

54797

T. C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI

**OTOLOG PERİFERİK KAN KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU
SONRASI HEMATOPOETİK ENGRAFTMAN GELİŞME SÜRESİNİ
ETKİLEYEN FAKTÖRLER**

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Șeref KÖMÜRCÜ

ANKARA — 1996

ÖNSÖZ

Bu tez konusu, 7.Ocak. 1995 tarihinde GATA Tıbbi Onkoloji Kliniği emekli bilim dalı başkanı Prof. Dr. A. Önder Berk tarafından sözlü olarak verilmiş ve çalışmaya başlanılmıştır.

Periferik kan kök hücre transplantasyonu, kandan elde edilen pluripotent ve progenitor hücrelerin infüzyonunu kapsayan güncel bir uygulamadır. Bu uygulama, hematolojik ve solid tümörlü olgularda yüksek doz kemoterapiden sonra, özellikle son yıllarda hematolojik destek için uygun kaynak olarak kabul edilmekte ve önerilmektedir. Periferik kan kök hücre transplantasyonunda komplikasyonlar, otolog ve allojeneik kemik iliği transplantasyonlarında görülenlerden daha az olup, hematopoetik engraftman (yenilenme) da daha kısa sürede gelişmektedir. Transplantasyonlarda başarıyı artıran en önemli faktörlerden birisinin engraftman süresinin kısalığı olması nedeniyle, bu süreyi artırma yada azaltma yönünde etkide bulunabilecek faktörlerin araştırılması özellikle önemlidir.

İç hastalıkları ve Tıbbi Onkoloji ihtisaslarım süresince kıymetli bilgi ve deneyimleri ile eğitimime büyük emeği geçen ve tez danışmanım olarak çalışmalarımı yöneten ve yönlendiren, değerli hocam sayın Prof. Dr. Atilla Yalçın' a saygı ve şükranlarımı sunarım. Kemik iliği transplantasyonu ve onkoloji sahasındaki bilgi ve deneyimlerinden yararlanma şansına sahip olduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. A. Önder Berk' e hürmet ve minnetlerimi iletirim. Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmalarım da her türlü yardım ve desteği esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Ahmet Özet' e; öğretim üyesi, ağabey ve arkadaş olarak ihtisasım süresince yakın ilgi ve dostluğunu gördüğüm sayın Yrd. Doç. Dr. Fikret Arpacı' ya teşekkürlerimi sunarım. Tezimin istatistiki analizlerinin yapılmasında, tartışma ve katkıları ile gösterdiği yakınlık ve ayırdığı zaman için Halk Sağlığı ABD öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Onur Hamzaoglu' na teşekkür ederim. Ayrıca beraber çalışmaktan büyük zevk duyduğum Dr. Bekir Öztürk, Dr. Alper Özkan, Dr. Rasih Altay' a, kliniğimiz hemşire ve personellerine özverili çalışmaları ve olgularımıza gösterdikleri yakın ilgileri için teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda kendi olgularının verilerini de kullanmama müsaade edip destek olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım AÜTF Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Meral Beksaç, Doç. Dr. Haluk Koç ve Uzm. Dr. Önder Arslan' a teşekkürü bir borç bilirim. Bana her zaman en büyük sevgi ve desteği veren eşim ve oğluma da teşekkür ederim.

Dr. Şeref KÖMÜRCÜ

ANKARA - 1996

İÇİNDEKİLER

Sayfa

I. GİRİŞ

1

A Çalışmanın Katkısı

2

B. Çalışmanın Amacı

3

II. GENEL BİLGİLER

4

A. Periferik Kan Kök Hücre Transplantasyonu (PKKHT)

4

1. Progenitor Hücrelerin Mobilizasyon Teknikleri

5

a. Kemoterapi ile mobilizasyon

6

b. Hematopoetik büyüme faktörleri ile mobilizasyon

6

2. PKKHT Uygulamaları

7

3. Allojeneik PKKHT

8

B. Hematopoetik Büyüme Faktörleri

9

C. Hematopoetik Engraftman (Yenilenme)

13

1. Granülosit ve Monosit Engraftmanı

15

2 Eritrosit Engraftmanı

15

3. Trombosit Engraftmanı

16

D. CD34 Antijeni

16

1. Moleküler Yapısı

17

2. Fonksiyonu

18

3. CD34 Ekspresyonu Görülen Hücreler

18

4. Klinik Kullanımı

19

III. GEREÇ VE YÖNTEM

21

A. Çalışmanın Özellikleri

21

B. Hasta Grubu	22
C. PKKH ve Kemik İliği Hücrelerini Toplama	24
D. Kriyoprezervasyon ve Reinfüzyon	24
E. CD34+ Hücre Oranının Belirlenmesi	25
F. Uygulanan Hazırlama Rejimleri	25
G. Klinik Takip	27
H. Engraftman Gelişme Süresine Etkileri Araştırılan Parametreler	27
I. Analiz Yöntemleri	28
IV. BULGULAR	30
A. Kateter, Hazırlama Rejimi ve Büyüme Faktörü Yan Etkileri	30
B. Toplanan Progenitor Hücrelerin Verileri	30
C. İki Merkezin Olgularının Engraftman Sürelerinin Karşılaştırılması	31
D. Hematopoetik Gelişme Sürelerini Etkilediği Düşünülen Risk Faktörleri	33
E. Çalışılan Risk Faktörlerinin Hepsinin Birden Etkilerinin Araştırılması	36
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
VII. ÖZET	48
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	49
VI. KAYNAKLAR	50
IX. EKLER	60
Ek - 1. Tablolar Dizini	60
Ek - 2. Şekiller Dizini	61
Ek - 3. Kullanılan Kısaltmalar	62

GİRİŞ

Hematolojik malignitelerde ve solid tümörlerde otolog periferik kan kök hücre transplantasyonu (PKKHT) uygulanmasında son 5 yılda önemli gelişmeler kaydedilmiştir (6,13,59). Bu uygulamada transplantasyona bağlı komplikasyonlar, otolog ve allogeneik kemik iliği transplantasyonunda görülenlerden daha az olup PKKHT 'nda graft versus host hastalığının (GVHD) görülmemesi özellikle önemlidir. Yüksek doz kemoterapi ve PKKHT' nin . en önemli dezavantajı yüksek relaps oranlarıdır. Otolog PKKHT'nun allogeneik ve otolog kemik iliği transplantasyonuna (OKİT) göre genel anestezi ve kemik iliği aspirasyonu gerektirmemesi, hematolojik yenilenmenin daha kısa sürede olması (13,59), destek tedavisine gereksinimin daha az olması (6,59), hastanede kalış süresini daha çok kısaltması, maliyetinin daha düşük olması (13), daha önce pelvik bölgeye radyoterapi uygulanan ve kemik iliği biyopsisi yapılamayan hastalarda da transplantasyonun mümkün olması (59) gibi avantajları vardır.

Henüz yeni bir transplantasyon yöntemi olup yaklaşık 12 yıldır yapılmakta olan miyeloablatif kemoterapiden sonra otolog PKKHT uygulamasının Türkiye' de 4 yıllık bir geçmişi olup, bu uygulamanın öncülüğünü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) İbn-i Sina Hastanesi ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Kemik İliği Transplantasyon (KİT) merkezleri yapmıştır (60). Ocak 1992 - Mayıs-1996 yılları arasında Türkiye' de yapılmış olan 65 yüksek doz kemoterapi ve PKKHT uygulamasının 50' si bu iki merkezde gerçekleştirilmiştir.

Kemik iliği transplantasyonlu olguların tutulduğu kayıt merkezi olan IBMTR (International Bone Marrow Transplant Registry)' a Türkiye' den üye olan merkezler sadece AÜTF ve GATA KİT merkezleridir.

1. Çalışmanın Katkısı:

PKKHT sonrası, olgularda erken hematopoetik yenilenmenin (engraftman) ortaya çıkması, morbidite ve mortalite insidanslarının azalmasında ve transplantasyonun başarısını belirlemede çok önemli bir faktördür. Lökosit ve trombosit engraftman gelişme süresi birçok etkene bağlı olarak değişebilmektedir. Bu çalışma PKKHT sonrası engraftman hızı ile ilgili bazı belirsizliklerin aydınlatılmasına katkıda bulunacağı düşüncesiyle planlanmıştır:

1- Türkiye' de yapılan bütün PKKHT olgularının yaklaşık %80' ini kapsayan bu hasta grubu ile yapılan çalışma, Türkiye popülasyonunun ve bazı demografik özelliklerin hematopoetik engraftman gelişme hızı ile ilişkileri konusunda bilgi verecektir.

2- Aferez ve kriyoprezervasyonda kullanılan alet ve yöntemin engraftman hızı ile ilişkisinin çalışılması optimum aferez yöntemi ile zamanlamasının ve optimum kriyoprezervasyon yönteminin belirlenmesine katkıda bulunacaktır.

3- Toplanan üründeki mononükleer hücre sayısı ve hacmi ile CD₃₄+hücrelerin sayılarının engraftman hızına olan etkilerinin değerlendirilmesi, ürünün optimum yeterli sayı ve hacminin belirlenmesine katkıda bulunacaktır.

2. Çalışmanın Amacı:

GATA ve AÜTF KİT merkezlerinde 4 yıl içinde yapılan yüksek doz kemoterapi ve PKKHT uygulamalarını kapsayan bu araştırmanın amaçları:

1- Bu iki merkezin PKKHT sonrası olgularda lökosit ve trombosit engraftmanı gelişme hızlarını karşılaştırmak,

2- Aşağıda belirtilen parametrelerin hematopoetik engraftmana olan etkilerini çalışmaktır.

a- Olguların yaşı ve cinsiyeti

b- Transplantasyon öncesi dönemde kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları

c- Reinfüzyon sonrası kullanılan büyüme faktör tipi

d- Transplantasyon döneminde engraftman oluşuncaya kadar geçen ateşli gün sayısı

e- Aferez ile toplanan ürünün hacmi

f- Toplam mononükleer ve CD₃₄+ hücrelerin sayıları

GENEL BİLGİLER

Modern anlamda kemik iliği transplantasyonu farelerde yapılan çalışmalarla başlamıştır. Letal dozda radyasyonla karşılaşan farelerin kemik iliği infüzyonu ile korunabileceklerinin gösterilmesi ile çalışmalar önemli ölçüde hızlanmıştır. Bunu köpekler üzerinde yapılan deneyler izlemiştir. Özellikle köpek doku grup antijenlerinin belirlenmesi ve antijenleri uygun köpekler arasında yapılan nakillerin olumlu sonuçlar vermesi ile insanlar üzerinde çalışmalar başlatılmıştır (16). İnsanlarda ilk uygulama Thomas ve ark. tarafından 1957 yılında gerçekleştirilmiştir (3). Daha sonra Belgrad'daki radyasyon kazası nedeniyle kemik iliği aplazisi gelişen 5 olguya Mathe ve ark. akraba olmayan donörlerden allojenik kemik iliği transplantasyonu yapmışlardır. Bu girişimleri 1959-1962 yılları arasında 154 transplantasyon olgusu izlemiştir (3).

A - PERİFERİK KAN KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU

PKKHT, kandan elde edilen gerçek pluripotent kök hücreleri ve/veya klonojenik progenitor hücrelerin ve/veya post-progenitor hücrelerin transplantasyonunu anlatan genel bir terimdir. Haziran 1994'te Hollanda'da düzenlenen Uluslararası Konsensüs Toplantısında PKKHT yerine "kemik iliği transplantasyonu" ile analog olarak "kan hücre transplantasyonu" teriminin kullanımı önerilmiştir (33).

PKKHT ile daha az morbidite ve hematolojik işlevde daha hızlı şifa söz konusu olduğu için, PKKHT OKİT'e göre daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. Şimdi PKKHT

bir çok koşulda yüksek doz kemoterapiden sonra hematolojik destek için uygun kaynak olarak kabul edilmektedir (33; 35). Yüksek doz kemoterapiden sonra veya hematopoetik büyüme faktörü varlığında perifer kanda progenitor hücrelerin oranı önemli ölçüde artar (20). Perifer kan progenitor ve kök hücreleri aferez yöntemi ile $6-8 \times 10^8$ çekirdekli hücre/kg oluncaya kadar toplanıp kriyopreserve edilir. PKKHT özellikle transplantasyon için kemik iliği aspirasyonu uygun olmayan (tümör tutulumu, daha önceden uygulanan pelvis ışınlaması, medikal nedenler gibi) hastalarda uygulanmıştır (33, 35, 43). Transplantasyona bağlı morbidite ve mortalitenin daha düşük oranda görüldüğü PKKHT uygulanmasını sınırlayan en önemli faktör, tümöral hücre klonlarının hastaya tekrar infüze edilme riskidir. Son 7-8 yıldır farklı in-vitro ayıklama (purging) metodları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir çok merkezde ayıklama 4-hydroxycyclophosphamide, maphosphamide veya monoklonal antikorlarla yapılmaktadır. Görülmüştür ki, ayıklama engraftmanı şiddetle geciktirmekte, hastanede kalış süresini ve transplantasyona bağlı komplikasyonları artırarak ölümlere yol açmaktadır. Bu nedenle ayıklama işleminin yararı henüz tartışmalıdır (3,26,62). Tümör hücre işleminin infüzyonunu azaltma girişimlerinden birisi de invitro kemik iliği kültürüdür . Diğer taraftan hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda malign hücrelerin klon oluşturma yeteneklerinin düşük olduğu ve kriyoprezervasyona dayanıklı olmadıkları gösterilmiştir. Ayrıca transplantasyon öncesi hastalara verilen hazırlama rejimlerinin kemik iliği mikroçevresini değiştirdiği ve ancak normal progenitor hücrelerin yaşamasına uygun olup, tümör hücrelerinin bu ortamda çok fazla yaşayamadıkları da tesbit edilmiştir (3,26).

1. Progenitor ve kök hücrelerin mobilizasyon teknikleri: Geçtiğimiz birkaç yılda progenitor ve kök hücre mobilizasyonu için kemoterapi, sitokinler ve ikisinin

kombinasyonundan oluşan çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Optimal mobilizasyon zamanı, engraftman hızını gösteren değişik belirleyiciler ve malign hücre kontaminasyonunun mobilizasyondaki rolü henüz tam olarak tanımlanmış değildir. Yine de hızlı hematopoetik şifa ve mobilizasyon tekniklerindeki belirgin gelişmeler yoğun kemo/radyoterapiden sonra PKKHT'nun önemli kök hücre kaynağı ve progenitor hücre desteği olarak kabul edilmesini sağlamıştır (8,33;34).

