

KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU KOMPLİKASYONLARINDAN AKUT GRAFT VERSUS HOST HASTALIĞI (aGvHH)'NİN MİKST LENFOSİT KÜLTÜR (MLC) TESTİ İLE ÖNCEDEN BELİRLENMESİ

EARLY DETERMINATION OF ACUTE GRAFT VERSUS HOST DISEASE (aGvHD) WHICH IS A COMPLICATION OF BONE MARROW TRANSPLANTATION BY USING MIXED LYMPHOCYTE CULTURE (MLC) TEST

Hülya S. ŞEN*, Tülay KILIÇASLAN AYNA**, Mehmet GÜRTEKİN**

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada kemik iliği transplantasyonu (KİT) uygulanacak hastalara, nakilden önce rutin olarak yapılan standart mikst lenfosit kültür (sMLC) testine ek olarak sitokin ilaveleri ile yapılan modifiye MLC (mMLC) testi ile sMLC testinin duyarlılığının artırılarak, nakil sonrası çıkabilecek komplikasyonların önceden belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmaya, 1998-2004 yılları arasında, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen ve KİT düşünüldüğü için rutin test yapılan 90 hasta ve sağlıklı vericileri alınmıştır. Tek yönlü sMLC testine ek olarak IL-2, IL-2 + IL-4 ve IL-2 + IFN γ + TNF α ilave edilerek hem tek yönlü, hem de iki yönlü mMLC çalışılmıştır.

Bulgular: sMLC testte 90 vaka negatif sonuçlanmıştır. Rutin test tekniği dışında ayrıca Human Leucocytes Antigen (HLA)'leri uyumsuz olan kontrol grubunda sitokin ilaveleri ile yapılan tek yönlü MLC test sonuçları uyumsuz (+) ve elde edilen değerler (SI ile RRI) çok yüksek bulunmuştur. Tek yönlü MLC testi ile IL-2 ilave edilen 82 vakanın 18 inde (+) sonuç alınmış, 11'ine nakil yapılmış ve bunlardan 9'unda akut graft versus host hastalığı (aGvHH) gelişmiştir. IL-2 + IL-4 ilave edilen 39 vakanın 9'unda (+) sonuç alınmış, 4'üne nakil yapılmış ve 3 vakada akut aGvHH gelişmiştir. IL-2 + IFN γ + TNF α ilave edilen 77 vakanın 13 ünde (+) sonuç alınmış, 7 vakaya nakil uygulanmış ve hepsinde aGvHH gelişmiştir. İki yönlü MLC testinde ise sonuçlar iki farklı formül kullanılarak değerlendirilmiştir. IL-2 ilave edilen 60 vakada I. formüle göre 57 vakada (+) sonuç alınmış, 40'ına nakil yapılmış, 17 vakada aGvHH gelişmiştir. II.formüle göre 20 (+) sonuç alınmış, 17'sine nakil uygulanmış, 6 vakada aGvHH gelişmiştir. IL-2 + IL-4 ilavesi ile 17 vaka çalışılmış, I. formüle göre hepsinde (+) sonuç alınmış, 12 vakaya nakil gerçekleştirilmiş ve 3 vakada aGvHH gelişmiştir. II. formüle göre 3 (+) sonuç alınmış, 2 sine nakil uygulanmış ve komplikasyon gözlenmemiştir. IL-2 + IFN γ + TNF α ile 53 vakada I.formüle göre 49'unda (+) sonuç alınmış, 35'ine nakil uygulanmış ve 16'sında aGvHH gelişmiştir. II.formüle göre de 15 (+) sonuç alınmış, 10'una nakil uygulanmış ve 2'sinde aGvHH görülmüştür.

