



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE NAKLİ
YAPILACAK HASTALARDA YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. OYA GEZER
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. BURAK Y. ÇİMEN**

MERSİN – 2023



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE NAKLİ
YAPILACAK HASTALARDA YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. OYA GEZER
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. BURAK Y. ÇİMEN**

**Bu tez BAP 2022-2-TP3-4708 kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir**

MERSİN – 2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman insanlığı ile bizlere örnek olan, destek, yardım ve hoşgörülerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Lülüfer Tamer ve Prof. Dr. Mehmet Burak Yavuz Çimen'e,

Çok kısa bir süre asistanı olma şansını yakaladığım ve bundan mutluluk duyduğum hocam Prof. Dr. Sembol Yıldırım'a,

Tezime ait hasta grubu örneklerinin toplanması aşamasındaki katkılarından dolayı Hematoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Pelin Aytan'a,

Tezimin istatistik analizinde yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Ali Türker Çitçi'ye,

Tezimin laboratuvar ve yazım aşamasındaki katkılarından dolayı bilim uzmanı Cemil Gülüm'e,

Asistanlığa başladığım ilk günden itibaren kendimi şanslı hissettiğim ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve tezimin yazımında yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Şenay Balcı Fidancı'ya,

Her zaman destek ve sevgilerini hissettiğim aileme ve anneme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Dr. Oya GEZER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ ve AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. Hücre	10
2.2. Kök Hücre	10
2.3. Hematopoietik Kök Hücre Nişi	12
2.4. Hematopoez	14
2.5. Mezenkimal Kök Hücreler	16
2.6. Hematopoietik Kök Hücre Nakli	16
2.7. Kök Hücre Mobilizasyonu	19
2.8. İmmünofenotipleme-CD Belirteçleri	24
2.9. Akım Sitometri	28
2.10. Monoklonal Gamopati	31
3. MATERYAL ve METOD	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Kullanılan sarf malzemeler	34
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve solüsyonlar	34
3.1.3. Kullanılan cihazlar	34
3.2. Örnek seçimi	34
3.2.1. Örneklerin toplanması	34
3.2.2. Örneklerin alınması ve saklanması	35
3.3. Yöntemler	35
3.3.1. Flow sitometrik analiz	36
3.4. İstatistiksel yöntemler	38
4. BULGULAR	39
4.1. Hastaların tanı anındaki CD138/CD38, CD56, Kappa, Lambda yüzdeleri	39

4.2. Hastaların absolü CD34 sayıları ve yüzdeleri	39
4.3. Lenfosit sayı yüzdeleri ve kapılanan lenfosit bölgesindeki seçilmiş belirteçlerde meydana gelen değişiklikler	40
4.4. Monosit sayı yüzdeleri ve kapılanan monosit bölgesindeki seçilmiş belirteçlerde meydana gelen değişiklikler	41
4.5. Lenfosit kapısında seçili belirteçler arası korelasyonlar	42
4.6. Monosit kapısında seçili belirteçler arası korelasyonlar	43
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
7. KAYNAKLAR	51
8. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	59
9. ŞEKİLLER DİZİNİ	61
10. TABLOLAR DİZİNİ	62

ÖZET

Hematopoietik kök hücre nakli, hematolojik malignitelerde ve diğer bir çok hastalıkta terapötik bir seçenektir. Otolog hematopoietik kök hücre nakli, hastadan toplanan kök hücrelerin hazırlık rejimi sonrasında hastaya verilmesidir. Kök hücrelerin toplanması için periferik kana mobilizasyonu gereklidir. Mobilizasyon için en yaygın kullanılan yaklaşım, granülosit koloni stimüle edici faktörün (G-CSF) tek başına veya yüksek doz kemoterapi ile birlikte verilmesidir. Farklılaşma kümesi (Cluster of Differentiation=CD) belirteçleri, hücreleri ayırt etmede anahtardır ve akım sitometri ile immünfenotipleme yapılarak tespit edilebilirler. Bu şekilde lösemi, lenfoma, miyeloma, immün yetmezlikler, otoimmün ve trombosit hastalıklarının tanısı sağlanabilmektedir. Monoklonal gamopati, bir monoklonal immünoglobulin veya fragmanının, B lenfositlerin klonal proliferasyonu ile üretildiği bir durumdur. Multiple miyelom bunlardan birisidir. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada multiple miyelom olan ve otolog hematopoietik kök hücre nakli planlanan hastalarda siklofosfamid ve G-CSF'nin CD45, CD34, CD38, CD45RA, CD71, CD90, CD117 gibi belirteçler üzerine olan etkilerini saptamak amaçlandı.

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Hastanesinde takip edilen 13 hasta dahil edildi. 0. günde siklofosfamid verildikten sonra, 5. günde G-CSF, 6 gün süreyle sabah, akşam uygulandı. 11. günde sadece sabah dozu verildi. 0. günde siklofosfamid uygulanmadan önce ve 11. günde G-CSF uygulandıktan 1 saat sonra içerisinde etilen diamin tetra asetik asit bulunan hemogram tüplerine 2 ml kan örneği alındı. Akım sitometrik yöntemle, seçilen belirteçlerin yüzde sayıları ve meydana gelen farklılıklar tespit edildi. Lenfosit kapısında CD38⁺ ve CD45RA⁺ hücre sayısında azalma, CD34⁺,CD90⁺/CD34⁺ hücre sayısında artma ve CD90⁺/CD34⁺, CD117⁺/CD34⁺ hücrelerde 0. gün ile 11. gün değerleri arasında pozitif yönde yüksek seviyede doğrusal bir ilişki varlığı saptandı. Monosit kapısında total monosit sayısında artma, CD45RA⁺ hücre sayısında azalma tespit edildi.

Elde ettiğimiz bulguların, multiple miyelomun otolog hematopoietik kök hücre nakli ile tedavisinde yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelime: Akım sitometri, CD, Granülosit koloni stimüle edici faktör, Multiple miyelom, Otolog hematopoietik kök hücre nakli

ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation is a therapeutic option in hematological malignancies and other many diseases. Autologous hematopoietic stem cell transplantation is the return of stem cells collected from the patient after the preparatory regimen. The mobilization of stem cells into the peripheral blood is necessary. The most commonly used approach for mobilization is granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) alone or in combination with high-dose chemotherapy. Cluster of Differentiation (CD) markers are key in distinguishing cells and can be detected by immunophenotyping by flow cytometry. In this way, the diagnosis of leukemia, lymphoma, myeloma, immune deficiencies, autoimmune and platelet diseases can be provided. Monoclonal gammopathy is a condition in which a monoclonal immunoglobulin or fragment is produced by clonal proliferation of B lymphocytes. Multiple myeloma is one of them. In the light of this information, it was aimed to determine the effects of cyclophosphamide and G-CSF on CD45, CD34, CD38, CD45RA, CD71, CD90, CD117 in patients diagnosed multiple myeloma and planned for autologous hematopoietic stem cell transplantation.

Thirteen patients followed in Mersin University Hospital were included. After cyclophosphamide was given on day 0, G-CSF was administered on the 5th day in the morning and evening for 6 days. On day 11, only the morning dose was given. Before cyclophosphamide administration on day 0 and 1 hour after G-CSF administration on day 11, 2 ml blood sample was taken into hemogram tubes with ethylene diamine tetra acetic acid. Percentages, and differences of selected markers were determined by flow cytometric method. In the lymphocyte gate there was a decrease in CD38⁺ and CD45RA⁺ cells, an increase in CD34⁺ and CD90⁺/CD34⁺ cells and a high level of positive linear correlation between CD90⁺/CD34⁺, CD117⁺/CD34⁺ cells. In the monocyte gate there was an increase in total monocytes and a decrease in CD45RA⁺ cells.

We think that our findings will be helpful in the treatment of multiple myeloma by autologous hematopoietic stem cell transplantation.

Keywords: Flow cytometry, CD, Granulocyte colony stimulating factor, Multiple myeloma, Autologous hematopoietic stem cell transplantation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler (KH), insan vücudunun özelleşmemiş hücreleridir. Bir organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilirler ve kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Hem embriyo hem de yetişkin hücrelerinde bulunurlar.¹

Hematopoietik sistem, insan sağlığı ve hastalıklarında çok sayıda önemli rol oynar. Homeostazda bozukluk, anemi, hemofili, immün yetmezlik, allerji, lösemi ve lenfoma gibi bir dizi hastalığa neden olabilir. Homeostaz, karmaşık bir kemik iliği (Kİ) mikro ortamı veya nişi içinde bulunan hematopoietik kök hücre (HKH) ve progenitör hücreler tarafından sürdürülür. İçsel programların ve dışsal sinyallerin oldukça dinamik ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir organizasyonudur. HKH'ler çok yönlülük ve kendini yenileme kapasiteleri nedeniyle bir alıcıya transplantasyonun ardından tüm kan sistemini yeniden oluşturabilirler ve hematopoiezi uzun süre devam ettirebilirler. Homeostaz ve stres sırasında kan ve bağışıklık hücresi üretimi talebini karşılamak için çoğalırlar ve farklılaşırlar.^{2,3}

Hematopoietik progenitör hücreler Kİ mikroçevresine çeşitli adeziv interaksiyonlarla bağlanırlar. Çok sayıda yüzey reseptörü eksprese ederler. Bu reseptör-ligand interaksiyonlarının inhibisyonu progenitör hücrelerin artmış mobilizasyonu ile sonuçlanır.⁴

Mobilizasyon; periferik kan KH toplanmasından önce verilen tedavi ile hastanın veya donörün Kİ'den periferik kana KH'lerin salınmasıdır.⁵

Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) mobilizasyona neden olmak için en sık kullanılan farmakolojik ajandır. Nötrofil elastaz aktivitesi, katepsin G salınımı ve stroma kaynaklı faktör 1 (stroma derive faktör 1 (SDF1)=CXC kemokin ligand 12 (CXCL12)) seviyelerindeki düşüş yoluyla miyeloid kompartmanın genişlemesine neden olur. CXC kemokin reseptör 4 (CXCR4) inhibitörü olan plerixafor diğer bir ajandır. CXCL12-CXCR4 bağlanmasını tersinir şekilde bloke eder. Siklofosfamid, KH mobilizasyonu amacıyla G-CSF ile birlikte sıklıkla kullanılmaktadır. Kemoterapi veya radyasyona maruz kalma, Kİ hipoksisini artırır. Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1α'nın stabilizasyonu, artan vasküler endotelial büyüme faktörü seviyelerine bağlı olarak sinüzoidlerin vazodilatasyonu yoluyla mobilizasyonu artırır.⁶

Hematopoietik KH nakli hematolojik malignitelerde, konjenital veya edinsel hematopoietik sistem bozukluklarında, bazı solid tümörlerde, otoimmün

ve kalıtsal metabolik bozukluklarda terapötik bir seçenek olarak kullanılmaktadır.⁷

Verici tiplerine göre; Allojenik, otolog, singeneik HKH nakli olarak üç gruba ayrılmaktadır.⁸

Hematopoietik KH kaynakları; Kİ, mobilize periferik kan ve kordon kanıdır.⁵ Otolog ve allojenik HKH nakillerinde mobilize edilmiş periferik HKH'leri, Kİ kaynaklı KH'lerin yerini almıştır.⁹

Kan hücreleri, koloni stimüle edici faktörler gibi sitokinlerin kontrolü altında, miyeloid ve lenfoid soylara farklılaşan ve çoğalan KH'lerden oluşurlar. Farklı soylardan gelen öncü hücreler değişik yüzey molekülleri eksprese ederler. Bunlar farklılaşma kümesi (Cluster of Differentiation=CD) belirteçleri (CD antijenleri) olarak tanımlanmaktadır. Lökositlerin plazma zarlarıyla ilişkili CD antijenleri, çeşitli işlevlerde yer alan moleküller olabilir (hücre-hücre etkileşimleri, sitokin reseptörleri, hücre sinyalleri, iyon kanalları, taşıyıcılar, enzimler, immünoglobulinler veya yapışma molekülleri). Hücreler belirli soylar boyunca farklılaştıkça, CD antijenlerinin ifadesi değişir. Lökositler üzerinde CD antijenlerinin ekspresyonu akım sitometri (AS) ile belirlenmektedir.¹⁰

Akım sitometri, tekli veya çoklu lazerlerden geçerken, tamponlu bir solüsyonda asılı olan hücreleri veya partikülleri hızla analiz eden bir teknolojidir. Her parçacık, görünür ışık saçılımı ve bir veya daha fazla floresan ile analiz edilir. Görünür ışık dağılımı; hücrenin göreceli boyutunu gösterebilen öne saçılan (Forward Scatter veya FSC) ve hücrenin granülarite düzeyini gösteren 90°'de yana saçılan ışık (Side Scatter veya SSC) olarak iki farklı şekildedir. Işık saçılımı floresandan bağımsızdır. Ayrıca floresan dedektörler ile de antijen varlığında reaksiyon oluşturan floresan bir madde ile işaretlenmiş antikorun floresansı ölçülür.¹¹

Farklılaşma kümesi (Cluster of Differentiation=CD) belirteçleri, hücreleri ayırt etmede anahtardır ve yüzey CD belirteçleri hücre tipine bağlı olarak belirli fonksiyonlara sahiptir. Çevresel koşullara ve hücre içi genetik değişikliklere yanıt olarak farklı şekilde ifade edilebilirler.¹²

Multipl miyelom (MM) kanın sistemik malign bir hastalığıdır. Kİ'de monoklonal plazma hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonu ile karakterizedir. İşlevsiz immünoglobulinlerin veya immünoglobulin zincirlerinin üretimine yol açar.¹³

Otolog KH transplantasyonu, MM'da daha yüksek tam remisyon oranları ile sonuçlandığından ve geleneksel kemoterapiden daha uzun sağkalım sağladığından genç hastaların birinci basamak tedavisinde altın standart olarak kabul edilir.¹⁴

Çalışmada Mersin Üniversitesi Hastanesinde takip edilen 13 MM hastasının kan örnekleri kullanıldı. Hastalara hematoloji bölümünde 0. günde 2,5 g/m² siklofosfamid verildikten sonra, 5. günde G-CSF (filgrastim), 60 kg altı hastalara 5 µg/kg, 60 kg üstü hastalara 48 milyon Ü subcutan 6 gün süreyle sabah, akşam 12 saat arayla uygulandı. 11. günde sadece sabah dozu verildi. 0. günde siklofosfamid uygulanmadan önce ve 11. günde G-CSF'nin sabah dozu uygulandıktan 1 saat sonra içerisinde etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) bulunan hemogram tüplerine 2 ml kan örneği alındı. Akım sitometrik yöntemle, 0. günde ve 11. günde alınan örneklerde CD45, CD34, CD38, CD45RA, CD71, CD90, CD117 hücre yüzey belirteçleri çalışıldı. 0. gün siklofosfamid uygulanmadan önceki ve 11. gün toplam G-CSF dozları bittikten sonraki azalış ve artışlar değerlendirildi.

Çalışma sonucunda elde edilen verilerle, MM hastalarında otolog KH transplantasyonu tedavisinde siklofosfamid+G-CSF protokolünün kök hücre mobilizasyonuna olan etkilerini belirlemeyi amaçladık. Bu çalışma sonuçlarının MM hastalarının tedavisinde önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre

Robert Hooke tarafından 1665'te, küçük oda anlamına gelen hücre; cell (İng), cellula (Lat), “yaşayan en küçük biyolojik yapı” olarak tanımlanmıştır. 1839 yılında Matthias Jakob Schleiden ve Theodor Schwann “Hücre Teorisi” ni tanımlamışlardır:

1-Hücre, yaşamın en küçük fonksiyonel yapı taşıdır ve tüm canlılar bir veya daha fazla hücreden meydana gelmiştir.

2-Yeni hücreler kendilerinden önce var olan hücrelerin bölünmesiyle meydana gelir.

3-Bir organizmanın tüm yaşamsal fonksiyonları onu oluşturan hücrelerin içinde gerçekleşir.