Bir çok çalışma kemoterapi ve sitokin kombinasyonu ile progenitor hücre mobilizasyonun, tek başına kemoterapi veya sitokinlere göre daha etkili olabileceğini göstermektedir (33).

a - Kemoterapi ile mobilizasyon: Kemoterapi ile mobilizasyonun amacı anti-tümör etkiye ilave olarak yüksek sayıda progenitor hücrenin perifer kana geçmesini sağlamaktır. 1970'lerde kemoterapilerden sonra kemik iliğinin yenilenmesi safhasında perifer kanda progenitor hücrelerin 20 kat kadar arttığı gösterilmiştir (15). Yüksek dozlarda verildiğinde cyclophosphamide ve etoposid, kök hücre toksisitesine neden olmadan etkili mobilizasyon yapan ajanlardandır. Optimal progenitor hücre mobilizasyonu için uygun kemoterapi rejim planı henüz tam olarak belirlenmemiştir. Kemoterapi ile hem primitif (CD34+, CD38-) hem de yönelmiş (committed) (CD34+, CD33+) hücreler mobilize olabilirler.

b - Hematopoetik büyüme faktörleri ile mobilizasyon: Perifer kanda progenitor hücrelerin ve nötrofillerin sayısını arttırdığı tesbit edilen ilk hematopoetik büyüme faktörü granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktördür (GM-CSF). Socinsky ve ark. kemoterapiden sonra myelopoetik iyileşme döneminde olgulara GM-CSF verildiğinde CFU-GM, BFU-E

sayısında 18-60 kat artış bulmuşlardır (15). Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) tek bir klona spesifik klinik aktiviteye sahip bir hematopoetik büyüme faktörü olmasına rağmen perifer kanda bir kaç hematolojik klonda progenitor hücre artışına neden olmuştur (18). Duke Üniversitesinde yapılan bir çalışmada G-CSF veya GM-CSF ile hücrelerin mobilize edilmeleri arasında fark bulunmamıştır (47). Bunların etki mekanizmaları ile ilgili görüşler; hematopoetik büyüme faktörlerinin progenitor hücrelerin periferden çıkış hızlarını yavaşlatarak kanda birikimlerini ya da bu hücrelerin periferde proliferasyonlarını artırarak etkilerini sağladıkları şeklindedir(15). Hücre mobilizasyonu ile ilgili olarak çalışılan bir başka sitokin de interlökin 3 (IL-3)'tür. Vase ve ark. IL-3'ü üç farklı dozda çalışmışlar, mobilizasyonun daha zayıf ve engraftmanın daha yavaş olduğunu göstermişlerdir (15).

2. PKKHT Uygulamaları: Kök hücreleri otolog nakilde son 3-4 yılda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. PKKHT' u yapılan hematolojik malignansiler, kötü prognozlu lenfomalar, metastatik meme kanserleri ve germ hücreli tümörleri olan hastalardan elde edilen bilgiler umut vericidir (33). Otolog PKKHT ile OKİT arasında özellikle lenfomalı olgularda hastalıksız sağ kalım açısından birçok çalışmada fark bulunmamıştır.

Gianni ve ark. mobilize edilmiş progenitor hücre verilerek yapılan PKKHT'lı grupta, hem granülosit hem de trombosit engraftmanını kemik iliği infüze edilen gruba göre daha hızlı bulmuşlardır (15,47). Bir çok çalışmada OKİT'e göre PKKHT'da trombosit ve eritrosit transfüzyonuna olan gereksinim daha az, hastanede kalış ve antibiyotik kullanım süreleri daha kısa bulunmuştur (15;33). Toplanan progenitor hücre

tipinde veya sayısındaki yetersizlik hızlı ve kalıcı engraftman cevabın ortaya çıkmamasının sebeplerindendir. Engraftmanın sağlanabilmesi için hücre aferezinde 5×10^8 çekirdekli hücre/kg, 2×10^6 CD₃₄+ hücre/kg veya 5×10^4 CFU-GM/kg hücre sayılarının hedef alınması yaygın kabul görmüştür (28).Yüksek doz kemoterapiden sonra PKKHT desteğinin avantajları ve dezavantajları aşağıda özetlenmiştir(15). Avantajları:

- Hücre aferezi ayaktan yapılabilir
- Hızlı engraftman sağlanabilir.
- Tümör hücresi kontaminasyon riski daha düşüktür.
- Yeterli sayıda progenitor hücre toplanabilir.

Dezavantajları:

- Aferez ve kriyoprezervasyon işlemleri için ek maliyet gerektirir.
- Sitokinlere bağlı maliyet ve toksisite riski söz konusudur.
- Geç dönemde kemik iliği yetmezliği riski (özellikle trombositopeni) fazladır.

3. Allojeneik PKKHT: Allojeneik kemik iliği yerine periferik kök hücre transplantasyonunun kullanılmasındaki amaç, hematopoetik engraftmanı hızlandırmak ve progenitor hücre toplamada vericileri genel anestezinin ve kemik iliği aspirasyonunun komplikasyonlarından korumaktır. Böylece genel popülasyonda, akraba olmayanlar için transplant vermeye istekli olanların sayısı arttırılabilir. Lökoferezle hücre toplanmasında T lenfositler gibi aksesuar hücrelere, ex vivo manipulasyon için progenitör hücrelere kemik iliği toplanmasına göre daha kolay erişilebilir (17, 51).

Progenitor hücreler için başka bir kaynak da umbilikal kord kanıdır (25). Kord kanında kök hücrelerin oranı erişkin donör kanındaki oranlardan daha yüksektir. Kord kanında T lenfosit sayısı ve fonksiyonları baskılanmış olduğu için allojenik transplantasyonda kord kanının daha uygun bir kaynak olduğu düşünülmektedir.

B - HEMATOPOETİK BÜYÜME FAKTÖRLERİ:

Hematopoetik büyüme faktörleri, hücre diferansiyonunun değişik evrelerinde hematopoetik hücrelere etkili olabilen glikoprotein yapısında hormonlardır. (Tablo-I) Bu faktörler progenitor hücrelerin hem proliferasyon ve farklılaşmasında etkili olurlar, hem de immatür ve matür progenitor hücrelerin yaşam faktörleri olarak görev yaparlar.

Tablo - I : Hematopoetik büyüme faktörleri ve hedef hücre serileri ;

Stokin	Kök hücreler	Granülopoez	Trombopoez	Eritropoez	Monositopoez
SCF	+	+	+	+	+
IL-3	+	+	+	+	+
GM-CSF	+	+	+	+	+
G-CSF	--	+	--	--	--
M- CSF	--	--	--	--	+
Eritropoetin	--	--	--	+	--
Meg-CSF	--	--	+	--	--

SCF : Stem cell faktör.

Rekombinan büyüme faktörleri, Echerichia coli'den üretilen nonglikozile proteinler olarak veya maya hücrelerinden üretilen glikozile proteinler olarak tanımlanır. Büyüme faktörlerinin doz araştırma çalışmaları, optimal doz aralığının günde 3-10 µg/kg olması gerektiğini vurgulamıştır (47)

G- CSF aktive monosit ve makrofajlar, nötrofiller, fibroblastlar, endotel hücreleri ve çeşitli tümör hücreleri tarafından salınır. Sekresyon TNF-α, IL-1, GM-CSF ve endotoksinlerle uyarılır; prostaglandin ile inhibe edilir.Biyolojik aktivitesi hematopoetik progenitör hücreleri uyarak nötrofillerin oluşumunu artırmaktır. Ayrıca perifer kanda bütün myeloid seri hücrelerinin sayılarını artırır. G-CSF nötrofillerin fagositoz ve

sitotoksiste fonksiyonlarını da uyarır. G-CSF tedavisinin kesilmesiyle bir kaç günde normal düzeylere iner (24). Kemik ağrısı, ALP ve LDH 'da artış, trombositopeni, vaskülit ve dermatit yan etkileri görülebilir.

GM-CSF aktive T lenfositler makroflajlar ve fibroblastlardan salınır. Sekresyon TNF- α , IL-1, IL-2, interferon ve endotoksinler tarafından uyarılır. GM-CSF'ün biyolojik etkisi nötrofil, monosit, eozinofil, erken eritroid ve kısmen megakaryosit hücre serilerinin proliferasyon ve diferansiyasyonlarının uyarılmasıdır. Ayrıca bütün granülositlerin ve monositlerin fonksiyonlarını artırır. Kemik ve kas ağrısı, letarji, ateş, cilt döküntüleri, trombofilebit, albümin ve kolesterol düzeylerinde azalma, trombositopeni, perikardit, kapiller sızıntı sendromu gibi yan etkiler nadir olarak görülebilir. (24).

Sitokinler bazen yerine koyma tedavisinde, genellikle de daha yüksek dozlardaki etkisinden yararlanılmak üzere çeşitli hastalıklarda kullanılmaktadır (Tablo II). (24)

Tablo II : Hematopoetik büyüme faktörlerinin klinik kullanım alanları

1. Kemoterapi veya radyoterapiye bağlı sitopeni

- Konvansiyonel doz tedavi
- Yüksek doz tedavi
- Kemik iliği transplantasyon sonrası

2. Kemik iliği yetmezliğinde hematopoezin uyarılması

- Aplastik anemi
- Kronik nötropeni
- Agranülositoz
- Miyelodisplastik sendromlar

3. Hematopoetik progenitör hücre toplanması

- Periferik kan kök hücre mobilizasyonu
- Kemik iliği progenitör hücrelerin ön stimülasyonu

4. Yetersiz endojen sitokin düzeylerinde

- Tümöre bağlı anemi
- Kemoterapiye bağlı anemi

5. Efektör hücre fonksiyon stimülasyonu

- Enfeksiyonlar
- Yanıklar
- Lökositler fonksiyon bozuklukları
- AIDS

6. Antitümör aktivasyonun stimülasyonu

İlk OKİT uygulamalarında nötrofil ve trombosit engraftmanı transplantasyonun ancak 3. haftasında başlarken, hematopoetik büyüme faktörlerin kullanılmaya başlanması ile özellikle nötrofil engraftman süresi çok kısalmıştır (ortalama 13-18 gün). G-CSF ve GM-CSF ile trombosit engraftman süresi çok fazla değişmemiştir (8). Aferez öncesi hematopoetik büyüme faktörü verilmesi OKİT için toplanan hücrelerin kalitesini yükseltir, graft yetmezliği riskini azaltır ve engraftman zamanını kısaltır (32). Böylece transplantasyona bağlı morbidite ve mortalitede belirgin azalma görülür (4).

C - HEMATOPOETİK ENGRAFTMAN (YENİLENME) :

Kemik iliği infüzyonundan sonra hematopoetik yenilenmenin yapısı ve hızı, donör hücre kaynağına, alıcının hematopoetik organlarının durumuna, transplantasyon sonrası ilaç tedavisine ve hastanın klinik durumuna göre farklılıklar gösterir. Fazla miktarda kemik iliği infüzyonu daha hızlı yenilenmeye neden olabilir (3). Kriyoprezervasyon ve ayıklama, otolog iliğin reinfüzyonundan önce yapılırsa bazen engraftmanda gecikmelere neden olabilirler (özellikle trombosit engraftmanında) (62). Transplantasyon öncesi önemli derecede miyelofibrozis veya splenomegali, methotrexate ile GVHD profilaksisi ve viral enfeksiyonlar (özellikle Herpes grubu) kemik iliği engraftmanını geciktirebilir (3,48).

Eksperimental çalışmalarda, hematopoetik yenilenmenin sınırlı sayıda klon ile oluşabildiği gösterilmiştir. Lemischka ve ark. kök hücrelerini işaretlemeye retrovirüs vektörü kullanılarak gerçekleştirilen gen transferini kullanarak, letal dozda radyasyon verilmiş farelere 1-2 kök hücre klonu infüze edildiğinde çoğu hematopoetik hücrelerin oluşabildiğini göstermişlerdir (3). İnsanlarda uygulanan transplantasyonlarda poliklonal

modeller tarif edilmişse de, bazı olgularda monoklonal kök hücre yenilenmesi gösterilmiştir (44). Bu nedenle ne kadar donör kök hücrenin insanlarda tam hematopoetik ve immünolojik yenilenme için yeterli olabileceği konusu henüz belirlenmemiştir.

Hematopoez, hücrelerin progresif ekspansiyon, maturasyon ve differansiasyonunu yansıtır. En ilkel pluripotent kök hücreler bütün matür kan hücrelerinin temel kaynağıdır. Bunlar kendini yenileme (self-renewal) kapasitesi ile farklıdırlar ve yaşam boyu hematopoezi temin etme yeteneğindedirler. Eğer bir transplantasyon sadece kök hücre popülasyonu ile yapılırsa hematopoetik yenilenme yavaş olur; çünkü kök hücrelerin tam farklılaşmış kan hücrelerine dönüşmesi için bir kaç haftaya ihtiyaçları vardır. Ekspansiyon ve farklılaşmanın başlaması ile progenitor hücreler ortaya çıkarlar. Hematopoetik progenitorler bölünür ve sayıları artar, fakat kendilerini yenileyemezler. Bu nedenle bu hücreleri de içeren transplantasyonda engraftman daha hızlı olacaktır. Hızı erken/geç progenitor hücre oranı belirleyecektir. Erken progenitor hücrelerin farklılaşması ve ekspansiyonu daha uzun zaman alacağı için engraftman gecikmiş olacaktır. Halbuki geç progenitor hücrelerin olgun hücrelere farklılaşması için sadece birkaç bölünme yeterli olacaktır. Diğer bir taraftan, sadece yönlendirilmiş hücrelerden ibaret olan bir transplantasyonda kendini yenileyen hücrelerin olmaması nedeniyle geç dönemde kemik iliği yetmezliği görülecektir. Yeterli sayıda kök hücre ve geç progenitor hücreleri uyarmak için hematopoetik büyüme faktörlerinin kullanımı ile hematopoetik yenilenme daha hızlı olacaktır. Kemik iliği infüzyonundan sonra hematopoetik büyüme faktörlerinin kullanımı nötrofillerin ilk ortaya çıkış sürelerini kısaltmaz, fakat bunlar görünmeye başladıktan sonra sayılarındaki artışı hızlandırır (3). Eğer büyüme faktörleri kesilirse nötrofil artışı yavaşlar. Hematopoetik büyüme faktörleri kullanarak ya da kemoterapi

sonrası yenilenme sırasında lökoferez yaparak perifer kan progenitor hücrelerinin sayısının artırılması ile yönlendirilmiş hücrelerin sayısı da artırılmış olur. Bu teknik nötrofil engraftmanının kısa bir sürede olmasını sağlayacaktır (20,35).

1. Granülosit ve Monosit Engraftmanı : Transplantasyon öncesi dalak ve kemik iliği morfolojik olarak normal olan bir hastaya donör hücreleri infüze edildiğinde, 7-10 gün içinde kanda ilk çekirdekli eritroid seri hücreleri ve erken miyeloid yapılar görülmeye başlanır. Bu hücreler ilkel kök hücrelerden ziyade olgun progenitor hücrelerden farklılaşırlar. İlk 2 hafta içinde kemik iliği hiposellülerdir, fakat dalakta hematopoetik aktivite tesbit edilebilir. Rodent modellerde koloni-forming-ünit-dalak (CFU-S) gösterilmiştir (35). Transplantasyondan 14-28 gün sonra kanda mononükleer hücreler (bazıları atipik lenfosit morfolojisinde) ve granülositler görülür. 10 ile 21. günler arasında genellikle granülosit sayısı $500/\text{mm}^3$ 'e ulaşır. İlk ortaya çıkan granülositlerin normal fagositik ve sitolitik kapasiteleri vardır. Benzer şekilde monositlerin normal sayıya ulaşması 3-4 haftada olur. Bu erken monositler de normal fagositik fonksiyon gösterirler ve genellikle normal antijenik yapılarını kazanmışlardır. Aksine, hazırlama rejimi ile fonksiyonları bozulan alveolar makrofajlar ve derinin langerhans hücreleri gibi doku aksesuar hücre gruplarının fonksiyonları ancak aylar sonra düzelir (3,46).

