

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

↓
tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KİMERİZM ANALİZİ İÇİN SHORT TANDEM REPEAT PCR
VE QUANTİTATİVE REAL TIME PCR YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

FİGEN ABATAY

**DANIŞMAN
PROF. DR. FATMA SAVRAN OĞUZ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

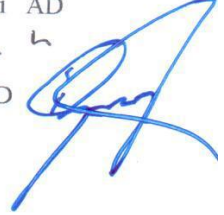
İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Figen Abatay tarafından hazırlanan Kimerizm Analizi İçin Short Tandem Repeat-PCR ve Quantitative-Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

11 / 06 / 2015

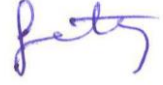
Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	
2.Prof. Dr. Filiz AYDIN İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	
3.Prof. Dr. Sevgi KALAYOĞLU BEŞİŞİK İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Hematoloji Bilim Dalı	
4.Prof. Dr. İlhan (ERALTAN) YAYLIM İstanbul Tıp Fakültesi DETAE, Moleküler Tıp AD	
5.Yard. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Trakya Üni. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Figen Abatay



İTHAF

İlkokuldan bugüne değin yoluma ışıık tutan tüm değerli hocalarıma ve aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren tüm deneyim ve bilgilerini paylaşan, özverisini örnek aldığım, hatalarımı hoşgörü ve sabrı ile karşılayıp yol gösterici olan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Filiz Aydın'a,

Her türlü problemimle ilk günden beri yakından ilgilenen, her türlü soruma ve sorunuma cevap aramamda yardımcı olan, ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden faydalandığım benim için çok değerli olan hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz'a,

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında bilgi ve birikimini paylaşmaktan çekinmeyen, klinik bilgiler konusunda yolumu aydınlatan, tüm sorularıma net yanıtlar aldığım ve desteğinden dolayı kendilerine çok şey borçlu olduğum İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Sevgi Kalayoğlu Beşışık'a,

Anabilim dalında başladığım ilk günden itibaren ilgisini, desteğini, yardımını, birikimini benle paylaşan, laboratuvar konusundaki bilgilerini akıl hocam olarak benden esirgemeyen Sayın MSc. Biyolog Yeliz Öğret'e,

Bu çalışmada hasta bilgilerinde ve takiplerinde hiçbir vakit kaybına uğramadan, anında geri dönüşlerle yardım aldığım, birlikte çalışmaktan dolayı çok mutlu olduğum İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık öğrencisi Dr. Metban Güzel'e,

İstatistik hesaplamalarımı yapmama yardımcı olan sevgili arkadaşım Hande Şenol'a,

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığımdan beri problemlerime aileden biriymişim gibi yaklaşan ve çoğu zaman abladan öte gördüğüm Doç. Dr. Çiğdem Kekik Çınar, Biyolog Pelin Gürbüz, MSc. Biyolog Sebahat Usta, Dr. Sonay Temurhan, Lab. Tek. Banu Benligölge, Lab. Tek. Nursel Yavuz, Lab. Tek. Ayşe Sinaz'a,

Birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım Biyolog Başak Polat, Biyolog Sibel Avşar, Biyolog Binnaz Özcan ve tüm personele,

İstanbul Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda eğitim alan tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Üç silahşör lakabının iki üyesi sevgili arkadaşlarım Ayşe Erol ve Demet Kıvanç'a,

Şimdiye kadar bilgilerinden ve birikimlerinden faydalandığım tüm değerli hocalarıma,

Beni hem maddi hem de manevi olarak destekleyen her şeyi borçlu olduğum, sahip oldukları enerji ile yolumu aydınlatıp üzüntümde tüm enerjileriyle her şeyi unutturabilen hayattaki en büyük şansım: Aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40818

İÇİNDEKİLER

KİMERİZM ANALİZİ İÇİN SHORT TANDEM REPEAT PCR VE QUANTİTATİVE REAL TİME PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	İ
TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HLA GEN SİSTEMİNİN ÖZELLİKLERİ ve ALLOJENİK NAKİLLERDEKİ ROLÜ.....	3
2.1.1. HLA Genlerinin ve Antijenlerinin Özellikleri	5
2.1.1.1. HLA Sınıf-I Genleri ve Antijenleri	5
2.1.1.2. HLA Sınıf-II Genleri ve Antijenleri.....	6
2.1.1.3. HLA Sınıf-III Genleri	7
2.1.1.4. HLA ve Transplant İmmunolojisindeki Yeri	7
2.2. KAN KÖK HÜCRE NAKLİ ve ÖZELLİKLERİ.....	8
2.2.1. Kan Kök Hücreleri	8
2.2.2. Kan Kök Hücre Nakli Özellikleri ve Tarihçesi.....	9
2.2.3. Kök Hücre Kaynağının Elde Edildiği Kişiye Göre Kan Kök Hücre Nakli	12
2.2.3.1. Otolog Kan Kök Hücre Nakli	12
2.2.3.2. Singenik Kan Kök Hücre Nakli	12
2.2.3.3. Allojeneik Kan Kök Hücre Nakli.....	12
2.2.4. Kök Hücre Kaynağına Göre Kan Kök Hücre Nakli	13
2.2.4.1. Kemik İliği	13
2.2.4.2. Periferel Kan Kök Hücresi	14

2.2.4.3. Kordon Kanı Kök Hücresi	15
2.2.5. Kan Kök Hücre Nakil Seçiminin Algoritması	16
2.3. KAN KÖK HÜCRE NAKLİ ÖNCESİ HAZIRLAMA REJİMİ	17
2.3.1. Hazırlama Rejiminde Kullanılan İmmünyosupresyon Seçimi.....	17
2.3.1.1. Yalnızca Kemoterapi Uygulaması	17
2.3.1.2. Tüm Beden Işınlaması (Total Body Irradiation – TBI)	18
2.4. ALLOJENEİK KAN KÖK HÜCRE NAKİLLERİNDE MYELOABLATİF ve YOĞUNLUĞU AZALTILMIŞ DOZDA HAZIRLAMA REJİMLERİ.....	18
2.5. GRAFT VERSUS HOST HASTALIĞINA KARŞI KORUMA.....	18
2.6. KAN KÖK HÜCRE NAKLİ SONRASINDA GÖRÜLEN KOMPLİKASYONLAR.....	19
2.6.1. Engraftman Öncesi Periyot	20
2.6.2. Erken Engraftman Periyodu.....	20
2.6.3. Geç Engraftman Periyodu	21
2.7. GRAFT VERSUS HOST HASTALIĞI	21
2.7.1. Akut Graft Versus Host Hastalığı	21
2.7.1.1. Akut GVHH Derecelendirme Kriterleri.....	26
2.7.2. Kronik Graft Versus Host Hastalığı.....	27
2.8. ALLOJENİK KAN KÖK HÜCRE NAKLİNDEN SONRA KİMERİZM TAKİBİ.....	28
2.8.1. Kimerizm Nedir?.....	28
2.8.2. Kimerizm Tipleri Nelerdir?	28
2.8.3. Kimerizm Takibine Hangi Zamanlarda Bakılmalıdır?	29
2.8.4. Karışık Kimerizm ve Donör Lenfosit İnfüzyon.....	29
2.8.5. Kimerizm Takibinde Kullanılan Yöntemler	31
2.8.5.1. Sitogenetik Kimerizm Takibi	31
2.8.5.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ile Kimerizm Takibi.....	31
2.8.5.3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP – Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) ile Kimerizm Takibi.....	32
2.8.5.4. Variable Number of Tandem Repeats (VNTR – Değişken Sayıda Art Arda Tekrarlar) ile Kimerizm Takibi	32
2.8.5.5. Short Tandem Repeats (Kısa Ardışık Tekrarlar) ile Kimerizm Takibi.....	33

2.8.5.6. Quantitative Real Time Polymerase Chain (Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR) ile Kimerizm Takibi	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. ÇALIŞMADAKİ HASTALARIN ÖZELLİKLERİ	37
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZ ve GEREÇLER	37
3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASALLAR VE PRİMERLER	38
3.4. ÇALIŞMADAKİ YÖNTEMLER	39
3.4.1. DNA İzolasyonu	39
3.4.2. STR-PZR Kimerizm Yöntemi	40
3.4.2.1. STR - PZR Kimerizm Protokolü:	40
3.4.3. Q-RT-PZR Kimerizm Yöntemi	41
3.4.3.1. Q-RT-PZR Kimerizm Protokolü:	41
3.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN STR-PZR ve Q-RT PZR DEĞERLENDİRMESİ	45
3.5.1. STR-PZR Değerlendirilmesi	45
3.5.2. Q-RT-PZR Değerlendirilmesi	46
3.6. İstatistiksel Analiz	48
4. BULGULAR	49
4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Temel Özellikleri	49
4.2. Allojeneik Kan Kök Hücre Nakline İlişkin Genel Bulgular	50
4.3. GVHH Gelişimine Ait Bulgular	58
4.4. Sağ Kalıma Ait Bulgular	61
4.5. Kimerizm Analizi İçin Kullanılan Yöntemlerden Elde Edilen Bulgular	62
4.6. Korelasyon Analizleri	64
5. TARTIŞMA	67
6. KAYNAKLAR	75
FORMLAR	83
6.1.1.1. GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRME VE OLUR (RIZA) FORMU	83
6.1.1.2. GÖNÜLLÜ ONAY FORMU	86
ETİK KURUL KARARI	87
ÖZGEÇMİŞ	88

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2- 1:KKHN Tedavisi Uygulanan Hastalıklar ve Uygulanabilir KKHN Türleri.....	9
Tablo 2- 2: Tek Başına Kemoterapi Uygulamasında Hazırlama Rejiminde Kullanılan Kemoterapötikler	17
Tablo 2- 3: GVHH Profilaksisinde Kullanılan İlaçlar ve Yöntemler	18
Tablo 2- 4: aGVHH Riskini Etkileyen Hasta, Verici ve Graft Özellikleri	22
Tablo 2- 5: aGVHH Derecelendirme ve Kriterleri	26
Tablo 3- 1: STR-PZR Yönteminde Kullanılan Markerların Özellikleri.....	45
Tablo 3- 2: Q-RT-PZR Yönteminde Kullanılan Markerlara Ait Bilgiler	47
Tablo 4- 1: Verici Seçimine Göre Nakiller.....	51
Tablo 4- 2: Hastaların Nakil Sonrası + 28. Gün Kimerizm Değerlendirilmeleri ve Sağ/Ex Durumları	52
Tablo 4- 3: Hasta, Verici ve Nakil Hakkında Genel Bulgular.....	54
Tablo 4- 4: Hazırlık Rejimine Göre Hastalar.....	54
Tablo 4- 5: HLA Uyumuna Göre Hastalar	55
Tablo 4- 6: HLA Uyumuna Göre Engraftman Gelişimi	55
Tablo 4- 7: Enfeksiyon Gelişimi.....	56
Tablo 4- 8: Hasta/Verici Kan Grupları Uyum, Alkol ve Sigara Alışkanlıkları	56
Tablo 4- 9: Erken/Geç Nötrofil ve Platelet Engraftman Başarıları	57
Tablo 4- 10: aGVHH Grade.....	58
Tablo 4- 11: aGVHH - Olaysız Sağ Kalım Etkisi	59
Tablo 4- 12: cGVHH Bilgileri	60
Tablo 4- 13: Ex-Sağ Hastalara Ait Bilgiler	61
Tablo 4- 14: STR-PZR ve Q-RT-PZR Yöntemlerine Göre +28. Gün Kimerizm Durumları.....	62
Tablo 4- 15: Q-RT-PZR Kimerizm Metodu Sonucundan Elde Edilen Bulgular	62
Tablo 4- 16: STR-PZR Kimerizm Metodu Sonucundan Elde Edilen Bulgular	63
Tablo 4- 17: Tüm Hastalar için Korelasyon Analizi.....	64
Tablo 4- 18: Sağ Hastalarda Korelasyon Analizi	65

Tablo 4- 19: Kappa Analizi	66
----------------------------------	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2- 1: MHC Gen Bölgesi.....	3
Şekil 2- 2: HLA Nomenklatür	4
Şekil 2- 3: Sınıf I ve Sınıf II Domainleri	7
Şekil 2- 4: Hücrelerin Kaynaklandığı Tabakalar	8
Şekil 2- 5 : KKHN Grupları.....	11
Şekil 2- 6: AKKHN Sonrasında Artan KK Gelişen Hastalarda Siklosporin A Kullanımına Göre Tedavi Seçimi ve Kimerizm Takibinde Kullanılan Yol	30
Şekil 4- 1: Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grubunun Tanılarına Göre Dağılımı.....	49
Şekil 4- 2: Hasta ve Vericilerin Cinsiyetlerine Göre Dağılımı	50
Şekil 4- 3: Cinsiyet Uyumu Açısından Nakiller	50
Şekil 4- 4: STR-PZR İnformatif Marker Sıklıkları.....	51
Şekil 4- 5: Q-RT-PZR İnformatif Marker Sıklıkları.....	52
Şekil 4- 6: aGVHH Gelişen Hastalar	58
Şekil 4- 7: cGVHH Gelişen Hastalar	59
Şekil 4- 8: Hastalara Ait Sağ Kalım.....	61

KISALTMALAR LİSTESİ

- AKKHN:** Allojeneik kan kök hücre nakli
- HLA:** İnsan lökosit antijen
- GVHH:** Graft versus host hastlığı
- STR-PZR:** Kısa ardışık tekrarlı (short tandem repeats)-polimeraz zincir reaksiyonu
- SNP:** Tek nükleotid polimorfizmi
- Q-RT-PZR:** Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
- DLI:** Donör lenfosit infüzyonu
- MHC:** Büyük doku uygunluk kompleksi
- HU-1:** Human-1
- LA:** Lökosit Antijen
- MLC:** Karışık lenfosit kültürü
- ABC:** ATP binding cassette
- KKHN:** Kan kök hücre nakli
- Otolog KKHN:** Otolog kan kök hücre nakli
- Allojeneik KKHN:** Allojeneik kan kök hücre nakli
- MM:** Multiple myeloma
- AA:** Aplastik anemi
- FA:** Fanconi anemisi
- MDS:** Myelodisplastik sendrom
- HL:** Hodgkin lenfoma
- HDL:** Hodgkin dışı lenfoma
- MPN:** Myeloproliferatif neoplazmlar
- KİT:** Kemik iliği transplantasyonu
- SCID:** Ağır kombine immün yetmezlik
- OKKHN:** Otolog kan kök hücre nakli
- SKKHN:** Singenik kan kök hücre nakli
- GVL:** Graft versus lösemi
- aGVHH:** Akut graft versus host hastalığı

cGVHH: Kronik graft versus host hastalığı
G-CSF: Granülosit koloni stimüle edici faktör
CXCR4: Kemokin reseptörü 4
BU: Busulfan
MEL: Melfelan
CYC: Siklofosfamid
BCNU: Karmustin
CCNU: Lomustin
ARA-C: Sitozin arabinosid
TBI: Tüm beden ışınlaması
ATG: Anti-timosit globulin
ASH: Antijen sunan hücre
KML: Kronik myeloid lösemi
RO: Risk oranı
RR: Rölatif Risk
TRR: Tahmini rölatif risk
GİS: Gastrointestinal sistem
NK: Natural killer
TK: Tam kimerizm
KK: Karışık kimerizm
DNA: Deoksiribonükleik asit
AML: Akut myeloid lösemi
ALL: Akut lenfoblastik lösemi
Cyc A: Siklosporin A
CMV: Sitomegalovirus
EBV: Epstein bar virusu
VNTR: Değişken sayılı art arda tekrarlar
FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon
RFLP: Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi
dNTP: Deoksinükleotid trifosfat

CT: Threshold cycle (eşik değeri döngüsü)

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer (Floresan dirençli enerji transferi)

T_m: Erime Sıcaklığı

EFS: Event-free survival (Olaysız sağ kalım)

ÖZET

Abatay F. Kimerizm analizi için Short Tandem Repeat-PCR ve Kantitatif- Real Time PCR yöntemlerinin karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2015.

Amaç: Allojeneik Kan Kök Hücre Nakli (AKKHN) sonrası kimerizm durumunu, Short Tandem Repeat-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (STR-PZR) ve Kantitatif Gerçek Zamanlı-PZR (Q-RT-PZR) kimerizm yöntemlerinin kantitatif açıdan incelenmesidir.

Metod: Kasım 2013- Şubat 2015 tarihleri arasında AKKHN olan 39 erişkin hasta ile vericileri çalışmaya dahil edildi. Periferal kandan elde edilen DNA kullanarak hastanın nakil sonrasına ait kimerizm durumu STR-PZR ve Q-RT-PZR yöntemleri ile karşılaştırılması yapıldı. İki yöntem sonucundaki analizler; klinik veriler ile değerlendirildi.

Bulgular: AKKHN olan hastalar ağırlıkla AML (%38,5 15/39) ve ALL (%35,9 14/39) tanısı almış olan hastalardır. aGVHH ile olaysız sağ kalım arasında istatistiksel olarak ileri derecede bir anlamlılık bulunmuştur ($p=0,0001$). STR-PZR ile 36 hastada (%92,3) tam kimerizm, 3 hastada (%7,7) karışık kimerizm, buna karşılık Q-RT-PZR ile 29 hastada (%74,4) tam kimerizm ve 10 hastada (%25,6) karışık kimerizm saptanmıştır. Tüm hastalarda nötrofil ile platelet engraftman günleri arasında pozitif yönlü bir korelasyon ($p=0,017$), verilen CD34+ hücre miktarı ile nötrofil engraftman günleri arasında negatif yönlü bir korelasyon ($p=0,019$) tespit edildi. STR-PZR ile Q-RT-PZR kimerizm yöntemleri uyumlu olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Q-RT-PZR'nin, STR-PZR yöntemine göre daha hızlı, hassas sonuç veren bir yöntem olması ile birlikte tam kimerik vakalarda bile hasta ve verici hücre yüzdelerinin saptanmasının uzun takipli kimerizm izlemi için oldukça yararlı olabileceğini öngörmekteyiz. Bu anlamda kimerizm analizinin erken nüksün saptanmasında yetersiz kalan STR-PZR'ye göre tedavi seçiminde yol gösterici olabileceğini öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kimerizm, allojeneik kan kök hücre nakli, STR-PZR, kantitatif gerçek zamanlı PZR, sağ kalım

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40818

ABSTRACT

Abatay F. Comparison of Short Tandem Repeat-PCR and Quantitative- Real Time PCR methods for chimerism analysis. İstanbul University, Institute of Health Science, Medical Biology Department. Master Thesis. İstanbul. 2015.

Object: The main aim of this project is the assesment of Short Tandem Repeat-PCR (STR-PCR) and Quantitative Real Time-PCR(Q-RT-PCR) chimerism methods for quantitative intention after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Method: 39 patients who were diagnosed hematological disease and underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation were added to the study from November 2013 to February 2015. The DNA that was extracted from peripheral blood were used to compare chimerism analysis with STR-PCR and Q-RT-PCR. The results were assembled into two groups: Complete Chimerism (CC) and Mixed Chimerism (MC). We examined the results of methods with the clinical data.

Findings: The most of patients received acute leukemia and other hematological diagnosis (38,5% AML, 35,9% ALL, 5,1% CML, 5,1% CLL, 5,1% Lymphoma, 5,1% AA, 2,6% MM and 2,6% MDS). We determined 36 CC (92,3%) and 3 MC (7,7%) by STR-PCR, 29 CC (74,4%) and 10 MC (25,6%) by Q-RT-PCR. We determined statistically significance between aGVHD and EFS ($p=0,0001$). Neutrophil and platelet engraftment positively correlated ($p=0,017$) and CD34+ cells negatively correlated with neutrophil engraftment ($p=0,019$). It is found that STR-PCR and Q-RT-PCR chimerism methods compatible and feasible.

Conclusion: We suggested that Q-RT-PCR chimerism analysis is more rapid, sensitive than STR-PCR also it must be advantageous for the longtime-monitoring of CC cases to follow-up patient/donor cell percentages. Q-RT-PCR chimerism analysis may provide leading method for chosing treatment for early recurrence which is failed down for detecting the relapse with STR-PCR.

Key words: Chimerism, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, STR-PCR, quantitative real time PCR, survival

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 40818.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde, hem pediatrik hem de erişkin hastalarda gözlemlenen, malign ve malign olmayan hematolojik rahatsızlıkların tedavisinde allojeneik kan kök hücre nakli (AKKHN) sıklıkla kullanılan bir tedavi seçeneğidir (1). AKKHN’nde insan lökosit antijen (Human Leukocyte Antigens; HLA) grubu yüksek oranda uygun akraba içi veya akraba dışı vericiden elde edilen kök hücreler kullanılabilirken kök hücre kaynağı olarak kemik iliği, çevre kanı veya kordon kanı uygulanabilmektedir.

Allojeneik kan kök hücre nakli öncesi hastanın HLA doku grubuyla uyumlu akraba içi doku grubu taraması yapılır ve eğer HLA uyumlu bir akraba bulunamadıysa akraba dışı taramaya başvurulur. Allojeneik nakillerde, öncelikle 8/8, 10/10 gibi tam uyumlu, tam uyumlu yoksa 7/8, 9/10 gibi tam uyuma yakın ya da yarı yarıya doku uyumlu (haploidentik) vericiden alınan kök hücreler kullanılabilir. Kordon kanı nakillerinde, bankalardaki mevcut kordon kanlarının hücre miktarı, kordon kanı toplanma yılı ile birlikte HLA uyumu değerlendirilmektedir. Kordon kanı nakillerinde HLA uyumu, 6/6, 5/6 ve 4/6 düzeyinde olabilmektedir.

Allojeneik kan kök hücre naklinde, öncelikle; hastanın kemik iliği, kemoterapi ve bazen radyoterapi ilavesi ile bağışıklık sistemi baskılanıp hastanın kan üretim sistemi (hematopoez) durdurulur. AKKHN öncesi, hematopoezi durdurmak amacıyla uygulanan radyoterapi ve kemoterapi tedavisine hazırlık rejimi adı verilir. Hazırlık rejiminin uygulanmasının asıl amacı, doku grubu uyumlu vericiden alınan kök hücrelerin, hastanın kemik iliğine yerleşip çoğalarak hastalığın düzelmesini sağlamaktır.

Allojeneik kan kök hücre nakli sonrası başarısızlığın en önemli yan etkileri; graft reddi, nakil sonrası gelişen hastalığın nüksü ve sağlıklı vericiden gelen hücrelerin, hasta doku ve organlarını yabancı olarak algılaması sonucu; başta cilt, karaciğer ve gastrointestinal sistemde gelişip ciddi bir tabloyla kendini gösteren Graft Versus Host Hastalığı (GVHH)’dır.

Nakil sonrası oluşan engraftman kaynağının hasta ya da verici kaynaklı olup olmadığı saptamak için kimerizm adı verilen izlem metodu ile takibi gereklidir. Kimerizm analizinin amacı; nakil sonrası oluşan graft reddi, hastalık nüksünü tespit etmeye ve GVHH gibi yan etkileri saptayıp tedavi uygulanabilirliğine yardımcı olmaktır. Kimerizm analizi sonucunun engraftman açısından verici kaynaklı olarak

tespit edilmesi (Tam Kimerik), seçilen hazırlık rejimi yoğunluğu, vericiden alınıp hastaya nakil olan kök hücre miktarı ve hastaya ait hücrelerin zamanla azalmasıyla ilgilidir.

Floresan bazlı kısa tekrarlı dizilere dayalı polimeraz zincir reaksiyon kimerizm metodu (Short Tandem Repeats-PCR; STR-PZR), günümüze kadar uygulanan altın standart semi-kantitatif yöntem haline gelmiştir ve bu semi-kantitatif yöntem hastalığın nüksü için bilgilendiricidir (2). STR-PZR metodu, hasta ve verici hücreleri arasındaki ayırımın kimerizm analizi için gerekli duyulduğu durumlarda kullanılır ve % 0,1-5 ayırım gücü hassasiyetine sahiptir (3,4). Alizadeh ve ark. (2) tarafından yayınlanmış olan çalışmada tek nükleotid polimorfizmine (Single Nükleotid Polimorfizmi; SNP) dayanan kantitatif gerçek zamanlı-PZR (Quantitative-Real Time-PCR; Q-RT-PZR) yönteminin, STR-PZR'ye göre;

- nakil sonrasında engraftman başarısı, yani hasta/verici hücre dengesinin değerlendirilmesi,
- gerekiyorsa donör lenfosit infüzyon (Donor Lymphocyte Infusion; DLI) tedavi seçeneğinin planlanması,
- daha kısa süre içerisinde daha hızlı, daha hassas ve kesin sonuç elde etmek için

en iyi yöntem olduğu gösterilmiştir.

