

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof.Dr.MAHMUT ÇARİN

132315

ÇOCUKLARDA ALLOJENEİK KEMİK İLİĞİ  
TRANSPLANTASYONU SONRASI PCR VE FISH  
YÖNTEMLERİYLE KİMERİZM TAYİNİ VE  
PROGNOZLA İLİŞKİSİ

132315

DOKTORA TEZİ

Dr.Hülya BİLGİN

İSTANBUL - 2003

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 KÖK HÜCRE VE HEMATOPOEZ.....	3
2.2 HEMATOPOETİK ORGANLAR.....	5
2.3 ÖNCÜ HÜCRELER.....	6
2.4 KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU.....	7
2.4.1 KİT TARİHÇESİ.....	7
2.4.2 KİT ENDİKASYONLARI.....	9
2.4.3 KİT YÖNTEMLERİ/ HAZIRLAMA –UYGULAMA.....	13
2.4.4 KİT'DE HAZIRLAMA REJİMLERİ.....	17
2.4.5 KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU SONRASI YENİDEN İMMUN YAPILANMA.....	21
2.4.6 KİT'DE İZLEM.....	26
2.4.7 KİT'DE ERKEN /GEÇ YAN ETKİLER.....	28
2.4.8 ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LÖSEMİLERİNDE KİT.....	32
2.4.8.1 AML'de KİT.....	32
2.4.8.2 ALL'de KİT.....	36
2.4.9 MYELODİPLASTİK SENDROMLARDA KİT.....	39
2.4.10 ÇOCUKLUK ÇAĞI ANEMİLERİNDE KİT.....	42
2.5 ALLOJENEİK LENFOHEMATOPOETİK TRANSPLAN TASYONDAN SONRA TAM VE MİKS KİMERİZMİN SAPTANMASI VE ÖNEMİ.....	45
2.5.1 KİMERİZMİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE TEKNİKLER.....	47
2.5.2 DUYARLIK VE NİCELİK TAYİNİ.....	48
2.5.3 KİT SONRASI KİMERİZM TAYİNİNDE KULLANILAN KAN ÖRNEĞİNİN KAYNAĞI .....	49
2.5.4 HEMATOLOJİK MALIGN HASTALIKLAR İÇİN MYELOBLASTİK KİT SONRASI KİMERİZM.....	49
2.5.5 LENFOPROLİFERATİF BOZUKLUKLAR İÇİN NON-	

MYELOABLATİF KİT SONRASI KİMERİZM.....	50
2.5.6 MYELOİD LÖSEMİDE KİT SONRASI KİMERİZM.....	50
2.5.7 MALIGN OLMAYAN BOZUKLUKLAR İÇİN KİT SONRASI KİMERİZM.....	51
2.5.8 KİMERİZM ANALİZLERİNDE DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN KONULAR.....	53
2.6 FISH YÖNTEMİ.....	54
2.6.1 FISH TEKNİĞİ.....	55
2.6.1.1 Problar.....	57
2.6.1.2 İşaretleme.....	58
2.6.1.3 Görüntüleme Sistemleri.....	59
2.7 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU.....	61
2.7.1 PCR ANA PRENSİP.....	61
2.7.2 PCR 'DA KONTAMİNASYON.....	63
2.7.3 PCR KULLANIM ALANLARI.....	63
2.7.4 ÇOĞALTILAN DNA'NIN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE GÖSTERİLMESİ.....	64
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	65
3.1 KAN ÖRNEKLERİ.....	65
3.2 İSTATİKSEL YÖNTEM.....	65
3.3 ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR VE MALZEMELER... 65	
3.3.1 FISH YÖNTEMİ	
3.3.1.1 Cihazlar.....	65
3.3.1.2 Kimyasal maddeler.....	66
3.3.1.3 Çalışmada kullanılan solüsyonlar.....	66
3.3.1.4 Kullanılan problar.....	68
3.3.1.5 X-Kromozomu tesbiti için protokol.....	69
3.3.1.6 X ve Y Kromozom tesbiti için protokol.....	71
3.3.2 PCR YÖNTEMİ.....	72
3.3.2.1 Cihazlar.....	72
3.3.2.2 Kimyasal maddeler.....	72
3.3.2.3 Sarf malzemeleri.....	73
3.3.2.4 Çözeltiler.....	74

3.3.2.5 Kullanılan VNTR Alelleri.....	75
3.3.2.6 Periferik kandan DNA İzolasyonu.....	76
3.3.2.7 PCR Reaksiyonu.....	77
3.3.2.8 PCR ısı koşulları.....	78
3.3.2.9 Agaroz jelin hazırlanması.....	79
4. BULGULAR .....	80
5.TARTIŞMA.....	108
6.ÖZET.....	115
7.SUMMARY.....	116
8.ÖZGEÇMİŞ.....	117
9.KAYNAKLAR.....	119



## ÖNSÖZ

*Son yıllarda çok önemli gelişmeler olduğu ve büyük başarıların yaşandığı pediatrik hematoloji – onkoloji alanında, kemik iliği nakli (KİT), “şifa sağlayıcı” özelliği de göz önüne alındığında, en önemli tedavi yöntemlerinden biri olarak ön plana çıkmaktadır. Değişik uygulama alanları ve yöntemleri KİT’nu daha da araştırmaya açık ve gelecek için ümit verici hale getirmektedir.*

*Türkiye’de pediatrik KİT’u alanında ilk olma özelliğini taşıyan merkezimizin 1989 yılından beri her aşamasında görev alma ve gelişimini izleme şansına ulaşmam komuya olan ilgimi daha da arttırdı. Hastalarda kök hücre naklinden sonra prognozu belirleyebilmek ,birtakım önlemleri ve tedavi yöntemlerini erken uygulayabilmek açısından takipte çok önemlidir. FISH ve PCR yöntemlerini kullanarak tesbit edeceğimiz kimerizm biçiminin ve oranının hastaların prognozları ile ilişkisi olup olmadığını araştıran bir tez çalışması yapmayı amaçladım. Umarım ileriye yönelik uygulamalarımızda yönlendirici olabilir.*

*Bu çalışmada ve tüm meslek hayatımda bana her zaman eğitici ve yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Gündüz Gedikoğlu’na, tez hocam, organ nakilleri çalışmalarının kilit insanı Prof.Dr.Mahmut Çarin’e ,kendisinden devamlı öğrendiğim ve sürekli desteğini aldığım Prof.Dr.Sema Anak’a, tez çalışmasında tümüyle destek olan Prof.Dr.Filiz Aydın ve Prof.Dr.Mehmet Gürtekin’e ,Uzm.Dr.Fatma Savran Oğuz’a ,Doç.Dr.Uğur Özbek ve DETAE çalışanlarına, çalışma arkadaşlarım Dr. Semra Özgenç, Dr.Emine Can, Dr.Asuman Kökrek, Dr.Kürşat Özdilli, Uzm.Psi.Gülcan Peykerli’ye, KİT’na başladığımız ilk günden beri kader birliği ettiğim KİT ekibine ve beni her zaman destekleyen Rahmi Sübar , tüm BLÇV çalışanlarına ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.*

## KISALTMALAR

AA	Aplastik Anemi
AGvHD	Akut GvHD
AKİT	Allojenik KİT
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
ATG	Anti Timosid Globulin
BFM	Berlin – Münster – Frankfurt (Almanya) grubu
CC	Tam kimerizm
CCSG	Children's Cancer Study Group
CMV	Sitomegalo Virus
Cy	Siklofosamid (Cyclophosphamide)
CyA	Cyclosporin A
DFS	Hastaliksız Sağ Kalım
DLI	Donör Lenfosit İnfüzyonu
EBMT	Avrupa KİT Birliği
EFS	Olaysız Sağ Kalım
EX	Exitus (Ölüm)
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
GvHD	Graft versus Host Hastalığı
GvL	Graft versus Lösemi etkisi
HD	Hodgkin Hastalığı
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSCT	Hemopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
HSV	Herpes Simplex Virus
HZV	Herpes Zoster Virus
Inf.	İnfeksiyon
IVIG	Intravenöz Immunglobulin
KC	Karaciğer
Kİ	Kemik İliği
KİT	Kemik İliği Nakli (Transplantasyonu)
KGvHD	Kronik GvHD

KML	Kronik Myeloid Lösemi
KMMoL	Kronik Myelo Monositer Lösemi
KT	Kemoterapi
LAK	Lenfosit aktive Öldürücü Hücre
LAP	Lenfadenopati
Lok.	Lokosit
MDS	Myelodisplastik Sendrom
NK	Doğal Öldürücü Hücre
MS	Multipl Skleroz
MUD	Aile dışı doku uyumlu donörler
NHL (NHML)	Non – Hodgkin (Malin) Lenfoma
OKİT	Otolog KİT
PKH	Periferik Kök Hücre
PKHT	Periferik Kök Hücre Transplantasyonu
PR	Parsiyel Remisyon
RA	Refrakter Anemi
RArt.	Romatoid Artrit
RAEB	Yüksek Blastlı Refrakter Anemi
RAEB – t	Yüksek Blastlı Refrakter Anemi – Geçiş Şekli
RARS	Refrakter Anemi + Halka Sideroblastlar
RMS	Rabdomiyosarkom
RT	Radyoterapi
SAML	İkincil AML
SCF	Kök Hücre Faktörü
SCID	Ağır Kombine İmmun Yetmezlik
SKİT	Sinjeneik KİT
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
TBI	Tüm Vücut Işınlaması
TBM	Transplanta Bağlı Mortalite
TLI	Total Lenfoid Işınlama
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TR	Tam Remisyon (CR)

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik iliği nakli çocuklarda pek çok hematolojik, kalıtsal, metabolik ve malign hastalıkta tedavi edici bir yöntem olarak başarı ile kullanılmaktadır. Allojeneik kemik iliği nakil sonrası relaps (hastalık tekrarı) ve rejeksiyon ise başarıyı etkileyen en önemli faktörlerdendir. Relapsın önceden belirlenebilmesi halinde uygulanacak immunolojik uygulamalar ile tekrar remisyon (iyilik hali) sağlanabilmektedir (14).

Kimerizm latince sözcük olan “ chimera” dan kökenini almaktadır ve canlı bir organizmadaki aynı veya farklı türde diğer bir bireyden köken alan hücre popülasyonudur. Allojeneik kemik iliği nakil sonrası dönemde alıcıdaki hematolojik hücrelerin alıcı ya da verici kökenli olup olmadığının (kimerizm durumu) incelenmesi hastanın prognozu açısından önemlidir. Hastanın altta yatan hastalığının tekrarını erken dönemde belirlemeye olanak sağlayabilir (5).

Karşı cinsten yapılan kemik iliği nakli sonrası cinsiyet kromozomu tayini kimerizm belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Karyotip analizleri, uzun zaman ve emek gerektirmektedir. Bu yüzden FISH (Fluoresan In Situ Hibridizasyon) yöntemi ile cinsiyet tayini daha kısa sürede ve kantitatif sonuç vermektedir (41).

Alıcı ve verici hücrelerinin ayırımındaki en kesin yöntemlerden biri son derece polimorfik olan genetik işaretleyicilerin (değişik sayıda tandem tekrarları = VNTR ve kısa tandem tekrarlar = STR) izlenmesidir . Özellikle cinsiyet uygun nakil sonrası kimerizm tayini bu tip DNA analizleri ile mümkün olmaktadır ve hem duyarlılık hem de özgünlük açısından önemli faydalar sağlamaktadır (38).

Kemik iliği nakli sonrası bir çok yan etki ve faktör KİT başarısında önemlidir. Bu tez ile prognozda etkili olduğu bilinen bu faktörlerle kimerizm durumunun ilişkisini araştırmak ve kimerizm durumunun da tek başına hastanın geleceğinde etkili olup olmadığını değerlendirmek istendi. Türkiye’de çocuklarda ilk kez gerçekleştirilecek olan bu tez ile çocuklarda kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini, kimerizm tayini sonrası miks ya

da tam kimerizm gelişen hastalarda kimerizm durumunun prognozla ilişkisinin araştırılarak kimerizm gelişmesinde etkili faktörlerin tayini amaçlanmıştır.

Bu çalışma ile altta yatan çeşitli hastalıkları nedeniyle allojenik kemik iliği nakli yapılan çocuklarda kimerizm tayininin ve tipinin nakil başarısını önceden tahmin etmemize yardımcı olup olmayacağını belirlenerek Türk çocuklarında ilk kez yapılan bu çalışma ile diğer araştırmacılara örnek oluşturmak hedeflendi.

Bu amaçla, Bizim-Lösemili Çocuklar Vakfı kemik iliği nakil ünitesinde allojeneik kemik iliği nakli uygulanmış çocuklarda Türkiye’de ilk kez yapılan bu çalışma ile kimerizm durumu ,cinsiyet farkı olanlardan kemik iliği nakil sonrası periferik kandan 1 ay ve 3ay sonra FISH ile cinsiyet kromozomu tayin ederek, cinsiyet farkı olmayan hastalarda PCR ile VNTR analizleri yapılarak nakil öncesi durumları ile nakil sonrası durumları karşılaştırılarak incelendi.

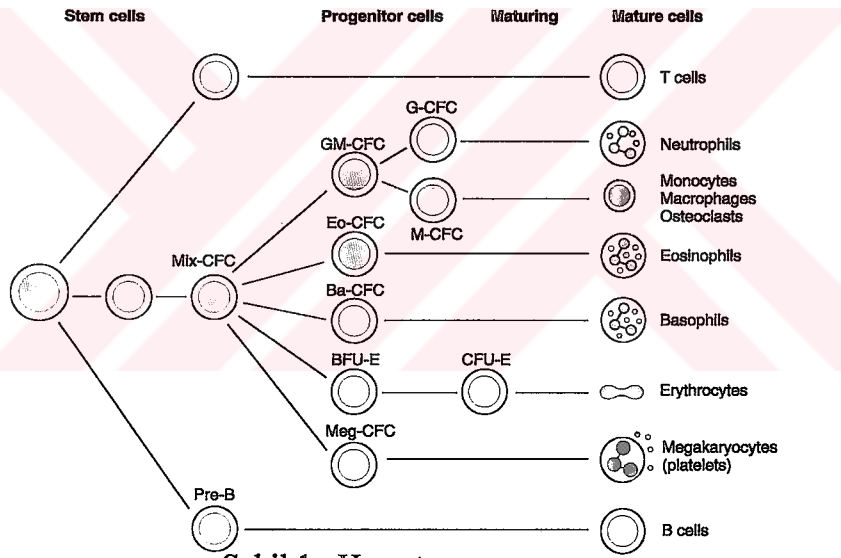
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 KÖK HÜCRE VE HEMATOPOEZ

Hematopoetik kök hücre (pluripotent kök hücre) hem benzerlerini yaparak devamlılığı, hem de farklılaşarak serileri oluşturacak öncüleri (multipotent progenitör) meydana getirerek olgunlaşmayı sağlayabilen hücrelerdir (Şekil 1).

Hematopoetik kök hücreyi tanımlarken iki özelliğini belirtmek gerekir :

- 1) Hematopoetik serilere farklılaşma yeteneği,
- 2) Kendini yenileyerek hematopoezi tüm yaşamboyu sürdürme yeteneği (102).



Şekil 1 : Hematopoez

Öncü hücreler sitokinler ile farklılaşarak çoğalır ve tek yönlü öncüleri (unipotent progenitör) oluşturur ki bu hücrelerin kendini yenileme yeteneği sınırlıdır. Tek yönlü öncüler de çoğalır, farklılaşır ve kendini yenileyemeyen genç öncüleri (prekürsör) oluşturur (34). Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler sürekli uyarılarak farklılaşır ve olgun hücreleri (granulosit, eritrosit, trombosit v.s.) oluşturur. Bu hücrelerin belli sayılarda göllenmesiyle dokulara oksijen taşınır (eritrositler), infeksiyonlar önlenir (granulositler) ve pıhtılaşma işlemi sürdürülür (trombositler), hematopoez de devam eder. Farklılaşmış son hücrelerin hızlı üretimi ve kısa ömürleri (2 – 120 gün) kemik iliğinin gelecekteki yapım özelliklerini ve yaşam süreçlerini tayin eder. Hematopoezin

sürekliği kemik iliğindeki kök hücrelerin çoğalarak benzerlerini yaratmaları ve değişik dizilere farklılaşması ve olgunlaşması ile sağlanır. Farklılaşmaya yönelme kararlılığı, yeni dizilerin tipi ve miktarı rastgele olaylardır. Ancak tümü sitokinlerin kontrolu altındadır (75).

Tüm serilerin üstündeki “multilineage”(tüm serilere farklılaşabilen) hematopoetik kök hücreye özgü bir işaretleyici henüz saptanmamıştır. Ancak CD34+ antijen taşıyan öncü hücreler uzun süreli “engraftman” (yamanma) sağlayabilir. Buradan alt gruplar ortaya çıkar, bunlar miyeloid, eritroid veya megakaryositik farklılaşma özelliği taşırlar. En erken “multilineage” kök hücre, CD34+, MDR-1+, c-kit+, ve CD45RO+, ancak CD38-, HLA-DR-, ve seri farklılaşma işaretleyicisi negatiftir (81). Buna karşın serilere has öncü hücreler CD34'e ek olarak miyeloid (CD33 ve CD13), megakaryositik (CD41 ve CD61), eritroid (CD71), B-lenfoid (CD19), veya T-lenfoid (CD7) işaretleyicileri de taşır (102, 103). Periferik kök hücre (PKH) CD34+ hücrelerin özel bir alt grubudur. İmmunfenotipik olarak CD34+/CD38-, miyeloid veya lenfoid seriye has işaretleyiciler (Lin-) yok, Thy-1 farklılaşma antijeni pozitifdir (CD34+/CD38-/Lin-/Thy-1+ hücreler) (29).

Normal süreçte kök hücrelerin büyük çoğunluğu hücre döngüsü dışındadır (Go fazındadır). Az orandaki kısmı ise hücre döngüsüne girerek çoğalmayı ve farklılaşmayı sağlamaktadır. Erişkin bir erkekte (70 kg) günde bir trilyon hücre döngüye girer (75).

Kök hücre fonksiyonlarının belirlenmesinde kullanılan değişik çalışmalar mevcuttur (Tablo1). Bir görüşe göre KİT sonrası kan hücre serilerinin uzun süreli engraftmanı kök hücrenin hematopoetik fonksiyonunu test edebilir. Bir diğer görüşe göre de, gerçek hematopoetik kök hücre, nakledilebilir veya nakledilemez ancak her durumda tüm kök hücre fonksiyonlarını koruyan hücrelere dönüşebilmelidir (102).

#### **Tablo 1 . Kök hücreyi saptamakta kullanılan yöntemler :**

##### **1) Kök hücre aktivitesini ölçen çalışmalar**

###### **A. In vitro çalışmalar**

- B. In vivo alışmalar (CFU'ler)
  - C. Radyoterapiden koruma
  - D. Yarışmasal rekonstitüsyon
  - E. Retroviral işaretleme
  - F. Ksenograft modelleri
- 2) Kök hücre popülasyonunun izolasyonu
- A. Fare kök hücrelerinin izolasyonu – Thy-1/Sca-1+Lin-/  
Alt grubu / grupları
  - B. İnsan Kök Hücrelerinin izolasyonu olarak sıralanabilir (101).

## 2.2 HEMATOPOETİK ORGANLAR

Embriyogenez esnasında ilk hematopoez vitellus kesesinde başlar (gestasyonun ilk 6 – 8 haftası). Daha sonra karaciğer ve dalak sırayla bu görevi üstlenir. Bunu kemik iliği izler. Postnatal dönemde kemik iliği normal şartlarda tek hematopoez organıdır. Geç fetal dönemde erişkin tipi hemoglobin yapmaya başlasalar da halen fetal hemoglobin yapımı vardır ve tam erişkin tip hemoglobine dönüş bir yılın sonundadır. Bu değişik aşamalardaki kök hücrenin aynı mı, farklı mı olduğu tartışmalıdır ve son görüşler farklı olduğu yönündedir (21). Hematopoetik organların ortak yapısı kan damarları, stroma ve nc hücrelerdir. Stroma nc hücrelerin yanında hematopoetik dokuyu oluşturan değişik hücrelerden (fibroblastlar, adipositler, makrofajlar, lenfositler ve endotel hücreleri v.b.) oluşur, yani nc hücrelerin gelişip çoğaldığı mikroçevreyi oluşturur (54).

Kemik iliğinin venöz yapısı karmaşık sinuslardan oluşur ve santral venlere direne olur, progenitor hücreler sinuslar dışında farklılaşır. Sinusların iini döşeyen endotel hücrelerinin, hematopoetik hücrelerin kemik iliğinden kana veya kandan kemik iliğine geçişinde rol oynadığı düşünülmektedir (21,62). Stromadaki ekstraselüler matriks çeşitli fibroz proteinler, glikoproteinler, ve protoglikanlardan (stroma tarafından yapılan kollagenler, fibronektin, laminin) oluşur. Hematopoetik progenitor hücreler özel yüzey reseptörleri ile matriksdeki makromoleküllere bağlanır (21). Protoglikanlar aynı zamanda büyüme faktörleri için de bağlanma bölgeleridir (44).

## 2.3 ÖNCÜ HÜCRELER

Progenitör hücreleri lenfoid ve hematopoetik popülasyonlar olarak gruplayabiliriz. İmmun hücreler diğer hematopoetik hücrelerden bağımsız olarak hareket ederler. B ve T lenfositler ve timus bu sistemde en önemli komponentlerdir. Birçok antijene cevapta T ve B lenfositler kombine hareket ederler, T lenfositler hücresele immünite cevaplarından sorumlu iken, B lenfositler antikoru yapırlar. Her iki grubunun da tek bir ana hücreden kaynaklandığı konusunda önemli ipuçları mevcuttur. Ancak gerek T gerekse B lenfositlerin neden vücudun otoantijenlerine reaksiyon vermediği halen tartışılmaktadır. B ve T lenfositlerin ömrü kısaysa da latent bir hafıza dönemine girerek aynı uyarıya çok uzun bir süre sonra da cevap verebilirler, bu özellik onları diğer hematopoetik hücrelerden ayırır. Son zamanlarda çalışmalar antijen sunan hücrelere yönelmiştir. Önce antijenik epitopl yapılr, sonra antijen sunan hücreler üzerinde yerleşirler. Bu grup hücreler makrofajlar ve dendritik hücreler olabilir ve MHC gruplarıyla direkt ilintilidirler (66).

Hematopoetik hücre grubu konusunda ilk çalışmalar 1961'de bu hücrelerin farelere injekte edildiğinde çoğalabileceğinin gösterilmesiyle başladı ve bu hücrelere dalak kolonileri (CFU-S) adı verildi. Önceleri bu hücrelerin ana kök hücre olduğu zannedildi, ancak doğrulanmadı. Daha sonraları değişik hücre serilerini uyaran maddeler izole edildi Granulosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF), Makrofaj Uyarıcı Faktör (M-CSF), Granulosit Uyarıcı Faktör (G-CSF), Interlökin 3 (IL-3). Daha sonra eritropoetin de pürifiye edildi. 1985'de Interlökin 4-18 (IL-4-18), Kök Hücre Faktörü(SCF), Trombopoetin saptandı. Bu maddelerin tümü glikoprotein karakterindedirler, 15.000 – 45.000 KD büyüklüğündedirler. Çoğu salgılanırsa da M-CSF ve SCF membranda yer alırlar. Bunların uzun süreli uyarıcı faktör olarak kök hücre naklinden sonra kullanımının hiperplaziye yol açtığı ama lösemi oluşturmadığı gösterilmiştir. Ancak hücrelerin kendini yenileme süreçlerindeki ek bir bozukluk lösemik klonun oluşumuna yol açabilir (54).

## 2.4 KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU ( KİT)

### 2.4.1 KİT TARİHÇESİ

Kemik İliği Transplantasyonu (KİT) günümüzde onkolojide ve onkoloji dışı pek çok hastalığın tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Onkolojide, özellikle cerrahi - kemoterapi - radyoterapi gibi diğer tedavi yöntemlerinin başarısız kaldığı olgularda KİT hayat kurtarıcı olabilir.

İlk KİT uygulaması, 1891'de Brown-Sequard ve d'Arsonaval tarafından, kemik iliği yetersizliği olan bir hastaya kemik iliği oral yolla verilerek yapılmıştır. 1937'de Schretzenmayr paraziter infeksiyonların tedavisinde otolog KİT (OKİT) / allojenik KİT (AKİT)'i intramüsküler yolla denemiş ve bazı başarılı sonuçlar bildirmiştir. 1939'da Osgood kemik iliğini intravenöz, 1944'de Bernard intramedüller yolla uygulamışlardır. 1950'lerde hayvan deneyleri, kök hücrenin hemopoezdeki yerini ve transfer edilebilirliğini göstermiş ve allojenik ve otolog KİT denemelerine devam edilmiştir (12, 56). 1957'de E.D.Thomas KİT'deki ilk başarılı çalışmaları yayınlamış, özellikle Tüm Vücut Işınlaması (TBI), "Graft versus Host Hastalığı" (GvHH)'nda "Metotreksat" profilaksisi gibi yeni uygulamaları ile dikkat çekmiştir. 1961'de McFarland Aplastik Anemi'de KİT ile başarılı ilk sonuçları bildirirken, 1963'de G.Mathé AKİT'de habis hücre uzaklaştırılmasında radyoterapinin rolünü, başarılı graflamada yüksek hücre sayısının önemini, steril bakımın ve GvHH'nın başarıdaki rolünü bildirmiştir. 1964'de Bach'ın karışık hücre kültürünü (MLC), 1965'de Dausset'in insan lökosit antijenleri (HLA) doku sistemlerini tarif etmesiyle Allojenik KİT'de yeni bir dönem açılmıştır. 1969'da DeKorning Ağır Kombine İmmun Yetmezlik (SCID)'te, E.D.Thomas Aplastik Anemi ve Lösemi'de başarılı sonuçlar yayınlamışlardır. 1950 - 1960'larda solid tümörlerin tedavisinde denenen ancak başarısız kalan OKİT uygulamalarına, AKİT'de tüm vücut ışınlanması (TBI ) ve yüksek doz kemoterapi ile alınan başarılı sonuçlar ışığında, 1980'lerde bu rejimlere yeniden dönülmüş ve lösemi, lenfoma ve solid tümörlerde başarıyla uygulanmıştır (7,56). 1980-1990 dönemi KİT'in "Altın Çağı" olmuş, uygulama ve merkez sayısı hızla artmış, AKİT'de doku grubu uygun kardeş

dışında “Alternatif Donör”lerin kullanımı, GvHH’da Cyclosporin A’nın uygulanması (Powles, 1980), infeksiyon profilaksisi ve tedavisindeki önemli gelişmeler başarıyı arttırmış ve “şifa” kavramını gündeme getirmiştir.

IBMTR ve EBMTR gibi kuruluşların veri toplama ve değerlendirmeleri, verici bankalarının hızla genişlemesi ve integrasyonu önemli katkılar sağlamıştır. Son yıllarda kemik iliği yerine periferik kök hücre, kordon kanı v.b uygulamaları da önemli aşamalar sağlamıştır.