2. Eritrosit Engraftmanı : Lenfosit ve monosit engraftmanının başlamasından 1-2 hafta sonra retikülositler saptanmaya başlanır ve transplantasyondan 4-6 hafta sonra pik yapar. Erken yenilenme döneminde donör kaynaklı eritrositler sıklıkla fetal eritrosit benzeri değişiklikler gösterirler (makrositoz, artmış i antijen ekspresyonu, artmış fetal globulin ve fetal hemoglobin seviyeleri) (3). Kırmızı seri progenitor hücreleri hafif

displastik olup, bu değişiklikler 1 yıla kadar devam edebilir. Eritropoetin seviyeleri deprese olmuştur ve rekombinan insan eritropoetinin kullanımı eritrosit engraftmanını hızlandırabilir (42,52).

3. Trombosit Engraftmanı : Trombosit yenilenmesi, diğer kan elemanlarının normal seviyelere dönmesinden sonra (lenfositler hariç) gerçekleşir. 3-4 hafta içinde trombosit seviyeleri $20000/\text{mm}^3$ üzerine çıkmasına rağmen aylarca trombosit transfüzyonlarına gereksinim devam edebilir. Hastaların üçte birinde miyelopoez ve eritropoez normale geldikten sonra izole trombositopeni devam edebilir. İlk ayda trombosit sayısı 100.000 üzerinde olsa bile üçüncü ayda tekrar 45.000 altına inebilir. Bu durum genellikle ilaca, viral enfeksiyonlara veya otoimmüniteye bağlı olabilir (3). Kronik persistan trombositopeni sıklıkla ciddi akut veya kronik GVHD'ye bağlıdır ve kötü prognoz gösterir. Bunlardan başka bazı OKİT hazırlama rejimleri, splenomegali veya ciddi kemik iliği fibrozisi transplantasyondan sonra kalıcı trombositopeniye neden olabilir.

D - CD 34 ANTİJENİ:

Olgun kan hücrelerinin ömrü kısadır ve yaşam süresince devamlı olarak yeni hücrelerin ortaya çıkması gerekmektedir. Bunlar genellikle kemik iliğinde yerleşmiş olan pluripotent kök hücreler ve hematopoetik progenitor hücreler ile yapılır. Progenitor hücreler tek bir soyağacına yönelmelerine (lineage committed) rağmen, pluripotent kök hücreler hem kendini yenileme hem de bütün hematopoetik hücre serilerine farklılaşma özelliğini gösterirler. Hematopoetik progenitor hücrelerin izole edilmesi zor bir işlemdir ve son zamanlarda bütün progenitor serilerinde ortak olan bir transmembran glikoproteinine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar aracılığı ile mümkün olabilmektedir

(56). Civin ve ark. 1984'te ilk olarak hematopoetik progenitor hücrelere karşı bir antikor (My 10) geliştirmişlerdir. Bundan bir kaç ay sonra Tindle ve ark. bir diğer antikor (BI. 3C5 Ab) tarif etmişlerdir. 1986'da 3. uluslararası "Workshop in Leukocyte Differentiation" toplantısında bu iki antikoru spesifik olduğu epitop CD34 antijeni olarak adlandırılmıştır (56).

1. Moleküler Yapısı: Bu antijen yaklaşık olarak 100-115 kD moleküler ağırlığı olan bir yüzey glikoproteinidir (1). CD 34 molekülünde en az üç, muhtemelen dört epitop vardır (Tablo III).

Tablo III: Anti CD₃₄ Antikorları (56)

Klon	İzotop	Epitop Grupları	Firma ismi - Katalog No
My 10	IgG 1	A	HPCA-1 Becton Dickinson
BI.3C5	IgG 1	A	MAS 113 Sera-lab
12.8	IgM	B	-
ICH 3	IgG 2a	C	CD 34 Mascia Brunelli
QBEND 10	IgG 1	C	10 M 34 Immunotech
p115.2	IgG 1	D	-
TuK 3	IgG 3	D	M 824 Dako
8612	IgG 1	D	HPCA-2 Becton Dickinson

CD 34 + hücreler perifer kanda yuvarlak nükleuslu, ince homojen kromatin dağılımlı ve sitoplazması zayıf bazofilik olup büyük, uyarılmış lenfositlere benzerler (61).

2. Fonksiyonu: CD 34 antijeninin bir büyüme faktör reseptörü gibi görev yaparak veya stromal hücrelerle etkileşerek erken hematopoezde düzenleyici rol aldığı düşünülmektedir (23). Fakat ilk bulgular bunların G-CSF ve GM-CSF'lerin reseptörü olmadığını göstermiştir. CD 34'ün aktive protein kinaz-C (PKC) ile direkt olarak fosforilize olduğu bulunmuştur. Progenitor hücrelerde PKC, proliferasyon / diferansiyasyon üzerine düzenleyici rol oynadığı için CD 34'ün erken lenfopoezde sinyal iletiminde görev aldığı düşünülmektedir (30). Sonuç olarak CD 34 proteininin fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir.

3. CD34 Ekspresyonu Görülen Hücreler: Başlangıçta perifer kanda CD 34 ekspresyonu hiç bulunamazken, son zamanlarda perifer mononükleer hücrelerde CD 34 antijeninin % 0.01-0.9 oranında pozitif olduğu gösterilmiştir (1). Bu da genç hücrelerin az oranda dolaşıma geçtiği görüşlerini desteklemektedir. Erişkin kemik iliği çekirdekli hücrelerin % 1-4'ünde CD 34 ekspresyonu gösterilirken, bunun ancak bir kaç hücre serisindeki pozitifliğe bağlı olduğu tesbit edilmiştir (7,30,56). Kemik iliğinde CD 34 pozitifliği özellikle bütün multipotent ve yönlendirilmiş miyeloid progenitor hücrelerde, B ve T lenfoid prekürsörlerde, osteoklast (CFU-osteoklast) ve muhtemelen stromal (CFU-F) progenitor hücrelerde bulunmuştur (14,58). Ayrıca endotel ve bazı deri hücrelerinde de eksprese olur. Henüz tam kesinleşmemekle birlikte malignitelerde CD 34 molekülünün akut lösemilerde, kronik myelositer löseminin blast hücrelerinde, vasküler kaynaklı

tümörlerde sıklıkla pozitif olduğu; kronik lenfoproliferatif hastalıklarda ve lenfomalarda negatif olduğu belirtilmiştir (56). (Tablo IV).

Tablo IV: Malignitelerde CD 34 Antijen Ekspresyonu

CD 34 (+) Maligniteler	CD 34 (-) Maligniteler
-ALL (%38-81)	-KLL
-AML (%28-61)	-Hodgkin Hastalığı
-KML (hastalık progresyonu ile pozitiflik artar)	-NHL
-Vasküler kaynaklı maligniteler:	-Multiple myeloma
*Anjioma-anjiosarkoma	-Meme kanseri
*Hemanjioendotelyoma	-Nöroblastoma
*Kaposi sarkomu	
-Akciğerin epidermoid hücreli karsinomu	

4. Klinik Kullanımı: CD 34 + hücrelerin belirlenmesi OKİT sırasında tedavide ve PKKHT uygulaması öncesi mobilizasyonun planlanmasında önemlidir.

a) Tedavide: Kemik iliği otogreftinde bazı tümör hücrelerinin bulunma riski OKİT'nun önemli problemlerinden biridir. Kemik iliğini saflaştırmak immünolojik hedeflendirme ile veya kimyasal tedaviyle mümkündür, ama etkinliği tartışmalıdır. CD 34

negatif malignitelerde, CD 34'e karşı geliştirilen monoklonal antikorların kullanımı ile engraftmandan sorumlu normal hematopoetik progenitor hücrelerin pozitif seleksiyonu OKİT' nda alternatif bir yaklaşımdır (56).

b) Mobilizasyonda: Akım sitometri ile CD 34 + hücrelerin oranının saptanması ile invitro olarak lökoferez öncesi perifer kanın o andaki koloni yapma kapasitesi değerlendirilebilmektedir. CD 34 + hücrelerinin belirlenmesi pratik olarak progenitor hücre oranını gösterir. Hematopoetik büyüme faktörü verilmesiyle 4-5. günlerde CD 34 + hücre sayısı dolaşımda 5 kat artar (55,59). Bu şekilde CD 34 ekspresyonu dolaşımda en yüksek düzeyde olunca aferez işlemi yapılır. Ayrıca aferez ile toplanan hücrelerin yeterli progenitor hücre miktarına ulaşması da CD 34 antijen düzeyinin takibi ile anlaşılır. PKKHT'de engraftmanın gerçekleşebilmesi için en az kilo başına 5×10^6 CD 34+ hücreye gereksinim vardır (28).

GEREÇ VE YÖNTEM

A - Çalışmanın Özellikleri:

Bu çalışma GATA Kemik İliği Merkezinde (KİT) Mart 1993 - Mayıs 1996 tarihleri arasında, AÜTF KİT merkezinde Ocak 1992- Mayıs 1996 tarihleri arasında yüksek doz kemoterapi ve PKKHT uygulanan olgularda planlanmıştır. PKKHT uygulamasının aşamaları tablo-V' de özetlenmiştir. Çalışma iki yöntemle yürütülmüştür: GATA' da Ekim 1994- Mayıs 1996 tarihleri arasında yapılan PKKHT uygulamaları prospektif olarak, Mart 1993 - Eylül 1994 tarihleri arasında GATA' da yapılan ve AÜTF' de yapılan bütün PKKHT uygulamaları ise retrospektif olarak çalışılmıştır.

Tablo- V: Yüksek doz kemoterapi ve PKKHT protokolünün aşamaları.

Hastalığın evrelendirilmesi

Progenitör hücre mobilizasyonu
(Büyüme faktörü veya kemoterapi ile)

PKKH' lerin aferezi

Toplanan ürünün kriyoprezervasyonu

Hazırlama rejiminin uygulanması

Reinfüzyon

Özel takip ve destekleyici tedavi

Transplantasyona cevabın değerlendirilmesi

B - Hasta Grubu:

Araştırma kapsamındaki hasta grubunu GATA KİT merkezinde PKKHT yapılan 21, AÜTF KİT merkezinde PKKHT yapılan 29 olmak üzere toplam 50 olgu oluşturmaktadır. Erken dönemde kaybedilen olgular çalışma dışında tutulduğunda lökosit engraftmanı gerçekleşen 43 olgu (GATA:20, AÜTF:23), trombosit engraftmanı gerçekleşen 41 olgu (GATA: 20, AÜTF: 21) değerlendirilmeye alınmıştır. 31' ini erkek (% 72.1) ve 12' sini kadınların (% 27.9) oluşturduğu olguların yaş dağılımı 13 ile 62 arasında (median 24 yıl) idi.

İlk kemoterapi sonrası relaps olmuş veya kötü prognostik kriterli 13 NHL'lı olgu, relaps yapmış 15 Hodgkin hastalıklı (HH) olgu, birinci veya ikinci remisyonda olan 9 AML' li olgu, 3 multiple myelomalı olgu ve 10'dan fazla aksiller nod tutulumu olan III veya IV. evrede 1 meme kanserli olgu, relaps yapmış C evresinde testis kanserli 1 olgu ve ekstra gonadal germ hücre tümörlü 1 olgu çalışmaya dahil edildi. Kardiyak (EF > %60), hepatik (SGOT ve SGPT < 50 ü) ve renal (kreatinin < 1.5 mg/dl) fonksiyonları normal olmayan olgular PKKHT programına alınmadılar. Hastalara progenitor ve kök hücre mobilizasyonu ve transplantasyon sonrası nötrofil engraftman süresini kısaltmak için 5-10 µg/kg dozunda G-CSF 33 olguda (% 76.7) ve GM-CSF 10 olguda (% 23.3) kullanıldı. Hasta grubunun özellikleri tablo-VI'da görülmektedir.

Tablo VI : Olguların özellikleri.

Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Tam	KT	RT	Hazırlama Rejimi	Büyüme Faktörü	Hacim (ml)	MNC $\times 10^8/\text{kg}$	CD34+ $\times 10^6/\text{kg}$	Ateşli gün	Lökosit $> 1000/\text{mm}^3$ (gün)	Trombosit $> 5 \times 10^4/\text{mm}^3$ (gün)
1	22	E	NHL	6	+	BEAM+RT	GM	610	2.2	-	11	20	28
2	22	E	HD	8	-	BEAM+RT	G	495	2.68	-	18	27	34
3	26	E	AML	1	-	CY+TBI	G	905	10.8	-	6	10	20
4	23	E	Testis Kanseri	11	+	ICE	G	950	7.48	-	5	14	18
5	21	E	HD	6	-	BEAM+RT	G	700	6.3	-	8	10	21
6	20	K	NHL	1	-	BEAM+TBI	G	1000	4.07	-	12	23	32
7	21	E	NHL	3	+	BEAM+RT	G	600	7.74	-	15	19	19
8	24	E	HD	11	+	BEAM	GM	850	5.81	-	6	15	16
9	22	E	HD	6	-	BEAM	G	480	8.5	-	18	23	28
10	24	E	HD	9	+	CYEAM+RT	G	750	7.23	-	9	18	26
11	24	E	NHL	11	+	CYEAM	GM	840	7.94	10	12	10	26
12	23	E	HD	9	-	CYEAM+RT	G	280	9.3	74	4	9	20
13	32	K	HD	10	+	CYEAM+RT	GM	1200	7.75	8	9	14	28
14	22	E	HD	12	-	CYEAM	GM	650	7.32	70	8	14	21
15	23	E	EGGHT	10	-	ICE	G	450	7.57	-	3	8	16
16	23	E	HD	10	+	CYEAM	GM	300	8.0	-	11	12	28
17	37	E	HD	12	+	CYEAM+RT	GM	700	6.3	8.8	10	10	28
18	22	K	NHL	9	-	CYEAM	GM	550	7.6	14	14	12	26
19	38	K	Meme Kanseri	12	+	ICE	GM	700	9.07	9.9	4	10	26
20	22	E	HD	6	+	CYEAM+RT	G	1500	5.08	4.5	8	10	26
21	41	E	NHL	6	-	CVB	GM	100	4.8	14.6	15	17	29
22	45	E	NHL	6	-	CVB	G	200	2.42	4.8	2	14	25
23	34	K	NHL	7	-	CVB	G	300	3.1	6.7	5	17	20
24	22	E	NHL	6	-	CVB	G	450	2.15	9.8	7	18	21
25	40	E	NHL	6	-	CVB	G	350	4.0	21	8	11	12
26	18	E	NHL	8	+	CVB	G	400	2.7	8.4	5	19	41
27	42	E	NHL	6	-	CVB	G	325	3.8	-	11	19	38
28	38	E	NHL	6	-	CVB	G	525	2.7	-	7	10	14
29	49	E	AML	2	-	BuCy	G	200	4.7	8.6	3	35	-
30	13	K	AML	4	-	BuCy	G	350	7.05	27.6	2	28	30
31	34	K	AML	2	-	BuCy	G	275	2.5	-	3	17	36
32	18	E	AML	2	-	BuCy	G	450	3.74	1.9	3	16	40
33	27	K	AML	2	-	BuCy	G	375	3.0	5.0	2	11	14
34	39	K	AML	2	-	BuCy	G	425	4.56	0.3	4	11	13
35	31	K	AML	2	-	BuCy	G	250	1.9	11	14	25	35
36	62	E	AML	2	-	BuCy	G	300	5.56	12.2	24	50	75
37	16	K	HH	>8	-	CVB	G	425	4.2	8.3	5	12	19
38	18	E	HH	>6	+	CVB	G	375	3.5	-	2	11	19
39	19	E	HH	>6	-	CVB	G	425	4.1	-	3	11	19
40	40	E	HH	8	-	CVB	G	475	4.7	-	2	10	13
41	50	E	M. Myeloma	>6	-	Melphalan	G	435	1.7	1.1	7	10	17
42	45	E	M. Myeloma	>6	-	Melphalan	G	400	2.1	1	8	11	-
43	52	K	M. Myeloma	>6	-	Melphalan	G	900	1.1	0.9	10	18	38