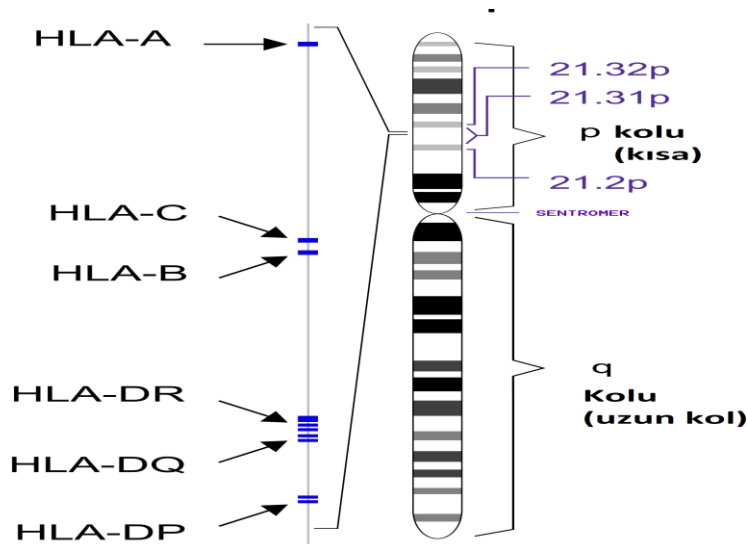
Bu çalışma, hematolojik malignite tanısı alıp allojeneik kan kök hücre nakli olan ve nakil sonrası +28.günde STR-PZR kimerizm analizleri yapılan hastaların Q-RT-PZR analizi ile kimerizm sonuçlarının incelenmesi, sağ kalım, olaysız sağ kalım, GVHH, engraftman gelişimi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Allojeneik Kemik İliği Ünitesi'nde Kasım 2013- Şubat 2015 tarihleri arasında AKKHN gerçekleşmiş, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda kimerizm izlemi yapılan ve nakil takibi sırasında hasta ve vericiye ait elde edilen tüm veriler dahil edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HLA GEN SİSTEMİNİN ÖZELLİKLERİ ve ALLOJENİK NAKİLLERDEKİ ROLÜ

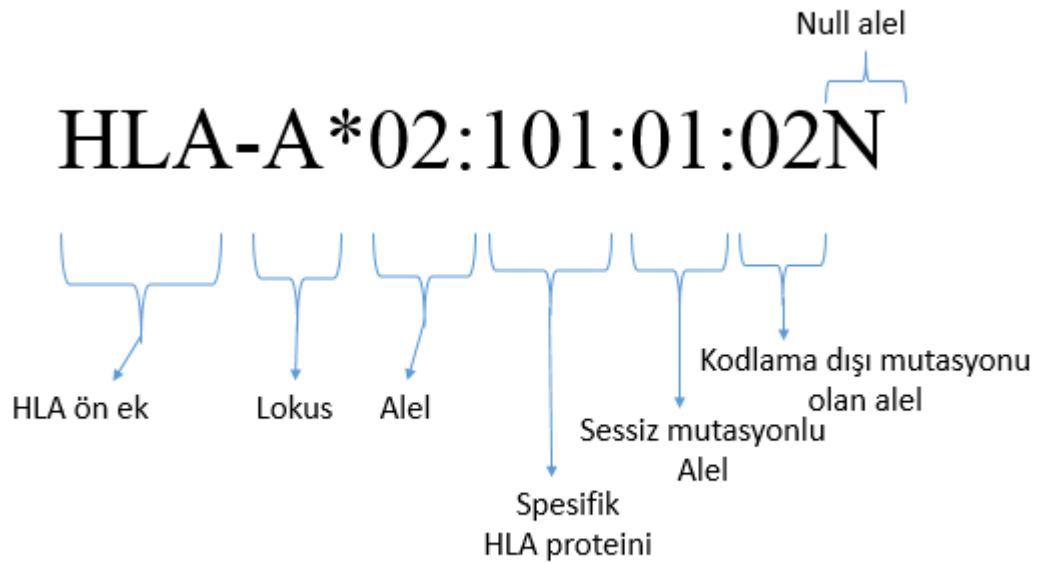
İlk kez 1937 yılında farelerdeki transplantasyon çalışmalarıyla Peter A. Gorer ve George D. Snell tarafından keşfedilen, 200'den fazla gen içeren 6p21.31 pozisyonunda lokalize olan Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex; MHC) bir çok immunolojik olayda yer almaktadır (5) (Şekil 2-1). Bu genlerin ürünleri olan moleküller, 1958 yılında Jean Dausset tarafından tanımlanmış, birden fazla kan transfüzyonu gerçekleştirilmiş kişilerin ve birden çok doğum yapmış kadınların serumlarında, lökositlere karşı oluşmuş antikorların varlığı gösterilmiştir (6). MHC'de yer alan en önemli genlerin esas fonksiyonu antijenik peptid sunumunu gerçekleştirerek immun cevap oluşumunu sağlayan İnsan Lökosit Antijenleri (Human Leukocyte Antigen; HLA), ilk olarak Dausset tarafından Human-1 (HU-1) ile Bodmer ve Payne tarafından Lökosit Antijen (Leukocyte Antigen; LA) olarak ortaya atılan terimlerin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır (7). HLA genleri kısaca, vücutta organizmanın kendine ait olan ile olmayanı ayırt eden sistem olarak tanımlanmakta ve hücrelere giren patojen ya da yabancı maddeleri tanıyarak, organizmanın savunma hücreleri aracılığıyla bu maddelere saldırmasında etkili olmaktadır.



Şekil 2- 1: MHC Gen Bölgesi

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HLA.svg>

İnsan lökosit antijen geni, genetik diğer birimlerdeki gibi blok halinde kalıtılır, yani; bireylerin HLA genotipleri parental olarak kalıtılan iki haplotip kombinasyonundan oluşmaktadır. Bu nedenle HLA gen sistemi, oldukça farklı polimorfik bir yapı göstermektedir. Birçok bireyin HLA lokusundaki alelleri heterozigot olup parental HLA haplotipleri tarafından kodlanan HLA antijenleri kodominant kalıtım gösterirler ve bu nedenle HLA bakımından heterozigot olan bireyler, her lokustaki genler tarafından kodlanan iki farklı antijene sahip olmaktadır. HLA genlerinin polimorfik yapısı kan kök hücre nakillerinde, hasta ve verici doku uyumu açısından büyük önem arz etmektedir (8). Transplantasyon açısından HLA antijenleri değerlendirildiğinde, polimorfik olan bu genetik birimlerin tiplendirilmesi potansiyel vericilerin bulunabilmesi için oldukça önem taşımaktadır. Çok çeşitlilik gösteren HLA biriminin adlandırılıp ayırt edilmesi için Şekil 2-2'deki nomenklatür kullanılmaktadır.



Şekil 2- 2: HLA Nomenklatür

Belli lokuslardaki polimorfizmin rastgele olmayan şekilde iki ya da daha fazla alellerinin birliktelikleri onların “bağlantı eşitsizliği”ni meydana getirir. Kan kök hücre nakillerinde HLA uyumlu akraba dışı verici bulabilmek için bağlantı eşitsizliğinin güçlü olması gerekir. Yani, diğer bir deyişle; hastanın HLA haplotipleri arasındaki bağlantı eşitsizliği güçlü değilse, uygun verici bulma olasılığı azalır. Diğer bir taraftan, kan kök hücre nakillerinde akraba içi haplotiplerine bakıldığında bazı aile üyelerinde haplotipler

aynı, bazı akrabalarda ise farklı haplotiplerin kalıtıldığı gözlenmektedir. Hastanın HLA haplotipleri arasındaki bağlantı eşitsizliği her ne kadar düşük olsa da aile içi üyelerde aynı tip haplotip geçişi olduğundan nakil olma şansı bulunmaktadır. Yani, HLA uyumlu akraba içi ve kardeş adaylardan AKKHN yapılabilirlik şansı daha yüksektir. GVHH görülme sıklığı bakımından, akraba dışı vericiden gerçekleştirilen nakillerle, HLA uyumlu kardeşten yapılan nakiller karşılaştırıldığında da, HLA uyumlu kardeş vericiden yapılan nakillerde bu sıklığın daha düşük olduğu gözlenmiştir (9).

2.1.1. HLA Genlerinin ve Antijenlerinin Özellikleri

2.1.1.1. HLA Sınıf-I Genleri ve Antijenleri

İnsan lökosit antijenleri, tüm çekirdekli hücrelerin membranında taşınmakta olup MHC'nin telomerik ucunda yer almaktadırlar. CD8⁺ T lenfositler ile köprü oluşturarak MHC sınırlı immun yanıtın ortaya çıkmasını sağlarlar. 15. kromozomda kodlanan ve tüm bireylerin Sınıf I'inde "beta-2 mikroglobulin" adı verilen beta hafif zincirli bir alt birim mevcuttur. Bunun dışında 6. Kromozom üzerinde MHC bölgesinde kodlanan alfa ağır zinciri yer almaktadır. Ağır zincirleri kodlayan Sınıf I genleri; işlevsel olarak HLA-A, -B, -C, -E, -F ve -G izoformlarını oluşturmaktadırlar. Bu işlevsel izoformlardan HLA-A, -B ve -C, Klasik Sınıf I antijenlerini sentezletir. Her 3 lokustaki genler yüksek derecede polimorfik özellik gösterir ve bu nedenle çok fazla sayıda dizi içermektedirler. HLA-B lokusu en polimorfik lokus olma özelliğini gösterir. HLA-E, -F ve -G lokusları da Klasik Olmayan Sınıf I antijenlerini sentezlemekte olup Natural Killer (NK) hücreler ile ilişkilendirilirler. Ayrıca bugüne değin immunolojik özelliği saptanamayan HLA-H, -J, -K ve -L olarak adlandırılan pseudo genler yer almaktadır. Tüm bireylerde, klasik ve klasik olmayan tüm Sınıf I genleri bulunurken bazı bireylerde ise HLA-H pseudo gen bölgesinde delesyonlar saptanmıştır.

HLA-A, -B ve -C Sınıf I genleri tarafından kodlanan HLA Sınıf I molekülünün alfa ağır zinciri 340 civarında aminoasit uzunluğuna sahip olup Alfa-1, Alfa-2 ve Alfa-3 olmak üzere üç adet ekstraselüler domain içermektedir. Alfa ağır zinciri 340 civarında aminoasit uzunluğuna sahiptir. Hafif zincir olan beta-2 mikroglobulin; non kovalent olarak ağır zincire bağlanır. Beta-2 mikroglobulin geni 15. kromozomda HLA geninden uzakta lokalize olmuştur. HLA Sınıf I antijenleri yapısal olarak iki alfa helikal bölge ve antiparalel yapıdaki beta kıvrımlarından oluşmuştur, bu kıvrımlar disülfid bağları sayesinde gerçekleşir (10). Sınıf I antijenlerinin distal aminoucunda Alfa 1 ve Alfa 2

domainleri bulunur. Oldukça polimorfik olan Alfa 1 ve Alfa 2 domainleri peptid fragmanlarının bağlanmasını kolaylaştırıp bağlanmış olan peptidlerin T hücrelere sunumunu sağlarlar.

HLA Sınıf I moleküllerinin esas görevi, hücre içerisindeki peptidleri hücre yüzeyine taşımaktır. Örneğin viral bir enfeksiyon sırasında sentezlenmiş viral bir peptidin hücre yüzeyine taşınmasını, yani bireye ait olmayan yabancı molekülün sitotoksik T lenfositler (CD8+ T lenfositler) tarafından öldürülmesine giden süreci başlatmayı sağlamaktadır.

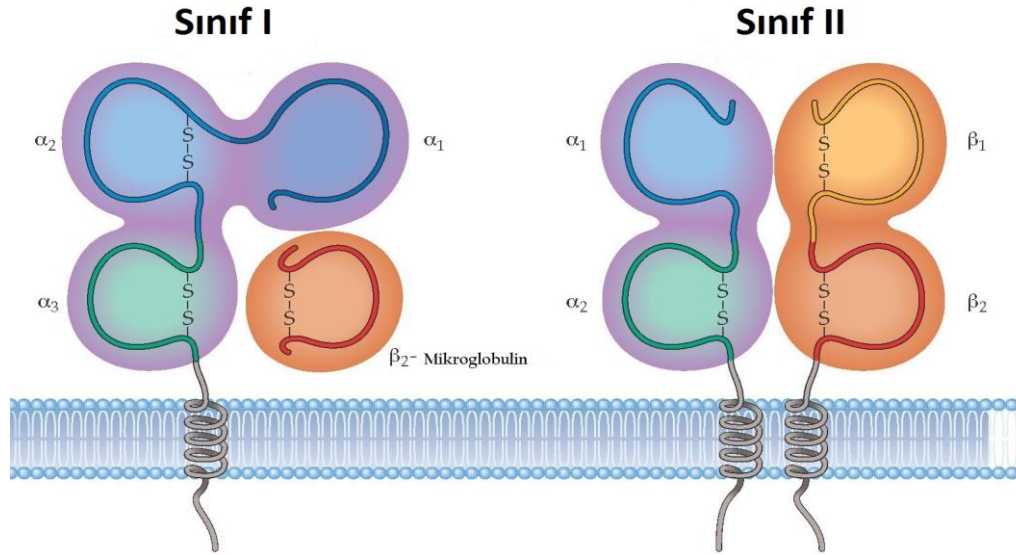
2.1.1.2. HLA Sınıf-II Genleri ve Antijenleri

HLA Sınıf II, dokuz lokustan oluşup sentromere yakın lokalize olmuşlardır. Hücre içine yabancı bir madde girdiğinde yabancı madde antijen sunan hücre tarafından alınıp işlenir. MHC Sınıf II molekülleri ile T lenfositlere sunularak immun yanıtın ortaya çıkmasını sağlarlar. HLA Sınıf II'de; HLA-DRA, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA, -DQB, DPA ve DPB lokusları yanı sıra transplantasyonla ilişkili LMP1, LMP2, TAP1 ve TAP2 gibi antijenlerin işlenmesinde rol alan çeşitli pseudogenler yer almaktadır. HLA genleri tarafından kodlanan HLA Sınıf II antijenleri, Sınıf I antijenlerin aksine bazı hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadırlar. Bunlar antijen sunan hücreler olup; monositler, B lenfositler, Langerhans ve Dendritik hücreler bu grup hücrelere örnektir. Bu bölgedeki HLA genleri 5 ayrı izoform oluşturmaktadır, bunlar; HLA-DM, -DO, -DP, -DQ ve -DR'dir. Her birinin hem alfa hem de beta zincirleri bulunmaktadır. HLA Sınıf II antijen ve genlerinin hepsinde D harfi bulunmasının sebebi; serolojik yöntemin dışında hücre kültürüne dayanan bir yöntem olan Karışık Lenfosit Kültürü (Mixed Lymphocyte Culture; MLC) reaksiyonu ile HLA-A, -B ve -C'den sonra gösterilen antijen olması ve dolayısıyla alfabetik düzenlemeye göre HLA-D olarak adlandırılmasından kaynaklanmaktadır.

HLA Sınıf II antijenleri polimorfik beta ve alfa zincirlerinin non kovalent bağlandığı bölgeler içermektedirler (11). Sınıf II HLA- DR, -DQ ve -DP antijenlerinde beta zinciri, yine DRB, DQB ve DPB genleri tarafından kodlanır. Polimorfik DR beta zincirleri dört farklı DRB geni (DRB1, DRB3, DRB4, DRB5) tarafından kodlanırlar.

HLA Sınıf II molekülünde Alfa-1, Alfa-2, Beta-1, ve Beta-2 domainlerinden oluşan alfa ve beta zincirleri yer almaktadır. Bu domainlerden Alfa-1 ve Beta-1 domainleri, Sınıf I'deki Alfa-1 ve Alfa-2 domainleri gibi peptid bağlama özelliğine

sahiptir. Sınıf II molekülünde Alfa-1 ve Beta-1 domainleri spesifik olarak saptanmıştır. HLA Sınıf I'de Alfa-3, Sınıf II'de ise Beta-2 domainleri değişmeyen kısımlar içermektedir. Sınıf I ve Sınıf II moleküllerine ait domainler Şekil 2-3'de gösterilmiştir.



Şekil 2- 3: Sınıf I ve Sınıf II Domainleri

<http://what-when-how.com/acp-medicine/adaptive-immunity-histocompatibility-antigens-and-immune-response-genes-part-1/>

2.1.1.3. HLA Sınıf-III Genleri

Sınıf III genleri, HLA-DRB ile HLA-B bölgeleri arasında bulunup inflamasyon ve bazı immün sistem aktivitelerinde görevli proteinleri kodlamaktadırlar, bunlar; transport proteinleri, tümör nekrozis proteinleri, kompleman sistem komponentleri ve ısı şok proteinleridir. HLA Sınıf III genleri immün sistemde önemli rol oynamaktadır.

2.1.1.4. HLA ve Transplant İmmunolojisindeki Yeri

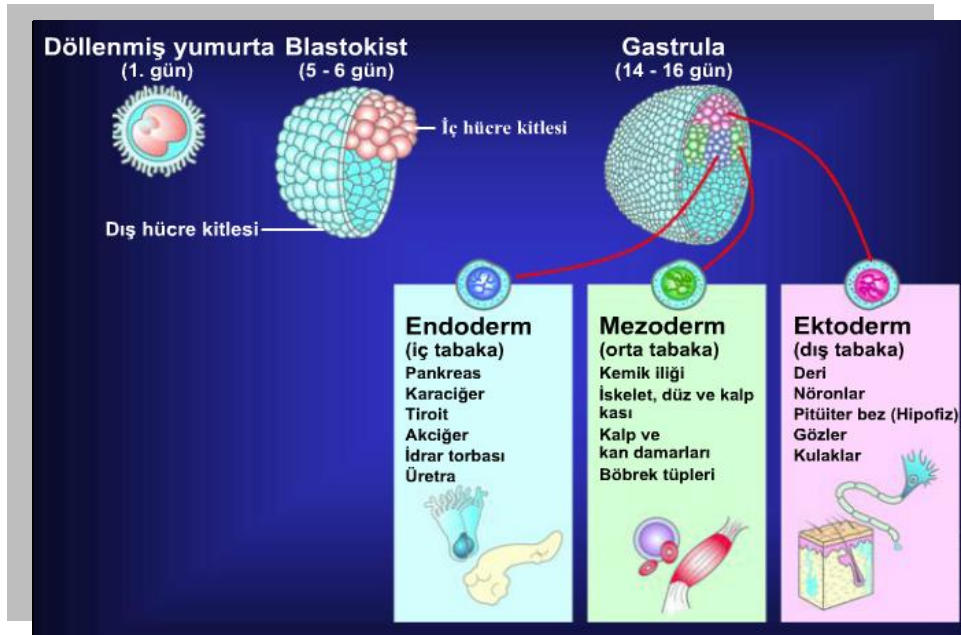
Transplantasyon immünolojisinde immün cevabın rolü oldukça önemlidir. İmmün sistemin organizmayı yabancı moleküllere karşı savunma ve yabancı molekülleri tanıma görevi HLA molekülleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Transplantasyon sonrasında hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığın aktif hale gelmesi nedeniyle tedavi sonrasında hastanın immün sisteminin doku reddini önleyecek şekilde kontrol altında tutulması gereklidir. Allograft nakillerin uyumunda veya reddinde HLA genleri tarafından kodlanan Sınıf I ve II HLA genleri çok önem taşımaktadır. Normal koşullarda esas görevi antijen sunucu hücrelerde ve enfekte

hücrelerde patojenin epitopunun T hücrelere sunulması olan bu yapılar hasta/verici uyumsuzluğunda nakledilen dokunun tanınmasına ve yok edilmesi için T lenfositlere sunulmasında aracılık ederler. Sahip olmuş oldukları bu özellikler sebebiyle HLA genleri transplantasyon immunolojisinde ve özellikle allojeneik nakillerde önemli rol oynamaktadırlar.

2.2. KAN KÖK HÜCRE NAKLİ ve ÖZELLİKLERİ

2.2.1. Kan Kök Hücreleri

Kök hücre kendini yenileme, kaynaklandığı dokuya ya da başka dokulara dönüşebilme yeteneği olan özel bir hücre tipidir (12). Bu tür hücreler başlangıç noktası gibi davranan olgunlaşmamış hücrelerdir ve kendi kopyalarını oluşturabilmektedirler. İç, orta ya da dış tabaka olmak üzere ayrı doku tabakalarında, vücudun gereksinimlerine yanıt olarak olgunlaşmaya hazır, başlatıcı hücrelerin sabit bir kaynağını oluştururlar. Kök hücreler, bu tabakalarda ilgili vücut dokularında yaşlanmış ya da hasar görmüş hücrelerin yerini alarak olgunlaşırlar ve olgunlaşmasının ardından kendilerini kopyalama yetenekleri kaybolur. Şekil 2-4'de vücut yapılarını oluşturan hücrelerin kaynaklandıkları tabakalar verilmiştir. Kemik iliği, embriyonik dönemin üç tabakasından biri olan mezoderm tabakasından orijinlenmiştir.



Şekil 2- 4: Hücrelerin Kaynaklandığı Tabakalar

http://www.kemikiligi.org/kok_hucre_sunum/

Hematopoetik kök hücre olarak bilinen kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunurlar. Bu öncül hücreler; yaygın olarak eritrositler, kan pıhtılaşmasından sorumlu trombositler ve immun sistem hücreleri olan lenfositler olmak üzere üç tip kan hücresinin kaynağını temin etmektedirler. Kemik iliğindeki kök hücreler, gerektiğinde eritrosit, trombosit ve lenfositleri yerine koymak için hematopoez adı verilen işlem ile olgunlaşır ve bu hücre tiplerine dönüşürler. Hematopoez, yani kan hücreleri oluşumu, vücutta sürekli olarak devam eder. Bireyin yüksek rakımlı bir yere taşınması ya da ciddi kanama geçirmesi gibi durumlarda kemik iliğinden dolaşıma geçen kan kök hücre sayısı artış göstermektedir. Kemik iliğinden daha fazla kan kök hücresi çıkışını sağlayan vücut sinyalleri tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber, hücre salınım hızını arttıran bazı faktörler üzerinde çalışmalar bulunmaktadır (13).

Lenfositler, kemik iliğinden henüz olgunlaşmamış halde iken ayrılır ve kan dolaşımı ile timus ve diğer lenfoid organlara taşınır ve immun sistemin özelleşmiş T ve B lenfositlerine farklılaşırlar. Diğer kan hücreleri kemik iliğinden dolaşıma geçmeden önce olgun hale gelirler.

2.2.2. Kan Kök Hücre Nakli Özellikleri ve Tarihçesi

Günümüzde malign ve malign olmayan hematolojik ve otoimmun kökenli hastalığın tedavisinde, öncül kan kök hücrelerin, hematopoezi yeniden oluşturması için damar yoluyla verilmesi işlemine kan kök hücre nakli (KKHN) adı verilir. Günümüzde KKHN tedavisi kullanılan hastalıklar ve vericiye göre KKHN uygulanırlığına ait tablo aşağıda yer almaktadır (Tablo 2-1).

Tablo 2- 1:KKHN Tedavisi Uygulanan Hastalıklar ve Uygulanabilir KKHN Türleri

HASTALIK	OTOLOG KKHN	ALLOJENİK KKHN
<i>Akut Lösemi (ALL,AML)</i>	+	+
<i>Kronik Lösemi (KLL, KML)</i>	-	+
<i>Multiple Myeloma (MM)</i>	+	+
<i>Aplastik Anemi (AA)</i>	-	+
<i>Fanconi Anemisi (FA)</i>	-	+

<i>Orak Hücreli Anemi</i>	-	+
<i>Talasemi</i>	-	+
<i>Myelodisplastik Sendrom (MDS)</i>	-	+
<i>Hodgkin Lenfoma (HL)</i>	+	+
<i>Hodgkin dışı Lenfoma(HDL)</i>	+	+
<i>Myeloproliferatif Neoplazmlar (MPN)</i>	-	+
<i>Konjenital Lökosit Disfonksiyon Sendromu</i>	-	+
<i>Chediak-Higashi Sendromu</i>	-	+
<i>Wiskott-Aldrich Sendromu</i>	-	+
<i>Şiddetli Kombine İmmün Yetersizlik</i>	-	+
<i>Konjenital Saf Eritroid Hücre Aplazisi</i>	-	+
<i>Paroksimal Noktural Hemaglobinüri</i>	-	+
<i>İnfanıl Habis Osteopetrozis</i>	-	+
<i>Germ Hücreli Tümörler</i>	+	-
<i>Renal Hücreli Kanser</i>	+	-
<i>Kalıtsal Metabolik Depo Hastalığı</i>	-	+
<i>Meme Kanseri</i>	+	-
<i>Radyasyon ile Oluşan Kemik İliği Yetersizliği</i>	-	+
<i>İnfanıl Habis Osteopetrozis</i>	-	+
<i>Bazı otoimmün hastalıklar</i>	-	+

İlk defa 1870 yılında lösemi sınıflandırılmış ve löseminin kemik iliğinden kaynaklandığını göstermiştir. Türk'ün 1903 yılında lenfatik lösemileri akut ve kronik olarak ayırmıştır ve 1914 yılında löseminin başka alt tipleri tarif edilmeye başlanmıştır (14, 15). Raporlanan ilk KİT uygulaması 1891'de Brown-Sequard ve d'Arsonaval tarafından, kemik iliğinin oral yolla verilmesiyle kemik iliği yetersizliği olan bir hastaya yapılmıştır (15, 16, 17). 1963 yılında G.Mathé, radyoterapinin kötü huylu hücreyi yok etmedeki önemi, graft oluşumunda yüksek hücre sayısının rolü ve GVHH'nın transplantasyondaki başarısını bildirmiş, 1964'de Bach'ın MLC yöntemi ve 1965'de Dausset'in HLA doku sistemlerini tarif etmesiyle Allojeneik KİT'nda yeni bir dönemi başlatmıştır (18). İlk başarılı allojeneik KİT Ağır Kombine İmmün Yetmezlik (Severe Combined Immunodeficiency; SCID) tanılı pediatrik hastaya yapılmış olup ardından Allojeneik KİT'daki tüm vücut ışınlaması ve yüksek doz kemoterapi uygulanması ile birlikte elde edilen başarılar sonucu; solid tümör, lösemi ve lenfomalarda uygulanması başarılı sonuçlar vermiştir (19,20,21,22). 1980 ve 1990'lı yıllar KİT'nun uygulanabilirliğinin artmasıyla uygulama ve merkez sayısı hızla artmış, Allojeneik KİT'da HLA uyumlu kardeş nakiller dışında akraba dışı alternatif donörlerden elde edilen hücrelerin kullanımı ve enfeksiyon profilaksisi uygulamasıyla tedavilerdeki başarıları arttırmıştır. Bu çalışmaları müteakiben kemik iliği yerine periferik kan kök hücre ve kordon kan kök hücre uygulamaları başarılı bir şekilde uygulanmaya başlanmıştır (23). Kan kök hücre nakilleri kök hücre kaynağına ve kök hücrenin elde edildiği kişiye göre farklı şekillerde gruplanmaktadır (Şekil. 2-5).



Şekil 2- 5 : KKHN Grupları

2.2.3. Kök Hücre Kaynağının Elde Edildiği Kişiye Göre Kan Kök Hücre Nakli

2.2.3.1. Otolog Kan Kök Hücre Nakli

Bazı malign hematolojik hastalıklar (akut myeloid lösemi, multiple myelom ve lenfoma) ve solid organ tümörlerinin tedavisinde, kemoterapötik ilaçların dozu arttırıldıkça hücre içinde daha uzun süreli kalışından dolayı hücre ölümüne yol açma olasılığının fazlalaştığının ortaya konulmasıyla birlikte yüksek doz kemoterapi tedavisi kullanılmaya başlanmıştır. Otolog Kan Kök Hücre Nakli'nde (OKKHN) hastanın hematopoetik kök hücreleri toplanır, ardından yüksek doz kemoterapi ve/veya radyoterapi sonrasında hücreler direkt ya da yabancı hücrelerin ayıklanmasını müteakiben hastaya damar yoluyla verilir ve böylece hastanın kemik iliği ya da periferel kanındaki hematopoetik hücreler yeniden aşılanmış olur. OKKHN, aslında yüksek doz kemoterapiye destek niteliğinde uygulanan kök hücre aşılansıdır (24). OKKHN'de kemik iliğinin hastalıksız olması ya da az miktarda hastalık hücreleri içermesi gereklidir. OKKHN, ardışık (tandem) nakil olarak da uygulanmaktadır. Buna göre hastaya iki kür kemoterapi verilir ve her kemoterapi uygulanmasının ardından başta alınmış olan kök hücrelerin yarısı hastaya geri verilir. Çoğunlukla 6 ay içerisinde kemoterapinin etkilerinden kurtulan hastaya ikinci kürü de uygulanıp tandem nakil gerçekleştirilmektedir. Tandem nakile, duble otolog nakil adı da verilmektedir.