4-Tüm hücreler, hücre fonksiyonlarını düzenleyen hereditör bilgiyi sonraki kuşaktaki hücrelere aktarırlar.¹⁵

2.2. Kök Hücre

Kök hücre (KH) ler; kendilerini yenileyebilme (self-renewal), başka hücrelere dönüşebilme (potency), sınırsız çoğalabilme, hasarlı dokuyu onarabilme ve klon oluşturabilme (clonality) özellikleri ile tanımlanırlar. Kolay elde edilmeleri, bol miktarda bulunmaları, birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, otolog veya allojenik alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp uygulamalarında tercih edilmektedirler.¹⁶

Farklılaşma kapasitelerine göre KH'ler; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak ayrılır. Totipotent KH'ler, bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahiptirler. Zigot, organizmayı oluşturacak tüm hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip ilk totipotent hücredir. Totipotent KH'ler, ekstra embriyonik yapı olan göbek kordonu, amniyon kesesi, Wharton jeli ve plasentayı oluşturarak pluripotent, multipotent ve unipotent özellik gösterebilirler. Pluripotent KH'lerin tüm germ yapraklarına (endoderm, ektoderm, mezoderm) ait dokuları oluşturabilme kapasiteleri vardır. Fetal veya yetişkin hücre tiplerini oluşturabilirler fakat bir organizmayı oluşturacak yeteneğe sahip değildirler. Multipotent KH'ler, insan vücudunda sadece birkaç hücre türüne, laboratuvar ortamında gerekli koşullar ve sinyaller sağlandığında daha

fazla hücre türüne dönüşebilen hücrelerdir. Unipotent KH'ler, tek bir hücre grubuna farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir. Doku yenilenmesinde de rol oynarlar fakat geniş doku hasarlarının tamiri için pluripotent KH'lere ihtiyaç vardır. KH'ler, temelde elde edildikleri kaynağa göre ikiye ayrılırlar; Embriyonik KH'ler ve embriyonik olmayan KH'ler.^{17, 18}

Embriyonik Kök Hücreler:

Embriyonun erken gelişim sürecinde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Pluripotenttirler ve her 3 germ tabakasının tümüne de farklılaşabilirler.¹⁸

Embriyonik Olmayan Kök Hücreler (Yetişkin Kök Hücreler):

Erişkin bireylerden elde edilen, bulundukları dokuların farklı birçok hücrelerini oluşturabilen (multipotent), embriyonik KH'lere göre daha sınırlı sayıda hücre tipini oluşturma yeteneğine sahip hücrelerdir. Hematopoietik (H) ve mezenkimal (M) KH'ler, üzerinde en çok çalışılanlardır. Kalp ve damar sistemi, kas ve iskelet sistemi, sindirim sistemi, sinir sistemi, epitel doku, testis ve ovaryum KH'leri unipotent özellikteki diğer yetişkin KH'leridir.¹⁹

Hematopoietik Kök Hücreler

Periferik kan hücrelerini oluşturan KH'lerdir, kırmızı hücreler, beyaz hücreler veya trombositler gibi üç tip kan hücresinden herhangi birine dönüşebilirler. İki tip HKH tanımlanmıştır;

- 1) The long-term repopulating cells (LTRC): Hayat boyunca kendini yenileme ve çok soylu farklılaşma potansiyelini sürdürebilen hücrelerdir.
- 2) The short-term repopulating cells (STRC): LTRC'den türemiş, daha sınırlı kendini yenileme potansiyeli sergileyen hücrelerdir. Yaklaşık 6 hafta gibi kısa bir süre için miyeloid ve/veya lenfoid bölmeleri yeniden oluştururlar.²⁰

Hematopoietik KH kaynakları; kemik iliği (Kİ), periferik kan ve kordon kanıdır.²⁰

Hematopoietik KH nişi, içinde bulunduğu anatomik konum ve fizyolojik mikro ortamdır. HKH'ler niş içinde ikamet eder ve kendini yeniler.²⁰

2.3. Hematopoietik Kök Hücre Nişi

Hematopoietik KH'ler Kİ mikroçevresinde, özelleşmiş alan olan nişlerinde bulunmaktadır. KH'ler, adezyon mekanizmaları da dahil olmak üzere çeşitli moleküler sinyalleri değiştirerek niş ile etkileşirler. HKH'lerin kendilerini yenilemesi, hücre siklusunun G₀ evresinde sessiz olarak kalmaları, adezyonları, proliferasyonları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya yönelmeleri, Kİ'den ayrılıp dolaşıma girmeleri (mobilizasyon), dolaşımdan Kİ'ne geri dönmeleri (homing) ve yerleşimleri (engraftman) gibi süreçler bu nişlerde sağlanmaktadır. HKH'ler osteoblastik (endosteal) niş ve vasküler niş olmak üzere iki yerde ikamet ederler. Nişler; osteoblastlar, osteoklastlar, nestin+ MKH'ler, sinüzoidal endotel, perivasküler stromal hücreler, bağışıklık hücreleri, sinir hücreleri, CXC kemokin ligand 12 (CXCL12)'den zengin retiküler hücreler (CXCL12 abundant reticular cells=CAR)'den oluşurlar.^{21, 22}

Osteoblastik (endosteal) niş, kemiğin iç yüzeyindedir. Osteoblastlar ana hücre tipidir. HKH'ler ve osteoblastlar birbirlerine adezyon molekülleri aracılığı ile bağlanırlar. Bu bağlanma, KH sessizliğinin korunmasına katkıda bulunur. Osteoblastlar, HKH'lerin tutulmasında rol alan osteopontin, N-kaderin, anjiyopoetin-1 (Ang-1), trombopoetin, Jagged 1 (Notch ligand) ve CXCL12 (diğer adıyla stroma kaynaklı faktör 1 (stroma derive faktör 1 (SDF1)) salgılar ve eksprese ederler. Aynı zamanda granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve IL-6 gibi HKH'lerin genişlemesi ve farklılaşmasına neden olan faktörler sentez ederler. Jagged 1'in HKH üzerindeki reseptörü Notch'dur. Ang-1, HKH tarafından eksprese edilen, bir çeşit trozin kinaz reseptörü olan Tie-2 reseptörü ile etkileşimdedir. Bu etkileşim, β 1-integrin ve N-kaderinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Aynı zamanda kök hücre sessizliğinin korunmasına da katkıda bulunur. Osteoblastlar tarafından eksprese edilen osteopontin, HKH proliferasyonunu inhibe eder, HKH apoptozunu destekler ve stromal hücreler tarafından Jag-1 ve Ang-1 ekspresyonunu etkiler. HKH havuz boyutunun negatif düzenleyicisidir.^{21, 22}

Vasküler niş, Kİ kavitesine yakın yerleşim gösterir, endotel hücreleri ve Kİ sinüzoidlerini çevreleyen diğer stromal hücrelerden oluşur. HKH'lerin fonksiyonlarında önemli yere sahiptirler. Nestin+ MKH'ler, CXCL12'den zengin retiküler hücreler (CXCL12 abundant reticular cells=CAR), sinir hücreleri, endotelial hücreler sayılabilir. Nestin+ MKH'ler, Kİ sinüzoidlerinin etrafında

bulunurlar ve osteoblastlara göre daha yüksek seviyede CXCL12, kök hücre faktörü (stem cell factor=SCF), IL-7 ve vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM1) eksprese ederler.^{21, 22}

HKH'lerin çoğunluğu Kİ'de bulunur. Periferik kanda kararlı durumda yalnızca sınırlı sayıda bulunur. Enflamasyon, kanama, miyokardiyal enfarktüs gibi stresli durumlarda artar. Kİ'deki stromal hücreler, HKH üzerinde eksprese edilen reseptörlere bağlanan sitokinler ve adezyon molekülleri sentezlerler. Bunlar; Kİ stromal hücreleri (çoğunlukla CAR'lar) tarafından sentez edilen CXCL12 ile HKH'ler üzerinde eksprese edilen CXC kemokin reseptör 4 (CXCR4) arasında, VCAM1 ile HKH üzerindeki very late antijen 4 (VLA-4) arasında, SCF ile HKH üzerindeki reseptörü c-kit arasında, trombopoetin ile HKH üzerindeki reseptörü miyeloproliferatif lösemi proteini (MPL) arasında ve Ang-1 ile HKH üzerinde eksprese edilen reseptörü Tie2 arasındadır. Bu etkileşimler Kİ'de HKH'lerin tutulmasını ve sessizliğini düzenler ve onları toksik streslerden korur. CXCL12/CXCR4 ve VCAM1/VLA-4 etkileşimleri en önemlileridir. Bozulmaları mobilizasyon ile sonuçlanır. Tie2, MPL ve c-kit'in kendi ligandlarıyla etkileşimleri, HKH'lerin sessizliklerini ve kendilerini yenilemelerini teşvik ederek uzun süreli çoğalma aktivitesinin sürdürülmesi için gereklidir.²¹

Nestin+ MKH'lerde azalma, Kİ HKH'lerinin ekstrasmeduller bölgeye mobilizasyonunu artırır ve periferik HKH'lerinin Kİ'ne dönmesini azaltır. Vasküler niş içindeki nestin+ MKH'ler sempatik sinir sisteminin adrenerjik lifleriyle yakın ilişki içerisindeyler. Sempatik sinir sistemi nörotransmitterlerinin serbest bırakılması, daha sonra önemli bağların (CXCR4, VLA-4, VCAM-1, SCF) bölünmesine aracılık eden membran tip matriks metalloproteinaz (MT1-MMP) ekspresyonunu ve matriks metalloproteinaz 2 (MMP-2) aktivitesini indükler. Böylece Kİ'den HKH çıkışını teşvik eder.²³

Tablo 1'de HKH'lerin aktivitesini düzenleyen moleküller verilmiştir.²⁴

Tablo1. Hematopoietik kök hücrelerin aktivitesini düzenleyen moleküller²⁴

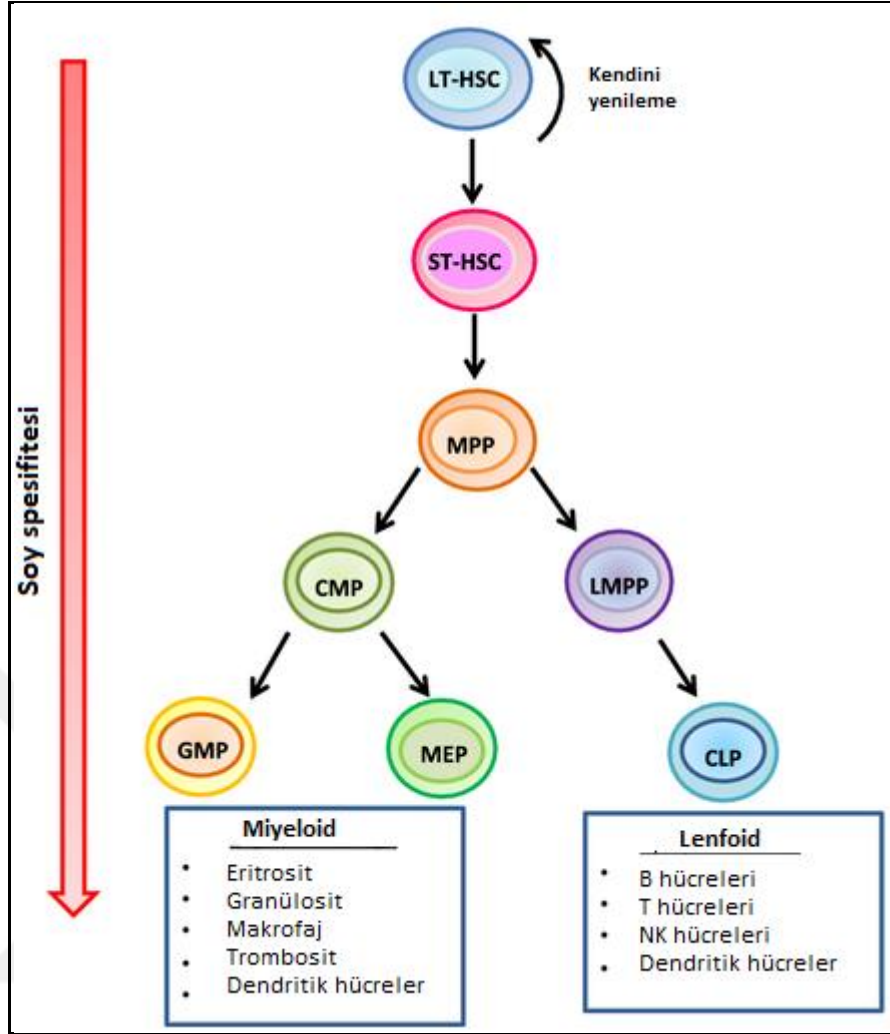
Molekül	
Anjiyopoetin-1, Tie-2 ve N-kaderin	Hücre döngüsü kontrolüne bağlantı kurarak HKH'yi niş içinde sessiz tutar
G-CSF	SDF-1'in regülasyonu
SDF-1 (veya CXCL12)	Stromal hücrelerde ifade edilir; HKH'yi çeker
CXCR4	HKH'lerde ifade edilir; SDF-1 reseptörü
VLA-4, LFA-1(Lökosit fonksiyon antijeni 1), Osteopontin, integrinler ve diğer hücre yüzey adezyon molekülleri	Aktivasyonları HKH mobilizasyonu için gereklidir.
MMP-9, MMP-2 ve sKitL (Kök hücre faktörü ligandı)	HKH mobilizasyonu için G-CSF ve SDF-1 tarafından tetiklenir
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktörü 4)	HKH'yi yetiştirmek için vasküler ve osteoblastik niş arasında bir gradyan oluşumu
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü), PLGF (Plasental büyüme faktörü) ve diğer büyüme faktörleri	HKH'nin mobilize edilmesi ve yetiştirilmesi

2.4. Hematopoez

Hematopoez; kan hücresel bileşenlerinin oluşumu, üretim ve yenilenmesi için embriyonik gelişim sırasında ve yetişkinlik boyunca devam eder.²⁵

Hematopoez, embriyonel dönemde yolk kesesinde başlar ve daha sonra aort-gonad-mezonefroz bölgesi, fetal karaciğer ve Kİ'de devam eder. HKH'ler, vücudun tüm olgun kan ve bağışıklık hücrelerini üreten lenfoid ve miyeloid progenitör hücrelere dönüşebilir.²⁶

Hematopoietik sistemin hiyerarşik düzenlenmesi Şekil 1'de verilmiştir.²⁶



Şekil 1. Hematopoietik sistemin hiyerarşik düzenlenmesi²⁶

Long-term (uzun vadeli) hematopoietik kök hücre (LT-HSC)

Short-term (kısa vadeli) hematopoietik kök hücre (ST-HSC)

Multipotent progenitörler (MPP)

Common myeloid progenitör (CMP)

Lenfoid multipotent progenitör (LMPP)

Granülosit-makrofaj progenitör (GMP)

Megakaryosit-eritrosit progenitör (MEP)

Commonlymphoid progenitor (CLP)

2.5. Mezenkimal Kök Hücreler

Geleneksel olarak Kİ kaynaklı fibroblast benzeri hücreler olarak tanımlanırlar. Yağ dokusu, göbek kordonu kanı ve fetal dokulardan da izole edilebilirler. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik soylara farklılaşabilirler ve kemik, kas, fibroblast, tendon, bağ ve yağ dokusuna dönüşebilirler.²⁷

Kendini yenileme yeteneğine sahip hücrelerdir ve doku iyileşmesi ve yenilenmesinde kilit rol oynayan çeşitli hücre tiplerine farklılaşırlar. Rejeneratif tedavide, hücre tedavisi için önemli bir kaynağı temsil ederler. Yaralı bölgelere göç edip farklılaşabilirken, hücrelerin yenilenmesi için dokuya yardımcı olan kemokinleri, sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgılama yetenekleri de vardır. Kİ kaynaklı MKH'ler hücre tedavisinde en sık kullanılanlardır.²⁸

Hematopoietik farklılaşma kümesi (Cluster of Differentiation=CD) belirteçlerini (CD14, CD34, CD45), KH belirteci CD133'ü veya endotel hücreleri için belirteç olan CD144'ü eksprese etmezler. CD44, CD73, CD29 ve CD90 eksprese ederler.²⁹

2.6. Hematopoietik Kök Hücre Nakli

Hematolojik malignitelerde, konjenital veya edinsel hematopoietik sistem bozuklukları ve bazı solid tümörlerde terapötik bir seçenek olarak uygulanır. Günümüzde otoimmün ve kalıtsal metabolik bozukluklar için de kullanılmaktadır.⁷