E: Erkek K: Kadın EGGHT: Ekstragonadal germ hücreli tümör G: Granülosit koloni uyartıcı faktör GM: Granülosit makrofaq koloni uyartıcı faktör RT: Radyoterapi MNC: Mononükleer hücre

C . PKKH ve Kemik İliği Hücrelerini Toplama :

Olgulara 5-9 gün boyunca hematopoetik büyüme faktörü cilt altı verildi. (5-10 µg/kg dozunda G-CSF veya GM-CSF) Lökosit sayısı 25.000/mm³ üzerine çıkarsa büyüme faktörü dozu azaltıldı, 5. 000/mm³ altında kalırsa dozu artırıldı. G-CSF veya GM-CSF veriliminin 5. gününden itibaren yada lökosit sayısı 10x10⁹ /L olunca yeterli sayıda mononükleer hücreye ulaşınca kadar, gün aşırı olarak Cobe Spectra (Cobe Laboratories Inc. Lakewood, USA) veya Baxter Fenwal CS 3000 hücre ayırıcıları ile lökoferez işlemi yapıldı. Hedef hücre sayısı minimum 2×10⁸ / kg toplam çekirdekli hücre veya 5×10⁶ /kg CD34 + hücre olarak alındı. Aferez işleminde damar yolu sağlamak için hastalara daha önceden subklavian vene Hickman kateteri takıldı.

D . Kriyoprezervasyon ve Reinfüzyon :

Lökoferez ile toplanan ürün eşit miktarda otolog plazma ve toplam %10'u olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) ile karıştırılıp (+4 derecede) 100cc'lik porsiyonlar halinde "gambrohemofreez" torbalara konuldu. Bu ürünler bilgisayarlı hız kontrollü dondurucu (planer R 203) ile 60 dk. 'da -100°C'ye kadar soğutulup reinfüzyon gününe kadar sıvı azot gazı içeren tanklar içinde (-196°C) saklandı. Reinfüzyon günü dondurulmuş torbalar +37⁰C'de su banyosunda hızlı bir şekilde eritilerek 15 dakikadan daha kısa bir süre içerisinde filtre edilmeksizin santral venöz kateterden verildi.

E . CD34+ Hücre Oranının Belirlenmesi:

25 olguda araştırılan CD 34 tesbitinde CBL 496 Anti-CD 34-FITC fare monoklonal antikoru (Cymbus Bioscience Limited) kullanıldı. Lökoferez ile toplanan üründen alınan örnek kan 24 saat içinde anti-CD 34 antikorla boyanıp FAC scan (Becton Dickinson) model akım sitometri ile CD 34+ olan hücrelerin oranları tesbit edildi. Boyamada 10 mikrolitre antikor ile MNC süspansiyonu (1.000.000 hücre /ml) +4C'de inhibe edildi. Sonra lysing solüsyonu ile (FACS Lysing Solution, Becton - Dickinson) karışımında eritrositler lizis edildi. 3 kez PBS ile yıkanıp akım sitometrisinde değerlendirildi. Mononükleer hücre popülasyonunda bulunan CD34+ hücre oranı ile toplam hücre sayısı çarpılarak toplam CD 34+ hücre sayısı bulundu. Mononükleer hücre sayımı Coulter Microdiff 18 (Coulter Electronics Limited) işlemcisi ile yapıldı

F . Uygulanan Hazırlama Rejimleri :

PKKHT olgularında hedef toplam mononükleer hücre ve toplam CD 34 + hücre sayılarına ulaşıldığında aferez işlemine son verilerek olgulara çeşitli hazırlama rejimi kemoterapi protokolleri uygulanmaya başlandı.(Tablo-VII). Ayrıca 7 olguda hastalıklı alana radyoterapi, 1 olguda total lenfoid ışınlama (TLI) ve 1 olguda total vücut ışınlaması (TBI) yapıldı.

Tablo VII: Uygulanan hazırlama rejim protokolleri:

Olgu sayısı	Tanı	Protokol			
7	HH	BEAM	BCNU	300 mg/m ² /gün	1. gün
	NHL		VP-16	200 mg/m ² /gün	2.,3.,4.,5. günler
			Ara-C	400 mg/m ² /gün	2.,3.,4.,5. günler
			L-PAM	140 mg/m ² /gün	6. gün
9	HH	CyEAM	Cy	1.5gr/m ² /gün	1.gün
	NHL		VP-16	200 mg/m ² /gün	2.,3.,4.,5. günler
			Ara-C	400 mg/m ² /gün	2.,3.,4.,5. günler
			L-PAM	140 mg/m ² /gün	6. gün
3	Germ hücreli tm.	ICE	IFO	1500mg/m ² /gün	1.,2.,3.,4.,5.günler
	Meme Kanseri		CBP	200mg/m ² /gün	1.,2.,3.,4.,5.günler
			VP-16	250mg/m ² /gün	1.,2.,3.,4.,5.günler
1	AML	Cy +TBI	Cy	60 mg/kg/gün	1. ve 2. günler
			TBI	1200 rad	
12	HH	CVB	Cy	1500mg/m ² /gün	1.,2.,3.,4. günler
	NHL		VP-16	200mg/m ² /gün	1.,2.,3. günler
			BCNU	300mg/m ² /gün	1. gün
8	AML	BuCy	Bu	4mg/kg/gün	1.,2.,3.,4. günler
			Cy	60 mg/kg/gün	1.,2. günler
3	Multiple myeloma	Melp	L-PAM	140 mg/m ² /gün	

G . Klinik Takip:

OKİT ve PKKHT uygulanan bütün olgular benzer protokolle takip edildiler. Hematokrit %27, trombosit $20000/\text{mm}^3$ üzerinde kalacak şekilde transfüzyonla desteklendiler. Trimetoprim sülfametoksazol +Gentamisin + Mikostatin ile intestinal dekontaminasyon yapıldı. Febril nötropeni durumunda geniş spektrumlu antibiyoterapi başlandı. Alınan kültür ve antibiyogram sonuçlarına göre gerekli değişiklikler yapıldı. Günlük kan sayımı, gün aşırı karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri takip edildi:Olgular reinfüzyon gününden itibaren "reverse" izolasyonun uygulandığı steril galoş, elbise ve maske ile, hastanın kullandığı malzeme ve yiyecekleri sterilize etmek için bir mikrodalga fırın ve ultraviyole lambanın olduğu steril odalarda tutuldular. Oral beslenemeyen olgularda parenteral hiperalimentasyon uygulandı. Reinfüzyondan sonra ,posttransplant +1. günden başlamak üzere, özellikle granülosit engraftmanını hızlandırmak amacıyla, 33 olguda G-CSF (Neupogen, Roche), 10 olguda GM-CSF (Leucomax, Sandoz) 5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozunda, lökosit sayısı ardışık 3 gün $\geq 1000 /\text{mm}$ oluncaya kadar verildi.

H . Engraftman Gelişme Süresine Etkileri Araştırılan Parametreler:

PKKHT uygulanan olgularda lökosit sayısının $\geq 1000 /\text{mm}^3$ ve trombosit sayısının $\geq 50000 /\text{mm}^3$ değerleri hematopoetik engraftman olarak kabul edildi. Tablo-VIII' de belirtilen parametrelerin trombosit ve lökosit engraftman süresini etkileyip etkilemedikleri araştırıldı. Ayrıca bütün parametrelerin birlikte engraftman gelişme sürelerine olan etkileri iki ayrı gruplandırma ile çalışıldı. 1. modelde olguların yaşları, transplantasyon öncesi dönemde radyoterapi ve kemoterapi uygulanımı, kullanılan büyüme

faktör tipi, toplam aferez hacmi, transplantasyon döneminde ateşli gün sayısı ve toplam MNC sayısı parametrelerinin etkileri toplam 43 olguda değerlendirildi. 2. modelde bu 7 parametre ile “toplam CD34 hücre sayısı” parametresinin birlikte engraftman süresine olan etkileri 25 olguda çalışıldı (CD34 tespiti sadece 25 olguda bakılabildiğinden).

Tablo : VIII: Engraftman gelişme süresine etkileri araştırılan parametreler :

Olguların yaşları

Transplantasyon hazırlık öncesi radyoterapi uygulanıp uygulanmadığı

Transplantasyon hazırlık öncesi alınan kemoterapi kür sayısı

Mononükleer hücre reinfüzyon sonrası kullanılan büyüme faktör tipi

Lökoferez ile toplanan toplam çekirdekli hücre sayısı

Lökoferez ile toplanan toplam CD 34+ hücre sayısı

Aferez volümü

Engraftman oluncaya kadar ateşli ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$) gün sayısı

I . Analiz Yöntemleri:

GATA ve AÜTF KİT merkezlerinde otolog PKKHT uygulanan olgularda tespit edilen engraftman için geçen sürelerin karşılaştırılması Mann Whitney-U testi ile yapıldı. Ayrıca bu KİT merkezlerindeki olguların engraftman gelişme süreleri analizi risk fonksiyonu (Hazard fonksiyon) ile gösterildi. Bütün olgularda tablo-VIII’ de belirtilen parametrelerin engraftman için geçen süreye olan etkileri lineer regresyon analizi ile

değerlendirildi. Engraftman için geçen sürenin belirlenen değişkenlerle birlikte değişim gösterip göstermediğini saptamak için korelasyon analizi ve saptanan çeşitli değişkenlerin alt gruplara göre engraftman süresinde bir farklılık olup olmadığı da Mann Whitney-U testi ile karşılaştırıldı. Adı geçen analizler SPSS istatistik programında çalışıldı.



BULGULAR

A - Kateter, hazırlama rejimi ve büyüme faktörüne bağlı olarak gelişen yan etkiler:

Yüksek doz kemoterapi ve PKKHT protokolü uygulanan olgularda aferez işlemleri Hickman subklavian ven kateteri ile yapılmış olup, katetere bağlı ciddi bir komplikasyon görülmedi. Katetere bağlı tromboembolik olay gözlenmeyen olgulardan 4' ünde geçici kateter tıkanıklığı gelişti. Bunlardan 3' ündeki tıkanıklık heparin ile, 1' indeki tıkanıklık ise streptokinaz ile açıldı. Olgularda 7 farklı hazırlama rejimi kullanıldı (Tablo - VII). Yüksek doz kemoterapi veya radyoterapiye bağlı olarak bulantı, kusma, karın ağrısı, saç dökülmesi dışında ciddi bir yan etki görülmedi. Olgulara transplantasyon öncesi (PKKH mobilizasyonu için) ve sonrası dönemde verilen G-CSF veya GM-CSF iyi tolere edilmiş olup sadece hafif-orta derecede toksik etkiler gelişti. Bu büyüme faktörlerine bağlı olarak 5 olguda (%11.6) ateş, 3 olguda (%6.9) yaygın kas ve kemik ağrıları ile 1 olguda (%2.3) cilt döküntüleri gözlemlendi. Hiç bir hastada büyüme faktörünün yan etkilerine bağlı olarak doz ayarlaması yapılmadı. Olgularda transplantasyon sonrası dönemde trombosit engraftmanı gelişinceye kadar median 7 gün (2-24) ateş 38.5°C ' nin üzerinde bulundu.

B -Toplanan progenitör hücrelerin verileri:

42 olgunun PKKH' leri, 1 olgunun periferik kanı toplandı. 2 olgunun ise PKKH' lerine ilave olarak kemik iliği hücreleri de alındı. Kilo başına median 4.7×10^8 ($1.1 - 10.8 \times 10^8$) mononükleer hücre (MNC) ortalama 4 (2-8) seansta toplanıp muhafaza edildi. Periferik kandan lökoferez işlemi ile toplanan ürüne ait veriler tablo - IX' da

özetlenmiştir. Aferezle toplanan progenitör hücrelerin kriyoprezervasyon öncesi “trypan blue” boyası ile tespit edilen viabilite oranları %90-100, eritme (thawing) sonrası dönemde ise %75-97 arasında bulundu.