2.2.3.2. Singenik Kan Kök Hücre Nakli

HLA uyumu açısından en avantajlı nakil olan Singenik Kan Kök Hücre Nakli (SKKHN) genetik olarak aynı olan ikiz kardeşten yapılır. OKKHN'den üstünlüğü sağlıklı bir bireyden alınan kök hücre kaynağının kullanılmasıdır (24). Periferel kan kök hücre kaynağı kullanılarak yapılmış olan ilk SKKHN 1993'te Weaver ve ark.ları (25) tarafından gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.3. Allojeneik Kan Kök Hücre Nakli

Genellikle 60 yaşın altında malign hastalığı olan bireylere bu hastalığın yok edilmesi yanında graft rejeksiyonunu da azaltmak amacıyla allojeneik kan kök hücre nakli uygulanır. AKKHN'de kök hücre kaynağı, aynı Singenik KKHN'de olduğu gibi sağlıklı bir vericiye aittir. AKKHN için en iyi seçim HLA tam uyumlu kardeşlerin seçimidir. Hastanın HLA uyumlu kardeşi olmadığı durumlarda hasta için olası üç seçenek mevcuttur ve bu seçeneklerden uygun olan ile nakle gidilir:

- Akrafa dışı HLA tam uyumlu kan kök hücre vericisi
- HLA uyumsuz kan kök hücre vericisi
- Haploidentik olan kan kök hücre vericisi

Otolog ve singenik kan kök hücre nakillerinden farkı, bu tip nakillerde, kök hücre kaynağının genetik olarak tam uyumlu olmayan hastada GVHH denilen tepkimeye yol açabilmesidir (26). GVHH gelişmeyen hastalarla karşılaştırıldığında, GVHH gelişmiş hastalarda nakil sonrası altta yatan hastalığın daha az nüks ettiği gözlenmiştir ve bu bulgu Graft Versus Lösemi (GVL) etkisinden gerçekleşmektedir. GVL etkisi büyük oranda lösemiye zgn epitoplara karşı oluşan T lenfositlerin immun yanıtına bağlıyken ayrıca düzenlenmiş antijenler ile minor MHC antijenlerine bağlıdır. Yani, akraba dışı AKKHN olmuş bir hastada Akut Graft Versus Host Hastalığı (aGVHH), Kronik Graft Versus Host Hastalığı (cGVHH), infeksiyon görülme sıklığı artarken; lösemik relaps riski azalmaktadır (2).

Allojeneik kan kök hücre naklinde, hastalığın hem yüksek doz kemoterapi hem de sağlıklı hücreler verilerek yeniden hematopoezin sağlanması ile hematopoez ile gelişen bağışıklık hücreleri aracılığıyla hastalığın tedavisi hedef alınmıştır.

2.2.4. Kök Hücre Kaynağına Göre Kan Kök Hücre Nakli

2.2.4.1. Kemik İliği

Kemik iliğindeki kök hücreler, kanda dolaşan periferel kan hücreleri olmak için çoğalıp olgunlaşırlar. Kemik iliği genellikle üst kalça kemiğinin arkasındaki krista iliaka denilen kemik bölümünden alınır. Genel anestezi altında ve kemik iliği toplama işlemine özel iğne ve enjektörler aracılığıyla 3-5 cc'lik miktarlar halinde toplanmaktadır. Toplanan rn, filtreden geçirilerek antikoagulan bulunan ürün saklama torbasına aktarılır ve antikoagulan ile ürünün oluşturduğu karışımın homojen olmasını sağlamak amacıyla düzenli olarak sallanır. Hasta vücut ağırlığına göre toplanacak kemik iliği miktarı hesaplanır. Vericiden alınan kemik iliği miktarı 1/5'ine tekabül ettiğinden, vericide immunolojik ya da hematolojik bir sorun oluşurmaz (26, 27).

Günümüzde OKKHN için kemik iliği kaynağına pek başvurulmazken AKKHN için ise hastanın klinik durumuna göre tercih edilmektedir. Örneğin ileri yaş hasta ve/veya verici sebebinden GVHH riskinin yüksek olabileceğinden ya da GVL etkisi çok gerekli görülmeyen hastalıklarda kök hücre kaynağı olarak kemik iliği seçilmektedir.

2.2.4.2. Periferik Kan Kök Hücresi

Periferik kanda kök hücrelerinin bulunduğu uzun zamandır biliniyor olmasına rağmen, bu kaynaktan elde edilen kök hücrelerin hematopoetik nakillerde kullanımı günümüze yakın zamanlarda başlanmıştır. Kemik iliğine göre periferik kanda kök hücreleri belirgin bir biçimde daha az olduğundan, klinisyenler periferik kan kök hücreleri vericilerine, kan kök hücrelerinin kemik iliğinden dolaşıma geçmesi için bir dizi büyüme faktörü enjeksiyonu uygulamaktadırlar. Bu uygulama sayesinde periferik kandaki kan kök hücre konsantrasyonu 10 ile 1000 kat arttırılmaktadır. Genel olarak kemik iliğindeki kök hücrenin periferik kana geçişi için 4 ayrı mobilizasyon tipi uygulanmaktadır. Bunlar;

- Yalnızca kemoterapi kullanılması
- Yalnızca hemopoetik büyüme faktörü kullanılması
- Kemoterapi + hemopoetik büyüme faktörü kullanılması
- Hemopoetik büyüme faktörü + kemokin reseptör antagonisti 4 kullanımı

Tek başına hemopoetik büyüme faktörü kullanımı ile Granülosit Koloni Stimüle edici Faktör (G-CSF) nötrofil proliferasyonuna ve proteaz salgılamasına yol açmaktadır. Kemik iliğindeki proteazların, kemik iliği kök hücrelerinin kemik iliğinde tutunduğu bölgelerdeki proteinleri parçalamasından dolayı kemik iliğindeki hücreler periferik kana geçerler ve G-CSF'ün uygulanmasına müteakiben bu kan kök hücreleri periferik kandan aferez yardımıyla toplanır. Bu mobilizasyon yöntemi yani tek başına hemopoetik büyüme faktörü uygulaması, kemoterapi ya da kemokin reseptör antagonisti ile birlikte verilmesi halinde tek başında verilmesinden daha başarılı olur. CXCR4 (kemokin reseptörü 4/ antagonisti:AMD3100), CD34+ hücrelerin üzerinde bulunmakta olup CD34+ hücrelerin kemik iliğine adezyonunu yönlendirmektedir. Periferik kanda kök hücre membranında eksprese edilmiş CD34+ antijenini uygun miktarda belirmesi ile toplama işlemi gerçekleştirilir. Periferik kandan alınan kan örneğinin akan hücre ölçer (Flow Cytometry) ile incelenmesinin ardından CD34+ hücrenin > 20000/ml olması halinde yetecek miktarda kan kök hücresi toplanması imkanı oluşur. Periferik kandan kök hücre elde edilmesi, lökoferez teknolojisinin gelişimiyle kemik iliği toplanmasına göre daha kolay ve cazip hale gelmiştir (28).

Yeterli miktarda kök hücre mobilizasyonunu sağlamış kişilerden alınan kan, aferez cihazlarında santrifüj benzeri işlemlerle, istenilen hedef kök hücreler ayrıştırılır. Kök hücreler bir torbaya aktarıldıktan sonra geri kalan kısım vericiye geri verilir. Bu işlemler kesintili ya da kesintisiz olarak cihazlarda yapılır. Kök hücre elde edilmesi ardından, vericiden birkaç hafta önce alınmış kandan eritrositler geri verilir.

Periferik kan kök hücrelerinin KKHN'lerinde seçilmesinin en büyük avantajı, olgun hücrelere daha yakın öncül hücreler ve bir log daha fazla T lenfosit bulunmasından dolayı erken dönem engraftman gelişmesidir (29, 30). Böylece dolaylı olarak trombosit transfüzyon ihtiyacı, sitopeni ve hastanede yatış süresi azalır (31). Fakat AKKHN'de periferik kan kök hücresi seçimi cGVHH görülme sıklığına ve uzun süreli tedavi gerektirmesine neden olabilmektedir.

2.2.4.3. Kordon Kanı Kök Hücresi

Tarihteki ilk kordon kanı nakli 1988 yılında Fanconi Anemi tanılı hastaya, kardeşinden alınan kordon kanının nakliyle gerçekleşmiştir (32). Wagner ve ark.ları (33) tarafından yayınlanan bir çalışmada 44 hastaya uygulanan HLA uyumlu kordon naklinin ilk 100 gün içerisinde grade II ve IV GVHH gelişme olasılığı % 3, bir yıl içinde cGVHH gelişme olasılığı ise % 6 gibi bir oranla diğer kök hücre kaynaklarından yapılan KKHN'lerine kıyasla daha avantajlı olduğu gösterilmiştir. Bu öncül çalışmalar olan kardeş vericilerden alınan kordon kanı ile yapılan nakillerin başarılı gerçekleşmesi sonucunda Amerika ve Avrupa'nın öncülüğünde allojeneik kordon kanı bankacılığı pilot programı başlatılmıştır (34, 35, 36).

Kordon kanı nakillerinde istenen HLA uyumu genellikle 4/6, 5/6 gibi uyumluluk seviyelerinde olduğundan hastaya daha kolay ve hızlı verici bulmayı sağlarken, neredeyse yalnızca pediatrik hastalara ve vücut ağırlığı çok düşük bireylere uygulanabilmektedir. Gluckman ve ark.larının (37) yayınladıkları çalışmada 78 kardeş kordon ve 65 akraba dışı kordon nakli olan hastalardan; akraba dışı olanlardan 3 tanesinin ikinci kez kordon kanı nakli olduğu raporlanmıştır. Kordon kanı nakilleri allojeneik olarak gerçekleştirilebileceği gibi otolog olarak da gerçekleştirilmektedir. Kordon kanı naklinin en önemli avantajları şunlardır:

- I. Çevre koşullarına kapalı olan bir sistemden toplandığı için infeksiyon bulunma sıklığı diğer kan kök hücre kaynaklarına göre daha düşüktür.

- II. Çoğalma hızı yüksek kan kök hücrelerinin sayısının fazla olması dolayısıyla erken engraftman potansiyelini yükseltir.
- III. Kordon kanı elde edilmesi, vericide hiçbir tehlikeye yol açmaz.
- IV. Kordon kanı, bankada hiçbir işleme tabi tutulmadan alıcıya ulaştırıldığından daha hızlı ve daha tercih edilirdir.
- V. Kordon kanı saklanması maliyeti düşüktür.
- VI. Diğer kök hücre kaynaklarına oranla aGVHH ve cGVHH görülme sıklığı daha azdır.

2.2.5. Kan Kök Hücre Nakil Seçiminin Algoritması

Genel tabiriyle algoritma; belli bir problemi çözmek ya da belirli bir amaca ulaşmak için çizilen yola ve/veya yollara denir. Algoritmalar oldukça sistematik olan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bazen bir, bazen de alternatif seçenekler sunan bir yöntemdir. Hematolojik malignitesi olan ve tedavi olarak allojeneik kan kök hücre nakli tercih edilmiş ise klinisyenlerin kullandığı algoritmik yol aşağıdaki gibidir:

1. Nakle gidecek hastanın genetik olarak identik yani ikiz kardeşi varsa Singenik Kan Kök Hücre Nakli seçilir.
2. Nakle gidecek hastanın klinik durumu Otolog Kan Kök Hücre Nakli yapılmaya uygunsa OKKHN tedavisi seçilir.
3. Eğer nakle gidecek hastanın ikiz kardeşi ya da otolog nakle uygun klinik durumu mevcut değilse Allojeneik Kan Kök Hücre Nakli tedavisi seçilir.
 - i. AKKHN olacak hastanın akraba içi HLA uyumu taraması gerçekleştirilir, hasta klinik durumu göz önüne alınarak klinisyenin değerlendirmesi ile istenen oranda HLA uyumu gösteren akrabadan nakil gerçekleştirilir.
 - ii. Akraba içi HLA uyumu taraması sonucu uygun bir potansiyel bulunmadığı takdirde, istenen HLA uyumuyla, Ulusal ve Uluslararası Kemik İliği Bankaları aracılığıyla bulunan akraba dışı tarama sonuçları değerlendirilir. En uygun potansiyelden gerçekleştirilebilecek nakil periferik kan kök hücresi ya da kemik iliğinden gerçekleştirilir.

- iii. Akraba içi ve akraba dışı tarama sonucunda HLA doku uyumu uygun potansiyel verici adayları bulunamadığında ya da hastanın durumu acil ise kordon kanı nakli gerçekleştirilir.

2.3. KAN KÖK HÜCRE NAKLİ ÖNCESİ HAZIRLAMA REJİMİ

Kan kök hücre nakli öncesi hastalığa neden olan hücrelerin yok edilip vericiden gelecek olan sağlıklı hücrelerin kan üretimini sağlayabilmesi ve kemik iliğini boşaltmak için yüksek doz kemoterapi ve bazen de kemoterapiye ilave olarak radyoterapi verilmesi işlemine hazırlık rejimi adı verilir. AKKHN'lerinde hazırlık rejiminin asıl amacı; vericiden gelecek ve immun sistemi yeniden oluşturacak olan sağlıklı kan kök hücrelerinin alıcıdaki kalıntı T, NK hücreleri gibi immun hücreler tarafından yok edilmesini önlemek amacıyla immun sistemin baskılanmasıdır. OKKHN olgularında hazırlama rejimi hastalığa göre değişkenlik gösterirken, AKKHN olgularında ise myeloablatif ve myeloablatif olmayan yoğunluğu azaltılmış dozda hazırlama rejimleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.3.1. Hazırlama Rejiminde Kullanılan İmmüsupresyon Seçimi

2.3.1.1. Yalnızca Kemoterapi Uygulaması

Bu uygulamada kullanılan 4 grup kemoterapötik ajan bulunmaktadır. Bunlar pürin analogu olan fludarabin fosfat düşük dozda kullanılmaktadır. Bu uygulama seçeneğinde kullanılan ajanlar Tablo 2-2'de verilmiştir.

Tablo 2- 2: Tek Başına Kemoterapi Uygulamasında Hazırlama Rejiminde Kullanılan Kemoterapötikler

<i>Pürin Analogu</i>	<i>Alkilleyici Kemoterapötik Ajanlar</i>	<i>Nitrozüreler</i>	<i>Diğer Kemoterapötik Ajanlar</i>
Fludarabin Fosfat	Busulfan (BU) Melfelan (MEL) Tiotepa Siklofosfamid (CYC) İfosfamid	Karmustin (BCNU) Lomustin (CCNU)	Sisplatin Mitoksantron Karboplatin Paklitaksel Sitozin arabinosid (ARA-C)

2.3.1.2. Tüm Beden Işınlaması (Total Body Irradiation – TBI)

Özellikle santral sinir sistemi ve testisler gibi lösemik hücre infiltrasyonunun bulunabileceği doku veya organların lösemi hücrelerinden arındırılması durumu söz konusu olduğunda TBI seçilmektedir (38). Ancak TBI’nda, akciğerler açısından interstisyel pnömoni oluşumuna sebep olduğundan dozunun kısıtlanması durumu söz konusu olmuştur ve böylelikle fraksiyone TBI adı verilen, kısmi TBI ile interstisyel pnömoni oranı günümüzde %15’den daha az gelişme göstermeye başlamıştır (39).

2.4. ALLOJENEİK KAN KÖK HÜCRE NAKİLLERİNDE MYELOABLATİF ve YOĞUNLUĞU AZALTILMIŞ DOZDA HAZIRLAMA REJİMLERİ

Myeloablatif hazırlama rejiminde sıklıkla siklofosfamid ile TBI ya da busulfan ile kemik iliğinin boşaltılması sağlanmaktadır, ancak tümör kök hücresi kemik iliğinde gerekli doz kullanılmış olmasına rağmen kalabilir.

Yoğunluğu azaltılmış dozda hazırlama rejimiyle immunsupresyon etkisiyle tümör hücrelerinde kısmi bir azalma sağlanır. Sağlıklı verici kaynaklı hücrelerin hematopoezi ile graft kaynaklı immun hücrelerin lösemi hücrelerini yok etmesi durumu söz konusudur. Daha çok ileriki yaş hasta gruplarında tercih edilir.

2.5. GRAFT VERSUS HOST HASTALIĞINA KARŞI KORUMA

Allojeneik kan kök hücre nakillerinde HLA tam uyumu olmasına rağmen sağlıklı vericiden gelen bağışıklık hücrelerinin birçok faktörün etkisi ve biyolojik reaksiyonlar sebebiyle hastada yabancı olarak algıladığı yapılara karşı savunma şeklinde tepkime gösterebilir. Bu sebeple AKKHN’lerinde GVHH’e karşı tolerans gelişene değin bağışıklığı baskılayıcı tedavi verilir. Tablo 2-3’te GVHH profilaksisinde kullanılan ilaçlar ve yöntemler verilmiştir.

Tablo 2- 3: GVHH Profilaksisinde Kullanılan İlaçlar ve Yöntemler

<i>Kullanılan Yöntemler</i>		
İmmunotoksin	Fototerapi	Monoklonal Antikor
<i>Kullanılan İlaçlar</i>		
Metotreksat	Siklofosfamid	6-merkaptopürin

Prokarbozin	Siklosporin	Azatiopürin
Takrolimus	Thalidomid	Anti-timosit globulin(ATG)
Pentoksifilin	Glukokortikoidler	Metil prednizolon

2.6. KAN KÖK HÜCRE NAKLİ SONRASINDA GÖRÜLEN KOMPLİKASYONLAR

Kan kök hücre nakli tedavisi ile birlikte sıklıkla karşılaşılan komplikasyonlardan biri enfeksiyonlardır. KKHN enfeksiyon riskini arttırırken hayatı tehdit edecek kadar ağır seyredebilir. Bu nedenle nakil öncesinde ve sonrasında farklı dönemlerde enfeksiyon gelişip gelişmediği takip edilir. Hazırlama rejiminde kullanılan kimyasal ajanlar olan kemoterapötikler hızla çoğalabilen her hücreyi yok eder.

Nakil sonrası erken dönemde gerçekleşebilen komplikasyonlar;

- Graft yetmezliği
- Kemik iliğinin baskılanması
- Mukozit gelişimi
- Pnömoni
- Akut böbrek yetmezliği
- aGVHH gibi bireyden bireye farklı bağışıklık olduğundan farklı durumlar görülebilmektedir.

Geç dönemde ise;

- cGVHH
- Kronik böbrek yetmezliği
- Relaps
- İkincil malign kanser türleri

- Kısırlık
- Hormonal defektler gibi komplikasyonlar gelişebilir.

Kan kök hücre nakli sonrası gelişebilen infeksiyon ve komplikasyonların görülme sıklığına göre 3 ana dönemde toplanabilmektedir.

- 1) Engraftman öncesi periyot
- 2) Erken engraftman periyodu
- 3) Geç engraftman periyodu

2.6.1. Engraftman Öncesi Periyot

Bu dönemde en önemli iki komplikasyon lenfositlerin giderek azalmasıyla gerçekleşen nötropeni ve ağızdan başlayarak tüm sindirim kanalı boyunca oluşabilen mukozit hasarıdır.

Nötropeni durumunun uzun sürmesi, immun sistem hücrelerinin yoksunluğundan dolayı infeksiyon gelişme riskini arttıran bir durumdur. Nötropeni süreci nakilde tercih edilen kök hücre kaynağı, miktarı ve hazırlık rejimi seçimine göre değişebilmektedir.

Ağızdan başlayıp sindirim sistemi boyunca süren mukozal tabaka, patojenlere karşı savunmanın ilk hattını oluşturmaktadır. KKHN öncesinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi mukozal tabakaya hasar vererek bu tabakadaki yararlı bakterilerin yaşayabildiği floranın da kaybolmasıyla barsak duvarı infeksiyonu gibi mukozit hasarlarının oluşmasına sebep olurlar.

2.6.2. Erken Engraftman Periyodu

Eritrosit, trombosit ve granülositlerin engraftmanı ile nötropenin sebep olduğu ateş ve mukozit gerilemeye başlar. Fakat bu dönemde aGVHH koruması sebebiyle hastaya verilen ilaçlar infeksiyon riskini arttırabilir.

Bazı durumlarda ise nakil olan kök hücre kendisini sürekli olarak çoğaltabilmeyi başaramayabilir ve erken graft başarısızlığına sebep olabilir. Bu durum verici kök hücrelerindeki minör ve/veya majör doku uyumu antijenlerinin hasta ile duyarlılığından yani graft direncinden kaynaklanabilmektedir.

2.6.3. Geç Engraftman Periyodu

Engraftman oluşumundan sonraki 6 aylık dönemi içine kapsamaktadır. Bu periyotta CD4+/CD8+ oranı düşüktür ve cGVHH görülmeyen hastalarda bu oran birinci yılda normale döner. Akraba dışı ya da HLA tam uyumlu olmayan verici kaynaklı KKHN sonrası hastada GVHH riski yüksek olduğundan, yoğun immunsupresyon tedavi uygulanır. Bu durumda, immun sistemin yeniden oluşmasını ve dolayısıyla engraftmanın gelişmesini geciktirmesine sebep olur. Bunların sonucu olarak infeksiyon oluşumuna eğilim artar. cGVHH gelişmesi ardından uygulanan cGVHH tedavisi ile hücresel ve humoral immun baskılanır. Sekretuar Ig salınımı kusurları ve Aspergillus gibi fungal ve bakteriyel infeksiyonların oluşumu artar.

2.7. GRAFT VERSUS HOST HASTALIĞI

İlk defa 1960'da Nispet ve Heslop tarafından tanımlanmış olup, immunolojik özelliklerini koruyan lenfositlerin, immun yetersizliği olan hastalara verilmesi sonucu ortaya çıkan ve ölümcül olabilen bir hastalık tablosudur (40). Akraba olmayan ve HLA uyumsuz AKKHN sonrası görülen en önemli komplikasyonlardan birisidir. GVHH, klinik seyiri ve nakil sonrası geliştiği periyoda göre akut ve kronik olmak üzere iki fazda görülebilir. aGVHH, nakil sonrası ilk 3 ay içinde, cGVHH ise engraftman oluşumu ardından 3.-6. aylar arasında görülmektedir.

Allojeneik kan kök hücre nakli olan hastalarda aGVHH görülme sıklığı %40 - %60 sınırları arasında bulunmaktadır (41,42). Periferik kan kök hücresi kullanılan nakiller ile kemik iliği kaynaklı nakiller karşılaştırıldığında; periferik kök hücre kaynaklı naklin daha yüksek GVHH geçirme riski olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (43).

2.7.1. Akut Graft Versus Host Hastalığı

Akut graft versus host hastalığı uygun profilaktik tedaviye rağmen, HLA uyumlu alıcıların %40-60'ında görülebilmektedir ve MHC genleri dışında minor doku uyumluluk antijenlerinin de bu komplikasyonda rolü olduğu düşünülmektedir (44,45). Patofizyolojisi oldukça karmaşık olmakla birlikte temelde hazırlama rejimlerinin alıcı dokusunda oluşturduğu hasar sonucu proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması ve antijen sunan hücrelerin (ASH) oluşumunu takiben verici T hücrelerinin aktivasyonu ve doku hasarı oluşumu yatmaktadır. Profilaktik tedavide kullanılan ilaçlar bu sürecin değişik

evrelerine etki gösterebilmektedir. aGVHH tedavisinde sıklıkla metil prednizolon kullanılmaktadır.

Billingham 1966'da GVHH gelişmesi için 3 temel immunolojik faktör tanımlamıştır. Buna göre graft immunolojik olarak yeterli lenfosit içermeli, hastada vericide olmayan alloantijenlere sahip olup grafta yabancı olarak görünmeli ve hastanın hücrelerinin vericiden gelen hücrelere, yani; oluşan grafta immunolojik yanıt oluşturmaması gerekmektedir (46).

Akut graft versus host hastalığı riskini etkileyebilen hasta, verici ve graft özellikleriyle ilişkili olabileceği Tablo 2-4'te gösterilmektedir (Harris ve ark.'dan uyarlanmıştır, 2013) (47).

Tablo 2- 4: aGVHH Riskini Etkileyen Hasta, Verici ve Graft Özellikleri

<i>Hasta ve verici özellikleri</i>	<i>Karakteristik özellikler</i>	<i>Anlamli etkisi</i>	<i>Çalışılan populasyon (n)</i>
<i>Hastanın yaşı</i>	>30 yaş	(*)RO=1,5 (1,4-1,7)	Akrabadışı (3857)
	>40yaş	RO=1,4 (1,2-1,8)	Akraba (1960)
<i>Taniya göre</i>	(1)KML	RO=2 (1,1-3,6)	Akraba (493)
		RO=1,4 (1,2-1,6)	Akraba (1960)
<i>Akraba dışı vericili nakil tipi</i>	Akraba dışı verici	(**)RR= 2,4 (2,1-2,8)	Akraba ve akr. dışı (4566)
		RO=1,7 (1,5-1,8)	Akraba ve akr. dışı (2941)
<i>HLA uyumu</i>	Tam uyumlu	RO=2 (1,8-2,2)	Akraba ve akr. dışı (2941)
		RO=3,1 (1,1-8,6) [4/6 ile 5-6/6)	Akr. Dışı kordon, pediatrik (88)
	HLA-A, -B, -C ya da -DRB1 uyumsuz	RO=1,5(1 mismatch) RO= 1,8(2 mismatch)	Akr. dışı (1874)
		RR=2,6 (2,2-3,2)	Akraba ve akr. dışı (4566)
		(***)TRR=1,3 (1,1-1,5) (yalnızca akr.	Akraba ve akr. dışı (5561)

		dışı)	
		HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR	Akr. dışı ve kordon (803)
	C antijen uyumsuz, B alel ya da antijen uyumsuz	aGVHH oranı oldukça yüksek	Akr. dışı (1933)
	>1 uyumsuz HLA-A, -B, -C ya da – DRB1’de	RO=2,5 (1,4-4,5) [şiddetli GVHH]	Akr. dışı (334)
	HLA-A, -B, -C, - DRB1 ya da –DP’de uyumsuzluk	RO=1,2 (1,1-1,4) [1 mismatch], RO=1,6 (1,5-1,8) [2 mismatch]	Akr. dışı (3857)
	DQ uyumsuz	HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR	Akr. dışı (1933)
	DQ ya da DP uyumsuz	HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR (0,85-1,26)	Akr. dışı (1874)
<i>Cinsiyet farklılığı</i>	Kadın vericiden erkek hastaya	RO= 1,3 (1,02-1,7)	Akraba ve akr. dışı (1481)
		RO=1,1 (1,04-1,2)	Akraba ve akr. dışı (2941)
	Alloimmunize kadın vericiden erkek hastaya	RO=3,6 (1,4-9,0)	Akraba ve akr. dışı(111)
<i>Graft özellikleri</i>	Perifer Kan Kök Hücresi ya da Kemik İliği	HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR	Akr. dışı (513)
		HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR	Akraba ve akr. dışı (2941)

	Kordon kanı	RR=0,4 (0,2-0,7) [tam uyumlu kordon ve tam uyumlu kemik iliği karşılaştırıldığında]	Akraba ve kordon (2165)
		RO=0,45 (0,2-0,96) [tam uyumlu akr. dışı ve uyumlu kordon karşılaştırıldığında]	Akr. dışı ve kordon- pediatrik hastalarda (785)
	HLA tam uyumlu kemik iliği/ HLA uyumsuz kemik iliği	HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR	Akr. dışı (600)
	Haplo identik vericili nakil	HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR (akraba dışı mismatchli donör ile karşılaştırıldığında)	Haploidentik ve HLA uyumsuz akr. dışı (35)
	HLA tam uyumlu akraba haploidentik/uyumlu akraba dışı	HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR	Akraba, akr. dışı ve haploidentik(90)
<i>Kullanılan kök hücre miktarı</i>	Yüksek CD34+	RO= 2,6 (1,3-5,3)	Akraba (315)
	Normal CD34+ oranı	HİÇBİR ANLAMLI İLİŞKİ BULUNMAMIŞTIR	Akraba dışı (932)
		RR=5 (1,9-16,7)	Akraba (58)
<i>Hazırlık Rejimi</i>	Düşük yoğunluklu hazırlama rejimi	RO=0,2 (0,1-0,5)	Akraba dışı kordon- pediatrik (88)
	TBI kullanımı	RO= 1,4 (1,2-1,7)	Akraba (1960)
	GVHH profilaksisi	TRR=2,5 (1,3-4,8) Tek kimyasal kullanımlı	Akraba (493)

		TRR=2 (1,1-3,7) Kalsinörin inhibitor monoterapisi	Akraba ve akraba dışı (304)
		TRR=0,6(0,5-0,9)/ akraba – Takrolimus kullanımlı	Akraba ve akraba dışı(5561)
		TRR=0,8(0,7-0,9)/ akraba dışı – Takrolimus kullanımlı	Akraba ve akraba dışı(5561)
		RR=0,6 Akraba/ Siklosporin ve metotreksat kullanımı ile Takrolimus ve metotreksat karşılaştırıldığında	Akraba (329)
		aGVHH riski düşüyor. (Siklosporin ve metotreksat kullanımı ile Takrolimus ve metotreksat karşılaştırıldığında)	Akraba dışı (180)

(*) RO; Risk Oranı, (**) RR; Rölatif Risk, (***)TRR; Tahmini Rölatif Risk,

(1) KML; Kronik Myeloid Lösemi

Tablo 2-4'ten de anlaşılacağı üzere aGVHH gelişme riskini anlayabilmek için oldukça fazla parametrenin değerlendirilmesi gerekmektedir. Hayvan deneyleriyle yapılan çalışmalarda aGVHH gelişmesi için 3 basamaklı bir sürecin gerçekleşmesi gerektiği düşünülmektedir.

