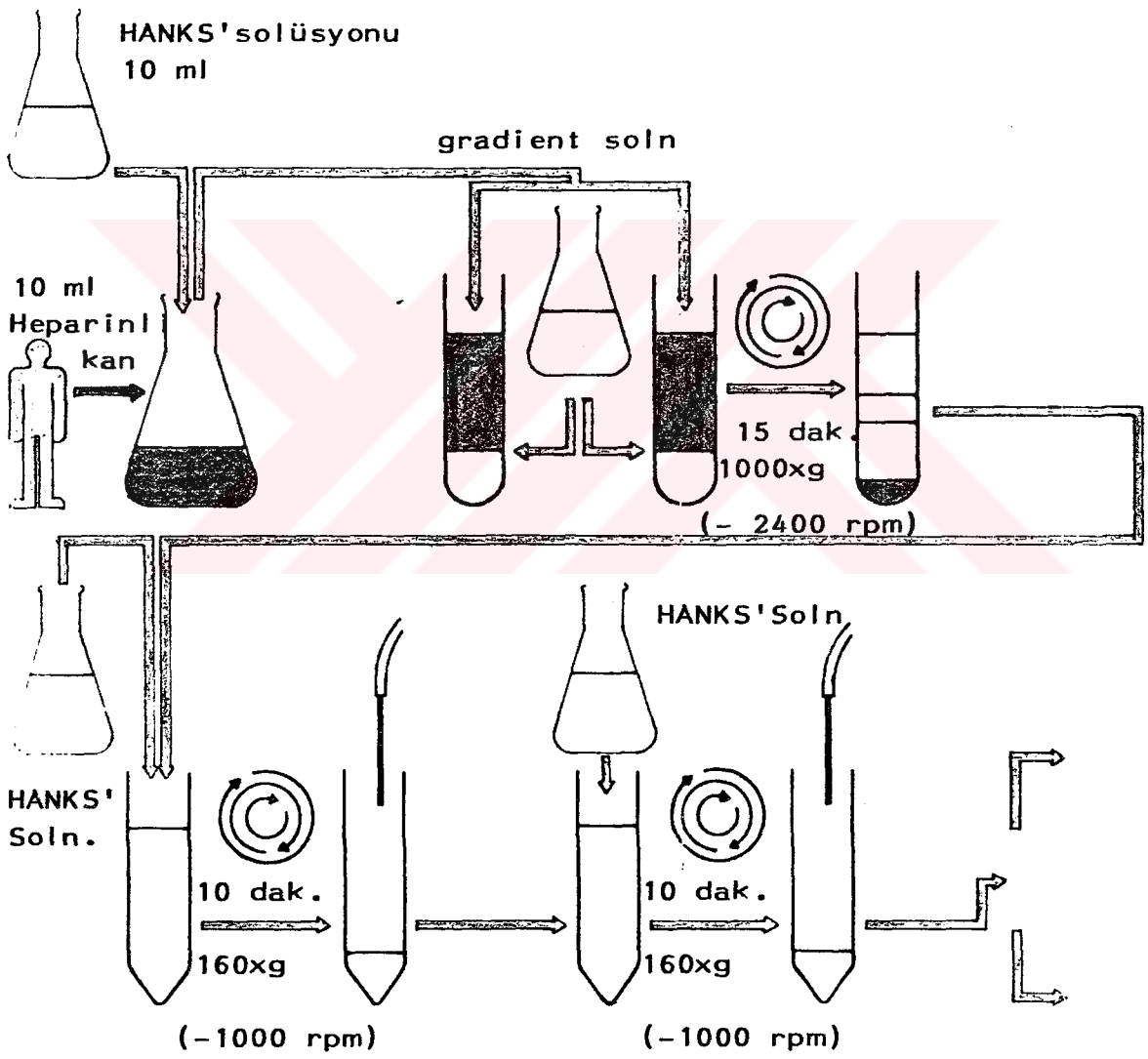
5- Her kuyucuğun üzerine 3 mikrolitre eosin eklendikten hemen 2 dak.sonra 8 mikrolitre PH=7'de %35-40'luk formaldehit oluşabilecek reaksiyonları durdurmak için eklendi.

6- Terasaki plağının kapağı kapatılarak 30 dak. ile 12 saat arası devamlı gözlenmesi için bırakıldı.