Tablo - IX: Aferez ile toplanan ürüne ait veriler:

	Median	Alt - üst sınır
MNC sayısı	$4.7 \times 10^8/\text{kg}$	$1.1-10.8 \times 10^8/\text{kg}$
CD ₃₄ + hücre sayısı	$8.6 \times 10^6/\text{kg}$	$0.3-74 \times 10^6/\text{kg}$
Toplam volüm	450 cc	100-1500 cc
Aferez işlemi	4 defa	2-8 defa

C - İki merkezin olgularının engraftman sürelerinin karşılaştırılması:

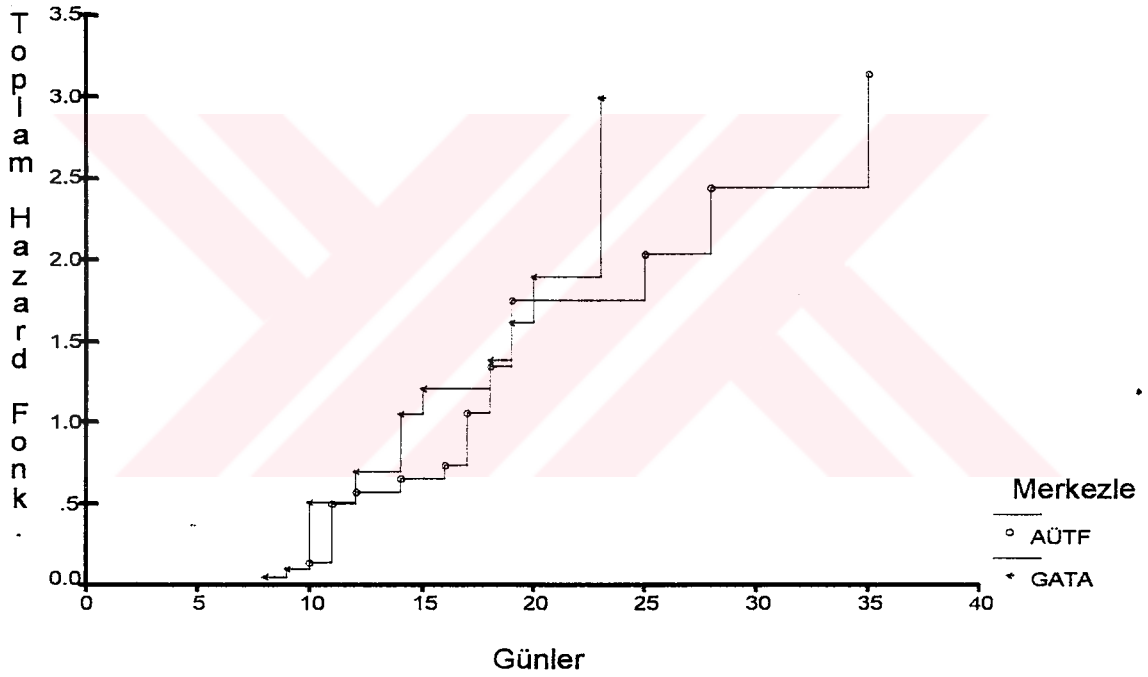
GATA KİT merkezinden değerlendirilmeye alınan PKKH transplantasyonlu 20 olguda lökosit ve trombosit engraftmanı sırasıyla median 14 gün (8-27) ve 26 gün (16-34) bulundu. AÜTF KİT merkezinden değerlendirmeye alınan lökosit engraftmanı için 23, trombosit engraftmanı için 21 olguya ait engraftman süreleri sırası ile median 16 gün (10-50) ve 21 gün (12-75) tespit edildi. Bu iki merkezin hem lökosit, hem de trombosit engraftman sürelerinin karşılaştırmasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Bu KİT merkezlerindeki olguların engraftman gelişme sürelerinin analizinin risk fonksiyonu (Hazard fonksiyon) Şekil - 1 ve Şekil - 2’ de gösterildi. Risk fonksiyonu belirli bir zamana kadar engraftman gelişmemiş bir kişinin bir sonraki zaman aralığında engraftman gelişme olasılığına verilen addır. Hazard sözcüğünün ilk harfi olan “H” ile gösterilen risk fonksiyonu ya da risk hızı aşağıdaki formülle hesaplanır. Bu formülde “d” toplam engraftman gelişen olgu sayısını, “Σf” engraftman gelişinceye kadar geçen toplam

süreyi ve “Σc” ise engraftman gelişmeyen olguların izlenme süresinin toplamını temsil etmektedir:

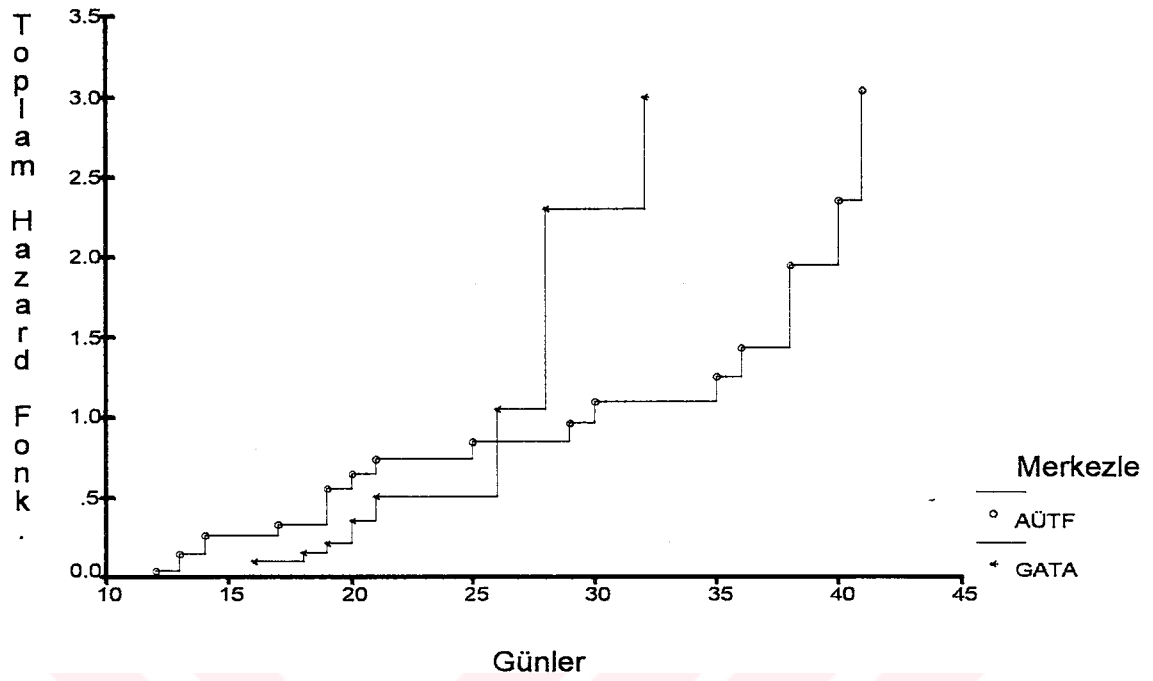
$$H = d / \Sigma f + \Sigma c$$

Her iki merkezde PKKHT uygulanan toplam 43 olguda lökosit ve trombosit engraftman süreleri sıra ile median 14 gün (8-50) ve 26 gün (12-75) bulundu.

Olgularda lökosit engraftmanı oluşma süresi ile trombosit engraftmanı oluşma sürelerinin kendi aralarındaki korelasyonun çalışılmasında oldukça anlamlı olarak %80.8’ lik bir pozitif korelasyon saptandı.



Şekil - 1: GATA ve AÜTF KİT merkezleri PKKHT olgularının lökosit engraftman gelişme sürelerinin toplam hazard fonksiyon grafiği.



Şekil - 2: GATA ve AÜTF KİT merkezleri PKKHT olgularının trombosit engraftman gelişme sürelerinin toplam hazard fonksiyon grafiği.

D - Hematopoetik engraftman gelişme sürelerini etkilediği düşünülen risk faktörleri:

PKKHT uygulanan olgularda lökosit ve trombosit engraftman gelişme sürelerine etkileri çalışılan risk faktörleri tablo-VIII' de belirtilmiştir. Hazırlama rejimi dönemine kadar uygulanmış olan kemoterapi kür sayıları ($p=0.011$) ve reinfüzyon gününden engraftman gelişinceye kadar olan zaman diliminde gözlenen ateşli ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$) gün sayısının ($p=0.0002$) lökosit engraftmanı gelişme süresi ile ilişkisi anlamlı bulundu. Yaş, cinsiyet, transplantasyondan sonra kullanılan büyüme faktör tipi, hazırlama rejimi öncesi herhangi bir alana radyoterapi uygulanımı, toplam aferez hacmi, aferez ile toplanan

üründeki kilo başına toplam MNC sayısı ve CD₃₄+ hücre sayısı gibi risk faktörlerinin ise lökosit engraftmanı gelişme süresini anlamlı olarak etkilemediği saptanmıştır (Tablo - X ve XI).

Bu parametrelerin ayrı ayrı trombosit engraftman gelişme süreleri ile olan ilişkilerinin araştırılmasında sadece transplantasyon döneminde geçen ateşli gün sayısının istatiki olarak anlamlı düzeyde trombosit engraftman süresini etkilediği gösterilmiştir (p=0.0013). Diğer risk faktörleri anlamlı olarak trombosit engraftman gelişme süresi ile ilişkili bulunmamıştır (Tablo - X ve XI).

Hastaların patolojik tanıları ve kullanılan hazırlama rejim protokollerinin hematopoetik engraftman gelişme süresine olan etkileri grup başına düşen olgu sayısının azlığı nedeniyle çalışılmadı.

Tablo X: Çalışılan parametrelerin lökosit ve trombosit engraftman gelişme süresine etkileri (I)

Risk faktörü	Olgu sayısı	%	Lökosit engraftmanı (gün)		Trombosit engraftmanı (gün)	
			Ort. $\pm$ SD	p değeri	Ort. $\pm$ SD	p-değeri
Yaş :						
< 24	20	46.5	15.80 $\pm$ 6.03	p > 0.05	25.30 $\pm$ 7.29	p > 0.05
$\geq$ 24	23	53.5	16.22 $\pm$ 9.48		26.13 $\pm$ 13.42	
Cinsiyet :						
-Erkek	31	72.1	15.84 $\pm$ 8.69	p > 0.05	25.45 $\pm$ 12.24	p > 0.05
-Kadın	12	27.9	16.50 $\pm$ 6.02		26.42 $\pm$ 8.40	
Radyoterapi* :						
- Evet	13	30.2	14.00 $\pm$ 3.87	p > 0.05	25.31 $\pm$ 6.43	p > 0.05
- Hayır	30	69.8	16.90 $\pm$ 9.13		25.93 $\pm$ 12.88	
Kemoterapi kür sayısı*						
$\leq$ 6	21	48.8	18.90 $\pm$ 9.81	p < 0.05	27.80 $\pm$ 13.98	p > 0.05
> 6	22	51.2	13.27 $\pm$ 4.39		23.76 $\pm$ 7.41	
Büyüme faktörü						
- G-CSF	33	76.7	16.82 $\pm$ 8.81	p > 0.05	25.77 $\pm$ 12.69	p > 0.05
- GM-CSF	10	23.3	13.40 $\pm$ 3.31		25.60 $\pm$ 4.06	

* : Hazırlama rejimi dönemine kadar uygulanan tedavi.

Ort $\pm$ SD: Ortalama $\pm$ Standart deviasyon

Tablo - XI: Çalışılan parametrelerin lökosit ve trombosit engraftman gelişme süresine etkileri (II)

Parametre	Median	Lökosit		Trombosit	
		engraftmanı		engraftmanı	
		r ²	p	r ²	p
Ateşli gün sayısı*	7 gün	0.271	< 0.0005	0.319	<0.005
MNC sayısı	4.7x10 ⁸ /kg	-0.144	>0.05	-0.121	>0.05
CD ₃₄ + hücre sayısı	8.6x10 ⁶ /kg	-0.482	>0.05	-0.131	>0.05
Aferez hacmi	450cc	-0.239	>0.05	-0.092	>0.05

* : Reinfüzyon gününden trombosit engraftmanına kadar olan dönemde ateşin $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ olarak devam ettiği gün sayısı
MNC : Mononükleer hücre

E - Çalışılan risk faktörlerinin hepsinin birden etkilerinin araştırılması:

Hematopoetik engraftmanı etkilediği düşünülen 7 risk faktörünün (model-1) ve tablo-VIII' de belirtilen 8 risk faktörünün (model- 2) hepsinin birlikte engraftman gelişme süresine etkileri araştırıldı. CD₃₄+ hücre sayısı sadece 25 hastada çalışılabilmiştir. Değerlendirmeye 43 olgu alabilmek için model-1' e "CD34+ hücre sayısı" parametresi dahil edilmedi. Model- 1' deki parametrelerin etkilerinin hepsinin birden lineer regresyonla değerlendirilmesinde (şekil -3) lökosit engraftmanının gelişmesi muhtemel süreyi belirlemede aşağıdaki formül geliştirildi (p= 0.00001):

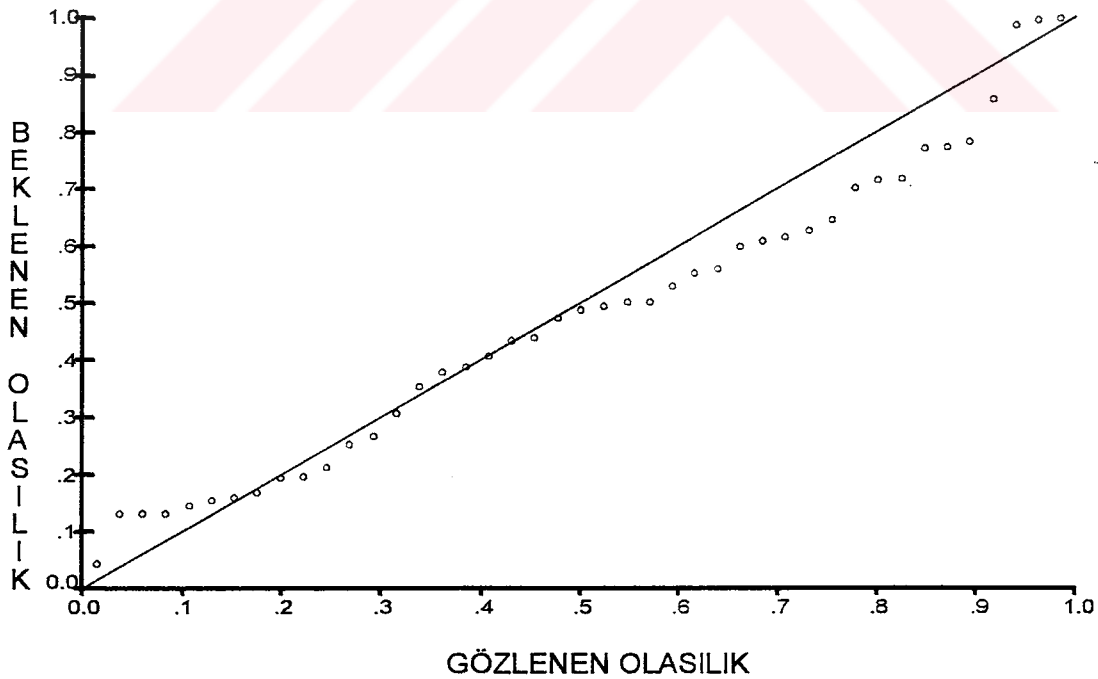
Beklenen lökosit engraftman gelişme süresi = 16.69 + (0.77 x ateşli gün sayısı) - (1.01 x kemoterapi kür sayısı)

25 olguda değerlendirilen model- 2' nin lökosit engraftmanı gelişme süresine etkisinin çalışılmasında da CD₃₄ sayısının anlamlı olarak yukarıdaki ilişkiyi değiştirmedeği gözlemlendi[20.54+(0.81xAteşli gün sayısı)-(1.52xKemoterapi kür sayısı)].