Tablo 2'de HKHN ile tedavi edilen hastalıklar verilmiştir.³⁰

Tablo 2. Hematopoietik kök hücre nakli ile tedavi edilen hastalıklar³⁰

Malign olmayan
Aplastik Anemi (Fanconi Anemisi, Diamond-Blackfan Sendromu)
Orak Hücreli Anemi
Talasemi
Proksimal Nokturnal Hemoglobinüri
Chediak-Higashi Sendromu
Kronik Granülamatöz Hastalık
Glanzmann Trombastenisi
Osteopetrozis
Lizozomal Depo Hastalıkları (Gaucher Hastalığı, Niemann-Pick Hastalığı)
Mukopolisakkaridozlar
Glukoproteinozlar
İmmün Yetmezlikler
Malign
Lösemiler
Lenfomalar
Multiple Miyelom
Myeloproliferatif Neoplazmlar
Solid Tümörler

Hematopoietik KHN, verici tiplerine göre üç gruba ayrılmaktadır;

1. Allojenik HKHN (AHKHN); sağlıklı, doku grubu uygun başka bir insandan alınan HKH'lerin hazırlık rejimi sonrasında alıcıya verilme işlemidir. Verici, human lökosit antijen (HLA) uyumlu bir aile üyesi, akrabalığı olmayan uyumlu donör veya uyumsuz aile donörleridir (haploidentical).⁸
2. Otolog HKHN (OHKHN); hastanın kendisinden toplanan HKH'lerin hazırlık rejimi sonrasında tekrar hastaya verilmesi işlemidir. Avantajlar arasında greft versus host hastalığı (GVHD) olmaması yer alır. Dezavantajı ise Kİ ürünlerinin malignite durumunda nüksetmeye neden olabilecek anormal hücreler içerebilmesidir.⁸

3. Singeneik HKHN (SHKHN); genetik olarak tam uyumlu tek yumurta ikizlerinden yapılan nakil şeklidir. Avantajları arasında GVHD ve greft yetmezliği olmaması yer alır.⁸

Önceki sitotoksik tedavi ve Kİ'nin veya periferik kanın ağır malign tutulumu genellikle OHKHN kullanımını engeller. AHKHN için HLA uyumlu kardeş donörleri tercih edilir, ancak hastaların %30'dan azında uygun bağışçı bulunabilmektedir. Kardeş donörü olmayan hastalarda, %30-40 olasılıkla HLA uyumlu donör, gönüllü bağışçı kayıtları aracılığı ile bulunur. Otolog veya allojenik transplantasyon için HKH ürünleri, Kİ, periferik kan veya göbek kordonundan elde edilebilir.³⁰

Hem otolog hem de allojenik HKHN için G-CSF ile mobilize edilmiş periferik HKH'lerinin kullanımı, Kİ'nin yerini almıştır.²³

Otolog nakil öncesinde, HKH'lerin toplanması için bunların periferik kana mobilizasyonu gereklidir. Mobilizasyon için en yaygın kullanılan yaklaşım, rekombinant insan G-CSF'nin (örneğin filgrastim veya FIL) tek başına veya yüksek doz kemoterapi ile birlikte verilmesidir.³¹

Granülosit koloni stimüle edici faktörün fonksiyonel değişiklikleri nasıl etkilediğini açıklamak için mekanizmalar önerilmiştir. Bunlar; granülosit hacminin genişlemesi, hem proteaza bağımlı hem de bağımsız yapışma moleküllerinin zayıflaması ve SDF-1/CXCR4 ekseninin bozulmasıdır. G-CSF'nin ayrıca SDF-1 mesajcı ribonükleik asiti (mRNA) azalttığı da gösterilmiştir. Osteoblast aktivitesini inhibe ederek SDF-1 seviyelerinde azalmaya yol açar.²³

Hematopoietik Kök Hücre Kaynakları

Kemik iliği: Genel veya spinal anestezi altında toplanır. Sınırlı sayıda HKH içerir. Ortanca çekirdekli hücre: 2×10^8 /kg, ortanca CD34+ hücre: 2.8×10^6 /kg, ortanca T-lenfosit: 2.2×10^7 /kg'dır. İşleme bağlı ağrı ve kanama olabilir. Eritrosit süspansiyonu transfüzyonu gerekebilir. Daha yavaş nötrofil ve platelet engraftmanı meydana gelir.³²

G-CSF mobilize periferik HKH: Anestezi gereği yoktur. G-CSF'ye bağlı yan etkiler görülebilir. Yüksek hücre sayısı vardır. Ortanca çekirdekli hücre: 9×10^8 /kg, ortanca CD34+ hücre: 7×10^6 /kg, ortanca T-lenfosit: 27×10^7 /kg'dır. Daha hızlı nötrofil ve trombosit engraftmanı kaydedilir.³²

Kordon kanı: Toplanması kolay ve zararsızdır. Dondurulmuş ünitelere kolayca ulaşılabilir. Bulaşabilen hastalık riski düşüktür. Parsiyel HLA uyumu kabul edilebilir. Hücre sayısı sınırlayıcı unsurdur. Ortanca çekirdekli hücre: 0.3×10^8 /kg, ortanca CD34+ hücre: 0.2×10^6 /kg, ortanca T-lenfosit: 0.4×10^7 /kg'dır.³²

Otolog Hematopoietik Kök Hücre Nakli

Yüksek doz kemoterapi sonrasında pansitopeniye girmiş hastalara, daha önce kendisinden elde edilmiş, mobilize periferik kan veya Kİ kaynaklı kök hücrelerin, verilmesidir. Özellikle multipl miyelom (MM) ve lenfomalarda bu tedavi seçeneği çok kullanılmaktadır.³³

Otolog HKH nakli birbirini takip eden 4 basamaktan oluşur:

- 1.basamak; kök hücrelerin toplanması, işlenmesi ve ardından sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurularak güvenle saklanması
- 2.basamak; miyeloablatif kemoterapi ve/veya radyoterapinin uygulanması
- 3.basamak; saklanmış olan kök hücrelerin hastaya infüze edilmesi
- 4.basamak ise; tedavi sonrası performansı bozulan hastalara düzeline kadar destek tedavisi uygulanmasıdır.³³

2.7. Kök Hücre Mobilizasyonu

Mobilizasyon, kemoterapi ya da sitokin tedavisini takiben HKH ve progenitör hücrelerin periferik kana çıkmasıdır. Mobilizasyon işlemi yaralanma ve inflamasyon sırasında oluşan stres sinyallerine yanıt olarak Kİ deposundan KH ve progenitörlerin salınımının artması şeklindeki fizyolojik yanıtı taklit eder. Günümüzde kök ve progenitör hücrelerin tercih edilen ve temel kaynağı mobilize hücrelerdir. Çünkü Kİ hücrelerine kıyasla engraftman daha hızlı olur ve işleme bağlı riskler daha azdır. Mezenkimal stromal ve HKH'ler arasındaki fizyolojik etkileşim bozulduğu zaman KH mobilizasyonu gerçekleşir. Mobilizasyon, nötrofil ve osteoklastların, kemoterapi ve G-CSF gibi sitokinlerle tekrarlayan stimülasyonu sonucu oluşan aktivasyonu tarafından başlatılır.³⁴

Mobilizasyon rejiminin seçimi klinik kaynaklara ve hastaya özgü faktörlere dayalı olarak düşünülmeli ve belirlenmelidir.³⁵

Matür hematopoietik hücreler Kİ'den periferik kana çıkmasına rağmen, immatür hücreler dolaşımda çok az oranda bulunurlar. Dolaşan lökositlerin

yaklaşık %0.05 veya daha azı hematopoietik progenitör hücrelerdir ve CD34 eksprese ederler.⁴

Otolog HKHN için minimum CD34+ hücre miktarı $2 \times 10^6/\text{kg}$ olmalıdır.³⁶

Kemoterapi ile Kök Hücre Mobilizasyonu

Kemoterapi genellikle tümör yükünü azaltmak, mobilizasyonu artırmak, aferez seanslarını azaltmak için G-CSF ile birlikte kullanılır. Miyelom hastalarında, orta derecede bir siklofosfamid dozu etkin olmaktadır.³⁷

Siklofosfamidin büyüme faktörleri üzerine eklenmesinin, Kİ'de granülositik proteazların salınmasında sinerjik etki gösterdiği, tek başına uygulandığında SDF-1, CXCR4 ve c-kit adezyon moleküllerinin bölünmesine yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca, kemoterapötik ajanların kemik iliği stroması üzerindeki toksisitesi, stromal hücrelerin onları desteklemedeki fonksiyonel kabiliyetine verilen hasarın bir sonucu olarak hematopoietik progenitör hücreleri serbest bırakabilir.⁴

Kemoterapi veya radyasyona maruz kalma, Kİ hipoksisini artırır. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1α'nın stabilizasyonu, artan vasküler endotelial büyüme faktörü seviyelerine bağlı olarak sinüzoidlerin vazodilatasyonu yoluyla mobilizasyonu artırır.⁶

Sitokinler ile Kök Hücre Mobilizasyonu

1960'larda, iki bağımsız grup, fare lenfoid lösemisindeki hücre çoğalmasını belirlerken birkaç tane çözünebilir faktör keşfetmişlerdir. Bu çözünebilir faktörler koloni uyarıcı faktörler (colony stimulating factors= CSFs) olarak isimlendirilmiştir. İzolasyon ve saflaştırmadan sonra, makrofaj CSF (M-CSF, CSF1), granülosit-makrofaj CSF (GM-CSF, CSF2), granülosit CSF (G-CSF, CSF3) ve IL3 olarak bilinen çok potansiyelli CSF dahil olmak üzere dört CSF tanımlanmıştır. Tüm bu faktörler kan hücresi gelişimi için uyarıcıdır ve HKH çoğalmasında ve değişik basamaklarda farklılaşmasında önemli role sahiptir. G-CSF'nin biyolojik etkilerine aracılık eden spesifik G-CSF reseptörü (G-CSFR) vardır. Nötrofil yapımında ve aktivitesinde G-CSF önemli bir düzenleyicidir. Nötrofil serinin çoğalma ve farklılaşmasını destekler ve olgunlaşmamış metamiyelositlerin olgun nötrofillere geçişini artırır. Nötrofil ve öncüllerinin sadece yaşam süresini uzatmaz, aynı zamanda matür nötrofillerin

görevlerini düzenler. Örneğin; süperoksit yapımı, fagositoz ve patojenlerin öldürülmesi. Yakın zamandaki çalışmalar G-CSF'nin tümörögenizde hayati öneme sahip olduğunu göstermiştir. Tümör büyümesini, metastazı ve kemoterapiye direnci destekler, kanser hücrelerinin apoptozunu engeller ve anjiyogenezini artırır, kanserle ilişkili tromboziste rol oynar ve zayıf klinik prognozla ilişkilidir. İnsan G-CSF geni 17q21-17q22 kromozom üzerindedir ve yaklaşık 2,5 kilobazdır. Fizyolojik durumlarda plazmadaki G-CSF düzeyi nerdeyse ölçülemeyecek kadardır. Fakat bir enfeksiyon meydana geldiği zaman G-CSF konsantrasyonu artar. Özellikle enfeksiyon ve kemoterapi sırasında nötrofillerin sayısı G-CSF konsantrasyonuna bağlıdır. Lipopolisakkarid (LPS), IL17, tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interferon- β (IFN- β) gibi enflamatuvar medyatörler tarafından uyarılmış fibroblastlar, epitelial hücreler, endotelial hücreler, makrofajlar ve monositler G-CSF salgılayabilir. Bununla birlikte meme, akciğer, mesane kanseri ve skuamöz hücreli karsinomun malign hücreleri G-CSF'yi yapısal olarak ifade edebilir ve G-CSF salgılayabilir. G-CSF reseptörü 1p35-34.3 kromozomunda lokalizedir. Sınıf I sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesidir.³⁸

Hematopoietik KH nakli için G-CSF, HKH'lerin mobilizasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılır. Doğrudan veya dolaylı proteaz aktivasyonu yolu ile mobilizasyonu gerçekleştirir. G-CSF uygulamasından sonra nötrofiller, nötrofil elastaz, katepsin ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP9) ve hücre yüzeyi proteazı dipeptidil peptidaz 4 (DPP4(CD26)) salgılar. Bunlar HKH'ler üzerindeki adezyon moleküllerini parçalar. Bu moleküller, SDF-1/CXCR4, SCF/c-kit ve VCAM-1/VLA-4'dür ve bunlar Kİ'de HKH'lerin tutulmasından sorumludur. G-CSF aynı zamanda osteoblast aktivitesini dolaylı olarak inhibe eder ve SDF-1 (CXCL12) ekspresyonunu azaltır. Minimum hedef doz olan $\geq 2 \times 10^6$ CD34+ hücre(kg ağırlık başına), 5-7 gün boyunca, 5-10 $\mu\text{g/kg/gün}$ G-CSF uygulaması ile bir veya daha çok aferezle elde edilebilir. OHKHN'de kemoterapi, genellikle tümör yükünü azaltmak ve mobilizasyonu artırmak için G-CSF ile birlikte kullanılır.³⁷

Kemik iliği HKH'leri ve G-CSF ile mobilize periferik kan HKH'leri transplantasyon açısından karşılaştırıldığında, G-CSF ile daha çok sayıda kök hücre elde edildiği bildirilmiştir. Nötrofil ve trombosit üretimi daha kısa zamanda olmuştur. Transplantasyon sonrası trombosit süspansiyonu transfüzyonu ve

hastanede yatış süresi azalmıştır. Allojenik transplantasyonlarda da aynı sonuçlar alınmıştır.²³

Sağlıklı donörler ve hastalarda %5-30 oranında mobilizasyon başarısızlığı olabileceği bildirilmiştir.³⁹

Klinikte HKH mobilizasyonunda G-CSF en çok kullanılan ajan olmaya devam etmektedir.²³

Levesque ve arkadaşları, G-CSF uygulamasının ardından farelerde proteolitik enzimlerin, nötrofil elastazın ve katepsin G'nin salınımını tanımlamışlardır. Bu enzimlerin, VCAM-1, SDF-1 ve CXCR4 ve c-kit dahil olmak üzere Kİ'de HKH tutulmasından sorumlu çeşitli molekülleri parçaladığı gösterilmiştir. G-CSF'nin ayrıca SDF-1 mRNA ekspresyonunu azalttığı ve osteoblast aktivitesini inhibe ederek SDF-1 seviyelerinde bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.²³

Plerixafor

Kök hücre mobilizasyonunda kullanılan rejimler genellikle kemoterapili veya kemoterapisiz G-CSF'dir. Fakat bu rejimler her zaman başarılı olmaz. Mobilizatör olarak kullanılan başka bir ajan CXCR4 kemokin reseptörü reversibl antagonisti plerixafor (Mozobil, AMD3100) dur. Plerixafor 502 Da. moleküler ağırlığa sahip küçük bir bisiklammoleküldür. MM ve Hodgkin dışı lenfoma (Non-Hodgkin Lenfoma=NHL) hastalarında otolog transplantasyon için periferik kana HKH'lerin mobilizasyonu için kullanılır. CXCR4 reseptörü, CD34+ hücre üzerinde eksprese edilen G-protein bağlı transmembran bir reseptördür. Bu reseptörün, Kİ stromal hücreleri tarafından eksprese edilen CXCL12 ile interaksiyonu, Kİ'de CD34+ hücrelerin tutulmasında önemlidir. Bu etkileşimi engellemek, KH'lerin periferik kana mobilizasyonu ile sonuçlanır. Birçok çalışma, plerixafor ile birlikte G-CSF'nin kullanılmasının, MM ve NHL'li hastalarda HKH'leri mobilize etmek için tek başına G-CSF'den üstün olduğunu göstermektedir.^{40, 41}

Periferik HKH mobilizasyon ajanları tablo 3'de verilmiştir.⁴¹

Tablo 3. Periferik hematopoietik kök hücre mobilizasyon ajanları⁴¹

Mobilizasyon ajanı	Mekanizma	Avantajları	Dezavantajları
G-CSF	1-Nötrofil elastaz tarafından bozunma yoluyla SDF-1'de bir azalmaya neden olur 2-Kİ'de CXCR4'te artış 3-Proteazların Kİ'ne salınmasını indükler	1-Ayakta tedavi yönetimi. 2-Düşük toksisite 3-CD34+hücrelerini zirveye çıkarmak için öngörülebilir süre 4-Öngörülebilir aferez zamanlaması	1-Kombinasyon rejimlerine kıyasla daha düşük CD34+hücre verimleri 2-Daha fazla aferez seansı 3-Yüksek CD34+hücre içeriğine sahip kök hücre ürünlerinin düşük olasılığı
Kemoterapi	Daha sonra hematopoietik iyileşmenin uyarılmasıyla birlikte ilik aplazisi	1-G-CSF'ye kıyasla daha yüksek sayıda CD34+ hücre 2-Daha az aferez seansı 3-Antitümör aktivite	1-Hastaneye yatış ihtiyacı 2-CD34+hücrelerini zirveye çıkarmak için öngörülemeyen süre 3-Aferezin öngörülemeyen zamanlaması 4-Daha fazla toksisite ve komplikasyonlar
Plerixafor	CXCR4'ün reversible antagonisti (CXCR4-SDF-1 etkileşimleri bloklar)	1-G-CSF ile karşılaştırıldığında daha yüksek CD34+hücre sayısı (G-CSF ile birlikte kullanıldığında) 2-Daha az aferez seansı 3-Daha fazla CD34+hücre içeren kök hücre greftleri 4-Başarılı mobilizasyon ve toplama olasılığı daha yüksektir 5-CD34+hücrelerini zirveye çıkarmak için öngörülebilir süre	Yüksek fiyat