Sonuç: KİT planlanan alıcıya uygun vericinin seçilmesinde uygulanan sMLC testine ilave olarak yapılacak çalışmalar önemlidir. IL-2 ve IL-2 + IFN γ + TNF α sitokin ilaveli tek yönlü mMLC sonuçları testi daha duyarlı hale getirmiş ve mMLC testindeki sonuçlarındaki (+)'lik ile nakil sonrası aGvHH'nin görülmesi anlamlı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: sMLC, sitokin, tek yönlü MLC, iki yönlü MLC, KİT, aGvHH

ABSTRACT

Objective: Standard MLC test is routinely used for patient-recipient pairs before bone marrow transplantation (BMT). This study investigates the possible predictive role of modified MLC (mMLC) (i.e. addition of several cytokines to sMLC) on posttransplant complications.

Materials and methods: Ninety patient-recipient pairs undergoing BMT between 1998-2004 were included in this study. Apart from sMLC, one and two way mMLC (addition of IL-2, IL-2 + IL-4 and IL-2 + IFN γ + TNF α) were done.

Date received/Dergiye geldiği tarih: 16.02.2006

* İstanbul Bakırköy Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Pediatrik Hematoloji ve Onkoloji Kliniği, İstanbul

** İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

(İletişim kurulacak yazar: mgurtek@istanbul.edu.tr)

Results: sMLC yielded negative results in ninety patient-recipient pairs. mMLC with IL-2 addition yielded positive results in 18 cases out of 82, of which 11 received a transplant, where 9 patient experienced acute Graft versus Host Disease (aGvHD). IL-2 +IL-4 added mMLC test resulted in 9 positive results, where 4 received transplant and only 3 patients experienced aGvHD. IL-2 + IFN γ + TNF α added mMLC yielded 13 positive results, 7 received transplant and all of them experienced aGvHD. Two way MLC results were analysed by two calculations. The first formula gave 57/60 positive results; 40 received transplant, 17 experienced aGvHD, whereas with the second formula 20 positive results were seen, with 17 transplantations and 6 aGvHD. Only 17 cases had IL-2 + IL-4 added MLC test. Of these all were positive with the first formula, where 12 received transplant and 3 patient experienced aGvHD, with the second formula. Three positive results were observed, where 2 received transplant with no aGvHD complication. IL-2 + IFN γ + TNF α mMLC resulted in 49 positive results, where 35 received transplant with 16 aGvHD with the first formula, whereas with the second formula 15 positive results; 10 transplantation with 2 aGvHD.

Conclusion: Addition of cytokines to sMLC is of importance in choosing the best available donor for BMT. IL-2, IL-2 + IFN γ + TNF α addition to one way mMLC rendered MLC test sensitive. This conclusion is based on a correlation of positive mMLC results with the occurrence of aGvHD.

Key words: sMLC, cytokine, one way MLC, two way MLC, BMT, aGvHD

GİRİŞ

HLA insanda 6. kromozomun kısa kolu üzerindeki genler tarafından kodlanır. Sınıf I (HLA-A, B, C) ve Sınıf II (HLA-DR) antijenleri doku ve organ naklinde önemli olan immunolojik parametrelerden birisidir (1,9). Alıcı verici arasındaki HLA uyumu serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmektedir. sMLC testi ise doku tipi testlerine ilave olarak HLA-DR uyumunu saptamak için kullanılan bir test yöntemidir. Ancak HLA identik çiftlerde bile nakil sonrası komplikasyonlar (aGvHH, doku reddi) önceden belirlenmemektedir (3,5,6,8,10). aGvHH allojeneik KİT'in en önemli komplikasyonlarından biridir ve grade III ve IV aGvHH ölüm oranının artmasına neden olmaktadır. sMLC testinde çeşitli sitokinlerin etkisi çalışılarak aGvHH'nin önceden belirlenebileceği bildirilmektedir (2, 3, 4, 11, 14, 16, 17, 18). Literatürde çeşitli sitokinlerle tek yönlü modifiye MLC (mMLC) veya iki yönlü mMLC çalışılarak, KİT sonrası aGvHH'nin belirlenebilirliği araştırılmaktadır (2,3). Çeşitli sitokinlerin uygulandığı çalışmalarda sınırlı kombinasyonlar kullanılmıştır. Bu çalışma, hem tek, hem de değişik kombinasyonlardaki sitokin ilavelerinin tek yönlü ve iki yönlü MLC testindeki etkisinin görülmesi amaçlanmıştır. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda KİT düşünülen hasta ve vericilerine rutin olarak yapılan sMLC testine ilave olarak, IL-2, IL-2 + IL-4 ve IL-2 + IFN γ + TNF α , ile hem tek yönlü, hem de iki yönlü mMLC testi çalışılarak, rutin olarak yapılan sMLC testinin sonuçları ile kıyaslanmıştır. sMLC testinin sonucu uyumlu (-) bulunan ve mMLC testinde uyumsuz (+) bulunan vakalardan nakil olanlarla aGvHH görülme arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Hematoloji Anabilim Dalı, Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı ve Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı'na takip ve tedavi edilmekte olan ve kemik iliği endikasyonu olan toplam 90 hasta ve sağlıklı vericileri (kardeş) dahil edilmiştir. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim