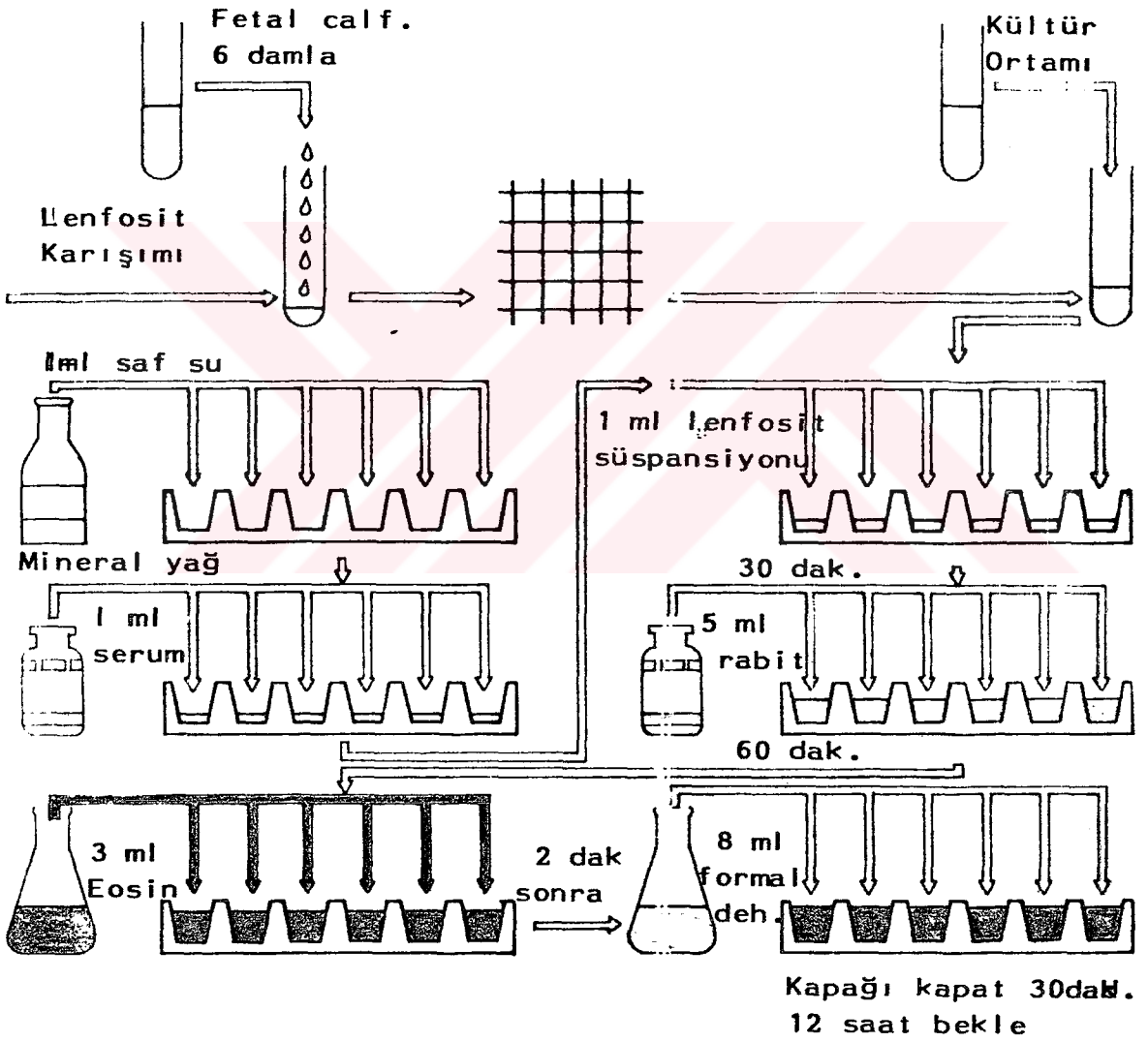
7- Sonuçta Faz kontrast mikroskobunda negatif veya pozitif oluşumuna göre her kuyucuk ayrı ayrı incelenerek yorumlanmaya çalışıldı. Bu yorum, hücrelerin koyu ve açık renkli boyanmalarına bakılarak bulundu.

8- Daha sonra herbir Terasaki plağı için özel olarak düzenlenmiş test kağıtlarının üzerindeki bölgelere (-) veya (+) işaretlerinin konulmasıyla deneyler tamamlandı (bkz. tablo 6).