Kök Hücre Mobilizasyonunu Etkileyen Faktörler

Mobilizasyon başarısızlığını etkileyen faktörler arasında geçmiş mobilizasyon başarısızlığı, ileri hasta yaşı, fazla sayıda/sürede kemoterapi almış olmak, KH toksik ilaçlarla kemoterapi öyküsü (melfelan, karmustin, fludarabin, kladribin, lenalidomid, platin bileşikleri), Kİ alanlarına geniş radyoterapi, mobilizasyon öncesi düşük trombosit sayıları, Kİ'nin tümör hücreleri tarafından infiltrasyonu, hastalık tipi (lenfomalı hastalarda miyeloma oranla 3 kat fazla) sayılabilir.⁴²

Bugün için HKH toplamının optimum olmasının temeli, donör ya da hasta periferik kanında günlük CD34+ hücre miktarını sayarak toplamaya başlama zamanına doğru karar verebilmektir.⁴³

2.8. İmmünofenotipleme-CD Belirteçleri

Farklılaşma kümesi (Cluster of Differentiation=CD) belirteçleri, hücreleri ayırt etmede anahtardır ve yüzey CD belirteçleri hücre tipine bağlı olarak belirli fonksiyonlara sahiptir. Çevresel koşullara ve hücre içi genetik değişikliklere yanıt olarak farklı şekilde ifade edilebilirler.¹²

CD34: İlk olarak 1984'te HKH ve progenitör hücrelerde tanımlanan, 116 kd ağırlığında, tip 1 transmembran fosfoglikoproteindir. Lenfohematopoietik gelişimin kök/progenitör aşamasında spesifik olarak eksprese edilir ve adezyonu düzenler. Yapısı, adezyon moleküllerinin sialomüsin ailesinin tipik örneğidir. CD34+ hücreler sitokin veya büyüme faktörü uyarımı ile genişleyebilen ve tüm lenfohematopoetik soylara farklılaşabilen hücrelerdir. Hematopoietik olgunlaşma sürecinde, CD34 ifadesi tamamen bastırılır.^{44, 45}

İnsan Kİ hücrelerinin küçük alt kümelerini tanıyan, ancak olgun kan ve lenfoid hücreleri tanımayan antikorları geliştirme stratejisinin bir sonucu olarak keşfedilmiştir. İnsan HKH'lerinin sayımı, izolasyonu için temel olarak kullanılan ayırt edici özellik haline gelmiştir. Çünkü hücreler daha olgun hücrelere farklılaştıkça CD34 azalmaktadır. Hücre yapışmasında ve homing sürecinde potansiyel rolü tanımlanmıştır. Vasküler endotelial hücrelerde ve bazı fibroblastlarda da eksprese edilir.⁴⁶

CD45 ve CD45RA: Ly-5, lökosit ortak antijeni, protein tirozin fosfataz reseptör tip C (PTPRC) olarak da bilinen tip 1 transmembran glikoproteindir. Olgun eritrosit ve trombositler hariç tüm çekirdekli hematopoietik hücrelerin ve bunların öncüllerinin yüzeyinde eksprese edilir. 180-220 kDa ağırlığında büyük bir glikoproteindir. T ve B lenfositlerin yüzeyindeki toplam glikoprotein %5-10'unu oluşturur. Hematolojik kökenli hücreleri tanımlamak için bir teşhis aracı olarak kullanılmıştır. Transmembran ve ekstraselüler parça olmak üzere iki sitoplazmik parçadan oluşur. Hematopoietik hücrelerde eksprese edilen CD45'in birkaç izoformu vardır. Ekson 4, 5 ve 6'nın farklı eklenmesiyle, glikozilasyon desenleri ve boyutları farklı, sırasıyla CD45RA, RB ve RC izoformları oluşur. Oluşumları sırasında farklı tip izoformların alternatif ekspresyonu nedeniyle HKH'lerin çoğalmasında ve farklılaşmasında hayati rol oynar. İnsan CD45 mRNA'sının altı izoformu vardır;^{47, 48}

- Eksonsuz (RO),
- Tek eksonlu (RA veya RB),
- İki ekson (RAB veya RBC) veya
- Üç eksonun tümü (RABC).

Hücre dışı alan, sistein açısından zengin bir bölge ve ağır N-glikozillenmiş olan üç fibronektin tip III tekrarı içerir. Bu kompleks N-glikanlar, CD45 stabilitesi ve hücre yüzeyine taşınması için gereklidir. CD45 izoformu ekspresyonu, T hücresinin olgunlaşma, aktivasyon ve farklılaşma evresine bağlı olarak değişir. Toy insan T hücreleri, ekson 4 içeren yüksek molekül ağırlıklı CD45RA izoformu eksprese ederler. Hücre aktivasyonundan sonra CD45RA'nın hücre dışı parçası alternatif eklemeye tabii tutulur ve yerini aynı zamanda hafıza ve aktive T hücrelerinde bulunan en kısa izoform CD45RO alır. CD45RA+ T hücrelerinin yüzdesi yaşla birlikte kademeli olarak azalırken, CD45RO+ T hücreleri artar. CD45'in alternatif olarak eklenmiş izoformlarının ifadesi de T hücresi gelişimi boyunca modüle edilir. CD3-CD4-CD8- üçlü negatif insan timositleri CD45RO- dir ve CD45RA, CD45RB ve CD45RC'yi ifade edebilir. CD4 ve CD8 çift + timositler CD45RO+RA- dir. CD45 lenfosit yaşamını, sitokin cevaplarını ve T hücre reseptör sinyalini düzenleyerek immün fonksiyonları kontrol eder.^{47, 48}

CD38: İmmün hücrelerde eksprese edilen multifonksiyonel transmembran proteindir. Kısa bir sitoplazmik kuyruğu, transmembran parçası ve hücre dışı parçası vardır. Lenfositlerde, monositlerde, makrofajlarda, dendritik hücrelerde, granülositlerde ve doğal öldürücü hücre (natural killer, NK) lerin yüzeyinde eksprese edilen CD38 seviyesi hücrelerin maturasyon ve/veya aktivasyon düzeyine bağlıdır. Reseptör ve enzim aracılı fonksiyonu vardır.^{49, 50}

Kromozom 4 ve 5 üzerinde lokalize olan, homolog genler tarafından kodlanır ve 300 aminoasit içerir. Sıklıkla hücre yüzeyinde bulunur, fakat endoplazmik retikulum, çekirdek membranı ve mitokondride de tespit edilmiştir. Membran oryantasyonuna göre tip II veya tip III membran proteini gibi davranabilir. Tip II oryantasyonun çoğunda, kısa amino kuyruğu sitozole bakar, katalitik parçası ekstraselüler alana bakar. Tip III oryantasyonda, katalitik parçanın sitozole baktığı raporlanmıştır.⁵¹

CD38, nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) substrat olarak kullanarak nikotinamid ve adenosin difosfat riboz (ADPR) sentezini katalize eder. NAD⁺, nikotinamidin salınmasıyla siklik ADPR'ye (cADPR) dönüştürülebilir. cADPR ayrıca CD38 tarafından ADPR'ye hidrolize edilebilir. CD38, hem ADPR siklaz hem de cADPR hidrolaz aktivitelerine sahiptir.⁵¹

CD38, CD31'e karşı reseptör görevi de görebilir. İkinci etkileşim yoluyla CD38, hematopoietik hücrelerin endotelial hücrelere selektin benzeri bağlanmasına aracılık eden ve bunların dokuya geçişini kolaylaştıran bir yapışma molekülü olarak görev yapabilir.⁵¹

CD71: Transferrin reseptör 1 (TfR-1) olarak bilinir. 760 amino asit içeren homodimerik glikoproteindir ve hücre yüzeyinde diferrik transferrine bağlanır. Demirin hücre içerisine alınımında önemli rol oynar. Hücre proliferasyonu ve aktivasyonu için gereklidir. Erken eritroid prekürsörlerde ekspresyonu çok yüksekken, retikülosit fazında ekspresyonu azalır. Hematopoietik sistemde tüm çoğalan hücreler CD71'i eksprese eder, ancak yaygın olarak önemli bir eritroid ilişkili belirteç olarak kabul edilir. Eritroblastlar üzerindeki CD71 ekspresyonu, diğer hücrelerden önemli ölçüde yüksektir. Akım sitometrede akut eritroblastik lösemi tanısı için ve eritroblastları ayırtetmek için temsili bir belirteç olarak kabul edilmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, CD71 ekspresyonunun

eritroblastlarda önemli ölçüde daha fazla olduğunu göstermiştir ve kemik iliğindeki CD71 pozitif hücrelerin yaklaşık %80'i eritroid hücrelerdir.^{52, 53}

CD90: Timus hücre antijeni 1 (Thymus cell antigen 1 (Thy-1)) olarak da bilinir. 25–37 kDa ağırlığında N-glikolize, glikofosfolidilinositol (GPI) bağlantılı hücre yüzey proteindir. Sitoplazmik parçası yoktur. Timositlerde, MKH'lerde, HKH'lerde, doğal öldürücü (natural killer=NK) hücrelerde, nöronlarda, endotelial hücrelerde, renal glomerüler mezengiyal hücrelerde, folliküler dendritik hücrelerde, fibroblastlarda ve miyofibroblastlarda eksprese edilir. Geni 11q23.3 kromozomda lokalizedir.⁵⁴

CD90'ın fonksiyonları; T hücre aktivasyonu, nöron regülasyonu, timositlerde ve mezengiyal hücrelerde apoptozis regülasyonu, fibrozis modülasyonu, hücre migrasyonunda artış, adezyon ve ekstrasvazasyondur.⁵⁴

Kanser kök hücreleri kanser gelişiminde ve metastazda hayati öneme sahiptir. Thy-1 kanser kök hücrelerinin belirteçidir.⁵⁵

Bazı kanserlerde tümör süpresör işlevi görür, bazılarında tümör hücrelerinin çoğalmasına yardımcı olur, bazılarında ise invazyon ve metastazi teşvik eder.⁵⁴

CD117: c-kit veya kök hücre faktörü reseptörü olarak da adlandırılır. Proto-onkogen c-kit tarafından kodlanır. Tirozin kinaz reseptörlerinin tip III alt ailesine ait olan transmembran proteindir. Ligandı olan kök hücre faktörü ile birleştiğinde aktive olur. Hematopoietik sistem, testis, miyokard, akciğer ve meme gibi farklı dokuların progenitör hücrelerinde eksprese edilir. Ekstraselüler, intramembranöz, intraselüler parçaları vardır. Ligandı olan kök hücre faktörüne bağlanarak, apoptozis, hücre farklılaşması, çoğalması ve hücre adezyonu gibi hücrel aktivite regüle etmede önemli rol oynar.^{56, 57}

CD117 aracılı sinyal iletimi, esas olarak hematopoietik progenitör hücrelerin normal gelişimi ve hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Malign hücrelerde, CD117 tespiti gastrointestinal stromal tümörlerin teşhisi için büyük önem taşır. Diğer tüm sarkomların, karsinomların ve hatta lenfomaların büyük çoğunluğu CD117- iken, meme dokuları gibi normal epitel dokuları pozitif olarak boyanır. Bazı MM vakaları CD117 eksprese ederken, normal plazma hücreleri eksprese etmezler.⁵⁸

Normal KI'de mononükleer hücrelerin yaklaşık %2-4 kadarı CD117 eksprese eder. KI'deki normal CD34+ hücrelerin yaklaşık %25 kadarı aynı zamanda CD117 eksprese eder. Lösemik hadiselerde, akut myelojenik lösemilerin %50'den fazlasında CD117 ekspresyonu raporlanmıştır. Fakat akut lenfoblastik lösemilerde nadiren görülür.⁵⁹

2.9. Akım Sitometri

Sitometri hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel veya kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Akım sitometri (AS) ise hücre veya partiküllerin sıvı bir sistem içerisinde tek tek geçerken fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerini analiz eden bir cihazdır.⁶⁰

Akım sitometride sıvı içindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölmeden geçirilir ve hücrelerin ışıktan geçerken verdikleri uyarılar toplanıp analiz edilir. Burada hücrelerin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri gösterilebileceği gibi; hücre yüzeyindeki veya içeriğindeki antijenik yapılar da belirlenebilir. Böylece partikülün immün yapısı, deoksiribo nükleik asit (DNA) içeriği, enzim aktivitesi, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında da bilgi edinilebilir.⁶⁰

Işık mikroskopisi ile karşılaştırılınca çok daha fazla hücre daha kısa sürede analiz edilebilir. Bu teknik ile ortalama 10.000 hücrenin 20 saniyede değerlendirilebilmesi mümkün olmaktadır.⁶⁰

Görünür ışık açısından iki farklı parametre kullanılarak değerlendirme yapılmaktadır:

- 1- Hücrenin göreceli boyutunu gösteren ileri saçılan ışık dedektörü (forward scatter, FSC)¹¹
- 2- Hücrenin iç yapısı ve granülaritesini gösteren, 90° açıyla sapan ışık dağılımını ölçen yana saçılan ışık dedektörü (side scatter, SSC)¹¹

Ayrıca floresan dedektörler ile de antijen varlığında reaksiyon oluşturan floresan bir madde ile işaretlenmiş antikörün floresansı ölçülür.¹¹

Cihaz başlıca sıvı sistemi, ışık kaynağı (lazer), filtreler, sinyal dedektörleri ve yazılım programından oluşur.⁶¹

Akım sitometride, kan, beyin-omurilik sıvısı, kemik iliği, bronkoalveolar lavaj sıvısı, periton sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, doku biyopsi materyali,

parafin bloktaki dokular, hücre kültürü örnekleri gibi biyolojik materyaller ile çalışılabilir.⁶¹

Analiz Yöntemleri:

- 1- FSC/SSC dedektörlerinden elde edilen verilerle hücrelerin büyüklük ve granülaritelerine göre ayrılması
- 2- Tek floresan boya işaretli antikorun kullanılmasıyla hücre yüzey belirteçlerinin belirlenmesi
- 3- Birden fazla yüzey antijenlerinin aynı anda analizini sağlayan floresan işaretli antikorlarla hücre alt gruplarının belirlenmesi (örneğin lenfosit alt gruplarının oranlarının saptanması) sağlanabilir.⁶¹

Akım sitometri ile kısa sürede çok sayıda hücre çalışılabilir ve birden fazla parametre aynı anda değerlendirilebilir. Küçük hacimlerde örnek yeterlidir. Pahalı bir teknoloji olması, özel eğitim almış laboratuvar elemanı gerektirmesi gibi durumlar ise sistemin dezavantajlarıdır.⁶²

Akım sitometri, klinik ve araştırma laboratuvarlarında; biyokimya, hematoloji, immünoloji, mikrobiyoloji, onkoloji ve moleküler biyoloji alanlarında kullanılmaktadır. İmmünofenotiplendirme analizinde hücrelerin maturasyonuna göre hücre yüzeyi ve içinde eksprese ettikleri antijenlere karşı monoklonal antikorlar kullanılarak belirli bir hücre grubunun belirlenmesi ve ayırımı sağlanabilmektedir. İmmünofenotipleme; lösemi, lenfoma, miyeloma gibi hematolojik malignitelerin tanısında, kemoterapi etkinliğinin izlenmesinde, immün yetmezliklerin, otoimmün hastalıkların ve trombosit hastalıklarının tanısında kullanılmaktadır.⁶¹