Dalına HLA doku uyumunun belirlenmesi amacıyla gönderilen hasta ve vericilerinin sınıf I (HLA-A, HLA-B) antijenleri serolojik, sınıf II (HLA-DR) antijenleri moleküler yöntemle belirlenmiş ve tüm dokuların genel uyumu da sMLC testi ile değerlendirilmiştir.

Hasta ve vericilerinden her zaman rutin test için alınan 7,5 ml kan ile önce rutin tek yönlü sMLC testi yapılmış daha sonra aynı hasta ve vericisine, eksojen sitokin ilavesi IL-2 (2,4 U/ μ l), IL-2 + IL-4 (14,5 U/ μ l), ve IL-2 + IFN γ (200 U/ μ l), + TNF α (110 U/ μ l), ile hem tek yönlü, hem de iki yönlü mMLC testi yapılmıştır. Periferal kandan lenfositler Ficoll-hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ) gradient teknik ile izole edilmiştir. Elde edilen lenfositler RPMI 1640 (glutaminli, hepesli, Sigma - 50 u/ml penisilin ve 50 μ g/ml streptomisin) ile üç kez yıkandıktan sonra hücreler RPMI 1640 ve insan serumu (9:1) içeren medyumda 1×10^6 olacak şekilde sayılmıştır. Alıcı ve verici hücreler 5000 rad'da (cGy) ışınlanmıştır. Hücreler 96 kuyulu plaklarda 96 saat 37°C ve %5 CO $_2$ 'li ortamda inkübe edildikten sonra, her bir kuyuya 3 H Thymidine koyulmuş ve 16-18 saat sonra tüm hücreler toplanmıştır. Kültürün sonlanmasından sonra likit sintilasyon sayacında sayım yapılmıştır. Tek yönlü MLC testinin sonucunda iki ayrı değerlendirme, Stimülasyon İndeksi (SI) ve Relative Response Index (RRI) hesaplanarak yapılmıştır (Şekil 1). MLC testinde SI değerinin ≤ 1 olması ve RRI değerinin (-) olması vericinin alıcı için uygun olduğunu belirtmektedir.

Tek yönlü MLC ile ilgili formüller

$$1) SI = AV^*/AA$$

$$2) RRI = (AV^* - AA / AK^* - AA) \times 100$$

* : ışınlanmış hücreler

İki yönlü MLC testinin sonuçları ise, Bonfichi'nin çalışmasında uyguladığı formüllere göre değerlendirildi (16). Bu formüllerden I.formüle göre sonuç 6'dan büyükse (+), nakil için uygun olmadığını, II. formüle göre sonuç 132'den büyükse (+) nakilden sonra aGvHH olasılığını belirtir (Şekil 2).