Periferik kök hücre nakillerinin geçmişi 20.yüzyılın başına dayanmaktadır. 1909’da A. Maximow periferik kanda, lenfositler arasında, nakli mümkün, pluripotent yeteneği olan küçük hücrelerin varlığını bildirmişse de ancak 1960’larda kök hücre kavramı ortaya konmuş, 1964’de Cavins ve ark.ları ilk kez köpekte otolog periferik kök hücre naklini başarmışlardır (89). Ancak, 1976’da başarılı kök hücre toplama teknikleri geliştirilmiş, ilk kez 1978’de McCredie ve ark.ları sinjeneik kan lokositlerini kemoterapi sonrası destek tedavisi olarak kullanmışlar, 1985 - 86’da C.Juttner, M.Körbling, J.Reiffer ve A.Kessinger ilk başarılı klinik uygulamaları bildirmişlerdir (90). 1989’da A.Kessinger ilk allojeneik (T-hücresi ayıklanmış) KİT’i uygulamış, 1994’de ise Dreger ve Schmitz, Russell aynı işlemi T-hücre ayıklaması yapılmadan bildirmişlerdir (98).

Artık KİT başarısında bir doygunluk gözlenmektedir. Örneğin lösemide, 1980 - 85 ile 1985 - 90 dönemlerinde, survi oranları tüm gelişmelere rağmen ancak %5 arttırılabilmıştır(50). Yeni yöntemler ve yan etkilerin azaltılmasının başarıyı arttırabileceği düşünülmektedir. Çocukluk yaş grubunda, henüz sayıların azlığı, yaş gruplarının farklılığı, uygulama çeşitliliği, hastalık seyrindeki değişkenler ve tedavi yaklaşımlarındaki uygunsuzluklar sağlıklı bir sonuca varılmasını ve standardizasyonu engellemektedir. Uluslararası ortak çalışmalar ile bu sorunun çözümlenmesine çalışılmaktadır (73,74).

Dünyada ve Avrupa’da veriler ayrı ayrı toplanmakta ve değerlendirilmektedir. Avrupa’de EBMT 1990 yılında ilk topladığı verilerde toplam 4.234 KİT (2.137 AKİT, 2.097 OKİT) bildirirken 1997’de 16.950 KİT (4.751 AKİT, 12.199 OKİT)

bildirmektedir. PKHT sayısı da 1991’de 4961 iken 1997’de 16.932’ye yükselmiştir (47). 1998’de 31 Avrupa ülkesinde 528 ekip 20.892 nakil yapmıştır. Bu nakillerden 18.400’ü 1. nakildir; 5.308’i (%29) allojenik, 13.092’i (%71) otolog nakildir. Otolog nakillerden 809’u (%6) kemik iliğinden, 12.283’ü (%94) PKH’dendi. Allojenik nakillerden 3.372’si (%64) kemik iliğinden, 1.936’sı (%36) PKH’dendi (47)2001 EBMT sonuçlarında total sayı 38.915, allojenik nakil 20.879, otolog nakil 18.846’e ulaşmıştır (94).

## 2.4.2 KİT ENDİKASYONLARI :

Çocukluk çağı KİT endikasyonları onkolojide ve onkoloji dışı hastalıklarda olmak üzere geniş bir hasta grubunu ilgilendirmektedir (Tablo 2-3) ( 6, 31, 42, 53, 56 ,73, 74 ).

**Tablo 2 . Pediatrik Kemik İliği Nakli Endikasyonları**

### A.Allojenik KİT

#### I.Onkolojik Hastalıklar

##### 1.Lösemiler

- a. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) -  $\geq 2$ . Tam Remisyon (TR), Yüksek riskli 1. Remisyon ( $\leq 1$  yaş, Prednol cevapsızlığı, lokosit sayısı  $\geq 100.000 / \text{mm}^3$ , t(9 ; 22), t(4 ; 11) v.b.)
- b.Akut Myeloid Lösemi (AML) -  $\geq 1$ . TR
- c.Kronik Myeloid Lösemi (KML) - Kronik faz (Akselere, blastik faz).
- d.Juvenil KML - Kronik faz
- e. Myelodisplastik Sendrom (MDS) (Monosomy 7) - RAEB -t ve öncesi fazlar

## 2.Lenfomalar

- a.Hodgkin Hastalığı (HD) - Dirençli, relaps (Kİ tutulmuş)
- b.Non - Hodgkin Malin Lenfoma (NHML) - Dirençli, relaps (~ Kİ tutulmuş)

## 3.Ailevi Hemofagositik Lenfhistiositoz (FEL) - 1. TR

## 4.Solid Tümörler

- a.Nöroblastoma -  $\geq 1$ .TR (?)(~ Kİ tutulmuş)

## II. Onkoloji Dışı Hastalıklar

### 1.Konjenital

- a.İmmun Yetmezlik Sendromları
- b.Hematolojik Sorunlar (Hemoglobinopatiler, Blackfan-Diamond v.b)
- c.Depo Hastalıkları / Mukopolisakkaridozlar
- d.Lizozomal Hastalıklar
- e.Osteopetrozis

### 2.Edinsel

- a.Ağır Aplastik Anemi
- b.Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri
- c.Myelofibrozis

## B. Otolog KİT

### I. Onkolojik Hastalıklar

#### 1. Lösemiler

a. ALL -  $\geq 2$ . TR

b. KML -  $\geq 1$ . TR

c. KML - Lösemik klon" İnterferon" ile elimine edilirse,  
akselere fazdan kronik faza döndürmek için

#### 2. Lenfomalar

a. Hodgkin Hastalığı - Dirençli, relaps

b. Non - Hodgkin Malin Lenfoma (NHML) - Dirençli, Relaps

#### 3. Solid Tümörler

a. Nöroblastom -  $\geq 1$ . TR

b. Ewing Sarkomu - Relaps, Dirençli

c. Rabdomyosarkoma (RMS) - Relaps, Dirençli

d. Germ Hücreli Tümör - Relaps, Dirençli

e. Beyin Tümörleri - Relaps, Dirençli

f. Testis Tümörleri - Relaps, Dirençli

g. Wilms Tümörü - Relaps, Dirençli

h. Diğer (Histiositozlar, Erişkin tipi tümörler)

#### 4. Otoimmün hastalıklar (SLE, RA, MS v.b)

**Tablo 3. Avrupa KİT (EBMT) birliğinin pediatrik onkolojik hastalıklarda KİT endikasyonları / 1998 (42).**

<u>Hastalık</u>	<u>Hast.Durumu</u>	<u>AlloKİT</u>		<u>OKİT</u>
		<u>Kardeş</u>	<u>Panel</u>	
AML	1.TR (Düşük Risk)	Ö	Ö	Ö
	1. TR (Yüksek Risk)	R	Ö	R
	2. TR	R	AP	R
ALL	1. TR (Düşük Risk)	Ö	Ö	Ö
	1. TR (Yüksek Risk)	AP	AP	Ö
	1.TR	R	R	AP
	>2. TR	R	R	AP
KML	Kronik Faz	R	R	AP
	İleri Fazlar	R	AP	Ö
NHML	1. TR (Düşük Risk)	Ö	Ö	Ö
	1. TR (Yüksek Risk)	AP	AP	AP
	2. TR	R	AP	AP
Solid Tm.	Germ H.li Tm.	Ö	Ö	AP
	Ewing Sarkomu	Ö	Ö	AP
	Yumuşak Doku Sar.	Ö	Ö	AP
	Nöroblastom	Ö	Ö	AP
	Wilms Tm.	Ö	Ö	AP
	Osteojenik Sarkom	Ö	Ö	GP
	Beyin Tümörleri	Ö	Ö	AP

R - Rutin Kullanım Ö - Önerilmez AP - Araştırma Protokolü

GP - Geliştirilen Protokol TR -Tam Remisyon

### 2.4.3 KİT YÖNTEMLERİ /HAZIRLAMA - UYGULAMA

Bugün için KİT’de değişik hemopoetik hücre kaynağı kullanılmaktadır (Tablo 4) (25).

**Tablo 4 .KİT’de kullanılabilir hemopoetik hücre kaynakları**

**A. Kemik iliği kullanımı**

**1. Allojenik KİT - Vericiden yapılan KİT**

- HLA ve DR grupları uygun kardeş verici
- HLA ve DR grupları kısmen uygun aileden vericiler
- HLA ve DR grupları uygun aile dışı vericiler (Kİ bankası)

**2. Sinjenik KİT - Tek yumurta ikizi verici**

**3. Otolog KİT - Kendi Kİ kullanılarak KİT**

**B. Periferik Kök Hücre Nakli (PKHT) - Periferden kök hücre toplanarak KİT**

**1.Otolog PKHT**

**2.Allojenik PKHT**

**C . Kordon Kanı Nakli**

**D. Fetal Karaciğer Hücresi Nakli**

**E. Gen Nakli**

**Allojenik KİT (AKİT):**

Bu yöntemde, sağlıklı ve doku grubu (HLA / DR) uyumlu bir vericiden elde edilen hemopoetik hücreler, alıcıya, uygun bir kemoterapi ve / veya radyoterapi içeren bir hazırlık rejimi sonrası damar yoluyla (i.v) nakledilir. ABO kan grubu uygunsuzluğu sorun oluşturmaz. Doku grubu uygun verici bulma şansı %25 - 30’dur. Doku bankaları bu oranı arttırmıştır. Donöre riski < %1’dir. Donörden kemik iliği (Kİ) anestezi altında “crista iliaca” dan toplanabileceği gibi PKH olarak da toplanabilir (59, 83).

### **Otolog KİT (OKİT) / PKHT:**

Hastanın kendi hemopoetik hücreleri (Kİ veya perifer kaynaklı) toplanır, hemen veya dondurulup bilahare uygun bir hazırlama rejimini (in vivo ayıklama - purging) takiben (kemoterapi ve / veya radyoterapi ile), hücreler direkt olarak (eritilerek) veya yabancı hücreler ayıklandıktan sonra (ex vivo ayıklama - purging) hastaya damar yoluyla (i.v) verilir.

Myoablatif tedaviden sonra otolog KİT kurtarıcı olarak kullanılır. KİT öncesi genellikle tümör kontaminasyonu olmaması istenir. Klonojenik tümör hücrelerinin otolog kemik iliğinden ayıklanması için değişik teknikler kullanılmaktadır. Ör. Kemoterapi ajanları, İmmuno-mekanik işlemler v.b. Bu tip ayıklama işleminden sonra kemik iliği engraftmanı etkilenmektedir. Aynı zamanda, kontamine ürünler ile nakil yapılan hastaların büyük çoğunluğunda, relaps, eski hastalık bölgelerinde olmuştur ki bu hazırlık rejiminin etkisizliğini gösterir (51). Bu nedenlerle, ayıklanmış otolog kemik iliğinin nakil için kullanımı hala kesin değildir.

PKHT için hücreler kemoterapi ve / veya büyüme faktörleri verilerek ve hemaferrez yöntemleriyle toplanır (30,55, 64). Dolaşan kök hücreler, kemik iliğine alternatif olarak, özellikle pelvik ışınlama alan, kemik iliği tutulumu olan ve kemik iliği aspirasyonu işlemini tolere edemeyecek hastalarda endikedir. PKH nakli ile daha daha hızlı bir hematopoetik rekonstitüsyon sağlanması da avantajıdır. PKH ile de tümör hücreleri ile kontaminasyon seyrek değildir. CD34 pozitif seleksiyonu ile tam bir ayıklanma sağlayabilir (28) .

### **Kordon Kanı Nakli:**

Son yıllarda uygulamaya girmiştir. Doğum esnasında plasentadan elde edilen hemopoetik kök hücreler kullanılır (68).

KİT' da kök hücre kaynağına göre avantaj ve dezavantajlar Tablo 5 'de özetlenmiştir.

**Tablo 5 . KİT uygulama tekniklerinin avantaj / dezavantajları**

**I. Allojenik KİT**

**A. Avantajlar :**

1. Relaps oranı düşüktür
2. Graft versus Lösemi (Tümör) (GvL) etkisi

**B. Dezavantajlar :**

1. Uygun bir verici bulunması zordur (%25 – 30)
2. Sinjenik KİT dışında GvHD riski
3. Yaşla risk artar
4. CMV ve interstisyel pnomoni – Özellikle kardeş dışı vericiler kullanıldığında siktir

**II. Otolog KİT**

**A. Avantajlar :**

1. Kemik iliği saklandıktan sonra hastaya subletal yüksek doz kemoterapi / radyoterapi yapılarak tümör eliminasyonu sağlanabilir
2. Verici gerekmez
3. GvHD olmaz
4. İleri yaşlarda da yapılabilir
5. CMV riski azdır

**B. Dezavantajlar :**

1. Relaps riski yüksektir (Tümör kontaminasyonu)
2. GvL etkisi yoktur (Siklosporin, İI-2 gibi immunmodülatörler kullanılmıştır)
3. Graft yetersizliği olabilir (Ayıklanma kullanma veya eski kemoterapilerin etkisi)

### III. Periferik Kök Hücre Nakli (PKHT)

#### A. Avantajlar :

1. Anestezi riski yoktur
2. AlloKİT ve OKİT için kullanılabilir
3. AlloPKHT'de GvL etkisi ve az relaps, OPKHT'de GvHD olmaması geçerlidir
4. Hemopoetik düzelme AlloKİT ve OKİT'den hızlıdır
5. Tümör hücresi kontaminasyonu daha azdır

#### B. Dezavantajlar :

1. Çocuklarda hemoferezis sistemleri henüz yeterince gelişmemiştir
2. Graft kalıcılığı sorgulanmaktadır
3. Allojenik çocuk vericilerde büyüme faktörü kullanımı etik bir sorundur
4. Yeterli kök hücre sağlanması sorun olabilir
5. GvHD oranı yükselebilir (AlloPKHT)

### IV. Kordon Kanı Nakli

#### A. Avantajlar :

1. Verici sağlama olasılığı artar
2. Vericiye zararsızdır
3. Vericinin kök hücrelerinin erken kullanımı olasıdır
4. Depolanıp "banka" olarak kullanılabilir
5. İmmunolojik bariyerlerin sınırlanması graft reddini ve GvHD'yi azaltır

#### B. Dezavantajlar :

1. Kontaminasyon fazladır
2. Yeterli kök hücre sağlanması zor olabilir
3. Doğum oranı az ülkelerde kullanımı sınırlıdır
4. Hemopoetik düzelme geç olur

## 2.4.4 KİT 'DE HAZIRLAMA REJİMLERİ

### A. Myeloablatif Transplantasyon

Yüksek doz sitotoksik kemo ve / veya radyoterapi ile kemik iliğinin ortadan kaldırılması (myeloablasyon), sonrasında immün sistemi de baskılanmış olan alıcıya HLA uyumlu vericiden alınan hematopoietik hücrelerin verilmesi KİT uygulamasının en önemli kısımlarıdır.

KİT'de kullanılan hazırlık rejimleri Allojenik KİT ve OKİT'de benzerdir. Her ikisinde de hastalara yüksek doz kemoterapi (Siklofosfamid, Busulphan v.b) ± Fraksiyone TBI kombinasyonu verilebilir. Bazı protokollere Ara-C, bazılarında da VP-16 veya melfalan ilave edilmektedir (6,53).

### B. Nonmyeloablatif Transplantasyon

Günümüzde büyük ölçüde myeloablatif yapılan allojeneik hemapoetik kök hücre transplantasyonu (HSCT) işlemine ait komplikasyonlar, transplant alternatifinin; malign hastalıklar için hastalık ilerlemesinden ölüm olması, malign olmayan hastalıklar için yaşam kalitesinde kabul edilemeyecek ölçüde bozulma olması dışında, ayrıca genel olarak da 60 yaş sınırı dışında kullanımını kısıtlamıştır (46).

### Değişen Görüşler

Malign hücrelerin öldürülmesinde yüksek doz tedavinin esas olduğu düşüncesi, zaman içinde allojeneik transplantın malignite ortadan kaldırmasında asıl etkisinin verici T hücrelerine ait olduğu (graft versus tümör-GVT- etkisi) şeklinde değişikliğe uğramıştır. Graft versus host hastalığı (GVHH) olanlarda lösemi relapsı insidansının daha az olması, sinjeneik transplantlarda veya T hücre arındırılması yapılanlarda yüksek relaps oranı, posttransplant relapsta donör lökosit infüzyonları ile sitotoksik kemoterapi olmaksızın remisyon sağlanması bu değişikliğe yol açan klinik gözlemlerin en önemlileridir (6). Bu durumda beklenti, verilen hematopoietik hücrelerle oluşan yeni immün sistemin kür sağlamasıdır. Verici T hücreleri, hem alıcı lenfoid hücrelerini hedef

olarak verici T hücre tam kimerizmini hem de ilik hücrelerini hedef olarak boşluk açılmasını sağlamaktadırlar. Bu buluşlar, transplantın uygulama şeklinin sorgulanmasına yol açmıştır. Kür sağlayan gerçek etkinin yüksek doz tedaviye ait olmaması, verici hücrelerine yer açmak için kemik iliğinin ortadan kaldırılmasının gerekmediğinin anlaşılmasına ve transplant öncesi hazırlama rejimlerinde önemli değişikliklerin yapılmasına yol açmıştır. Çok daha az toksik, yeterli immünoşüpresyonu ve graftı içeren uygulamalarla GVT etkisini sağlayan başarılı transplantlar yapılmaya başlanılmıştır (5,6). Bu farklı hazırlama anlayışı “non-myeloablative” (NMA); diğer bir ifade ile myeloablasyon yapmayan hazırlama rejimi şeklinde isimlendirilmiştir. Uygulamayı yapan veya ilgilenen insanlar tarafından içeriği ve yoğunluğunu da yansıtabilecek şekilde; “submyeloablative”, “azalmış doz yoğunluklu”, “lenfoablative”, “mini transplant”, “transplant-lite” şeklinde de isimlendirilebilmektedir. Allojeneik transplantasyondan beklenen etkiyi, alıcıyı yıpratmadan sağlayabilmesi, allo KİT uygulamasının yaş ve organ toksisite sınırlamalarını genişleterek, sunulabildiği hasta sayısını da artırmıştır.

### **Farklı Özellikler**

Bu tür rejimlerle, eski rejimlerdekine göre minimal lökopeni ve azalmış enfeksiyon riski, trombosit ve eritrosit desteği gereksiniminde azalma, mukozit ve diğer toksik semptomlarda azalma, immün toleransın daha kolay oluşturulması ve doku yıkımının daha az olması ile GVHH'da azalma, ayrıca yüksek doza bağlı geç etkilerde azalma beklentileri ortaya çıkmıştır. Eski standart rejimlerdeki myeloblative potansiyel belirli bir etki düzeyini yansıtsa da, NMA isimlendirilmesi, myeloblative özelliği çok değişik olan pek çok uygulamayı kapsamaktadır. Sadece etkili bir immünoşüpresyondan, submyeloblative denilebilecek, hematopoietik hücre desteği olmaksızın ancak toparlanabilecek derecede bir kemik iliği şüpresyonuna yol açan rejimlere kadar değişen farklı uygulamalar mevcuttur (14). Tam olmayan myeloablasyon, yeterli bir immünoşüpresyonun varlığında, miks kimerizminin oluşumunu kolaylaştırır. Miks kimerik yapı, zaman içinde vericiye ait unsurların artışı ile tam kimerik hale gelebileceği gibi, ortadan kaybolması ile tamamen alıcı orijinine dönebilir. Bazan miks kimerik yapı sürekliliğini korur. Bu durum belirli düzeyde bir graft versus host

toleransının sürmesini sağlar. Bu özellik, malign olmayan, diğer bir deyişle GVT etkisinin aranmadığı pek çok hastalıkta transplanta bağlı immünolojik yan etkilerin azalmasını sağlayan önemli bir kazanımdır. Sürekli miks kimerik yapı GVT etkisinin arandığı hastalıklarda ise, host orjinli maligniteye de tolerans oluşturarak bir dezavantaj yaratabilir. Bu durumda posttransplant GVHH profilaksisinin kesilmesi, gerekirse donör lenfosit infüzyonları (DLI) verilmesi, tam verici kimerizmini sağlamayı kolaylaştırırken, GVT etkisini de artırabilir. Storb ve ark.ları ilk kez 1982'de uyarılmamış periferik "buffy coat" kullanmanın aplastik anemide yararlı olabileceğini gösterdiler. Bu uygulama ile GvHH artıyor (artmış lenfosit yükü), ancak rejeksiyon ve relaps azalıyordu (46).

Son yıllarda, donör lenfosit infüzyonu (DLI), malign hastalıklarda post-transplantasyon immunoterapisinde kullanılmaktadır. Transplant sonrası farklı zamanlarda DLI verilerek graft-versus-tümör etkisi sağlanıp relaps engellenebilir. Bu uygulamada GvHD riski %50, aplazi riski %20'dir. En çok KML'de etkilidir (40).

NMA hazırlama yapılan transplantlar önceleri standart allojeneik transplant uygulamalarının yaş ve performans durumu gibi sınırlarının dışında kalan, toksisiteden kaçınılan hastalarda gerçekleştirilmiştir. Zaman içinde, standart uygulamalara iyi bir alternatif olabileceği, hatta allojeneik transplant uygulamalarının endikasyon sınırlarını da genişletebileceği anlaşılmıştır. Kalıcı miks kimerizminin verici hücrelerinin immün toleransla birlikte konakçıda ikamesini sağlamasının aranılan bir özellik olduğu malign olmayan hastalıklar buna örnektir. Konakçının antijenik özelliklerini verici T hücrelerine sunan hücrelerin NMA hazırlama ile elimine edilmemesi, GVT etkisini artıracak bir durumdur. Miks kimerizmin sağladığı immün toleransın ve doku yıkımının azlığının, GVHH sıklığında azalma sağlayabileceği, GVT etkisinin gerektiğinde DLI ile kuvvetlendirilebileceği öngörüsü, allojeneik HSCT'nun daha rahat bir şekilde, daha geniş endikasyon diliminde ki maligniteli hastalara sunulabilmesini sağlayacak uygulama ve projelerin temelini oluşturmuştur (46).

Yapılan uygulamaların değerlendirilmesi sonucu , malignitenin antijen sunan hücreleri de kapsadığı durumlarda (lenfoid malignitelerde B hücreleri, kronik myeloid lösemide dendritik hücreler gibi) GVT etkisinin daha çok görüldüğünü ortaya çıkarmıştır.

Malignitenin immünolojik özelliklerinin yanı sıra hızla ilerleyen ve/veya transplant sırasında tümör yükünün fazla olduğu malignitelerde de sonuçlar genellikle başarılı değildir (40). Böyle durumlarda, GVT etkisinin ortaya çıkması için gereken iki üç aylık süre zarfında maligniteyi sınırlı tutabilecek, tümör kitlesinin en aza indirilmesini hedefleyen, yüksek dozlu,hatta otolog destekli ön uygulamalar, toksisite ile ilgili toparlanma sağlandıktan sonra NMA hazırlamalı allojeneik transplant yapılmak süretiyle yararlı olabilir .

### **Çözülmesi Gereken Konular**

Sağlam bilimsel dayanakları olan bu yeni allojeneik transplantasyon uygulama şeklinin, beklendiği üzere geleneksel myeloablative hazırlama ile gerçekleştirilen transplantasyonların yerini alabilmesi için her bir endikasyonda karşılaştırılmalı olarak kontrolü gerekmektedir. Bunları yaparken çözülmesi gereken konuların en başında, submyeloablative seviyede ajan ve doz optimizasyonu gelmektedir. Standart myeloablative rejimlerdeki sınırlı ajanlarla yapılan uygulamalar, yerini hastalığın ve graftın özelliklerine göre belirlenebilecek hazırlama rejimi zenginliğine bırakabilir. Yine de sınıflandırarak da olsa bir standardizasyon gerekmektedir. İkinci önemli konu, kalıcı miksa kimerizm ve GVH-GVHH dengelerini hastalık ve graftın özellikleri bazında ele alarak optimize edilmesi gereken GVHH profilaksisidir. Genellikle geçmişteki NMA uygulamalarında kısa süreli ve tek ajanlı profilaksiler yapıldığı görülmektedir. Sonuçların farklılığı, bu yaklaşımın doğruluğunun sorgulanmasını gerektirmektedir. Hücre serilerinin kimerizmini ayrı ayrı, yakından takip ederek GVT-GVHH dengesini öngörmek ve buna göre DLI uygulamasını ayarlamak daha hassas bir şekilde mümkün olabilecektir .

## Beklentiler

Kemo ve / veya radyoterapideki doz değişikliği ile birlikte komplikasyonlarda da azalmanın ortaya çıkması ile, en başta maliyet etkinlik dengesinde daha olumlu bir tablo oluşacağı en büyük beklentidir. Yaşam kalitesinde iyileşme beklentisi de yüksektir. Yayınlanmış olan NMA allojeneik nakil serilerinde hastanede kalış süreleri, antibiyotik ve kan ürünü kullanımı anlamlı olarak standart rejime göre düşük bulunmuştur. Bu durum maliyet etkinlik analizleri açısından NMA lehine değerlendirilebilir. Transplantla ilişkili ölüm oranı ve transplantın etkinliğinde olumlu yönde olacağı öngörülen etkileri, incelenmesi gereken diğer özellikleridir. Etki ve yan etkiler de uzun dönemde gözlenebilecektir. NMA uygulaması, akraba dışı veya doku grubu uyumu tam olmayan transplantların kullanım sıklığı ve sahasının genişlemesini sağlayabilir. Kısaca NMA hazırlama bakış açısı, graft elde etme ve işleme tekniklerinde ki gelişmelerin yanı sıra, kontrol altına alınması gereken bir devrim niteliğindedir (40).

### 2.4.5 KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU SONRASI YENİDEN İMMUN YAPILANMA

Kemik iliği transplantasyonu teknik açıdan kemik iliği hücre suspansiyonun intravenöz yoldan spesifik olarak hazırlanmış alıcıya verilmesine dayanır.. Yamanmanın sağlanması için öncelikle hastanın lenfoid ve hematopoetik kök hücrelerinin yok edilmesi, yer sağlanması gereklidir. Bu nedenledir ki KİT hazırlık döneminde yoğun kemoterapötik ajanların kullanımı zorunludur. Siklofosfamid ve antitimositglobulin (ATG) gibi ajanlar immunsupressif olarak, TBI ve Busulfan gibi ajanlar da hematopoetik kök hücrelerin ortadan kaldırılması için uygulanmaktadır. Ancak KİT hazırlık dönemi sonrası alıcıda yeni donör immunoematopoetik sistem gelişine kadar ağır bir immunsupresyon oluşmaktadır. Hazırlık rejimi ile birlikte hematopoetik ve immunolojik fonksiyon tam gelişene kadar olan süre içinde KİT alıcısı potansiyel olarak hayatı tehdit eden bakteri, mantar, viral ve protozoal enfeksiyonların riski altındadır.

İyileşmenin hızı ve klinik komplikasyonların oluşu en başta transplantasyon için kullanılan hemotopoetik stem hücrelerinin kaynağına bağlıdır.

Transplant öncesi ve sonrası zaman sürecini 6 dönem olarak incelemek mümkündür (121).

