

**KAN YAKINLIĞI VE BAZI ERİTROSİT ANTİJENLERİNİN
BLASTİK DÖNÜŞÜMLE İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI (*)**

Dr. Bekir Sıtkı Şaylı **

Bundan önceki yazımızda (Şaylı, 1969) blastik transformasyonun bazı yönlerini ele almış ve fenomende asıl varyablın dönüşme güç ve yeteneğine sahip küçük lenfositler olduğunu belirtmiştik. Bununla beraber, olgun bir hücrenin blast haline dönebilmesinde stimülasyonun, ister spesifik ister non-spesifik, önemli katkıda bulunacağı şüphesizdir. Stimülasyonun temeli immünolojiktir ve ilk bakışta eriyebilir antijenlerinkine benzer bir etki akla gelirse de (ilk yazının referenslerine bak.) sonraki çalışmalar tenbihin, dolaşısıyla, aktivasyonun hücresel tabiatını düşündürür mahiyettedir (Hardy ve Ling, 1969.) Lenfositlerin primitif şekillerine dönüştükleri preparatlarda mitotik figürlerin görülmesiyle anlaşılır. Ortama H⁺ veya C⁺ ile işaretli timidin koymakla DNA sentezi yapan ve mitozu geçen hücreler kolaylıkla ve kesin olarak tesbit edilebilir (ilk yazının referanslarına bak.). Genellikle büyük (ya da blast) bazofil çekirdeklerin sayımıyla kantitasyon mümkün olur.

1962 yılında Johns Hopkins Hastanesi Medikal Genetik bölümünde insan kromozomlarının morfolojisiyle ilgili çalışmalar yaparken, marka gibi kullanılmak üzere, kadın ve erkek lökositlerini beraberce kültür etmiş ve preparatlarda XX ve XY metafaz plaklarını elde etmiştim (Şaylı, 1964). Böylece genetik bakımdan farklı iki kişinin lenfositleri birlikte üreyebiliyorlardı; ne var ki stimulan olarak fitohemaglutinin (PHA) kullanılmıştı. Bain, Vas ve Lowenstein (1963, 1964) birbiriyle ilişkisi olmayan iki insanın lökositlerini PHA ihtiva etmeyen kültüre aynı zamanda koyarak

* Eczacıbaşı İlmi Araştırma ve Mükafat Fonu tarafından desteklenmiş çalışmalardan.

** A.Ü. Tıp Fakültesi Genetik Kürsüsü Doçenti.

blastik transformasyon elde etmeyi başardılar. Genetik yapısı birbirinden farklı iki kişinin lökositlerinin beraberce kültürü (i) tek yönlü ve (ii) iki yönlü olmak üzere iki şekilde mümkündür. İlk halde kişilerden birinin hücreleri X ışınlaması, dondurarak parçalama («freeze-thawing»), sonikasyon gibi fizik-mekanik yahut mitomisin C gibi biyolojik maddelerle önceden muamele görür. Böyle bir muamele, spesifik veya spesifik olmıyan bir etkiyle, hücrelerin yapı ve görev bütünlüğünü bozar; lenfositler primitif şekillere dönme yeteneklerini kaybederler; bununla beraber stimülüs olma güçleri kalır (**Lowenstein ve Bain, 1966; Kasakura ve Lowenstein, 1967; Bach ve Voynow, 1966**). Bu takdirde, kültüre genetik kuruluşu farklı iki lenfosit popülasyonu konduğunda, sadece intakt olanları dönüşüme uğrar.

İki yönlü kültürde iki lenfosit türü de intakttır. Karışık lökosit reaksiyonu («mixed leucocyte reaction», KLR) diye tanımlanan bu fenomeninde stimülüs başkasına ait lökositlerin varlığıdır. Bir başka cümleyle anlatılmak istenirse KLR genotipleri farklı kişilerin lenfositleri arasındaki interaksyondur ki hücrelerden bir kısmının ana şekillerine dönüşmesi şeklinde tezahür eder (**Bain ve Lowenstein, 1964**). Hatta ikiden fazla kişiyle de KLR meydana getirebilir (**Schrek ve Donnelly, 1961; Bain ve ark., 1964**). Ancak **Bain ve Lowenstein** bu arada 15 kardeş çiftiyle yaptıkları KLR çalışmalarında göstermişlerdir ki çoğunda lökositler kardeş (veya akraba) olmıyanlara oranla daha zayıf reaksiyon vermektedirler. Sonuç başkaları tarafından desteklenmiş, hatta, bazı kardeşler ve ikizlerde blastik transformasyonun meydana gelmediği anlaşılmıştır (**Lowenstein ve Bain, 1966; Kasakura ve Bain, Çavdar'a atfen, 1969**). Diğer memelilerle yapılan çalışmalar da aynı şekilde sonuçlanmıştır (başlıca, **Dutton, 1965**).

Allojenik lökositlerin bu etkisi antijenik bir maddenin varlığına bağlanmış, lökosit aktivasyonunun insan ve kemiricilerde histokompatibilite fenomeniyle asosiasyon göstermesi stimülasyonun hücre yüzeyindeki (yabancı) histokompatibilite antijenleri tarafından husule getirildiğinin düşünülmesine yol açmıştır (**Bach ve Kiskan, 1967, Hardy ve Ling tarafından zikredildiği üzere, 1969; Cooperband ve ark., 1968**). Bu takdirde stimülasyonun derecesi histokompatibilitedeki aykırılığın bir fonksiyonu olmak gerekir **Ba-**

in ve ark., 1964). Parçalanmış lökositlerin de aynı etkiyi yapması bu görüşü desteklemek için gösterilmişse de Hardy ve Ling (1969) sonucu durumu teyide muvaffak olamadıkları gibi KLR'na sadece transplantasyon antijenleriyle açıklanmasını şüpheyile karşılamaktadırlar.