- Bu basamaklardan birincisi yüksek doz radyo-kemoterapiye bağlı olan doku hasarı oluşumuyla salınan sitokinlerdir (48). Toubai ve ark.'nın

(49) 2012’de yayınlamış olduğu rapora göre birçok proinflatuvar sitokinler (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-2, IL-12, IL-18, IFN- γ , IL-15, IL-17) aGVHH gelişmesi ile ilintili bulunmuştur.

- İkinci basamakta ise graftta bulunan olgun lenfositlerin, inflamatuvar moleküller ve aktif ASH’den oluşan bir çevreye aşılmasıdır. Bu çevredeki olgun lenfositler aktifleşerek etki alanlarını genişletmektedirler.
- Üçüncü ve son basamak ise aktifleşmiş efektör T lenfositlerin alıcı hücre ve dokularını yabancı olarak algılayıp doku hasarını oluşturmalarıdır.

2.7.1.1. Akut GVHH Derecelendirme Kriterleri

İlk olarak 1974’te Glucksberg tarafından geliştirilmiş olup 1994’te bir konsensus ile GVHH derecelendirmesi için temel taşlar atılmıştır (50,51). Başta gastrointestinal sistem (GİS) derecelendirmesi pediatrik hastalar için uygulanmamış olsa da şimdilerde pediatrik merkezler vücut ağırlığının kilo başına hacmine dayalı GİS derecelendirmesini ayarlamışlardır.

Akut graft versus host hastalığı cilt için semptomu makülopapuler deri döküntüleri, GİS için; bulantı ve/veya anoreksiya, sulu diyare, şiddetli abdominal ağrı, kanlı diyare ve bağırsak tıkanıklığı, karaciğer için ise; kolestatik hiperbilirubinemiadır. Tablo 2-5’de aGVHH derecelendirmesi için kullanılan kriterler gösterilmiştir.

Tablo 2- 5: aGVHH Derecelendirme ve Kriterleri

<i>Derece</i>	<i>Cilt</i>	<i>Karaciğer (bilirubin)</i>	<i>GİS (dışkı/günlük)</i>
0	GVHH döküntüsü yoktur	<2mg/dl	Yetişkin:<500ml/gün Çocuk:<10ml kg/gün
1	Makülopapuler döküntü (Vücut yüzeyinin <%25)	2-3mg/dl	Yetişkin:500-999 ml/gün Çocuk:10-19.9ml/kg/gün ve bulantı,kusma,anoreksiya

2	Makülopapuler döküntü (Vücut yüzeyinin %25-50'si kaplıdır)	3,1-6mg/dl	Yetişkin: 1000-1500ml/gün Çocuk: 20-30 ml/kg/gün
3	Makülopapuler döküntü (Vücut yüzeyinin >%50)	6,1-15mg/dl	Yetişkin: >1500 ml/gün Çocuk: >30ml/kg/gün
4	Genel olarak büllöz formda eritroderma mevcuttur	>15mg/dl	Şiddetli abdominal ağrı ve ağrı ile bağırsak tıkanıklığı

2.7.2. Kronik Graft Versus Host Hastalığı

Kronik GVHH, klinik ve histolojik olarak otoimmün hastalıklardan olan Sjögren Sendromuna benzemektedir ve hedefteki doku mezenkimal hücrelerdir (52). cGVHH, AHKHN sonrasında 3. ve 12. ay döneminde vakaların %50'sinde görülen ve hastaların yaşam kalitesini ve dolayısıyla sağ kalımı etkileyen bir komplikasyondur. cGVHH'nda T lenfositler öncelikle otoreaktiftir. CD8+ sitotoksik T lenfositler esasen epitel doku hasarından sorumludur. Bu hasara Natural Killer (NK), mast hücreleri, makrofajlar ve sitokinler de eşlik ederek katkıda bulunur, fibroblast proliferasyonunu ve de kollajen sentezini arttırarak otoantikorların belirmesine sebep olurlar.

Ciltte; pullanma ve kuruma, tırnakta; distrofi ya da kayıplara, ağızda; ülser ve liken tipi yaralara, gözde; göz kuruluğu ve sicca sendromuna, kas ve konnektif dokularda; myopati, fasiitis ve sklerodermaya, böbrekte; nadir olarak nefrotik sendroma, kadın genital bölgesinde; vajinal skleroz ve ülserlere, kalpte; perikardite, kemik iliğinde; trombositopeni, nötropeni ve anemiye, GİS'de; anoreksi ve kilo kaybına neden olan klinik bulgular gözlenmektedir.

2.8. ALLOJENİK KAN KÖK HÜCRE NAKLİNDEN SONRA KİMERİZM TAKİBİ

2.8.1. Kimerizm Nedir?

Tıbbi bir terim olarak kimerizm, bir organizmada kendiliğinden ya da müdahale sonucu farklı iki hücre hattının bulunması durumudur. “Tek bedende farklı DNA’lar”, “tek bedende çift kimlik” anlamlarında da kullanılmaktadır. Erken embriyonal gelişim sırasında, anne karnında döllenmiş iki yumurtanın kaynaşmasıyla ikiz doğacağı halde tek doğan bebeğin vücudunda farklı DNA’lar bulunabilmektedir. Bu tip vakalarda kişinin kalbi kendisine, akciğerleri ikiz kardeşine ve hatta sağ yumurtalık ikiz kardeşine ait iken sol yumurtalığın DNA’sı kendisine ait olabilmektedir. Bu tip vakaların çocuklarının DNA’sı da kardeşine ait olabilmektedir.

Kimerizm durumu ayrıca, AKKHN sonrasında yeni oluşan hematopoetik sistemin hasta, verici veya hem hasta hem verici kaynaklı olup olmadığı ve nakil başarısını değerlendirmede en önemli unsurdur. Nakil sonrası hematopoezin genotipik orijininin değerlendirmesine “kimerizm analizi” denmektedir. Kimerizm deyimi, Eski Yunan Mitolojisi’ne göre ilk olarak Homeros’un İlyada destanında anlatılan, Anadolu’da yer alan Likya’da yaşayanlara korku salan ve kahraman Bellerophontes tarafından kurban edilen aslan başlı, keçi gövdeli, yılan kuyruklu ve ağzından ateş saçan bir canavar olan “Kimera” isminden türetilmiştir (53). Tıpta bu terim ilk defa Anderson ve ark. (54) tarafından 1951’de, nakil alanında ise ilk defa Ford tarafından 1956’da kullanılmıştır (55). Gerek nakil için kullanılan kimerizm analizi gerekse adli vakalardaki kullanımı sebebiyle kimerizm oldukça önemli bir analizdir. İlginç bir konu olmasından dolayı popüler kültürde sıklıkla yer alan bir konudur.

2.8.2. Kimerizm Tipleri Nelerdir?

Allojeneik kan kök hücre nakli sonrasında esasen engraftman özelliğini sürdüren yani verici hematopoezine sahip kimerizm tipine “Tam Kimerizm” (TK), hasta ve verici kaynaklı hematopoezin ikisini de gösteren kimerizm tipine ise “Karışık Kimerizm” (KK) adı verilmektedir. Karışık kimerizm üç farklı şekilde görülebilir. Art arda kimerizm izlemi sonucu hastaya ait hücrelerin azalıp verici kaynaklı hücrelerin artmasıyla gözlemlenen duruma “Azalan Karışık Kimerizm”, tam tersi durum yani; hastaya ait hücrelerin artıp vericiye ait hücrelerin azalmasıyla gözlemlenen “Artan Karışık Kimerizm” ve yine ardı sıra kimerizm takibi sonucu hasta ve verici hücrelerinin

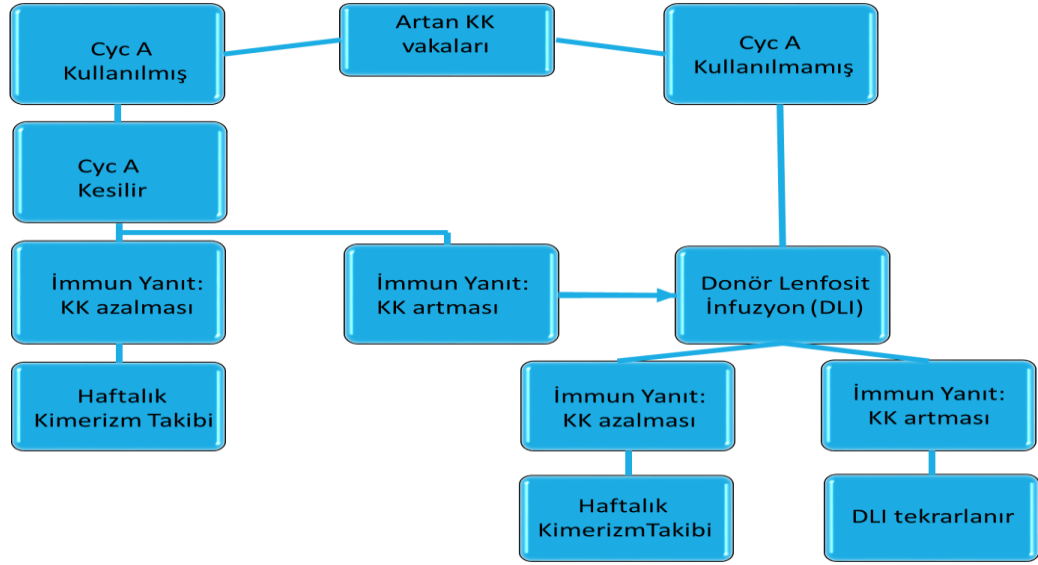
sabit miktarlarda kaldığı duruma da “Sabit Karışık Kimerizm” adı verilmektedir. Ayrıca kimerizm analizi olarak NK hücreler ve T lenfositler gibi farklı hücre subpopulasyonlarının da değerlendirilmesi yapılmaktadır. Buna “Ayrık (Split) Kimerizm” adı verilir (56).

2.8.3. Kimerizm Takibine Hangi Zamanlarda Bakılmalıdır?

Engraftman izlemi için kimerizm analizi rutin yapılan bir değerlendirme yöntemidir. Bu analiz, malign ve malign olmayan hastalıkların yeniden oluşmasını gösteren bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda kimerizm analizi, immunoterapi ile nüksü tedavi etme, engraftmanı sürdürme, graft rejeksiyonunu önleme gibi tedavi seçiminin odak noktası haline gelmiştir. Malign ve malign olmayan hastalıklarda haftalık rutin kimerizm analizleri tam kandan ayrılan DNA tabanlı testler ile bakılabildiği gibi, graft başarısızlığı ya da graft rejeksiyonu durumunda ayrık kimerizm tipinde de analiz yapılabilmektedir. Akut Myeloid Lösemi (AML), Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Kronik Myeloid Lösemi (KML) ve Myelodisplastik Sendrom (MDS) gibi malign hastalıklarda nakil sonrasında +200.güne kadar haftalık olarak ve +200. Günden sonra aylık rutin kimerizm analizi yapılması uygundur. Genellikle 18. aya kadar aylık rutinler yapılması ya da 100.günden sonra her iki ayda bir defa 2 yıla kadar rutin kimerizm takibinin yapılması hastalığın kliniği için oldukça önemlidir (56).

2.8.4. Karışık Kimerizm ve Donör Lenfosit İnfüzyon

Karışık kimerizm görülen vakalarda siklosporin A (Cyc A) kullanımına göre tedavi seçilir ve tedavi sonucu kimerizm analiziyle takip edilmesi seçilen tedavi sonucunu izleyebilmek için oldukça önemlidir. İzlenen yola göre; kimerik durum seyrinde, haftalık rutin kimerizm takibinin yapılması, KK ya da TK saptanması, seçilen immunot tedavinin yeterli olup olmadığını saptayabilmek için önemli rol oynamaktadır. Şekil 2-6’da AHKHN sonrasında artan karışık kimerizm gelişen Siklosporin A kullanımına göre tedavi seçimi ve kimerizm takibinde kullanılan yol gösterilmiştir (Bader ve ark.’larından uyarlanmıştır, 2005).



Şekil 2- 6: AKKHN Sonrasında Artan KK Gelişen Hastalarda Siklosporin A Kullanımına Göre Tedavi Seçimi ve Kimerizm Takibinde Kullanılan Yol

Daha önceki kimerizm analizine göre %5 ya da daha fazla hasta kaynaklı hücre saptanmış artan KK bulgusuna rastlanıldığında derhal siklosporin A içerikli immunosupresif ajanın verilmesi kesilir ve TK gözlenene kadar haftalık olarak kimerizm takibi yapılır. Eğer siklosporin A kesilmesine rağmen KK gözlenmeye devam ediliyorsa Donör Lenfosit İnfüzyon (DLI) uygulanır. DLI, kısaca vericinin lenfosit hücrelerinin hastaya verilmesidir. Tedavi amacıyla ya da ilk aşama tedavi olarak da uygulanabilir. Başlıca nüks, CMV (Sitomegalovirus) ve/veya EBV (Ebstein bar virusu) tedavisi, düşük yoğunluklu hazırlama rejim uygulanmış KKHN'leri sonrasında ve karışık kimerizm olgularında kullanılır. Örneğin siklosporin A içermeyen bir tedavi uygulanan hastada KK oluşursa direkt olarak DLI immunoterapisi uygulanır. DLI'da kullanılacak hücre dozu hasta ve vericisi arasındaki HLA uyum durumunun ciddiyeti ve uyum oranına bağlı olarak $2,5 \times 10^4$ ile 1×10^6 /kg vücut ağırlığı aralığında ayarlanmaktadır. DLI immunoterapisi uygulamasının ardından, TK gözlenene kadar kimerizm durumu haftalık olarak takibe alınmaktadır. Hastada DLI'a rağmen en az üç hafta geçtikten sonra hala KK durumu sürüyor ise ve GVHH gelişmemişse ikinci defa DLI uygulanabilmektedir (56).

Childs ve ark.ları (57) tarafından yapılmış olan çalışmada, uygulanan non-myeloablative DLI sonrası kimerizm takibinin önemi vurgulanmış ve ayrıca tam-donör T lenfosit kimerizm oluşumu, GVHH ve GVL saptanmasında önemli bir faktör olduğu ileri sürülmüştür.

2.8.5. Kimerizm Takibinde Kullanılan Yöntemler

Kimerizm yönteminin kullanılmasının temeli hastanın ve vericinin genetik belirteçlerinin ayırımından nakil takibinin yapılmasıdır. Bu amaçla kullanılan genetik belirteçler, laboratuvar metodları kan kök hücre nakli tarihi boyunca değişikliğe uğramıştır. İlk çalışmalarda kırmızı kan hücre antijenleri, verici hücresinin varlığını kanıtlamaktaydı (58). Daha sonraki çalışmalarda sitogenetik belirteçler ve enzim polimorfizmleri kullanılmaya başlandı. 1980’lerde moleküler biyoloji alanındaki pozitif gelişimlerin ivmesiyle genetik belirteçler kullanılmaya başlandı (59,60). Yaklaşık on yıl kadar bir süreç içerisinde cinsiyet kromozomuna özgü problemler ile in situ hibridizasyon ve DNA amplifikasyonuna dayalı değişken sayılı art arda tekrar polimorfizmleri (Variable Number Tandem Repeats; VNTR) teknikleri geliştirildi (61,62). Kullanılan yöntem ve belirtecin tercihi; hasta ile verici arasındaki cinsiyet farkına bağlı olarak, KKHN’nin hangi hastalığın tedavisinde kullanıldığı ve kullanılmak istenen yöntemin duyarlılığına göre değişebilir. Son yıllarda kimerizm analizlerinde daha hızlı ve hassas olan gerçek zamanlı PZR metodu kullanılmaya başlanmasıyla acil endikasyonlu durumlarda hızlı immunoterapinin seçimine katkısı olabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (2).

2.8.5.1. Sitogenetik Kimerizm Takibi

Kimerizm açısından sitogenetik inceleme, hasta ve verici hücrelerinin ayırımı için kullanılmaktadır. Hasta ve vericisi cinsiyet uyumlularsa, satellitler ve bazı polimorfik bölgeler kullanılarak hücresel ayırım gerçekleştirilir. Farklı lösemi türlerinde gerçekleşen translokasyon, inversiyon gibi genetik bilgiler sitogenetik kimerizm takibinde önemli rol oynarlar. Örneğin KML olgularında, Philadelphia kromozomu taşıyan lösemik hücreleri G bantlama yöntemi ile takibi gerçekleştirilir (63).

2.8.5.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ile Kimerizm Takibi

Başka bir sitogenetik kimerizm takibi yöntemi de Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemidir. Cinsiyet uyumsuz nakillerde, hasta ve verici hücrelerini ayırmak için X ve Y kromozomuna özgü problemler kullanılarak, özellikle az miktarda örnek olduğu durumlarda KK saptamak için basit ve verici hücresinin oranını sayısal olarak değerlendirme açısından niceliksel bir yöntemdir (64). FISH yöntemiyle kısa sürede çok fazla sayıda hücre taranabilir ve nakil sonrası engraftman takibinde yüksek duyarlılık ve

düşük yanlış pozitifliğe sahiptir. Erkek bireylerde yanlış negatif sonuçlarda üst sınır % 5,6 iken kadınlardaysa bu durum % 2'dir (65).

Bazı durumlarda ise Y kromozomuna özgü problemler kullanıldığı halde sinyaller gözükmebilir ve tespit edilen hücrenin kadın orijinli olduğu anlaşılabilir. Eğer sinyal varsa hibridizasyonu önleyen hatalardan şüphe edilir ve bu durumda çift renkli farklı kromofor ile etiketlenmiş X-Y kromozomuna spesifik problemlerin karışımı kullanıldığında var olan hata anlaşılabilir. Bu tip FISH yönteminde ise erkek bireylerde yanlış pozitif sinyal verme üst sınırı % 0,63 iken kadınlarda yanlış pozitiflik üst sınırı % 0,30 olarak raporlanmıştır (66).

2.8.5.3. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP – Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) ile Kimerizm Takibi

Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizminin amacı hasta ve vericideki sınırlama enzimleri için kesilme bölgelerinin varlığı ya da yokluğunun tespiti. Restriksiyon endonükleazlar, DNA'yı kişiden kişiye değişen farklı bölgelerde bölüp genomda farklılığa sebep olurlar. Bu polimorfizm bölgeleri Mendel kanunlarına göre kodominant kalıtılırlar. Southern Blot tekniği ile radyoaktif işaretler ile problemler hibridizasyon sayesinde farklı DNA dizilerinin büyüklüğünü belirleyebilen özel paternler üreterek saptanırlar. Southern Blot tekniği kompleks ve laboratuvar rutin çalışmaları için oldukça elverişsizdir. Southern Blot tekniğiyle RFLP'nin kimerizm takibindeki duyarlılığı % 10'dur ve kesinliği saptamak zordur (67).

2.8.5.4. Variable Number of Tandem Repeats (VNTR – Değişken Sayıda Art Arda Tekrarlar) ile Kimerizm Takibi

Bireyden bireye tüm genom içerisindeki DNA dizileri ardı ardına farklı sayılarda tekrarlar şeklinde olabilmektedir. Tekrarlayıcı olan bu diziler 15 - 50 baz çifti uzunluğunda olabilmektedir. Mendel kanunlarına göre kodominant kalıtılırlar ve test için oldukça fazla sayıda lokus kullanılmaktadır. VNTR Southern Blot tekniğiyle tespit edilebildiği gibi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) olarak bilinen, kısa DNA segmentlerinin amplifikasyonu yolu ile de tespit edilebilir. PZR ile VNTR tespiti, çekirdek dizisine zıt zincir üzerinde 5' → 3' yönünde komplementer oligonükleotidler, denatürasyon, primer uzaması, ısı sabit aracılı genişlemenin tekrarlayan siklusları ile yapılmaktadır.

DNA tabanlı kimerizm analizlerinde çok az miktarda DNA ile teste başlanarak lökopeni, graft yetmezliği durumlarında bile kimerik durum saptanabilir. VNTR testinin duyarlılığı %1-5 aralığındadır.

2.8.5.5. Short Tandem Repeats (Kısa Ardışık Tekrarlar) ile Kimerizm Takibi

Bu kimerizm analizinde, spesifik STR lokuslarındaki 2–6 baz çiftlik uzunluktaki dizi tekrarlarının hasta ve vericisi arasındaki farklılıktan yararlanmak söz konusudur. Ayrıca STR ana-babalık testi, adli tıp vakalarının çözülmesinde de kullanılan bir yöntemdir. Mikrosatellitler olarak da bilinen STR lokuslarında aynı VNTR'da olduğu gibi Mendeliyen bir aktarım söz konusudur. Mikrosatellitler, TGTGTG...TG, ATGATG...ATG ve AAATAAAT...AAAT gibi iki, üç ya da dört nükleotid tekrarlarından oluşur ve bu tekrarların oluşturduğu polimorfizm kişiden kişiye değişmektedir. STR-PZR kimerizm yönteminde intron bölgesine ait polimorfizmi ayırt edici özelliğinden yararlanarak ayırım sağlanır.

Southern Blot tekniği VNTR ve RFLP yöntemlerinde kullanılabilirken, STR'de Southern Blot tekniği elverişli değildir. Ana-babalık testi gibi genetik bağlantı kurulacak ya da kimerizm testi gibi hasta-verici farkından yararlanılacak durumlarda STR yönteminin kullanılması, genom içerisinde bulunan mikrosatellit lokuslarla identifikasyon sağlanabilmektedir (68).

Multipleks PZR tekniği STR-PZR kimerizm yöntemi için oldukça elverişlidir. Yani aynı anda birden fazla belirtecin aynı anda aynı ortamda amplifikasyonu gerçekleşebilmektedir. Multipleks STR-PZR aracılığıyla ayrı ayrı kuyucuklarda ayrı bölgelerin çoğaltılması yerine, aynı kuyucukta birden fazla lokusa ait bölgelerin aynı anda amplifikasyonunu gerçekleştirip sonrasında elektroforez yürütme ile farklı tekrarların saptanmasına olanak sağlar. Ayrıca az miktardaki hücreden analiz yapılmasına olanak tanıyarak engraftman için morfolojik bir kanıt oluşmadan önce engraftman kinetiklerinin analiz edilmesini sağlar. PZR ürününün floresan kaplı primerler ile işaretlenerek kapiller elektroforezde görünür hale getirilip cihazda otomatik olarak görünürlüğü sağlanabilmekte ve analizi daha kolay yapılabilir.

Kimerizm analizi duyarlı teknikler kullanılarak yapılmalıdır. Günümüzde STR-PZR kimerizm analizi tekrarlanabilirliği ve nakil sonrasında hastaya ait bilgilendirici veriler elde edilme olasılığı en yüksek olan ve en sık başvuru alan yöntemdir. Sitogenetik

yöntemler, FISH, RFLP ve VNTR yöntemleri de uygulanabilir, ancak STR-PZR kimerizm yöntemine göre daha az duyarlı yöntemlerdir.

2.8.5.6. Quantitative Real Time Polymerase Chain (Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR) ile Kimerizm Takibi

Gerçek zamanlı PZR; genotiplendirme, mutasyon ve kimerizm analizi için PZR tekniğinin en son geliştirilmiş tekniğidir. 1990'ların başından beri, bu tekniğin gelişmesi ile birlikte birçok farklı deney formatları dizayn edilmiştir. Kimerizm analizinde, Q-RT-PZR kullanımıyla hasta ve vericisi arasındaki farklı amplifiye olan belirteçlerin belirlenmesi ardından, bu belirteçlerin kullanımıyla, hastadaki yüzdeli (%) verici hücre mevcudu kesin bir sonuç olarak elde edilmektedir.

Şüphesiz ki, diğer PZR yöntemleriyle karşılaştırılınca en önemli avantajı; floresan teknikleri kullanımıyla amplifikasyon işleminin izlenebilirliğidir. Cihazın bağlı olduğu bilgisayardaki yazılımdan amplifiye olan ürünlerin çoğalışını, amplifikasyon eğrilerinden izlenebilir ve başlangıç miktarı bilinen ürünün geniş çaptaki artışı izlenerek yapılan testin kesinliği takibe alınabilir. Kantifikasyon için, amplifikasyon eğrilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu eğrilerin 3 önemli seviyesi mevcuttur (70).

1. **Lag (Lineer) fazı:** Bu fazda hiçbir ürün toplanması söz konusu değildir
2. **Eksponensiyal faz:** Prensip olarak başlangıç reaksiyonunun tespit edilebilmesinden dolayı oluşabilecek kopya sayısının hesaplanması tahmini olarak oranlanabilecek evredir. Bu evrede kopya ürün sayısı logaritmik olarak artış göstermektedir.
3. **Plato fazı:** Bu fazda ortamdaki deoks nükleotid trifosfatlar (dNTP), primerlerin bitmesine bağlı olarak ürüne bağlanmasının azalır. Oluşan ürün sayısının azaldığı için bu faz bir düzlük şeklinde gözlemlenmektedir. Bu nedenle Plato Fazı olarak adlandırılır.