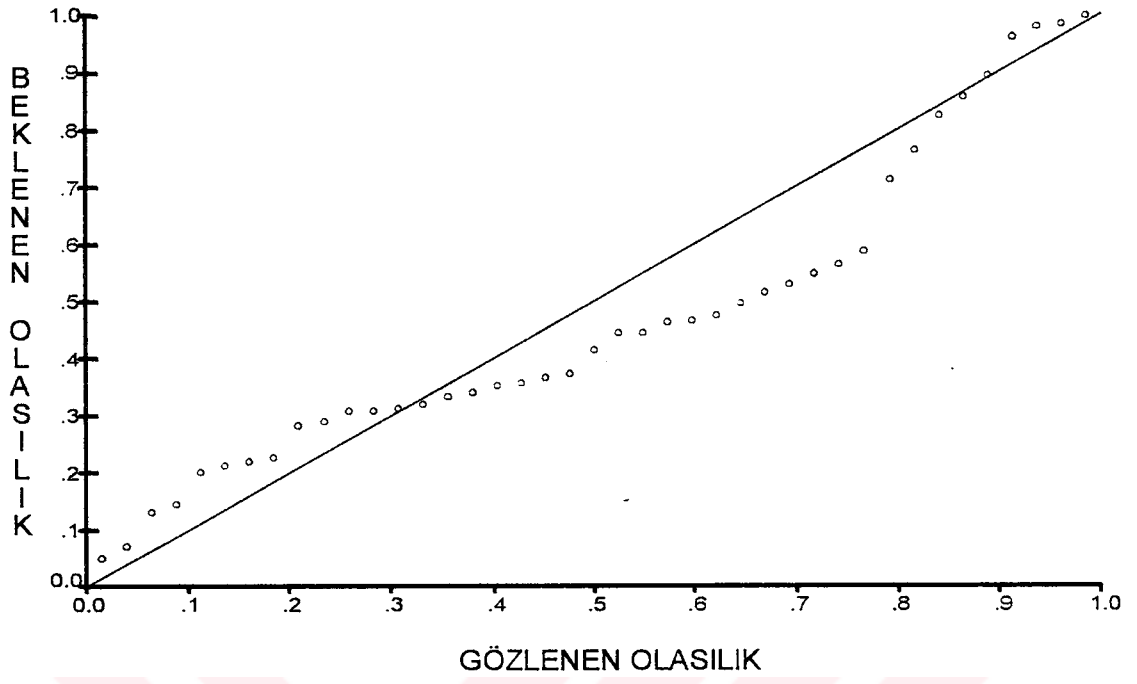
Model - 1 kapsamındaki risk faktörlerinin hepsinin birden trombosit engraftman gelişme süresine olan etkilerinin değerlendirilmesinde, bu süreyi en anlamlı olarak değiştiren parametrenin “ ateşli gün sayısı” olduğu tesbit edildi (p=0.0012) (Şekil - 4).

Beklenen trombosit engraftman gelişme süresi=15.86+ (1.22xAteşli gün sayısı)

Model - 2' nin trombosit engraftmanı ile ilişkisinin araştırılmasında da yukarıdaki bağıntı pek değişmedi. [14.98+(1.57xAteşli gün sayısı)].



Şekil-3: Model -1 için lökosit engraftman gelişme olasılığının lineer regresyon eğrisi.



Şekil-4: Model -1 için trombosit engraftman gelişme olasılığının lineer regresyon eğrisi

TARTIŞMA VE SONUÇ

PKKHT Türkiye’ de 4 yıldır hematolojik ve solid tümörlerde başarıyla uygulanmakta olup, bu uygulamanın % 77’ sini gerçekleştiren GATA ve AÜTF KİT merkezlerinin otolog PKKHT olguları çalışma kapsamına alınmıştır. Bu olgularda erken hematopoetik yenilenmenin (engraftman) ortaya çıkmasının transplantasyona bağlı morbidite ve mortalite insidansını azaltan en önemli faktör olduğu genel kabul gören bir gerçektir. Lökosit ve trombosit engraftman gelişme süresi birçok etkene bağlı olarak değişebilmektedir. Bu çalışma PKKHT sonrası engraftman gelişme hızı ile ilgili bazı belirsizliklerin aydınlatılmasına katkıda bulunacağı düşüncesiyle planlanmıştır. Literatür taramalarında Türkiye’ de yapılan otolog PKKHT olgularında, kemik iliği engraftmanı gelişme süresine etkili olabilecek risk faktörlerini kapsayan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yabancı literatür taramalarında ise bu konuyla ilgili çok az sayıda çalışma bulunmuş olup, bunlarda da araştırılan parametrelerin engraftman gelişme süresine olan etkileri ayrı ayrı değerlendirilmiştir (7,38,43). Hematopoetik yenilenmenin süresine katkıda bulunacak faktörler birbirinden bağımsız olarak düşünülemez. Çünkü bunların hem tek başlarına engraftmana etkileri vardır, hem de bu faktörler birbirlerinin etkilerini değiştirebilirler. Örneğin transplantasyon öncesi dönemde hastaya uygulanan kemoterapi kür sayısı veya radyoterapi, transplantasyondan sonra uygulanacak büyüme faktörünün engraftmanı hızlandırıcı etkisini veya toplanan MNC sayısından bağımsız olarak diferansiyasyon evrelerini değiştirebilirler. Bu nedenle PKKHT sonrası engraftman gelişme hızını etkileyebilecek risk faktörlerinin hep birlikte değerlendirmeye alınması daha doğru sonuç

verecektir. Çalışmamızın farklılığı da çok parametrelili (8 parametre) olması ve engraftmana olan etkileri araştırılırken değerlendirmeye hepsinin birden alınmasıdır.

Birçok çalışmada lökosit engraftmanı gelişimi olarak nötrofil sayısının $\geq 500 / \text{mm}^3$ veya granülosit sayısının $\geq 1000 / \text{mm}^3$ olması kabul edilmiştir (2,7,8,50). Bizim çalışmamızda da 3 gün üstü 1000 / mm^3 üzerinde granülosit sayısı tespit edildiğinde bunun ilk günü lökosit engraftman gelişme günü olarak alınmıştır. Trombosit engraftman gelişme sınırı olarak mm^3 ' de 20000, 25000, 50000, 100000 sayılarını kabul eden araştırmacılar vardır (2,43,45,48,50). Biz 20000 - 25000 / mm^3 trombosit sayılarını trombosit transfüzyonlarından bağımsız olarak tespit etme gücüne olabileceği için ve 100000 / mm^3 sayısına ulaşılmadan olgular hastaneden genellikle taburcu edildiği için trombosit engraftmanı olarak 50000 / mm^3 sayısını kabul ettik.

GATA KİT merkezinde yapıp değerlendirmeye alınan 20 olguda lökosit ve trombosit engraftmanı gelişme süreleri sırasıyla median 14 gün ve 26 gün, AÜTF KİT merkezinin 23 olgusunda bu süreler median 16 gün ve 21 gün olarak bulunmuştur. Bu iki merkezde hasta populasyonunun demografik özelliklerinde , aferez ve kriyoprezervasyon yöntemlerinde, hazırlama rejimi protokollerinde, kullanılan büyüme faktör tipi ve klinik takip protokollerinde olası farklılıklar nedeniyle tespit edilen engraftman gelişme süreleri de farklı olabilir düşüncesi ile her iki merkezde bulunan lökosit ve trombosit engraftman süreleri karşılaştırılmış, fakat istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu karşılaştırmada önemli bir fark tespit edilmiş olsa, çalışmamız bu farka neden olan etkenleri ortaya çıkarmaya yönelik olarak planlanacaktı. İki KİT merkezinin engraftman

gelişme sürelerinde anlamlı bir fark olmadığı için verileri ortak değerlendirmeye alıp, olgu sayısını artırmada bir sakınca görülmemiştir.

Hematopoetik büyüme faktörü ile mobilize edilerek yapılan PKKHT' nda çoğu araştırmacı lökosit engraftman ($\geq 1000 / \text{mm}^3$) gelişme süresini median 10 - 17 gün, trombosit engraftman ($\geq 50000 / \text{mm}^3$) gelişme süresini median 21 - 29 gün arasında rapor etmişlerdir (5,8,16,19,22,28,31,38). Çalışmamızda toplam 43 PKKHT' lu olgumuzu değerlendirdiğimizde, belirtilen lökosit ve trombosit düzeylerine sırasıyla median 14 ve 26 günde ulaşıldığı görülmüştür. Sonuç olarak Türkiye popülasyonunda yapılan PKKHT' nda, GATA ve AÜTF KİT merkezlerinin uyguladığı transplantasyon protokolleri ile birçok merkezin sonuçlarına yakın kemik iliği engraftmanı gelişme süreleri bulunmuştur.

Engraftman süresini etkileyen faktörleri çalışmaya, lökosit engraftman gelişme süresi ile trombosit engraftman gelişme süresinin kendi aralarında bir paralellik gösterip göstermediğini araştırmakla başladık. Sonuçta % 80.8 gibi çok anlamlı bir pozitif korelasyon tespit ettik. Bu bulgu, lökosit engraftmanı erken görülürse trombosit engraftmanının da erken görülmesinin büyük bir olasılık olacağı çıkarımını desteklemektedir. Yani, lökosit ve trombosit engraftmanı gelişim sürelerini genellikle aynı etkenler belirlemektedir.

Hematopoetik yenilenmenin mekanizması tam olarak bilinmemesine karşın, kemik iliği engraftmanının çeşitli fazlarının olduğu görüşü yaygındır. Jones ve arkadaşları engraftmanın ilk fazını yönlenmiş (committed) progenitör hücrelerin, engraftmanın devamını sağlayan ikinci fazı ise pluripotent kök hücrelerin oluşturduğunu göstermişlerdir.

Hematopoetik büyüme faktörleri özellikle yönlendirilmiş progenitör hücrelerin periferdeki sayısını artırdıkları için, bu faktörlerle mobilize edilerek yapılan PKKHT' da engraftmanın ilk fazı hızlıdır (8,43). Yakın bir dönemde Chao ve arkadaşları büyüme faktörü ile mobilize edilmiş ve büyüme faktörü verilmeden periferik progenitör hücre toplanarak yapılan transplantasyonların lökosit ve trombosit engraftman hızını çalışmışlardır. Bazı çalışmalarla da uyumlu olarak birinci grupta daha hızlı bir engraftman bulduklarını rapor etmişlerdir (8,40,43,53). Progenitör hücre mobilizasyonunda olduğu gibi transplantasyon sonrası lökosit engraftmanını hızlandırmak için de kullanılan hematopoetik büyüme faktörlerinden en çok G - CSF ve GM - CSF tercih edilmektedir. Bu ikisinin kemik iliği yenilenmesine olan etkinliklerini karşılaştıran çok az çalışma vardır. Çalışmamızda GM - CSF verilen olgularımızda lökosit engraftmanı gelişim süresini (median 13.40 ± 3.31 gün) G - CSF verilen gruba (median 16.82 ± 8.81 gün) göre daha kısa bulmamıza rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). G - CSF ve GM - CSF verilen olgularda trombosit engraftman süresine etkileri de farklı bulunmadı. Bizim bulgularımızı destekleyen araştırmacılar olduğu gibi G - CSF' in özellikle lökosit engraftmanı gelişim süresini GM - CSF' e göre daha fazla kısalttığını rapor eden araştırmacılar da vardır (9,37,48). Bunun sebebi olarak GM - CSF' in daha erken progenitör hücreleri uyarmaları, bu hücrelerin olgun hücrelere dönüşünceye kadar belirgin bir süre gerektirmeleri gösterilmektedir (21).

Miyeloablatif tedaviden sonra hematopoetik yenilenmeyi artırmak için transplantasyon sonrası kullanılması gerekli optimal büyüme faktör dozu da henüz tartışmalı bir konudur. Çalışmamızda G - CSF ve GM - CSF' nin $5 \mu\text{g} / \text{kg}$ dozları

kullanıldı ve nötrofil artışı tespit edilmezse dozları iki katına kadar çıkarıldı. Büyüme faktör kullanımına bağlı yan etki görülünce de dozlar azaltıldı. Birçok araştırmacı G - CSF ve GM - CSF' in etkili dozunu 5 µg / kg olarak kabul etmekte olup, daha yüksek dozların kemik iliği engraftmanı gelişim süresini kısaltmadığını belirtmektedirler (16,48,54); hatta trombosit engraftman gelişim süresine olumsuz etkisi olduğu bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmektedir (10).

Bu çalışmada lökosit ve trombosit engraftman gelişme süresi ile infüze edilen toplam mononükleer hücre ve toplam CD34+ hücre sayısı arasında anlamlı bir ilişki derecede bulunmamıştır. Sonuçlarımızı desteklemeyen bazı araştırmalarda fazla sayıda çekirdekli hücre ve CD34+ hücre sayılarının kemik iliği engraftman hızını artırdığı rapor edilmiştir (8,12,39,43). İnfüze edilen total mononükleer hücre, CFU-GM ve CD34+ hücre sayıları ile nötrofil ve trombosit engraftman gelişme süresi arasında anlamlı bir ilişki tespit etmeyen araştırmacılar da mevcuttur (29,41,49,57). CFU-GM ve mononükleer hücre miktarı ile hematopoetik yenilenme süresi arasındaki ilişki birçok çalışmada daha çok tartışmalı olduğu için, aferezde toplanan ürünün engraftman gelişimine yeterli miktarının planlanmasında CD34+ hücre sayısının esas kriter olarak alınması kabul edilmektedir (16).

PKKHT' da kemik iliği yenilenmesinde minimum 2×10^8 / kg mononükleer hücre, 3×10^6 / kg CD34+ hücre sayısının yeterli olduğu konusunda genel bir kabul görmesine rağmen bu konu halen tartışmalıdır (27,43). Gorin ve ark. düşük hücre sayımları ile transplantasyon yapılan olgularda, engraftmanın olmadığını yada çok yavaş olduğunu belirtmişlerdir ve 0.3×10^6 / kg CD34+ hücre infüze edilen bir hastada, megakaryositer

serinin hiç gelişmediğini saptamışlardır (27). Bizim çalışmamızda hematopoetik engraftman süresi ile MNC ve CD34+ hücre sayısı arasında bir ilişki tespit edilmemesi, olgulara infüze ettiğimiz MNC ve CD34+ hücre sayılarının gereksinimin çok üstünde olması ile açıklanabilir (sırası ile median $4.7 \times 10^8 / \text{kg}$ ve $8.6 \times 10^6 / \text{kg}$).

Gerek mononükleer hücreler gerekse CD34+ hücrelerin viabilitesi de transplantasyonda önemlidir. Hücre ayırma işleminde, DMSO ile muamelede , dondurma ve eritme sırasında hücreler sayıca kayba uğrayabilirler veya canlılıklarını yitirebilirler. Bizim tüm olgularımızda hematopoetik yenilenme sağlandı. Eriterek olgulara infüze ettiğimiz üründe viabilite oldukça yüksek bulundu (% 75 - 97). Viabilitenin yüksek olması, manipulasyonlar sırasında progenitör hücrelerin fazla zarar görmediğini göstermektedir.

Yaşla ilişkili olarak kemik iliği rezervinde bazı değişikliklerin olabileceği düşüncesi ile, olguların yaşlarının hematopoetik engraftman gelişme süresine olan etkisi de değerlendirmeye alındı. Bulgularımızda PKKHT uygulanan olgularımızın yaşı ile lökosit ve trombosit engraftman gelişme süresi arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Yaş faktörünün kemik iliği yenilenmesi üzerine etkisini çalışan araştırmacılar, bizim bulgularımızla uyumlu ve uyumsuz sonuç rapor edenler mevcuttur (11,36).