Akım Sitometride Verilerin Değerlendirilmesi

Kapılama; farklı bölgelere düşen hücre topluluklarından, analiz edilmek istenen hücre grubunun izole edilip, analiz alanından dışlanmak istenen hücrelerin uzaklaştırılması için kullanılır. Veriler histogram, nokta alan (dot plot), kontur alan, yoğunluk alan ve 3 boyutlu izometrik grafikler ile ifade edilebilir.⁶¹

Histogram grafikleri; en basit ve yaygın kullanılan yöntemdir. Tek bir parametreye ilişkin hücre yoğunluğunu gösterir. Özellikle çok sayıda örnekte tek bir antijenin araştırıldığı deneylerde yararlıdır. X eksenini araştırılan parametrenin yoğunluğunu, Y eksenini ise belli sinyal yoğunluğundaki hücre sayısını

göstermektedir. Veriler bir popülasyonda hücrelerin yüzdesi ya da “ortalama floresan yoğunluğu” (mean fluorescence intensity) (MFI) şeklinde belirtilir.⁶³

Saçılan ışık ve floresan yoğunluğu lineer veya logaritmik ölçekle görüntülenebilir. Pek çok uygulamada lineer ölçeğe göre daha çok tercih edilen logaritmik ölçek, tipik olarak floresan değerlerinin 10'luk ölçekte 4-5 kattan daha geniş bir dağılım göstermesi durumunda kullanılır. Hücrelerde DNA miktarının ölçüldüğü veya çok dar aralıktaki floresan değerlerinin elde edildiği deneylerde daha çok lineer ölçek kullanılır. Genel olarak FSC ve SSC grafikleri lineer ölçekte görüntülenir. Ancak, bu ölçek periferik kandaki plazma hücreleri veya eosinofiller gibi büyük ve çok granüllü hücrelerinin ayrışmasında yeterli olmaz. Genellikle lökositler ve DNA miktar ölçümleri için lineer grafikler kullanılırken; trombosit ve retikülosit analizlerinde de logaritmik skala seçilmelidir.⁶³

Nokta alan grafikleri; eş zamanlı iki parametrenin görüntülenebilmesi amacıyla en sık kullanılan yöntemdir. Hücreler 2 parametrenin sinyal yoğunluğuna göre x-y eksenlerinde işaretlenir. İki parametrenin birbiri ile ilişkileri incelenebilir. Her nokta bir hücreyi temsil etmektedir.⁶³

Kadran analizi; nokta alan grafisinde yaygın kullanılan ve analizde katkı sağlayan basit bir yöntemdir. Bu yöntemde her iki parametre değerleri aynı olan pek çok hücre aynı noktaya denk gelebilmektedir. Hücreler her iki antikoru da içeriyorsa grafikte sağ üst kadrana, her ikisini de içermiyorsa sol alt kadrana düşer. Y eksenindeki antikoru içeriyorsa sadece sol üst kadrana, X eksenindeki antikoru içeriyorsa da yalnızca sağ alt kadrana düşer.¹¹

Kontur alan veya yoğunluk alan grafikleri; nokta alan grafisinde her nokta bir partikülü/hücreyi temsil etmektedir. Her iki parametre değerleri aynı olan pek çok hücre aynı noktaya denk gelebilmektedir. Bu durum çok sayıda hücrenin okutulduğu örneklerde zorluk oluşturabilir. Böyle örneklerde kontur alan veya yoğunluk alan grafipleri tercih edilir.⁶³

İzometrik grafik ise FSC ve SSC gibi parametrelerle oluşturulan grafiklere hücre sayısı gibi üçüncü bir parametrenin daha eklenmesiyle elde edilir.⁶³

2.10. Monoklonal Gamopati

Bir monoklonal immünoglobulin veya fragmanının, B lenfosit soyundaki hücrelerin klonal proliferasyonu ile üretildiği bir durumdur. Monoklonal gamopati üretebilen hematolojik durumların spektrumu, önemi belirsiz monoklonal gamopati (monoclonal gammopathy of undetermined significance=MGUS), multipl miyelom (MM), plazmasitoma, Waldenström makroglobulinemi (WM), kronik lenfositik lenfoma (KLL) ve diğer düşük dereceli lenfomaları içerir.⁶⁴ Tablo 4’de MGUS, smoldering MM ve aktif MM için tanı kriterleri verilmiştir.⁶⁵

Tablo 4. MGUS, smoldering MM ve aktif MM için tanı kriterleri⁶⁵

MGUS
Serum monoklonal (M) protein < 3 g/dL
Klonal Kİ plazma hücreleri < 10%
Miyelom tanımlayıcı olayların veya hafif zincirli amiloidozun olmaması
Smoldering multiple miyelom
Serum M protein ≥ 3 g/dL veya klonal Kİ plazma hücreleri 10%–60%, veya ikisi
Miyelom tanımlayıcı olayların veya hafif zincirli amiloidozun olmaması
Semptomatik multiple miyelom
Klonal Kİ plazma hücreleri ≥ 10% veya plazmasitoma ve ≥ 1 miyelomu tanımlayan olay:
Calcium (Kalsiyum): Hiperkalsemi, yani serum kalsiyumu normalin üst sınırından > 1 mg/dL daha yüksek veya > 11 mg/dL
Renal insufficiency (Böbrek yetmezliği): Kreatinin klerensi < 40 mL/dakika veya serum kreatinin > 2 mg/dL
Anemia (Anemi): Hemoglobin > 2 g/dL normalin alt sınırının altında veya < 10 g/dL
Bone involvement (Kemik tutulumu): İskelet radyografisi, bilgisayarlı tomografi veya pozitron emisyon tomografisi bilgisayarlı tomografide ≥ 1 litik lezyon
Klonal Kİ plazma hücresi yüzdesi ≥ %60
Manyetik rezonans görüntülemeye birden fazla fokal lezyon

Önemi Belirsiz Monoklonal Gamopati

Miyelomdan önce, MGUS olarak adlandırılan sakin bir faz gelir. Herhangi bir son organ hasarı veya miyelomun özellikleri olmayan bir monoklonal proteinin (< 3 g/dL) varlığı ile tanımlanır. Nedeni şu anda bilinmemektedir, ancak semptomatik miyelomaya dönüşebilir. Miyeloma ilerleme riski, yüksek monoklonal protein seviyesi, kemik iliğinde yüksek plazma hücresi yüzdesi, IgA monoklonal protein varlığı ve anormal serbest hafif zincir oranı risk faktörleriyle birlikte yılda yaklaşık %1'dir.⁶⁶

Önemi belirsiz monoklonal gamopatinin miyeloma ilerlemesinde p53 ve ras mutasyonu, p16 metilasyonu, ikincil translokasyonlar, angiogenez artışı, hücresel bağışıklığın supresyonu, IL-6, vasküler endotelial büyüme faktörü gibi sitokinler etkili olmaktadır.⁶⁷

Multipl Miyelom

Multipl miyelom (MM), Kİ'de klonal, kötü huylu plazma hücrelerinin birikimi ile karakterizedir. Oluş nedeni bilinmemektedir. Radyasyon, virüsler, endüstriyel toksinler suçlanmaktadır. Kromozomal anormallikler de tespit edilmiştir. En sık görülen kromozom 14'ün uzun kolunda immünoglobulin ağır zincir anahtarı olan bölgedir. Hematolojik malignitelerin %10 kadarını oluşturur. Sık olarak, kemik ağrıları, patolojik kırıklar, anemi (Kİ yetmezliğine bağlı), tekrar eden enfeksiyonlar, hiperkalsemi, renal yetmezlik (hiperkalsemi, hafif zincir depolanması, non-steroid ilaçlar, anemi ve enfeksiyonlara bağlı), anormal kanamalar (trombosit fonksiyon bozukluğuna bağlı) görülür. Daha az sıklıkta, hipervizkozite sendromu (iskemi, kardiyak yetmezlik ve nörolojik problemler), amiloid birikimi görülür.⁶⁸

Farklı etnik gruplar arasında insidanda farklılıklar vardır; Afrikalı Amerikalılarda beyazlara göre iki kat daha yaygın ve Asyalılarda daha az yaygındır.⁶⁶

Plazma hücreleri, antikor yapan lenfositlerden türetilmiştir. Miyelomda bu plazma hücreleri, tüm kemik iliği hücrelerinin %10'unu aşar ve hastalığın bir belirteci olarak işlev gören anormal bir antikor (bir "paraprotein") oluştururlar. Ortanca tanı yaşı 70'tir.⁶⁹

Tanı için yapılması gereken testler:

- Tam kan sayımı (anemiye veya diğer kan hücrelerindeki azalmayı saptamak için)
- Biyokimya testleri (kalsiyum seviyesi, böbrek ve karaciğer fonksiyon testlerini de kapsayacak şekilde)
- Beta-2 mikroglobulin düzeyi (prognostik açıdan anlamlıdır, <4 mg/L iyi prognosis, 4-8 orta, >8 kötü prognosisdur).
- Serum ve idrarda paraprotein tespiti ve miktar tayini (Miyelom hastalarının %1'inde paraprotein ("sekretuar olmayan miyelom") bulunmaz).⁶⁹

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan sarf malzemeler

Adı	Marka	Üretim yeri
EDTA'lı kan toplama tüpü	Vacuset	Türkiye
Polistiren tüp (5 ml)	Labcon	USA
Otomatik pipet ucu (1-200 µl)	AHN	Almanya
Otomatik pipet ucu (100-1000 µl)	İsolab	Almanya

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve solüsyonlar

Adı	Marka	Üretim yeri
İsoFlow Solüsyonu	Beckman Coulter	İrlanda
OptiLyse Solüsyonu	Beckman Coulter	İrlanda

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Adı	Marka	Model	Üretim yeri
Akan Hücre Ölçer	Beckman Coulter	Navios EX Flow Cytometer	İrlanda
Santrifüj	Nüve	NF 800	Türkiye
Vortex	Heidolph	Reax Top	Almanya

3.2. Örnek seçimi

3.2.1. Örneklerin toplanması

01/09/2022-01/06/2023 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji bölümünde multiple miyelom tanısıyla takip edilen ve otolog periferik hematopoetik kök hücre nakli planlanan, bilgilendirilmiş olur formunu imzalayan, 18-70 yaş arası, araştırmaya dahil edilme kriterlerine uyan 13 hasta çalışmaya dahil edildi. Nakil öncesi, hastalardan 0. ve 11. günlerde hematoloji bölümünde hemşireler tarafından içerisinde etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) olan hemogram tüplerine 2 ml kan alınarak tıbbi biyokimya laboratuvarına gönderildi. Akım sitometrik yöntemle, Beckman Coulter, NAVIOS EX cihazında, 0. günde ve 11. günde alınan örneklerde CD45 (KrO), CD34 (PC7), CD38 (PC5), CD45RA (APC),

CD71 (FITC), CD90 (RPE), CD117 (APC) (BC, İrlanda) hücre yüzey belirteçleri çalışılarak araştırıldı.

Bu çalışma Helsinki Bildirgesi özelliklerine göre yapıldı ve Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 25.05.2022 tarihli 2022/359 sayılı kurul kararı ile onay alındı.

3.2.2. Örneklerin alınması ve saklanması

Bu çalışmada gönüllülerin venöz tam kanları kullanılmıştır. Kan, içerisinde EDTA bulunan 2 ml'lik hemogram tüplerine alındı. Çalışılması planlanan tüm parametrelere ait örnekler prosedürlere uygun olarak ve bekletilmeden çalışıldı.

3.3. Yöntem

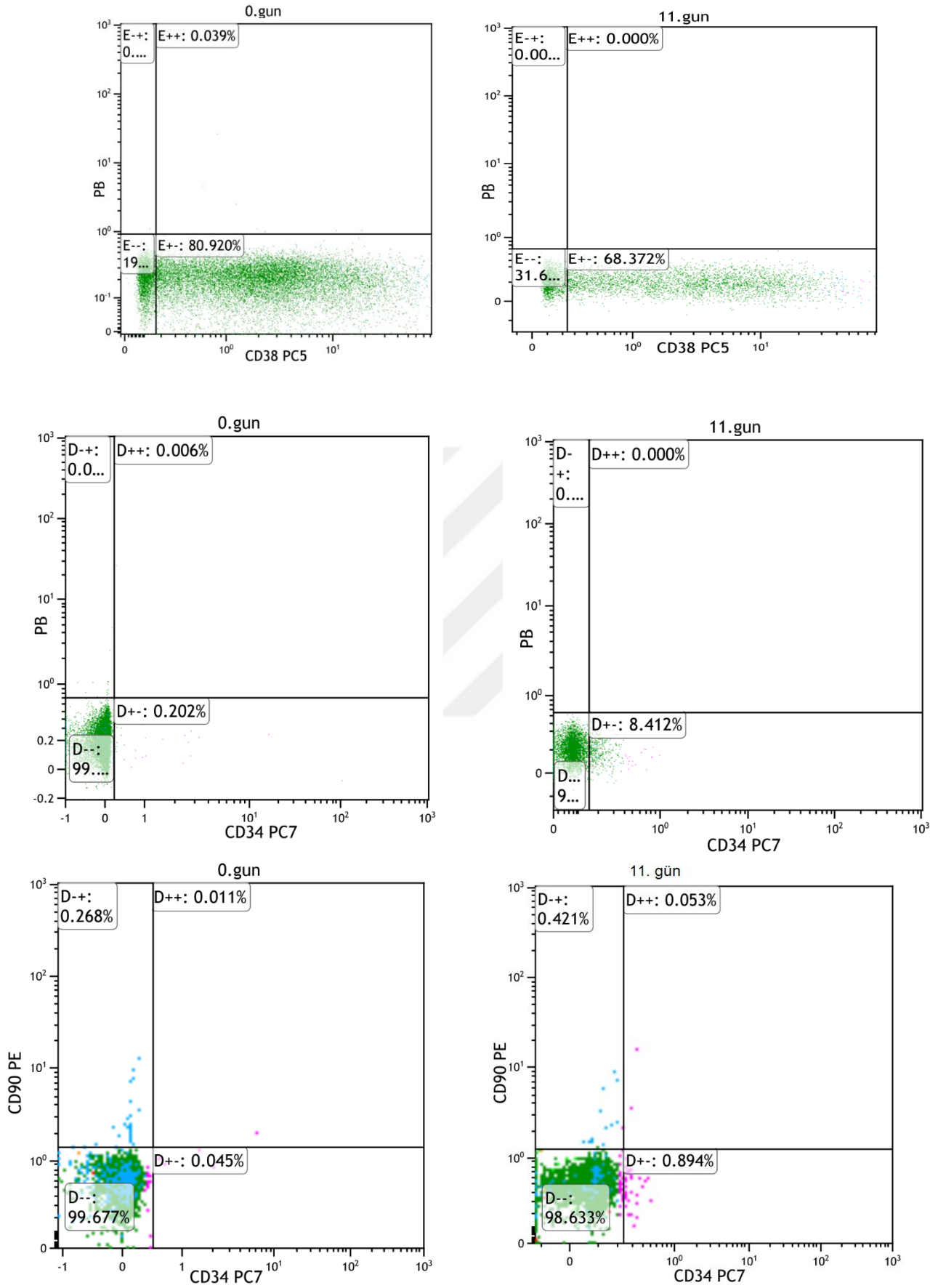
01/09/2022-01/06/2023 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji bölümünde multiple miyelom tanısıyla takip edilen ve otolog periferik hematopoetik kök hücre nakli planlanan, bilgilendirilmiş olur formunu imzalayan, 18-70 yaş arası, araştırmaya dahil edilme kriterlerine uyan 13 hasta çalışmaya alındı. Hastalara hematoloji bölümünde 2,5 g/m² siklofosfamid verildikten sonra, 5. günde G-CSF (filgrastim), 6 gün süreyle sabah, akşam 12 saat arayla 60 kg altı hastalara 5 µg/kg, 60 kg üstü hastalara 48 milyon Ü subcutan uygulandı. 11. günde sadece sabah dozu verildi. Çalışmamızda, 0. günde siklofosfamid uygulanmadan önce ve 11. günde G-CSF'in sabah dozu uygulandıktan 1 saat sonra içerisinde EDTA bulunan hemogram tüplerine 2 ml kan alınarak tıbbi biyokimya laboratuvarına gönderildi. Akım sitometrik yöntemle, Beckman Coulter, NAVIOS EX cihazında, 0. günde ve 11. günde alınan örneklerde CD45, CD34, CD38, CD45RA, CD71, CD90, CD117 hücre yüzey belirteçleri çalışıldı ve 0. gün siklofosfamid uygulanmadan önceki ve 11. gün toplam G-CSF dozları bittikten sonraki azalış ve artışlar ölçüldü.