Lag fazından, eksponensiyal faza geçerken müthiş bir artışın gözlemlendiği ilk basamağa ya da başka bir deyişle kullanılan proba bağlı olarak reportör sinyalinde önemli artışın gözlemlendiği ilk değere Eşik Değeri (Threshold Cycle; CT) denir. Hassas kantifikasyon hesaplanabilirliği için amplifikasyonun nerede başladığının bilinmesi önemlidir.

Gerçek zamanlı PZR tekniğinde kullanılan probalar sayesinde elde edilen sonuçların kesinliği arttırılmaktadır. RT-PZR yönteminde Hidroliz probaları (TaqMan), Hibridizasyon probaları (FRET- Fluorescence Resonance Energy Transfer), Molecular Beacons, Sunrise ve Scorpion primerler ile Light-up probalar kimyasal floresan boya ların kullanımına ve teknolojisine göre farklı teknikler kullanılmaktadır (69). Bunlardan hidroliz probu olan TaqMan tekniğinde; 5'- ucunda reportör (başlatıcı), 3'- ucunda quencher (sonlandırıcı) adı ile bilinen floresan kimyasalları bulunmaktadır. Bu prob-primer ikilisi mikro bir yumak şeklindedir, hedef diziyi bulan reportör ucu ışımaya ve bu sinyal ile primer eşlenmeye başlar, sonlandığı yer de bulunan quencher probunun primer-prob sisteminden ayrılmasıyla güçlü bir ışıma gerçekleşir ve bu cihaz tarafından okunmaktadır. Bu kimyasal teknolojinin sağladığı sistem ile amplifikasyon tespit edilir ve ışıma yoğunluğu kantifiye edilmektedir.

Çift sarmal DNA yapısına bağlanan diziye özgü olmayan SYBR-green floresan boyasının kullanıldığı RT-PZR yöntemlerinde çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğunu kesinleştirmek için erime eğrisi analizi yapılmaktadır. Erime Sıcaklığı (Temperature Melting; Tm), DNA molekülünün yarısının tek sarmal haline geldiği belirli sıcaklığa verilen isimdir. Erime sıcaklığını büyük ölçüde baz dizisi belirler ve farklı dizilere sahip DNA moleküllerinin Tm değerleri birbirinden farklı olur. Bu nedenle erime eğrisi analizi, testi doğru yorumlayabilmek için oldukça önemlidir. Erime eğrisi analizinde, çift sarmal DNA örneğinin sıcaklığı yavaş yavaş arttırılır. Floresan sinyalin, sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik oluşturulur. Floresan sinyalin ani düşüşünden kaynaklanan tepelikler aracılığıyla DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması gözlemlenir. TaqMan işaretli PZR ürünü baz dizisi, o ürüne özgü floresan işaretli probalarla görüntülenir, bu yüzden çoğalan ürün spesifik olarak saptanmış olur. SYBR-green kullanılan kitlerde ise, dizi ayrımı yapmaksızın SYBR-green tüm çift zincirli DNA'lara bağlandığı için ürün spesifik olarak görüntülenemez.

Negatif kontrol, RT-PZR protokollerinin olmazsa olmazıdır. Negatif kontrol, içinde her malzemeyi (distile su, master mix, enzim..vb.) barındırıp sadece test edilen genetik materyali içermeyen kontrol kuyusudur. Negatif kontrol, olası bir kontaminasyonun varlığının kontrol edilmesini sağlar, pozitif sonuçlar testin kontaminasyona maruz kaldığını gösterir.

Pozitif kontrol ise, pozitif sonuç vermesi beklenen reaksiyon kontrolüdür. Pozitif kontrol, uygulamadaki veya kullanılan malzemelerdeki olası aksaklıkların ortaya çıkarılmasını sağlar. Pozitif kontrol pozitif sonuç vermezse, o deneyin sağlıklı olmadığı anlaşılır ve doğru sonuçların verildiğinden emin olmak için deney tekrarlanır.

Kantitatif RT-PZR'de standart eğri oluşturmak için en az üç standart ile çalışılmak gereklidir. Bu eğri sadece kantitasyonu yapılmak istenen hedef gen bölgesinin DNA/RNA miktarını gösterir. Bu eğrinin oluşturulması için de kesinlikle DNA miktarının ölçülmesi gereklidir.

Sekans spesifik problemlerin kullanıldığı kimerizm yöntemlerinde alellerin farklılığını ve kantifikasyonunu ölçülebilmektedir. SNP ya da insersiyon/delesyon polimorfizmine dayanan kimerizm analizi oldukça hassas sonuçlar vermeye uygundur. Cinsiyet farklı nakillerde, Y-kromozomuna spesifik prob ve alel spesifik prob-primer çiftleriyle oluşturulan RT-PZR kombinasyonu ile oldukça hassas kantitatif sonuçlar veren kimerizm takibi gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntem ile Maas ve ark.ları tarafından 2003 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada % 0.01'e kadar duyarlı sonuçlar elde edildiği raporlanmıştır (70). Alizadeh ve ark.ları (2) kimerizm analizinde KK tespitinde; Q-RT-PZR kullanımının STR-PZR yöntemine göre kantitatif olarak hasta hücre yüzdesini hesaplamada daha duyarlı, daha kesin sonuç verirken, DLI gibi tedavi seçeneklerini değerlendirmek açısından da daha hızlı sonuca ulaşılmasının da önemli bir avantaj olduğunu ortaya koymuşlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADAKİ HASTALARIN ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya, Kasım 2013 – Şubat 2015 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Allojeneik Kemik İliği Ünitesi'nde, hemotolojik malignite tanısı alan, HLA uygun akraba ya da akraba dışı vericiden allojeneik kan kök hücre nakli olmuş olan hastalar dahil edilerek kimerizm takipleri değerlendirilmiştir.

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZ ve GEREÇLER

EDTA'lı tüp

Santrifüj (HERAUS)

Otomatik Pipet (10, 200, 1000 μ L) (EPPENDORF)

Pipet Ucu (10, 200, 1000 μ L)

0,2 ml'lik santrifüj tüpü

0,5 ml'lik santrifüj tüpü

1,5 ml'lik santrifüj tüpü

2 ml'lik santrifüj tüpü

Su banyosu

Steril pamuklu aplikatör

Mini santrifüj (Nüve NF048)

Plate santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5810 R)

Çeker ocak (Laminer Flow)

Buzdolabı (Beko 7125)

Deep-freeze

Spektrofotometre (ThermoScientific NanoDrop 2000)

Thermal cycler PCR cihazı (Perkin Elmer GeneAmp 9700)

Vortex (Labnet s0200)

96 well plate

Plate Vortex (Biocote SA8)

Ayarlı sıcak su banyosu (B.Braun Thermomix1441)

MicroAmp® Optical Adhesive Film Aplikatörü

MicroAmp® Optical Adhesive Film Seal

ABI 3130

ABI Prism 7500

3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASALLAR VE PRİMERLER

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar:

- DTAB
- CTAB
- Kloroform
- 1,2 M NaCl
- % 99,9'luk Etanol
- % 70'lik Etanol
- Distile Su

STR-PZR kimerizm yönteminde kullanılan kimyasallar ve primerler:

Promega multipleks kimerizm kiti:

- Master mix
- Primer mix
- Distile su
- Formamid
- Liz standard (ILS600)

Q-RT PZR kimerizm yönteminde kullanılan kimyasallar ve primerler:

a. Screening Testi için kullanılanlar:

- Master mix (Abbott)
- Primer (CA 001'den CA 034'e kadar olan tüm informatif marker'ların primer setleri ile pozitif ve negative control kuyuları için housekeeping gen marker'ı RNase P genine özel primer set) (Abbott)

- Bidistile su (Milli –Q)
- b. Quantitation Testi için kullanılanlar:
 - Master mix (Abbott)
 - Primer (CA 001'den CA 034'e kadar informative olan marker'ların primer setleri ile pozitif ve negative control kuyuları için housekeeping gen marker'ı RNase P genine özel primer set) (Abbott)
 - Bidistile su (Milli – Q)

3.4. ÇALIŞMADAKİ YÖNTEMLER

3.4.1. DNA İzolasyonu

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Allojeneik Kemik İliği Ünitesi'nde, hemotolojik malignite tanısı alan hastalar ve vericilerinden 10 cc'lik EDTA'lı tüpe kan alındı ve tuz çöktürme yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Hasta ve verici kanları 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan buffy coat'tan 450 µL alınıp her hasta için ayrı hazırlanmış 2 ml'lik santrifüj tüpe konuldu.
2. 450 µL buffy coat üzerine 450 µL DTAB solusyonu eklendi.
3. 5 dakika 68°C'de su banyosunda inkübe edildi.
4. Buffy coat ve DTAB karışımı üzerine 900 µL kloroform eklendi. Karışımaya kadar vortexlendi.
5. 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
6. 1,5 ml'lik santrifüj tüpe 100 µL CTAB ve 900 µL distile su solusyonu hazırlandı.
7. 2 ml'lik santrifüj tüpte oluşan süpernatant, hazırlanan CTAB solusyonuna aktarıldı.
8. 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
9. Üstte oluşan süpernatant döküldü. DNA-CTAB oluşan pelet üzerine 1,2 M NaCl solusyonundan 300 µL ilave edilerek pelet kalkana kadar vortexlendi.

10. 750 µL %99,9'luk etanol ilave edildi. Santrifüj tüpü 1-2 dakika kadar aşağı yukarı çevrilerek DNA gözlendi.
11. 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
12. Üstte oluşan süpernatant döküldü. 1 ml %70'lik etanol ilave edilerek santrifüj tüp 1-2 dakika kadar aşağı yukarı çevrilerek DNA gözlendi.
13. 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
14. Etanol dökülerek, ependorfun dibindeki pelete değmeden steril pamuklu aplikatör ile tüp iyice kurulandı.
15. 500-750 µL distile su ve vortex kullanarak DNA, distile su içerisinde çözüldü.
16. Spektrofotometre'de DNA konsantrasyonu ve saflığı ölçülerek kaydedildi.
17. Elde edilen DNA -20°C'de saklandı.

3.4.2. STR-PZR Kimerizm Yöntemi

3.4.2.1. STR - PZR Kimerizm Protokolü:

1. Hasta nakil öncesi, sonrası ve vericiler için hem amplifikasyon basamağı hem de kapiller elektroforezindeki yürütme için listeler hazırlandı.
2. Konsantrasyonları ölçülmüş olan hastaların nakil öncesi, nakil sonrası ve donörlerin DNA'sı ayrı ayrı 1,5 ml santrifüj tüplerinde sulandırılmalar yapıp DNA konsantrasyonları 0,2-2 ng olabilecek şekilde dilüe edildi.
3. 0,2 ml'lik santrifüj tüplerine hasta nakil öncesi, sonrası ve donör için reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı;
Master mix: 5 µL
Primer mix: 2,5µL
Distile su: 16,5µL konuldu. (hepsi vortexlendi).
4. Dilüe edilmiş olan DNA solusyonlarından 1 µL reaksiyon karışımına eklendi.
5. Total amplifikasyon reaksiyon hacmi 25 µL oldu.
6. Reaksiyon karışımı, plate vortex cihazında vortexlenip santrifüj edildi.
7. Thermal cycler cihazında 2,5 saat aşağıdaki döngü şemasında DNA'lar amplifiye edildi. Amplifikasyon sonucunda +4 °C'de bekletildi.

Döngü sayısı	Sıcaklık	Zaman
1 döngü	96°C	2 dakika
10 döngü	94°C	30 saniye
	60°C	68 saniye
	70°C	50 saniye
22 döngü	90°C	30 saniye
	60°C	60 saniye
	70°C	50 saniye
1 döngü	60°C	30 dakika
	4°C	∞

8. 96 kuyucuklu plate'e hasta nakil öncesi, sonrası ve donör için her bir kuyucuğa; 0,5 µL Liz Size Standart ve 9,5 µL Formamid eklendi.
9. +4°C'de bekleyen amplifiye ürünlerden 1 µL, formamid-liz karışımına eklendi.
10. Final reaksiyon hacmi 10 µL oldu.
11. Fikse edilen amplifiye ürünler +96°C'de thermal cycler cihazında denatüre edildi.
12. Denatüre edilen ürünler ABI 3130XL cihazında yürütüldü.
13. Kapiller elektroforezdeki yürüme işlemine göre DNA ürünlerinin lokuslardaki okutması GeneMapper Programında gerçekleştirildi ve analizleri yapıldı.

Değerlendirme: STR-PZR analizi için GeneMapper yazılımı kullanıldı.

3.4.3. Q-RT-PZR Kimerizm Yöntemi

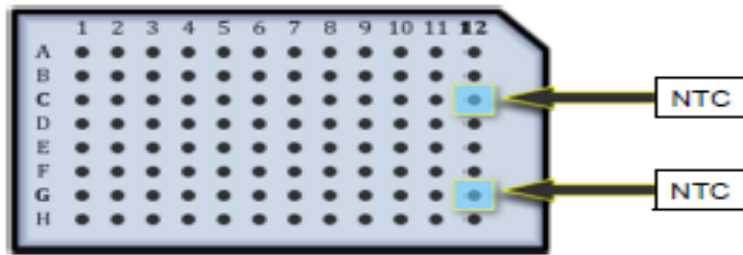
3.4.3.1. Q-RT-PZR Kimerizm Protokolü:

a) Screening Protokolü

Gerçek zamanlı PZR kimerizm screening protokülünün temel amacı; nakil sonrası hasta takibinde, hasta ve vericisi arasındaki farklı olan insersiyon/delesyon belirteçlerinin ayırımına varabilmektir. Vericide olup hastada olmayan bir

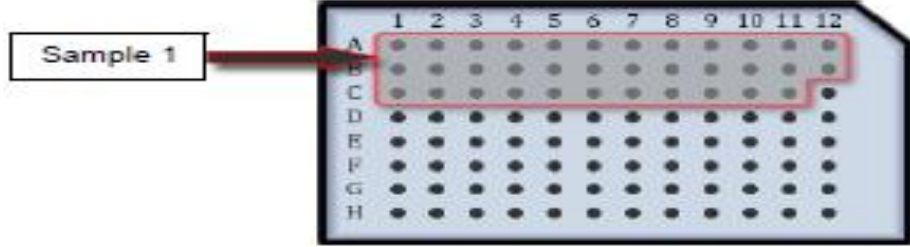
insersiyon/delesyon belirteci bu yöntem için informatif marker olarak tanımlanır. Protokol gereği nakil sonrasında informatif markerların hastada varlığı, nakil sonrası takip için gereklidir. Q-RT-PZR kimerizm yönteminde bu amaçla 34 insersiyon/delesyon, pozitif kontrol olarak da housekeeping gen belirteci RNase P markerları kullanıldı.

1. Hastaların nakil öncesi DNA'ları ile vericilerin DNA'larının konsantrasyonları ölçüldü.
2. AlleleSEQRSuite kimerizm analizi yazılımında DNA konsantrasyonları girildi ve 37 kuyucuk (+1 kuyucuk hata payı olarak hesaplandı) için gerekli olan DNA ve distile su miktarları ile negatif kontrol kuyusu için gereken master mix ve distile su miktarları hesaplandı.
3. 3 adet 1,5 mL santrifüj tüpünün üzerine aşağıdaki bilgiler yazıldı:
 - a. 1. Santrifüj tüp: Hasta DNA adı
 - b. 2. Santrifüj tüp: Verici DNA adı
 - c. 3. Santrifüj tüp: Negatif Kontrol (Hiçbir DNA içermeyen)
4. 1. ve 2. tüplere yazılımdan hesaplanmış olan gerekli miktarlarda DNA ve distile sular eklendi ve 37 kuyucuğa gerekli olan 185 µL master mix her iki tüpe de eklendi.
5. Hem hasta hem de verici PZR'lerinin 2 adet negatif kontrol kuyusu olacağından 3 kuyucuk için (+1 hata payı);
15 µL master mix
60 µL distile su 3.tüpe eklendi.
6. Her 3 tüp vortekslendi.
7. 96 kuyucuklu plate'in C12 ve G12 kuyucuklarına 3.tüpte hazırlanmış olan master mix su karışımından 25 µL negatif kontrol olarak eklendi.

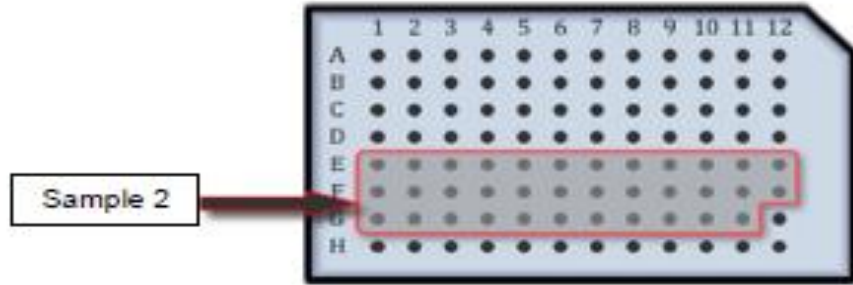


(NTC= No Template Control)

8. Aşağıda işaretlendiği gibi 1. tüpteki hastaya ait 25'er μL DNA+master mix karışımından, AlleleSEQR Screening Plate'te A1 kuyucuğundan C11 kuyucuğuna kadar (C11 kuyucuğu dâhil) pipet ile eklendi.



9. Aşağıda işaretlendiği gibi 2. tüpteki donöre ait 25'er μL DNA+master mix karışımından, AlleleSEQR Screening Plate'te E1 kuyucuğundan G11 kuyucuğuna kadar (G11 kuyucuğu dâhil) pipet ile eklendi.



10. MicroAmp® Optical Adhesive Film Aplikatörü kullanılarak, MicroAmp® Optical Adhesive Film Seal ile plate kapatıldı.
11. Plate iyice vortexlendi.
12. Plate santrifüjü aracılığıyla kuyucuklarda bulunan reaksiyon içeriği çöktürüldü.
13. Plate, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR cihazına yüklendi ve 1 saat sürecek olan gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi.

Değerlendirme: Testin analizi AlleleSEQRSuite Chimerism Analysis yazılımı aracılığıyla hasta ve vericiye ait informatif insersiyon/delesyon belirteçleri tespit edildi.

PZR Koşulları:

Döngü sayısı	Sıcaklık	Zaman
Tek döngü	95 °	10 dakika
40 döngü	95 °	10 saniye
	63°	35 saniye

Primerler: Fluorogenic 5'nükleaz kimyasal boyası ile işaretli oligonükleotid bir prob olan TaqMan teknolojisi kullanıldı.

b) Quantitation Protokolü:

Q-RT-PZR kimerizm yönteminin kantifikasyon protokolü, informatif olan belirteçlerin tespiti sonrasında, hastanın nakil sonrasında donöre ait ne kadar hücrenin bulunduğu dair sonuç elde etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu protokolün kullanılmasının esas amacı nakil sonrası oluşan engraftman başarısının yüzdeli (%) olarak net bir sonuç elde etmektir.

Bu protokol, informatif belirteçlerin tespit edildiği Screening protokolü ardından ya hasta nakil öncesi DNA-hasta nakil sonrası DNA ikilisi ya da hasta nakil sonrası DNA-verici DNA ikilisi kullanılarak uygulanabilir. Bu çalışmada tüm Kantifikasyon testleri, hasta nakil öncesi ve sonrası DNA'ları kullanılarak yapıldı.

1. Hasta nakil öncesi ve sonrası DNA'larının konsantrasyonları ölçüldü.
2. AlleleSEQRSuite Chimerism Analysis yazılımında hastanın nakil öncesi ve nakil sonrası +28. gün DNA konsantrasyon değerleri girilerek gerekli olan DNA, master mix ve distile su miktarları hesaplandı.
3. Teste ait liste yazılımda hazırlandı.
4. Her bir hastanın nakil öncesi ve sonrası için aynı informatif marker kullanıldı. Nakil öncesi ve sonrası için 3'er kuyucuğa informatif markera ait primerlerden, 5'er µL eklendi.
5. Primerlerin bulunduğu kuyucuklara 5'er µL master mix eklendi.
6. İformatif belirteçli kuyucuklara karşılık 6 kuyucuk pozitif kontrol kuyusu olarak belirlendi ve Rnase P'ye ait 5' er µL primer mix, 5'er µL de master mix eklendi ve karanlıkta +4'te saklandı.
7. Daha önceden cihazın yazılımında hesaplanmış olan master mix, distile su ve DNA karışımı hazırlandı.
8. Hazırlanmış olan master mix, distile su ve DNA karışımı vortexlenip hem informatif belirteçli kuyulara hem de pozitif kontrol kuyularına 15 µL eklendi.
9. Kuyucuk başına final reaksiyon hacmi 25 µL oldu.
10. Her bir DNA örneği için bir negatif kuyucuk belirlenip o kuyucuğa 5 µL informatif marker primeri, 5 µL master mix, 15 µL distile su eklendi.
11. MicroAmp® Optical Adhesive Film Aplikatörü kullanılarak, MicroAmp® Optical Adhesive Film Seal ile plate kapatıldı.

12. Plate iyice vortekslendi.
13. Plate santrifüjü aracılığıyla kuyucuklarda bulunan reaksiyon içeriği çöktürüldü.
14. Plate, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR cihazına yüklendi ve 1 saat sürecek olan gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi.

Değerlendirme: Testin analizi AlleleSEQRSuite Chimerism Analysis yazılımıyla kullanılan informatif markerların $\Delta\Delta CT$ değeri hesaplanarak hastada vericiye ait hücre oranı yüzdeli olarak elde edildi.

PZR Şartları:

Döngü sayısı	Sıcaklık	Zaman
Tek döngü	95 °	10 dakika
40 döngü	95 °	10 saniye
	63°	35 saniye

Primerler: Fluorogenic 5'nükleaz kimyasal boyası ile işaretli oligonükleotid bir prob olan TaqMan teknolojisi kullanıldı.

3.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN STR-PZR ve Q-RT PZR DEĞERLENDİRMESİ

3.5.1. STR-PZR Değerlendirilmesi

Çalışmamızda hastanın nakil öncesi ve sonrası intron polimorfizmine ait belirteçlerin kullanıldığı STR-PZR yöntemiyle elde edilen panelin verdiği 16 mikrosatelit lokusu bilgisi ile vericiye ait lokusların bilgileri karşılaştırıldı. Hastaların +28.gün kanlarından izole edilen DNA'larından yapılan STR-PZR kimerizm metodu ile nakil öncesi ve vericisinin DNA'sı kullanarak yapılan STR-PZR kimerizm yöntemleri karşılaştırıldı. Bu bilgilere göre; ABI 3130 cihazındaki yürütme ve GeneMapper yazılımı aracılığıyla hastanın +28. Gün STR-PZR sonucu ile vericiye ait STR-PZR sonucu aynı olanlar tam kimerik, hem vericiye hem de kendisine ait olanlar ise karışık kimerik olarak değerlendirildi. STR-PZR çoğaltılan lokuslara ait bilgiler aşağıdaki gibidir.

Tablo 3- 1: STR-PZR Yönteminde Kullanılan Markerların Özellikleri

STR Lokus	Kromozomal Lokasyonu	Tekrar Dizisi 5' →3'
Penta E	15q	AAAGA
D18S51	18q21.3	AGAA
D21S11	21q11-21q21	TCTA
TH01	11p15.5	AATG

D3S1358	3p	TCTA
FGA	4q28	TTTC
TPOX	2p24	AATG
D8S1179	8q24.13	TCTA
vWA	12p13.31	TCTA
Amelogenin	Xp22.1-22.3 ve Y	*
Penta D	21q	AAAGA
CSF1PO	5q33.3-34	AGAT
D16S539	16q24.1	GATA
D7S820	7q11.21-22	GATA
D13S317	13q22-q31	TATC
D5S818	5q23.3-32	AGAT

*Amelogenin bir STR değildir ancak X'e spesifik 106 baz, Y kromozomuna ait 112 baz uzunluk gösterdiğinden ayırt edici belirteç olarak kullanılmaktadır.

3.5.2. Q-RT-PZR Değerlendirilmesi

Bu çalışmada kullanılan Q-RT-PZR belirteçleri, STR-PZR belirteçlerinden farklı olarak hasta ve verici arasındaki insersiyon/delesyon polimorfizmi ayırt edici özelliği kullanılarak AKKHN takibinde kullanılabilirliği ve hassasiyeti testlendi.

Hasta ve verici arasındaki insersiyon/delesyon varlığı farkı üzerinden nakil izlemine yardımcı olabilmektedir. Q-RT-PZR'de, STR-PZR'den farklı olarak;

1. Hasta nakil öncesi ve vericisi arasındaki informatif markerların (insersiyon/delesyon farklılıklarının) belirlenmesi için ilk basamak testinin yapılması gerekir (Screening Test).
2. Screening protokolünün ardından elde edilen informatif markerın kullanımıyla hasta nakil sonrası ve verici DNA'ları kullanılarak Quantitation protokolü uygulanarak kantitatif kimerizm sonucu elde edilir. Bu test ile Tam Kimerik olarak gözlemlenen hastaların dahi % olarak ne kadar kendisine ait hücrelerin bulunduğu da tespit edilir.

Short tandem repeat-PZR yöntemiyle çalışılmış 39 hastanın tamamı önce screening sonra kantifikasyon protokolü kullanılarak 250 ng DNA olacak şekilde ABI 7500 cihazında testlendi ve tüm analizler AlleleSEQRSuite yazılımında değerlendirildi. Q-RT-PZR kimerizm metodunda 34 informatif marker ile 1 adet RNase P genine ait markerı kullanıldı. RNase P bir house-keeping olarak bilinen bir gen türü olmasından

dolayı internal standart değerinde idi ve pozitif kuyuda kullanılan markerdı. Negatif kuyuya ise testin güvenilirliğini teyit etmek amacıyla, hiçbir marker ve DNA eklenmedi.

Q-RT-PZR kimerizm yönteminde kullanılan primer-prob çiftlerine ait bilgiler tablo 3-2’de yer almaktadır.