İki yönlü MLC testi ile ilgili formüllerI. formül= $(AV / AK^* + VK^*) \times 100$ II. formül= $(AV / AV^* + VA^*) \times 100$

* : ışınlanmış hücreler

Ayrıca bu çalışmada, HLA antijenleri uyumsuz olan 8 vaka ile sMLC testi, IL-2, IL-2 + IL-4 ve IL-2 + IFN γ + TNF α ilavesi ile tek yönlü mMLC testi çalışması yapılarak, MLC testindeki kontrol grupları dışında bir kontrol grubu da oluşturulmuştur. Test çalışmalarından sonra, kliniklerden bu vakalardan KİT yapılan vakalar belirlenerek test sonuçları ile nakil sonrası ortaya çıkan aGvHH ilişkisi değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 10.0 istatistik yazılım programı kullanılarak hesaplanmıştır. mMLC testinin sonuçları ve KİT yapılan hastalarda aGvHH gelişip gelişmemesi arasındaki bağlantı Ki-kare (chi-square) ve Fisher's Exact testi kullanılarak hesaplandı.

BULGULAR

Bu çalışmaya dahil edilen 90 hastanın yaş ortalaması $23,89 \pm 30,13$ olarak hesaplandı. Hastaların 38'i kadın (% 42,2), 52'si (% 57,8) erkekti. Anabilim Dalımıza gönderilen 90 hasta ve 90 sağlıklı vericinin lenfositleri ile yapılan sMLC testi sonuçları (-) olarak bulunmuştur. Her üç parametre içinde hücre sayısı yeterli olan vakalar çalışılmıştır. Bu vakalardan 82'sine IL-2 ilave edilerek yapılan tek yönlü mMLC testinde 18 vakada (+) sonuç elde edilmiştir. Bu vakalardan 11'ine KİT yapılmış, KİT yapılanlar içinde 9 vakada aGVHH gelişmiştir. IL-2 ilave edilerek yapılan tek yönlü mMLC testinde 64 vakada (-) sonuç elde edilmiştir. Negatif olan 64 vakanın 42'sine KİT yapılmıştır. 14 hastada aGVHH gelişmiştir. IL-2 eklenerek

yapılan mMLC testindeki (+) ve (-) sonuçlar ile KİT sonrası aGvHH gelişimi arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p=0,004$) (Tablo 1). MMLC testinin sonuçları (+) olanlarda aGvHH, mMLC testinin sonuçları (-) olanlara göre; ileri derecede istatistik anlamlılık verecek şekilde daha fazladır. Oysa bu vakaların sMLC testi sonuçları (-) olarak bulunmuştur. HLA antijenleri uyumsuz (miss-match) olup, kontrol grubu olarak değerlendirilen çalışmada, hem sMLC testinin sonuçları tümünde (+) hem de IL-2 ilavesi ile yapılan mMLC testinin sonuçları çok daha yüksek oranda (+) olarak bulunmuştur.

IL-2 ilave edilen vakalardan 60'ına iki yönlü mMLC testi uygulanmış, I. formüle göre bu 60 vakanın 57'sinde (+), 3'ünde ise (-) sonuç alınmıştır. 57 vakanın 40'ına KİT uygulanmış ve 17 vakada aGVHH gelişmiştir. Negatif bulunan üç vakanın 2'sine KİT yapılmış ve her iki hastada da aGVHH gelişmiştir. Bu grup için Fisher's Exact testine göre istatistiksel analiz yapılmış ve anlamlı ilişki bulunamamıştır (Tablo 2).

İki yönlü mMLC testinde II. formüle göre ise 60 vakanın 20'sinde (+), 40'ında (-) sonuç elde edilmiştir. Pozitif bulunan vakalardan 17'sine KİT uygulanmış, bunlardan 6'sında aGVHH gelişmiştir. Negatif bulunan 40 vakanın 26'sına KİT yapılmış ve 13 vakada aGVHH gelişmiştir. Bu grup için ki-kare testine göre istatistiksel analiz yapılmış, anlamlı ilişki bulunamamıştır (Tablo 3).