Kemik iliği transplantasyon dönemleri:

1. Hazırlık dönemi (pretransplant) 2 gün-2 hafta
2. Kemik iliği infüzyon dönemi, 0. gün
3. Granulopoez öncesi dönem (preengraftman)1-4 hafta
4. Komplet engraftman dönemi, 3-6 hafta
5. Erken rekonstitusyon dönemi,30-90 gün
6. İntermedial rekonstitusyon dönemi, 90-360 gün
7. Geç rekonstitusyon dönemi

Hastaya hazırlık döneminde yoğun kemoterapi ajanları çeşitli kombinasyonlarda verilir. İkinci dönem Kİ'nin infüzyon günüdür ve 0.güne denk gelmektedir. Üçüncü dönem Kİ infüzyonu sonrası granulosit sayısının  $500 \text{ mm}^3$ ' ün üzerine çıkma süresini kapsar. Ortalama 1-4 haftadır. Yamanma veya aplazik dönem olarak da isimlendi.Dördüncü komplet engraftman dönemi 3-6 haftada tamamlanır. Granülosit sayısı  $1000 \text{ mm}^3$ 'ün üzerine çıkar. Beşinci dönem erken yeniden yapılanma dönemi 30-90 gün arasındır ve hasta genellikle artık dışarıdan takiplidir. Altıncı dönem ara yeniden yapılanma dönemidir.

### **Fagositler ve Katil Hücreler**

Granülositler KİT sonrası 3 ila 4 haftada artar ve mutlak nötrofil sayısı bir çok bakteriyel infeksiyondan koruyucu düzeye gelir. Erken posttransplant döneminde granülosit fonksiyonlarında değişik oranlarda bozukluk görülür. Bazı araştırmacılar kemotaksi bozukluğu tesbit ederken, diğerleri nötrofil kemotaksi ve migrasyonu normal bulmuşlardır (22).

Kronik GVHH'li hastalarda da monositler T lenfositleri IL-2 salgılama bozukluğu gösterebilirler de IL-1'i normal olarak salgırlar. Yapılan çalışmalarda doğal katil (natural killer (NK) hücreleri allojeneik KİT'de çelişkili bulgular vermiştir. NK hücreleri çok

sayıdaki immun yanıtta etkilidirler. Konak orjinli NK hücreleri, allojenik kemik iliğine direnç gösterebilir. Bir çalışmada NK hücreleri erken transplant sonrası yüksek aktivite göstermiş ve akut GVHH gelişmiştir (35). Başka bir çalışmada ise sitotoksik aktivite ile infeksiyon GVHH ve lösemi reküransı gibi komplikasyonlar arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Sağlıklı uzun survili hastaların %20'sinde NK hücre defektinin ısrar ettiği görülmüş, bu birbirinden farklı sonuçlar NK hücre popülasyonunun heterojenitesine bağlanmıştır (121).

NK hücrelerinin sitotoksitesi, efektör hücrelerinin birkaç alt grublarına bağlıdır. Periferik lenfositlerden klonlanmış hücreler anti-lösemik etki gösterebilirler.

Fibroblastlara karşı normal NK hücre yanıtı gösteren NK hücreleri, herpes simplex (HSV) virusu tip 1 ile infekte edildiklerinde, belirgin olarak akut GVHH geliştirme eğilimi gösterirler. Diğer taraftan düşük NK aktivitesi gösteren hastalarda GVHH geliştirme eğilimi yoktur. Genel olarak anlaşılmıştır ki immun sistemin ilkel fagositik ve sitotoksik fonksiyonu daha önce düzeldiği halde, hücreler arası etkileşim ve ince regülasyon gerektiren fonksiyonlar daha geç düzelmektedir (49).

### **T hücreye bağlı immünite**

T hücreye bağlı fonksiyonların düzelmesi konusu çeşitli teknikler ile araştırılmıştır. Bunlar T lenfosit yüzey işaretleyicilerinin tesbit edilmesi, gecikmiş tip aşırı duyarlılığın ölçümü ile in vitro mitojenlere karşı lenfoblastik cevabın araştırılması, immunglobulin sentezi için yardımcı hücre aktivitesi, T hücreye bağlı sitotoksikite ve T hücre koloni formasyonudur. Donör orjinli T ve B lenfosit repopülasyonu periferik kanda posttransplant ilk 3 ayda olur (121).

Lenfosit yüzey işaretleyicilerinin ekspresyonu, akut ve kronik GVHH, CMV infeksiyonu, donör grafitının T hücre deplasyonu ve GVHH önlenmesi için kullanılan immunsupresyon tipi gibi bir çok klinik durum ile etkilenir.. Bir çok çalışma erken post transplant döneminde yardımcı T hücrelerinin (CD4) azaldığı görülmüştür. Hem mutlak sayısal olarak, hem de göreceli oran olarak azalma tesbit edilmiştir. Ayrıca baskılayıcı ,

sitotoksik T hücrelerin (CD8) erken ve geç iyileşme döneminde sayısal ve oransal olarak normalden fazla olduğu gösterilmiştir (107).

Bununla beraber bir çalışmada çok erken aplastik ve yamanma döneminde lenfosit yüzey işaretleyicileri araştırıldığında allojenik transplantasyonu takiben 4.günde ilk tesbit edilen hücre popülasyonunun CD4 + hücreler olduğu ve bunu 4 - 7 gün sonra CD8 + hücre artışının takip ettiği görülmüştür. Bir çok hastada erken post transplant döneminde pozitif yardımcı /baskılayıcı (CD4/CD8) oranı vardır ve bu 3.haftada tersine döner. Bu durum hem otolog hem de allojenik transplantasyonda söz konusudur. Allojenik KİT hastalarında CD4/CD8 oranı düzelmesi akut GVHH ile de korelasyon gösterir.

Daha sonra post transplant döneminde ki yüksek CD8 + ve düşük CD4 + hücre durumu nakil sonrası 1 yıldan fazla sürebilir. Düşük CD4/CD8 oranının sağlıklı KİT alıcılarda 1 yıl sonra değiştiği, kronik GVHH'de ise oranın senelerce ters kalabildiği, ayrıca CD4/CD8 oranı ile CMV infeksiyon oranında da korelasyon olduğu görülmüştür (121).

Hücrel immunitenin yeniden yapılanması in vitro olarak gecikmiş tipte aşırı duyarlılık deri testleri ile ölçüldüğünde hücrel bağışıklık anormal şekilde düşük yanıt verir. Bu durum özellikle akut ve kronik GVHH'da gözlenir.

T lenfosit boşaltılmasının kemik iliğinde immun yeniden yapılanma üzerine etkisi tartışmalıdır. Ayrıca GVHH önlenmesi için verilen ilaçların da immunsupressif etkileri vardır. T lenfosit fonksiyonları transplant sonrası ilk 180 günde T hücre boşaltılmış KİT yapılan kemik iliği alıcılarda daha belirgin bozuktur. Altı aylık bir süreden sonra işlem yapılmamış KİT ve T hücre boşaltılması yapılmış hastalardaki kan T hücre sayıları eşit olarak bulunmuştur (7).

### **B hücreye bağlı immunité**

B hücrelerinin periferik kanda normal sayıda tekrar yer alması allojenik veya ikiz KİT'den sonrası 2 ilâ 3 ay sonra olur. Erken post transplant döneminde immatür B hücreleri dolaşımında CD5 + T hücre antijeni ekspres ederler (121).

Serum IgG ve IgM immunglobulinlerin normal düzeylerde gelişi 3 ayda olur. Ancak serum IgA senelerce düşük kaşır. IgE seviyesi akut GVHH ile birlikte virüslere veya bakteriyel patojenlerle olan infeksiyonlarda da artar.

Hastadan kaynaklanan antikorlar ABO kan grubu farklı KİT alıcılarında isohemaglutinin titrelerinin ölçümüyle gösterilebilir. %80 olguda 80. günde ölçülebilir isohemaglutinin titresi görülemezken, 120. gün titre ölçülemez. Bununla beraber bazı mikskimerizm gösteren hastalarda artmış izohemogglutinin titresi uzun süre devam edebilir.

İmmunolojik yeniden yapılanmayı etkileyen diğer faktörler verici-alıcı akrabalığı (otolog, sinjenik, allojenik doku uygunluğu olan veya HLA uygun akraba olmayan donör) araya giren infeksiyonlar, alıcı yaşı ve diğerleridir (121).

### **İmmunolojik yeniden yapılanma üzerine GVHH'nın etkisi**

Toplam lenfosit sayısı veya CD3+ T lenfosit sayısı ölçüldüğünde görülmektedir ki, doku uygunluğu olan KİT sonrası akut GVHH'nın lenfoid yeniden yapılanma üzerine etkisi azdır. Lenfosit miktarında ve CD3+ T lenfosit sayısında geçici bir azalma anti T lenfosit immunsupresyonu, özellikle antitimosit globulin (ATG) ve anti T lenfosit monoklonal antikorları uygulandığında meydana gelir. Spesifik immunsupresyon olmadığında T ve B lenfositlerinin düzelme hızı akut GVHH'dan etkilenmez (12).

IgE seviyelerinde geçici yükselme ve spesifik IgE antikor yapımı KİT sonrası erken dönemde gösterilmiştir ve bu akut GVHH varlığı ile ilişki gösterir (115).

GVHH'na bağlı anormallikler en çok kronik GVHH'da göze çarpar. Kronik GVHH'ı olan hastalarda antijeni spesifik T lenfosit yanıtı azalmış ve özellikle polisakkarid antijenlere karşı spesifik antikor yapımı azalmıştır. Bu hastalarda otoantikor (anti-DNA, eritrosit, tiroid) insidansı artmıştır (121).

GVHH'lı hastaların immun yetmezlikleri in vitro olarak hücresele düzeyde analiz edildiğinde bir dizi hücresele bozukluk görülür. CD4+ yardımcı T Lenfositlerinin

sayısının ve fonksiyonunun azaldığı, aktive CD4+ ve CD8+ supresör T lenfositlerinin varlığı saptanır. KİT sonrası erken dönemde tüm hastalarda yardımcı T lenfosit öncülleri azalmaktadır ve kronik GVHH'lı hastalarda sitotoksik ve yardımcı T lenfosit öncülleri sürekli düşük olmaktadır (115) .

#### 2.4.6 KİT'DE İZLEM

Hangi yöntem uygulanırsa uygulansın hastada hemopoetik düzelme yaklaşık 15 - 30 gün sürecektir. Bu dönemde hastada önemli sorunlar yaşanabilir. Özellikle infeksiyonlar önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir, hasta bu dönem boyunca özel steril ortamlarda tutulur, steril gıdalarla veya damardan beslenir. Bu aşamada ve daha sonrasında komplikasyonları önlemek için destek tedaviler ve gereğinde soruna yönelik tedaviler yapılmalıdır (7) .

#### KİT'de destek tedaviler

1. Kan ve kan ürünleri
2. İnfeksiyon profilaksisi / tedavisi
3. Beslenme desteği
4. GvHH profilaksisi / tedavisi
5. Psikososyal destek

#### **Kan ve kan ürünleri desteği**

Sıklıkla kullanılan ürünler eritrosit süspansiyonu, trombosit süspansiyonu, nadiren granulosit süspansiyonu, taze donmuş plazma (TDP), human albumin, IVIG ve büyüme faktörleridir. GvHH'na karşı kan ürünleri 2500 - 3000 cGy ışınlanır, CMV profilaksisi için lokosit filtreleri kullanılır. İnfeksiyonlara karşı profilaktik IVIG ve CMV hiperimmunglobulini önerilebilir.

## **İnfeksiyon önlenmesi / tedavisi**

KİT'nun en önemli sorunudur. Gerek altta yatan hastalığın tedavisi, gerekse KİT işlemi hastanın oldukça uzun sürebilecek (~6 ay - 2 yıl) bir kombine immun yetmezlik tablosuna girmesine neden olur. Ayrıca deri - mukoza bariyerlerinin bozulması da sorunu arttırır. Proflakside steril ortam, steril gıdalar, günlük deri temizliği, ağız bakımı, barsak dekontaminasyonu, büyüme faktörleri, IVIG, P.Carinii - Candida - HSV - CMV v.b proflaksisi kullanılır. İnfeksiyonlar gelişirse uygun antibiotikler, antiviral ve antifungaller kullanılmalıdır (7,12,70)

## **Beslenme**

Özellikle çocuklarda önemli bir sorundur. Bulantı / kusma, oral mukozit, diare, iştah azalması, tükürük salınımında azalma, ateş / sepsise bağlı kalori ihtiyacının artması, akut ve kronik GvHD'e bağlı malabzorpsiyon beslenmeyi bozar. Oral alım kısıtlanır veya tamamen kesilir. Total Parenteral Beslenme (TPN) gerekebilir.

## **GvHD proflaksisi / tedavisi**

AlloKİT'lerde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. %10 - 50 oranında görülür. Verici T - hücreleri, monositler, lenfokin yapımı (Il-1, TNF) etyopatogenezinde etkindir. Proflaksisinde ve tedavisinde kan ürünlerinin ışınlanması, Metotreksat, Kortikosteroidler, Siklosporin - A (CyA), Siklofosfamid ,Antitimosit globulin (ATG), T - Hücre ayıklanması (in vivo, ex vivo) kullanılabilir (115).

## **Psikososyal destek**

Hem hasta hem de ailesi için gereklidir. Özellikle hastanın izolasyon, sosyal kısıtlanma, endişelenme, depresyon, aşırı önemsenme (VIP sendromu), eğitim ve meslek sorunları; ailenin uyum, terkedilme, stres altında normal dışı yaklaşımlara yönelme, sosyal - kültürel - maddî çöküşler halledilmesi gerekli sorunlardır (26).

## 2.4.7 ERKEN / GEÇ YAN ETKİLER

KİT yan etkileri KİT'den 15 gün önce başlar, yıllar sonrasına uzanabilir. Farklı graft kaynakları, hazırlama rejimleri, GvHD oluşumu / proflaksisi, infeksiyonlar / proflaksisi, bu süreci ve sorunları etkiler. KİT'de erken / geç yan etkiler Tablo 6 da özetlenmiştir (97,110).

**Tablo 6 .KİT'de erken / geç yan etkiler**

### **A. Erken**

1. İnfeksiyonlar
2. GvHD (akut)
3. Graft rejeksiyonu
4. Venooklusif Hastalık (VOD)
5. Psikososyal sorunlar
6. Beslenme sorunları (TPN)
7. Gastrointestinal sorunlar
8. Bulantı / Kusma
9. Mukozit
10. Diare / Tiflit
11. Kardiovasküler sorunlar
12. Renal / üriner sistem sorunları
13. Hemorajik Sistit
14. MSS / Nörolojik sorunlar
15. Diğer

### **B. Geç**

1. GvHD (kronik)
2. Büyüme - Gelişme bozuklukları
3. Multipl Endokrin sorunlar

4. Hipotiroidi
5. Gecikmiş Puberte
6. Gonad yetersizlikleri
7. İkincil Maligniteler
8. Sterilite
9. Katarakt
10. Renal yetersizlik
11. Obstruktif / Restriktif Akciğer hastalığı
12. Kardiyomiyopati
13. Hepatik sorunlar
14. Geç İnfeksiyonlar
15. Aseptik Kemik Nekrozu
16. Kas sorunları
17. Lökoensefalopati ( $\pm$  it Mtx)
18. Psikososyal / Eğitim sorunları
19. Aşılama Problemleri

KİT sonrası gözlenen komplikasyonlardan kimerizme etkili olanlar aşağıda ele alınmıştır.

### **İnfeksiyonlar**

Ağır, mortalitesi yüksek infeksiyonlar KİT’de en önemli başarısızlık nedenlerinden biridir. İmmun sistemi yetersiz (hücresele / hümorele), deri - mukoza bariyeri bozulmuş hasta infeksiyonlara açıktır. İlk 30 günde en sık koagülaz (-) Staf. Epidermidis (kateterler nedeniyle) ve Gram (-) bakteri infeksiyonları görülür. 2 - 3. aylarda CMV, P.Carinii ve mantarlarla interstisyel pnomoniler, 120 günden sonra kapsüllü bakterilerle sinopulmoner infeksiyonlar, HZV deri infeksiyonları görülür (12). Odak, etken ve zamanlamaya göre, komplikasyonlar (GvHH) da gözönüne alınarak kombine, geniş spektrumlu antibiotikler, antifungal ve antiviraller kullanılır (70,110).

## GvHH

Vericinin sitotoksik T-lenfositlerinin alıcının hedef organ / dokularına immunolojik saldırısıdır. Transfer olan lenfositlerin yabancı dokulara cevap verebilmesi için 4 - 7 gün proliferasyonu gerekir, bundan dolayı GvHH ancak KİT'in 7 - 10. gününden sonra gelişebilir, sıklıkla 3. haftadan sonra başlar. İlk 100 günde görülürse "akut" GvHH, >100 günde görüldüğünde "kronik" GvHH adını alır. Hedef organlar deri, karaciğer safra yolları ve gastro intestinal sistem mukozasıdır. Deride makulopapüler döküntüden bülle ve deskuamasyona kadar değişen lezyonlar, karaciğerde obstrüktif sarılık bulguları, direkt hiperbilirubinemi, gastrointestinal sistemde ağır diare ve abdominal kramplar karakteristiktir (12). Akut GvHH'de klinik sınıflama Tablo 7 'de özetlenmiştir. Tedavide sitotoksik ilâçlar (CTX, MTX v.b), steroidler, biyolojik cevap değiştiriciler (ATG, monoklonal anti - T hücre antikoları), CyA kullanılır (35, 56, 71, 115). Kronik GvHH ise otoimmün bir hastalıktır, hedef doku mezenkimal hücrelerdir. Ciltte kuruma, pullanma, eklemlerde ankiloz, gözyaşı ve mukozalarda kuruma, immun yetmezlik ve infeksiyonlar görülür. Lokalize deri tutulumu ± karaciğer fonksiyon bozukluğu olduğunda "sınırlı", yaygın deri tutulumu veya lokalize deri tutulumu veya karaciğer bozukluğu ± kronik agresif hepatit veya göz tutulumu veya mukoza, salgı bezlerinde tutulum veya mukoza tutulumu veya diğer hedef organ tutulumu olduğunda "yaygın" kronik GvHH'den bahsedebiliriz. Tedavisinde akut GvHH tedavisine ilâveten thalidomide ve T - hücreleri ayıklanmış OKİT kullanılmaktadır (115).

**Tablo 7 .Akut GvHH'de Klinik Sınıflama**

<u>Zarar</u>	<u>Organ</u>	<u>Zararı</u>
<u>Düzeyi</u>	<u>Deri</u>	<u>Karaciğer(Bil.)</u>
1	Makulopapüller dök.(<%25 vücut alanı)	2 - 3 mg / dl
2	Makulopapüller dök.( %25 - 50 )	>3 - 6 mg / dl
3	Yaygın eritrodermi	>6 - 15 mg / dl
4	Yaygın eritrodermi + büller, deskuamasyon	>15 mg / dl
<u>Sınıf</u>	<u>Deri</u>	<u>Karaciğer</u>
I	1 VEYA 2	0
II	1 - 3	1
III	2 VEYA 3	2 VEYA 3
IV	2 - 4	2 - 4
		<u>İntestinal Sistem</u>
		50 - 1000 ml sıvı dışkı / gün
		>1000 - >1500 ml sıvı dışkı / gün
		≥1500 ml sıvı dışkı / gün
		Ağır abdominal ağrı ± ileus
		<u>İntestinal Sistem</u>
		0
		1
		2 VEYA 3
		2 - 4

### **Graft Rejeksiyonu**

KİT'de uzun yıllardır bilinen bir komplikasyondur. Son yıllarda, alıcının immunitesini baskılayan, yüksek doz Kemoterapi / Radyoterapi içeren hazırlık rejimlerinin kullanımı ile büyük ölçüde azalmıştır. T - hücre ayıklanması kullanıldığında sıktır. Şüphe edildiğinde büyüme faktörleri kullanılmalı, viral etkenler (CMV) araştırılmalıdır. İkinci KİT denenebilir.

## 2.4.8 ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LÖSEMİLERİNDE KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU

Çocukluk çağı akut lösemilerin kemoterapi protokollerinde ve sonuçlarında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Yoğun induksiyon, konsolidasyon ve idame tedaviler ile çocuklarda survi artmıştır (14,16). Ancak lösemilerin bazı alt grupları ile kötü prognostik faktörü olanlarda; nüks gösterenlerde sonuçlar kötüdür; bu nedenle alternatif bir tedavi şekli olan KİT gündeme gelmiştir.

KİT ile antilösemik etki nasıl sağlanır?

- Hazırlık rejiminde kullanılan kemoterapinin miyeloablatif dozları ve radyasyon reziduel lösemik hücrelerde redüksiyon sağlar.
- İmmun mekanizmalar yoluyla oluşan Graft Versus Leukemia (GvL) etkisiyle Allojenik KİT olgularında rezidüel löseminin supresyonu sağlanır. GVHH gelişen hastalarda nüks oranı düşük olduğu ve donörü monozigot ikiz olan KİT olgularında nüks oranının artmış olduğu IBMT kayıtlarında gösterilmiştir (37,85).

### 2.4.8.1 AML'de KİT

Akut Myeloblastik Lösemi tedavisinde yüksek doz sitozin arabinozid (Ara-C), antrasiklinler, etoposid ve thioguanin gibi ajanların kombinasyonundan oluşan induksiyon sonrası %75-90 hastada 1. tam remisyon (1.TR) elde edilir. Ancak nüks tedavi başarısızlığının başlıca nedenidir ve çeşitli merkezlere göre değişiklikler göstermekle beraber %30 - 47'dir. Hastaliksız survi (DFS) ise %35-50 arasında değişmektedir. Nüks yapmış AML'li hastalarda 2. Remisyon sağlanma olasılığı ve uzun süreli DFS'nin düşük olması nedeniyle allojenik veya otolog KİT'i gündeme getirmiştir (34,35, 50, 55). HLA uygun kardeşten yapılacak KİT, lösemi nüksünün önlenmesi ve uzun süreli hastaliksız yaşam sağlanması için başarılı bir tedavi yaklaşımıdır. Allojenik veya otolog KİT ile 1.TR'daki çocuklarda DFS (5 senelik) %60-70'lere çıkmaktadır. (67, 74, 88, 100).

## Hangi AML'li Pediatrik hastalar KİT adaydır?

MRC – UK (İngiltere) grubu AML'li tüm hastaları 1.TR'da KİT programına alırken, Fransız ve Alman grupları AML'de bazı yüksek risk faktörlerine göre KİT adaylarını belirlemektedirler (Tablo 8). Alman grubunun KİT indikasyonu için kullandığı kötü risk faktörleri (Risk grubu II) özetlenmiştir (52).

**Tablo 8: Pediatrik BFM AML 1993**

	Risk grup I (İyi Risk Grubu) >%80 EFS	Risk grup II (Kötü Risk Grubu) <40-50 EFS
FAB M1	Auer pozitif	Auer negatif
M2	Lok.<20x10 <sup>9</sup> /L	Lok.>20x10 <sup>9</sup> /L
M3	Hepsi	
M4	Kİ Eoz>%3	Kİ Eoz<%3
M5	-	Hepsi
M6	Hepsi	-
M7	-	Hepsi
MSS lösemisi	-	Hepsi
TR süresi	<10 hafta	>10 hafta
KİT 1.TR'da	Hayır	Evet

KİT'in kemoterapiye karşı üstünlüğü (Tablo 9) birçok prospektif ve kontrollü çalışmada gösterilmiştir (69,78, 90).

**Tablo 9 :Pediatrik AML’li olgularda Allo KİT, OKİT, Kemoterapi sonuçlarının (%EFS) karşılaştırması.**

<u>Grup</u>	<u>Kemoterapi</u>	<u>AKİT</u>	<u>OKİT</u>
BFM (AML92-94)	%39 (5 yıl)	%69 (3 yıl)	%42 (3 yıl)
LAME (89-91)	%48 (5 yıl)	%72 (5 yıl)	-
POG (1994)	%34 (3 yıl)	%40 (3 yıl)	-
MRCUK (1995)	%48 (5 yıl)	%61 (5 yıl)	%52 (5 yıl)
İspanya (93-94)	-	%78 (3 yıl)	%75 (3 yıl)

AML’li hastalarda OKİT genelde AKİT’e göre daha başarısız görülmektedir; OKİT’de GvHH’na bağlı morbidite ve mortalite olmasa da GvL etkisi olmayışı nedeniyle nüks allojenik KİT’e göre daha fazladır. Nüks nedeni olarak içinde blast hücresi olabilen kemik iliğinin infüzyonu da suçlanmaktadır. Özet olarak, teorik ve deneysel çalışmalara göre in vivo yetersiz hücre öldürülmesi relapsın ana nedenidir. Ayrıca, kemik iliğinden blastların ayıklanması yöntemi (Purging) geliştirilmiştir. En sık kullanılan in vitro ayıklama teknikleri arasında sitotoksik ajanlarla ayıklama (Mafosfamid veya metaboliti 4 - hydroperoxycyclophosphamid (4 - HC)) sayılabilir. Monoklonal antikolar da purging’de kullanılabilir. Bu şekilde, TBI’lı hazırlık rejimleri de kullanılarak DFS artırılabilir; bu sonuçlar purging uygulanmayan grupla karşılaştırıldığında nüks oranı daha azdır. Bu nedenle AML 1.TR’da otolog KİT tartışılabilir. Ancak bazı gruplar iki yöntem arasında fark bulamamışlardır (88,119,120).

Birinci remisyonadaki AML’li olguların %25 kadarı konvansiyonel kemoterapi sonrası nüks ederler. Birinci remisyonadaki hastalar teorik olarak KİT’e en ideal adaylardır, çünkü lösemik yükleri minimaldir, reziduel lösemik popülasyonları tedaviye daha az resistandır ve hastalar genel olarak iyi klinik konumdadırlar. Birinci remisyonadaki hastalar ister çocuk ister erişkin olsun daha yüksek survi gösterirler. 2.TR’daki AML’li hastalarda gerek kardeşten (%25 - 28) gerekse uygun aile dışı vericiden (%30) yapılan alloKİT sonuçlarının 1.TR’a (%46 - 50) göre düşük olduğunu bildirilmiştir(74) .

Lösemilerde KİT öncesi hazırlık rejimi uygulanmasının amacı 2 yönlüdür:

- 1) Lösemik klonu eradike etmek
- 2) Kalıcı ve fonksiyonel kemik iliği engraftının sağlanması için immün supresyon oluşturmak.

Hazırlık rejimleri arasında en sık kullanılanlar siklofosfamid (Cy) + Total vücut ışınlanması (TBI) ile Busulfan (Bu) + Cy'dir. Işınsız hazırlık rejimleri ile KİT'e bağlı toksisitenin azaltılması planlanmaktadır.

Son yıllarda hücre ayırıcısı aletlerle periferik kök hücrelerinin toplanarak otolog transplantasyon uygulaması gündemdedir. Periferik kandan kök hücre toplanması (PKHT), hematopoez düzelirken veya dış uyarı sonrası lökoferez ile yapılmaktadır. Büyüme faktörleri AML'de uyarıcı olarak pek önerilmez (lösemik kök hücrelerinin uyarılma riskinden dolayı), genelde Cy uyarıcı olarak kullanılır. Bu yöntem ile engraftın çabuk olur. PKH transplantasyonu hastalıksız sağkalım sonuçları %40 – 50 civarında olup otolog KİT'e benzerdir (23).