Tablo 3- 2: Q-RT-PZR Yönteminde Kullanılan Markerlara Ait Bilgiler

Q-RT PZR Markerlar	Kromozom Lokasyonu	İnsersiyon/Delesyon
CA 001	8	Delesyon
CA 002	14	Delesyon
CA 003	18	Delesyon
CA 004	18	İnsersiyon
CA 005	13	Delesyon
CA 006	1	İnsersiyon
CA 007	1	Delesyon
CA 008	7	İnsersiyon
CA 009	17	İnsersiyon
CA 010	5	Delesyon
CA 011	X	İnsersiyon
CA 012	X	Delesyon
CA 013	6	Delesyon
CA 014	12	Delesyon
CA 015	5	Delesyon
CA 016	17	Delesyon
CA 017	Y	Y-İnsersiyon
CA 018	11	İnsersiyon
CA 019	20	İnsersiyon
CA 020	1	İnsersiyon
CA 021	4	İnsersiyon
CA 022	10	İnsersiyon
CA 023	11	Delesyon
CA 024	3	Delesyon
CA 025	5	Delesyon
CA 026	16	Delesyon
CA 027	6	İnsersiyon
CA 028	20	İnsersiyon
CA 029	2	Delesyon
CA 030	9	Delesyon
CA 031	11	Delesyon
CA 032	6	İnsersiyon
CA 033	12	İnsersiyon
CA 034	1	İnsersiyon
CA 099	14q11.2	Rnaz P geni

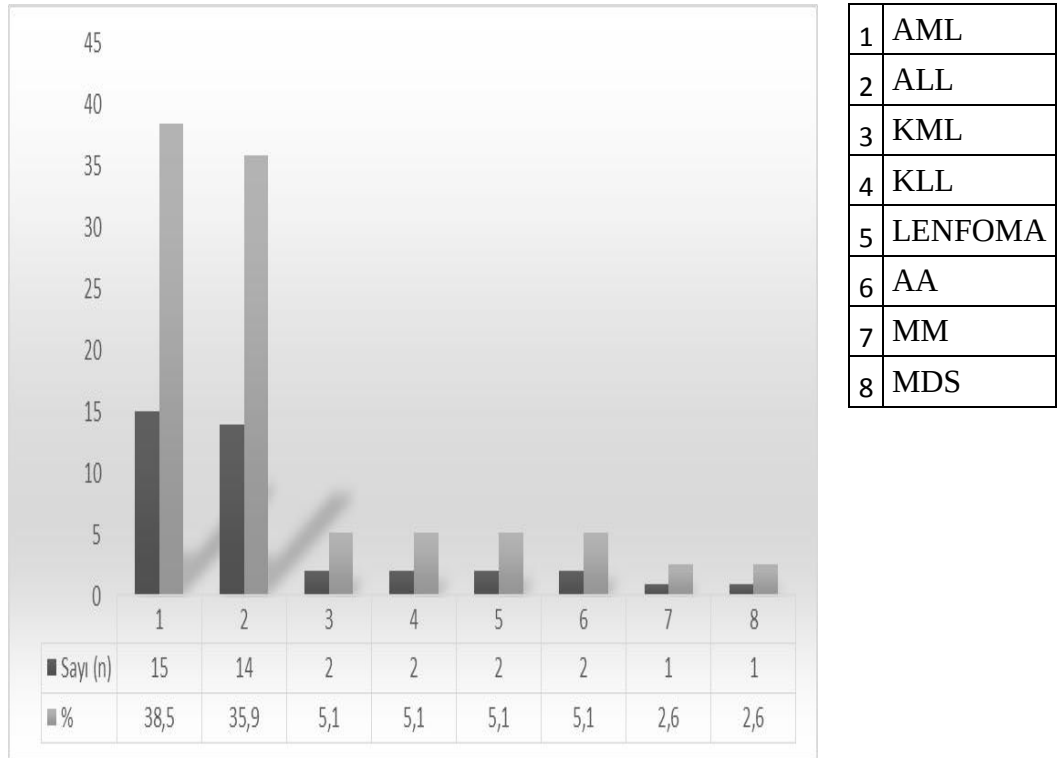
3.6. İstatistiksel Analiz

- Veriler SPSS paket programıyla analiz edildi.
- Sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma, medyan (minimum - maksimum değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi.
- Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı.
- STR-PZR ve Q-RT-PZR yöntemleri arasındaki uyum için Kappa Uyum Analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Temel Özellikleri

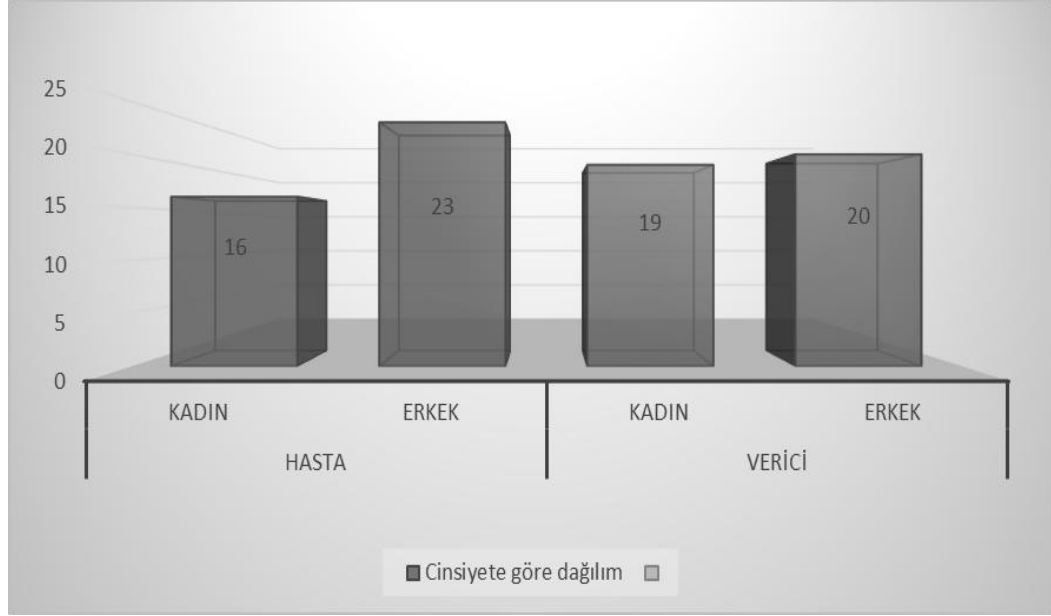
Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Allojeneik Kemik İliği Ünitesi'nde Kasım 2013 - Şubat 2015 tarihleri arasında AKKHN gerçekleşmiş, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda kimerizm izlemi yapılan 39 hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hematolojik malignite tanısı almış olan hastalar, HLA uyumlu akraba içi ve akraba dışı vericiden nakli gerçekleştirilmiştir. Şekil 4-1'de çalışmaya alınan hasta grubuna ait tanı dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 4- 1: Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grubunun Tanılarına Göre Dağılımı

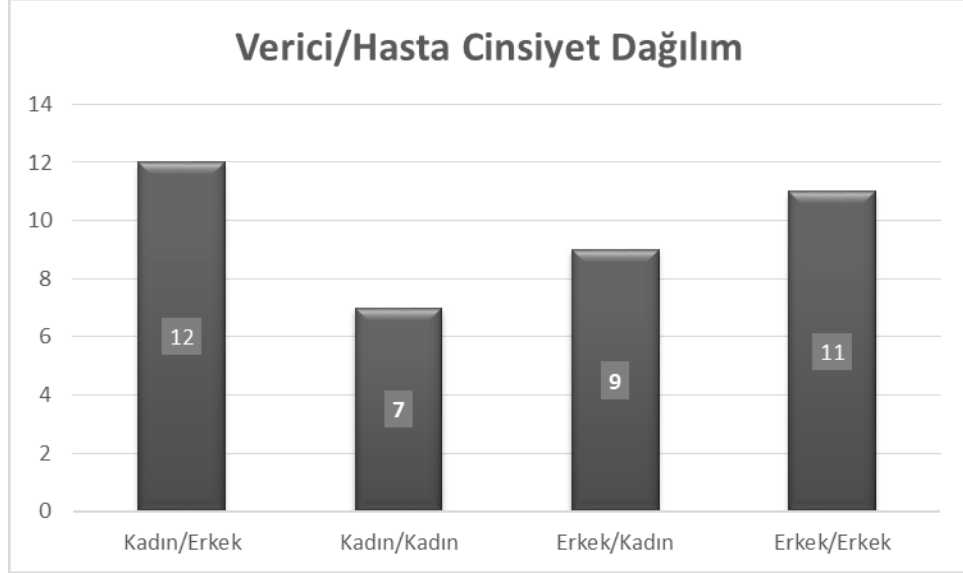
Çalışma, tanılarına göre değerlendirildiğinde başta AML ve ALL olmak üzere en sık akut lösemilerin, sonrasında KML, KLL, Lenfoma ve AA olgularından oluştuğu belirlendi. Akut lösemi grubundan 2 AML tanılı hastada t(8;21), 2 ALL tanısı almış hastada ise t(9;22) saptandı. Çalışmada 15 AML, 14 ALL, 2 KML, 2 KLL, 2 Lenfoma, 2 AA, 1 MM ve 1 MDS tanılı hasta dahil edilmiştir.

4.2. Allojeneik Kan Kök Hücre Nakline İlişkin Genel Bulgular



Şekil 4- 2: Hasta ve Vericilerin Cinsiyetlerine Göre Dağılımı

➔ Allojeneik kan kök hücre nakli olan hastaların 16'sı (% 41) kadın, 23'ü (% 59) erkek ve vericilerin 19'u (% 48,7) kadın, 20'si (% 51,3) erkek olduğu saptandı.



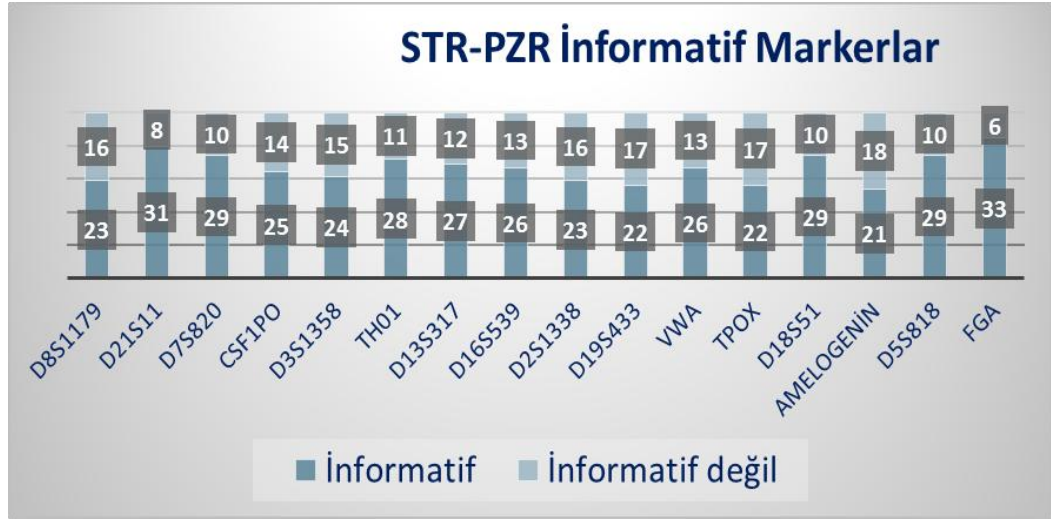
Şekil 4- 3: Cinsiyet Uyumu Açısından Nakiller

➔ Nakiller cinsiyet uyumuna göre değerlendirildiğinde 12'sinin kadın (%30,8) vericiden erkek hastaya, 7'sinin kadın vericiden (%18) kadın hastaya, 9'unun erkek vericiden (%23) kadın hastaya ve 11'inin erkek vericiden (%28,2) erkek hastaya yapıldığı belirlendi.

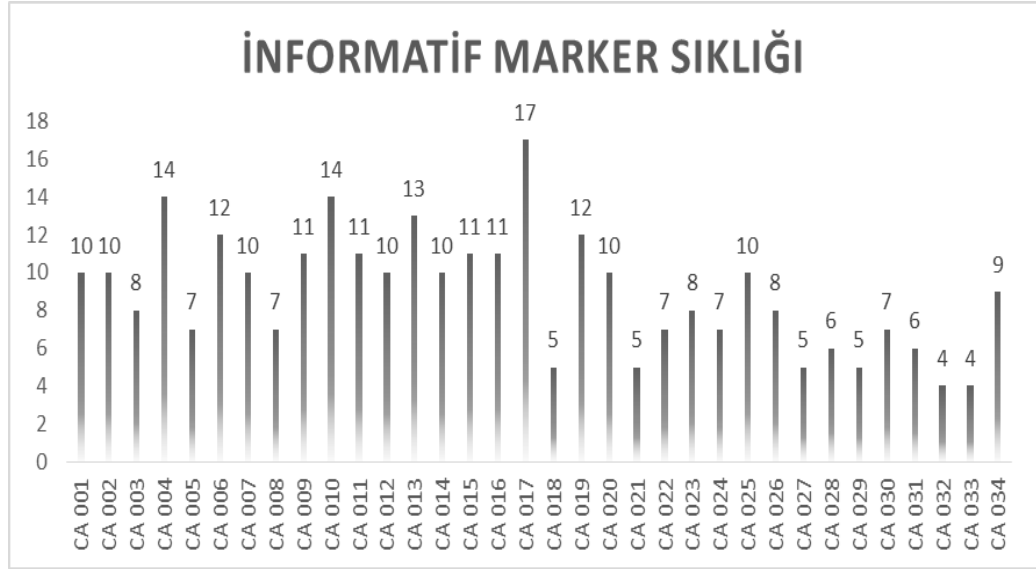
Tablo 4- 1: Verici Seçimine Göre Nakiller

VERİCİ YAKINLIK	Sayı (n)	%
Akraba içi nakil	28	71,8
Akraba dışı nakil	11	28,2
Toplam	39	100,0

➔ Akraba içi 26 hasta kardeşten, 1'i anneden, 1 hasta ise yeğenden; 11 hasta ise akraba içi HLA doku grubu uyumlu vericisi olmaması nedeniyle, İstanbul Tıp Fakültesi Kemik İliği Bankası aracılığıyla bulunan akraba dışı vericilerden nakil olmuştur.

**Şekil 4- 4: STR-PZR İformatif Marker Sıklıkları**

➔ 39 hastanın nakil sonrası, vericiye göre STR-PZR yöntemine göre informatif markerları belirlendi. Nakil sonrasında 33 hastada (%84,6) FGA lokusu polimorfizmi sıklıkla informatif olarak tespit edildi.



Şekil 4- 5: Q-RT-PZR İnfomatif Marker Sıklıkları

→ Hasta ve verici arasındaki insersiyon/delesyon polimorfizmine dayanan farklılıktan yararlanılan Q-RT-PZR sonucuna göre 17 hastada (%43,6) vericilerine göre CA 017 markeri informatif olarak saptanmıştır.

Tablo 4- 2: Hastaların Nakil Sonrası + 28. Gün Kimerizm Değerlendirilmeleri ve Sağ/Ex Durumları

Vaka No	STR-PCR SONUCU	Q-RT PCR SONUCU	EX/SAĞ
Vaka 1	TK	99,90%	Ex
Vaka 2	TK	100%	Ex
Vaka 3	TK	98,80%	Sağ
Vaka 4	TK	97,00%	Ex
Vaka 5	TK	88,00%	Sağ
Vaka 6	TK	99,90%	Ex
Vaka 7	TK	99,50%	Ex
Vaka 8	TK	99,90%	Ex
Vaka 9	TK	69,10%	Ex
Vaka 10	TK	99,60%	Ex
Vaka 11	TK	98,90%	Ex
Vaka 12	TK	99,90%	Ex
Vaka 13	TK	99,90%	Sağ

Vaka 14	TK	86,30%	Sağ
Vaka 15	TK	99,90%	Sağ
Vaka 16	TK	99,90%	Ex
Vaka 17	TK	99,70%	Sağ
Vaka 18	TK	88,00%	Sağ
Vaka 19	TK	99,60%	Sağ
Vaka 20	TK	99,20%	Sağ
Vaka 21	TK	96,40%	Sağ
Vaka 22	TK	98,20%	Ex
Vaka 23	TK	99,90%	Ex
Vaka 24	TK	99,90%	Sağ
Vaka 25	TK	99,90%	Sağ
Vaka 26	TK	100%	Ex
Vaka 27	TK	72,40%	Ex
Vaka 28	TK	99,90%	Sağ
Vaka 29	TK	89,00%	Sağ
Vaka 30	TK	99,90%	Sağ
Vaka 31	TK	69,10%	Sağ
Vaka 32	TK	97,90%	Sağ
Vaka 33	TK	98,40%	Sağ
Vaka 34	KK	72,40%	Sağ
Vaka 35	KK	70,00%	Sağ
Vaka 36	KK	89,00%	Sağ
Vaka 37	TK	99,50%	Sağ
Vaka 38	TK	98,30%	Sağ
Vaka 39	TK	99,20%	Sağ

➔ Q-RT-PZR yöntemi sonucunda, STR-PZR'dan farklı olarak 7 hastada daha +28.günde karışık kimerizm gözlendi. STR-PZR sonucuna göre farklılık tespit edilen hastalardan 2'si ex olmuştur.

Tablo 4- 3: Hasta, Verici ve Nakil Hakkında Genel Bulgular

	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Medyan (Min - Maks)
Hasta yaşı	38,08 $\pm$ 11	39 (18 - 58)
Verici yaşı	37,67 $\pm$ 11,51	37 (17 - 63)
EFS (gün)	111,46 $\pm$ 115,86	61 (9 - 448)
Genel sağkalım (gün)	194,63 $\pm$ 156,43	154 (72 - 464)
Verilen CD 34+ hücre ($\times 10^6$)	7,38 $\pm$ 2,92	6,87 (2,4 - 16,07)
Nötrofil engraftman gelişimi (gün)	16,84 $\pm$ 9,55	15 (8 - 70)
Platelet engraftman gelişimi (gün)	15,87 $\pm$ 10,69	12,5 (6 - 68)

→ Tablo 4-3'te hesaplanan hasta ve verici yaşlarına göre ortalama ve medyan değerleri bulundu. Tüm hastaların, kimerizm izlem süresince genel sağ kalımları ile olaysız sağ kalımları hesaplandı. Buna göre olaysız sağ kalım ortancası 61 gün iken genel sağ kalım 154 gün olarak tespit edildi. Nötrofil ve platelet engraftman gelişimleri de gün bazında değerlendirmeye alındı. Vericiden toplanıp hastaya verilen CD34+ hücre miktarlarına ait bilgiler de istatistiksel açıdan değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil edildi.

Tablo 4- 4: Hazırlık Rejimine Göre Hastalar

HAZIRLIK REJİMİ	Sayı (n)	%
BU+CYC	30	76,9
IDARUB+BU+CYC	1	2,6
CYC+ATG	2	5,1
ATG+BU+FLU	1	2,6
MELFELAN+FLU	1	2,6
BU+CYC+ATG	1	2,6
BU+CYC+FLU	1	2,6
FLU+BU+ ATG	1	2,6
R-BEAM	1	2,6
Toplam	39	100,0

→ Allojeneik kan kök hücre nakli olan hastalara en sık bulsulfan ve siklofosfamid (%76,9) içeren hazırlık rejimi kullanıldı. Hastaların 38'inde periferik kan kök hücre, 1 hastada ise kemik iliği kök hücre kaynağı olarak kullanıldı. Kemik iliği

kök hücresinden nakil olan hastaya akraba dışı vericiden nakli gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4- 5: HLA Uyumuna Göre Hastalar

UYUM DERECEŚİ	Sayı (n)	%
HLA Tam Uyumlu (10/10, 6/6)	34	87,2
Alel A Uyumsuz	1	2,56
Alel B Uyumsuz	1	2,56
Antijen B Uyumsuz	1	2,56
Alel DQB1 Uyumsuz	1	2,56
Antijen DQ Uyumsuz	1	2,56
Toplam	39	100,0

→ Allojeneik kan kök hücre nakli olan hastaların ve vericilerinin HLA uyumuna bakıldığında; 34'ü (%87,2) HLA tam uyumlu ve bu tam uyumlu hastaların 17'si 10/10, diğer yarısı 6/6 tam uyumlu; geriye kalan 5 hasta (%12,8) HLA uyumsuzluğu mevcut nakiller gerçekleştirilmiş idi.

Tablo 4- 6: HLA Uyumuna Göre Engraftman Gelişimi

HLA UYUMU		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Ortanca (Min - Maks)	p
Nötrofil Engraftman Gün	Uyumlu (n=32)	16,69 $\pm$ 10,21	15 (8 - 70)	0,039*
	Uyumsuz (n=5)	17,8 $\pm$ 3,27	18 (14 - 21)	
Platelet Engraftman Gün	Uyumlu (n=33)	16,15 $\pm$ 11,4	12 (6 - 68)	0,049
	Uyumsuz (n=5)	14 $\pm$ 3,46	15 (8 - 17)	

→ HLA Uyumu tüm demografik ve klinik bilgilerle değerlendirildiğinde istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı. HLA uyumlu nakillerde, HLA uyumlu

olmayan nakillere göre daha kısa sürede nötrofil engraftmanının sağlandığı tespit edildi ($p=0,039$).

Tablo 4- 7: İnfeksiyon Gelişimi

CMV	Sayı (n)	%
CMV negatif	12	36,4
CMV infeksiyonu	21	63,6
Toplam	33	100,0
MANTAR	Sayı (n)	%
Mantar pozitif	31	79,5
Mantar negatif	8	20,5
Toplam	39	100,0

➔ Allojeneik kan kök hücre nakli olan 39 hastanın 31’inde (%79,5) mantar infeksiyonu saptanırken, CMV gelişimi hakkında 33 hastanın kesin bilgisine ulaşılmış olup 21 hastada (%63,6) CMV infeksiyonu gelişmiştir.

Tablo 4- 8: Hasta/Verici Kan Grupları Uyumu, Alkol ve Sigara Alışkanlıkları

Hasta Kan Grubu / Verici Kan Grubu	Sayı (n)	%
RH uyumlu	19	48,7
RH uyumsuz	20	51,3
Toplam	39	100,0
ALKOL	Sayı (n)	%
Alkol kullanımı yok	32	97,0
Alkol kullanımı var	1	3,0
Toplam	33	100,0
SİGARA	Sayı (n)	%
Sigara hiç kullanmayan	37	94,9
Sigarayı bırakan	1	2,6
Halen kullanan	1	2,6
Toplam	39	100,0

➔ Tablo 4-7’de hasta ve vericisi arasında kan grubu uyumu, RH uyumlu/uyumsuz nakillere dair bilgiler ile alkol ve sigara alışkanlıklarına dair bilgiler verilmiştir.

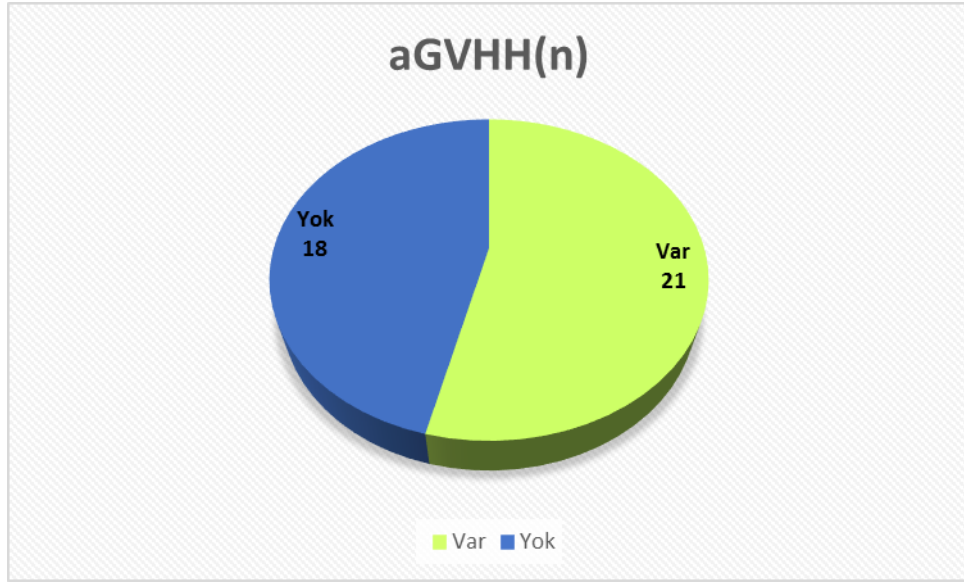
Alkol kullanımına ilişkin toplam 33 hastanın bilgisi elde edilmişken bunlardan yalnızca 1 hastanın alkol kullandığını ve sosyal içici olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Diğer taraftan sigara kullanımına dair tüm hastaların bilgileri elde edilmiş ve 37'sinin hiç sigara kullanmadığı, 1 hastanın nakil öncesi bıraktığı diğer hastanın ise halen kullanmakta olduğu bilgisi elde edilmiştir.

Tablo 4- 9: Erken/Geç Nötrofil ve Platelet Engraftman Başarıları

Nötrofil engraftmanı	Sayı (n)	%
Başarılı engraftman	36	97,3
Geç engraftman	1	2,7
Toplam	37	100,0
Platelet engraftmanı	Sayı (n)	%
Başarılı engraftman	33	86,8
Erken engraftman	1	2,6
Geç engraftman	2	5,3
Başarısız engraftman	2	5,3
Toplam	38	100,0

- ➔ Tablo 4-8'deki veriler üzerinden, nötrofil/platelet engraftman süreleri açısından nakilleri değerlendirdiğimizde; 2 hastanın nötrofil engraftmanı tarihi ile 1 hastanın platelet engraftman tarihleri bilgisine ulaşamamıştır. Nötrofil engraftmanını ortalama $16,84 \pm 9,55$ (min-max; 8 - 70), platelet engraftmanını ise $15,87 \pm 10,69$ (min-max; 6 - 68) günde olduğu tespit edilmiştir. Yalnızca 1 AML tanılı hastada +70. günde nötrofil ve +68. günde platelet engraftmanı, bir ALL hastasında ise +41.günde platelet engraftmanı tespit edilmiştir. Ayrıca 2 ALL tanılı hastanın birinde +24, diğerinde +27. günde geç platelet engraftmanı gözlemlenmiştir.

4.3. GVHH Gelişimine Ait Bulgular



Şekil 4- 6: aGVHH Gelişen Hastalar

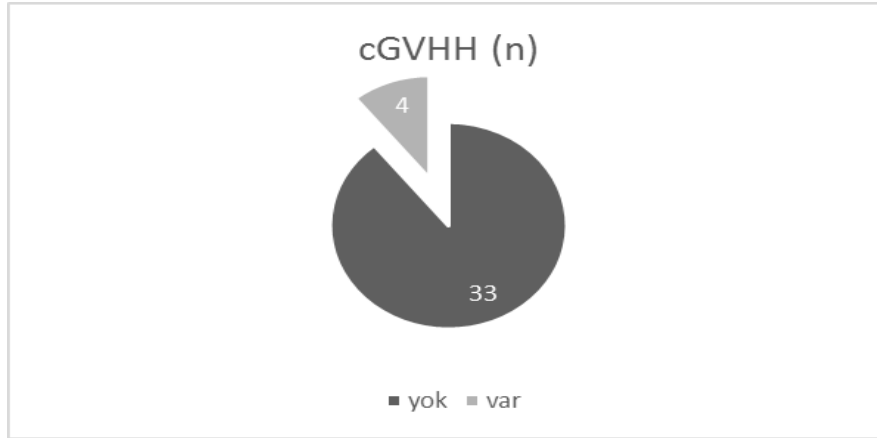
Tablo 4- 10: aGVHH Grade

aGVHH grade	Sayı (n)	%
Cilt grade I	9	45,0
Cilt grade II	7	35,0
Karaciğer grade I	1	5,0
Karaciğer grade III	2	10,0
GİS grade III	1	5,0
Toplam	20	100,0

→ Şekil 4-6'dan da anlaşılacağı üzere AKKHN sonrası 21 hastada (%53,8) aGVHH gelişmiş ve bunlardan 1 hasta hariç tüm hastaların tutulumu ve dereceleri tablo 4-9'da verilmiştir. aGVHH gelişimi olaysız sağ kalım ile karşılaştırıldığında anlamlı (Mann Whitney U test, $p=0,0001$) etkisi olduğu görülmüştür (Tablo 4-10).