3.3.1. Flow sitometrik analiz

1. Çalışma EDTA'lı tam kandan yapıldı.
2. Polistiren tüp içerisine kullanılacak antikorlardan üretici firmanın önerdiği miktar eklendi. (5 µl)
3. 100 µl hasta kanı her tüpe alındı.
4. 15' oda ısısında karanlıkta bekletildi.
5. 500 µl OptilyseC eklendi.
6. 10' oda ısısında karanlıkta bekletildi
7. 500 µl IsoFlow eklendi.
8. 5' oda ısısında karanlıkta bekletildi
9. 300 g 5' santrifüj edildi.
10. 500 µl IsoFlow ile yıkama yapıldı.
11. 1 ml IsoFlow eklenip okuma yapıldı.

Hazırlanan örnekler akım sitometri cihazı (NAVIOS EX, Beckman Coulter, İrlanda) ve Kaluza programı kullanılarak analiz edildi. Cihazın voltaj ve kompenzasyon ayarları cihaz üreticisi tarafından temin edilen standardize edilmiş boncuklar (Flow Check) kullanılarak yapıldı. CD45-SSC grafiğinden lenfosit ve monosit bölgeleri seçildi. Seçilen lenfosit ve monositlerdeki CD34, CD38, CD45RA, CD71, CD90 ve CD117 ekspresyonları nokta-alan grafikleri kullanılarak belirlendi. Grafiklerin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar ekspresyon yüzdeleri olarak ifade edildi.

Şekil 2'de hastalara ait nokta-alan grafikleri örnekleri verilmiştir.



Şekil 2. Hastalara ait nokta-alan grafikleri

3.4. İstatiksel Yöntemler

Değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Değişkenler için Ort $\pm$ S.Sapma ve Min-Maks ile Medyan [Q1-Q3] cinsinden özetlenerek tablolarda verilmiştir. İki bağımlı değişkenlerin karşılaştırmalarında Paired t-testinden yararlanılmıştır. Bu analizler Statistica v.13.3.1 programı ile yapılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

01/09/2022-01/06/2023 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Bölümünde, multiple miyelom tanısıyla takip edilen ve otolog periferik hematopoetik kök hücre nakli planlanan, bilgilendirilmiş olur formunu imzalayan, 18-70 yaş arası, araştırmaya dahil edilme kriterlerine uyan 13 hasta çalışmaya alındı. Hastalardan 6 tanesi kadın, 7 tanesi erkekti. Yaş ortalaması $59,07 \pm 8,33$ tespit edildi.

Hastaların 0. ve 11. günlerde total lenfosit ve monosit sayı yüzdeleri, kapılanan bölgelerdeki CD34, CD71, CD90, CD117, CD38, CD45RA belirteçlerinin yüzdeleri, CD34 pozitifliği ile birlikte yüzde oranları ve parametreler arası korelasyonları araştırıldı.

Hastalarda multipl miyeloma tanısı için kullanılan CD138/CD38, CD56, kappa ve lambda yüzdeleri Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Hastaların tanı anındaki CD138/CD38, CD56, Kappa, Lambda yüzdeleri

	n	Min-Maks	Ort $\pm$ SS	Medyan[Q1-Q3]
CD138/CD38	13	0,07-36,89	11,24 $\pm$ 11,99	7,03[0,58-21,55]
CD56%	13	1,43-100,00	90,86 $\pm$ 29,66	99,98[99,58-100,00]
Kappa%	13	0,36-99,52	44,76 $\pm$ 41,85	40,28[4,53-98,50]
Lambda%	13	0,02-99,58	42,84 $\pm$ 44,36	25,85[0,64-93,27]

11. gün toplama öncesi CD34 absolü sayı Ort $\pm$ SS:39,82 $\pm$ 31,58 (Min-Maks:1,54-87,35 ve Medyan [Q1-Q3]:33,53 [9,48-73,61]) ve CD34 yüzdeleri Ort $\pm$ SS:0,64 $\pm$ 0,60 (Min-Maks:0,02-2,09 ve Medyan [Q1-Q3]:0,54 [0,18-0,93]) olarak tespit edildi.

Hastaların 0. ve 11. günlerdeki lenfosit sayı yüzdelerinin ve lenfosit popülasyonunda analiz edilen belirteçlerdeki yüzde oranlarının minimum, maksimum ve p değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

Lenfosit kapısında değerlendirilen parametrelerden;

- 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,002$),
- CD34% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,018$),
- CD71% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,003$),
- CD71/CD34 0.gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,019$),

- CD90/CD34 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,039$),
- CD38% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,016$),
- CD45RA% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlendi.

Tablo 6. Lenfosit sayı yüzdeleri ve kapılanan lenfosit bölgesindeki seçilmiş belirteçlerde meydana gelen değişiklikler

Parametre	n	Ort $\pm$ SS	Min-Maks	p*
LENFOSİT % 0.GÜN	13	27,38 $\pm$ 11,43	15,51-49,60	0,002
LENFOSİT % 11.GÜN	13	14,41 $\pm$ 7,69	3,27-31,06	
LENFOSİT CD34% 0.GÜN	13	0,36 $\pm$ 0,26	0,08-0,93	0,018
LENFOSİT CD34% 11.GÜN	13	1,13 $\pm$ 1,05	0,14-3,12	
LENFOSİT CD71% 0.GÜN	13	1,56 $\pm$ 0,77	0,31-2,99	0,003
LENFOSİT CD71% 11.GÜN	13	5,20 $\pm$ 3,68	1,01-12,28	
LENFOSİT CD71/CD34 0.GÜN	13	0,08 $\pm$ 0,11	0,00-0,32	0,019
LENFOSİT CD71/CD34 11.GÜN	13	0,52 $\pm$ 0,58	0,02-2,24	
LENFOSİT CD90% 0.GÜN	13	0,53 $\pm$ 0,66	0,03-2,58	0,161
LENFOSİT CD90% 11.GÜN	13	0,77 $\pm$ 0,42	0,06-1,47	
LENFOSİT CD90/CD34 0.GÜN	13	0,08 $\pm$ 0,08	0,00-0,24	0,039
LENFOSİT CD90/CD34 11.GÜN	13	0,23 $\pm$ 0,29	0,01-1,02	
LENFOSİT CD117% 0.GÜN	13	13,49 $\pm$ 22,59	0,37-60,93	0,364
LENFOSİT CD117% 11.GÜN	13	12,20 $\pm$ 20,58	0,43-59,46	
LENFOSİT CD117/CD34 0.GÜN	13	0,37 $\pm$ 0,74	0,00-2,02	0,402
LENFOSİT CD117/CD34 11.GÜN	13	0,53 $\pm$ 0,70	0,00-1,85	
LENFOSİT CD38% 0. GÜN	13	58,41 $\pm$ 21,47	0,37-80,17	0,016
LENFOSİT CD38% 11.GÜN	13	53,34 $\pm$ 17,69	4,96-71,44	
LENFOSİT CD38/CD34 0.GÜN	13	2,19 $\pm$ 2,02	0,01-7,99	0,21
LENFOSİT CD38/CD34 11.GÜN	13	3,06 $\pm$ 2,05	0,09-6,66	
LENFOSİT CD45RA% 0.GÜN	13	32,93 $\pm$ 13,35	7,53-55,51	<0,001
LENFOSİT CD45RA% 11.GÜN	13	19,93 $\pm$ 11,13	0,31-45,11	
LENFOSİT CD45RA/CD34 0.GÜN	13	1,60 $\pm$ 1,42	0,10-4,66	0,925
LENFOSİT CD45RA/CD34 11.GÜN	13	1,56 $\pm$ 1,06	0,00-3,82	

* p: gruplar arası anlamlılık derecesi ($p < 0,05$ olmalı)

Hastaların 0. ve 11. günlerdeki monosit sayı yüzdelerinin ve monosit popülasyonunda analiz edilen belirteçlerdeki yüzde oranlarının minimum, maksimum ve p değerleri Tablo 7’de verilmiştir.

Monosit kapısında değerlendirilen parametrelerden;

- 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p < 0,001$),
- CD38% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p = 0,045$),
- CD45RA% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p = 0,016$) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlendi.

Tablo 7. Monosit sayı yüzdeleri ve kapılanan monosit bölgesindeki seçilmiş belirteçlerde meydana gelen değişiklikler

Parametre	n	Ort $\pm$ SS	Min-Maks	p*
MONOSİT% 0.GÜN	13	9,01 $\pm$ 2,04	5,20-12,84	<0,001
MONOSİT% 11.GÜN	13	17,21 $\pm$ 5,46	8,30-27,71	
MONOSİT CD34% 0.GÜN	13	0,64 $\pm$ 0,42	0,17-1,54	0,353
MONOSİT CD34% 11.GÜN	13	1,55 $\pm$ 3,28	0,11-12,34	
MONOSİT CD71% 0.GÜN	13	1,61 $\pm$ 0,51	0,55-2,50	0,227
MONOSİT CD71% 11.GÜN	13	2,79 $\pm$ 3,35	0,77-13,30	
MONOSİT CD71/CD34 0.GÜN	13	0,12 $\pm$ 0,18	0,00-0,52	0,24
MONOSİT CD71/CD34 11.GÜN	13	0,68 $\pm$ 1,58	0,01-5,83	
MONOSİT CD90% 0.GÜN	13	0,98 $\pm$ 0,58	0,27-2,16	0,114
MONOSİT CD90% 11.GÜN	13	0,64 $\pm$ 0,53	0,09-2,07	
MONOSİT CD90/CD34 0.GÜN	13	0,10 $\pm$ 0,17	0,00-0,63	0,339
MONOSİT CD90/CD34 11.GÜN	13	0,27 $\pm$ 0,55	0,00-1,94	
MONOSİT CD117% 0.GÜN	13	22,69 $\pm$ 40,69	0,55-97,30	0,362
MONOSİT CD117% 11.GÜN	13	23,07 $\pm$ 41,52	0,36-97,28	
MONOSİT CD117/CD34 0.GÜN	13	0,12 $\pm$ 0,22	0,00-0,75	0,234
MONOSİT CD117/CD34 11.GÜN	13	1,20 $\pm$ 3,08	0,00-11,32	
MONOSİT CD38% 0.GÜN	13	86,54 $\pm$ 25,94	1,10-99,01	0,045
MONOSİT CD38% 11.GÜN	13	88,23 $\pm$ 26,41	1,08-98,56	
MONOSİT CD38/CD34 0.GÜN	13	0,50 $\pm$ 0,37	0,03-1,04	0,307
MONOSİT CD38/CD34 11.GÜN	13	1,58 $\pm$ 3,57	0,01-13,30	
MONOSİT CD45RA% 0.GÜN	13	6,55 $\pm$ 4,10	1,50-17,27	0,016
MONOSİT CD45RA% 11.GÜN	13	3,38 $\pm$ 1,90	0,07-6,86	
MONOSİT CD45RA/CD34 0.GÜN	13	0,13 $\pm$ 0,08	0,03-0,31	0,233
MONOSİT CD45RA/CD34 11.GÜN	13	0,25 $\pm$ 0,30	0,01-0,97	

* p: gruplar arası anlamlılık derecesi ($p < 0,05$ olmalı)

Lenfosit kapısında, hastaların 0. ve 11. günlerde analiz edilen belirteçlerdeki korelasyonları Tablo 8'de verilmiştir.

Lenfosit kapısında;

- CD90/CD34 0. gün değeri ile CD90/CD34 11. gün değerleri arasında ($r=0,678$; $p=0,011$),
- CD117 % 0. gün değeri ile CD117 % 11. gün değerleri arasında ($r=0,978$; $p<0,001$),
- CD117/CD34 0. gün değeri ile CD117/CD34 11. gün değerleri arasında ($r=0,597$; $p=0,031$),
- CD38 % 0. gün değeri ile CD38 % 11. gün değerleri arasında ($r=0,963$; $p<0,001$),
- CD45RA% 0. gün değeri ile CD45RA % 11. gün değerleri arasında ($r=0,737$; $p=0,004$) pozitif yönde yüksek seviyede doğrusal bir ilişki varlığı saptandı.

Tablo 8. Lenfosit kapısında seçili belirteçler arası korelasyonlar

	n	r	p
LENFOSİT% 0.GÜN & LENFOSİT% 11.GÜN	13	0,297	0,325
CD34% 0.GÜN & CD34% 11.GÜN	13	0,238	0,434
CD71% 0.GÜN & CD71% 11.GÜN	13	0,304	0,313
CD71/CD34 0.GÜN & CD71/CD34 11.GÜN	13	0,037	0,904
CD90% 0.GÜN & CD90% 11.GÜN	13	0,481	0,096
CD90/CD34 0.GÜN & CD90/CD34 11.GÜN	13	0,678	0,011
CD117% 0.GÜN & CD117% 11.GÜN	13	0,978	<0,001
CD117/CD34 0.GÜN & CD117/CD34 11.GÜN	13	0,597	0,031
CD38% 0.GÜN & CD38% 11.GÜN	13	0,963	<0,001
CD38/CD34 0.GÜN & CD38/CD34 11.GÜN	13	0,314	0,297
CD45RA% 0.GÜN & CD45RA% 11.GÜN	13	0,737	0,004
CD45RA/CD34 0.GÜN & CD45RA/CD34 11.GÜN	13	0,435	0,137

Monosit kapısında, hastaların 0. ve 11. günlerde analiz edilen belirteçlerdeki korelasyonları Tablo 9'da verilmiştir.

Monosit kapısında;

- CD117 % 0. gün değeri ile CD117 % 11. gün değerleri arasında ($r=0,997$; $p<0,001$),
- CD38 % 0. gün değeri ile CD38 % 11. gün değerleri arasında ($r=0,995$; $p<0,001$) pozitif yönde yüksek seviyede doğrusal bir ilişki varlığı saptandı.

Tablo 9. Monosit bölgesinde seçili belirteçler arası korelasyonlar

	n	r	p
MONOSİT% 0.GÜN & MONOSİT% 11.GÜN	13	0,447	0,126
CD34% 0.GÜN & CD34% 11.GÜN	13	-0,201	0,511
CD71% 0.GÜN & CD71% 11.GÜN	13	0,094	0,761
CD71/CD34 0.GÜN & CD71/CD34 11.GÜN	13	-0,175	0,567
CD90% 0.GÜN & CD90% 11.GÜN	13	0,175	0,568
CD90/CD34 0.GÜN & CD90/CD34 11.GÜN	13	-0,178	0,560
CD117% 0.GÜN & CD117% 11.GÜN	13	0,997	<0,001
CD117/CD34 0.GÜN & CD117/CD34 11.GÜN	13	-0,155	0,613
CD38% 0.GÜN & CD38% 11.GÜN	13	0,995	<0,001
CD38/CD34 0.GÜN & CD38/CD34 11.GÜN	13	-0,205	0,501
CD45RA% 0.GÜN & CD45RA% 11.GÜN	13	0,230	0,449
CD45RA/CD34 0.GÜN & CD45RA/CD34 11.GÜN	13	-0,372	0,210

5. TARTIŞMA

Hematopoietik KH'lerin, çeşitli hastalıkların tedavisi açısından oldukça geniş bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Bu amaçla hematopoez ile fonksiyonel KI'ni rejenere edebilmek veya yeterli sayıda HKH toplamak ilgili tedavilerin ilk adımıdır. Az miktarda, farklı sayıda HKH, normal kararlı durumda dolaşımda vardır ve periferik HKH mobilizasyonu olarak adlandırılan kemoterapi ve/veya sitokinlerle tedaviyi takiben HKH'lerin periferik kana aktarılması gerekir.⁷⁰

Çalışmamızda MM tanısı almış hastalarda; siklofosamid+G-CSF ikilisi kullanılarak HKH mobilizasyonunun takibi ve nakil amacıyla değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

CD34+ hücrelerin %90'ından fazlası lenfoid, miyeloid veya eritroid serilere farklılaşmasına karar veren karakteristik antijenler taşır. Uzun-dönem kemik iliği kültürünü başlatan hücreler CD34 eksprese ederler ve CD3, CD4, CD8, CD10, CD14, CD15, CD19, CD20, CD33, CD38 ve CD71 (CD34+ Lin-hücreler) gibi alt grup antijenlerini taşımazlar. Hematopoietik kök hücre CD34⁺DR⁻lin⁻ olarak tanımlanmıştır.⁷¹

Kararlı durum hematopoezinde, dolaşımdaki lökositlerin yaklaşık olarak %0.01'i CD34+ kök hücrelerdir. Tipik olarak hücreler, periferik kanda dolaşımdaki CD34+ sayısı 10/μL'yi aştığında toplanır. En az 2x10⁶ CD34+ hücre/kg vücut ağırlığı olan hastalarda güvenilir aşılama yapılabilir.⁷² Periferik kan CD34+ hücre sayısının optimum eşiği konusunda kesin bir fikir birliği olmamakla birlikte, rutinde gerçekleştirilen uygulamalar 5 - 20/ μL arasında değişmektedir.⁷³

Çalışmamızda CD34+ absolüt hücre sayısı μL'de ortalama 39,82±31,58 bulunmuştur. 15/μL'nin altında CD34+ hücre sayısı olan 3 hastada mobilizasyon için farklı bir ajan kullanılması uygun görülmüştür.