İdame tedavisi KİT sonrası etkin bulunmamıştır, AKİT ve OKİT sonrası ortaya çıkan LAK ve NK hücreleri kemoterapi sonrası gösterilememiştir. Bu hücreler, direkt tümör hücrelerini öldüren antilösemik bir etki sağlayabilir. Bu etkileri IL-2 verilerek artırılabilir. Siklosporin OKİT sonrası GvHH benzeri deri sendromu oluşturacak otoreaktif T-Lenfositleri baskılar ve Sınıf II doku uygunluk antijenlerine karşı reaktif hücre oluşumunu uyarır. Ancak bu uygulama klinik düzeyde etkili olmayabildiği gibi kontrolsüz kalıp mortalite daha da artabilir (88).

#### 2.4.8.2 ALL'de KİT

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) immatur lenfosit ve progenitör hücrelerinin hızlı proliferasyonu ve akkümülayonu ile karakterize hematolojik bir malignitedir. Çocuklarda özellikle düşük riskli gruptaki ALL'li olguların %50-75'i yalnız kemoterapi ile tedavi edilebilir .Çeşitli literatürden elde edilen sonuçlar tablo 10 'da özetlenmiştir (71, 72, 95, 99, 116,117).

**Tablo 10 .Çocukluk çağı ALL'sinde kemoterapi sonuçları**

<u>Gruplar</u>	<u>Uygulama Yılları</u>	<u>Hasta Sayısı</u>	<u>EFS (%)</u>
ALL-BFM 86	1986 – 90	998	72 + 2
NOPHO	1986 – 91	886	68 + 2
DFCI	1985 – 87	220	78 + 3
UKALL X	1985 – 90	1612	62 + 2 (Geç yoğunlaştırma ile 71)
St.Jude	1984 – 88	358	71 + 2
DCLSG	1984 – 88	291	72 + 3
CCG 106	1983-1989	1712	66 (5 yıl)
AIEOP	1982-1990	2010	61 (5 yıl)
FRALLE 83	1983-1987	559	57 (7 yıl)
POG	1986-1990	2404	66 (4 yıl)

Erişkin hastalar çocuklar gibi uzun süreli hastalıksız survi göstermezler. Bir çok merkez ve araştırmacı ALL'de tanı sırasındaki özelliklerine göre prognostik faktörleri tesbit ederek tedavinin yoğunluğu ve tipini, KİT gerekliliğini araştırmaktadır. Çünkü bazı prognostik faktörlerin tedavi sonuçlarını kötü yönde etkilediği görülmüştür. BFM grubu (Almanya), ALL'li hastaları standard risk, orta risk ve yüksek risk olmak üzere üç gruba ayırmaktadır ve yüksek riskli gruba uygun verici varsa AlloKİT uygulamaktadır (99) . Kötü prognostik faktör taşıyan ALL'li hastaların çeşitli merkezlerdeki tedavi sonuçları tablo 11 'de özetlenmektedir.

**Tablo 11. BFM - ALL 1995 protokolüne göre risk grupları**

<u>Standart Risk</u>	<u>Orta Risk</u>	<u>Yüksek Risk</u>
Yaş : 1- 6	Yaş : <1 - >6	Tüm yaşlar
Lok. < 20 x 10 <sup>9</sup> /L	Lok. > 20 x 10 <sup>9</sup> /L	Lok. > 100 x 10 <sup>9</sup> /L
8.gün Prednol cevabı iyi	8.gün Prednol cevabı iyi	8.gün Prednol'e cevapsız
P.Blast < 1 x 10 <sup>9</sup> /L	P.Blast < 1 x 10 <sup>9</sup> /L	P.Blast > 1 x 10 <sup>9</sup> /L
33. gün Kİ : Remisyonda	33.gün Kİ : Remisyonda	33.gün Kİ : Remisyon yok
Translokasyon (-)	Translokasyon (-)	Translokasyon (+)
t (9;22)	t (9;22)	t (9;22)
t (4;11)	t (4;11)	t (4;11)

Yüksek risk grubundaki ALL'li hastalar (Tablo 12) yüksek doz radyoterapi - kemoterapi ile hazırlık rejimi sonrası yapılan allojenik KİT'den yararlanırlar (37).

**Tablo 12 .Pediatrik Yüksek Risk ALL (1.TR)'de Allo KİT Sonuçları**

<u>Araştırmacılar</u>	<u>n</u>	<u>Kriter</u>	<u>EFS</u>
Barrett	56	Sitogenetik, MSS (+) Lok. >100 000 / mm <sup>3</sup> T-ALL, B-ALL	%56 (5 yıl)
Chessels	34	Sitogenetik Lok. >100 000/mm <sup>3</sup> geç cevaplı	%69 (5 yıl)
AGİ	67	BFM Kriterleri	%62.8 (5 yıl)
Shaw (Avustralya)	6	BFM Kriterleri	%83 (3 yıl)
NOPHO	22 / 427	BFM Kriterleri	%73 (10 yıl)

## **KİT uygulanması gereken en uygun zaman hangisidir?**

Yüksek risk grubu olan ve HLA uygun donörü olan ALL'li çocuklar 1. Tam Remisyonda transplante edilmelidir, çünkü günümüzde yoğun kemoterapi ile DFS ancak %50'lerdedir ve KİT bu grupta tedavi şansıdır. Ancak Nachman ve ark.ları, yüksek riskli (Lok.>50 x 10<sup>9</sup> / L, yaş >10) pediatrik ALL olgularında uyguladıkları CCG-1882 "augmented" BFM protokolü ile 4 senelik %70.8'lik hastalıksız survi elde etmişlerdir (74). Sonuçta uygun donörü olmayan yüksek riskli hastalar için "augmented" BFM protokolü, artmış aseptik nekroz riskine rağmen, alternatif bir tedavi şeklidir. Yüksek riskli olup 1. TR'da KİT yapılmamış hastalarda, nüks geliştiğinde, KİT yapılabilmesi için ikinci TR elde edilmesi ve Karnovsky skorunun yüksek olması gerekir. Ayrıca KİT yapılması planlanan relaps yapmış birçok hasta hastalığı (resistan veya progresyon) veya kemoterapiye bağlı komplikasyonlar nedeniyle kaybedilmektedir. Allojenik grupta transplantasyona bağlı mortalitenin yüksek olduğu bildirilmektedir (13, 82).

ALL'li hastalarda nüks zamanı prognozu etkileyen önemli bir faktördür, uzun süreli 1.TR gösteren ve kromozomal anomalisi olmayan olguların sonuçları, birinci sene içinde nüks gösteren ve kromozomal anomalileri olan olgulara göre daha iyidir.

Johns Hopkins Üniversitesi KİT'e bağlı toksisiteyi azaltmak amacıyla TBI yerine busulfan (BU) kullanmıştır. Bu (16 mg / kg) + CY (200 mg / kg) rejimi ile TBI + CY'dekinin benzeri sonuçlar elde ederek ALL'li olguların KİT'inde TBI'ın şart olmadığını göstermiştir. Etoposide (VP - 16) (60 mg / kg) + TBI protokolü de ALL'lerde KİT hazırlık protokolünde kullanılmaktadır (111).

Son yıllarda ALL'de yoğun indüksiyon rejimleri ve 2 yıllık idame tedavisi ile %60'ın üzerindeki çocukta kür sağlanabilmektedir. Ancak yüksek riskli ALL'lerde, kemoterapi ile DFS'nin %30-40 olmasından dolayı, bu hastalar KİT adaydır.

Allojenik ve otolog KİT uygulaması bazı gruplarca karşılaştırılmış, yüksek risk veya refrakter ALL'li 91 hastadan uygun donörü olmayan 45'ine purging'li otolog KİT

uygulanmıştır. Tüm hastalara aynı hazırlık rejimi verilmiştir (CTX (60 mg / kg / gün x 2) + fraksiyone TBI (1320 cGY)). Sonuçta, 4 senelik DFS otolog KİT’de %23, allojenik KİT’de de %31 bulunmuştur. Başarısızlık nedenleri, otolog KİT grubunda lösemik relaps, allojenik grupta ise KİT’e bağlı toksisite olarak bildirilmektedir. Ayrıca, GvHD gelişmeyen ve allojenik KİT uygulanmış hastalarda, relaps sıklığı, otolog KİT olgularındakine benzer bulunmuştur (77).

Minnesota çalışmasında, fatal toksisite sıklığı, allojenik KİT’de %17 bulunurken, otolog KİT’de bu oran %8 bulunmuştur; relaps oranı da AlloKİT’de %30, otolog KİT’de de %47 bulunmuştur. Sonuçta relaps yapmış ALL’de Allo KİT ile otolog KİT sonuçları benzer bulunmuştur (DFS %56 ve %50). Transplantasyona bağlı mortalite (TRM) özellikle Allojenik KİT’de yüksek olduğundan survi de düşmektedir. Son yıllarda, TRM’de düşüş kaydedilmiştir, buna neden olarak GvHH profilaksisine CSA ilavesi, TBI olmayan hazırlık rejimlerinin kullanımı ve 1.TR ile KİT uygulaması arasındaki sürenin kısalması gösterilmektedir (2,49,71).

#### 2.4.9 MYELODİSPLASTİK SENDROMLARDA KİT

Lösemili çocukların %95’den fazlasında ALL ya da AML vardır. Diğerlerinde daha kronik hastalıklar olan myeloproliferatif ya da myelodisplastik hastalık mevcuttur.

Kronik Myeloproliferatif Hastalık terimi kemik iliğinin anormal proliferasyonunu tanımlar. Bu hastalıkta genelde kan sayımı parametrelerinde de artış mevcuttur. İlk kez 1950’de Dameshek tarafından Kronik Granülositik Lösemi, Polisitemi Rubra Vera, Esansiyel Trombositemi ve Myelofibrozis gibi hastalıkları tanımlamak için kullanılmıştır.

Myelodisplastik Sendromlar (MDS) hücrel kemik iliği ve periferel pansitopeni ile karakterizedir. Ancak bu iki farklı antite benzeşmektedirler. Her ikisi de anormal klonal bir proliferasyon olup akut lösemiye progresyon riski taşırlar. MDS’lar ilk kez “Smouldering leukemia” (İçin için yanan lösemi) ya da Prelösemi olarak tanımlanmışlardır. Aslen yaşlı popülasyonu ilgilendiren bir hastalık grubudur.

İlk kez 1964 yılında Hardistry ve ark.çocukluk çağındaki kronik granüositik lösemiye iki tip olarak tanımlamıştır. Erişkin tipinin sürvisi daha uzundur .Çocukluk çağındaki MDS'ların karakteristik bir özelliği de diğer hastalıklarla sıklıkla birliktelik göstermesidir (50 ).

#### **Çocukluk çağında myelodisplazi ile birlikte olan hastalıklar:**

Konjenital hastalıklar

Down sendromu

Trizomi 8

Nörofibromatozis tip 1

Konjenital Kemik İliği Hastalıkları

Fanconi anemisi

Diamond-Blackfan anemisi

Konj.Nötropeni (Kostmann's send. dahil)

Schwachman-Diamond sendromu

Familyal MDS

Edinsel hastalıklar

İmmünoşüpresif tedavi ile birlikte Aplastik Anemi

Sitotoksik tedavi ve radyoterapi

Yapılan çalışmalarda MDS'lu olguların %25-50 kadarında fenotipik anormallikler gösterilmiştir .Bunlardan bazıları mental retardasyon ya da kısa boy gibi nonspesifik özelliklerdir. Ancak diğerleri başlıbaşına tanınmış genetik hastalıklardır.Down sendromlu çocuklarda lösemi gelişmesi riski 10-20 katı fazla olup bunlar genellikle pre-B ya da CALLA(+) ya da AML M7 tipindedir. AML M7 olan hastalar genellikle birkaç hafta-ay süren bir MDS fazı göstermektedirler. Bu fatal hastalık Down sendromlu bebeklerde görülen transient anormal miyelopoez (TAM) ile karıştırılmamalıdır. TAM normal bebeklerde de görülebilir ve spontan olarak düzelir (103).

Konstitüsyonel trizomi 8 genellikle mozaik formundadır ve fasiyal dismorfizm, iskelet anormallikleri ve hafif-orta mental retardasyonla birlikte. Trizomi 8 myeloid malinitelerde sık görülen bir sitogenetik bulgudur, ancak yapısal Trizomi 8 olan hastalar MDS dahil bazı hematolojik malinitelere dönüşüm gösterebilirler.

Otozomal dominant bir hastalık olan nörofibromatozisde ve Monozomi7 olan MDS hastalarında KMML birlikteliği mevcuttur.

Sekonder MDS ilk olarak Hodgkin hastalığı, multipl myeloma ve over CA nedeniyle kemoterapi yapılan hastalarda görülmüştür. Daha yeni olarak yüksek doz kemoradyoterapi ve otolog kemik iliği infüzyonu yapılan hastalarda da bildirilmiştir. Diğer taraftan Topoizomeraz II inhibitörleri ile tedavi edilen hastalarda görülen sekonder akut lösemi genellikle displastik bir ön aşama olmadan görülür.

### **Tedavi**

Normal sitogenetik özelliklere sahip genç çocuklarda viral enfeksiyonları ekarte etmek için uygun araştırmalar yapılmaktadır.Özellikle genç infantlarda KMML tanısında herhangi bir şüphne varsa bir süre hasta izlenebilir.Bu uygulamanın tedaviyi olumsuz etkileyebileceğine dair bir kanıt yoktur. AML'li hastalara verilen gibi bir yoğun kemoterapi ile İnfantil Monozomi 7 mevcut olan hastaların küçük bir bölümünde remisyon ve hatta uzun süreli survi oranları bildirilmekte ise de gerçek bir bilgiye ulaşabileceğimiz bir kaynak bulunmamaktadır. AML'de Monozomi 7 olması kötü prognoz işareti iken MDS'da da tedaviye refrakter olma ile Monozomi 7 arasında bir ilişki olup olmadığı bilinmemektedir (25).

Agresif KMML ve yüksek miktarda HbF bulunan ve hızlı ilerleyen hastalığı olan hastalarda yoğun kemoterapi başarılı olamamıştır. Tedaviye cevap alındığına dair bazı yayınlara rağmen gerçek bir remisyona ulaşmanın pek mümkün olmadığı düşünülmektedir.KİT yapılmayan 72 çocukla yapılan bir çalışmada sürvi %6 bulunmuştur ve bu oran yoğun kemoterapi almayanlarda da aynıdır (108).

KMML'de küratif tek tedavi seçeneği KİT 'dur. Uygun donörü olmayan tüm çocuklarda alternatif donör bulmaya çalışılmalıdır. Yavaş seyirli küçük bir hasta grubu dışında hastalığı KİT ile eradike etmek de zordur. Tedavide "Graft Versus Lösemi Etkisi" önemli rol oynar.

İlk KİT yayını Seattle'dan olup hazırlık rejimi olarak TBI ve Siklofosfamid kullanılmıştır.Hastalığın eradike edilmesindeki zorluklar dikkate alındığında Busulfan ve Siklofosfamid gibi kemoterapi ağırlıklı rejimlerin malign klonu eradike etmede

yetersiz olacağı düşünülmektedir. Bu güne kadar KİT ile tedavi edilmiş KMML 'li çocuklardaki en büyük seri olan 43 vakalık bir çalışmada 5 yıllık sağkalım; kardeş donörü olan 25 vaka için %38, akraba olmayan donörü olan hastalar için %18'dir . Relaps riski %58 olup TBI almayan gruptaki sağ kalım oranı daha iyidir. Busulfan, Siklofosamid ve Melfalan kullanımı da umut verici sonuçlar verebilmektedir. Yoğun kemoterapi ve /veya KİT öncesi splenektomi de tedavi seçenekleri arasında incelenmektedir. KMML'nin refrakter karakteri ve biyolojik özellikleri sebebiyle bazı farklılaştırıcı ajanlar ve sitokinler de gündemdedir. En sık kullanılan 13-cis-retinoik asit'tir. Bu ilacın 10 hastanın 5'inde tam ya da parsiyel cevaba yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca diğer retinoidler gibi incelenmektedir. Ek olarak in vitro çalışmalarda GM-CSF ve IL-1 reseptör antagonistleri denenmektedir (108).

#### 2.4.10 ÇOCUKLUK ÇAĞI ANEMİLERİNDE KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU

Kemik iliği (Kİ) yetersizliği sendromlarını ve ağır hemoglobinopatileri kapsayan kalıtsal ve sonradan kazanılmış hemotopoetik hastalıklarda kemik iliği transplantasyonu (KİT) endikasyonları tablo 13'de gösterilmiştir (3,6).

##### **Tablo 13 .Kemik İliği Yetersizlikleri**

###### **I -Kİ Tek Seri Yetersizliği**

Megakaryosit : Amegakaryositik trombositopenik purpura

Eritrosit : Konjenital eritrositer seri eksikliği (Diamond-Blackfan Anemisi)

Lökosit : Konjenital nütropeni (Kostmann Sendromu)

II- Kİ Tüm Hücre Serilerinin Yetersizliği (Pansitopeni, hücreden yoksun veya hücreden fakir kemik iliği)

###### **Yapısal**

Fankoni Aplastik Anemisi

Anomali olmayan ailevi, aplastik anemi

Seckel-Like sendromu

Shwachman-Diamond sendromu

Osteopetrosis

Sonradan Kazanılmış

İdiopatik aplastik anemi

Sekonder aplastik anemi

Hemolitik Anemiler

Globulin sentez bozukluğu

Talasemi majör

Orak hücre anemisi

Uygulama sıklığı sırasına göre hastalıklar ele alındığında:

### **Aplastik anemide KİT**

Donör bulunduğunda en iyi tedavi KİT'dir. Donör yoksa immunsupresif tedavi (ALG,Cyc-A, steroid kombinasyonları) kullanılmakta ve bazı merkezlerde eşit sonuçlar bildirilmektedir. Lökosit sayısı düştükçe immunsupresif tedavinin başarısı azalmaktadır. Immunsupresif tedavide 3 yıllık survi %62-64 olarak verilmektedir. Sekonder malinite (MDS dahil), relaps, önemli komplikasyonlardır.

KİT ile %65-93 survi mümkündür. Başarı oranı yaş küçüldükçe artmaktadır. Transfüzyon sayısının azlığı, tanı ile KİT arasındaki sürenin kısalığı (1 ay) iyi prognostik faktörlerdir.

Hazırlık rejiminde siklofosfamid (200 mg/kg) ± ATG (30mg/kg)± radyoterapi (TLI 500-750 cGy) yer alır.

### **Fanconi anemisinde KİT**

Otozomal resesif geçişli, progresif pansitopeni ile seyreden çeşitli konjenital anomaliler ile karakterize bir kemik iliği yetmezliği sendromudur. En önemli tanı kriteri, spontan veya indüklenmiş kromozom kırıklarının saptanmasıdır. Sekonder malinite oranı yüksektir.

KİT, hastaların tek tedavi şansıdır. Kemik iliği yetmezliği ve hematolojik bulgular, 3-7 yaş arasında ortaya çıkar. Androjen, steroid ve sportif tedavi ile KİT programına kadar geçici düzelme sağlanabilir. Hastalarda hücrelerin kemoterapotik ajanlara hipersensitivitesi nedeniyle hazırlık rejiminde kullanılan siklofosfamid dozu modifiye edilmektedir. Aplastik anemide 200 mg/kg verilirken, Fanconi anemisinde 20 mg/kg  $\pm$  ATG 30 mg/kg  $\pm$  TLI kullanılmaktadır. ATG ve TLI artmış transfüzyon sayısına göre eklenmektedir. **Survi, %75 civarındadır (7).**

### **Talasemi major'da KİT**

Talasemi, hemoglobin yapısındaki globin zincirlerinin yapımında bozukluğa yol açan herediter hastalıklar grubunu tanımlamakta kullanılan bir terimdir. Talasemi dünyada en sık görülen tek gen bozukluğudur. Özellikle Akdeniz bölgesi, Ortadoğu ve Asya kıtasında talasemiye çok sık rastlanır. Sadece Akdeniz bölgesinde 200.000 Beta Talasemi Major'lü hasta olduğu varsayılmaktadır (2).

Bugün için uygulanabilecek şifa sağlayan en uygun tedavi yaklaşımı, hastalığın kemik iliğinde olduğu da göz önüne alınırsa, allojeneik kemik iliği naklidir (AKİT).

Talasemide ilk başarılı uygulama 1981'de Thomas ve arkadaşları tarafından Seattle, ABD'de yapılmıştır. Hiç transfüze edilmemiş, 18 aylık bir bebek olan bu olguya HLA uygun kız kardeşinden AKİT uygulanmış ve halen devam etmekte olan uzun, hastalısız bir sürvi sağlanmıştır. İlk seri çalışmalar da Lucarelli ve arkadaşları tarafından Pesaro, İtalya'dan yayınlanmıştır. Öncü niteliğindeki ve hazırlama rejimi olarak CY + TBI kullanarak yapılan AKİT'lerde en büyük sorun graft rejeksiyonu ve erken toksisite olmuştur. 1983'ten beri ise Santos'un lösemili hastalar için önerdiği BU + CY başarıyla kullanılmaktadır. Bugün talasemide, allojenik uygulamalarda, kardeş veya HLA uyumlu panel kaynaklı vericilerin kemik iliği, periferik kök hücre ve kordon kanı kaynak olarak kullanılmaktadır (68).

Lucarelli ve arkadaşları talasemi'de dünyada en çok KİT uygulaması yapan gruptur . Lucarelli ve arkadaşları 1981-2000 tarihleri arasında 886 beta T.Major'lü hastaya (Orta yaş : 10, 1-35yaş) HLA uygun vericiden KİT yapmışlardır. 19 yıllık talasemisiz yaşam

%73 olarak saptanmıştır. Sınıfların ayrı ayrı değerlendirmelerinde ise, Sınıf 1 olarak kabul edilen ve 1985-2000 yılları arasında izlenen <17yaş (Orta yaş : 5.5, 1-16 yaş) 124 hastanın 15 yıllık sürvisi %93, olaysız sürvisi (EFS) %91, rejeksiyon oranı %8, rejeksiyon dışı mortalitesi %2 olarak saptanmıştır. Transplanta bağlı ölüm (TRM) oranı ise %7.2'dir. Sınıf 2'de <17yaş (Orta yaş : 9, 2-16 yaş) 297 hastanın 15 yıllık sürvisi %84, olaysız sürvisi (EFS) %82, rejeksiyon oranı %3, rejeksiyon dışı mortalitesi %15 olarak saptanmıştır. TRM %14'dür. Sınıf 3'deki 55 hastaya, 1985-1989 yılları arasında standart protokolle yapılan KİT uygulama sonuçları cesaret kırıcıydı. TRM, yüksek toksisite ve erken ölümler nedeniyle, çok yüksekti. 1989'da hazırlama rejimindeki CY dozu azaltıldı. 1989-1998 yılları arasında <17 yaş (Orta yaş : 11, 3-16 yaş) 126 hastanın 9 yıllık sürvisi %79, olaysız sürvisi (EFS) %58, rejeksiyon oranı %28, rejeksiyon dışı mortalitesi %19 olarak saptanmıştır. TRM %20.6'dır (2).

İtalya'dan bildirilen başarılı sonuçlar diğer merkezlerin de KİT uygulamalarını arttırmıştır. Ancak pekçok merkezde otolog rekonstitüsyon halen ciddi bir sorundur ve hastalısız sağkalımı %60-70'e indirmektedir. Son İtalyan çalışmalarında miks kimerizm geliştiren hastalarda da talasemisiz yaşam için bunun yeterli olduğu gösterilmiştir.

## 2.5 ALLOJENİK LENFOHEMATOPOETİK

### TRANSPLANTASYONDAN SONRA TAM VE MİKS DONOR

### KİMERİZMİNİN SAPTANMASI VE ÖNEMİ

Kimerizm terimi, konak orjinli olmayan lenfo-hematopoetik hücrelerin varlığını işaret etmektedir (Tablo 14). Bu hücreler bir fetal maternal transfüzyondan veya bir kan transfüzyonundan raslantısal olarak veya amaçlı olarak hematopoetik kök hücre transplantasyonundan (HSCT) sonra türeyebilir. Tam kimerizm, genel olarak donör hematopoezinin konağının yerini aldığına işaret eder. Miks kimerizm, lenfositler gibi hücresel kompartmanlarda hem donör hem de alıcı hücrelerinin varlığını gösterir. Split kimerizm terimi, donörden bir veya daha fazla kompartman türediğinde kullanılabilir. Tam kanda kimerizm olup olmamasının saptanmasının veya kan serisi için spesifik olup olmamasının çalışmacı tarafından tayin edilmesi, miks kimerizm vakalarının

tanımlanmasında tavsiye edilmektedir. Split kimerizm vakalarında, kan serisinin orjini tayin edilmelidir (5).

**Tablo14. Kimerizm Tanımları**

<u>Kimerizmin tipi</u>	<u>Tanımlama</u>	<u>İçerik</u>
Tam kimerizm	%100 donör hücresi saptanması.	Çoğu çalışma semikantitatif ve az sayıda konak hücresi saptanamaz olabilmesine rağmen tam kimerizm tam lenfohematopoetik yerine geçmeyi ifade eder.
Miks kimerizm	Verilen hücrel kompartmanda örneğin lenfositlerden konak hücreler saptanması	Literatür genellikle %5 veya 10 donör hücresini miks kimerizm kriteri olarak kabul eder. Genel olarak konak lenfohematopoetik hücrelerin herhangi bir güvenilir tespiti miks kimerizm olarak dikkate alınabilir.
Split kimerizm	Bir veya daha fazla konak hücre serisi ve bir ya da daha çok donör hücre serisi saptanması.	Split kimerizmin ayrıntıları kesindir örneğin miyeloid hücreler %100 konak ve T-hücreleri %100 donör.
Mikrokimerizm	<%1 konak hücrelerin saptanması	Mikrokimerizm organ transplantasyonunda yüksek derecede duyarlı teknikler kullanılarak belirlenebilir. Allojenik kök hücre transplantasyondan sonra kullanımı önerilmez.

Mikrokimerizm terimi, yalnızca çok duyarlı tekniklerle saptanabilen donör hücrelerinin varlığının göstermekte kullanılır. Bu durum, organ transplantasyonundan sonra ve az sayıda fetüs kaynaklı hücre saptanabilen sistemik sklerozlu kadınlarda tanımlanmıştır.

Kemik iliği naklinin başarısının saptanmasında, donör lenfohematopoetik sisteminin konağa baskın olması veya dengede olma derecesinin saptanması kritik öneme sahiptir. Ayrıca bu belirleme, değişik hazırlık rejimlerinin etkinliği, graft-versus-host hastalığı (GVHH), profilaktik rejimler, ve yamanma ve graft versus lösemi (GVL) aktivitesinin sağlanmasında hücrel tedavinin değerlendirilmesini sağlar. Bu konular T hücre ayıklanmış veya nonmyeloablatif transplant uygulanan hastalarda özellikle önemlidir.