Tablo 4- 11: aGVHH - Olaysız Sağ Kalım Etkisi

aGVHD		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Ortanca (Min - Maks)	p
EFS (gün)	yok (n=18)	204,72 $\pm$ 111,58	167 (72 - 448)	0,0001*
	var (n=21)	31,52 $\pm$ 19,6	31 (9 - 96)	
Genel sağ kalım (gün)	yok (n=18)	204,72 $\pm$ 111,58	167 (72 - 464)	0,587
	var (n=21)	213,9 $\pm$ 186,24	111 (83 - 432)	
Verilen CD34+ miktarı	yok (n=18)	7,41 $\pm$ 3,27	6,65 (3,4 - 16,07)	0,666
	var (n=21)	7,34 $\pm$ 2,66	6,91 (2,4 - 12)	
Nötrofil engraftmanı günü	yok (n=17)	14,47 $\pm$ 3,43	14 (8 - 21)	0,085
	var (n=20)	18,85 $\pm$ 12,39	17 (11 - 70)	
Platelet engraftmanı günü	yok (n=17)	14,59 $\pm$ 7,61	12 (8 - 41)	0,504
	var (n=21)	16,9 $\pm$ 12,74	13 (6 - 68)	



Şekil 4- 7: cGVHH Gelişen Hastalar

→ Allojeneik kan kök hücre nakli olan 39 hastanın 37'sinde cGVHH bilgilerine ulaşılmıştır, bu bilgilere göre; 4 tanesinde cGVHH gelişmiştir. Hastalarda cilt grade II ve akciğer tutulumu gözlemlenmiştir. aGVHH'na karşın, cGVHH ve olaysız sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. cGVHH oluşan hasta sayısı yeterli olmadığından istatistiksel analiz yapılmamıştır, ancak tanımlayıcı bilgiler verilmiştir.

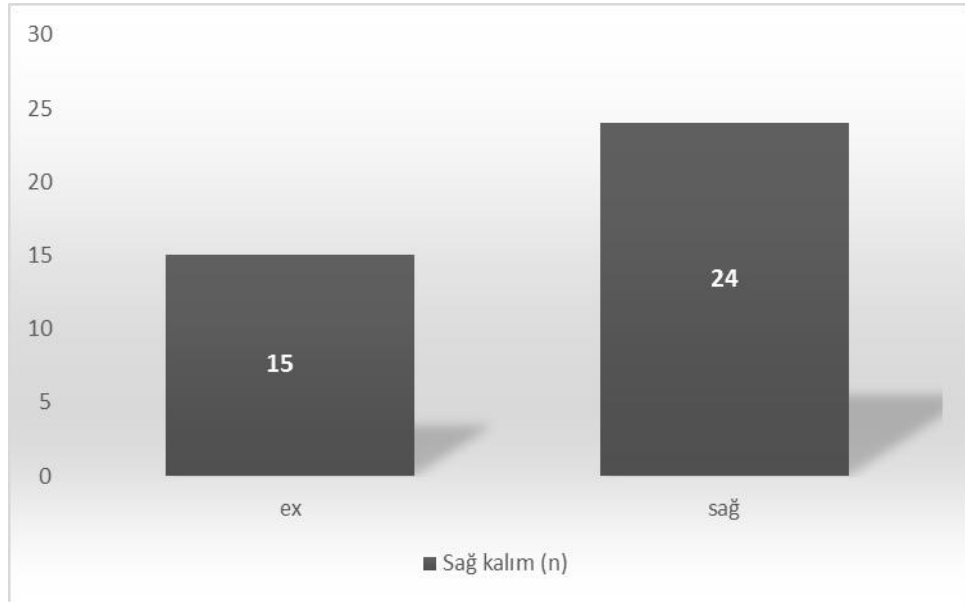
Tablo 4- 12: cGVHH Bilgileri

cGVHH		Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (Min - Maks)
EFS gün	yok (n=33)	112,76 ± 119,39	61 (9 - 448)
	var (n=4)		
		141 ± 124,99	115 (111 - 278)
Genel sağ kalım	yok (n=33)	163,24 ± 158,89	146 (83- 464)
	var (n=4)		
		344,5 ± 319,24	256 (62 - 414)
Verilen CD 34+	yok (n=33)	7,21 ± 2,77	6,8 (2,4 - 16,07)
	var (n=4)		
		7,24 ± 3,58	7,14 (3,4 - 11,28)
Nötrofil engraftmanı günü	yok (n=32)	15,28 ± 3,26	15 (8 - 21)
	var (n=3)		
		36 ± 29,46	20 (18 - 70)
Platelet engraftmanı günü	yok (n=33)	13,73 ± 4,61	12 (6 - 27)
	var (n=3)		
		32,67 ± 30,75	18 (12 - 68)

4.4. Sağ Kalıma Ait Bulgular

Tablo 4- 13: Ex-Sağ Hastalara Ait Bilgiler

Ex ve Sağ	Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (Min - Maks)	P
EFS gün	Ex (n=15)	66,87 ± 65,18	0,097
	Sağ (n=24)	139,33 ± 132,23	
Genel sağ kalım	Ex (n=15)	175,2 ± 171,97	0,246
	Sağ (n=24)	231,21 ± 138,9	
Verilen CD34+	Ex (n=15)	7,51 ± 2,85	0,765
	Sağ (n=24)	7,29 ± 3,02	
Nötrofil engraftman günü	Ex (n=15)	15,87 ± 3,36	0,68
	Sağ (n=22)	17,5 ± 12,15	
Platelet engraftman günü	Ex (n=15)	15,6 ± 8,76	0,637
	Sağ(n=23)	16,04 ± 11,96	



Şekil 4- 8: Hastalara Ait Sağ Kalım

- ➔ Allojeneik kan kök hücre nakli gerçekleştirilen 39 hastanın 15'i (% 38,5) ex, 24'ü (% 61,5) yapılan izlem sürecince sağ olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4-8). Ex ve sağ olan hastaların olaysız sağ kalım, genel sağ kalım, CD34+ hücre

miktarı, nötrofil ve platelet engraftmanı bakımından değerlendirildiğinde anlamlı hiçbir ilişki bulunamamıştır (Tablo 4-12).

4.5. Kimerizm Analizi İçin Kullanılan Yöntemlerden Elde Edilen Bulgular

Tablo 4- 14: STR-PZR ve Q-RT-PZR Yöntemlerine Göre +28. Gün Kimerizm Durumları

Yöntemler	Kimerizm Durumu	Sayı (n)	%
STR PCR SONUCU (n=39)	TK	36	92,3
	KK	3	7,7
Q RT PCR SONUCU (n=39)	TK	29	74,4
	KK	10	25,6

→ STR-PZR yöntemine göre 39 hastanın yalnızca 3'ünde karışık kimerizm gözlenmiş iken, Q-RT-PZR ile STR-PZR yönteminde tespit edilen 3 hasta haricinde 7 hastada daha karışık kimerizm gözlenmiştir. STR-PZR kimerizm yöntemi ile bir hastaya ait sonuç 1-2 gün içerisinde elde edilmiş iken Q-RT-PZR yöntemi ile 3-4 saat içerisinde analizleri sonuçlandırmak mümkün olmuştur.

Tablo 4- 15: Q-RT-PZR Kimerizm Metodu Sonucundan Elde Edilen Bulgular

Q-RT-PZR		Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca (Min - Maks)	p
Hasta Yaş	TK 29	39,45 ± 10,13	40 (19 - 56)	0,189
	KK 10	34,1 ± 12,97	30,5 (18 - 58)	
Verici Yaş	TK 29	37,83 ± 11,71	37 (17 - 63)	0,884
	KK 10	37,2 ± 11,5	38 (23 - 54)	
Nötrofil engraftman günü	TK 29	17,82 ± 10,67	16 (11 - 70)	0,1
	KK 10	13,78 ± 3,49	14 (8 - 20)	
Platelet engraftman günü	TK 29	17,03 ± 11,97	13 (6 - 68)	0,262
	KK 10	12,11 ± 2,47	12 (9 - 16)	
EFS gün	TK 29	86,03 ± 89,64	35 (9 - 342)	0,059*
	KK 10	185,2 ± 153,48	134,5 (16 - 448)	
Genel sağ kalım (gün)	TK 29	188,1 ± 118,86	154 (83 - 459)	0,382
	KK 10	272,2 ± 225,6	212 (61 - 464)	
Verilen CD34+	TK 29	7,87 ± 3	7,2 (2,4 - 16,07)	0,073
	KK 10	5,95 ± 2,2	5,8 (3,4 - 11,28)	

→ Q-RT-PZR kimerizm yöntemi ile hasta, donör yaş verilen CD34+ miktarları iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (independent samples t test) ile istatistik analizi yapıldı ve hiç bir anlamlılık saptanamadı.

- ➔ Verici yaş, olaysız sağ kalım, nötrofil ve platelet engraftman günleri ile Q-RT-PZR sonucu Mann- Whitney U testi ile istatistiksel analizi yapıldı ve olaysız sağ kalım açısından düşük ölçekte de olsa bir anlamlılık tespit edildi ($p=0,059$).

Tablo 4- 16: STR-PZR Kimerizm Metodu Sonucundan Elde Edilen Bulgular

STR-PZR SONUCU		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Ortanca (Min - Maks)	P
Hasta yaş	TK 36			0,14
	KK 3	37,31 $\pm$ 10,89	38 (18 - 56)	
		47,33 $\pm$ 9,29	43 (41 - 58)	
Verici yaş	TK 36			0,038
	KK 3	36,64 $\pm$ 11,35	35 (17 - 63)	
		50 $\pm$ 3,61	49 (47 - 54)	
Nötrofil engraftman günü	TK 36			0,507
	KK 3	17,15 $\pm$ 9,84	15 (11 - 70)	
		13,33 $\pm$ 4,62	16 (8 - 16)	
Platelet engraftman günü	TK 36			0,759
	KK 3	16,14 $\pm$ 11,07	12 (6 - 68)	
		12,67 $\pm$ 3,51	13 (9 - 16)	
EFS gün	TK 36			0,172
	KK 3	105,14 $\pm$ 113,62	43,5 (9 - 448)	
		187,33 $\pm$ 140,63	146 (72 - 344)	
Genel sağ kalım (gün)	TK 36			0,862
	KK 3	211,53 $\pm$ 157,21	154,5 (83 - 464)	
		187,33 $\pm$ 140,63	146 (72 - 344)	
Verilen CD34+	TK 36			0,052
	KK 3	7,6 $\pm$ 2,92	7,01 (2,4 - 16,07)	
		4,73 $\pm$ 1,16	4,48 (3,72 - 6)	

- ➔ STR-PZR kimerizm yöntemi ile hasta, donör yaş ve verilen CD34+ miktarları iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (independent samples t test) ile istatistik analizi yapıldı.
- ➔ Verici yaş, olaysız sağ kalım, nötrofil ve platelet engraftman günleri ile Q-RT-PZR sonucu Mann- Whitney U testi ile istatistiksel analizi yapıldı.

4.6. Korelasyon Analizleri

Tablo 4- 17: Tüm Hastalar için Korelasyon Analizi

		Genel sağ kalım	EFS gün	Verilen CD34+	Nötrofil engraftman günü	Platelet engraftman günü	Hasta yaş	Donör yaş
Genel kalım	sağ r	1	0,196	-0,173	-0,049	-0,190	0,097	0,258
	P		0,233	0,293	0,772	0,252	0,556	0,113
EFS gün	r		1	-0,206	-0,385*	-0,116	0,035	0,126
	P			0,208	0,019	0,487	0,833	0,444
Verilen CD34+	r			1	0,214	0,169	0,088	-0,009
	P				0,203	0,309	0,596	0,959
Nötrofil engraftman günü	r				1	0,390*	-0,163	-0,214
	P					0,017	0,334	0,203
Platelet engraftman günü	r					1	-0,043	0,022
	P						0,798	0,895
Hasta yaş	r						1	0,723*
	P							0,000
Donör yaş	r							1
	P							

→ Tüm korelasyon analizlerinde değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Spearman Korelasyon Katsayısı kullanıldı. Tablo 4-16'ya göre hasta yaş ve donör yaşları arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur ($p=0,000$). Nötrofil engraftman günü ile platelet engraftman günü arasında yine pozitif bir korelasyon ($p=0,017$) ve nötrofil engraftman günü olaysız sağ kalım arasında negatif yönlü bir korelasyon ($p=0,019$) tespit edildi.

→ Ex hastalarda hasta ve verici yaşı arasındaki korelasyon dışında anlamlı bir korelasyon sonucu tespit edilemedi.

Tablo 4- 18: Sağ Hastalarda Korelasyon Analizi

		Genel sağ kalım	EFS gün	Verilen CD34+	Nötrofil engraftman günü	Platelet engraftman günü	Hasta yaş	Verici yaş
Genel kalım	r	1	0,201	-0,268	-0,188	-0,120	0,118	0,300
	p		0,345	0,206	0,402	0,584	0,583	0,154
EFS gün	r		1	-0,339	-0,340	-0,215	0,075	-0,029
	p			0,105	0,122	0,325	0,729	0,894
Verilen CD34+	r			1	0,487*	0,110	0,023	-0,121
	p				0,021	0,617	0,915	0,572
Nötrofil engraftman günü	r				1	0,525*	-0,092	-0,201
	p					0,012	0,683	0,370
Platelet engraftman günü	r					1	-0,103	0,047
	p						0,639	0,831
Hasta yaş	r						1	0,756*
	p							0,000
Verici yaş	r							1
	p							

→ Çalışma süresince kimerizm takibi yapılan hastalardan sağ olanlarının korelasyon analizinde verilen CD34+ miktarıyla nötrofil günü arasında ($p=0,021$) ve platelet ile nötrofil engraftmanları ($p=0,012$) arasında pozitif yönlü bir korelasyon tespit edildi.

➔ Ayrıca STR-PZR ve Q-RT PZR arasındaki uyum için Kappa Uyum Katsayısı kullanıldı. 32/39 olguda (%82,1) uyumlu olduğu tespit edildi (Tablo 4-18).

Tablo 4- 19: Kappa Analizi

			Q-RT-PZR		
			TK	KK	Toplam
STR-PZR	TK	Sayı (n)	29	7	36
		%	74,4%	17,9%	92,3%
	KK	Sayı (n)	0	3	3
		%	0,0%	7,7%	7,7%
Toplam		Sayı (n)	29	10	39
		%	74,4%	25,6%	100,0%

5. TARTIŞMA

Son yıllarda malign ve non malign hematolojik hastalıklar ile bazı solid tümörlerin tedavisinde allojeneik kan kök hücre nakli sıklıkla başvurulmuş tedavi yöntemi haline gelmiştir. Özellikle AKKHN'nin hematolojik hastalıkların tedavisinde kullanılması bu alandaki pozitif yönlü gelişmeler sayesinde yeni bulgu ve bilgilere ulaşılmasına olanak vermiştir. 1950'lerde HLA genlerinin transplantasyondaki yeri ve önemini tespitiyle nakil dinamiklerinin anlaşılması için ilk adım atılmıştır. Bu alandaki gelişmeye paralel GVHH, GVL, erken/geç engraftman başarısı gibi etkenlerin mekanizmasının; AKKHN, remisyon ve relaps üzerine etkileşimlerini anlamamıza ve dolayısıyla hastanın remisyonunda kalmasını sağlayabilmek için nakil sonrası takibin oldukça önemli olduğunun sonucuna varılmıştır.

Kimerizm, bir transplantasyon terminolojisi olarak hastada allojeneik nakil sonrasında verici hücrelerinin varlığının gösterilmesi durumudur. Yani, allojeneik nakil sonrası kan sisteminin vericiye ait olması ve bu yeni oluşan hematopoezin gelişme şeklini gösteren yöntemdir. Kimerizm analizi sayesinde, nakil sonrasındaki kimerizm tipinin tayin edilmesi yanında, ayrıca; nakil sonrası greft kabulü, GVHH gibi patolojik durumların varlığının desteklenmesine de olanak sağlamaktadır.

Kimerizm analizinde; eritrosit fenotiplemesi, immunolojik izotip tayini, sitogenetik ve DNA polimorfizmlerinden yararlanılan genetik yöntemler kullanılmaktadır (4). Günümüzde polimorfizme dayalı yöntemlerin analizi en sık kullanılan yöntemler haline gelmiştir.

Polimorfik bir yöntemin tanımlama amacıyla kullanılması için o sistemin popülasyonda en az % 1 sıklıkta rastlanması gereklidir. İstatiksel açıdan her üç gen lokusundan biri polimorfizm gösterdiğinden genetik çalışmalarda bu belirteçten yararlanmak söz konusudur. İnsan genomunda protein kodlayan ve kodlamayan bölgeler mevcuttur ve tüm genomun yaklaşık olarak % 75'i kodlama yapmayan bölgelerden oluşmaktadır. Bu bölgelerde birden fazla sayıda tekrarlanan nükleotid birimleri bulunmaktadır. İnsan genomunda 2500'den fazla polimorfik bölge tespit edilmiş olup bu polimorfik bölgeler; RFLP, VNTR ve STR olarak bilinmektedirler (71).

Restriksiyon bölgelerinin uzunluk polimorfizmi, ilk keşfedilen polimorfizm türüdür. RFLP yönteminin kimerizm alanındaki duyarlılığı %5-10'dur ve kullanımı elverişsizdir (56).

Allojeneik kan kök hücre nakli sonrasında DNA'nın kodlanmayan bölgelerindeki minisatelit ve mikrosatelit bölgelerindeki polimorfizmden, engraftmanı göstermek amacıyla yararlanılmaktadır. Minisatelitler, 15-50 baz çiftlik ve art arda 20-50 kez tekrarlanan bölgelerden oluşmaktadır ve duyarlılığı % 1-5 arasındadır. Diğer yandan mikrosatelitler 2-3 baz çiftinden oluşan birimlerden oluşmaktadır. Duyarlılığı VNTR analizi ile hemen hemen aynı olmasına rağmen kullanılan yöntemler nedeniyle STR bölgelerinden elde edilen sonucun daha az zaman kaybına yol açması, STR kullanımının sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasına sebep olmuştur.

Son yıllarda Alizadeh ve ark.ları (2) tarafından yayınlanmış olan çalışmada insersiyon/delesyon polimorfizmine dayalı, STR-PZR yöntemine göre daha hassas, daha kesin ve kantitatif değerlendirmeye olanak sağlayan yeni bir kimerizm izlem yöntemi olan kantitatif gerçek zamanlı PZR yönteminin allojenik kan kök hücre nakli sonrasında kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Allojeneik kan kök hücre nakli sonrasında oluşan hematopoezin hasta veya verici kökenli olup olmadığını kantitatif bir yöntemle tayin etmek; engraftman oluşumunu ya da rejeksiyonu ve ayrıca hastalığın nüksünü tahmin edebilmek için oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca kantitatif kimerizm değerlendirmesi; girişimsel GVHH tedavisi, profilaksi yöntemleri ve yakın zamanda oluşabilme ihtimali olan nüksün tedavilerinde uygulanacak immunoterapiye rehberlik edebilmektedir. Üstelik bu rehberlik sayesinde immunsupresyonun yeniden düzenlenmesine (azaltılmasına ve artırılmasına) ya da DLI gibi hayat-kurtaran tedavinin seçimine yardımcı olabilecektir (72).

Allojeneik kan kök hücre nakli sonrası kimerizm izlemi farklı etkenler ile nitelik ve nicelik kazanmaktadır. Hastalık tanısı, nakil sırası hastalık durumu, kullanılan kök hücre kaynağı, hazırlama rejimi ve verilen CD34+ hücre miktarı kimerizmi etkileyen faktörler arasındadır.

Hastada oluşan yeni hematopoezin hem hasta hem de verici orijinli olması durumuna karışık kimerizm adı verilir. Karışık kimerizm bulunan bir olguda allojeneik nakil sonrasında hasta kaynaklı kan hücrelerinin artması, malign olan hastalığın nüksü

ile birlikte düşünülmektedir. Bundan dolayı malign hematolojik hastalıklarda allojeneik kan kök hücre nakli sonrasında yeni oluşan hematopoezin tamamen verici kaynaklı olması, diğer bir deyişle tam kimerizm olması naklin başarılı olduğunu göstermektedir. Ancak tam kimerizm saptaması, diziye özgü ya da kantitatif kimerizm yapılmadığı müddetçe nakil sonrası kimerizm değerlendirmesi için kesinliği gösterememektedir.

Çalışmamız hematolojik malignite tanısı almış 39 hastanın allojeneik kan kök hücre nakli sonrası +28.gün STR-PZR kimerizm yöntemi ile Q-RT-PZR kimerizm yöntemlerini karşılaştırarak bu yöntemlerden elde edilen sonuçların klinik verilerle değerlendirmesini kapsamaktadır.

Çalışmamız erişkin hastaları kapsayan bir çalışma olmuştur. Hastaların yaş ortalaması $38,08 \pm 11$ yıl ve yaş sınırları 18 ile 58 arasındadır. Vericilerin yaş ortalaması $37,67 \pm 11,51$ yıl olup yaş sınırları 17 ile 63 arasında gözlenmiştir. Hasta ve verici yaşları arasında bir korelasyon tespit edildi. Çalışmamıza 15 AML, 14 ALL, 2 KML, 2 KLL, 2 Lenfoma, 2 AA, 1 MM ve 1 MDS tanılı hasta dahil edilmiştir. Çalışmamız yaş ortalaması açısından 15 AML ve 15 ALL tanılı hasta grubundan oluşan Choi ve arkadaşlarının (73) çalışmasına benzerdir.

Hastalar HLA uyumuna göre karşılaştırıldığında HLA tam uyumlu 34 (%87,2) allojeneik kan kök hücre nakline karşılık, 5 (%12,8) nakil HLA uyumsuz vericiden yapıldığı gözlemlenmiştir. HLA tam uyumlu 34 hastanın 17'si akraba içi 6/6 HLA tam uyumlu, 9'u akraba içi 10/10 HLA tam uyumlu, 2'si akraba içi HLA uyumsuz ve 7'si akraba dışı 10/10 HLA tam uyumlu, 3'ü akraba dışı HLA uyumsuz nakil yapıldığı tespit edilmiştir.

Nakil sonrası engraftman takipleri yapıldığında 36 hastanın (%97,3) başarılı nötrofil engraftmanına karşılık, 1 hastanın başarısız nötrofil engraftmanı (nakil sonrası +70.gün) tespit edilmiştir. 33 başarılı (%86,8), 2 gecikmiş (%5,3; biri +27.gün diğeri +24.gün), 1 erken (%2,6) ve 2 başarısız (%5,3; biri +41.gün, diğeri +68.gün) platelet engraftmanları oluşumu gözlenmiştir. Erken engraftman için ilk hafta içerisinde gelişmesi, başarılı engraftman için +7 ve +21.günler arasında gelişmesi, +21. günden sonra gecikmiş engraftman ve +40 günden sonra engraftman gelişmesi ise başarısız engraftman olarak değerlendirildi.

Davies ve arkadaşları (74) tarafından engraftman ve sağ kalım üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, HLA uyumu ile platelet ve nötrofil engraftmanı arasında

istatistiksel bir anlamlılık olduğu saptanmıştır. Bu veri dikkate alınarak HLA uyumu ve nötrofil engraftman ilişkisi incelendiğinde Davies ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak bir anlamlılık saptanmıştır. Bu durum daha fazla sayıda HLA uyumlu ve uyumsuz vakaların yer alacağı gelecekteki çalışmalara ışık tutacağı şeklinde yorumlandı. Ayrıca HLA uyumu ile olaysız sağ kalım ve genel sağ kalım ile de anlamlı bir ilişkisi olmadığı görüldü. Nötrofil ve platelet engraftman süreleri arasında orta derecede bir anlamlılık ile nötrofil engraftman süresi ve verilen CD34+ hücre miktarı arasında pozitif yönlü bir ilişki tespit edildi. HLA uyumunun, nakil sonrası engraftman oluşumuna yaptığı katkının önemli olduğu çalışmamızla gösterilmiş oldu.

Hem STR-PZR hem de Q-RT-PZR yöntemi sonucunda oluşturulan TK ve KK grupları nötrofil ve platelet engraftmanlarıyla değerlendirildiğinde önemli bir istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Choi ve arkadaşlarının (73) yapmış oldukları STR-PZR kimerizm izleminde ise çalışmamızı destekler nitelikte nötrofil ve platelet engraftmanı ile KK ve TK grupları arasında bir anlamlılık saptanamadığı raporlanmıştır.

Lai ve arkadaşlarının (75), 3 ayrı hazırlık rejimi uygulanmış; BU+FLU/BU+CYC/TBI+CYC ve sıklıkla AML tanılı 508 hastanın 2 yıllık takibinde yaptıkları çalışmada aGVHH gelişiminin genel sağ kalım ile olaysız sağ kalım üzerinde negatif yönde etkilediğini ve buna karşılık cGVHH varlığı, özellikle GVL gelişimi etkisi ile birlikte EFS ve genel sağ kalım üzerine pozitif yönde etkileşim gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Buna karşılık sıklıkla BU+CYC hazırlık rejimli, sıklıkla akut lösemi tanılı 39 hastadan oluşan çalışmamızda aGVHH varlığı ve olaysız sağ kalım süreleri arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmuştur. Buna göre aGVHH gelişen hastalarda, gelişmeyen hastalara göre olaysız sağ kalım sürelerinin daha kısa olduğu saptanmıştır. Buna karşılık aGVHH varlığı ile genel sağ kalım, verilen CD34+ hücre miktarı, nötrofil ve platelet engraftman günleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı.