Hansson ve ark. yaptıkları bir çalışmada optimal mobilizasyonunun ne zaman gerçekleşeceğine ilişkin en iyi öngörü değişkeninin, monositik hücrelerdeki artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu gözlem, monosit sayısındaki günlük nispi artışın, kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin optimal mobilizasyonunun ne zaman gerçekleşeceğinin bir göstergesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir.⁷⁴ Çalışmamızda 0. ve 11. günler arasında

monosit sayı yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bir artış saptanmıştır. Rutin klinik uygulamalarda, 0. günde siklofosamid verildikten sonra, 5. günde G-CSF'nin 6 gün süreyle verilmesi sonrasında 11. gün itibarıyla CD34+ hücreler sayılarak HKH'lerin toplanmasına başlanmaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde çalışmamızda analizi gerçekleştirilen numunelerde arzulanan hedefe ulaşılmış olduğu görülmektedir.

İleri yaş gruplarında MM gelişme riski daha yüksekken, 45 yaş altı hastalarda çok daha nadir görülen bir tanıdır. Ortanca tanı yaşı 65'tir.⁷⁵

Bizim çalışmamızda yaş ortalaması $59,07\pm 8,33$ saptanmıştır.

Multiple miyelom ön tanısı olan hastalardan alınan Kİ numunelerinde miyeloma hücreleri, akım sitometrisi kullanılarak güçlü CD38/CD138 pozitifliği ve CD45 negatifliği kullanılarak tespit edilebilir. CD38, erken B hücresi gelişimi sırasında ifade edilen, olgun aktif B hücrelerinde bulunmayan ve plazma hücrelerinde güçlü bir şekilde yeniden ifade edilen antijenidir. CD138, miyelom hücrelerinin yüzeyinde bulunan proteoglikandır.⁷⁶ Tae-Dong Jeong ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada 62 MM hastasının 61'inde (%98,4) CD138 pozitif saptanmıştır.⁷⁷ Murat Albayrak ve ark. yaptıkları bir çalışmada 29 MM hastasını teşhis etmek ve malign plazma hücrelerini ayırt etmek için CD38 ve CD138 kullanmışlardır ve CD38 ve CD138 tüm vakalarda pozitif saptanmıştır.⁷⁸ Çalışmamızda yapılan istatistiksel analizde, hastalardaki total CD138/CD38 birlikteliği ortalaması $11,24\pm 11,99$ olarak tespit edilmiştir.

Nöral hücre adezyon molekülünün (NCAM) bir izoformu olan CD56, normalde nöral dokular ve bağışıklık sisteminin doğal öldürücü (NK) hücreleri tarafından eksprese edilen bir membran glikoproteinidir.⁷⁹ Sahara N ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; CD56 negatif olan MM vakalarının kötü prognoza sahip olduğu ve ekstramedüller hastalık, Bence Jones proteini, böbrek yetmezliği, trombositopeni olasılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. CD56 ekspresyonunu, 70 MM hastasının 55'inde (%79) belirlemişlerdir.⁸⁰ Pan Y ve ark. yaptıkları retrospektif bir çalışmada 50 MM hastasının %74'ünde CD56 ekspresyonunu artmış olarak tespit etmişlerdir.⁸¹ Skerget ve ark. 110 MM hastasıyla yaptıkları çalışmada CD56 ekspresyonunu %71 bulmuşlardır.⁸² Yapılan başka bir çalışmada 34 MM hastasının 29'unda (%85,3) CD56 pozitifliği tespit edilmiştir.⁸³ Epameinondas Koumpi ve ark. tarafından 2021 yılında

multiple miyelomlu hasta grubunda yapılan bir çalışmada; malign plazma hücrelerinde CD56'nın ekspresyon oranının yaklaşık %62 olduğu bildirilmiştir.⁷⁹ Chuanying Geng ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada 370 MM hastasının 250'sinde (%67,6), CD56 ekspresyonunun tespit edilebileceği gösterilmiştir.⁸⁴ Çalışmamızda, diğer çalışmalarla uyumlu olarak, kapılanan malign plazma hücrelerinde CD56 yüzde ortalaması $90,86 \pm 29,66$ bulunmuştur.

CD34⁺ hücre popülasyonunun akım sitometrisi ile daha fazla karakterize edilmesi, CD45RO'nun ekspresyonu ve CD38, CD33, CD13 ve HLA-DR ifadesinin olmaması ile multipotent progenitör hücreleri daha doğru bir şekilde tanımlayabilir. Comitted progenitör hücreler, miyeloid (CD33, CD13), eritroid (CD71), lenfoid (CD7, CD19) veya megakaryositik soy (CD41, CD61) ile ilişkili antijenlerle birlikte CD34'ü ifade edebilmektedirler. CD90 veya Thy-1, fetal karaciğer, kordon kanı ve kemik iliğinde bulunan varsayılan olgunlaşmamış hematopoietik kök hücreler üzerinde CD34 ile birlikte eksprese edilen bir antijendir.⁸⁵

Kordon kanının CD34+CD38-CD45RA- hücrelerindeki Thy1 ekspresyonunun kaybının, HKH'leri multipotent progenitörlerden ayırmak için yeterli olduğu öne sürülmüştür.⁸⁶ Ravindra Majet ve ark. yaptıkları bir çalışmada Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA- kordon kanı hücrelerinin HKH'leri içerdiğini göstermişlerdir. Ek olarak, bu popülasyonun insan hematopoietik gelişim hiyerarşisinin en üstünde yer aldığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte; hem CD90+CD45RA- hem de CD90-CD45RA- hücrelerinin benzer miyeloid ve lenfoid hücre üretimi yüzdeleri ile uzun süreli in vivo multipotent insan hematopoezi oluşturma yeteneğine sahip olduğunu ancak CD90-CD45RA- olanların uzun süreli aşılama için daha fazla hücrenin naklini gerektirdiklerinden ve hücre eşdeğeri nakil başına daha az insan hücresi ürettiklerinden, daha düşük bir aşılama kapasitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir.⁸⁷

Yapılan çalışmalarda, CD45RA ve CD38 antikorlarının, HKH'lerde negatif olarak raporlandığı bildirilmiştir. Böylece, son on yılda CD34+ CD38- Thy1+ CD45RA- hücreler olarak insan HKH'lerinin bir resmi ortaya çıkmıştır.⁸⁸ M. Syrjala ve ark. yaptıkları çalışmada soy spesifik antijenlerin belirgin ekspresyonu olmayan CD34+ hücrelerde CD45RA'nın negatif olduğunu ve CD45 ekspresyonlarının çok zayıf olduğunu tespit etmişlerdir.⁸⁹ Çalışmamızda

lenfosit kapısındaki CD34 sayı ve yüzdeleri anlamlı olarak artmıştır ($p=0,018$). Aynı zamanda yapılan analizlerde CD90/CD34 birlikte pozitifliğinde de anlamlı bir artış ($p=0,039$) varlığı saptanmıştır. Bu durumun HKH'lerde CD90'ın CD34 ile birlikte eksprese edilmesi nedeniyle gerçekleşmiş olduğunu değerlendirilebilir.

Lenfosit kapısındaki CD38 sayı ve yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görülüyor olması da ($p=0,016$) CD38 antikorlarının kök hücrelerde değil, olgunlaşmanın ileri aşamalarındaki hücrelerde eksprese ediliyor olmasından kaynaklandığı fikrindeyiz.

Çalışmamızda lenfosit ($p<0,001$) ve monosit ($p=0,016$) kapısında CD45RA sayı yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu da HKH 'lerde CD45RA'nın eksprese edilmemesi şeklindeki bilgileri desteklemektedir.

Kemik iliği numunelerinde, CD71 için erken eritroid öncüllerde membranöz ve intra sitoplazmik boyama yoğunluğu parlak görülür iken geç normoblastlarda düşük seviyede kalmıştır.⁵³ Çalışmamızda örneklerde kapılanan lenfosit bölgesinde CD71 antikor sayı ve yüzdelerinde ($p=0,003$) ve CD71/CD34 birlikte pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p=0,019$) olduğu belirlenmiştir.

Yetişkin kemik iliği veya göbek kordonu kanından türetilen CD34+ hücrelerinin, CD45RA (bir lökosit ortak antijen izoformu) ve CD71 (transferrin reseptörü) antijenlerinin ekspresyonuna dayalı olarak farklı alt popülasyonlara ayrılabilceği gösterilmiştir. CD34+ hücreleri, yüksek düzeyde CD45RA ve düşük seviyelerde CD71 eksprese ederlerse (CD34+CD45RA+CD71- hücreleri), miyeloid farklılaşma soyuna bağlı progenitörler oluşurlar. Düşük seviyelerde CD45RA ve yüksek seviyelerde CD71 (CD34+CD45RA-CD71+ hücreleri) ifade ederlerse eritroid farklılaşma soyuna bağlı progenitörler oluşurlar. Buna karşılık, hem CD45RA hem de CD71'in (CD34+CD45RA^{low}CD71^{low} hücreleri) düşük seviyelerini ifade eden CD34+ hücreleri, multipotent progenitörlerdir.⁹⁰

CD117, HKH, mezenkimal kök hücreler ve multipotent progenitörler dahil olmak üzere çok çeşitli doku kök hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen bir sitokin reseptörü tirozin kinaz tip III'tür. Hematopoietik/mezenkimal kök/progenitör hücre tiplerini ve bunların farklılaşma ve aktivite aşamalarını

belirlemek ve izlemek için spesifik antikorlar kullanılarak saptanabilir.⁹¹ Escribano ve ark. , eritroid, granülositik ve monositik soylara bağlı progenitörler ve küçük NK ve T-hücre öncülleri popülasyonları dahil olmak üzere CD34+ hücrelerinin %50'sinden fazlasının CD117'yi de ifade ettiğini bildirmişlerdir.⁹²

Sperling ve ark. ve Ashman ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda CD34+ kemik iliği hücrelerinin %70'inin aynı zamanda CD117+ olduğu belirtilmiştir.^{93, 94} Selim Kuçi ve ark. yaptıkları çalışmada mobilize periferik kan CD34+ hücrelerinin yaklaşık %15-40'ının c-Kit'i birlikte ifade ettiğini saptamışlardır.⁹⁵ Simmons ve ark. CD34+ hücrelerinin ortalama %76'sının c-kit'i birlikte eksprese ettiğini bulmuşlardır.⁹⁶

Çalışmamızda lenfosit kapısında ($r=0,978$; $p<0,001$) ve monosit kapısında ($r=0,997$; $p<0,001$) CD117'nin 0. günü ile 11. günü arasında istatistiksel olarak pozitif yönde yüksek seviyede doğrusal bir ilişki saptanmıştır. Bu da CD117'nin HKH'lerde eksprese edildiğini desteklemektedir. Aynı zamanda CD117/CD34 0. gün değeri ile CD117/CD34 11. gün değerleri arasında ($r=0,597$; $p=0,031$) pozitif yönde yüksek seviyede doğrusal bir ilişki saptanmıştır.

Siklofosfamid+G-CSF ikilisi HKH mobilizasyonunda en yaygın kullanılan rejimlerden bir tanesidir. Otolog hematopoietik kök hücre transplantasyonu planlanan 13 MM hastasında siklofosfamid+G-CSF ikili protokolünün HKH mobilizasyonunda ne kadar etkin olduğunu CD34, CD38, CD45RA, CD71, CD90, CD117 belirteçlerinin analizini kullanarak belirlemeye çalıştık. Mevcut çalışmanın daha geniş hasta gruplarıyla yapılabilmesi hususunu değerlendirmekle birlikte; çalışma sonucunda elde edilen verilerin mevcut haliyle MM hastalarının tedavi ve takibinde önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmaya multiple miyelom tanısı alan 13 hasta dahil edildi. Yaş ortalaması $59,07 \pm 8,33$ saptandı.

Lenfosit popülasyonunda;

- 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,002$),
- CD34% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,018$),
- CD71% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,003$),
- CD71/CD34 0.gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,019$),
- CD90/CD34 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,039$),
- CD38% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,016$),
- CD45RA% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlendi.

Monosit popülasyonunda;

- 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p<0,001$),
- CD38% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,045$),
- CD45RA% 0. gün ile 11. gün değerleri arasında ($p=0,016$) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlendi.

Lenfosit kapısında, hastaların 0. ve 11. günlerde analiz edilen belirteçlerdeki korelasyonları;

- CD90/CD34 0. gün değeri ile CD90/CD34 11. gün değerleri arasında ($r=0,678$; $p=0,011$),
- CD117 % 0. gün değeri ile CD117 % 11. gün değerleri arasında ($r=0,978$; $p<0,001$),
- CD117/CD34 0. gün değeri ile CD117/CD34 11. gün değerleri arasında ($r=0,597$; $p=0,031$),
- CD38 % 0. gün değeri ile CD38 % 11. gün değerleri arasında ($r=0,963$; $p<0,001$),
- CD45RA % 0. gün değeri ile CD45RA % 11. gün değerleri arasında ($r=0,737$; $p=0,004$) pozitif yönde yüksek seviyede doğrusal bir ilişki varlığı saptandı.

Monosit kapısında, hastaların 0. ve 11. günlerde analiz edilen belirteçlerdeki korelasyonları;

- CD117 % 0. gün değeri ile CD117 % 11. gün değerleri arasında ($r=0,997$; $p<0,001$),
- CD38 % 0. gün değeri ile CD38 % 11. gün değerleri arasında ($r=0,995$; $p<0,001$) pozitif yönde yüksek seviyede doğrusal bir ilişki varlığı saptandı.

Otolog hematopoietik kök hücre nakli planlanan MM hastalarında, hematopoietik KH mobilizasyonunda kullanılan siklofosamid+G-CSF protokolünün etkinliğini görmek ve en uygun toplama zamanına karar vermek için absolü CD34 sayısı/ μ L dışında CD38, CD45RA, CD71, CD90, CD117 gibi belirteçlerin kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Daha geniş hasta popülasyonu kullanılarak yapılacak yeni çalışmaların; projemizin amaçlarını net olarak ortaya koymak ve literatüre katkı sağlamak adına faydalı olacağını önerebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy* 2019;10(1):68.
2. Wei Q, Frenette PS. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunity* 2018;48(4):632–648.
3. Wilkinson AC, Yamazaki S. The hematopoietic stem cell diet. *International Journal of Hematology* 2018;107:634–641.
4. Salvino MA, Ruiz J. Hematopoietic progenitor cell mobilization for autologous transplantation – a literature review. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016;38(1):28–36.
5. Balassa K, Danby R, Rocha V. Haematopoietic stem cell transplants: principles and indications. *British Journal of Hospital Medicine* 2019;80(1):33-39.
6. Liesveld JL, Sharma N, Aljitali OS. Stem cell homing: From physiology to therapeutics. *Stem Cells* 2020;38(10):1241–1253.
7. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. *Rambam Maimonides Med J* 2014;5(4):e0028.
8. Khaddour K, Hana CK, Mewawalla P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *StatPearls* [Internet].
9. Vose JM, Ho AD, Coiffier B. et al. Advances in mobilization for the optimization of autologous stem cell transplantation. *Leukemia & Lymphoma* 2009;50(9):1412–1421.
10. Belov L, Vega O, Remedios CG, Mulligan SP, Christopherson RI. Immunophenotyping of Leukemias Using a Cluster of Differentiation Antibody Microarray. *Cancer research* 2001;61(11):4483–4489.
11. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 2019;120(5):1–11.
12. Shahrabi S, Ghanavat M, Behzad MM, Purrahman D, Saki N. CD markers polymorphisms as prognostic biomarkers in hematological malignancies. *Oncology Reviews* 2020;14(2):466.
13. Gerecke C, Fuhrmann S, Striffler S, Schmidt-Hieber M, Einsele H, Knop S. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Deutsches Arzteblatt International* 2016;113(27-28):470–476.