GVL etkisi donör T-hücre kimerizminin esas derecesine erişmeye bağlı olabilir. Diğer yandan, konak lenfohematopoezinin tam olarak ortadan kaldırıldığı, tam donör kimerizmi yerine miks kimerizm durumu tercih edilir olabilir. Organ transplantasyonlarında, konjenital metabolik hastalıklarda ve solid tümörlerin immünoterapisi gibi çeşitli durumlarda bir miks kimerizmin yerleşmesi immünolojik yararlar sağlayabilir (41).

### 2.5.1 KİMERİZMİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE TEKNİKLER

Çok erken KİT çalışmaları kimerizmin yerleşmesinin önemini ortaya koymuştur, ancak ilk araştırmacılar tarafından kimerik durumu değerlendirmek için eritrosit fenotiplemesi, immünolojik izotip analizi, sitogenetik gibi teknikler kullanılmıştır. Bu tekniklerin sınırlamaları, sınırlı polimorfizm derecesi, zayıf duyarlık ve cins uygunsuz donör ve alıcı idi.

Cins-uygunsuz transplantasyon değerlendirmesinde bir teknik X ve Y kromozomları için floresan in situ hibridizasyondur (FISH). Bu teknik bugün çoğu rutin laboratuvarlarda yapılmaktadır ve görece sensitif ve kantitatifdir. Belirlenmiş işlemler ticari olarak mevcuttur, yöntemlerin standardizasyonu olasıdır ve kıyaslanabilir sonuçlar sağlamaktadır (57).

Kimerizmi değerlendirmede en genel uygulanabilir ve kullanışlı yöntemler restriksiyon parça uzunluk polimorfizmini (RFLP) kullanan DNA teknikleridir. Bu polimorfizmler, DNA dizisinin doğal varyasyonlarının bir restriksiyon enzim kesim bölgesinin kaybı veya kazanılmasıyla veya restriksiyon bölgeleri arasında DNA'nın insersiyonu veya delesyonuyla yapılır. Bu bölgeler Mendel tarzda bir kalıtımla geçerler ve KİT'den sonraki kimerizmi değerlendirmekte yararlıdırlar (58,79).

KİT'den sonra geleneksel RFLP analizinin önemli kısıtlılıkları, geleneksel Southern blot analizi için yeterli DNA izole etmek için en az  $10^6$  hücre bulunması gerekliliği ve azınlıkta kalan hücre popülasyonlarını saptamadaki duyarlılık eksikliğidir. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) insandaki mini satellit ve mikrosatellit bölgelerinin hızlı amplifikasyonu için bir yöntem olarak kullanılmaya başlaması kimerizmi

değerlendirmekte güçlü bir araç sağlamıştır. Minisatellit ve mikrosatellit bölgelerini yandan kuşatan PCR primerleri kullanarak, bütün allel büyütülür ve bu şekilde PCR ürününün büyüklüğü birbiri arkasına dizilmiş tekrarların uzunluğu ve sayısı ile saptanır. Genel olarak, mikrosatellitlerin analizi (STR) minisatellitlerin analizinden (VNTR) daha kolaydır(106). Bu fark kısmen birçok minisatellitin tekrarlanan bölgelerinin GC'den zengin olmasından kısmen de minisatellit allellerinin mikrosatellit allellerinden daha büyük olmasından kaynaklanmaktadır. Bu her iki faktör de PCR reaksiyon durumunu teknik olarak daha zorlayıcı kılar. PCR-temelli bir yöntemin ana avantajı artmış duyarlılıktır; bu durum minör donör ya da alıcı hücre popülasyonlarının saptanmasına olanak tanır (79). Ayrıca, PCR az sayıda hücreden analiz yapılmasına olanak tanıyarak yamanma için morfolojik kanıt oluşmadan önce yamanma kinetiklerinin analiz edilmesini sağlar. PCR ürünü agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulabilir, <sup>32</sup>P ile işaretli problarla hibridize edilebilir ve otoradyograf yöntemi uygulanabilir ya da PCR floresanla işaretlenmiş primerlerle yürütülebilir. Teknik genel olarak daha duyarlı olsa da, bugünlerde birçok laboratuvar daha hızlı oldukları ve radyoaktivite kullanımından kaçındığı için floresan primer yöntemlerini kullanmaya dönmüştür (106,112).

## 2.5.2 DUYARLILIK VE NİCELİK TAYİNİ

Geleneksel PCR yöntemleri kullanıldığında kimerizm analizinin duyarlılığı yöntemin yarışmacı özelliğinden ötürü sınırlıdır. Genel olarak, test edilen alele ve radyoaktif ya da floresan tayin yönteminin kullanılmasına bağlı olarak duyarlılık %0.1 ile %5 arasındadır. Cinsiyet eşleşmesi uygunsuz bir transplantasyonda (kadın donör/erkek alıcı) Y-spesifik aleller kullanılarak yüksek düzeylerde duyarlılık elde edilebilirse de bu düşük düzeyli kimerizmin prognostik önemi bilinmemektedir. FISH analizi kullanarak nicelik tayini basittir ve minisatellit ve mikrosatellit aleller kullanılarak PCR-temelli yöntemlerle uygulanabilir. Son zamanlarda gerçek-zamanlı PCR'ın kullanıma girmesinin gelecekte daha fazla duyarlılığa ve daha doğru nicelik tayinine olanak tanıması olasıdır.

### 2.5.3 KEMİK İLİĞİ NAKLİNDEN SONRA KİMERİZM TAYİNİNDE KULLANILAN KAN ÖRNEĞİNİN KAYNAĞI (PERİFERİK KAN, KEMİK İLİĞİ)NİN VE KAN ÖRNEĞİNİN DİZİLERE AYRILARAK KULLANIMININ ÖNEMİ

Kan mı, kemik iliği analizi mi kullanmak ve fraksiyonlarına ayrılmış mı, diziye-spesifik analiz mi kullanmak iki ayrı soru gibi görünebilir ama esasında aynı konuyu ele almaktadırlar. Kemik iliği kimerizmi analizinin kan kimerizmi analizinden daha bilgilendirici olduğu az sayıda durum vardır. Bunlardan biri, kemik iliğinde minimal rezidüel hastalığın tayinidir. Kimerizm analizi görece duyarlıdır ve rezidüel alıcı hücreleri tayin etmek için yaklaşık %1 olduğu bildirilmiştir (5). Diziye-spesifik analiz kullanılarak duyarlılık artırılabilir; fakat bu yöntem hastalığa-spesifik PCR yöntemlerinden genellikle daha az etkilidir ve genellikle rezidüel alıcı hücrelerin normal ya da malign olduğunu ortaya koymaz. Genel olarak, çoğu kemik iliği nakli ile uğraşan araştırmacı önce donör yamanmasının olup olmadığını ve ikinci olarak ta miks kimerizm olup olmadığını saptamayı isterler. Eğer miks kimerizm varsa, hangi dizilerin miks olduğunu ve hangilerinin tam donör olduğunu bilmek önemli olabilir. Son zamanlarda “nonmyeloblatif” hazırlama rejimlerinin kullanıma girmesiyle, hem miyeloid hem de lenfoid kimerizmi göstermek önemli olmuştur. Her ikisi de periferik kan analizi ile saptanabilir. Kan spesifik dizilere ayrılabilir. Spesifik dizilere ayırmak için çeşitli teknikler seçilebilir. Bu seçilen teknik yalnızca dizilerin analizine olanak tanımakla beraber tekniğin görece duyarlılığını da artırır (5).

### 2.5.4 HEMATOLOJİK MALİGN HASTALIKLAR İÇİN MYELOBLATİF TRANSPLANTASYON SONRASINDA KİMERİZMİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Erken kimerizm çalışmalarının çoğu hematolojik malign hastalıklar için ,miyeloblatif transplantasyon uygulanan hastalarda yapılmıştı (46). Miks kimerizm, bazı hastalarda duyarlı teknikler kullanarak saptanabilir olsa da, manipüle edilmemiş transplantasyon yapılan hastaların çoğu tamamıyla kimerik olacaktır. Muhtemelen, graftteki T-hücreleri bir graft-versus-lenfohematopoez etkisi ile tam donör kimerizminin yerleşmesine

katkıda bulunmaktadır. Buna zıt olarak, birkaç tane teknikten herhangi biri ile T-hücreyi boşaltılmış ilik nakli yapılmış hastalarda sıklıkla miks kimerizm olduğu bulunmuştur. Bu şekilde, geleneksel hazırlama ve GVHH proflaksisi kullanarak yapılan miyeloablative transplantasyonda kimerizmin ölçümü şart değildir. Fakat, eğer graft manipüle edilirse, yeni GVHH rejimleri çalışılır, ya da eğer hazırlama rejimi değiştirilirse, yeni rejimin etkilerini değerlendirmek için kimerizmin ölçümü kritik değere sahip olabilir (84,91).

#### 2.5.5 LENFOPROLİFERATİF BOZUKLUKLAR İÇİN NONMYELOABLATİF KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU SONRASINDA KİMERİZMİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Lenfoproliferatif bozukluklarda, maligniteyi eradike eden bir GVL yanıtı tam lenfohematopoetik kimerizmle ilişkili değildir (5). Lenfoproliferatif bozukluklar için bir nonmiyeloablative hazırlayıcı rejim ve HLA-uygun ve uygunsuz HLA -donör kemik iliği transplantasyonu sonrasında miks lenfohematopoetik kimerizm güvenilir bir şekilde indüklenebilir. Proflaktik DLI'ler ile sıklıkla tam donör hematopoezine dönüşüm ve yine sıklıkla çarpıcı antitümör yanıtlar gözlenmiştir. Graft kaybı ise, özellikle HLA-uygun-donör transplantasyonu ortamında bir sorun olmuştur. Kök hücre transplantasyonu için nonmiyeloablative hazırlayıcı rejimler kullanan bazı başka programlardan elde edilen deneyimlere göre, kimerizm nadir olarak değerlendirilmiştir ve çoğu durumda tam ya da tama yakın donör hematopoezi erken dönemde sağlanmıştır (93).

#### 2.5.6 MYELOİD LÖSEMİLER İÇİN NONMYELOABLATİF VE AZALMIŞ-YOĞUNLUKTA HAZIRLAMA SONRASINDA KİMERİZM ANALİZİ

Miyeloid-spesifik kimerizmin saptanması miyeloid kökenli malignitesi olan hastalarda özellikle önemlidir. Son derece düşük düzeylerde bile olsa, persistan olarak saptanabilen alıcı hematopoezi olan remisyon dönemindeki miyeloid lösemi hastaları relaps açısından tam donör miyeloid kimerizmi ile sonuçlanan 'graft-versus-host hematopoetik etkisi' olan hastalara kıyasla önemli derecede daha yüksek risk

altındadırlar. Bu ortamda miyeloid kimerizmin değerlendirilmesi minimal rezidüel hastalığın saptanması için 'onun yerine geçecek' bir yaklaşım gibi gözükmemektedir. Çünkü saptanabilecek konak miyeloid hücre popülasyonlarının relapsa neden olma kapasitesine sahip malign hücreleri barındırdıkları bilinmemektedir. Ayrıştırılmamış kemik iliği hücrelerinin geleneksel ablatif hazırlayıcı rejim ortamında kimerizm analizinin GVHH, graft başarısızlığı ve relaps gibi sonuçları tahmin ettiği bildirilmiştir. Bu yüzden, diziye-spesifik kimerizm transplantasyon sonrasında olan biyolojik olayların daha iyi anlaşılmasında zorunludur (96). Ancak miyeloid dizilerdeki mik s kimerizm, relaps olayını miyeloid malignansilerde tahmin ederken, lenfoid malignansilerde tahmin edemeyecektir. T-hücre altkümelerindeki mik s kimerizm daha düşük bir akut GVHH riski tahmin edecektir (5).

#### 2.5.7 MALİGN OLMAYAN BOZUKLUKLAR İÇİN TRANSPLANTASYON SONRASINDA KİMERİZMİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İçlerinde immün yetmezliklerin, edinilmiş ve konjenital ilik yetmezliği sendromlarının ve hemoglobinopatilerin de olduğu çok sayıda nonmalign bozukluk hematopoetik kök hücre transplantasyonu ile düzeltilebilir. Belirli sistemik metabolik bozuklukların letal ve dejeneratif komplikasyonlarının düzeltilmesi de normal enzim aktivitelere sahip hematopoetik hücrelerin stabil yamanma ile sağlanabilir. Bu hastalıkların birçoğunda, altta yatan durumların 'iyileştirilmesi'ni ya da fonksiyonel dönüşümünü sağlamak için tam hematopoetik kimerizm gerekli değildir. Buna karşın, immün sistem ve ilik fonksiyonlarının sağlam olduğu ve daha önceden hiçbir kemoterapinin uygulanmadığı (örneğin metabolik bozukluklar) ve tam ablatif hazırlamanın bile dayanıklı donör hücre yamanma sağlamada yetersiz kalabildiği nonmalign bozuklukların tedavisi için transplantasyonda graft reddi önemli bir sorundur (5).

Uzun-dönemli mik s kimerizm ağır kombine immünyetmezlikler, Wiskott-Aldrich sendromu ve hemofagositik lenfositosis gibi T-hücre dizisinde patolojik lezyonlarla karakterize immün yetmezliklerin tedavisi için transplantasyonun sıklıkla karşılaşılan bir sonucudur. Geleneksel 'ablatif' protokollerle (örneğin, busulfan, siklofosfamid ve etoposid) bile, periferik kanda mik s kimerizm vakaların yaklaşık

%50'sinde görülmür. T-hücre depleyonsuz ilişkisiz ya da alternatif donör transplantasyonu sonrasında, tam donör kimerizmi histolojik olarak uygun kardeş transplantasyonundan sonra olduğundan biraz daha sık görülebilir; nedeni belki de daha güçlü bir graft-versus-hematopoez etkisidir. Orantısal donör-tipi angrafmanının %5'den %100'e dönüşümü gözlenmiştir. Genel olarak konuşmak gerekirse, donör hücrelerin %10'undan fazlasının engrafmanı, altta yatan hastalığın fonksiyonel olarak düzeltilmesi için yeterli olabilir (60).

Sistemik kromozom dengesizliği bozuklukları hücre siklusu regülasyonundaki defektlere ya da apoptozise bağlıdır (örneğin, Fanconi anemisi, Bloom sendromu, ve otoimmün lenfoproliferatif bozukluklar). Bu bozukluklar hastaları hematolojik malignanitelere yatkın kılar, bu yüzden tam hemopoetik yamanma istenir (78).

Eşleşmiş bir kardeş donörü kullanarak yapılan aplastik anemi transplantasyonu, siklofosfamid ya da siklofosfamid ile antitimosit globülini içeren nonmiyeloblastif hazırlama rejimleri ile uygulanır. Daha az yoğun hazırlama rejimleri kullanarak yapılan ağır aplastik anemi tedavisi için başarılı transplantasyondan sonra miks kimerizmle karşılaşma olasılığı yüksektir. Gerçekten de, bazı hastalarda konak hematopoezinin tam iyileşmesi olabilmektedir. Günümüzde, kemik iliğinden ziyade periferik kandaki kök hücrelerin kullanımının miks kimerizmin genel insidansını etkileyip etkilemeyeceği bilinmemektedir. Aplastik anemi için transplantasyon sonrasında kimerizmin monitorizasyonu graft kaybı ve relapsın değerlendirilmesinde yararlı olabilir, fakat hematopoez devam ettiği sürece, miks kimerizmin varlığı klinik olarak bu durumla ilgili olmayabilir.

Farklı hazırlık ilaçlarının donör engrafmanı üzerindeki kritik etkisi son birkaç yılda artan oranda netlik kazanmıştır. Örneğin, daha düşük dozlarda bile "melfelan" gibi 'kök-hücresine toksik' ilaçlar kullanan rejimler hala yüksek derecede mielosüpresiftir ve alıcı kök hücreleri koruyan rejimlerde görülen yüksek düzeylerdeki otolog miyeloid iyileşmesine olanak tanınması çok daha zayıf bir olasılıktır. Buna zıt olarak, daha az mielosüpresif (kök-hücresi için toksik olmayan) fakat siklofosfamid ve fludarabin gibi daha fazla immünosüpresif ilaçlar kullanan rejimlerin büyük oranda kayda değer otolog hematopoetik iyileşmeye yol açma olasılıkları çok daha fazladır (5).

## 2.5.8 KİMERİZM ANALİZLERİNDE DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN KONULAR

Kimerizm analizi duyarlı (<%1), bilgilendirici teknikler kullanılarak yapılmalıdır. Günümüzde, STR/VNTR analizi tekrarlanabilir bilgilendirici veriler verme olasılığı en yüksek yaklaşımdır. Sitogenetik, FISH ve hipermetafaz FISH eğer STR/VNTR analizleri yapılamıyorsa ya da cinsiyet açısından uygunsuz eşleşmeli transplantasyon ise yararlı olabilir. Fakat, bu teknikler daha az duyarlıdır (5).

Kimerizm analizi için periferik kandaki kök hücreler genellikle kemik iliği hücrelerinden daha yararlıdır. Ayrıştırılmamış kemik iliği hücrelerinin kimerizmi miyeloid hücrelerin orijininin belgelenmesine olanak tanır; fakat, T-hücrelerinin ve diğer dizilerden hücrelerin kimerizmi ile zayıf korelasyon gösterir ve diğer hücreler alt kümelerdeki kimerizm derecesi hakkında çok az bilgi verir. Diziye-spesifik kimerizm nonmiyeloablatif ve azalmış-yoğunlukta hazırlama ortamında seçilecek tayin yöntemi olarak düşünülmelidir (46).

Miyeloablatif KİT'den sonra geleneksel GVHH proflaksisi kullanılarak yapılan kimerizm analizi muhtemelen şart değildir ve yardımcı olarak değerlendirilebilir. Eğer yapılacaksa, 1, 3, 6 ve 12 aylık bir takvim uygundur. Tam kimerizm bir kez yerleştikten sonra, klinik durumda bir değişiklik olmadıkça tekrarlama testi gereksizdir. T-hücre depleasyonu, nonmiyeloablatif ya da azaltılmış-yoğunlukta hazırlama ya da yeni GVHH önleme rejimlerinin kullanımı 1., 3., 6. ve 12. aylarda kimerizm analizini gerekli kılar, çünkü donör lenfosit infüzyonları gibi girişimler donör durumuna bağlı olabilir. Aplastik anemi tedavisi için transplantasyon geçiren hastalarda 1., 3., 6. ve 12. aylarda rutin kimerizm analizi yapılmalıdır. Nonmiyeloablatif transplantasyonda, erken kimerizm paternleri ya GVHH (artan donör T-hücre kimerizmi) için ya da graft kaybı (donör hücrelerin ≤%20'sine kadar azalan donör T-hücre kimerizmi) için tahmin değerine sahip olabilir. Bu yüzden, eğer tedavi edici girişim bu kimerizm durumuna dayandırılırsa daha sık analiz önerilir (5).

## 2.6 FLUORESAN IN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİ

Karyotiplemeyi değerlendirmede önemli tekniklerden birisi de in situ hibridizasyon tekniğidir. İşaretli DNA problemlerinin gittikçe artan miktarda ortaya çıkmasıyla, direkt olarak lam üzerine yayılan kromozom üzerinde DNA dizilerini lokalize etmek mümkün olabilmektedir. In situ hibridizasyonda, başlangıçta radyoaktif olarak işaretlenmiş nükleik asit problemleri kullanılıyordu. Bu metod ribozomal RNA (rRNA) genleri veya tümör hücrelerinde amplifiye olan genler gibi kromozom üzerindeki genlerin çoğul kopyalarını tespit etmek için yeterliydi. Ancak tek kopyalı genleri tespit etmek oldukça zordu ve metod buna karşı yeterince hassas değildi. Radyoaktif maddelerle çalışmanın zorluğu, tehlikesi ve aylar ile ifade edilecek bir zaman gerektirmesi nedeniyle farklı işaretleyiciler geliştirildi (76).

Yeni işaretleme tekniklerinin gelişmesi ve tek gen kopyasının kısa sürede tespit edilmesiyle, FISH tekniği oldukça yeterli hale gelmiştir. Radyoaktivite kullanılmadan yapılan işaretleme yöntemleri (biotin işaretli problemler fluoressan boya ile boyandığında ortaya çıkan metod) son zamanlarda oldukça tercih edilen bir metod haline gelmeye başlamıştır. Bu metod ile, kromozom üzerindeki son derece spesifik özgül gen dizilerini çok doğru ve güvenilir bir şekilde belirlemek mümkündür (57,86).

FISH tekniğinde, önce metafazdaki kromozom, lam üzerinde denatüre edilir ve daha sonra biotin ile işaretli DNA probu ile birlikte hibridizasyon sağlanır. Lam daha sonra avidin proteini ile muamele edilir. Avidin, biotini oldukça sıkı bir şekilde bağlar. Biotine karşı fluoressan ile işaretli antikorun lam üzerine ilave edilmesiyle fluoressan ışığı yayan boyutu içermekte olan kromozomun, fluoressan mikroskop altında pozisyonu lokalize edilmektedir (15).

FISH tekniğindeki son gelişmeler ise, aynı kromozom üzerine farklı boylarla işaretli, farklı problemlerin uygulanmasıdır. Bu yenilikte 2-3 megabazlık en az iki prob aynı kromozom üzerine uygulanabilmektedir. Ek olarak, kromozom boyamanın geliştirilmesi, (ki burada kromozom spesifik DNA dizilerinin karışımı kullanılmaktadır) metafazda yayılmış spesifik kromozomun tanınmasına olanak sağlamıştır. Bu teknikle,

kromozomun tüm boyuna komplementer DNA probu kullanılmaktadır. Bu problemler kromozomu ışıklandırmakta ve basit bantlama yönteminden daha doğru bir biçimde translokasyonları ve yeniden düzenlemeleri tespit edebilmektedir (86).

Her ne kadar FISH tekniği, başlangıçta metafazda yayılmış kromozomlar için kullanılmaktaysa da, interfaz hücrelerine de uygulanabilmektedir. Interfazda uygulanabilir olmasının avantajı ise, klinisyene çok daha kısa bir sürede neticeyi ulaştırabilir olmasıdır. Çünkü bu işlem ile hücre kültüre konulmadan sonuç 24-48 saat içinde elde edilebilmektedir. Interfaz FISH, interfaz çekirdeğinde fazladan bir fluoresan boya içeren trizomilerin prenatal tanısında, cinsiyet kromozom anomalilerinde ve farklı cinsten kemik iliği transplantasyon sonrası relaps ve minimal hastalık tesbitinde kullanılmaktadır (57,86).

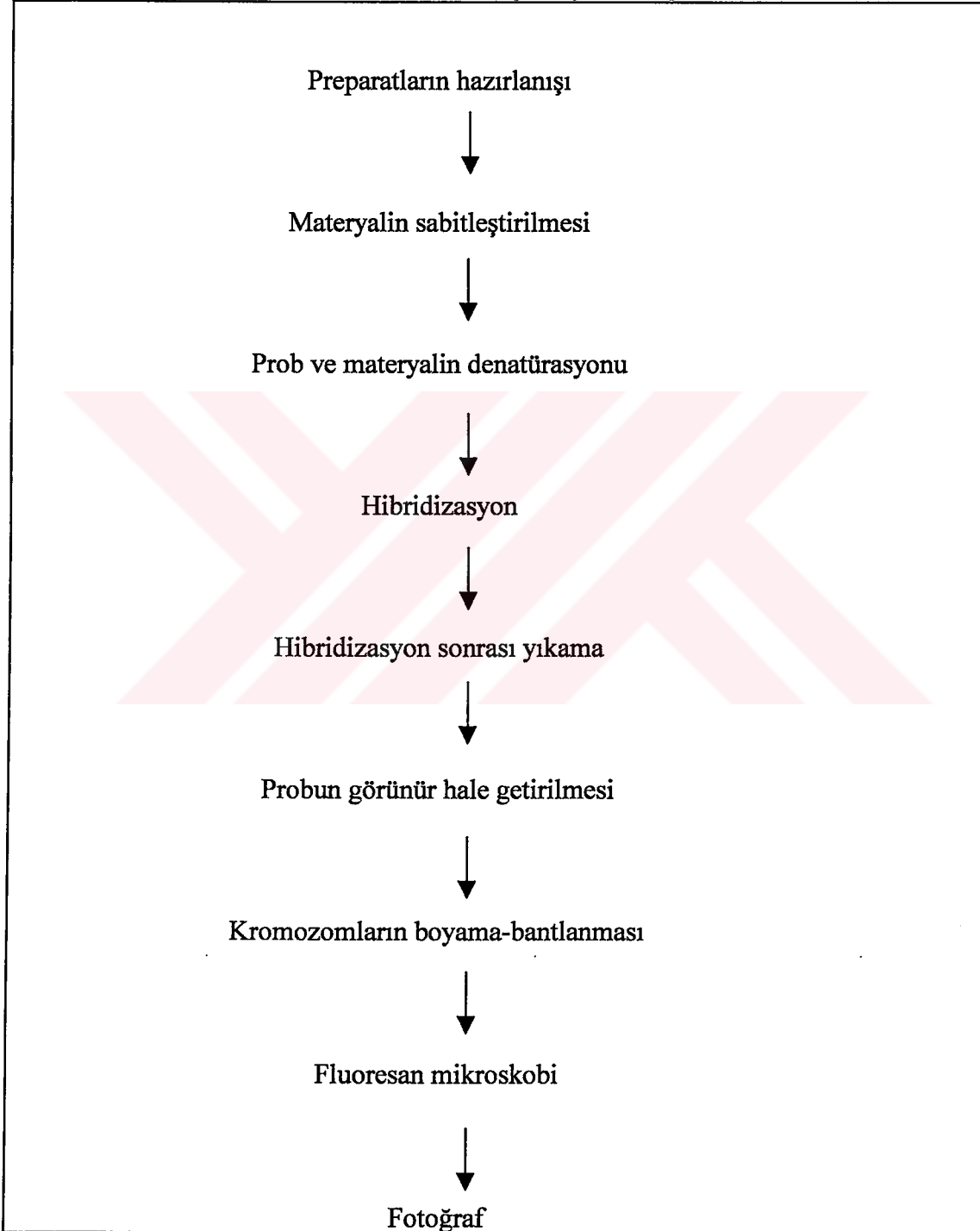
In situ hibridizasyon yönteminin esası genomik DNA ile fluoresanla işaretlenmiş prob DNA molekülünün hibridizasyonuna (melezlenmesine) dayanmaktadır. Kromozoma spesifik problemler ile hücreler interfazda bile olsa karyotipik sayısal ve yapısal anomalilerin tanısında kullanılabilirlerdir. Lösemilere özgü olan bu kromozomal düzensizlikler hem hastalığın tanısı sırasında hem de tedavi sonrasında minimal rezidüel hastalıkları tanımlamak amacıyla kullanılabilirlerdir. Çok sayıdaki periferik kan ve kemik iliği hücrelerinin incelenmesine bağlı kantitatif sonuçlar verilebilmesi ve hipoplastik kemik iliği vakalarında az sayıdaki hücrelere de uygulanabilir olması, yöntemin hassasiyetinin ve özgüllüğünün artmasına neden olmaktadır (76).