IL-2+IL+4, 39 vakaya uygulanmış ve tek yönlü mMLC testi yapılmıştır. Bunlardan 9 vakada (+) sonuç alınmış, bu vakalardan 4'üne KİT yapılmış ve 3 vakada aGVHH geliştiği saptanmıştır. 30 vakanın sonucu negatif olarak saptanmıştır. Bunlardan 20'sine KİT yapılmış ve 6 vakada aGVHH gelişmiştir. Tek yönlü mMLC test sonuçları ile

Tablo 1. IL-2 ilaveli tek yönlü mMLC ile aGVHH arasındaki ilişki

Tek yönlü mMLC sonucu (IL-2 ilaveli)	aGVHH (-)		aGVHH (+)		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
+	2	18,2	9	81,8	11	100
-	28	66,7	14	33,3	42	100
Toplam	30	(56,6)	23	(43,4)	53	(100)
$X^2=8,342$ b	p=0,004				Anlamlı	

Tablo 2. IL-2 ilaveli iki yönlü mMLC yapılan grupta I. formüle göre KİT yapılan ve yapılmayan hastalar

İki yönlü mMLC (IL-2) I. formül	KİT yapılmayan	KİT yapılan		Toplam	Toplam (iki yönlü mMLC)
		aGVHH (+)	aGVHH (-)		
+	17	17	23	40	57
-	1	2	0	2	3
Toplam	18	19	23	42	60

Fisher's Exact test: 0.199

Tablo 3. IL-2 ilaveli iki yönlü mMLC yapılan grupta II. formüle göre KİT yapılan ve yapılmayan hastalar

İki yönlü mMLC (IL-2) (II. formül)	KİT yapılmayan	KİT yapılan		Toplam (iki yönlü mMLC)	
		aGVHH (+)	aGVHH (-)	Toplam	
+	3	6	11	17	20
-	14	13	13	26	40
Toplam	17	19	24	43	60

$X^2=0,901$ $p=0,342$

Tablo 4. IL-2+IL-4 ilaveli tek yönlü mMLC ile aGVHH arasındaki ilişki

Tek yönlü mMLC sonucu (IL-2 + IL-4)	aGVHH (-)		aGVHH (+)		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
	+	1	25,0	3	75,0	4
-	14	70,0	6	30,0	20	100
Toplam	15	(62,5)	9	(37,5)	24	(100)

Fisher's Exact test: 0.130

Anlamsız

Tablo 5. IL-2+IL-4 ilaveli iki yönlü mMLC yapılan grupta II. formüle göre KİT yapılan ve yapılmayan hastalar

İki yönlü mMLC (IL-2+IL-4) II.formül	KİT yapılmayan	KİT yapılan		Toplam (iki yönlü mMLC)	
		aGVHH (+)	aGVHH (-)	Toplam	
+	1	0	2	2	3
-	4	3	7	10	14
Toplam	5	3	9	12	17

Fisher's Exact test:1.000

aGVHH arasındaki bağlantı istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır (Tablo 4).

IL-2+IL-4 ilavesi yapılan vakalardan 17'sine iki yönlü mMLC testi uygulanmıştır. I. formüle göre 17'sinde de (+) sonuç alınmıştır. Bu vakalardan 12'sine KİT yapılmış, bunlardan 3 tanesinde aGVHH gelişmiştir. Bu grupta, I. formüle göre, tüm sonuçların pozitif bulunması nedeni ile istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. II. formüle göre ise, 17 vakanın 3'ünde (+), 14'ünde (-) sonuç alınmıştır. Pozitif bulunan vakalardan 2'sine KİT yapılmış, bu vakalarda komplikasyon gelişmemiştir. Negatif bulunan 14 vakanın 10'una KİT yapılmış, 3'ünde aGVHH gözlenmiştir. Bu grup için Fisher's Exact testine göre istatistiksel analiz yapılmış ve anlamlı ilişki bulunamamıştır (Tablo5).