Çalışmamızda 39 hastada STR-PZR yöntemiyle Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D81179, vWA, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 lokusları ve Amelogenin genine ait bölgeler incelendi. Hasta nakil öncesi ve verici arasındaki informatif bilgiler elde edilerek, hastanın nakil sonrası +28. gündeki DNA'sı nakil sonrası kimerizm durumu açısından değerlendirildi. FGA, 36 hastada (%92,3) en sık informatif değere sahip olan STR-PZR markerı olarak gözlemlendi. İkinci sırada ise D21S11 markerı yer almaktaydı. FGA lokusunda sıklıkla 21 aleli,

D21S11 lokusunda sıklıkla 30 aleli sıklıkla yer almaktaydı. <http://allstr.de> veritabanı adresinde Türkiye’de şu ana kadar sıklıkla D16S539 alelinin yer aldığı raporlanmıştır (76). Ayrıca FGA lokusu için çalışmamızdaki gibi sıklıkla 21 aleli, D21S11 lokusu için 30 alelinin en sık olduğu rapor edilmiştir. Choi ve arkadaşlarının (73) 30 hastalık kimerizm çalışmasında sıklıkla TPOX markerının informatifliğinden yararlandıklarını rapor etmişlerdir ve yine aynı veritabanı adresine bakıldığında TPOX’ın Kore için en sık lokus olduğu raporlanmıştır.

STR-PZR kimerizm sonucuna göre 36 hasta (%92,3) tam kimerik, 3 hasta (%7,7) ise karışık kimerik olarak saptandı. Q-RT-PZR sonucuna göre 29 hasta (%74,7) TK, 10 hasta (%25,6) KK göstermiştir.

Lawler ve arkadaşlarının (4) TBI+Siklofosfamid hazırlık rejimi uygulanmış 32 hastadan oluşan çalışması sonucunda hastaların %60’ında KK olduğu raporlanmıştır. Kullandıkları STR-PZR yöntemi bizim çalışmamızda kullandığımız yöntemden farklı olup yalnızca dinükleotid dizi tekrarlı markerdan oluşan multipleks PZR yöntemi ile poliakrilamid jelde yürütülmesiyle kimerizm analizine olanak sağlanan bir yöntemi seçmişlerdir. Bu tekniğin kullanımının sonra gerçekleşecek nakillerde kullanılacak olan hazırlama rejimlerinin değiştirilmesi ile KK görülme sıklığına olumlu etkileri olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Çalışmamızda hem Q-RT-PZR hem de STR-PZR yöntemleriyle TK ve KK tespit edilen vakalarda olaysız sağ kalım açısından değerlendirildiğinde her iki grupta da KK vakalarının olaysız sağ kalımlarının daha uzun olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızla KK vakaları kadar TK vakalarının da büyük bir dikkatle ve hassas yöntemlerle takibinin KK’e dönme riski fazla olan (%95,00 civarı) TK vakaların da dikkatle izleminin tekrar KK’e dönme riski, dolayısıyla relaps, olaysız sağ kalım ve genel sağ kalım süreleri üzerinde olumlu etkileri olacağına öngörmekteyiz.

Barrios ve arkadaşlarının (77) 147 akut lösemi tanılı AKKHN olmuş hastayı kapsayan çalışmasında VNTR yöntemi kullanarak kimerizm takibini yapmışlar. Yaptıkları bu çalışmada karışık kimerik saptanan olgular ile tam kimerik olan olgular, lösemisiz sağ kalım açısından değerlendirildiğinde sağ kalımın karışık kimerik saptanan olgular için daha kısa olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda STR-PZR ve Q-RT-PZR sonuçlarının %82,1 uyumlu (32/39) olduğu tespit edilmiştir. Her iki kimerizm yöntemi ile değerlendirme sonucunda farklı olan KK gösteren vakaların +28.gün sonrasında STR-PZR'a göre daha hassas olan Q-RT-PZR yöntemi ile de takibin yapılmasının erken ve sınırda KK saptanmasının relaps tespiti ve sağ kalım süreleri üzerinde olumlu etkileri olabileceği görüşünü taşımaktayız.

Thiede ve arkadaşlarının (78) Haziran 1997-Mayıs 1999 tarihleri arasında gerçekleşen kimerizm takibinde 121 hastanın STR-PZR ile takibini yapmışlardır. Çalışma grubundan seçtikleri aynı güne ait 14 hastanın hem FISH hem de STR-PZR sonuçlarını karşılaştırarak iki yöntem arasında yüksek bir korelasyon saptamışlardır.

Alizadeh ve arkadaşları (2) 63 hastadan oluşan kimerizm çalışmasında iki yöntemin oldukça uyumlu olduğunu bulmuşlardır (%90). Ayrıca kimerizm incelemesinde daha hassas olan Q-RT-PZR yönteminin STR-PZR yöntemine göre KK gösterilmesinde daha etkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Diğer taraftan Choi ve arkadaşlarının (73) uzun süreli yapmış oldukları STR-PZR yöntemi kullandıkları kimerizm izlemi ile nüks arasında bir ilişki saptamamışlardır. Barrios ve arkadaşlarının (77) raporlamış oldukları çalışmaya göre tam kimerizm gösteren vakaların %25'inde nüks geliştiği gözlemlenmiştir. Bu sebeplerden dolayı VNTR ve STR-PZR yöntemleri ile kimerizm durumunun greft kaynağı bilgisi vermesine karşın erken nüksü tespit etmede duyarlılığı yeterli olamamaktadır. Çalışmamızda Q-RT-PZR ile KK olarak farklı çıkan 2 hastanın nüks nedeniyle ex, 5 hastanın izlem boyunca sağ olduğu raporlanmıştır (Bu 7 hastanın hepsi HLA tam uyumlu olup 3'ü akraba dışı, 4'ü akrabadan nakil olan, 3'ü AML, 3'ü ALL ve biri lenfoma tanılı, hepsine busulfan ve siklofosfamid hazırlık rejimi uygulanmış, 6'sı cinsiyet uyumlu ve 1'i kadın vericiden erkeğe allojeneik kan kök hücre nakli uygulanmış hastalar olduğu rapor edildi). Kantitatif değerlendirme açısından zayıf kalan STR-PZR kimerizm yönteminin daha hassas ve kantitatif sonuç veren Q-RT-PZR yöntemi ile birlikte yapılmasının, daha kesin kimerizm değerlendirmesi ile seçilecek tedavinin yönüne katkı sağlayacağı ve dolayısıyla relaps, sağ kalım üzerine olumlu etkileri olabileceği görüşünü taşımaktayız.

Farklı çıkan olgular için +28. günde STR-PZR ile birlikte Q-RT-PZR yöntemi yapılabilseydi kliniğinin yeniden tartışılıp buna göre immunoterdavilerin düzenlenebilirliği bu çalışmanın geleceği ve geliştirilebilirliği için akılda tutulmalıdır.

Bader ve arkadaşlarının (56) yapmış oldukları çalışmada özellikle AML ve ALL tanılı hastaların KK gözlendiği andan itibaren tam kimerizm gösterene kadar haftalık, sonrasında ise 2 yıla kadar aylık takibinin yapılmasının önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Qin ve arkadaşları (72) tarafından yapılan 8 hastanın uzun süreli Q-RT-PZR kimerizm metoduyla izlemi sonucu hızlı, hassas bir yöntem olduğunu ve karışık kimerizm vakalarının kantitatif değerlendirilmesinin erken nüksün ve greft reddinin tahmininde yardımcı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Çalışmanın geliştirilebilirliği açısından daha uzun süreli takibin % 95 TK tespit edilen ve KK dönebilme riski olan vakaların STR-PZR'ye göre daha hassas yöntem olan Q-RT-PZR ile de takibinin erken KK ve erken nüks tespiti için yararlı olabileceğini öne sürmekteyiz.

Çalışmamızda STR-PZR kimerizm sonuçlarına karşılık hastaların nakil öncesi ve sonrası +28. gün ile vericilerinin DNA'ları kullanılarak Q-RT-PZR kimerizm metodu ile ikinci bir kimerizm değerlendirilmesi gerçekleştirilerek STR-PZR'nin karışık kimerizm olgularındaki verici hücre yüzdesi ile tam kimerik olgulardaki verici yüzdeleri değerlendirildi. STR-PZR ile elde edilen karışık kimerizm verici yüzdeleri ile Q-RT-PZR kimerizm verici yüzde sonuçları korele bir ilişki gösterdi. STR-PZR ile karışık kimerizm gözlenen her 3 olgu Q-RT-PZR kimerizm yöntemi ile de tespit edildi. Öte taraftan STR-PZR yöntemiyle tam kimerizm olduğu tespit edilen 7 olgunun Q-RT-PZR yöntemine göre karışık kimerik olduğu bulundu. Bu vakalardan 2'sinin ex olduğu ve diğer 5'inin çalışma izlem süresince sağ olduğu rapor edildi. Bunlar; hepsi HLA tam uyumlu olup 3'ü akraba dışı, 4'ü akrabadan nakil olan, 3'ü AML, 3'ü ALL ve biri lenfoma tanılı, hepsine busulfan ve siklofosfamid hazırlık rejimi uygulanmış, 6'sı cinsiyet uyumlu ve 1'i kadın vericiden erkeğe allojeneik kan kök hücre nakli uygulanmış hastalardır. Ex olan hastaların STR-PZR ile takibinin yapılamadığı buna karşın sağ olan hastalardan 1'inin 100.günden sonra KK'e döndüğü izlendi.

Bu çalışma sonucunda allojeneik kan kök hücre nakli sonrasında hastaların kimerizm izleminin Q-RT-PZR ile STR-PZR'ye göre daha hassas, daha kesin ve daha yararlı olacağı belirlenmiştir.

Kimerizm değerlendirmesi açısından Q-RT-PZR'nin, STR-PZR yöntemine göre daha hızlı sonuç veren bir yöntem olduğu, tam kimerik vakalarda dahi hasta ve verici

hücre yüzdelerinin saptanmasının kimerizm izleminde, özellikle % 95 seviyelerinde verici hücre kaynaklı tam kimerizm durumundan, karışık kimerizme dönmesi kritik olan vakaların izleminde oldukça yararlı olacağı saptanmıştır.

Bu çalışma, ülkemizde kimerizm analizi için STR-PZR ile Q-RT-PZR yöntemlerinin karşılaştırıldığı ilk tez çalışmasıdır. Allojeneik kan kök hücre nakli sonrası Q-RT-PZR kimerizm yönteminin, erken nüksün saptanması ve seçilecek tedavi için yetersiz kalabilen STR-PZR yöntemine göre güçlü bir yön gösterici olabileceğini öngörmekteyiz.

Bu tez projesi, STR-PZR ve Q-RT-PZR kimerizm yöntemleri karşılaştırılması ve klinik bilgilerle incelenmesi bakımından Türkiye’de yapılan ilk çalışmadır.

6. KAYNAKLAR

1. Klingebiel T, Bader P. Delayed lymphocyte infusion in children given SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2008; **41**: 23–26.
2. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prisé PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; **99**: 4618-4625.
3. Elmaagacli AH, Runkel K, Steckel N, Opalka B, Trenscher R, Seeber S, Scafer UW, Beelen DW. A comparison of chimerism and minimal residual disease between four different allogeneic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase. *Bone Marrow Transplant* 2001; **27**: 809–815.
4. Lawler M, Humphries P, McCann SR. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; **77**: 2504–2514.
5. Klein J. George Snell's First Foray Into the Unexplored Territory of the Major Histocompatibility Complex. *Genetics* 2001; **159**: 435–439.
6. Degos L. Jean Dausset a scientific pioneer: intuition and creativity for the patients (1916-2009). *Haematologica* 2009; **94**:1331-1332.
7. Terasaki P. Jean Dausset (1916–2009). *American Journal of Transplantation* 2009; **9**: 2441–2442.
8. Petersdorf EW. Optimal HLA Matching in Haematopoietic Cell Transplantation *Curr Opin Immunol.* 2008; **20**: 588–593.
9. Bacigalupo A, Socié G, Hamladji RM, Aljurf M, Maschan A, Kyrz-Krzemien S, Cybicka A, Sengelov H, Unal A, Beelen D, Locasciulli A, Dufour C, Passweg JR, Oneto R, Signori A, and Marsh JC. Current outcome of HLA identical sibling vs. unrelated donor transplants in severe aplastic anemia: an EBMT analysis. *Haematologica.* 2015; **100**: 696-702.
10. Strominger JL, Wiley DC, P. J. Bjorkman, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *J Immunol* 2005; **174**: 6-12.

11. Esteban O, Zhao H. Directed Evolution of Soluble Single-chain Human Class II MHC Molecules. *J. Mol. Biol.* 2004; **340**: 81–95.
12. Nadig RR. Stem cell therapy – Hype or hope? *J Conserv Dent.* 2009; **12**: 131–138.
13. Luis TC, Killmann NMB and Staal FJT. Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: Introduction to a series of Spotlight Reviews *Leukemia* 2012; **26**: 86–90.
14. Rao JR, Fleming CC, Moore JE. *Molecular Diagnostics: Current Technology and Applications*. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2006. pp: 242-246.
15. Barrett J. Graft-Versus-Host Disease. İçinde Treleaven J, Barrett J, editörler. *Bone Marrow Transplantation in Practice*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1992. pp. 257 – 272.
16. Bain BJ. *Leukemia Diagnostic*. West Sussex: Blackwell Publishing; 2010.
17. Krance RA, Heslop H, Brenner M. Bone Marrow Transplantation for Pediatric Malignancy. İçinde Burt RK, Deeg HJ, Lothian ST, Santos GW, editörler. *Bone Marrow Transplantation*. New York: Chapman & Hall Publishers; 1996. pp. 253 – 266.
18. Trigg ME. Milestones in the development of pediatric hematopoietic stem cell transplantation-50 years of progress. *Pediatr Transplantation* 2002; **6**: 465–474.
19. Lenarsky C, Parkman R. Bone marrow transplantation for the treatment of immune deficiency states. *Bone Marrow Transplant* 1990; **6**: 361-369.
20. Wahlstrom JT, Dvorak CC, Cowan MJ. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Severe Combined Immunodeficiency. *Curr Pediatr Rep.* 2015; **3**: 1-10.
21. Thomas ED. A history of hematopoietic cell transplantation. *British Journal of Haematology* 1999; **105**: 330–339.
22. Belkacémi Y, Pène F, Touboul E, Rio B, Leblond V, Gorin NC, Laugier A, Gemici C, Housset M, Ozsahin M. Total-body irradiation before bone marrow transplantation for acute leukemia in first or second complete remission. Results and prognostic factors in 326 consecutive patients. *Strahlenther Onkol.* 1998; **174**: 92-104.
23. Reiffers J, Bernard P, David B, Vezon G, Sarrat A, Marit G, Moulinier J, Broustet A. Successful autologous transplantation with peripheral blood

- hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol*. 1986; **14**: 312-315.
24. Wiernik PH, Goldman JH, Dutcher JP, Kyle RA. Neoplastic Diseases of the Blood. *Springer* 2013; **59**: 1321-1345.
 25. Weaver CH, Buckner CD, Longin K, et al. Syngeneic transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1993; **82**: 1981-1984.
 26. Armitage JO. Bone Marrow Transplantation. *N Eng J Med* 1994; **330**: 827-838.
 27. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Stewart P, Bensinger WI, Doney KC, Sullivan KM, Witherspoon RP, Deeg HJ, Appelbaum FR. Marrow harvesting from normal donors. *Blood* 1984; **64**: 630 – 634.
 28. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Jutnner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; **89**: 2233- 2258.
 29. Hong DS, Deeg HJ. Hemopoietic stem cells: sources and applications. *Med Oncol*. 1994; **1**: 63-68.
 30. Tanaka J, Kasai M, Imamura M, Asaka M. Clinical application of allogeneic peripheral blood stem cells transplantation. *Ann Hematol*. 1995; **71**: 265-269.
 31. Grundy M, editor. *Nursing in Heamatological Oncology*. Aberdeen, UK: Baillière Tindall; 2006.
 32. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989; **321**: 1174-1178.
 33. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995; **346**: 214-219.
 34. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993; **81**: 1679-1690.
 35. Mccullough J, Clay ME, Fautsch S, Noreen H, Segall M, Perry E, Stroncek D. Proposed policies and procedures for the establishment of a Cord Blood Bank. *Blood Cells* 1994; **20**: 609-626.

36. Tse WW, Zang SL, Bunting KD, Laughlin MJ. Umbilical cord blood transplantation in adult myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 2008; **41**: 465–472.
37. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*. 1997; **337**: 373-381.
38. Fredric T. Serota, Edith D. Burkey, Charles S. August, Giulio J. D'Angio Total body irradiation as preparation for bone marrow transplantation in treatment of acute leukemia and aplastic anemia. *Radiat Oncol Bio Phys*.1983; **9**: 1941-1949.
39. Thomas O, Mahé M, Campion L, Bourdin S, Milpied N, Brunet G, Lisbona A, Le Mevel A, Moreau P, Harousseau J, Cuilliere J. Long-term complications of total body irradiation in adults. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; **49**: 125-131.
40. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Trasnplant* 2005; **11**: 945-956.
41. Cragg L, Blazar BR, Defor T, Kolatker N, Miller W, Kersey J, Ramsay M, McGlave P, Filipovich A, Weisdorf D. A randomized trial comparing prednisone with antithymocyte globulin/prednisone as an initial systemic therapy for moderately severe acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000; **6**: 441- 447.
42. Weisdorf D, Hakke R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, Kersey J, Filipovich A. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation* 1991; **51**: 1197-1203.

43. Bensinger W. Individual patient data meta-analysis of allogeneic peripheral blood stem cell transplant vs bone marrow transplant in the management of hematological malignancies: indirect assessment of the effect of day 11 methotrexate administration. *Bone Marrow Transplant* 2006; **38**: 539-546.
44. den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, Huczko E, Koning F, Drijfhout JW, Skipper J, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995; **9**: 1476-1480.
45. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1996; **334**: 281-285.
46. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966; **62**: 21-78.
47. Harris AC, Ferrara JL, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br J Haematol.* 2013; **160**: 288-302.
48. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol.* 2006; **43**: 3-10.
49. Toubai T, Tanaka J, Paczesny S, Shono Y, Reddy P, Imamura M. Role of cytokines in the pathophysiology of acute graft-versus-host disease (GVHD): are serum/plasma cytokines potential biomarkers for diagnosis of acute GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT)? *Curr Stem Cell Res Ther* 2012; **7**: 229-239.
50. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974; **18**: 295–304.
51. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hovs J, Thomas ED. Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995; **15**: 825-828.
52. Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol.* 2006; **13**: 426-435.
53. Rose HJ. *A Handbook of Greek Mythology*. London: Methuen and co.; 1958.

54. Anderson D, Billingham RE , Lampkin GH, Medawar PB. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity* 1951; **5**: 379-397.
55. Mystkowska ET, Tarkowski AK. Observations on CBA-p/CBA-T6T6 mouse chimeras. *Embryol. exp. Morph.* 1968; **20**: 33-52.
56. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation* 2005; **35**: 107–119.
57. Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, Read EJ, Carter C, Bahceci E, Young NS, Barrett AJ. Engraftment Kinetics After Nonmyeloablative Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Full Donor T-Cell Chimerism Precedes Alloimmune Responses. *Blood* 1999; **94**: 3234-3241.
58. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957; **257**: 491-496.
59. Durnam DM, Anders KR, Fisher L, O'Quigley J, Bryant EM, Thomas ED. Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. *Blood* 1989; **74**: 2220-2226.
60. Blazar BR, Orr HT, Arthur DC, Kersey JH, Filipovich AH. Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1985; **66**: 1436-1444.
61. Kletzel M, Huang W, Olszewski M, Khan S. Validation of chimerism in pediatric recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) a comparison between two methods: real-time PCR (qPCR) vs. variable number tandem repeats PCR (VNTR PCR). *Chimerism.* 2013; **4**: 1-8.
62. Min GL, Hibbin J, Arthur C, Apperley J, Jeffreys A, Goldman J. Use of minisatellite DNA probes for recognition and characterization of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 1988; **68**: 195-201.
63. Bertheas MF, Maraninchi D, Lafage M, Fraisse J, Blaise D, Stoppa AM, Michel G, Brizard CP, Gaspard MH, Novakovitch G, et al. Partial chimerism after T-

- cell depleted allogeneic bone marrow transplantation in leukemic HLA-matched patients: a cytogenetic documentation. *Blood* 1988; **72**: 89-93.
64. Seong CM, Giralt S, Kantarjian H, Xu J, Swankowski J, Hayes K, Glassman AB, Khouri I, Korbling M, Thall P, Siciliano MJ, Champlin RE. Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2000; **18**: 1831-1836.
 65. Najfeld V, Burnett W, Vlachos A, Scigliano E, Isola L, Fruchtman S. Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes. *Bone Marrow Transplant* 1997; **19**: 829-834.
 66. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Law ME, Zinsmeister AR, Stalboerger PG, Jalal SM, Ash RC, Jenkins RB. Fluorescence in situ hybridization with X and Y chromosome probes for cytogenetic studies on bone marrow cells after opposite sex transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1993; **12**: 149-154.
 67. Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Löffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia* 1993; **7**: 679-687.
 68. Tilanus MG. Short tandem repeat markers in diagnostics: what's in a repeat? *Leukemia* 2006; **20**: 1353-1355.
 69. Wilhelm J, Pingoud A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 2003; **4**: 1120-1128.
 70. Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buño I, Dolstra H, de Witte T, Schattenberg A, van de Wiel-van Kemenade E. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003; **17**: 621-629.
 71. Kletzel M, Huang W, Olszewski M, Khan S. Validation of chimerism in pediatric recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) a comparison between: two methods: Real Time PCR Methods (QPCR) vs. Variable Number Tandem Repeats PCR (VNTR-PCR) *Chimerism* 2013; **4** :1-8.
 72. Qin XY, Li GX, Qin YZ, Wang Y, Wang FR, Liu DH, Xu LP, Chen H, Han W, Wang JZ, Zhang XH, Li JL, Li LD, Liu KY, Huang XJ. Quantitative

- assessment of hematopoietic chimerism by quantitative real-time polymerase chain reaction of sequence polymorphism systems after hematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J* 2011; **15**: 2301-2308.
73. Choi SJ, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee JS, Kim SH, Park CJ, Chi HS, Kim WK. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2000; **26**: 327-32.
 74. Davies SM, Kollman C, Anasetti C, Antin JH, Gajewski J, Casper JT, Nademanee A, Noreen H, King R, Confer D, Kernan NA. Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the National Marrow Donor Program. *Blood* 2000; **96**: 13: 4096-4102.
 75. Lai YR, Chen YH, Hu DM, Jiang M, Liu QF, Liu L, Hou J, Schwarzenberger P, Li QC, Zhang ZM, Liu KY, Huang XJ. Multicenter phase ii study of a combination of cyclosporine a, methotrexate and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis: results of the Chinese Bone Marrow Transplant Cooperative Group (CBMT CG). *J Hematol Oncol*. 2014; **7**: 2-12.
 76. <http://allstr.de/allstr/showPopulation.seam?populationId=turks&cid=559503>
 77. Barrios M, Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Madrigal ME, Castillejo JA, Torres A, Heiniger A. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Heamatologica* 2003; **88**: 801-810.
 78. Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001; **15**: 293-302.

FORMLAR

6.1.1.1. GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRME VE OLUR (RIZA) FORMU

Lösemiler (kan kanserleri), vücuttaki kan üretim sistemini (lenfatik sistem ve kemik iliği) etkileyen kanserlerdir. Lösemiler akut veya kronik olarak (mikroskoptaki görünüşlerine göre alt gruplara ayrılırlar) ve tümörün yayılım ve gelişim özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Genel olarak, akut lösemiler çocuklarda ortaya çıkarken, kronik lösemiler daha çok yetişkinlerde görülme eğilimindedirler. Kan kanserinin hücre tipine göre (myeloid, lenfoid gibi) ve hastalığın süresine göre (akut ve kronik) çeşitleri vardır. Bazı tipler daha hızlı ve kötü bir gidiş gösterir.

Bu nedenle sizlerden, lösemi hastalarının tekrar eden lösemi gelişimine sebep olan nedenlerin tam ve daha kısa sürede anlaşılabilmesini sağlamak için bu çalışmaya sadece kan örneği vererek katılmanız istenmektedir.

Bu çalışma için vereceğiniz kan örneği ve bu kandan elde edilecek DNA (genetik şifre) İstanbul Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında saklanacak ve incelemeler bu laboratuvarında yürütülecektir. Gerekli izinler alınmak koşuluyla, bu örnekler bu konuda çalışma yapmak isteyen başka bilim adamlarının kullanımına da açık tutulacaktır. Yapılacak bilimsel çalışma, çok sayıda örnekle (yaklaşık 40) yürütülecektir. Bu çalışmalardan toplu bir sonuç çıkacaktır. Bu nedenle kısa dönemde çalışma sonuçlarından sizin ve/veya ailenizin diğer bireylerinin yararlanması söz konusu olmayabilir. Fakat vermiş olduğunuz kan örneği ve bu çalışmada yer almanız uzun dönemde myeloid ve lenfoid kaynaklı lösemi olan hastalarda tekrar eden(relaps) lösemi gelişimine yol açan nedenlerin tam olarak anlaşılmasını, yeni tedavi ve tanı yöntemlerini ortaya koyacak çalışmaların yapılmasını sağlayabilir.

Bu kan örneği ile çalışmanın sonlandırılmasından herhangi bir ticari kazanç beklememeyi de taahhüt ediyorsunuz. Bu çalışmaya katılmak için herhangi bir ücret ödemeniz gerekmemektedir.

Bu çalışma, bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumuna bir gider yüklemeyecektir.

Bu çalışmaya katılıp katılmamakta özgürsünüz. Bu çalışmaya katılmayı kabul etmeseniz de merkezimizde yürütülen tedavinizde herhangi bir aksama olmayacaktır.

Yürütülmekte olan bu çalışmanın sonuçları hakkında Figen Abatay’dan bilgi alabilirsiniz. Herhangi bir sorun ya da soru olduğunda 0-538-032-77-42no’lu telefondan kendisine ulaşabilirsiniz.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda genetik/biyolojik incelemeler yapılmak üzere kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kan vermeyi ve çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-soyadı

İmzası

Sayın Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz tarafından İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof.Dr. Fatma S. Oğuz'u, İstanbul Tıp Fakültesi, Temel Bilimler Binası, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı adresinden ve 0-532-373-7035 arayıp ulaşabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

6.1.1.2. GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı-soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon no, faks no)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı:

İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı:

İmzası:

Görevi:

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Tarih : 10.12.2013

Sayı : 1730

Konu : Prof.Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ

Sayın Prof.Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İlgi :Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının 15/11/2013 gün ve 465 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Figen ABATAY'ın yürüteceği 2013/1608 dosya numaralı "Kimerizm Analizi için Short Tandem Repeat-PCR ve Quantitative- Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması " başlıklı çalışma kurumumuzun 22/11/2013 gün ve 20 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	FİGEN	Soyadı	ABATAY
Doğ.Yeri	ŞARKÖY/TEKİRDAĞ	Doğ.Tar.	1983/01/13
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	24884542456
Email	figen.ABATAY@gmail.com	Tel	0-538-032-77-42

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı	2007
Lise	Tekirdağ Tuğlacılar Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2001

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	60	-
Fransızca	Orta	Zayıf	Zayıf	-	DELF-A2

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70.62042		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Word	Çok iyi
MS Excel	Çok iyi
MS Powerpoint	Çok iyi

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Rüzgar sörfü, yüzme ve sinema.