Yüksek doz kemoterapi ve PKKHT uygulanan olgularda hematopoetik engraftman gelişme süresinin transplantasyon öncesi dönemde alınan tedavi (kemoterapi ve / veya radyoterapi) ile ilişkisi konusunda çelişkili sonuçlar belirten literatürler mevcuttur. Birçok çalışmada fazla kemoterapi almış olgularda hematopoetik yenilenmenin daha geç olduğu

rapor edilmiştir (12,36). Bizim çalışmamızda da lökosit engraftman gelişme süresi ile olgularımızın transplantasyon öncesi aldıkları kemoterapi kür sayısı arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı ($p=0.011$). Aynı korelasyon trombosit engraftman gelişme süresi ile gösterilemedi ($p > 0.05$). Balwell ve ark. çalışmalarında olguların daha önce kemoterapi almalarının hematopoetik yenilenmeyi etkilemediğini belirtmişlerdir (8). Bazı araştırmacıların sonuçlarında PKKHT' na hazırlık öncesi dönemde radyoterapi uygulanan ve özellikle pelvik bölgeye radyoterapi verilen olgularda kemik iliği yenilenmesinde gecikme olduğu rapor edilmiştir (12). Bu nedenle daha önce özellikle pelvik bölgeye veya daha geniş bir alana radyoterapi uygulanıp PKKHT programına alınacak olgularda daha fazla aferez işlemi yapmak gerekebileceği yorumu getirilmiştir (8,43). Bizim çalışmamızda ise herhangi bir lokalizasyona ve herhangi bir dozda radyoterapi almış olgularımızda lökosit ve trombosit engraftman gelişme süreleri, radyoterapi almayan olgularda tespit edilen engraftman sürelerinden anlamlı olarak farklı değildi. Bizim bulgularımızla uyumlu olan ve özellikle trombosit engraftman gelişme süresi ile ilişkisiz olduğunu vurgulayan literatürler de vardır (8,36).

Çalışmamızda hematopoetik engraftmanı etkileyebileceği düşünülen 7 risk faktörünün (model-1) (yaş, cinsiyet, kemoterapi kür sayısı, radyoterapi uygulanmış olması, kullanılan büyüme faktör tipi, ateşli gün sayısı ve toplanan MNC sayısı) hepsinin birden değerlendirilmeye alınmasının da uygun olacağı düşünüldü. Bu faktörler tek tek engraftmanı az da olsa direkt olarak etkilemekte, ayrıca herbir faktörün birbirlerine etkisiyle de kemik iliği engraftmanına etkileri dolaylı olarak devam etmektedir. Bu parametrelerin toplam etkilerini daha doğru değerlendirebilmek için bu açıdan da istatistiki analiz yapılmıştır. Model-1 ile lökosit engraftmanı gelişme sürelerinin ilişkisi lineer

regresyonla değerlendirildiğinde özellikle transplantasyon döneminde geçen ateşli ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$) gün sayısı ve transplantasyon öncesi dönemde uygulanan kemoterapi kür sayısı ile özellikle belirlenen şu ilişki tespit edilmiştir ($p = 0.00001$) : Beklenen lökosit engraftman gelişme süresi = $16.69 + (0.77 \times \text{ateşli gün sayısı}) - (1.01 \times \text{kemoterapi kür sayısı})$. Buradan “ateşli gün sayısı” ile “kemoterapi kür sayısı” parametrelerindeki değişikliklerin direkt olarak lökosit engraftman süresine yansıtacağını , diğer parametrelerin ise kısmi etkide bulunup sadece formüldeki sabit katsayıları oluşturduğu yorumu yapılabilir. Nitekim, “CD34+ hücre sayısı” parametresinin de eklenerek 8 risk faktörünün (model-2) lökosit engraftmanına etkisi çalışıldığında da ilişkide değişikliğin olmadığı görüldü. [Beklenen lökosit engraftman gelişme süresi = $20.54 + (0.81 \times \text{ateşli gün sayısı}) - (1.52 \times \text{kemoterapi kür sayısı})$].

Model-1 kapsamındaki risk faktörlerinin hepsinin birden trombosit engraftman gelişme süresine olan etkilerinin değerlendirilmesinde, bu süreyi en anlamlı olarak değiştiren parametrenin “ateşli gün sayısı” olduğu tespit edildi. [Beklenen trombosit engraftman gelişme süresi = $15.86 + (1.22 \times \text{ateşli gün sayısı})$] ($p=0.0012$). Model-2’ nin trombosit engraftmanı ile ilişkisinin araştırılmasında da yukarıdaki bağıntı değişmedi. [$14.98 + (1.57 \times \text{ateşli gün sayısı})$]. Gerek lökosit gerekse de trombosit engraftmanı gelişme süresini “CD34+ hücre sayısı” parametresinin çok fazla etkilememesinin nedeninin, olgulara gereksinim duyulandan daha çok miktarlarda CD34+ hücre içeren aferez ürünü (median $8.6 \times 10^6 / \text{kg}$) infüze edilmesi olabileceği düşünüldü.

SONUÇ

PKKHT sonrası, olgularda erken hematopoetik engraftmanın ortaya çıkması transplantasyona bağlı morbidite ve mortalite insidansının azalmasında ve transplantasyonun başarısını belirlemede çok önemli bir faktördür. Bu çalışma engraftman gelişme süresini etkileyen parametrelerle ilgili belirsizlikleri açıklığa kavuşturmak için yapılması gereken araştırmalara bir katkıdır. Çalışmamızda özellikle transplantasyon öncesi dönemde alınan kemoterapi kür sayısı ile transplantasyon döneminde geçen ateşli gün sayısının kemik iliği engraftman süresini önemli derecede etkilediği bulunmuştur. Bu nedenle PKKHT adayı olan olgulara daha fazla kemoterapi uygulamadan transplantasyon kararının verilmesi ve nötropenik dönemde enfeksiyonu önlemek için maksimum tedbirlerin alınması engraftman süresini kısaltabilecektir. Ayrıca kemik iliği engraftman süresinde etkili olabilecek diğer birçok faktörün de çok olgulu çalışmalarla araştırılmasına gereksinim vardır.

ÖZET

Yüksek doz kemoterapi ve otolog periferik kan kök hücre desteği relaps yapmış lenfoma ve lösemilerde uzamış hastalıksız sağ kalım ve bazı solid tümörlerde daha uzun süren tam cevap sağlar. Kemik iliği engraftmanı sağlanıncaya kadar sürececek 2-4 haftalık aplazi dönemindeki enfeksiyöz ve kanama komplikasyonları en belirgin morbidite ve mortalite nedenidir. Bu nedenle nötrofil ve trombosit engraftman zamanı çok önemlidir. Miyeloablasyondan sonra periferik kan kök hücrelerin infüzyonunu takiben engraftmanın gelişimi ile ilgili olabilecek faktörleri belirlemek için, iki transplantasyon merkezinde (GATA ve AÜTF KİT merkezleri) PKKHT uygulanan 43 olgu çalışmaya alındı (13-62 yaşlarında). Olgularda histolojik olarak Hodgkin hastalığı(15), non-Hodgkin lenfoma(13), AML(9), multiple myeloma(3), germ hücreli tümör(2) ve meme kanseri(1) tanıları mevcuttu. $500/\text{mm}^3$ nötrofil ve $50000/\text{mm}^3$ trombosit sayılarına sırasıyla median 14 ve 26 günde ulaşıldı. Kemik iliği engraftmanı gelişim sürelerine etkileri araştırılan faktörler: Olguların yaşları, transplantasyon öncesi dönemde uygulanan radyoterapi ve kemoterapi, infüzyondan sonra uygulanan büyüme faktör tipi (G-CSF veya GM-CSF), infüze edilen toplam mononükleer ve CD34+ hücre sayısı, toplanan ürünün hacmi, trransplantasyondan sonra engraftman gelişinceye kadar geçen ateşli gün sayısı. Bu faktörlerin hepsinin birden kemik iliği yenilenmesine etkileri lineer regresyonla değerlendirildi. Verilerimize göre, nötrofil engraftmanı olguların daha önce kemoterapi görmeleri ile ($p=0.011$) ve ateşli gün sayısı ile ($p=0.0002$) negatif korelasyon gösterdi, diğer faktörlerle ilişkili bulunmadı. Trombosit engraftmanı ile sadece ateşli gün sayısı korelasyon gösterdi ($p=0.0013$). Kemik iliği yenilenmesini artırmada optimal PKKHT protokolü henüz belirgin değildir. Miyeloablatif tedaviden sonra hematopoetik yenilenmeyi hızlandırmak için, engraftmanı etkileyen diğer faktörleri içeren daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

SUMMARY

Factors Affecting Hematopoietic Engraftment After Peripheral Blood Stem Cell Transplantation (PBSCT)

High dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell support achieves prolonged relapse-free survival in relapsed lymphomas and leukemias and has provided durable complete responses in certain solid tumors. The principal morbidity and mortality result from the infectious and bleeding complications during 2-4 week aplasia until the bone marrow autograft can recover. So, time to achieve neutrophil and platelet engraftment is very important. To determine the factors that might be involved in successful engraftment following administration of autologous peripheral blood stem cells after myeloablation, we examined 43 patients (13-62 years of age) undergone PBSCT in two transplantation centers (GATA and AÜTF BMT Centers). Patients were histologically confirmed as Hodgkin's disease (15), non-Hodgkin's lymphoma(13), AML(9), multiple myeloma(3), germ cell tumor(2) and breast cancer(1). The median time to achieve $500/\text{mm}^3$ neutrophils and $50000/\text{mm}^3$ platelets was 14 and 26 days, respectively. Factors investigated in an attempt to determine their effects on marrow engraftment were: The ages of cases, radiotherapy and chemotherapy applied in pretransplantation period, the growth factor used (G-CSF or GM-CSF) after infusion, the total numbers of mononuclear cells and CD34+ cells infused, total blood volume pheresed and the number of days with fever in post -transplant period. The overall effect of all of these factors on marrow recovery was evaluated at the same time by linear regression. Our data showed that neutrophil engraftment negatively correlated with prior exposure to chemotherapy ($p=0.011$) as well as days passed with fever ($p=0.0002$) but not the other factors. And only the number of days with fever was correlated with platelet recovery ($p=0.0013$). The optimal schedule of PBSCT protocol is not known to enhance bone marrow recovery. More work is required to study other factors affecting engraftment in an effort to further increase hematopoietic constitution after myeloablative therapy.

KAYNAKLAR

1. Andrews, R. G., Singer, J. W., Bernstein, I. D.: Monoclonal Antibody 12-8 Recognizes a 115-kd Molecule Present on Both Unipotent and Multipotent Hematopoietic Colony-Forming Cells and Their Precursors. *Blood*. 67: 842-845, 1986.
2. Andrews, R. G., Briddell, R. A., Knitter, G. H., Rowley, S. D., Appelbaum, F. R., McNiece, I. K.: Rapid Engraftment by Peripheral Blood Progenitor Cells Mobilized by Recombinant Human Stem Cell Factor and Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor in Nonhuman Primates. *Blood*, 85(1): 15-20, 1995.
3. Antin, J. H., Smith, B. R.: Bone Marrow Transplantation . *Blood Principles and Practice of Hematology* (Eds). Handin, R. I., Lux, S. E., Stassel, T. P. Philadelphia, JB Lippincott Company. 1995.
4. Antman, K.H.: GM-CSF in Marrow Transplantation. *Eur. J. Cancer*, 29A Suppl. 3: 2-6, 1993.
5. Barge, A. J.: A Review of the Efficacy and Tolerability of the Recombinant Haematopoietic Growth Factors in Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 11(Suppl.2): 1-11, 1993.
6. Bensinger, W., Singer, J., Appelbaum, F., Lilleby, K., Longin, K., Rowley, S., Clarke, E.: Autologous Transplantation with Peripheral Blood Mononuclear Cells

- Collected After Administration of Recombinant Granulocyte Stimulating Factor. Blood, 81: 3158 , 1993.
7. Berenson, R. J., Bensinger, W. I., Hill, R. S., Andrews, R. G., Lopez, J.G., Kalamasz, D. F., Still, B. J.: Engraftment After Infusion of CD34+ Marrow cells in Patients with Breast Cancer or Neuroblastoma. Blood, 77(8): 1717-1722, 1991.
 8. Bolwell, B. J., Fishleder, S. W., Andresen, A. E., Lichtin, A., Koo, A., Yanssens, T., Burwell, R., Bauccho, P., Green, R.: G-CSF Primed Peripheral Blood Progenitor Cells in Autologous Bone Marrow Transplantation: Parameters Affecting Bone Marrow Engraftment. Bone Marrow Transplantation, 12: 609-614, 1993.
 9. Bolwell, B. J., Goormastic, M., Yanisens, T., Dannley, R., Bauccho, P., Fishleder, A.: Comparison of G-CSF with GM-CSF for Mobilizing Peripheral Blood progenitor Cells and for Enhancing Marrow Recovery After Autologous Bone Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplant., 14(6): 913-8, 1994.
 10. Bolwell, B., Goormastic, M., Dannley, R., Andresen, S., Overmayer, B., Pohlman, B., Mendez, Z., Kalaycıoğlu, M.: G-CSF Post-Autologous Peripheral Blood Progenitor Cell (PBPC) Transplant: A Randomized Study of 5, 10, and 16 µg/dl. Blood, 86(10) Suppl.1: 2465, 1995.
 11. Canals, C., Marti, J. M., Martinez, E., Sierra, J., Punti, C., Granena, A., Domingo, A.: Hematological Recovery After Autologous Bone Marrow Transplantation in Acute Leukemia: Predictive Factors. J. Hematother., 2(1): 75-85, 1993.
 12. Champagne, M. A., Piantadosi, S., Fresia, A., Davis, J., Wiley, J. M.: Identification of Risk Factors for Delayed Bone Marrow Engraftment by Multivariate

- Analysis in Patients With Solid Tumors After Unpurged Autologous Bone Marrow Transplant (ABMT). Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol. 12: A1474, 1993.
13. Chao, N. J., Schriber, J. R., Grimes, K., Long, G.D., Negrin, R. S., Raimodi, C. M., Horning, S. J.: Granulocyte Colony - Stimulating Factor "Mobilized" Peripheral Blood Progenitor Cells Accelerate Granulocyte and Platelet Recovery After High - Dose Chemotherapy. Blood, 81: 2031, 1993.
 14. Civin, C. I., Strauss, L. C., Fackler, M. J., Trischmann, T. M., Wiley, J.M., Loken, M. R.: Positive Stem Cell Selection-Basic Science. Prog. Clin. Biol. Res., 333: 387-401, 1990.
 15. Demetri, G. D., Elias, A. D.: Clinical Applications of Peripheral Blood Progenitor Cells. Advances In Oncology, 10(3): 12-20, 1994.
 16. Demirer, T., Buckner, C. D., Appelbaum, F. R.: Rapid Engraftment After Autologous Transplantation Utilizing Marrow and Recombinant Granulocyte Colony - Stimulating Factor Mobilized Peripheral Blood Stem Cells in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. Bone Marrow Transplantation, 15(6): 915-922, 1995.
 17. Dreger, P., Suttorp, M., Haferlach, T., Löffler, H., Schmitz, H., Schroyens, W.: Allogeneic Granulocyte Colony Stimulating Factor Mobilized Peripheral Blood Progenitor Cells for Treatment of Engraftment Failure After Bone Marrow Transplantation. Blood, 81: 1404, 1993 (Letter).
 18. Duhrsen, U., Villeval, J. L., Boyd, J.: Effects of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor on Hematopoietic Progenitor Cells in Cancer Patients. Blood, 72: 2074-2081, 1988.