IL-2 + IFN γ + TNF α ilavesi ile 77 vakaya tek yönlü mMLC testi yapılmış, 13 vakada (+) sonuç alınmıştır. Bu vakalardan 7'sine KİT uygulanmış ve tamamında aGVHH gelişmiştir. Ne-

gatif sonuç elde edilen 44 vakanın tamamına KİT uygulanmış ve 16'sında aGVHH saptanmıştır. IL-2 + IFN γ + TNF α eklenerek yapılan tek yönlü mMLC testindeki (+) ve (-) sonuçlar ile KİT sonrası aGVHH gelişimi arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (Tablo 6).

IL2+IFN γ +TNF α ilavesi ile 53 vakada iki yönlü mMLC testi çalışılmış, I.formüle göre 49'unda (+), 4'ünde ise (-) sonuç alınmıştır. Pozitif olan vakalardan 35'ine KİT yapılmış, 16 vakada aGVHH gelişmiştir. Negatif olan 4 vakanın 2'sine KİT uygulanmış ve her ikisinde de komplikasyon gelişmemiştir. Bu grup için Fisher's Exact testine göre istatistiksel analiz yapılmış, anlamlı ilişki bulunamamıştır (Tablo 7).

II. formüle göre, 15 vakada (+), 38 vakada (-) sonuç alınmıştır. Pozitif olan vakalardan 10'una KİT yapılmış, 2'sinde aGVHH gelişmiştir. Negatif olan 38 vakadan 26'sına KİT uygulanmış ve 13'ünde aGVHH gelişmiştir. Bu grup için ise, ki-kare testine göre istatistiksel analiz yapılmış ve anlamlı ilişki

Tablo 6. IL2 + IFN γ + TNF α ilaveli tek yönlü mMLC ile aGVHH gelişimi arasındaki ilişki

Tek yönlü mMLC sonucu (IL2 + IFN γ + TNF α)	aGVHH (-)		aGVHH (+)		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
+	0	0	7	100	7	100
-	28	63,6	16	36,4	44	100
Toplam	28	(54,9)	23	(45,1)	51	(100)
Fisher's Exact test:0,002					Anlamlı	

Tablo 7. IL2 + IFN γ + TNF α ilaveli iki yönlü mMLC yapılan grupta I. formüle göre KİT yapılan ve yapılmayan hastalar

İki yönlü mMLC (IL2 + IFN γ + TNF α) I.formül	KİT yapılmayan	KİT yapılan		Toplam	Toplam (iki yönlü mMLC)
		aGVHH (+)	aGVHH (-)		
+	18	16	19	35	49
-	2	0	2	2	4
Toplam	20	3	9	37	53

Fisher's Exact test:0.495

Tablo 8. IL2 + IFN γ + TNF α ilaveli iki yönlü mMLC yapılan grupta II. formüle göre KİT yapılan ve yapılmayan hastalar

İki yönlü mMLC (IL2 + IFN γ + TNF α) II.formül	KİT yapılmayan	KİT yapılan		Toplam	Toplam (iki yönlü mMLC)
		aGVHH (+)	aGVHH (-)		
+	5	2	8	10	15
-	12	13	13	26	38
Toplam	17	15	21	36	53

$X^2=2,674$

$p=0,102$

bulunamamıştır (Tablo 8).

TARTIŞMA

aGvHH, HLA-uyumlu vericilerden kemik iliği (graft) alan hastaların %40-60'nın etkilendiği, KİT kliniğinde hala önemi koruyan bir problemdir (13,15). Hasta ve vericisinin I. ve II. sınıf HLA'ları uyumlu olması durumunda bile, KİT'den sonra aGvHH ve ilik reddi ortaya çıkabilmektedir (7,10,12). Çalışmamızda, her vaka için rutin olarak yapılan sMLC test çalışmasına paralel kuyular açılarak, IL-2, IL-2 + IL-4 ve IL-2 + IFN γ + TNF α sitokinleri ile hem tek yönlü hem de iki yönlü mMLC testi çalışması yapılmıştır. 90 vakada sMLC testinin sonucu uygun (-) bulunurken, sitokin ilaveleri ile yapılan mMLC testinin sonuçlarında uyumsuz (+) sonuçlar elde edilmiştir. IL-2 ilavesi ile tek yönlü mMLC testinde 18 vakanın (+) olarak bulunması ve bu vakalardan KİT yapılan 11 vakadan 9'unda aGvHH gelişmesi dikkat çekicidir. Bu sonuç, Bishara ve arkadaşlarının IL-2 ekleyerek yaptıkları çalışma ile