KLR nun organ nakillerinde alıcı-verici seçiminde test olarak kullanılıp kullanılamıyacağı tartışması devam etmektedir. Bulgular blastik transformasyonda çeşitli değişkenlerin dikkate alınması gerektiğini düşündürür mahiyettedir. Biz bu çalışmayla kan yakınlığının (genetik yakınlık) etkisini araştırmakta, ayrıca bazı kan grupları antijenleriyle dönüşüm arasındaki ilişkileri incelemekteyiz.

MATERYEL VE METOD

Materyel

Çalışmada 63 kişiden alınan periferik kan lökositleri kullanılmıştır. Bunların dökümü aşağıda verilmiş; ayrıca, akrabalık durumları ve diğer teknik noktalar belirtilmiştir (Tablo 1).

(Tablonun düzenlenmesinde, metod bölümünde anlatılacağı üzere, zorunlu olarak, lökositleri yıkanmadan kültüre konan kişiler 'alıcı', bir kere yıkandıktan sonra konanlar 'verici' diye adlandırılmıştır. Alıcı ve vericinin pozisyonu değiştirilen kültürlerse karşılıklı diye işaretlenmiştir).

Tablo 1 — Lökositleri Kullanılan 'Alıcı' ve 'Verici' Kişiler, Akrabalık Dereceleri

Grup	Prot. No.	Cinsiyet		Akrabalık derecesi	Diğerleri
		Alıcı süpernatant	Verici yıkanmış		
I	1 a	E	D	—	karşılıklı
	1 b	D	E	—	
	2 a	E	D	—	»
	2 b	D	E	—	
	3 a	E	D	—	»
	3 b	D	E	—	
	4 a	E	D	—	»
	4 b	D	E	—	
	5 a	E	D	—	»
	5 b	D	E	—	
	6	E	D	—	—

II	7	E	D	—	—
	8	D	E	—	—
	9	D	E	—	—
III	10	E	E	—	—
	11	E	E	—	—
	12	E	E	—	—
	13	E	E	—	—
IV	14	D	D	—	—
	15	D	D	—	—
	16	D	D	—	—
	17	D	D	—	—
	18	D	D	—	—
	19 a	D	D		
	19 b	D	D	kız kardeş	karşılıklı
	20 a	D	D		
V	20 b	D	D	»	»
	21 a	D	D	»	»
	21 b	D	D		
	22 a	D	D		
VI	22 b	D	D	»	»
	23	D	D	kız kardeş	—
	24	D	D	»	—
	25	D	D	»	—
	26 a	E	E	erkek kardeş	karşılıklı
	26 b	E	E		
VII	27 a	E	E		
	27 b	E	E	»	—
	28 a	E	E		
	28 b	E	E	»	—
VIII	29	E	E		
	30	E	E		
	31	E	E		
	32 a	E	D		
IX	32 b	D	E	erkek-kız kardeş	karşılıklı
	33 a	E	D		
	33 b	D	E	»	»
	34 a	E	D		
	34 b	D	E	»	»

	35	D	E	kız-erkek kardeş	—
X	36	D	E	»	—
	37	D	E	»	—
	38	E	D	erkek-kız kardeş	—
XI	39	E	D	»	—
	40	E	D	»	—
	41 a	D	E	anne-oğul	karşılıklı
XII	41 b	E	D		
	42 a	D	E	»	»
	42 b	E	D		
	43	D	E	anne-oğul	—
XIII	44	D	E	»	—
	45	D	D	»	—
	46 a	D	D		
XIV	46 b	D	D	anne-kız	karşılıklı
	47 a	D	D	»	»
	47 b	D	D		
	48	D	D	anne-kız	—
XV	49	D	D	»	—
	50	D	D	»	—
	51 a	E	D		
	51 b	D	E	baba-kız	karşılıklı
	52 a	E	D		
XVI	52 b	D	E	»	»
	53 a	E	D		
	53 b	D	E	»	»
XVII	54	E	D	baba-kız	—
	55	E	D	»	—
	56 a	E	E	baba-oğul	karşılıklı
	56 b	E	E		
	57 a	E	E		
XVIII	57 b	E	E	»	»
	58 a	E	E		
	58 b	E	E	»	»
	59	E	E	baba-oğul	—
XIX	60	E	E	»	—
	61	E	E	»	—
	62	E	D	ikiz-kardeş	—
XX	63	D	E	»	—

Tablonun incelenmesinden anlaşılabacağı üzere, 18 kişinin birbirleriyle akrabalığı yoktur (kontrol grubu). Geriye kalanlardan 7 tanesi kız kardeş, 6 tanesi erkek kardeş, 9 tanesi kız-erkek kardeş (veya tersi), 5 tanesi anne-oğul, 5 tanesi anne-kız, 5 tanesi baba-kız ve 6 tanesi baba-oğuldur. Ayrıca iki çift ayrı cinsiyetli ikiz incelenmiş, bunlar gruplar halinde gösterilmiştir.

Yaş farkı dikkate alınmamış, kromozomal seviyede etki yapabilecek ilaçları (bazı antibiyotikler, steroidler gibi) kullanmadığı ya da radyasyona maruz kalmadığı anamnezle tesbit edilenler seriye dahil edilmiştir. Vak'aların çoğu Genetik Kürsüsüne gelen hastalardan seçilmekle beraber kromozom düzensizliği gösterip göstermeyecekleri sakınca sayılmamıştır.

Metodlar

1. Anamnez : Kişi fizik muayeneye tabi tutulmamış (Kürsüce esasen incelenenler ve çalışmaya sokulanlar hariç), sadece akrabalık ve belli bazı ilaçların alınıp alınmadığının soruşturulmasıyla yetinilmiştir.