ŞEMA: A- Lenfosit Süspansiyonunun Hazırlanması



ŞEMA: B- Terasaki Plağında HLA Tayini



4. BULGULAR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Bölümüne başvuran ve KML tanısı konmuş 17 hasta üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları ve bulunan antijenlerin listesi aşağıda gösterilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. HLA antijenlerinin hastalardaki dağılımı

	HLA-A	HLA-B	HLA-C
1. Hasta	A2-A10	B37-B14	Cw2-Cw3
2. Hasta	A2+28-A2	B17-B21	Cw4-Cw3
3. Hasta	A3 - A25	B16-B38	Cw3-Cw4
4. Hasta	A10-A11	B16+A10	Cw4-Cw2
5. Hasta	A2 - A28	B40+B13-B13	Cw2-Cw3
6. Hasta	A9 - A2	Bw60-Bw40	Cw6-Cw5
7. Hasta	A9 - A1	B21-B49	Cw3-Cw6
8. Hasta	A23-A24	B38-B14	Cw4-Cw6
9. Hasta	A8 - A30	Bw73-B49	Cw4-Cw6
10. Hasta	A30-A24	B14-Bw62	Cw3- -
11. Hasta	A2-A2+A28	B5-B51	Cw4-Cw5
12. Hasta	A25+32-A10	B5-B8	Cw1-Cw2
13. Hasta	A11-A3	B51(5)-B35+51	Cw3-Cw4
14. Hasta	A2+A28-A28	B12-B37	Cw4-Cw3
15. Hasta	A30+A31-A2	B27-B17	Cw3-Cw5
16. Hasta	A10-A25(10)	B21-B49	Cw1-Cw6
17. Hasta	A26-A10	B5-B13	Cw3 -

Tablo 7' de görüldüğü gibi HLA antijenlerinin 17 hastadaki dağılımı ((+) olduğu) ortaya çıkarılmıştır. Buna göre; yapılan taramalar sonucunda HLA-A, B ve C gruplarında bulunan antijenlerin hangi hastada görüldüğü tespit edilmiştir.

Tablo 8. HLA-A, B ve C grubu antijenlerin hastalardaki sayısı

HLA-A	(X)	HLA-B	(X)	HLA-C	(X)
A2	6	B37	2	Cw1	3
A10	4	B14	3	Cw2	4
A2+28	3	B17	2	Cw3	10
A3	2	B21	3	Cw4	8
A25	1	B16	1	Cw5	3
A11	2	B38	2	Cw6	4
A28	2	B16+A10	1		
A9	2	B40+B13	1		
A1	1	B13	2		
A23	1	Bw60+40	1		
A24	2	B49	3		
A8	1	B38	1		
A30	2	Bw73	1		
A30+31	1	Bw62	1		
A25(10)	1	B5	3		
A26	1	B51	1		
A25+32	1	B8	1		
		B51(5)	1		
		B35+B51	1		
		B12	1		
		B27	1(X) = Kaç hastada görüldüğü		

Tablo 8 de tespit edilen pozitif antijenlerin kaç hasta üzerinde dağılımı gösterilmek istenmiştir.

HLA doku grubu antijenleri daha öncede belirttiğimiz gibi bir anneden bir de babadan gelmek üzere her insanda en az iki tane bulunmak zorundadır.Yukarıda da görüldüğü gibi 17 hastada da her antijen grubundan

ikişer tane antijen görülmektedir. Bunun yanında 4. hastada HLA-B grubundan 1 tane, 10. ve 17. hastalarda ise HLA-C grubundan 1 tane antijen bulunmaktadır. Bunun da yakın akraba evliliğinden kaynaklandığı sanılmaktadır.

Bu yapılan işlemler sonucunda HLA-A,B grubunda göze batan bir birliktelik görülmemekle beraber C grubunda, Cw3 ve Cw4 antijenlerinde belli bir fazlalık görülmüştür. Bu fazlalık yani bu iki antijenin hastaların hemen hemen %50'sinden fazla bir kısmında görülmesi bu iki antijenin KML ile birliktelik taşıdığı imajını göstermektedir.



5. TARTIŞMA

Bu çalışma KML'li olgularda, HLA doku gruplarının saptanması amacıyla yapıldı. Çünkü bu hastalık konvansiyonel tedavilerle ancak palyatif olarak tedavi edilebiliyordu ve kür saptanamamaktaydı. Diğer çalışma gruplarına benzer şekilde bizim verilerimiz KML'li hastalardaki belli antijenlerin bulunmasına dayanmaktadır (1,2,4).

Günümüzde KML'nin teşhisinde belli bir aşama sağlanabilmektedir. Bizim çalışmamız tamamen KML teşhisine yönelik diğer çalışmalarla aynı özellikleri taşımasının nedeni HLA tayin yöntemlerinden serolojik çalışma yapılmış olmasındandır (10,22,28).