19. Elias, A. D., Mazanet, R., Wheeler, C., Anderson, K., Ayash, L., Schwartz, G., Tepler, I.: GM-CSF Potentiated Peripheral Blood Progenitor Cell (PBPC) Collection With or Without Bone Marrow as Hematologic Support of High-Dose Chemotherapy: Two Protocols. *Breast Cancer Research and Treatment*, 20: 25-29, 1991.
20. Elias, A. D., Ayash, L., Anderson, K. C.: Mobilization of Peripheral Blood Progenitor Cells by Chemotherapy and Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor for Hematologic Support After High Dose Intensification for Breast Cancer. *Blood*, 79: 3036, 1992.
21. Fan, Y., Perez, L., Cook, P., Abraham, N.: Sequential Cytokine Support Following Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation May Accelerate White Blood Cell Recovery. *Blood*, 86(10) Suppl.1: 3765, 1995.
22. Faucher, C., Le-Correller, A., G., Blaise, D., Novokovitch, G., Manonni, P., Moatti, J. P., Maraninchi, D.: Comparison of G-CSF Primed Peripheral Blood Progenitor Cells and Bone Marrow Auto Transplantation: Clinical Assessment and Cost-Effectiveness. *Bone Marrow Transplantation*, 14(6): 895-901, 1994.
23. Fina, L., Malgoard, H. V., Robertson, D.: Expression of the CD34 Gene in Vascular Endothelial Cells. *Blood*, 75: 2417-26, 1990.
24. Ganser, A.: Clinical Use of Hematopoietic Growth Factors. *Handbook of Supportive Care in Cancer*, (Eds) Klastersky, J., Schimpff, S. C., Senn, H. J. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker Inc. 1995, 559-579.

25. Gluckman, E., Broxmeyer, H. E., Auerbach, A. D.: Hematopoietic Reconstitution in Patients with Fanconi's Anemia by Means of Umbilical Cord Blood from HLA-Identical Sibling. *N. Engl. J. Med.*, 321: 1174, 1989.
26. Gorin, N. C., Herve, P., Aegerter, P.: Autologous Bone Marrow Transplantation for Acute Leukemia in Remission. *Br. J. Haematol.*, 64: 385, 1986.
27. Gorin, N. C., Lopez, M., Laporta, J. P.: Preparation and Successful Engraftment of Purified CD34+ Bone Marrow Progenitor Cells in Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 85(6): 1647-1654, 1995.
28. Haas, R., Hohaus, S., Ehrhardt, R., Goldschmidt, H., Hunstein, W.: Autografting with Filgrastim-Mobilized Blood Stem Cells in Patients with Chemosensitive Malignancies. Congress Abstract Review. American Society of Hematology 34th Annual Meeting 4-8 December 1992.
29. Holland, H. K., Geller, R.B., Redei, S., Bray, R., Winton, E. F., Connaghan, D. G., O'Toole, K.: Total CD34+ Cell Content and CFU-GEMM are not Good Predictors of Time to Neutrophil Engraftment Following Matched Unrelated Donor Transplantation. *Blood*, 86(10) Suppl. 1: 467, 1995.
30. Holyoake, T. L., Alcorn, M. J.: CD34+ Positive Haemopoietic Cells: Biology and Clinical Applications. *Blood Rev.*, 8(2): 113-124, 1994.
31. Iacone, A., Pierelli, L., Quaglietta, A. M., Nicolucci, A., Manichella, G.: Survival After PBSC Transplantation and Comparison of Engraftment Speed With Autologous and Allogeneic Marrow Transplantation : Results of a Multicenter Study. *Int. J. Artif. Organs*, 16(Suppl.5): 45-50, 1993.

32. Johnsen, H. E., Hansen, P. B., Plesner, T., Jensen, L., Gaarsdal, E., Andersen, H., Hansen, S. W.: Increased Yield of Myeloid Progenitor Cells in Bone Marrow Harvested for Autologous Transplantation by Pretreatment with Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor. *Bone Marrow Transplantation*, 10(3): 229-234, 1992.
33. Juttner, C. A., Fibbe, W. E., Nemunaitis, J., Kanz, L., Gianni, A. M.: Kan Hücre Transplantasyonu: Uluslararası Konsensüs Toplantısı Raporu. *Bone Marrow Transplantation*. 14: 689-693, 1994.
34. Kessinger, A., Armitage, J. O.: The Evolving Role of Autologous Peripheral Stem Cell Transplantation Following High-Dose Therapy for Malignancies. *Blood*, 77: 211-213, 1991.
35. Kessinger, A., Bierman, P. J., Vose, J. M., Armitage, J. O.: High Dose Cyclophosphamide, Carmustine, and Etoposide Followed by Autologous Peripheral Stem Cell Transplantation for Patients with Relapsed Hodgkin's Disease. *Blood*, 77: 2322, 1991.
36. Kessinger, A., Anderson, J., Bishop, M., Vose, J., Bierman, P., Armitage, J. O.: Lymphoma Patients Who Require Platelet Transfusions During Blood Stem Cell Collection Have Slower Platelet Recovery After High-Dose Therapy And Autotransplant. *Blood*, 86(10) Suppl. 1: 397, 1995.
37. Keung, Y. K., Cobos, E., Brideau, A., Park, C. H.: Comparative Study of Post-Transplant GM-CSF Versus G-CSF in Autologous Bone Marrow and/or Peripheral Blood Stem Transplants. *Blood*, 86(10)Suppl.1: 3795, 1995.

38. Langenmayer, I., Weaver, C., Buckner, C. D., Lilleby, K., Appelbaum, F. R., Longin, K., Rowley, S.: Engraftment, of Patients with Lymphoid Malignancies Transplanted with Autologous Bone Marrow, Peripheral Blood Stem Cells or Both. Bone Marrow Transplantation, 15: 241-246, 1995.
39. Leibundgut, K., Rohr, A. V., Brühlhart, K., Hirt, A., Ischi, E., Jeanneret, C., Muff, J.: The Number of Circulating CD34+ Blood cells Predicts the Colony Forming Capacity of Leucapheresis Products in Children. Bone Marrow Transplantation 15: 25-31, 1995.
40. Linch, D. C., Milligan, D. W., Winfield, D. A., Kelsey, S., Johnson, S., Littlewood, T., Smith, G.: G-CSF Significantly Accelerates Neutrophil Recovery After Peripheral Blood Stem Cell Transplantation (PBSCT) in Lymphoma Patients and Shortens the Time in Hospital: Preliminary Results of a Randomised BNLI Trial. Blood, 86(10)Suppl.1: 873, 1995.
41. Masszi, T., Gluckman, E.: Lack of Correlation Between the Number of Donor Nucleated Bone Marrow Cells or CFU-GM Content and the Rapidity of Engraftment in Allogeneic BMT. Acta. Biomed. Ateneo. Parmense., 64(5-6): 221-226, 1993.
42. Mitus, A. J., Antin, J. H., Rutherford, C. J., McGarigle, C., Churchill, W. H., Goldberg, M. A.: Significant Reduction in Homologous Red Cell Transfusion Requirements with the Use of Recombinant Human Erythropoetin in Allogeneic Bone Marrow Transplantation. Blood, 80 (Suppl.1): 330a, 1992.

43. Morse, E.M., Tuck, D., Ascensao, J., Sorba, S., Dainiak, N.: Factors Affecting Recovery After Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 23(2): 89 - 96, 1993.
44. Nash, R., Storb, R., Neiman, P.: Polyclonal Reconstitution of Human Marrow After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood*, 72: 2031, 1988.
45. Os, R. V., Konings, A. W. T., Down, J. D.: Compromising Effect of Low Dose Rate Total Body Irradiation on Allogeneic Bone Marrow Engraftment. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64(6): 761-770, 1993.
46. Perreault, C., Pelletier, M., Landry, D., Gyger, M.: Study of Langerhans Cells After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood*, 63: 807, 1984.
47. Peters, W. P., Rosner, G., Ross, M.: Comparative Effects of GM-CSF and G-CSF on Priming Peripheral Blood Progenitor Cells for Use with Autologous Bone Marrow After High Dose Chemotherapy. *Blood*, 81: 1709-1719, 1993.
48. Rajantie, J., Sale, G. E., Deeg, H. J.: Adverse Effect of Severe Marrow Fibrosis on Hematologic Recovery After Chemoradiotherapy and Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood*, 67: 1693, 1986.
49. Reiffers, J., Marit, G., Cony, M. P., Faberes, C., Foures, C., Ferrer, A. M., Bernard, P.: Autologous Blood Stem Cell Transplantation for Acute Leukemia: Hematological Recovery and Survival. *Haematologica*, 76 (Suppl. 4): 88, 1991.

50. Rowley, S. D., Bensinger, W. I., Gooley, T. A., Buckner, C. D.: Effect of Cell Concentration on Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Cryopreservation. *Blood*, 83(9): 2731-2736, 1994.
51. Russel, N. H., Hunter, A., Rogers, S., Hanley, J., Anderson, O.: Peripheral Blood Stem Cells as an Alternative to Marrow for Allogeneic Transplantation. *Lancet*, 341: 1482, 1993.
52. Schapira, L., Antin, J. H., Ransii, B. J.: Serum Erythropoietin Levels in Patients Receiving Intensive Chemotherapy and Radiotherapy. *Blood*, 76: 2354, 1990.
53. Schriber, J. R., Chao, N. J., Long, G. D., Negrin, R. S., Blume, K. G.: Accelerated Platelet Recovery with G-CSF-Primed PBPCs Following Autologous Bone Marrow Transplantation for Patients With Hodgkin's Disease. Congress Abstract Review: American Society of Hematology, 34th Annual Meeting 1063, 1992.
54. Sheridan, W., Begley, G., Juttner, C., Luca, E., To, L. B., Szer, J., Maher, D.: Effect of Different Doses and Schedules of Filgrastim on Mononuclear Cell and PBPC Collection and Haematopoietic Recovery After High-Dose Chemotherapy and Infusion of Filgrastim-Mobilized PBPCs Without Bone Marrow. Congress Abstract Review. American Society of Hematology, 3th Annual Meeting 1315, 1992.
55. Siena, S., Bregni, M., Brando, B., Ravagnani, F., Bonadonna, G., Gianni, A.M.: Circulation of CD34+ Hematopoietic Stem Cells in the Peripheral Blood of High-Dose Cyclophosphamide-Treated Patients: Enhancement by Intravenous Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor. *Blood*, 74(6): 1905-1914, 1989.

56. Silvestri, F., Banovall, S., Baccorani, M., Preisler, H. D.: The CD34 Hemapoietic Progenitor Cell Associated Antigen: Biology and Clinical Applications. *Haematologica*, 77: 265-72, 1992.
57. Spencer, V, Smith, J., Kulkarni, S., Petruska, P., Brown, G., Dunphy, F., Martin, T.: Does Transplantation of High Number of CD34 Cells Predict More Rapid Engraftment Following High Dose Chemotherapy? *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 11: A347, 1992.
58. Sutherland, D. R., Keating, A.: The CD34 Antigen: Structure, Biology, and Potential Clinical Applications. *J. Hematother.*, 1(2): 115-129, 1992.
59. Tjonnfjord, G. E., Steen, R., Evensen, S. A., Thorsby E., Egeland, T.: Characterization of CD34+ Peripheral Blood Cells From Healthy Adults Mobilization by Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Blood*, 84 (8): 2795 - 2801, 1994.
60. To, L. B., Haylock, D. N., Kimber, R. J., Juttner, C. A.: High Levels of Circulating Haematopoietic Stem Cells in Very Early Remission from Acute Non-Lymphoblastic Leukemia and Their Collection and Cryopreservation. *Br. J. Hematol.*, 58: 399-410, 1984.
61. Wickenhauser, C., Tiele, J., Kummel, T., Fischer, R.: Hematopoietic Stem Cells of the Human. Function and Morphology. *Pathologe*, 16(1): 1-10, 1995.
62. Yeager, A. M., Kaizer, H., Santos, G. W.: Autologous Bone Marrow Transplantation in Patients with Acute Nonlymphocytic Leukemia Using Ex Vivo Marrow Treatment with 4-Hydroperoxycyclophosphamide. *N. Engl. J. Med.*, 315: 141, 1986.

RECEIVED IN THE
LIBRARY OF THE
HISTORICAL SOCIETY OF
MASSACHUSETTS
ON FEBRUARY 1995

Ek-1:

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>SAYFA</u>
Tablo I. Hematopoetik büyüme faktörleri ve hedef hücre serileri.	10
Tablo II. Hematopoetik büyüme faktörlerinin klinik kullanım alanları.	12
Tablo III. Anti-CD34 antikörleri	17
Tablo-IV. Malignitelerde CD34 antijen ekspresyonu.	19
Tablo-V. Yüksek doz kemoterapi ve PKKHT protokolünün aşamaları.	21
Tablo-VI. Olguların Özellikleri.	23
Tablo-VII. Uygulanan hazırlama rejim protokolleri.	26
Tablo-VIII. Engraftman gelişme süresine etkileri araştırılan parametreler.	28
Tablo-IX. Aferez ile toplanan ürüne ait veriler.	31
Tablo-X. Çalışılan parametrelerin lökosit ve trombosit engraftman gelişme süresine etkileri.(I)	35
Tablo-XI: Çalışılan parametrelerin lökosit ve trombosit engraftman gelişme süresine etkileri.(II)	36

Ek -2 :

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1	GATA ve AÜTF KİT Merkezleri PKKHT olgularının lökosit engraftman gelişme olasılıklarının toplam hazard fonksiyon grafiği.	32
Şekil-2.	GATA ve AÜTF KİT Merkezleri PKKHT olgularının trombosit engraftman gelişme olasılıklarının toplam hazard fonksiyon grafiği.	33
Şekil-3	Model-1 için lökosit engraftman gelişme olasılığının lineer regresyon eğrisi.	37
Şekil-4.	Model-1 için trombosit engraftman gelişme olasılığının lineer regresyon eğrisi.	38

Ek-3 :

KULLANILAN KISALTMALAR:

PKKHT: Periferik kan kök hücre transplantasyonu

GVHD: Graft-versus-host hastalığı

OKİT: Otolog kemik iliği transplantasyonu

GATA: Gülhane Askeri Tıp Akademisi

AÜTF: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

KİT: Kemik iliği transplantasyonu

IBMTR: International Bone Marrow Transplant Registry

CD: Cluster Designation

PKKH: Periferik kan kök hücre

G-CSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör

GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

IL: İnterlökin

CFU-GM: Colony forming unit granulocyte-macrophage

BFU-E: Burst forming unit-eritroid

SCF: Stem cell factor

M-CSF: Monosit-koloni uyarıcı faktör

Meg-CSF: Megakaryosit-koloni uyarıcı faktör.

TNF: Tümör nekrosis faktör

ALP: Alkalen fosfataz

LDH: Laktik dehidrogenaz

AIDS: Acquired immune deficiency syndrom

CFU-S: Colony forming unit-spleen

PKC: Protein kinaz-C

EF: Ejeksiyon fraksiyonu

HH: Hodgkin hastalığı

NHL: Non-Hodgkin Lenfoma

AML: Akut myeloblastik lösemi

EGGH Tm: Ekstragonodal germ hücreli tümör

DMSO: Dimetil sülfoksit

FITC: Floresan izotiyosiyonat

TBI: Total vücut ışınlaması

TLI: Total lenfoid ışınlama

MNC: Mononükleer hücre

BMT: Bone marrow transplantation

PBSCT: Peripheral blood stem cell transplantation.