2. Lökosit kültürleri: Kültüre ait ayrıntılar ilk makalede verilmiştir (Şaylı, 1969). Kültürler iki şekilde hazırlanmıştır : (a) Bir şahıstan alınan periferik kan sedimentasyona terkedildikten sonra 0.5 sm³ kadar süpernatant TC Medium 199 ile bir kere yıkanmış, ondan sonra öteki şahsın intakt lökositlerinin ekildiği PHA ihtiva etmeyen kültür şişesine konmuştur. Lökositleri yıkanmayan kişi 'alıcı', bir kere yıkanan da, kolaylık için, 'verici' diye adlandırılmıştır. (b) İki lökosit süpernatantı doğrudan doğruya şişelere konmuş ve PHAsız kültür edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2 — İntakt Lökosit Kültürleri

Prot. No.	Cinsiyet		Akrabalık durumu
	Alıcı	Verici	
1	E	D	—
2	E	D	—
3	E	D	—
8	D	E	—
11	E	E	—
12	E	E	—
14	D	D	—
15	D	D	—
19	D	D	kız kardeş
20	D	D	»
22	D	D	»
26	E	E	erkek kardeş
27	E	E	»
28	E	E	»

31	E	E	»
32	E	D	erkek-kız kardeş
33	E	D	»
34	E	D	»
36	D	E	kız-erkek kardeş
37	D	E	»
41	D	E	anne-oğul
42	D	E	»
45	D	E	»
47	D	D	anne-kız
48	D	D	»
49	D	D	»
51	E	D	baba-kız
52	E	D	»
53	E	D	»
56	E	D	baba-oğul
57	E	E	»
60	E	E	»
62	E	D	ikiz-kardeş
63	D	E	»

3. Sitolojik inceleme : Giemsa ile boyanmış preparatlar immersiyon mikroskopunda incelenerek blastik transformasyon genellikle sitolojik kriterlere göre değerlendirilmiş, metafaz, prometafaz ve profaz safhasındaki çekirdekler skorlandırılmıştır. Metafaz plakları bulunanlara + + +, prometafaz devresinde olanlara + + ve profaz devresinde olanlara + verilmiş, blastik dönüşüm göstermeyenlere — denmiştir. Yıkanma nedeniyle 'verici' lökositler sayılmamış, ancak intakt olanlarda mitotik index çıkarılabilmiştir. Son olarak çeşitli preparatlardaki figürler birbirlerine göre yüzdeleştirilmiştir.

4. Kan grupları : Behringwerke AG'den sağlanan antiseromlarla bütün vak'alarda lam metoduyla P (anti—P₁—p^k), tüp metoduyla Duffy (anti—Duffy^a), tüp metoduyla Kell/Cellano (anti—Kell/anti—Cellano), MN ve s grupları tayin edilmiştir. Bununla beraber reaksiyon sonuçları indirek Coombs ile kontrol edilmemiş ve genotip tayinine gidilmemiştir.

BULGULAR

PHA ihtiva etmeyen kültür ortamında iki ayrı lökosit popülasyonundan birinin bir kere yıkanmış olması, kalitatif bakımdan bir mes'ele yaratmadığı, yani, intakt lökositler kadar yıkan-

mişlar da ana şekillerine dönebildiklerinden (Şaylı, 1969) Tablo 1 ve 2 de sıralanan kişilere ait sonuçlar topluca verilmektedir (Tablo 3). Kişileri birer-birer belirtmek yerine gruplardaki reaksiyonları işaretleme tercih edilmiştir.

Tablo 3 — Kontrol ve Akrabalık Derecesine göre Düzenlenmiş Gruplarda Karışık Lökosit Reaksiyonu

Grup	Akrabalık	Blastik Transformasyon
I	—	+++
II	—	++
III	—	+++
IV	—	+++
V	kız kardeş	+
VI	»	—
VII	erkek kardeş	—
VIII	»	++
IX	erkek-kız kardeş	+
X	kız-erkek kardeş	—
XI	erkek-kız kardeş	++ (?)
XII	anne-oğul	+
XIII	»	—
XIV	anne-kız	++
XV	»	+
XVI	baba-kız	—
XVII	»	—
XVIII	baba-oğul	++
XIX	»	—
XX	ikiz kardeş	— (+?)

Sanuçları tartışmadan önce, esasen yalnız birinci derecede akrabalık söz konusu olduğundan, bu tabloyu (a) kontrol gurubunda ve (b) 1. dereceden akrabalarda blastik reaksiyon şeklinde sadeleştirmek ve yeniden düzenlemek mümkündür (Tablo 4).

Tablo 4 — Kontrol ve 1. Dereceden Akraha Gruplarında Karışık Lökosit Reaksiyonu

Grup	Akrabalık	Blastik Dönüşüm
Kontrol	—	++, ++, ++
1. Derece akraha	+	++, ++ (?), + (?), +, —

Tabloların incelenmesinden anlaşılacağı üzere, birbirleriyle kan yakınlığı bulunmayan kişilerde KLR (blastik transformasyon)

bütün komponentleriyle meydana gelirken ana-baba ve çocuklar arasında sadece profaz ve prometafaz devresindeki hücrelere rastlanmıştır. Bununla beraber, birer vak'ada erkek kardeşler, anne-kız ve baba-oğul arasında aşikâr prometafaz tesbit edilmiş, erkek-kız kardeş arasındakiki kültürdeyse prometafazlar şüpheli karşılaşmıştır. İkiz kardeşlerden meydana gelen sistemlerin birinde dönüşme olmamış, diğerinde profaz çekirdeklerine rastlanmıştır. Bulgular 'alıcı-verici' diye tanımlanan karşılıklı kültürlerde de aynı olmuştur (Resimler 1-3).



Resim 1 — Prometafaz safhasında çekirdek ve metafaz plağı (birbiriyle akrabalığı bulunmayan, eritrosit antijenleri identik kontrol grubundan). Giemsa x immersiyon



Resim 2 — Prometafaz safhasında çekirdek ve metafaz plağı (birbiriyle akrabalığı bulunmayan, eritrosit antijenleri identik olmayan kontrol grubundan). Giemsa x immersiyon



Resim 3 — Kızkardeşlerden yapılan karışık lökosit kültüründe stimülasyon belirtisi göstermeyen hücreler.

Giemsa x immersiyon

Akraba grubu mitotik index (kültüre konan 100 lökosit karşılık elde edilen metafaz plağı) bakımından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında söylenenlerin genellikle desteklendiği görülür. İlkinde mitotik index pratik olarak sıfırken ikinci grupta % 0.8-5.1 arasında çıkmıştır. (Mamafih, mitotik indexe başka faktörlerin de etki yaptığı, aynı metodla, aynı zamanda hatta aynı kişilerden yapılan kültürlerde bile büyük sayılabilecek varyasyonun bulunduğu, hattâ, kültürlerin başarısız olduğu unutulmamalıdır).