Değişik HLA antijenlerinin antijenlere karşı farklı afiniteye sahip olması veya T hücre olgacının (TCR) bunu tanimasındaki değişkenlik, kişiler arasındaki immün yanıt farklılıklarını açıklayabilir. Eğer bir kimsenin MHC antijenleri belirli bir peptidle birleşmiyorsa o kişi o peptide yanıt veremez (8,9,10). Bağışıklılık yanıtının oluşabilmesi için antijenin MHC ürünlerine bağlanması ve bu kompleksin T-lenfositleri tarafından yabancı olarak tanınması gerekir. Bu durumda HLA molekülü immünojenik peptitler için bir olgaç (reseptör) olmaktadır.

HLA antijenlerinin uyşur olması organ transplantasyonu başarısı bakımından son derece önemlidir. Bu bakımdan bu antijenleri yapan genlerin bulunması için çaba harcanmasına hız verilmiştir (6,7).

KML'li olgularda, daha çok HLA Cw3 ve Cw4 doku gruplarının gittikçe artan bir sıklıkta gözleniyor olması, bu lösemi için yatkınlık oluşturduğu sonucuna varılmasını sağlamıştır (23,25).

KML'li hastalarda, yapılan çalışmalarda toplumumuzda HLA-A2 antijenin sıklığı 0.42 olarak belirlenmiştir (28). Bizim de sonuçlarımızda 17 hastada A2 antijeni 0.36 olarak bulunmuştur. Bunun yanında bu grup hastalarda HLA-Cw3 ve Cw4'ün belli bir sıklıkta bulunduğu tespit edilmiştir. Bizim alışmamızda da Cw3 10 hastada Cw4 ise 8 hastada pozitif olarak görölmesi diğer çalışmalarla özdeşlik göstermiştir.



6. SONUÇLAR

Bu çalışma sonunda, KML'li hastalarda hangi antijenin ne oranda pozitif olarak görüldüğü gösterilmiştir. Pozitif bulunan bu antijenlerin KML ile özdeşlik taşıyacağı sonucuna ulaşılmak istenmiştir. Bu çalışmanın diğer araştırmacılar tarafından benzer yapılan çalışmalar ile paralel olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışma ile elde edilen gerek pozitif ve gerekse negatif antijenlerin oranlarından KML hastaları için iyi bir teşhis yönteminin tespiti amaçlanmıştır. Bu oranların tamamının tespit edilebilmesi ve teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar henüz araştırma safhasındadır.

KML için elde edilen bu bulguların diğer lösemi gruplarında da sağlanamamış olduğu değişik araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Bu nedenle biz de çalışmamıza KML'li hastaları dahil ettik. Çünkü KML'li çoğu asemptomatik hasta diğer hastalıklar değerlendirilirken veya günlük rutin fizik muayene ile tesadüfen tanı alınır.

KML için hangi HLA antijenin tam bir uygunluk sağladığı henüz belli değildir. Bunun için daha uzun süreli bir takibin yapılması gerektiği açıktır.

Bizim tarafımızdan tespit edilen bu pozitif antijenlerin de diğer araştırmacılar tarafından da tespit edilmiş olması sevindiricidir. Bu hastalar için bu yöntem halen uygulanmakta ve takipleri devam etmektedir.

7. ÖZET

Bu çalışma 1993-1994 yılları arasında Kronik Miyelositer Lösemi tanısı konmuş 17 kontrol hastası üzerinde yapılmıştır.

Pozitif olgularda HLA-A2 %35.29, HLA-Cw3 %58.82 ve HLA-Cw4 %47.05 oranlarında saptanmıştır.

Araştırma sonucu elde edilen bulgular, KML tanısının tesadüfi olmasını ortadan kaldırdığını göstermektedir.

7. SUMMARY

This study was carried out on 17 control patients, diagnosed by Chronic Myelogenous Leukemia between 1993-1994.

It has been determined that HLA-A2, HLA-Cw3 and HLA-Cw4 were 35.29 %, 58.82 % and 47.05 % respectively among positive phenomena.

The findings of this research shows that the randomness of CML diagnosis may be removed.