14. Blade J, Rosinol L, Cibeira MT, Rovira M, Carreras E. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010. *Blood* 2010;115(18):3655-3663.
15. Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(1):19-28.
16. Tekeli S, Arısu Naghavi E, Gökçe B. et al. Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(2):72-83.
17. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 2005;34(5):415- 423.
18. Can A. A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turk J Haematol* 2008;25(2):57-59.
19. Ökçesiz A, Ündeğer Bucurgat Ü. Sitotoksosite çalışmalarında kök hücre. *Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Ankara* 2017;41(2):1-14.
20. Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: An overview. *Transfusion and Apheresis Science* 2014;51(3):68-82.
21. Motabi IH, DiPersio JF. Advances in stem cell mobilization. *Blood reviews* 2012;26(6):267-278.
22. Tabe Y, Konopleva M. Advances In Understanding The Leukemia Microenvironment. *Br J Haematol* 2014;164(6):767–778.
23. Hopman RK, DiPersio JF. Advances in Stem Cell Mobilization. *Blood Rev* 2014;28(1):31–40.
24. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends in biochemical sciences* 2006;31(10):589-595.
25. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development* 2013;140(12):2463-2467.
26. Ho MSH, Medcalf RL, Livesey SA, Traianedes K. The dynamics of adult haematopoiesis in the bone and bonemarrow environment. *British Journal of Haematology* 2015;170(4):472–486.
27. Alfaro MP, Saraswati S, Young PP. Molecular Mediators of Mesenchymal Stem Cell Biology. *Vitam Horm* 2011;87: 39–59.
28. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells* 2019;8(8):784.

29. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006;24(5):1294 –1301.
30. Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 2010;3:105–117.
31. Ding X, Huang W, Peng Y. et al. Pegfilgrastim improves the outcomes of mobilization and engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of multiple myeloma. *Annals of Hematology* 2020;99(6):1331–1339.
32. Arat M. Hematopoetik kök hücrelerin klinik kullanımı. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(1):10-18.
33. Saccardi R, Gualandi F. Hematopoietic stem cell transplantation procedures. *Autoimmunity* 2008;41(8):570–576.
34. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I et al. Stem cell mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003;419-437.
35. Hsu YMS, Cushing MM. Autologous Stem Cell Mobilization and Collection. *Hematol Oncol Clin N Am* 2016;30(3):573–589.
36. Kruijf EJ, Fibbe WE, Pel M. Cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization: unraveling interactions between stem cells and their niche. *Ann. N.Y Acad. Sci* 2020;1466:24–38.
37. Albakri M, Tashkandi H, Zhou L. A Review of Advances in Hematopoietic Stem Cell Mobilization and the Potential Role of Notch2 Blockade. *Cell Transplantation* 2020;29:1–13.
38. Liu L, Liu Y, Yan X, Zhou C, Xiong X. The role of granulocyte colony-stimulating factor in breast cancer development: A review. *Molecular Medicine Reports* 2020;21(5): 2019-2029.
39. To LB, Levesque JP, Herbert KE. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood* 2011;118(17):4530-4540.
40. Keating GM. Plerixafor A Review of its Use in Stem-Cell Mobilization in Patients with Lymphoma or Multiple Myeloma. *Drugs* 2011;71(12): 1623-1647.
41. Tanhehco YC, Vogl DT, Stadtmauer EA, O'Doherty U. The evolving role of plerixafor in hematopoietic progenitorcell mobilization. *Transfusion* 2013;53(10):2314-2326.

42. Jantunen E, Kvalheim G. Mobilization strategies in hard-to-mobilize patients with lymphoid malignancies. *European journal of haematology* 2010;85(6):463-471.
43. Ford CD, Chan KJ, Reilly WF, Petersen FB. An evaluation of predictive factors for CD34+ cell harvest yields from patients mobilized with chemotherapy and growth factors. *Transfusion* 2003;43(5): 622-625.
44. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells* 2014;32(6):1380–1389.
45. Felschow DM, McVeigh ML, Hoehn GT, Civin CI, Fackler MJ. The adapter protein CrkL associates with CD34. *Blood* 2001;97(12):3768–3775.
46. Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *Journal of Pathology* 2002;197(4):430–440.
47. Rheinlander A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters* 2018;196:22-32.
48. Ahmed Al Barashdi M, Ali A, McMullin MF, Mills K. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). *J Clin Pathol* 2021;74(9):548–552.
49. Glaria E, Valledor AF. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells* 2020;9(1):228.
50. Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res* 2001;25(1):1–12.
51. Piedra-Quintero ZL, Wilson Z, Nava P, Guerau-de-Arellano M. CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity. *Front Immunol* 2020;11
52. Liu Q, Wang M, Hu Y. et al. Significance of CD71 expression by flow cytometry in diagnosis of acute leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2014;55(4):892–898.
53. Marsee DK, Pinkus GS, Yu H. CD71 (Transferrin Receptor) An Effective Marker for Erythroid Precursors in Bone Marrow Biopsy Specimens. *Am J Clin Pathol* 2010;134(3):429-435.
54. Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumor Biol* 2016;37(9):11611–11622.

55. Yang J, Zhan XZ, Malola J. et al. The multiple roles of Thy-1 in cell differentiation and regeneration. *Differentiation* 2020;113:38–48.
56. Kim J, Villadsen R. Expression of Luminal Progenitor Marker CD117 in the Human Breast Gland. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2018; 66(12): 879–888.
57. Zhao F, Chen Y, Wu Q, Lu J. Prognostic value of CD117 in cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(3):1012-1021.
58. Bataille R, Pellat-Deceunynck C, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P. CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis. *Leukemia Research* 2008;32(3):379–382.
59. Hans CP, Finn WG, Singleton TP, Schnitzer B, Ross CW. Usefulness of Anti-CD117 in the Flow Cytometric Analysis of Acute Leukemia. *Am J Clin Pathol* 2002;117(2):301-305.
60. Özdemir Ö, Karavaizoğlu Ç. Akım Sitometrinin İmmünolojik ve Allerjik Hastalıklarda Kullanımı. *Asthma Allergy Immunol* 2016;14:117-128.
61. Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2007;5(2):75-82.
62. Başlar Z. Trombositopeniler ve Trombosit İşlev Bozukluklarında Labaratuvar Değerlendirmesi (Tam Kan Sayımı, Çevresel Kan Yayması, Kanama Zamanı, PFA, Trombosit Agregasyon Testi, Akış Sitometrisi). *Türkiye Klinikleri J Hematol-Special Topics* 2014;7(2):14-20.
63. Mutlu E, Gültekin M. Akım Sitometride Veri Analizi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2015;45(4):155-159.
64. Glavey SV, Leung N. Monoclonal gammopathy: The good, the bad and the ugly. *Blood Reviews* 2016;30(3):223-231.
65. Khouri J, Samaras C, Valent J. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: A primary care guide. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2019;86(1):39-46.
66. Joshua DE, Bryant C, Dix C, Gibson J, Ho J. Biology and therapy of multiple myeloma. *Med J Aust* 2019;210(8):375-380.
67. Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Current problems in cancer* 2009;33(1):7-64.

68. Firth J. Haematology: multiple myeloma. *Clinical Medicine* 2019;19(1): 58–60.
69. Mehta A. Multiple myeloma. *Hematology* 2015;20(1):58-59.
70. Takeyama K, Ohto H. PBSC mobilization. *Transfusion and Apheresis Science* 2004;31(3):233–243.
71. Ozmen S, Fındıkcıoğlu F, Siemionow M. *Türk Plast Rekonstr Est Cer Derg* 2006;14(3):187-196.
72. Abdel-Rahman F, Tuffaha HW, Sharma S. et al. GCSF with or without chemotherapy compared to Plerixafor with GCSF as salvage mobilization regimen in patients with multiple myeloma and lymphoma: Collection effectiveness and cost effectiveness analysis. *J Oncol Pharm Practice* 2014;20(2):130–136.
73. Goker H, Etgul S, Buyukasik Y. Optimizing mobilization strategies in difficult-to-mobilize patients: The role of plerixafor. *Transfusion and Apheresis Science* 2015;53(1):23–29.
74. Hansson M, Svensson A, Engervall P, Björkholm M, Gruber A, Söderström T. Increase of monocytes predicts mobilization of peripheral stem and progenitor cells after chemotherapy followed by G-CSF administration, *Eur J Haematol* 1995;54:321-328.
75. Brigle K, Roger S B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in Oncology Nursing* 2017;33(3):225-236.
76. Ak I, Aslan V, Vardareli E, Gülbaş Z. Tc-99m methoxyisobutylisonitrile bone marrow imaging for predicting the levels of myeloma cells in bone marrow in multiple myeloma: correlation with CD38/CD138 expressing myeloma cells. *Annals of Hematology* 2003;82(2):88-92.
77. Jeong TD, Park CJ, Shim H, et al. Simplified flow cytometric immunophenotyping panel for multiple myeloma, CD56/CD19/CD138(CD38)/CD45, to differentiate neoplastic myeloma cells from reactive plasma cells. *The Korean Journal of Hematology* 2012;47(4):260-266.
78. Albayrak M, Sahin Balcık O, Dagdas S, et al. Role of flow cytometry in multiple myeloma and the prognostic significance of CD87 (uPAR) expression. *Turk J Haematol* 2010;27(3):182-189.

79. Koumpis E, Tassi I, Malea T, et al. CD56 expression in multiple myeloma: Correlation with poor prognostic markers but no effect on outcome. *Pathology - Research and Practice* 2021;225:153567
80. Sahara N, Takeshita A, Shigeno K, et al. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2002;117(4):882–885.
81. Pan Y, Wang H, Tao Q, et al. Absence of both CD56 and CD117 expression on malignant plasma cells is related with a poor prognosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leuk Res* 2016;40:77–82.
82. Skerget M, Skopec B, Zadnik V, et al. CD56 expression is an important prognostic factor in multiple myeloma even with Bortezomib induction. *Acta Haematol* 2018;139(4):228–234.
83. Ceran F, Falay M, Dağdaş S, Özet G. The assessment of CD56 and CD117 expressions at the time of the diagnosis in multiple myeloma patients. *Turk J Haematol* 2017;34(3):226–232.
84. Geng C, Zhou H, Wang H, et al. Newly diagnosed multiple myeloma patients with CD56 expression benefit more from autologous stem cell transplantation. *BMC Cancer* 2022; 22(1):1349.
85. Stewart DA, Guo D, Luider J, et al. The CD34⁺90⁺ cell dose does not predict early engraftment of autologous blood stem cells as well as the total CD34⁺ cell dose. *Bone Marrow Transplantation* 2000;25(4):435–440.
86. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science* 2011;333(6039):218–221.
87. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell Stem Cell* 2007;1(6): 635–645.
88. Tian C, Zhang Y. Purification of hematopoietic stem cells from bone marrow. *Ann Hematol* 2016;95(4):543–547.
89. Syrjala M, Ruutu T, Jansson SE. A flow cytometric assay of CD34-positive cell populations in the bone marrow. *British Journal of Haematology* 1994;88(4):679–684.

90. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of Functionally Distinct Subpopulations of CD34+ Cord Blood Cells in Serum-Free Long-Term Cultures Supplemented With Hematopoietic Cytokines. *Blood* 1993;82(9):2664-2672.
91. Ohshima S, Mori S, Shigenari A, et al. Differentiation ability of multipotent hematopoietic stem/progenitor cells detected by a porcine specific anti-CD117 monoclonal antibody. *BioScience Trends* 2014; 8(6):308-315.
92. Escribano L, Ocqueteau M, Almeida J, Orfao A, San Miguel JF. Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1998;30(5-6):450-466.
93. Sperling C, Schwartz S, Büchner T, Thiel E, Ludwig WD. Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. *Haematologica* 1997;82(5):617-621.
94. Ashman LK, Cambareri AC, To LB, Levinsky RJ, Juttner CA. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 1991;78(1):30-37.
95. Kuci S, Taylor G, Neu S, Schumm M, Niethammer D, Handgretinger R. Phenotypic and functional characterization of mobilized peripheral blood CD34+ cells coexpressing different levels of c-Kit. *Leukemia Research* 1998;22(4):355-363.
96. Simmons PJ, Aylett GW, Niutta S, To LB, Juttner CA, Ashman LK. c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Exp Hematol* 1994;22(2):157-165.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KH: Kök hücre

H: Hematopoietik

M: Mezenkimal

Kİ: Kemik iliği

G-CSF: Granülosit koloni stimüle edici faktör

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör

SCF (Stem cell factor): Kök hücre faktörü

IL: İnterlökin

VCAM1: Vasküler hücre adezyon molekülü 1

CAR (CXCL12 abundant reticular cells): CXCL12'den zengin retiküler hücreler

CXCR4: CXC kemokin reseptör 4

VLA-4: Very late antijen 4

Ang-1: Anjiyopoetin-1

MPL: Miyeloproliferatif lösemi proteini (Trombopoetin reseptörü)

LT-HSC: Long-term (uzun vadeli) hematopoietik kök hücre

ST-HSC: Short-term (kısa vadeli) hematopoietik kök hücre

MPP: Multipotent progenitörler

CMP: Common myeloid progenitör

LMPP: Lenfoid multipotent progenitör

GMP: Granülosit–makrofaj progenitör

MEP: Megakaryosit–eritrosit progenitör

CLP: Common lymphoid progenitor

HKHN: Hematopoietik kök hücre nakli

AHKHN: Allojenik HKHN

OHKHN: Otolog HKHN

HLA: Human lökosit antijen

SHKHN: Singeneik HKHN

GVHD: Greft versus host hastalığı

CXCL12 (CXC kemokin ligand 12): SDF1 (Stroma derive faktör 1): Stroma kaynaklı faktör 1

MM: Multipl miyelom

CSF: Koloni stimüle edici faktör

M-CSF (CSF1): Makrofaj CSF

GM-CSF (CSF2): Granülosit-makrofaj CSF ,

G-CSF (CSF3): Granülosit CSF

IL3: Çok potansiyelli CSF

G-CSFR: G-CSF reseptörü

LPS: Lipopolisakkarid

TNF: Tümör nekroz faktör

IFN: İnterferon

MMP: Matriks metalloproteinaz

DPP4 (CD26): Dipeptidil peptidaz 4

CD (Cluster of Differentiation): Farklılaşma kümesi

PTPRC: Protein tirozin fosfataz reseptör tip C

NK (Natural killer): Doğal öldürücü

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

TfR-1: Transferrin reseptör 1

Thy-1 (Thymus cell antigen 1): Timus hücre antijeni 1

GPI: Glikofosfotidilinositol

AS: Akım sitometri

FSC (Forward scatter): İleri saçılan

SSC (Side scatter): Yana saçılan

DNA: Deoksiribo nükleik asit

MGUS (Monoclonal gammopathy of undetermined significance): Önemi belirsiz monoklonal gamopati

WM: Waldenström makroglobulinemi

KLL: Kronik lenfositik lenfoma

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

ADPR : Adenozin difosfat riboz

cADPR: Siklik adenozin difosfat riboz

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

Sayfa No

Şekil 1. Hematopoietik sistemin hiyerarşik düzenlenmesi

15

Şekil 2. Hastalara ait nokta-alan grafiği örnekleri

37



TABLÖLAR DİZİNİ

TABLÖ	Sayfa No
Tablo 1. Hematopoietik kök hücrelerin aktivitesini düzenleyen moleküller	14
Tablo 2. HKHN ile tedavi edilen hastalıklar	17
Tablo 3. Periferik hematopoietik kök hücre mobilizasyon ajanları	23
Tablo 4. MGUS, smoldering MM ve aktif MM için tanı kriterleri	31
Tablo 5. Hastaların tanı anındaki CD138/CD38, CD56, Kappa, Lambda yüzdeleri	39
Tablo 6. Lenfosit sayı yüzdeleri ve kapılanan lenfosit bölgesindeki seçilmiş belirteçlerde meydana gelen değişiklikler	40
Tablo 7. Monosit sayı yüzdeleri ve kapılanan monosit bölgesindeki belirteçlerde meydana gelen değişiklikler	41
Tablo 8. Lenfosit kapısında seçili belirteçler arası korelasyonlar	42
Tablo 9. Monosit bölgesinde seçili belirteçler arası korelasyonlar	43