Karışık lökosit kültürlerinde blastik transformasyonla bazı eritrosit antijenleri arasındaki ilişkiler Tablo 5 de verilmektedir.

Tablo 5 — P, Duffy, Kell/Cellano, MN ve Ss Antijenleri ve KL Kültürlerinde Blastik Dönüşüm

Grup	Akrabalık	Eritrosit Antijeni	Fenotip	Blastik Dönüşüm
I	—	P	identik	++
			identik değil	+++
		Duffy	identik	+
			identik değil	+
I	—	Kell/Cellano	identik	+++
			identik değil	++
		MN	identik	+
			identik değil	++
		Ss	identik	+
			identik değil	++
II	1. dereceden	Hepsi	identik	++, ++ (?), +, —

Sonuç olarak denebilir ki birbiriyle akrabalığı bulunmayan ve söz konusu eritrosit antijenleri itibarıyla identik ve identik olmayan fenotipteki kişilerden yapılan karışık lökosit kültürlerinde hemen daima blastik transformasyon husule gelebilmektedir. Buna karşılık teorik olarak aynı antijenlere sahip birinci derece akrabalarda karşılıklı reaksiyon (interaksiyon), antijenik yapıyı dikkate almıyan deneylerde olduğu gibi (Tablolar 3 ve 4), ya hiç görülmemekte veya pek az derecede meydana gelmektedir (prometafaz ve profaz çekirdekleri). Bununla beraber materyelin azlığı ve genotiplerin bilinmediği dikkatten uzak tutulmamalıdır.

TARTIŞMA

Mitojenik etkisinden faydalanılmak üzere rutin olarak kullanılan fitohemaglütinin bulunmadığı bir kültürde, ister intakt ister önceden şu veya bu şekilde muamele görmüş, hatta kısmen inaktif ve edilmiş lökositlerin başka bir individiuma ait normal lökositlerle birlikte bulunması halinde, genetikman uzak iki hücre grubundan birinin diğerini stimüle ettiği ve DNA sentezine ittiği şüphesizdir. Fakat daha iyisi, (kısmen) inaktif hücrelerin blast şekillerine dönme güçlerini kaybetmelerine rağmen, ikisinin de birbirlerini uyardıklarını söylemektir; zira, KLR genellikle iki yönlü bir reaksiyondur ve iki lökosit populasyonunun da neticeye karakteristik katkıları vardır (Hardy ve Ling, 1969). Bunu, sonuncu yazarlar, iki hücre de intakt ve belki canlı olmadan reaksiyonun olamayacağına değinerek 'hücre-hücre interaksiyonu' şeklinde tanımlamaktadırlar. Burada arzedilen 'alıcı-verici' pozisyonların değiştirilmesi halinde, yani, resiprok kültürlerde stimülasyonun yine görülmesi bu fikri destekler mahiyettedir. Ancak ne stimülasyonun mahiyeti ne de mekanizması kesinlikle anlaşılmıştır, lâkin immünolojik natürde olduğu şüphesizdir. Nitekim, homolog hücrelere karşı doğumda toleran kılınmış sıçan lenfositleri tolerans husele getiren soyun hücreleri için spesifik olarak non-reaktiftir (Wilson ve ark., 1967; Schwarz, 1968). Diğer bütün yazarlar bu anlayışta fikir birliğindedirler.

Burada arzedilen bulguların önceki çalışmaları desteklediği şüphesizdir: KLR'nde blastik dönüşüm 1. dereceden akrabalarda akraba olmıyanlara oranla yok denecek kadar önemsiz. Bizim dizigotik ikizlerimizde de, monozigotiklerdeki gibi (Bain ve ark., 1964). dönüşüm negatif olmuştur. Bu sonuç ilk bakışta şaşırtıcı sayılabilir; zira, birbirine yakın kişilerdeki reaksiyonun daha kuvvetli olması gerekeceği düşünülebilir. Bu takdirde iki noktanın dikkate alınması zorunlu : (i) kişinin, eğer transformasyon immünolojik temele dayanıyorsa, genel antijenik yapısı (iki genetikman determinedir) ve (ii) kültürdeki 'responding' ve 'stimulating' hücrelerin antijenik yapıları (ki aynı şekilde genetik kontrol altındadır). İlk halde 1. derece akrabaların (anne, baba ve sibler) bu tür genlere % 50 ortak olmaları gerekir. Benzerliğin KLR'nde pozitif ya da negatif yönde etki yapması aynı derecede mümkündür, ne var ki

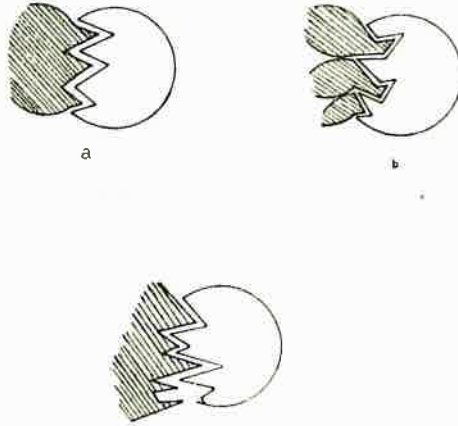
alternatiflerden birini seçmek için hiç delilimiz yok. Öyleyse blastik dönüşümde iki lenfosit popülasyonunun genetik karakterleri ele alınmalı.