## 2.6.1 FISH TEKNİĞİ

Fluorokrom moleküller, in situ hibridizasyon yöntemi ile kromozom üzerinde özgül bölgelere problemler aracılığı ile bağlanarak, o bölgeyi görünür hale getirebilirler. DNA dizileri fluorokrom moleküller ya da aracı moleküller ile işaretlenerek hedef materyalle birlikte denatüre edilir ve birbiri ile komplementer olan prob ve hedef dizinler birlikte yeniden sarmal oluşumu için uygun koşullara bırakılırlar. Hibridizasyon sonrası ortamdan artan dizinlerin uzaklaştırılması için yapılan yıkama işleminden sonra, seçilen

işaretleme sistemine göre direkt boyama-bantlama ya da florokrom moleküllerle bağlı antikör ya da substratlarla muamele edilir (91). In situ hibridizasyon için işlem akışı tablo 15’de gösterilmiştir.

**Tablo 15: In situ hibridizasyon işlem akışı**



### 2.6.1.1 Problar

Aracı ya da florokrom moleküllerle işaretlenmiş problar genellikle 200-400 bç'lik parçalara ayrılmışlardır. Bu uzunluk, özgün hibridizasyonun maksimum olduğu ve özgül olmayan bağlanmaların minimuma indirilebildiği en uygun büyüklüktür. Problar direkt olarak floresan moleküllerle konjuge edilebilirler. Ancak, bir aracı molekülle işaretlenmiş probların, hibridizasyon sonrası florokrom moleküllerle bağlanması daha yaygın olarak kullanılmaktadır (109).

En sık kullanılan aracı moleküller biotin, digoxigenin, dinitrofenil (DNP), aminoasetilflorein (AAF), civa ve sülfonat'tır.

Problar, genomik, kromozoma özgü tekrarlayan diziler, "whole library"(kütüphane) problar, tek gen probları olmak üzere dört ayrı özellikte bulunmaktadır.

#### Genomik problar

Türe özgü işaretleme için kullanılırlar. Tüm nükleer genomun işaretlemesine olanak tanıyacak özellikleri taşımalıdır. Bunun için, tek gen dizilerinden çok, hızlı hibridizasyona olanak veren tekrarlayan diziler kullanılır. Türe özgü işaretleme için Alu dizileri sıklıkla kullanılmaktadır (76).

#### Kromozoma özgü tekrarlayan diziler

Satellit ya da telomerik tekrar dizilerine özgü problardır. Alfa satellit problar, sentromerdeki alfoid DNA dizilerine özgü olup özellikle anöplidilerin saptanmasında interfaz ve metafazda kullanılabilir. Işıma yoğunlukları son derece yüksektir. Beta satellit problar ise insan kromozomlarının perisentrik heterokromatin bölgelerinde yer alan tekrar dizilerine spesifik olarak hazırlanmışlardır. Akrosentrik kromozomların polimorfik satellit bölgelerinin gösterilmesi amacı ile kullanılabilir. Klasik satellit probların hedefleri ise 1,9,16. kromozomların sekonder büzüntü bölgelerinde ve Y kromozomunun uzun kolunda yer alan tekrar dizileridir.

Telomerik proplar, kromozoma ve kromozomun koluna özgün dizilerin komplementeri olup, telomeri içeren yapısal kromozomal değişikliklerde sık kullanım alanı bulmaktadır.

Bunların yanısıra 1.kromozom telomerine komşu tekrarlayan diziler için midisatellit propları, DXZ4 bölgesi için makrosatellit propları kullanılabilir(76).

### **“Whole library” / Kütüphane proplar**

Bir kromozoma ait tüm DNA dizisini taşıyan proplar olup boyama kolleksiyonları olarak da adlandırılırlar. Özellikle metafaz kromozomlarının tanımlanmasında kullanılan ve kromozomun tamamını gösteren bu proplar, en sık olarak translokasyonlar için kullanılır. İşmaları çok rahat gözlenebilir.

### **Tek gen propları**

Genomdaki tek kopya dizilerine yönelik olan bu propların hibridizasyon verimi gözlenecek olan bölgenin büyüklüğü ile ilişkilidir. Hedefin 2 kb’den uzun olması başarıyı arttırmaktadır. Gen ampifikasyonları ve delesyonları için kullanılırlar.

### **2.6.1.2 İşaretleme:**

1991 yılında yeni bir alternatif olarak floresan işaretleli nükleik asitler kullanıma sunulmuştur. Floresan işaretleli nükleotidler, direk ve indirek in situ hibridizasyon deneylerinde kullanılabilirler.

Fluorescein-dUTP/UTP/ddUTP standart tekniklerle enzimatik olarak nükleik asitlere bağlanmıştır. Doğrudan işaretleme metodunda immunohistokimyasal görüntülemeye ihtiyaç yoktur. Ancak biotin ve digoxigenin ile modifiye proplarla görüntüleme dolaylı metoda göre daha duyarlıdır (86 ).

Hapten olarak kullanıldığında, fluoresan işaretli nükleotidlerin tespiti; bir enzimle birleştirilmiş anti- fluoresan antikoru veya FITC işaretli sekonder ile belirlenen konjuge olmamış antikor ile yapılır. Bu tür deneylerin hassasiyeti dolaylı metodla aynıdır.

Doğrudan işaretlemede kullanılan diğer florokrom maddelerden;

Tetramethylrhodamine-6-2-dUTP (kırmızı fluoresan boya) ve aminomethylcoumarin-6-2-dUTP (mavi fluoresan boya) de sık olarak kullanılır.

### **İkili ve Üçlü İşaretleme Sistemleri**

Digoxigenin, biotin ve fluoresan işaretli problemlerin kombinasyonları kullanılarak tek preparasyonda farklı kromozom bölgelerinde veya farklı RNA dizilerinde çoklu hibridizasyon yapılabilir.

Bu işlemde üç değişik boyalı antikorların kullanımı olasıdır. Bu boyalar; Fluorescein veya FITC (fluoresceinisothiocynate;sarı), rhodamine veya TRITC (tetramethylrhodaminiso-thiocynate; kırmızı)ve AMCA (aminomethylcoumarin-aceticacid;mavi)'dir (76).

#### **2.6.1.3 Görüntüleme Sistemleri**

##### **Antikor konjugantları:**

Enzimler, florokrom boyalar veya kolloidal altın bağlanmış antikorlarla hibridizasyon sonrası problemlerin spesifik bölgeleri görüntülenebilir.

Enzim bağlı antikorlar, bağlandıklarında renk açığa çıkaran substratları gerektirirler. Florokrom bağlı antikorların tespiti için floresan mikroskoba ihtiyaç vardır. In situ hibridizasyonda çoğunlukla bu konjugatlar kullanılır. Kolloidal altın bağlı antikorlar için ise dondurulmuş kesitler hazırlanır ve elektron mikroskopunda incelenir. Konjuge olmayan antikorlar bütün sistemlerde kullanılabilir ama görüntüleme için 2.veya 3.bir antikora ihtiyaç vardır (57).

## **Immunohistokimya**

Immünohistokimyasal işlemlerde biotin, DIG ve FITC kullanılır. Bunlar tespit moleküllerinin ve mikroskop türünün seçiminde esneklik sağlar. Immünojenik işlem öncesi zeminin artefaktlı olmasını engellemek için baskılayıcı işlemler uygulanır. Standart reaksiyonda, hedef doku, hücre veya kromozom preparasyonu bloklanır ve 37°C de 30 dakika antikorlu konjuge solüsyonunda enkübe edilir. Daha sonra üç kere Tween 20 içeren tampon ile yıkanır (76).

## **Enzimler**

Immünohistokimya reaksiyonlarında kullanılan bütün enzimler in situ hibridizasyon için de kullanılabilir. Peroksidaz (POD) için diaminobenzidine (DAB) i Imidazole reaksiyonu ve alkaline fosfataz (AP) için 5-bromo-4-chloro-3-inodylphosphate / nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) reaksiyonu önerilmektedir. Kolorimetrik tespit avantajları; iyi lokalizasyon, yüksek hassasiyet ve presipitasyon sabitliğidir. DAB reaksiyonu, mavi alkalen fosfataz reaksiyonuna zıt bir renk verir, böylece çift hibridizasyonda iki enzim birlikte kullanılabilir. Ayrıca, her iki görüntüleme metodunun parlak yansıtma özelliği vardır (76).

## **Florokrom Moleküllerle Görüntüleme:**

“Fluorescein”, “rodamin”, resorufin hydroxycuomarin ile işaretlenmiş DNA problemleri FISH’da kullanılabilir. Hedef bölge dışındaki DNA’yı boyamak için; florokrom DNA boyaları olarak propiodin iodide (kırmızı renk), DAPI (mavi renk) kullanılabilir.

## 2.7 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 1980 yılında Kary Mullis tarafından tasarlanmış ve moleküler genetik araştırmalarında bir devrim yaratmıştır. Genetik çalışmalarındaki en büyük sorun 3 milyon baz içeren genomda hedeflenen bölgenin hızla görüntülenmesidir. PCR yöntemi klonlamaya gerek duymaksızın istenilen DNA yada RNA bölgesinin kısa süre içinde incelenmesini sağlayacak yaygın ve kolay bir tekniktir.

### 2.7.1 ANA PRENSİP

PCR bir in vitro replikasyonu yöntemidir. çoğaltılmak istenilen DNA dizisinin her iki ucuna uygun ve komplementer seçilen primerler ile kalıp DNA hedef alınarak sentez yapılır. Bu döngüde primer hibridizasyonu, DNA sentezi ve zincir ayrışması (denatürasyon) işlemleri birbirini izler ve bu döngüler istenen miktarda (20-35) tekrarlanır.

Çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin G+C içeriğine göre ilk denatürasyon 92-96 °C arasında seçilir. Bu yüksek ısı ortamında genomik DNA'daki çift ipliğin birbirinden ayrılması sağlanır. Her döngü başında tekrarlanacak olan denatürasyon ile çift iplikli yapının yeniden birbirinden ayrılması sağlanır. Denatürasyon aşamasından sonra hedef DNA'ya primerlerin bağlanması sağlanmalıdır. Bu, ısının düşürülmesi ile mümkündür. Isının ne olacağı da primerlerin baz içeriğine bağlıdır. Primerin baz kompozisyonuna göre bağlanma ısısı  $2(A+T)+4(C+G)=Tm$  formülü ile hesaplanabilir. Burada A=Adenin, T= Timin, C=Sitozin ve G=Guanin nükleotidlerinin sayısıdır. Primer bağlanması sağlanınca Taq polimeraz enzimi ortamdaki dNTP'leri kullanarak ve her 20 sn'de 500 baz ekleyerek, primerin bağlandığı yerden itibaren sentez yapar. Bu ısı değişimleri 20-35 döngü halinde tekrarlanır. Yani bir döngüde denatürasyon, primer bağlanma ve uzama aşamaları bulunur (1) .

PCR hazırlanacak ortamda, her türlü ekipmanın ve reaksiyonda kullanılacak kimyasalların steril ve bulaşmadan uzak olması dikkat edilmesi gereken çok önemli bir noktadır.

PCR yapılırken önce tüm gerekli bileşenleri içeren karışım çalışılacak örnek sayısı göz önünde bulundurularak hazırlanır. Örnek sayısından bir fazla olacak şekilde hesaplar yapılır (20).

- Taq polimeraz: 50µl'lik bir reaksiyonda ortalama gerekli miktar 0.5-2.5 U'dur.
- 10X enzime özgü reaksiyon tamponu:
  - 10-50mM Tris-HCl, pH 7.5-9.0
  - 6-50mM KCl ya da (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 1.5-5.0 mM MgCl<sub>2</sub>
- dNTP: dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'dir. Dört dNTP'nin konsantrasyonları eşit olmalıdır. Ortamdaki dNTP konsantrasyonu yükseldikçe ortamda daha fazla Mg +2 iyonunu bağlar. Mg +2 iyonu ise Taq polimerazın aktivitesi için gereklidir. Ortamdaki serbest Mg+2 iyonunun azalması Taq polimerazın aktivitesini etkiler. Her birinden yaklaşık 0.2mM kullanılır.
- Primer : Primer seçimi genellikle bilgisayar ortamında yapılır. İdeal bir primer saç tokası şeklinde ikincil yapı oluşturmamalı, AT/GC oranı dengeli olmalı, primer dimeri oluşmamalıdır (3' uçları komplementer olmamalıdır.). Primer konsantrasyonunun yüksek olması özgül olmayan bağlanmaya neden olur ve özgün ürün oluşmasına engel olur. Her birinden 0.1-1.0µM kullanılır.
- Kalıp DNA: DNA miktarının fazla olması ortamda yeterince çözünmesini engellediğinden, PCR reaksiyonunu da olumsuz etkiler. DNA miktarının az olması da az ürün oluşmasına neden olur. Bir reaksiyonda 10-200ng kullanılır.
- MgCl<sub>2</sub>: Mg+2 iyonu Taq polimerazın çalışması için gerekli iyonudur.

## 2.7.2 PCR'DA KONTAMİNASYON

Kontaminasyon kaynakları çalışma alanı, ekipman, pipetler, kimyasal ya da kalıp DNA olabilir.

Kontaminasyonun engellenmesi:

- 1) PCR yapılan yer, DNA izole edilen yer ve PCR ürünlerinin incelendiği bölgeler birbirlerinden ayrı tutulmalıdır.
- 2) PCR reaksiyonu için gerekli olan karışımın hazırlanması ve bunun tüplere dağıtılarak reaksiyona hazırlanma işlemleri mümkünse çeker ocak ve UV ışığı altında yapılmalıdır.
- 3) Kullanılacak olan tüm malzeme steril ya da otoklavlı olmalıdır.
- 4) PCR için gerekli tüm kimyasallar (dNTP, Taq polimeraz, MgCl<sub>2</sub>, primerler ve 10X tampon) mümkün olan en düşük volüme bölünerek saklanmalıdır. Mümkünse her tüp bir kere açıldıktan sonra atılmalıdır.

Negatif Kontrol: Kontaminasyon olup olmadığından emin olmak için her PCR reaksiyonunda bir tüpe PCR karışımı konulduğu halde DNA eklenmez. Bu tüp, diğer örneklerle beraber PCR makinesine konmalı ve amplifikasyon olup olmadığı kontrol edilmelidir. Eğer sonuç negatif ise kontaminasyondan şüphe edilmez.

Pozitif Kontrol: Her PCR reaksiyonu sırasında genotipi bilinmeyen örnekler dışında kolayca amplifiye olan ve genotipi bilinen bir DNA örneği pozitif kontrol olarak kullanılır. Bu hem PCR'ın çalışıp çalışmadığını anlamamıza yardımcı olur, hem de genotipleme sırasında kolaylık sağlar.

## 2.7.3 PCR'IN KULLANIM ALANLARI

- 1) Klonlama:
  - Genomik ve cDNA dizilerinin vektöre takılması yoluyla çoğaltılması
  - DNA dizilerinin oldukları gibi ya da restriksiyon tanıma bölgesi eklenerek çoğaltılması.
- 2) Bağlantı analizi:
  - Hastalık tanısında

- Adli amaçlı
- 3) Mutasyon analizi:
- Restriksiyon bölgesi oluşması veya kaybolmasını saptama
  - SSCP, DGGE, dizileme gibi metodlarla birleştirerek nokta mutasyonlarının saptanması
  - Delesyon/insersiyon amplifiye olan DNA bölgelerinin büyümesi, küçülmesi veya kaybı gibi değişikliklerin doğrudan incelenmesi
- 4) Dizileme:
- İncelenecek bölgenin işaretlenerek çoğaltılması
- 5) cDNA eldesi:
- Ters yönlü transkriptaz enziminin kullanılmasıyla mRNA'dan DNA eldesidir.

#### 2.7.4 ÇOĞALTILAN HEDEF DNA'NIN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE GÖSTERİLMESİ

PCR ile elde edilen son ürün Etidyum bromid içeren agaroz jelde elektroforeze tabi tutulur. Etidyum bromid DNA'ya bağlanarak UV ile floresans vermektedir (Transluminator-Fotodyne incorporated). Aynı jel içinde örneğe yakın bir yerde DNA boyut işaretleyicisi de elektroforeze sokulmaktadır. DNA boyut işaretleyicileri [(SM 0211, PBR 322 DNA/Alw441, (apa L1) IM val (BstN Marker 21)] faj DNA'ların restriksiyon enzimleri ile farklı uzunluklarda kesilmesi ile elde edilmişlerdir. Her parçanın baz sayısı bilinmektedir ve bunlar elektroforezde farklı mesafelere yürümektedirler. Baz sayısına göre agarozda farklı yerlerde bantlar oluşturmaktadırlar. Jel UV altına incelenmektedir. Örnekten elde edilen DNA bandı, kendi hizasındaki DNA bandı ile karşılaştırılır. Eğer bu bant amplifikasyonu hedeflenen DNA segmenti ile aynı büyüklükte ise özgül amplifikasyon sağlanmış demektir, aranan dizi mevcuttur (20).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 KAN ÖRNEKLERİ

Bu çalışmada Bizim-Lösemili Çocuklar Vakfı'nda allojeneik kemik iliği nakli yapılan 78 ( 49 erkek, 29 kız ) hastadan alınan EDTA 'lı kan örnekleri kullanılmıştır. Hastaların 32 'si AML, 16'sı Fanconi Aplastik anemisi, 8'i KML, 6'sı Aplastik anemi,6'sı Talasemi Major,4'ü ALL, 3'ü MDS, 1'i Orak Hücreli Anemi,1'i Hodgkin Hastalığı,1'i Adrenolökodistrofi tanısı ile takipte idi. Cinsiyet-uygunsuz kemik iliği nakli yapılan 49 hastanın periferik kan örneğinde kimerizm FISH yöntemiyle İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı FISH Laboratuvarında aynı cinsiyetten kemik iliği nakli yapılan 29 hastanın periferik kan örneğinde kimerizm PCR yöntemi ile İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Laboratuvarında çalışıldı.

#### 3.2 İSTATİKSEL YÖNTEM

Nakil sonrası kimerizm durumu ile hastanın prognozu arasındaki ilişki istatistiksel olarak  $X^2$ , Kaplan Meier survi ve log-rank testleri ile bilgisayar ortamında SPSS 8.0 programı kullanılarak değerlendirildi.

#### 3.3 ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR VE MALZEMELER

##### 3.3.1. FISH YÖNTEMİ

###### 3.3.1.1 Cihazlar

Şale

Lastik yapıştırıcısı

Lam

Lamel

Santrifüj (Heraeus)

Su banyosu (Memmert)

---

---

Etüv	(Heraeus)
Derin dondurucu (-20 °C)	(Arçelik)
Flouresan mikroskobu	(Leica, DMLS)
Buzdolabı	(Arçelik)
Sıcak Zemin	(Cytocell)
Otomatik Pipet Seti	(Eppendorf)

### 3.3.1.2 Kimyasal Maddeler

Sodyum Klorür (NaCl)	(Merck)
Potasyum Klorür (KCl)	(Merck)
Sodyum Hidrojen Fosfat ( Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	(Merck)
Potasyum Dihidrojen Fosfat ( KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	(Merck)
Distile su	
Formamid	(Merck)
Etanol	(Merck)
Glasiyal asetik asit	(Merck)
Tween 20	(Merck)
Sodyum Sitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	(Merck)
RNAaz	(Oncor)
Süt tozu	(Pınar)

### 3.3.1.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

#### 1. A )Standart Salin Sitrat ( 20x SSC (pH 7.0)

175,3 gr	NaCl
88,23 gr	NaSitrat (tri)
1000 ml	Distile su.

**B) 0.4 X SSC (Ph 7.5)**

20 ml	20 x SSC
980 ml	Distile su

**2. 10x PBS (pH 7.0) (1 litre için);**

NaCl 137 mM	8 gr
KCl 27 mM	2,01 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 80mM	11,36 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 15mM	2,04 gr
DH <sub>2</sub> O	1000 ml

**3. BSA (Bovin Serum Albumin)**

**4. Formamid**

%50 Formamid / 2x SSC pH:7,0 (500 ml)

250 ml	Formamid
50 ml	20x SSC
200 ml	Distile su

%55 Formamid / 2x SSC pH:7,0 (800 ml)

440 ml	Formamid
36 ml	20x SSC
324 ml	Distile su

%70 Formamid / 2x SSC pH:7.0 (80 ml)

56 ml	Formamid
8 ml	20xSSC
16 ml	Distile su

### 5. Süt Tozu

5 gr Süt tozu + 2x SSC 100 ml içinde eritildi

### 6. 4T (4x SSC/Tween 20) pH:7,0 (1000 ml) (X-kromozomu tesbiti için)

20 x SSC	200 ml
Tween 20	0,5 ml (Merck)
Distile su	795 ml

### 7. Fiksatif

3:1 Metanol / Glasiyal asetik asit

#### 3.3.1.4 Kullanılan problemler

##### 1. Prob ( $\alpha$ -satellite X-probu; (Oncor)

FITC-Avidin

Anti-avidin (Oncor kit'i içinde)

Avidin (Oncor kit'i içinde)

Pİ/antifade (Oncor kit'i içinde)

##### 2.CEPX/Y ( Spektrum Orange/Green, Sentromerik Prob X ve Y)

DAPI II ( Kit içinde)

### 3.3.1.5 X- kromozumu tesbiti için protokol

#### Preparat hazırlığı

Hastalardan alınan, periferik kandaki mononükleer hücreler ağırlık gradyeni santrifügasyon yöntemine göre izole edildi. RPMI 1640 ile yıkanan hücreler santrifüj ile ayrıldı. Süpernatant atıldıktan sonra resüspanse edilmek üzere hücrelerin üzerine hipotonik solüsyon olan KCL ilave edildi. Bu solüsyon içinde, patlatılan hücreler santrifüjle ayrıldı ve sonra taze hazırlanmış metanol-asetik asit karışımı ile fikse edildikten sonra temizlenmiş lam üzerine yayıldı.

#### Preparat ön yıkaması

1. Preperat 1X PBS solüsyonunda 30 dakika yıkandı
2. Her preperat için 1 µl RNAaz + 99µl 2X SSC karışımı hazırlanarak damlatıldı.
3. Üzeri "lamel" ile kapatıldı ve 1 saat 37 °C de inkübe edildi
4. 2x SSC solüsyonunda 3 defa 2 dakika yıkandı.
5. %70, %90, %96 alkol serilerinden geçirildi

#### Probe hazırlığı

1. Prob 37°C de 5 dakika ısıtıldı.
2. 13000 rpm'de 5-10 saniye santrifüj edildi.
3. Her bir preperat için, 0,5 µl prob + 9,5 µl hibridizasyon solüsyonu hazırlandı.
4. 70 °C de 5 dakika denatüre edildi.
5. + 4 °C de saklandı.

#### Preparat denatürasyonu

1. 70 °C'deki su banyosuna, %70 Formamid / 2 x SSC solüsyonu kondu.
2. Preperat 70°C'de 5 dakika denatüre edildi.
3. -20 °Cde alkol serilerinden (%70,%90 ve %100) geçirildi ve kurumaya bırakıldı.

## Hibridizasyon

1. Denature edilen prob'dan 10µl alınıp, preparat üzerinde hücrelerin yoğun olduğu bölgeye damlatıldı.
2. Üzeri 24x24 mm'lik lamelle kapatıldı.
3. Etrafı yapışkan ile mühürlendi
4. 37<sup>0</sup>C'de nemli ortam içinde, bütün gece 14-16 saat enkübe edildi.

## Posthibridizasyon

1. 37<sup>0</sup>C'den slaytlar alındı ve yapışkan kaldırıldı.
2. 42<sup>0</sup>C'deki su banyosu içinde, 3 ayrı %55 formamid solüsyonu kondu.
3. Preperatlar 5' er dakika, 3 kez bu solüsyonların içinden geçirildi
4. 37<sup>0</sup>C'deki 2x SSC solüsyonu içinden 3 kez 3 dakika geçirildi.  
Stok 2x SSC solüsyonuda 37<sup>0</sup>C'de bırakıldı.
5. Oda ısısında 4T içinde 3 dakika bekletildi.
6. Preperat kurumadan, herbirirne 100µl süt tozu solüsyonu damlatıldı, lamel ile kapatıldı ve 20-30 dakika 37<sup>0</sup>C'de nemli ortamda bırakıldı.
7. Oda ısısında 4T içinde 3 dakika bırakıldı.
8. Preperatlara 60 µl FITC (avidin) fluorescene labeled anti-digoxigenin (anti-digoxigenin FITC) damlatıldı, lamelle örtüldü ve 20 dakika 37<sup>0</sup>C'ye kaldırıldı.
9. Oda ısısında 4T içinde 3 dakika 3 kez yıkandı.
10. 60 µl anti-avidine (tavşan anti-koyun antikoru I) damlatılıp, lamelle kapatıldı ve 20 dakika 37<sup>0</sup>C'ye kaldırıldı.
11. Oda ısısında 4T ile 3 kez 3'er dakika yıkandı.
12. 60 µl avidine (fluoresan işaretli, tavşan antikoru II) damlatılıp, lamelle kapatıldı ve 20 dakika 37<sup>0</sup>C'ye kaldırıldı.
13. Oda ısısında 4T içinde 3'er dakika 3 kez yıkandı.
14. Preperatlar alkol (%70, %90 ve %100) serilerinden geçirildi.
15. 15µl PI/antifade damlatılıp, lamelle kapatıldı ve karanlıkta saklandı.
16. 15-20 dakika sonra fluoresan mikroskobunda preperatlar incelenebilir hale getirildi.

### 3.3.1.6 X ve Y Kromozom tesbiti için protokol (CEPX / Y)

Preperat hazırlığı ve preparat ön yıkaması X kromozomu tesbiti için bir önceki bölümde anlatılan şekildedir.

#### Probe hazırlığı

10µl prob 73 °C 'de 5 dakika denatüre edildi.

#### Preparat denatürasyonu

- 1.73 °C'deki su banyosuna, %70 Formamid / 2 x SSC solüsyonu kondu.
- 2.Preperat 73 °C 'de 5 dakika denatüre edildi.
3. Preparat oda ısısında(%70,%85,%100 lük etanolde 1 'er dakika yıkandı
4. 45- 50 °C lik hot plate üzerinde 2 dakika kurutuldu.

#### Hibridizasyon

1. Denature edilen prob'dan 10µl alınıp, preparat üzerinde hücrelerin yoğun olduğu bölgeye damlatıldı.
2. Üzeri 24x24 mm'lik lamelle kapatıldı
3. Etrafi yapışkan ile mühürlendi
4. 42°C'de nemli ortam içinde, bütün gece 14-16 saat enkübe edildi.

#### Posthibridizasyon

1. 0.4 x SSC solusyonunda 73 ° C'de 2 dakika yıkandı.
2. 4 T solüsyonunda 1 dakika yıkandı
3. Havada kurutuldu.
4. 10 µl DAPI II konularak lamelle kapatıldı karanlıkta saklandı
5. 15-20 dakika sonra fluoresan mikroskobunda preparatlar incelenebilir hale getirildi.