uyumludur (3). Bu parametrede 82 vakanın 64'ünde mMLC testinin sonucu (-) çıkmış, bunlardan 42 vakaya KİT yapılmış ve 14 aGvHH gelişmiştir. Bu parametrede, mMLC'deki (+) ve (-) sonuçlar ile KİT sonrası aGvHH gelişimi arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p=0,004$) (Tablo I).

Bishara ve arkadaşları IL-2 ile IL-4'ü tek tek ve kombine olarak uygulayıp tek yönlü mMLC testi yaptıklarında da HLA identik çiftler arasında (+) sonuç elde etmişlerdir (2,3). Visentainer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da sMLC testine IL-4 eklenmiş ve bu şekilde modifiye edilen MLC test ile aGvHH arasında bağlantı saptanamamıştır (17). Bizim çalışmamızda da IL-2 + IL-4 ilavesi ile HLA identik çiftler arasında (+) sonuçlar elde edilmiştir. 39 vakanın 9'unda (+) sonuç alınmış ve bunların 3 tanesinde aGvHH geliştiği görülmüştür. Uyumsuz bulunan 30 vakadan 20'sine KİT uygulandıktan sonra 6 aGvHH gelişmiştir. Bir başka çalışmada da, MLC tes-

tinin hassasiyetini artırmak için, IL-2 ve IL-4, tek tek ilave edilmiş ve sMLC testine göre daha avantajlı sonuçlar bulunmuştur (18).

Fakat bu çalışmada bu parametre için (+) ve (-) bulunan bu vakalar ile aGvHH gelişimi arasında istatistiksel analizde anlamlılık elde edilememiştir (Tablo 4).

IL-2 + IFN γ + TNF α ilavesi ile yaptığımız tek yönlü mMLC testinde ise, 77 vakanın 13'ünde (+) sonuç bulunmuş, bu vakalardan 7'sine KİT uygulanmış ve hepsinde aGvHH gelişmiştir. Uyumsuz olarak bulunan 44 vakanın tamamına KİT uygulanmış ve 16 vakada aGvHH gelişmiştir. (+) ve (-) vakalar için yapılan istatistiksel analiz anlamlı olarak değerlendirilmiş ve bu kombinasyonda mMLC testi ile KİT sonrası aGvHH belirlenebilecektir (Tablo 7) .

İki yönlü mMLC ile yaptığımız her üç kombinasyondaki sitokin ilaveleri ile sMLC testine göre daha duyarlı bulgular elde edilmiş, ancak aGVHH geçiren ve geçirmeyen vaka sayısının yetersiz olması veya tüm sonuçların (+) bulunması nedeni ile istatistiksel analizler anlamlı bulunamamıştır.