Niçin lenfositlerdeki antijenik benzerlik (% 100 veya % 50) karışık kültürlerde negatif etki yapıyor? Bu sorunun direkt cevabını henüz bilemiyoruz; zira, devamlı çalışmalara rağmen, blastik transformasyonun mekanizması yeterince aydınlanmış değil (başlıca, Agarwal ve ark., 1970). İleriye sürülen ve tam olarak testlendirilmemiş olmakla beraber, aşağıda söyleneceği gibi, geniş ölçüde desteklenen hipotez şu : KLK nde meydana gelecek reaksiyonun akibeti bir hücre popülasyonunun öteki hücre popülasyonundaki immünogenetik aykırılığı tanıyabilme yeteneğine bağlıdır. Eğer reaksiyon yoksa iki hücre popülasyonu arasında immünogenetik aykırılık yok veya hücreler mevcut aykırılığı tanıyamıyorlar demektir. Bununla beraber başka alternatiflerin de göz önünde tutulması gerektiğini bildiren gözlemler vardır : Sell ve ark. nın (1965) radyoaktif metodlarla yaptıkları deneylere göre spesifik veya nonspesifik lökosit transformasyonunda protein, RNA ve DNA sentez edilmekte ve hücre metabolik değişikliklere uğramaktadır. Yazarlara göre sentez edilen proteinler lenfositlerdeki değişikliklerden sorumludur ve IgG dışındaki proteinlere karşı yapılan antikorlar blastogeneze yol açmaktadır. Bu tür biyokimyasal değişiklikler başkaları tarafından da gösterilmiş ve neticede küçük, definitif periferik kan lenfositinin transformasyonu gen aktivasyonunun memeli hücrelerindeki modeli sayılmıştır (Hirschhorn ve ark., 1969)). Onun için blastik transformasyon sadece antijen - antikor ilişkileri içerisinde görülmemeli (Gell ve Sell, 1965). Nitekim Supinancı ve ark. (1970). kronik hepatitli değil fakat sirozlu hastaların lenfositlerinin PHA ile stimülasyonlarının deprese olduğunu müşahade etmişlerdir.

Burada arzedilen çalışmalarla KLK ndeki blastik transformasyonunun bazı eritrosit antijenleriyle ilişkili olmadığı açıkça anlaşılr. Zira söz konusu antijenler bakımından identik ve identik olmıyan kontrol grubunda mitotik index değişmemiş; buna karşılık, 1. dereceden akrabalarda pratik olarak blastik dönüşüm görülmemiştir ki bu sonuncuların eritrosit antijenlerini tayin eden genlere de % 50 ortak oldukları malumdur. Eritrosit ve trombositlerin stimülasyonda variabl olmadıkları başkaları tarafından da

bildirilmiştir (Bain ve ark., 1964; Hardy ve Ling, 1969). Sonuncu araştırmacılar hatta eritrositler için depresör bir etki anlatmaktadırlar.

Bütün bu tartışmalardan sonra şu fikir rahatlıkla ileriye sürülebilir : Madem ki dönüşümde asıl variabl lenfosittir, öyleyse hücrelere vaki etkinin bir dereceye kadar spesifik olması zorunludur. Çünkü non-spesifik denmesine rağmen PHA, «pokeweed» extresi, stafilokok kültür filtratı, anti-lenfosit ve anti-immünoglobulin seromların ve spesifik antijenlerin dönüşüm husule getirdikleri bilinmektedir (ilk yazıdaki referenslere bak). Tabii, bu aynı morfolojik tabloyla tezahür edecektir : mitoz. Madem ki uyarılan bir hücredir, bu hücrede reaktif bir yüzey veya kesimin mevcudiyeti şart olmalı. İşte bu kesimlerin her madde için spesifik olduğu düşünülebilir. Alternatif olarak da her stimülan için ayrı bir reaksiyon yüzey veya kesiminin bulunacağı söylenebilir (hiç şüphesiz moleküler seviyede) (Şema 1). Aynı düşünce karışık



Şema 1 — Lenfositlerin blastik transformasyonunun mekanizmasını açıklamak üzere ileri sürdüğümüz hipoteze göre:

- a) hücrede belli bir reaktif kesim vardır, stimülan maddenin teması reaksiyonu başlatır; ancak bu teması sağlayabilen maddeler stimülantır.
- b) hücrede her stimülan madde için ayrı ve özel bir reaktif yüzey bulunur.
- c) hücrede belli ve tek bir reaktif kesim vardır, ancak stimülan maddenin teması sonucu bu kesimde moleküler seviyede yeniden düzenlenme olur ve reaksiyon başlar.

kültürlerdeki «responding» hücreler için de geçerli olmak gerekir. Tabiatıyla bu bir spekülasyon ve isbatı güç. Ne var ki genel biyolojik fenomenlere hiç de aykırı düşmez, zira lenfositlerdeki antijenik kesimlerin kişinin diğer organlarındakilerle aynıyeti biyolojik zorunluluktur. Nitekim **Hardy ve Ling** (1969) karşılıklı stimülasyonun bir hücre-hücre teması sonucu olduğunu isbatlamışlardır. Bununla beraber mevcudiyeti farzedilen reaktif kesimlerin mahiyetini açıklamak ve lokalizasyonunu yapmak henüz mümkün değil. İlerki çalışmalar bu hipoteze ışık tutacaktır. Karsinogenezisle ilgili transformasyonu açıklarlarken **İnbar ve Sachs** da (1969) yüzey membranlardaki farklı strüktürel kesimlerden bahsetmektedirler.

Öte yandan KKK ne kaçınılmaz olarak granülosit ve diğer kan elemanları dahil edilmektedir; bunların hiç değilse reaksiyon toplamına etki yapacakları şüphesizdir (Şaylı, 1969; **Hardy ve Ling**, 1969). Sonuç olarak denebilir ki karışık lökosit kültürlerindeki blastogenezisin mahiyeti henüz yeterince anlaşılamamıştır ve sistemin kinetiği üzerine devamlı araştırmalar yapılmaktadır.

KARIŞIK LÖKOSİT REAKSİYONU ORGAN NAKİLLERİNDE TEST OLARAK KULLANILABİLİR Mİ?

İnsanda bazı organların kişiden kişiye nakli pratikte çeşitli güçlükler arzeder. Transplantasyon sonrası zorluklar da az değildir ve bütün gayretlere rağmen başarısızlığın hatta bazan fatalitenin önüne geçilemez. Fenomende doku veya organ uygunluğunun varlığı temeldir; zira ancak otolog veya izolog (izojenik) aşılardan başarı şansı vardır; ilk halde doku veya organ bizzat kişinin kendisinden, ikincisinde (insanda) hormozigot ikiz kardeşinden alınır.