### 3.3.2 PCR YÖNTEMİ

#### 3.3.2.1 Cihazlar

Çeker ocak

Otoklav

Tartı

Soğutmalı Santrifüj

Otomatik Pipet Seti

Masa üstü santrifüj

Karıştırıcı

Ph metre

Buzdolabı

Derin Dondurucu

Sıcak su banyosu

Mikrodalga fırın

Jel tankı

PCR cihazı (Perkin-Elmer)

Bilgisayar

U-V

#### 3.3.2.2 Kimyasal Maddeler

Distile su (dH<sub>2</sub>O)

Amonyum Klorür ( NH<sub>4</sub> Cl)

Potasyum Bikarbonat (KH CO<sub>3</sub>)

Etilen diamin tetra asetik asit( EDTA veya Na<sub>2</sub>EDTA)

Tridroksimetilaminometan (Tris)

Taq Polimeraz ( Boehringer- Mannheim )

Amonyum Asetat (  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ;  $\text{NH}_4\text{COO}^-$  )  
Sodyum dodesil sülfat (SDS)  
Asetik asit (  $\text{CH}_3\text{COOH}$  )  
Etil Alkol (  $\text{Eth.OH}$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$  )  
Etidyum Bromid  
Sodyum Hidroksit (  $\text{NaOH}$  )  
Hidroklorik Asit (HCl)  
Hidrojen Peroksit (  $\text{H}_2\text{O}_2$  )  
Sodyum Hipoklorit ( Çamaşır suyu,  $\text{Na ClO}$  )

### 3.3.2.3 Sarf Malzemeleri

500 ml veya 1000 ml 'lik otoklavlanabilir cam şişeler  
Otoklav bandı  
Steril plastik enjektör (10 veya 20 ml'lik)  
Enjektör Filtresi  
50 ml'lik falkon tüpler  
Beyaz,sarı ve mavi pipet uçları ( DNA z/ RNAz free ,otoklavlanmış)  
1.5 ml'lik eppendorf tüp (( DNA z/ RNAz free ,otoklavlanmış)  
Parafilm  
Pamuk  
Kurutma kağıdı  
Kağıt havlu

### 3.3.2.4 Çözeltiler

#### Eritrosit parçalama çözeltisi ( Lysis Buffer ;LB) ( pH 7.4 , 25 ° C )

4.74 gr NH<sub>4</sub>Cl

1 gr KHCO<sub>3</sub>

0.0372 gr Na<sub>2</sub>EDTA

tartılarak 1 litrelik şişeye alındı. Üzerine yaklaşık 900 ml distile su eklendi.

Çözündürülüp pH 7.4 olacak şekilde HCl katılarak ayarlandı. Hacim 1 itreye distile su ile tamamlandı. Otoklavlanarak steril hale getirildi.

#### Lökosit parçalama çözeltisi ( White Blood Cell Lysis Buffer ; WBL)

NaCl 4 M

Na<sub>2</sub>EDTA 0.5 M

400 ml çözelti için,

2.34 gr Na Cl

3.722 gr ( Na<sub>2</sub>EDTA)

tartıldı .500 ml lik kaba koyuldu. Üzeri 400 ml'ye kadar distile su ile tamamlandı, çözündürüldü .Çözelti otoklavlanarak sterilize edildi,oda sıcaklığında saklandı.

#### Amonyum asetat çözeltisi ( NH<sub>4</sub>Ac)

NH<sub>4</sub>Ac ; 9.5 M Taze olarak hazırlanır. Toksikdir ve otoklavlanmaz. Filtreden geçirilerek sterilize edilir. +4 °C de buzdolabında saklanır.

100 ml çözelti için

73.226 gr NH<sub>4</sub>Ac tartıldı. Üzeri 100 ml distile suya tamamlandı.

#### %10 SDS (Sodyum dodesil sülfat ) çözeltisi

10 gr SDS çift distile ve steril H<sub>2</sub>O ile çözündürülür. 100 ml'ye tamamlanır. Filtre edilerek sterilize edilir.

### TE Çözeltisi ( pH 8.0, 25 °C)

Tris 100 mM

Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM

20 ml TE çözeltisi için

0.02422 gr Tris,

0.007444 gr Na<sub>2</sub>EDTA

tartıldı. 15 ml'ye distile su ile tamamlandı .pH 8.0'a ayarlandı. Hacim 20 ml'ye distile su ile tamamlandı. Filtreden geçirilerek sterilize edildi.

### 3.3.2.5 Kullanılan VNTR alelleri ( Genomed Ltd)

#### APOB (Apolipoprotein B)

Apolipoprotein geni 42 kb.uzunluğunda ve 2.kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. Apolipoprotein B geninin 3'ucunda AT zengin VNTR bölgesi bulunmaktadır. 30 bç ya da birbirini izleyen iki 15 bç. Uzunluğunda 12 alele sahiptir Alelik ürünlerin boyları 570-900 bç arasındadır.

#### Primer dizesi;

5' AT gAA Acg gAg AAA TTA Tg 3'  
5' CCT TCT CAC TTg gCA AAT AC 3'

10 pg-100 ng DNA

#### D1S80 LOKUSU

1.kromozom üzerinde bulunan bir VNTR lokusudur. 16 bç.lik tekrarlardan oluşan 15 alel tespit edilmiştir. Alelik ürünlerin boyları 430-750 bç.arasındadır.

**Primer dizisi;**

5' gAA ACT ggC CTC CAA ACA CTg CCC gCC g 3'

5' gTC TTg TTg gAg ATg CAC gTg CCC CTT gC 3'

**PAH**

12 . kromozom üzerinde 2-60 nükleotid uzunluğunda ve bu lokusdaki allelerin tekrar sayısı 2 ile 40 bç arasında değişebilir.

**Primer dizisi;**

5' gCT TgA AAC TTg AAA gTT gC 3'

5' ggA ACC TTA AgA ATC CCA TC 3'

**3.3.2.6 Periferik kan'dan DNA izolasyonu**

1. Periferik kan 10 ml falkon tüpüne aktarıldı üzerine 1:3 oranında lizis tampon (30 ml) eklendi, +4 derecede 15 dk. Rotorda çevrildi.
2. Rotor'dan alınan örnekler, +4 derecede 10 dk, 1500 rpm'de santrifuj edildi.
3. Süpernatant atıldı. Pelet tamamen süspanse edildi. Üzerine 15-20 ml Lysis buffer eklenerek +4 derecede 10 dk, 1500 rpm, de santrifuj edildi.
4. Süpernatant atıldı. Pelet tamamen süspanse edildi. Eğer deneye devam edilmeyecek ise bu aşamada örnekler -70 derecede uzun süre saklanabilir. Çalışmaya devam ediliyorsa süspanse olmuş örneğe %10'luk SDS'ten 500 µl, 50 µl proteinaz K ve 9.4 ml WBL eklenerek 56 derecede bir gece inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası her bir mililitre solüsyon başına 0.37 ml 9.5 M NH<sub>4</sub>Ac. eklendi (10 ml örnek için 3.7 ml 9.5M NH<sub>4</sub>Ac). İyice karıştırıldıktan sonra oda ısısında, 25 dk, 3000 rpm'de santrifuj edilerek proteinler çöktürüldü.
6. Çöken kısmın yerinden oynatılmamasına dikkat ederek süpernatant temiz bir Falkon tüpe aktarıldı.
7. Süpernatant'ın üzerine 1:2 oranında olacak şekilde %99'luk absölü alkol eklenerek DNA'nın çökmesi sağlandı. DNA tüpün yukarısına ulaşana kadar beklendi.

8. Yüzeyle ulaşan DNA, mikropipet ucu ile avlanarak 5 ml, %70'lik alkol içinde yıkandı.
9. Çıkartılan DNA'nın büyüklüğü oranında Eppendorf tüplere TE tampon eklendi ve DNA Eppendorf tüpe aktarıldı. 1 saat 56 derecede sıcak zeminde, ya da oda ısısında bir gece bekletilerek DNA tamamen solüsyona geçirildi.
10. Tamamen solüsyona geçen DNA +4 derecede saklandı.

### 3.3.2.7 PCR reaksiyonu için

#### 100 µl lik reaksiyon için

1. dH <sub>2</sub> O ( Dnaz- RNAz yoksun)	71 µl x
2.10 x PCR Tampon	10 µl x
3.dNTP (200 µM her bir nukleotidden)	8 µl x
4.Mg Cl <sub>2</sub> ( 5 mM)	6 µl x
5. Primer F (10 pmol)	2 µl x
6.Primer R ( 10 pmol )	2 µl x
7. Taq polimeraz ( MBI)	1 x

Yukarıdaki reaktifler karıştırılıp her bir PCR tüpüne 49 µl dağıtıldı. Karışım üzerine 200 ng /µl DNA örneğinden eklendi. Aşağıdaki PCR cihazı ısı koşulları her bir bölge için uygulandı.

### 3.3.2.8 PCR ısı koşulları

#### APOB (Apolipoprotein B)

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µg her primerden

200 µM her dNTP'den

1.25 U Taq polimeraz

10 pg-100 ng DNA

94 °C 1 dakika, 60 °C 6 dakika , 32 döngü olacak şekilde

#### D1S80 LOKUSU

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µM her primerden

200 µM her dNTP'den

2.5 U Taq polimeraz

10 pg-100 ng DNA

95°C 1 dakika, 65°C 1 dakika , 70°C 8 dak, 30 döngü olacak şekilde

#### PAH (Fenil Alanin Hidroksilaz)

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µM her primerden

200 µM her dNTP'den

2.5 U Taq polimeraz

10 pg-100 ng DNA

94°C de 1 dakika, 55°C de 1 dakika , 72°C de 8 dakika , 35 döngü olacak şekilde çoğaltıldı.

PAH, D1S80, Apo-B lokuslarının amplifikasyonundan sonra 20 µl örnek hacimi %2 lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu.

### 3.3.2.9 Agaroz jelin hazırlanması

1. 1 gram agaroz aliminyum folyo ya da temiz bir kağıt üzerinde tartılıp dereceli kaba kondu. TAE (Tris Asetik asit EDTA) tamponu ile 50 ml'ye tamamlandı.
2. Mikrodalga fırın içinde karışım kaynatıldı.
3. Agarozun tamamen eridiğine emin olunduktan sonra karışım çeker ocak içerisinde manyetik karıştırıcı üzerine konularak 40<sup>0</sup> C 'ye kadar soğutuldu.
4. Çeker ocak içerisinde soğuyan karışıma etidyum bromid solumsyonu eklendi. ( Etidyum bromid DNA ve RNA'ya bağlanarak UV altında parlak floresan ışımaya yapan bir boyadır.)
5. İyice karıştırılan agaroz çözeltisi jel kabına döküldü ve tamamen donması beklendi.
6. Jel tankındaki tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı. DNA yüklenecek olan kuyular negatif kutba yakın olacak şekilde tankın içerisine yerleştirildi. Kuyular kontrol edildi, içlerinde jel parçaları ya da herhangi bir partikül varsa uzaklaştırıldı.
7. Bir parça parafilm kesilerek masaya kondu. Üzerine her örnek için 1:6 oranında gliserollü yükleme tamponu ( LB ) eklendi.
8. Tüm örnekler yüklendikten sonra ( KİT öncesi alıcı, verici ve KİT sonrası alıcı ) tankın kapağı kapatıldı ve elektrik yönü negatiften pozitif olacak şekilde akım uygulanmaya başlandı ( Kuyuların olduğu taraf her zaman negatiftir).
9. Örnekler uygun çözünürlüğe ulaşana kadar jel içerisinde yürütüldü ve agaroz jel elektroforezi tamamlandı.
10. UV altında örneklerin genotiplenmeleri yapıldı.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda allojeneik kemik iliği nakli uygulanan 78 çocukta kimerizm tayin edilmiştir. FISH yöntemi ile cinsiyet farklılığı olan 49 (%62.8) hasta ve PCR yöntemi kullanılarak DNA VNTR gen polimorfizmleri ile cinsiyet farklılığı olmayan 29 (%37.2) hastada kemik iliği nakli sonrası kimerizm periferik kanda incelenmiştir. İki grupta cins, yaş, hastalık, hazırlık rejimi açısından fark yoktur. Hastaların takip süresi ortalama  $76.71 \pm 6.2$  aydır. Çalışmaya alınan hastaların özellikleri tablo 16' da gösterilmiştir.

**TABLO 16 : Kimerizm tayini yapılan hasta grubunun özellikleri**

Hasta Karakteristikleri	n	%
<b>HASTA</b>	78	100
<b>FISH</b>	49	62.8
<b>PCR</b>	29	37.2
<b>Cins(K/E), Yaş</b>	29 /49      9.4 $\pm$ 3.2 yıl	37.2 / 62.8
<b><u>Hastalıklar</u></b>		
AML	32	41
FAA	16	20
KML	8	10
SAA	6	8
ALL	4	5
MDS	3	4
T.Major	6	8
Hodgkin Hastalığı	1	1.3
Adrenolökodistrofi	1	1.3
Orak Hücreli Anemi	1	1.3
<b><u>Hazırlık Rejimi</u></b>		
Kemoterapi	61	78.2
TBI içeren rejim	17	21.8
<b><u>GvHH</u></b>	22	28.2
<b><u>Kimerizm</u></b>		
Tam Kimerizm (CC)	47	60
Miks Kimerizm (MC)	31	40
<b><u>Verici /Alıcı Cins</u></b>		
Kız- Erkek	32	41
Erkek- Kız	17	21.8
Kız- Kız	11	14.1
Erkek - Erkek	18	23.1
<b><u>Relaps</u></b>	21	26.9
<b><u>Sağ Kalım</u></b>	55	71

- Hastaların kullanılan yöntemlere göre özellikleri ise tablo 17 de gösterilmiştir.

**TABLO 17 : Kimerizm tayini yapılan hastaların kullanılan tekniklere göre özellikleri**

Parametreler	FISH n:49	PCR n :29
<b>Cins (K / E)</b>	18 / 31	11 / 18
<b>Yaş (yıl)</b>	12.1 $\pm$ 3.4	9.51 $\pm$ 4.02
<b>Hastalık</b>		
AML	18	14
FAA	12	4
KML	3	5
SAA	5	1
ALL	3	1
MDS	2	1
Thalassemi Major	5	1
Orak Hücreli Anemi	-	1
Hodgkin	1	-
ALD	-	1
<b>Hazırlık Rejimi</b>		
Kemoterapi	37	24
TBI içeren rejim	12	5
<b>GvHH</b>	16(%28.5)	6(%17)
<b>Kimerizm Durumu</b>		
Miks Kimerizm (MC)	25	6
Tam Kimerizm (CC)	24	23
<b>Relaps</b>	10	11
<b>Sağ Kalım</b>	34 (%69)	21 (%72)
<b>Takip Süresi</b>	77.69 $\pm$ 7.4 ay	75.82 $\pm$ 8.8 ay

- Tablo 18 de her iki yöntem ile tam kimerizm ya da miks kimerizm saptanan olguların özellikleri yer almıştır.

**TABLO 18 :Kimerizm Tayini sonucuna göre tam kimerizm ve miks kimerizm saptanan hastaların özellikleri**

<b>Parametreler</b>	<b>Tam Kimerizm n:47</b>	<b>Miks Kimerizm n :31</b>
<b>FISH</b>	24	25
<b>PCR</b>	23	6
<b>Cins (K / E)</b>	21 /26	7 / 24
<b>Yaş (yıl)</b>	10.7 + 2.3	8.6 + 3.7
<b>Hastalık</b>		
AML	15	17
FAA	10	6
KML	8	0
SAA	5	1
ALL	1	3
MDS	3	0
Thalassemi Major	4	3
Orak Hücreli Anemi	0	1
Hodgkin	0	1
ALD	1	0
<b>Hazırlık Rejimi</b>		
<b>Kemoterapi</b>	40	27
<b>TBI içeren rejim</b>	7	4
<b>GvHH</b>	20	2
<b>Relaps</b>	7	14
<b>Sağ Kalım</b>	%72	%68
<b>Takip Süresi</b>	78.12 + 6.1	76.5 + 4.2

Tablo 19 ve 20 'de yöntemlere göre kimerizm tayin edilen vakaların tüm özellikleri gösterilmiştir.

**Tablo 19 : FISH analizi ile kimerizm tayin edilen grup**

Sıra No	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Hastalık	Hazırlık rejimi	Cins Verici	GvHH Evre	Kimerizm	Kimerizm <3 ay % donör	Kimerizm >3ay % donör	Relaps	Sonuç	Sağ Kalm ay
1	E.I	12	K	SAA	Bu-Cy-TLI	E	Yok	CC	93	99	Yok	Yaşiyor	109
2	Ş.P	14	K	AML	Bu-Cy	E	IV	CC	98	-	Yok	Ex	2
3	M.T	14	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	CC	100	60	Var	Ex	6
4	S.T	10	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	70	63	Yok	Yaşiyor	69
5	S.Ç	5	K	AML	Bu-Cy	E	Yok	MC	70	80	Var	Yaşiyor	74
6	D.Ç	9	K	KML	Cy-TBI	E	Yok	CC	98	68	Var	Ex	36
7	E.B	6	K	SAA	Bu-Cy-TLI	E	Yok	CC	98	96	Yok	Yaşiyor	62
8	B.Ç	9	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	87	99	Var	Yaşiyor	64
9	Ş.T	7	E	FAA	Bu-Cy	K	III	CC	98	100	Yok	Yaşiyor	91
10	A.D	2	K	Th.M	Bu-Cy	E	Yok	CC	97	96	Yok	Yaşiyor	57
11	S.A	16	K	SAA	Bu Cy	E	II	CC	96	-	Yok	Ex	3
12	Y.K	7	E	FAA	Bu-Cy-ATG	K	II	MC	82	88	Yok	Yaşiyor	48
13	E.Y	5	E	Th.M	Bu-Cy	K	Yok	MC	75	otolog	Var	Yaşiyor	58
14	A.Ö	5	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	89	91	Yok	Yaşiyor	54
15	R.K	16	E	ALL	Cy-VP-16TBI	K	Yok	MC	85	92	Yok	Yaşiyor	53
16	E.G	9	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	80	96	Yok	Yaşiyor	52
17	S.Ş	9	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	89	85	Var	Ex	6
18	N.Y	7	E	FAA	Bu-Cy-ATG	K	Yok	MC	88	94	Yok	Yaşiyor	48
19	M.K	19	E	ALL	CyVP16 TBI	K	Yok	CC	95	97	Yok	Yaşiyor	48
20	U.O	16	K	AML	Bu-Cy	E	II/Yaygın	CC	95	98	Yok	Ex	13
21	A.M.E	9	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	MC	92	94	Var	Ex	8
22	U.T	2	E	Hodgkin	BEAM	K	Yok	MC	86	72	Var	Ex	6
23	H.B	9	K	FAA	Bu-Cy-ATG	E	Yok	MC	54	otolog -	Var	Ex	2
24	R.Ç	9	E	KML	Bu-Cy	K	III	CC	97	-	Yok	Ex	2
25	C.S	2	E	SAA	Bu-Cy	K	Yok	CC	93	97	Yok	Yaşiyor	40
26	M.A.K	16	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	93	-	Yok	Ex	4
27	S.Ş	14	K	KML	Bu-Cy	E	Yok	CC	84	97	Yok	Yaşiyor	40
28	G.E	5	K	FAA	Bu-Cy	E	III	CC	98	-	Yok	Ex	38
29	F.K	16	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	92	94	Yok	Yaşiyor	38
30	T.Ç	4	E	Th.M	Bu-Cy-ATG	K	II	CC	94	100	yok	Yaşiyor	36
31	K.P	14	K	FAA	Bu-Cy	E	Yok	MC	87	63	Yok	Yaşiyor	83
32	Z.A	8	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	82	78	Var	Ex	6
33	N.K	8	K	AML	Bu-Cy	E	Yok	MC	91	63	Var	Ex	6
34	S.B	5	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	76	95	Yok	Yaşiyor	34
35	O.D	7	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	MC	84	90	Yok	Yaşiyor	31
36	G.B	8	K	ALL	BuVP16-TBI	E	Yok	MC	96	92	Yok	Yaşiyor	29
37	E.I	9	E	FAA	Bu-Cy	K	Yok	MC	95	94	Yok	Yaşiyor	84
38	A.S	8	E	FAA	Bu-Cy-ATG	K	Yok	CC	97	100	Yok	Yaşiyor	24
39	F.A	7	E	FAA	Bu-Cy-ATG	K	II/Yaygın	CC	98	97	Yok	Ex	23
40	H.B.G	8	K	MDS	Bu-Cy-Melp	E	II	CC	98	98	Yok	Yaşiyor	23
41	U.D	9	E	Th.M	Bu-Cy-ATG	K	II	CC	96	98	Yok	Yaşiyor	24
42	H.Ö	10	E	MDS	Bu-Cy-Melp	K	Yok	CC	98	98	Yok	Yaşiyor	22
43	V.B	8	K	FAA	Bu-Cy-ATG	E	Yok	MC	96	96	Yok	Yaşiyor	12
44	Z.Ö	10	K	Th.M	Bu-Cy-ATG	E	Yok	MC	65	65	Yok	Yaşiyor	13
45	N.C	10	E	FAA	Bu-Cy	K	/Limitli	CC	98	100	Yok	Yaşiyor	12
46	S.A	14	E	AML	Bu-Cy	K	Yok	CC	99	99	Yok	Yaşiyor	8
47	O.Y	7	E	FAA	Bu-Cy-ATG	K	II	CC	98	98	Yok	yaşiyor	7
48	B.S	16	E	SAA	Bu-Cy-ATG	K	Yok	MC	76	78	Yok	Yaşiyor	6
49	G.E	9	E	AML	Bu-Cy	K	II	CC	98	-	Yok	Yaşiyor	3

**Tablo 20 : PCR analizi ile kimerizm tayin edilen grup**

Sıra No	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Hastalık	Hazırlık rejimi	Cins Verici	GvHH Evre A/K	Kimerizm < 3 ay	Kimerizm > 3ay	Relaps	Sonuç	Sağ Kalım ay
1	O.K	4	E	AML	Bu-Cy-	E	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	113
2	M.Y	4	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	CC	CC	Var	Yaşıyor	102
3	F.M	10	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	MC	MC	Var	Ex	8
4	B.T	4	K	AML	Bu-Cy	K	II/Sınırlı	CC	CC	Yok	Yaşıyor	92
5	S.A	11	K	AML	Bu-Cy	K	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	91
6	E.Ş	18	E	KML	Bu-Cy	E	III	CC	CC	Var	Ex	13
7	M.B	12	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	66
8	M.Ç	12	E	KML	Bu-Cy-	E	Yok	CC	CC	yok	Yaşıyor	66
9	F.K	10	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	63
10	İ.U	14	E	ALL	BuVP16 TBI	E	Yok	CC	MC	Yok	Yaşıyor	61
11	Y.E.G	9	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	CC	MC	Var	Yaşıyor	60
12	H.Ö	9	K	AML	Bu-Cy	K	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	58
13	A.M.E	7	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	CC	CC	Var	Ex	8
14	A.K	6	K	AML	Bu-Cy	K	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	47
15	G.K	17	E	MDS	Bu-Cy-Melp	E	II/Yaygın	CC	-	Yok	Ex	3
16	Ö.D	8	K	KML	Bu-Cy-	K	Yok	CC	CC	Var	Ex	36
17	T.A	17	E	AML	Bu-Cy-	E	II/Yaygın	CC	MC	Var	Ex	4
18	N.K	8	K	AML	Bu-Cy-	K	Yok	CC	MC	Var	Ex	8
19	E.E	12	K	KML	Bu-Cy-	K	Yok	CC	Otolog	Var	Yaşıyor	30
20	S.G	10	E	AML	Bu-Cy-	E	Yok	CC	-	Yok	Yaşıyor	8
21	B.Y	6	K	FAA	Bu-Cy-ATG	K	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	11
22	H.B	6	E	FAA	Bu-Cy-ATG	E	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	25
23	B.Ç	5	E	OHA	Bu-Cy	E	Yok	MC	Otolog	Var	Yaşıyor	61
24	E.D	7	E	ALD	Bu-Cy	E	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	12
25	G.G	12	K	Th.M	Bu-Cy-ATG	K	Yok	CC	CC	Yok	yaşıyor	37
26	Z.S	9	K	FAA	Bu-Cy-ATG	K	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	66
27	S.D	14	E	SAA	Bu-Cy	E	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	99
28	E.B	8	K	FAA	Bu-Cy	K	II	CC	CC	Yok	Ex	12
29	M.E	12	E	KML	Bu-Cy	E	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	6

- Hastalık grubuna göre hastaların özellikleri malign hastalıklar için tabo 21 ve 22 'de yer almıştır.