8. KAYNAKLAR

1. Gastl G., Alitzky W., Tilg H.: Dose related effectiveness in chronic myelogenous leukemia. Blut 1987, 54,251-252.
2. Loandl U., Kloke O., Opalka B. et al.: Hematopoietic cells in patients with chronic myelogenous leukemia. Berlin, Heidelberg, 1988, 84-90.
3. Baker MA., Taub RN., Carter VH., Jr et al.: Immunotherapy for chronic myelogenous leukemia survival not effect by treatment in the early phase. Cancer Res. 1984,44:383-385.
4. Talpaz M., Mc Credie., Mavligit GM., et al.: Leucocyt interferan induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia.
5. Bach FH., Sochs Gs.: Transplantation immunology. The new England Journal of medicine 317: 489. 1987.
6. Walford DL., Waters H., Smith GS.: Human transplantation antigens. Fed Proc 29: 2011-2019, 1970.
7. Sudmer J., Marsch SGE., Albert E.: Nomenclature for the factors of the HLA system. Immunology today 11: 3, 1990.
8. Van Rood JJ., Eernisse JG.: The deflection of transplantation antigens in leucocytes. Prog surg 7: 217-221, 1987.
9. Hanjen Ja., Cho Sy., Geraghty DE., Mickelson E.: The HLA system in clinical bone marrow transplantation. Hematology Oncology Clinics of North America 4: 507, 1990.

10. Door As., Fugyl SV., Fabre JW., Ting A., Morris PJ.: The Detailed distribution of HLA-A,B,C antigens in normal human organs. *Transplantation* 38: 287-292, 1984.
11. Failkow PJ., Jacobson RJ., Papayannopoulou T.: Chronic Myelocytic Leukemia. Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am.J.Med.* 1977, 63: 125-130.
12. Failkow Pj, Martin Pj, Nojfeld V et al: Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1981, 58, 158.
13. Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1988, 132, 1497.
14. Rowley JD.: A new consistent chromosomal abnormality in chronic Myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973, 243: 290-293.
15. Kantarjian HM., Keating MJ., Talpoz M., et al: Chronic Myelogenous leukemia in blastic crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med.* 1987, 83: 245-254.
16. Koeffler HP., Golde DW.: Chronic Myelogenous leukemia-new concept (part 2) *N Eng J Med.* 1981, 304: 1269-1274.
17. Roitt IM., Brostoff J., Male DK.: *IMMUNOLOGY*. Gowens Med. Publ. London 1985.
18. Roitt IM.: *ESSENTIAL IMMUNOLOGY* 6 th. Ed. Blackwell Sci. Publ. London 1988.

19. Cerundolo W., Alexander J., Anderson K. et al.: Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility molecule. Nature 322: 845-1988.

20. Müftüoğlu AÜ., Yazıcı H.: Doku grupları ve hastalıklarla ilişkisi. Cerrahpaşa Tıp Fak. Der. 9: 182-187, 1978

21. Cunnigham BA.: The structure and function of histocompatibility antigens. Sci Amer 237: 96-106, 1977.

22. Koller BH., Greaghty DE., DeMarks R., Duvik L., Rich SS., Orr HT.: Chromosomal organisation of the MHC Class I gene family. J. Exple Med. 169: 469-480, 1989.

23. Cunnighmom I.: Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. Oncology huntingt 1990 Nov. 4(11): 101-8; discussion 108,111.

24. Marks DI., Hughes TP., Szydlo R., Kelly S., Cullis JU., Schwart AP., Mockinnos S., Apperley J., Borret AJ., Hows JM., et al.: HLA-identical sibling donor bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase. Br. J. Haemato. 1992 Jul; 81(3): 383-90.

25. Schoudt K., Müller C., Einsele H., Schmidt H., Schlotz E., Rehbein A., Powelec G.: Relationship between donor alloreactivity and acute GVHD in CML patients transplanted in the first chronic phase with HLA-identical sibling marrow (letter). Bone-Marrow-Transplant 1993 Jul; 12(1): 93-5

26. Kılıçturgay K.: İmmünolojiye giriş 1st edition Bursa 1987.

27. Kılıçturgay K.: İmmünolojiye giriş 2nd edition: Güneş and Nobel Tıp Kitapevi, Görükle, Bursa. 1994.

28. Yeğin O.: Temel immünoloji ve immün yetmezlik hastalıkları. Akdeniz Üniversitesi Yayın No: 45, Antalya, 1992.
29. Müftüoğlu E.: Klinik Hematoloji ve immünoloji. Dicle Üniversitesi Diyarbakır, 1986.
30. Johannsen R.: Teuter Chr. HLA system Ist English Edition West Germany, 1987.
31. Mc Devitt HO: The HLA System and Its relation to disease, Hosp Pract (July 15) 198; 20:57.
32. HLA Nomenclature Commitee: Nomenclature for Factors of The HLA System, 1987, Immunogenetics 1988; 28:391.
33. Stites D.P., Terr A.I.: Appleton and Lange Basic and Clinical Immunology, Middle East Edition, 1991.
34. Dupont B(Editor): Histocompatibilty Testing 1987, Vol:1 of : Immunbiology of HLA. Springer-Verlog. 1989.