Solid allografların alıcı organizma tarafından kabul edilme-yip atılması («rejection») vakiasının hücre aracılıklı immüniteden («cellemediated immunity») sorumlu lenfositlerin transplantasyon fenomenine karışmasıyla ortaya çıktığı genellikle kabul edilmektedir. Bu görüşü destekliyen çeşitli bulgular herkes tarafından esasen biliniyor Allograft başarısı hemen mutlak genetik homojeniteyi gerektirdiğinden alıcı-vericiden seçilmesi, daha yerinde deyi-miyle, eşleştirilmesinde çeşitli testlerin uygulanması zorunluluğu vardır. Böyle bir test:

- a) basit;
- b) sür'atli;
- c) tekrarlanabilir;
- d) hassas;
- e) ölçülebilir ve
- f) manüplasyon bakımından kolay olmalıdır.

İşte KLR testi bu özelliklerden bazılarına sahiptir ve onun için organ nakillerinde toleransın tesbiti amacıyla kullanılabilir (Schwarz, 1968); çünkü, bu sistemde blastik transformasyonun meydana gelmesi veya gelmemesi iki lenfosit grubundaki immüno-genetik aykırılık veya uzaklığa bağlıdır.

Bu görüş ve KLR'nde blastik transformasyonun histokompatibilite antijenleriyle ilişkili olduğu fikri şu gözlem ve bulgulara dayandırılmaktadır :

i) İnsanda identik ikizlerde (tek-yumurta ikizleri) ve safkan («inbred») hayvan suşlarında KLR'nde stimülasyon görülmez (Bain ve ark., 1964; Bach ve Hirschhorn, 1964); çünkü, bu gibi individümlerin immüno-genetik benzerlikleri tamdır (% 100), dolayısıyla birbirleri için tolerandırlar ;

ii) akraba kişilerden yapılan KLR'nde aktivasyon akraba olmayan kişilerininkine oranla çok daha azdır (Bain ve Lowenstein, 1964; buradaki çalışmalar);

iii) üç kişiden ibaret bir grubun histokompatibilite durumu, KLR'ne dayanarak, üçüncü kişinin ilkininkilerle testlendirilmesi halinde tayin edilen histokompatibiliteye tamamen uyar (Bach ve Hirschhorn, 1964);

iv) HL-A (insan histokompatibilite antijenleri, major loküs) identik kardeşlerin hücreleri KLR'nde stimüle edilemezken aynı loküs için identik olmayan vericilerle yapılan klütürlerde daima stimülasyon görülür (Amos ve Bach, 1968); ve

v) diğerleri. Şöyle ki (başlıcaları) :

a) sıçanda hemopoietik hücrelerin neonatal devrede verilmesiyle husule getirilen tolerans transformasyonu süprese eder (Schwarz, 1968);

b) sıçanda iki grup hücre Ag-B histokompatibilite lökü-sü bakımından farklı olmadıkça pozitif reaksiyon alınmaz (Elkins ve Palm, 1967);

c) alıcı ve vericinin deri hücreleri birlikte kültür edil-diğinde deri graftı reaksiyonu sırasında ve bundan sonra KLR ak-tivasyonu artar. Toleran kılınmış donörlerin lenfositleri pironino-filik hücreler haline dönmekte, yani, blastik dönüşüme uğra-mamakta ve runt hastalığının en küçük belirtilerini olsun verme-mektedirler (Gowans ve McGregor, 1965).

Bütün bunlar şöyle yorumlanıyor : lenfositlerin blastik trans-formasyon süreci transplantasyon antijenlerine karşı primer immünolojik cevabın ilk safhasıdır. Nitekim doğumda homolog transplantasyon izoantijenlerine toleran kılınmış donör lenfositleri tolerans husule getiren soyun antijenlerini taşıyan hücreler için non-reaktiftirler; o halde KLR sadece histokompatibilite antijenle-riyle ilgili bir fenomendir (Wilson ve ark., 1967). İnsanda da KLR nde aktivasyonun meydana gelebilmesi için gerekli ve önemli olan antijenler major 'LA' ve '4' subloküslerle aynı veya onlara pek ya-kın genlerle tayin ediliyor. demektir (Kissmeyer-Nielsen ve ark., 1970). Gerçekten HL-A sistemi yalnız ('LA') '4' subloküslerinden ibaretse, bir insan en çok dört HL-A antijene sahip olacak ve bun-dan karışık lenfosit kültürlerinde stimülasyonun görülmemesi ha-linde birbiriyle akrabalığı bulunmayan lökosit donörlerinin de HL-A identik kardeşler gibi aynı antijenlere sahip oldukları anla-mı çıkacaktır.

Ancak bu arada bazı gözlemleri gözden uzak tutmamak gere-kir :

A) Üremik plazma KLR nde normal hücrelerin reaksiyonu-nu inhibe etmekte fakat PHA ile vaki stimülasyona zarar verme-mektedir (Kasakura ve Lowenstein, 1967);

B) Kontrol kültürlerindeki stimülasyon yüksekse karışık kül-türlerdeki oranın düşüklüğünü değerlendirmek güçleşir;

C) İnsan transplantasyon antijenlerini teşkil eden ve fare-de H-2, sıçanda Ag-B sistemleriyle eş olan HL-A sisteminin gene-tik kompozisyonu son derece karışıktır ve subloküslerin sayısı yeterince bilinmemektedir. Nitekim Walford ve ark. (1969) bu an-

tijenlerin sentezine katılan üçüncü subloküsü keşfetmişlerdir. Ayrıca loküslerde krosing-over gibi yeniden düzenlenmeler, mutasyonlar meydana gelebilir (**Kissmeyer-Nielsen ve ark.**, 1969).