sMLC testi ile tüm vakalarda (-) sonuç alınırken, özellikle tek başına IL-2 ilave edilen ve IL-2 + IFN γ + TNF α kombinasyonu ile yapılan tek yönlü mMLC test sonuçlarına bakıldığında, testin daha duyarlı hale geldiği gözlenmektedir. Her üç parametrede iki yönlü mMLC testinin sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın, KİT sonrası ortaya çıkabilecek aGvHH'yi önceden belirleyebileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Bach BH, Hirschhorn K. Lymphocyte interaction:a potential histocompatibility test in vitro. Science, 1964; 143:813-814.
2. Bishara A, Brautbar C, Cohen I, Nagler A. Positivity in modified mixed leukocyte reaction test correlates with molecular HLA-C disparity in prediction of unrelated bone marrow transplantation outcome. Hum Immunol, 1999; 60: 833-839.
3. Bishara A, Brautbar C, Nagler A, Slavin S, Lehsem B, Cohen I, and Kedar E.: Prediction by a modified mixed leukocyte reaction assay of graft versus host disease and graft rejection after allogeneic bone marrow transplantation. Transplantation, 1994; 57: 1474-1479.
4. D'Ambrosio A, Giacomini E, Camponeschi B, Quintieri F. Diltiazem modulates monokine production in human mixed lymphocyte culture. Transplantation, 1998; 65: 1411-1413.
5. Danzer SG, Rink L. Cytokines mixed lymphocyte culture as a prospective parameter for transplantation. Med Clin, 1996; 15,91: 494-500.
6. Goulmy E, Gratama JW, Blokland E, Zwaan FE, van Rood JJ. A minor transplantation antigen detected by MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes during graft-versus-host disease. Nature, 1983; 302:159-161.

7. Hows JM, Yin JL, Marsh J, Swirsky D, Jones L, Apperley JF, James DC, Smithers S, Batchelor JR, Goldman JM. Histocompatible unrelated volunteer donors compared with HLA nonidentical family donors in marrow transplantation for aplastic anemia and leukemia. Blood, 1986; 68: 1322-1328.
8. Lim SH, Patton WN, Jobson S, Gentle TA, Baynham M, Franklin IM, Broughton BJ. Mixed lymphocyte reactions do not predict severity of graft versus host disease in HLA-DR compatible sibling bone marrow transplants. J Clin Pathol, 1988; 41:1155-1157.
9. Mickelson EM, Guthrie LA, Hansen JA. The Mixed Lymphocyte Culture (MLC) test. ASHI Laboratory Manual. New York, NY: The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2000.
10. Odum N, Platz P, Jakobsen BK, Petersen CM, Jacobsen N, Moller J, Ryder LP, Lamm L, Svejgaard A. HLA-DP and bone marrow transplantation: DP incompatibility and severe acute graft versus host disease. Tissue Ant, 1987; 30:213-216.
11. Raziuddin S, Abu-Eshy S, Sheikha A. Peripheral T cell Lymphoma. Immunoregulatory cytokine (interleukin-2, interleukin-4, and interferon-gamma) abnormalities and autologous mixed lymphocyte reaction. Cancer, 1994; 74: 2843-2849.
12. Storb R, Deeg HJ, Pepe M, Appelbaum F, Anasetti C, Beatty P, Bensinger W, Berenson R, Buckner CD, Clift R. Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft versus host disease in patients given HLA identical marrow grafts for leukemia: Long term follow up of a controlled trial. Blood, 1989; 73: 1729-1734.
13. Storb R, Thomas ED. Allogeneic bone marrow transplantation. Immunol Rev, 1983; 71: 77-102.
14. Tanaka J, Imamura M, Kasai M, Zhu X, Kobayashi S, Imai K, Hashino S, Higa T, Sakurada K, Miyazaki T. Cytokine gene expression in the mixed lymphocyte reaction in allogeneic bone marrow transplants as a predictive method for transplantation-related complications. Br J Hematology, 1994; 87: 415-418.
15. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone marrow transplantation. N Engl J Med, 1975; 292: 832-902.
16. Toungouz M, Denys C, Andrien M. and Dupont E. HLA-DR subtypes induce IL-6 and TNF α production in the primary mixed lymphocyte reaction. Transplantation Proceedings, 1995; 27: 461-462.
17. Van Der Meer A, Wissink WM, Schattenberg AV, Joosten I. Interferon-g based mixed lymphocyte culture as a selection tool for allogeneic bone marrow donors other than identical siblings. Br J Hematology, 1999; 105: 304-348.
18. Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, Vigorito AC, Aranha FJ, Souza CA. Addition of exogenous cytokines in mixed lymphocyte culture for selecting related donors for bone marrow transplantation. Sao Paulo Medical Journal, 2002; 120: 175-