D) İmmünolojik bakımdan farklı olmalarına rağmen kronik olarak timektomize ergin köpeklerin hücreleri karışık kültürlerde ya hiç reaksiyon vermezler ya da reaksiyon minimal kalır (**Kisken ve Swenson**, 1969);

E) Mitotik index istatistik ve dinamik bakımdan genotipe tabidir (**Gedda ve Brenci**, 1970), ve

F) İki kişinin hücreleri birbirini stimüle edebilir ki individual farklar histokompatibilite loküsündeki farklılara bağlı olabilir (**Kasakura ve Lowenstein**, 1968).

Bu gözlemler blastik transformasyon fenomenine, bir kısmı bilinen, çeşitli faktörlerin katkıda bulunduklarını düşündürür ve sonuncu nokta transplantasyon amacıyla yapılacak eleştirmede uygulanması gereken metodun tek-yönlü stimülasyon olacağını telkin eder.

Tek-yönlü stimülasyon, bugün için, iki şekilde elde edilebilir:

I — Lökosit popülasyonlarından birinin mitomisin C ile muamelesi: Mitomisin C ile muamele edilmiş lökositler, DNA sentezi blokajı nedeniyle, aktive edilemezler fakat 'stimulating' hücre görevini yerine getirirler ve intakt homolog hücreleri blastogeneze götürürler ('responding' hücreler) (**Bach ve Voynow**, 1966). Ancak daha sonraları mitomisinle meydana getirilen hücre harabiyetinin özellikle normal reaktör lökositler bulunduğu zaman reverzibl olabileceği anlaşılmıştır (**Elves**, 1969).

II — Lökosit popülasyonlarından birinin X — ışınlarıyla muamelesi : Lökositler 4000 r gibi oldukça yüksek dozda irradiye edilmekle 'stimulating' hücreler haline getirilebilir. İrradiasyonun sonuyla kültürün başlamasına kadar geçecek ara, irradiye hücre miktarı ve inkübasyon süresi dikkate alınması gereken değişkenlerdir (**Kasakura ve Lowenstein**, 1968). Yazarlara göre irradiye hücrelerle yapılacak tek-yönlü KLR kişiye özeldir. Bu metod transplantasyonda temel ölçüdür (**Bach**, 1967).

III — Diğer metodlar: Diğer metodlarla da tek-yönlü stimülasyon mümkündür; ne var ki sonuçlar henüz tartışmalı (**Bach ve Hirschhorn, 1964; Hashem ve Rosen, 1964; Gordon ve MacLean, 1965; Kasakura ve Lowenstein, 1967**);

Alıcı yoksa verici lökositlerinin mi inaktive edileceği problem sayılmamalı; zira, hatırlanacağı üzere, reaksiyon karşılıklıdır. En iyisi resiprok kültürlerle, bir defasında alıcı öteki defasında verici hücreleri muameleye tutularak, sonuç değerlendirilmeli. Deney en azından iki kere tekrarlanmalı.

Gerçekten **Kisken ve Malck (1969)** KLK tekniğini köpekler arasındaki böbrek transplantasyonunda alıcı-vericiyi eşleştirmek için başarıyla kullanmışlar ve bunun histoinkompatibilitiyi tayinde faydalı bir test olabileceğini isbatlamışlardır. Aynı şekilde **Graw ve ark. (1970)** allojenik kemik iliği aşıları yapabilmek üzere akut lenfositik lösemiyle musap 10-24 yaşlı 8 kişinin eşleştirilmesinde bu metodu uygulamışlardır. Vericiler HL-A identik kardeşler olmuş ve hiçbirinde KLK nde reaksiyon görülmemiştir.

Sonuç olarak denebilir ki karışık lökosit kültürleri homografların genetik olarak eşleştirilmesinde bir metod gibi kullanılabilir. Reaksiyonun neticesi diğer bulgularla beraber değerlendirilmelidir.

ÖZET

Bu çalışmada birinci dereceden akrabalarla akraba olmayanlardan yapılan karışık lökosit kültürlerinde lenfositlerin blastik transformasyonunu tayin ve bu reaksiyonla P, Duffy, Kell/Celano, MN ve Ss eritrosit antijenleri arasında ilişki bulunup bulunmadığını tesbit amacıyla 45 tanesi 1. dereceden akraba 63 kişinin periferik lökositleri kullanıldı. Fitohemaglütininin ihtiva etmeyen standard kültürlerdeki reaksiyon sitolojik metodlarla değerlendirildi. Akraba grubunda stimülasyonun karşılıklı olarak meydana gelmediği ve stimülasyonla söz konusu antijenlerin ilişkisinin bulunmadığı gösterilerek KLR nun allograft transplantasyonunda histoinkompatibilitiyi tayin için test olarak kullanılabileceği belirtildi.

Transformasyonun mekanizmasını açıklamak üzere lenfositlerde özel reaktif kesimlerin varlığını öngören bir hipotez ortaya atıldı.

SUMMARY

Investigations on the Relationship between Consanguinity, Blastic Transformation and Some Erythrocyte Antigens

In this study to measure the degree of transformation of lymphocytes in mixed leucocyte cultures from those who are relatives and those of unrelated individuals and to test if there is any relationship between the erythrocyte antigens of P, Duffy, Kell/Celano, MN and Ss, peripheral leucocytes have been taken from 63 individuals, 45 of them are first-degree relatives. Reactions in standard cultures not containing phytohemagglutinin have been evaluated with cytologic techniques. It has been found that no stimulation in those cultures from first-degree relatives occurs and there is no relation between antigens tested so far. To explain the mechanism of lymphocyte transformation it has been postulated the existence of some specific reactive sites on lymphocytes.

LİTERATÜR

- 1 — Agarwall, S.S., Bugbee, S.J., Loeb, L. A. : Induction of DNA polymerase in mixed lymphocyte cultures. *Nature*, 226: 949 1970.
- 2 — Bach, F.H.: First International Congress of the Transplantation Society (abstr.), s. 172, Paris, 1967. Kasakura ve Lowenstein'da, 1968.
- 3 — ———, Hirschhorn, K.: The in vitro immun response of peripheral blood lymphocytes. *Seminars in Hematology*, 2: bb, 1965.
- 5 — ———, Kiskan, W.A.: *Transplantation*, 5: 1046, 1967. Hardy ve Ling'de, 1969.
- 6 — ———, Voynow, N.K.: One-way stimulation in mixed leucocyte cultures. *Science*, 153: 545 1966.
- 7 — Bain, B., Lowenstein, L.: Genetic studies on the mixed leucocyte reaction. *ibid*, 145 : 1315, 1964.
- 8 — ———, Vas, M.R., Lowenstein, L.: The development of large immature mononuclear cells in mixed leucocyte cultures. *Blood*, 23: 108-116, 1964.
- 9 — ——— : *Federation Proc.*, 22: 428 (abstr.), 1963.
- 10 — Cooperband, S.R., Rosen, F.S., Kibrick, S.: Studies on the in vitro behavior of ogamunaglobulinemic lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 47: 836-847, 1968.
- 11 — Dutton, R.W.: Further studies of the stimulation of DNA synthesis in cultures of spleen cell suspensions by homologous cells in inbred strains of mice and rats. *J. Exp. Med.*, 122 : 759 1965.

- 12 — **Elkins, W.L., Palm, J.E.:** Identification of a strong histocompatibility locus in the rat by normal spleen cell transfer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 129: 573, 1967.
- 13 — **Elves, M.W.:** Comparison of mitomycin C and X-rays for the production of one-way stimulation in mixed leucocyte cultures. *Nature*, 223: 90, 1969.
- 14 — **Gedda, L., Brenci, G.:** The genetic conditioning of the mitotic index and the association index of acrocentric chromosomes. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 19: 179, 1970.
- 15 — **Gell, P.G.H., Sell, S.:** Studies on rabbit lymphocytes in vitro. *J. Exp. Med.*, 122: 813, 1965.
- 16 — **Gordon, J., MacLean, L.D.:** A lymphocyte—stimulating factor produced in vitro. *Nature*, 208: 795, 1965.
- 17 — **Gowans, J.L., Mc Gregor, D.D. :** The immunological activities of lymphocytes. *Progr. Allergy*, 9: 1, 1965.
- 18 — **Graw, R.G., Herzig, G.P., Rogentine, G.N., J., Yankee, R.A., Leventhal, B.G., Whang-Peng, J., Halterman, R.H., Krüger, G., Berard, C., Henderson, E.S.:** Graft-versus-host reaction complicating HL-A matched bone-marrow transplantation. *Lancet*, ii: 1053, 1970.
- 19 — **Hardy, D.A., Ling, N.R.:** Effects of some cellular antigens on lymphocytes and the nature of the mixed lymphocyte reaction. *Nature*, 221: 545 1969.
- 20 — **Hashem, N., Rosen, F.S.:** Mitogenic fractions in human peripheral lymphocyte extracts. *Lancet*, i: 201, 1964.
- 21 — **Hirschhorn, R., Troll, W., Brittinger, G., Weissmann, G.:** Template activity of nuclei from stimulated lymphocytes. *Nature*, 222: 1247 1969.
- 22 — **Inbar, M., Sachs, L.:** Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. *ibid*, 223: 710, 1969.
- 23 — **Kasakura, S., Lowenstein, I. :** Irradiated and preserved leucocytes in mixed leucocyte cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125: 355, 1967.
- 24 — ———: The factors affecting the strength of 'one-way' stimulation with irradiated leucocytes in mixed leucocyte cultures. *J. Immun.*, 101: 12 1968.
- 25 — **Kisken, W.A., Malek, G.H.:** Kidney allograft survival in the dog predicted by mixed leucocyte culture tests. *Nature*, 224: 1110, 1969.
- 26 — ———, **Swenson, N.A.:** Unresponsiveness of mixed leucocyte cultures from thymectomized adult dogs. *ibid*, s. 76-77.
- 27 — **Kissmeyer-Nielsen, F., Svejgaard, A., Sorensen, S.F., Nielsen, L.S., Thorsby, E.:** Mixed lymphocyte cultures and HL-A identity in unrelated subjects. *ibid*, 228: 63, 1970.
- 28 — ———, ———, **Ahrons, S., Nielsen, L.S.:** Crossingover within the HL-A system. *ibid*, 224: 75, 1965.
- 29 — **Lowenstein, L., Bain, B.:** Blastogenesis and histocompatibility. *Vox Sang.*, 11: 305, 1966.

- 30 — Sell, S., Rowe, D.S., Gell, P.G.H.: Studies on rabbit lymphocytes in vitro. J. Exp. Med., 122: 823, 1965.
- 31 — Schrek, R., Donnelly, W. J.: Differences between lymphocytes of leukemic and non-leukemic patients with respect to morphologic features, motility and susceptibility to guinea pig serum. Blood, 18: 561, 1961.
- 32 — Schwarz, M.R.: The mixed lymphocyte reaction: An in vitro test for tolerance. J. Exp. Med., 127: 879, 1968.
- 33 — Surianu, P., Heiniger, H.J., Feinendegen, L.E.: Verminderte Phytohemagglutinin-Stimulation von menschlichen Lymphozytenkulturen bei Leberzirrhose: Untersuchungen mit ³H-Thymidin und ¹²⁵I-Desoxyuridin. Blut, XX (6): 370, 1970.
- 34 — Şaylı, B.S.: Secondary constrictions and heteropycnotic segments of human chromosomes. Bull. Johns Hopkins Hosp., 114: 152, 1964.
- 35 — ———: Blastik transformasyonda serom faktörleri ve heterolog lökositlerin etkileri. A.Ü. Tıp Fak. Mec., 22: 749, 1969.
- 36 — Walford, R.L., Finkelstein, S., Hanna, C., Collins, Z.: Third sublocus in the HL—A human transplantation system. Nature, 224: 74, 1969.
- 37 — Wilson, D.B., Silvers, W.K., Nowell, P.C.: Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. J. Exp. Med., 126 : 655, 1967.

(Mecmuaya geldiği tarih: 21 Ocak 1971)