**Tablo 21 : Malign hastalıklar grubu / FISH**

Hasta No	Sıra No	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Hastalık	Hazırlık rejimi	GvHH Evre	Kimerizm	Kimerizm < 3 ay % donör	Kimerizm >3ay % donör	Relaps	Sonuç	Sağ Kalım ay
2	1.	Ş.P	14	K	AML	Bu-Cy	IV	CC	98	-	Yok	Ex	2
3	2.	M.T	14	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	100	60	Var	Ex	6
4	3.	S.T	10	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	70	63	Yok	Yaşıyor	69
5	4.	S.Ç	5	K	AML	Bu-Cy	Yok	MC	70	80	Var	Yaşıyor	74
6	5.	D.Ç	9	K	KML	Cy-TBI	Yok	CC	98	68	Var	Ex	36
8	6.	B.Ç	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	87	99	Var	Yaşıyor	64
14	7.	A.Ö	5	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	89	91	Yok	Yaşıyor	54
15	8.	R.K	16	E	ALL	Cy-VP-16TBI	Yok	MC	85	92	Yok	Yaşıyor	53
16	9.	E.G	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	80	96	Yok	Yaşıyor	52
17	10.	S.Ş	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	89	85	Var	Ex	6
19	11.	M.K	19	E	ALL	CyVP16 TBI	Yok	CC	95	97	Yok	Yaşıyor	48
20	12.	U.O	16	K	AML	Bu-Cy	II/Yaygın	CC	95	98	Yok	Ex	13
21	13.	A.M.E	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	92	94	Var	Ex	8
22	14.	U.T	2	E	Hodgkin	BEAM	Yok	MC	86	72	Var	Ex	6
24	15.	R.Ç	9	E	KML	Bu-Cy	III	CC	97	-	Yok	Ex	2
26	16.	M.A.K	16	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	93	-	Yok	Ex	4
27	17.	S.Ş	14	K	KML	Bu-Cy	Yok	CC	84	97	Yok	Yaşıyor	40
29	18.	F.K	16	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	92	94	Yok	Yaşıyor	38
32	19.	Z.A	8	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	82	78	Var	Ex	6
33	20.	N.K	8	K	AML	Bu-Cy	Yok	MC	91	63	Var	Ex	6
34	21.	S.B	5	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	76	95	Yok	Yaşıyor	34
35	22.	O.D	7	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	84	90	Yok	Yaşıyor	31
36	23.	G.B	8	K	ALL	BuVP16 TBI	Yok	MC	96	92	Yok	Yaşıyor	29
40	24.	H.B.G	8	K	MDS	Bu-Cy-Melp	II	CC	98	98	Yok	Yaşıyor	23
42	25.	H.Ö	10	E	MDS	Bu-Cy-Melp	Yok	CC	98	98	Yok	Yaşıyor	22
49	26.	G.E	9	E	AML	Bu-Cy	II	CC	98	-	Yok	Yaşıyor	3

**Tablo 22 : Malign hastalık grubu / PCR**

Hasta No	Sıra No	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Hastalık	Hazırlık rejimi	GvHH Evre A/K	Kimerizm < 3 ay	Kimerizm > 3ay	Relaps	Sonuç	Sağ Kalım ay
1	27	O.K	4	E	AML	Bu-Cy-	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	113
2	28	M.Y	4	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Var	Yaşıyor	102
3	29	F.M	10	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	MC	Var	Ex	8
4	30	B.T	4	K	AML	Bu-Cy	II/Sımrılı	CC	CC	Yok	Yaşıyor	92
5	31	S.A	11	K	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	91
6	32	E.Ş	18	E	KML	Bu-Cy	III	CC	CC	Var	Ex	13
7	33	M.B	12	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	66
8	34	M.Ç	12	E	KML	Bu-Cy-	Yok	CC	CC	yok	Yaşıyor	66
9	35	F.K	10	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	63
10	36	İ.U	14	E	ALL	BuVP16 TBI	Yok	CC	MC	Yok	Yaşıyor	61
11	37	Y.E.G	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	MC	Var	Yaşıyor	60
12	38	H.Ö	9	K	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	58
13	39	A.M.E	7	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Var	Ex	8
14	40	A.K	6	K	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	47
15	41	G.K	17	E	MDS	Bu-Cy-Melp	II/Yaygın	CC	-	Yok	Ex	3
16	42	Ö.D	8	K	KML	Bu-Cy-	Yok	CC	CC	Var	Ex	36
17	43	T.A	17	E	AML	Bu-Cy-	II/Yaygın	CC	MC	Var	Ex	4
18	44	N.K	8	K	AML	Bu-Cy-	Yok	CC	MC	Var	Ex	8
19	45	E.E	12	K	KML	Bu-Cy-	Yok	CC	Otolog	Var	Yaşıyor	30
20	46	S.G	10	E	AML	Bu-Cy-	Yok	Non info.	-	Yok	Yaşıyor	8
29	47	M.E	12	E	KML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	6

- Tablo 23 ve 24 de tam kimerizm gelişen hastaların FISH ve PCR sonuçlarına göre detayları sunulmuştur..

**Tablo 23 : FISH analizi ile kimerizm tayin edilen grup / tam kimerizm**

Hasta No	Sıra No	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Hastalık	Hazırlık rejimi	GvHH Evre	Kimerizm	Kimerizm < 3 ay % donör	Kimerizm > 3ay% donör	Relaps	Sonuç	Sağ Kalım ay
1	1	E.I	12	K	SAA	Bu-Cy-TLI	Yok	CC	93	99	Yok	Yaşiyor	109
2	2	Ş.P	14	K	AML	Bu-Cy	IV	CC	98	-	Yok	Ex	2
3	3	M.T	14	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	100	60	Var	Ex	6
6	4	D.Ç	9	K	KML	Cy-TBI	Yok	CC	98	68	Var	Ex	36
7	5	E.B	6	K	SAA	Bu-Cy-TLI	Yok	CC	98	96	Yok	Yaşiyor	62
9	6	Ş.T	7	E	FAA	Bu-Cy	III	CC	98	100	Yok	Yaşiyor	91
10	7	A.D	2	K	Th.M	Bu-Cy	Yok	CC	97	96	Yok	Yaşiyor	57
11	8	S.A	16	K	SAA	Bu-Cy	II	CC	96	-	Yok	Ex	3
19	9	M.K	19	E	ALL	CyVP16 TBI	Yok	CC	95	97	Yok	Yaşiyor	48
20	10	U.O	16	K	AML	Bu-Cy	II/Yaygın	CC	95	98	Yok	Ex	13
24	11	R.Ç	9	E	KML	Bu-Cy	III	CC	97	-	Yok	Ex	2
25	12	C.S	2	E	SAA	Bu-Cy	Yok	CC	93	97	Yok	Yaşiyor	40
27	13	S.Ş	14	K	KML	Bu-Cy	Yok	CC	84	97	Yok	Yaşiyor	40
28	14	G.E	5	K	FAA	Bu-Cy	III	CC	98	-	Yok	Ex	38
30	15	T.Ç	4	E	Th.M	Bu-Cy-ATG	II	CC	94	100	yok	Yaşiyor	36
38	16	A.S	8	E	FAA	Bu-Cy-ATG	Yok	CC	97	100	Yok	Yaşiyor	24
39	17	F.A	7	E	FAA	Bu-Cy-ATG	II/Yaygın	CC	98	97	Yok	Ex	23
40	18	H.B.G	8	K	MDS	Bu-Cy-Melp	II	CC	98	98	Yok	Yaşiyor	23
41	19	U.D	9	E	Th.M	Bu-Cy-ATG	II	CC	96	98	Yok	Yaşiyor	24
42	20	H.Ö	10	E	MDS	Bu-Cy-Melp	Yok	CC	98	98	Yok	Yaşiyor	22
45	21	N.C	10	E	FAA	Bu-Cy	/Limitli	CC	98	100	Yok	Yaşiyor	12
46	22	S.A	14	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	99	99	Yok	Yaşiyor	8
47	23	O.Y	7	E	FAA	Bu-Cy-ATG	II	CC	98	98	Yok	yaşiyor	7
49	24	G.E	9	E	AML	Bu-Cy	II	CC	98	-	Yok	Yaşiyor	3

**Tablo 24 : PCR analizi ile kimerizm tayin edilen grup / tam kimerizm**

Hasta No	Sıra No	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Hastalık	Hazırlık rejimi	GvHH Evre A/K	Kimerizm < 3 ay	Kimerizm > 3ay	Relaps	Sonuç	Sağ Kalım ay
1	25.	O.K	4	E	AML	BuCy-	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	113
2	26.	M.Y	4	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Var	Yaşıyor	102
4	27.	B.T	4	K	AML	Bu-Cy	II/Sımrılı	CC	CC	Yok	Yaşıyor	92
5	28.	S.A	11	K	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	91
6	29.	E.Ş	18	E	KML	Bu-Cy	III	CC	CC	Var	Ex	13
7	30.	M.B	12	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	66
8	31.	M.Ç	12	E	KML	Bu-Cy-	Yok	CC	CC	yok	Yaşıyor	66
9	32.	F.K	10	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	63
12	33.	H.Ö	9	K	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	58
13	34.	A.M.E	7	E	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Var	Ex	8
14	35.	A.K	6	K	AML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	47
15	36.	G.K	17	E	MDS	Bu-Cy Melp	II/Yaygın	CC	-	Yok	Ex	3
16	37.	Ö.D	8	K	KML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Var	Ex	36
19	38.	E.E	12	K	KML	Bu-Cy	Yok	CC	Otolog	Var	Yaşıyor	30
20	39.	S.G	10	E	AML	Bu-Cy	Yok	Non_inf or matif	-	Yok	Yaşıyor	8
21	40.	B.Y	6	K	FAA	BuCy-ATG	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	11
22	41.	H.B	6	E	FAA	Bu-Cy-ATG	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	25
24	42.	E.D	7	E	ALD	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	12
25	43.	G.G	12	K	Th.M	BuCy-ATG	Yok	CC	CC	Yok	yaşıyor	37
26	44.	Z.S	9	K	FAA	BuCy-ATG	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	66
27	45.	S.D	14	E	SAA	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	99
28	46.	E.B	8	K	FAA	Bu-Cy	II	CC	CC	Yok	Ex	12
29	47.	M.E	12	E	KML	Bu-Cy	Yok	CC	CC	Yok	Yaşıyor	6

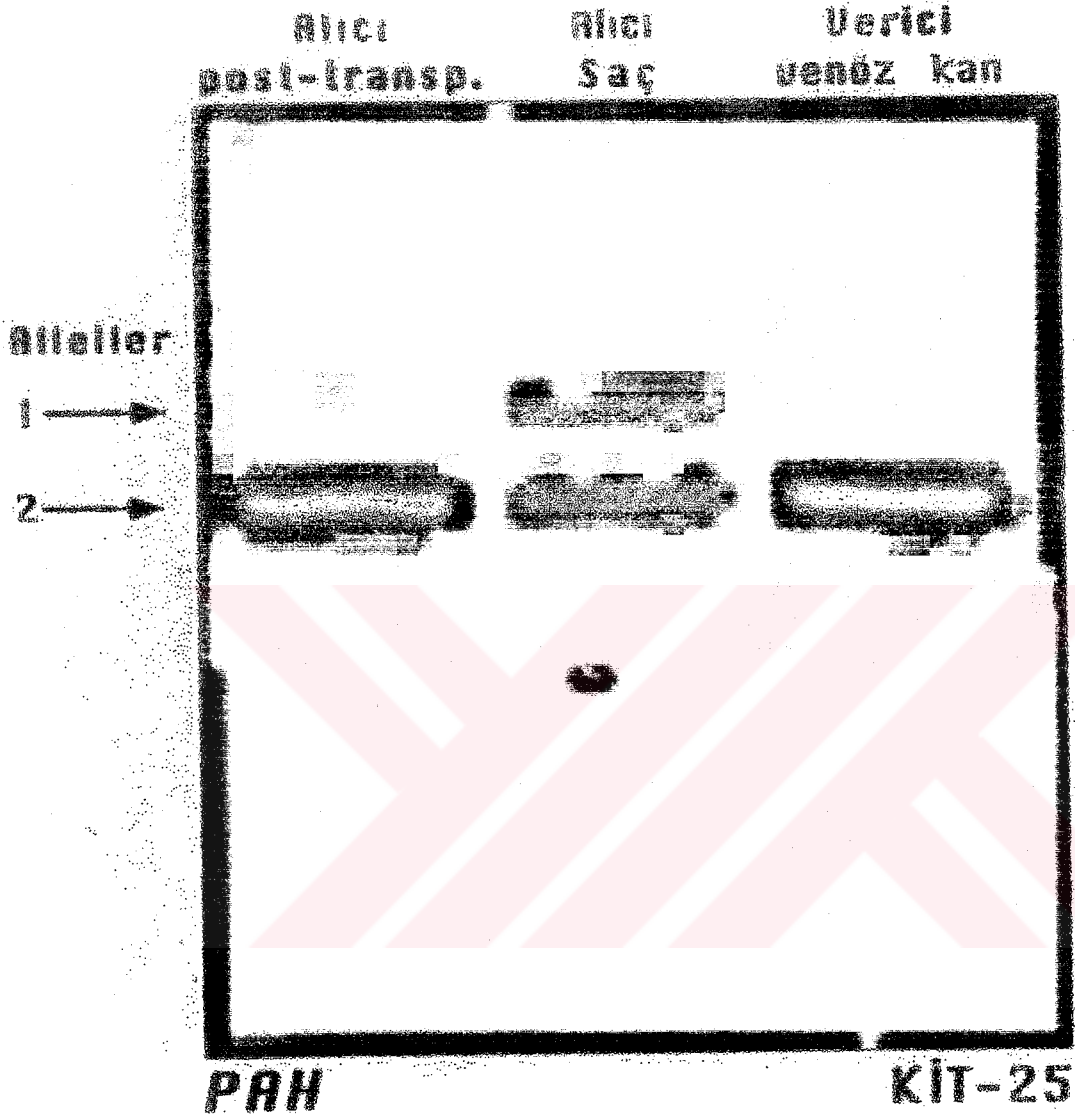
- Miks kimerizm gözlenen hastaların tayin yöntemine göre özellikleri tablo 25 ve 26'da yer almıştır.

**Tablo 25: FISH analizi ile kimerizm tayin edilen grup / miks kimerizm**

Hasta No	Sıra No	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Hastalık	Hazırlık rejimi	GvHH Evre	Kimerizm	Kimerizm < 3 ay % donör	Kimerizm > 3ay% donör	Relaps	Sonuç	Sağ Kalım ay
4	1.	S.T	10	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	70	63	Yok	Yaşiyor	69
5	2.	S.Ç	5	K	AML	Bu-Cy	Yok	MC	70	80	Var	Yaşiyor	74
8	3.	B.Ç	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	87	99	Var	Yaşiyor	64
12	4.	Y.K	7	E	FAA	Bu-Cy-ATG	II	MC	82	88	Yok	Yaşiyor	48
13	5.	E.Y	5	E	Th.M	Bu-Cy	Yok	MC	75	otolog	Var	Yaşiyor	58
14	6.	A.Ö	5	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	89	91	Yok	Yaşiyor	54
15	7.	R.K	16	E	ALL	Cy-VP-16TBI	Yok	MC	85	92	Yok	Yaşiyor	53
16	8.	E.G	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	80	96	Yok	Yaşiyor	52
17	9.	S,Ş	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	89	85	Var	Ex	6
18	10	N.Y	7	E	FAA	Bu-Cy-ATG	Yok	MC	88	94	Yok	Yaşiyor	48
21	11	A.M.E	9	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	92	94	Var	Ex	8
22	12	U.T	2	E	Hodgkin	BEAM	Yok	MC	86	72	Var	Ex	6
23	13	HB	9	K	FAA	Bu-Cy-ATG	Yok	MC	54	otolog -	Var	Ex	2
26	14	M.A.K	16	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	93	-	Yok	Ex	4
29	15	F.K	16	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	92	94	Yok	Yaşiyor	38
31	16	K.P	14	K	FAA	Bu-Cy	Yok	MC	87	63	Yok	Yaşiyor	83
32	17	Z.A	8	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	82	78	Var	Ex	6
33	18	N.K	8	K	AML	Bu-Cy	Yok	MC	91	63	Var	Ex	6
34	19	S.B	5	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	76	95	Yok	Yaşiyor	34
35	20	O.D	7	E	AML	Bu-Cy	Yok	MC	84	90	Yok	Yaşiyor	31
36	21	G.B	8	K	ALL	BuVP16 TBI	Yok	MC	96	92	Yok	Yaşiyor	29
37	22	E.I	9	E	FAA	Bu-Cy	Yok	MC	95	94	Yok	Yaşiyor	84
43	23	V.B	8	K	FAA	Bu-Cy-ATG	Yok	MC	96	96	Yok	Yaşiyor	12
44	24	Z.Ö	10	K	Th.M	Bu-Cy-ATG	Yok	MC	65	65	Yok	Yaşiyor	13
48	25	B.S	16	E	SAA	Bu-Cy-ATG	Yok	MC	76	78	Yok	Yaşiyor	6

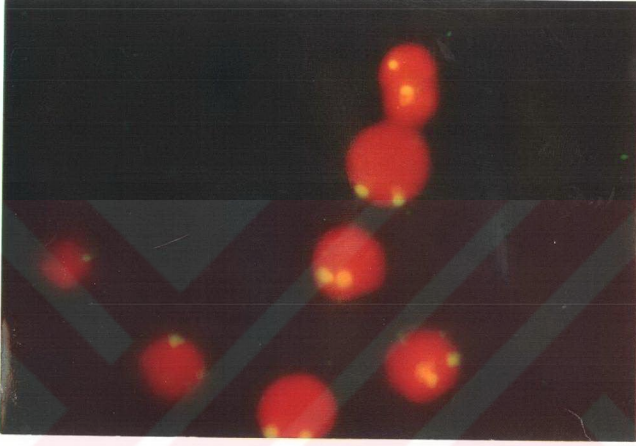
**Tablo 26 : PCR analizi ile kimerizm tayin edilen grup mik s kimerizm**

Sıra No	Adı Soyadı	Yaş	Cins	Hastalık	Hazırlık rejimi	Cins Verici	GvHH Evre A/K	Kimerizm < 3 ay	Kimerizm > 3ay	Relaps	Sonuç	Sağ Kalım ay
3	F.M	10	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	MC	MC	Var	Ex	8
10	İ.U	14	E	ALL	BuVP16 TBI	E	Yok	CC	MC	Yok	Yaşıyor	61
11	Y.E.G	9	E	AML	Bu-Cy	E	Yok	CC	MC	Var	Yaşıyor	60
17	T.A	17	E	AML	Bu-Cy-	E	II/ Yaygın	CC	MC	Var	Ex	4
18	N.K	8	K	AML	Bu-Cy-	K	Yok	CC	MC	Var	Ex	8
23	B.Ç	5	E	OHA	Bu-Cy	E	Yok	MC	Otolog	Var	Yaşıyor	61



Şekil 2 : PCR ile VNTR analizlerinden PAH aleli kullanarak tesbit edilen bir tam kimerizm vakası

Şekil 2 de görüldüğü gibi transplantasyon sonrası alıcı ile verici PAH lokusu açısından aynıdır.



**Şekil 3 : FISH yöntemi ile X'e özgü prob kullanılarak bir erkek olguda nakil sonrası gösterilen bir tam kimerizm durumu**

Nakil sonrası tüm hücrelerde 2 sinyal (XX) gözlenmektedir.



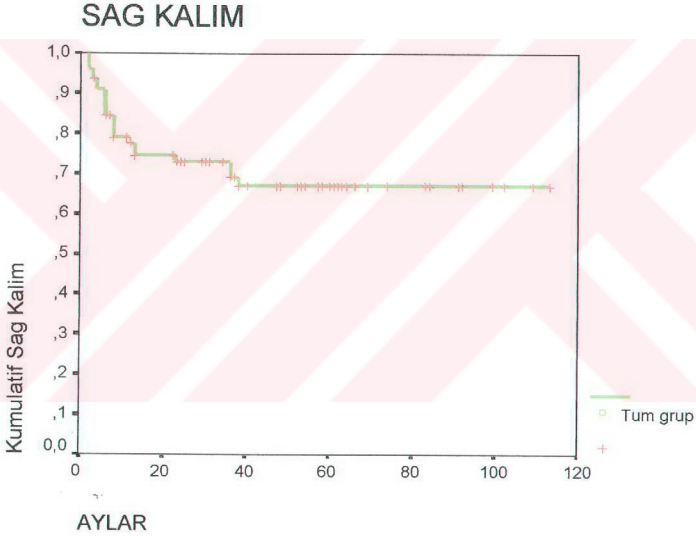
**Şekil 4 : FISH yöntemi ile X ve Y'e özgü prob kullanılarak bir kız olguda gösterilen tam kimerizm X= turuncu Y = yeşil**

Şekil 4 'de sırasıyla X/Y'e uygun prob kullanılarak yapılan kız olguda FISH çalışmalarında tam kimerizm tesbit edilmiştir.

- FISH analizinde %97 ve üzeri donör hücresi bulunması **tam kimerizm**, %97 den az bulunması **miks kimerizm** olarak değerlendirilmiştir.
- PCR analizinde nakil öncesi informatif bulunan DNA polimorfik gen bölgesinin donör orijinli hale dönüşmesi **tam kimerizm**, donör ve alıcı gen polimorfizmlerinin birlikte bulunuşu ise **miks kimerizm** olarak adlandırılmıştır
- (Kimerizm tayinleri nakil sonrası 3 aydan önce, 3.ayda, 1.yılda ve gereğinde daha sık yapılmıştır.
- Hastaların 29'u kız (%35.9), 49 u (%64.1) erkektir. Yirmisekiz kız hastada 18'inde kimerizm analizi FISH ile 11'i PCR ile incelenmiştir. 49 erkek çocuğun kimerizm analizi 31 inde FISH ile, 18 inde PCR ile incelenmiştir.Hastaların yaş ortalaması 9.5 +4.02, median 9 dur.
- FISH yöntemi ile kimerizm tayini yapılan 49 hastanın 32 si (%65) kız vericiden erkek vericiye, 17 si (% 35) erkek vericiden kız vericiyedir.
- PCR ile analiz yapılan hastaların 11'i (%38) kızdan kıza, 18'i (%62) erkekten erkeğedir.
- Çalışmamamızda yer alan 78 hastanın 48'i ( %61.5) altta yatan hastalığı malin, 30'u (%38.5) ise malin olmayan hastalıktır.(Tablo13,14)
- Hastaların 52 sinde ( % 66.7) Bu-Cy hazırlık rejimi, 17 sinde (%21.8) TBI/TLI içeren rejim, 9'unda (%11.5) ise ATG ve diğer kemoterapötik içeren rejimler kullanılmıştır.
- .Çalışmada yer alan hastaların herhangi bir analizde tam kimerizm 47 (%60.3) hastada saptanırken 31 hastada (%39.7) miks kimerizm saptanmıştır.
- PCR ile tam kimerizm saptanan 23 hastadan 5 'inde (%22) relaps saptanmış ve hastaların 3'ü kaybedilmiştir.
- PCR ile miks kimerizm saptanan 6 hastanın 5'inde (%83) relaps saptanmış ve 3 hasta kaybedilmiştir. Miks kimerizm saptanan sadece 1 hasta relaps yapmamıştır. Bu hasta ALL tanısı ile yakından takip edilmektedir.
- FISH ile miks kimerizm saptanan 25 hastanın 9'unda (%36) relaps saptanırken tam kimerizm gözlenen 24 hastanın 2'sinde (%8) relaps gelişmiş ve hastalar kaybedilmiştir. İlk analizden itibaren miks kimerizm gözlenen ve relaps saptanan 9 hastanın ise 6'sı ise kaybedilmiştir. 1 hasta ise thalassemik

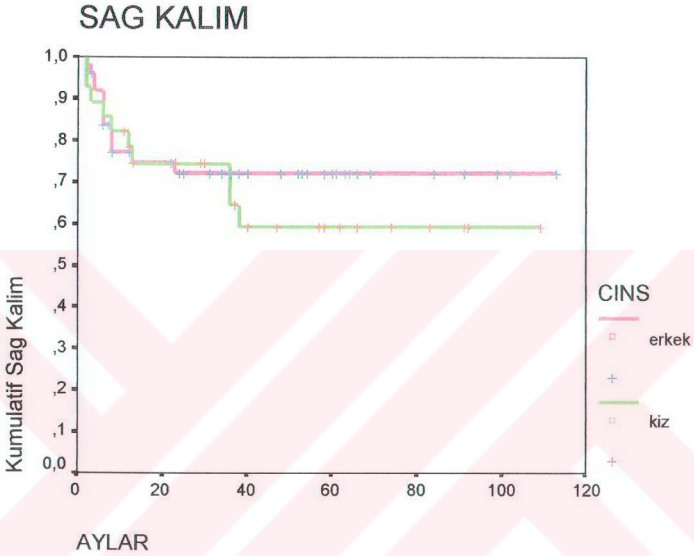
rekonstitüsyon ile yaşamını sürdürmektedir. Relaps gözlenen bu hastalara DLI + kemoterapi uygulanmış ve 2'si hastaliksız olarak yaşamlarını ortalama 60.ayda sürdürmektedir.

- GvHH gözlenme oranı tüm hasta grubunda %28.2 (n : 22) dur.
- Tüm çalışma grubunda kaybedilen hasta sayısı %29.5 (n : 23) tür.
- Analiz yapılan 78 hastadan 3'ünde otolog rekonstitüsyon gözlenmiştir. Hastalar yaşamlarını sürdürmektedir.
- Tüm hasta grubumuzda hastaliksız sağ kalım %67.7 (5 yıllık) bulunmuştur (Grafik1).



**Grafik 1 :Tüm çalışma grubunda sağ kalım (5 yıllık)**

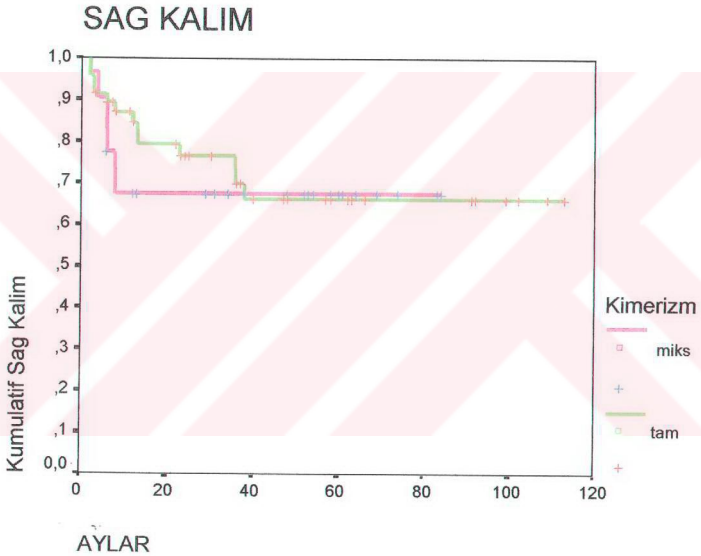
- Cins ile kimerizm gelişme tipi geliştirme arasındaki ilişkiye bakıldığında : Kızların %71'inde tam kimerizm saptanırken, erkeklerin %54'ünde tam kimerizm gözlenmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0.131$ ).



**Grafik 2 : Tüm grupta erkekler ile kızlar arasında sağ kalım**

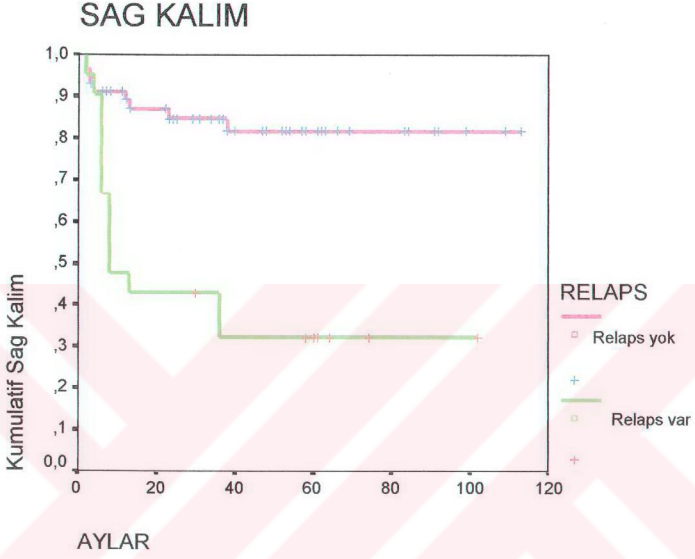
- Cins ile sağkalım arasında ilişki araştırıldığında kızların %64.3 'ü yaşarken erkeklerin %74'ü sağdır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır ( $p=0.367$ ). (Grafik 2).Cins ile relaps arasında da ilişki saptanmamıştır. Kızların %25'inde relaps gözlenirken, erkeklerin %28 'inde relaps gözlenmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır ( $p=0.774$ ).

- Çalışma sonucu tam kimerizm gözlenen hastaların sağ kalımı 78 ay ortalama takipte %72 iken, miks kimerizm gelişen hastalarda ortalama 76 aylık takipte % 68 olarak bulunmuştur. İstatiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p= 0.2$ ) (Grafik 3).



**Grafik 3 : Tam kimerizm gelişen hastalar ile miks kimerizm gelişen hastalarda sağ kalım**

- Tüm çalışma grubunda relaps gelişen 21/78 hastanın %25'i sağ ve sağlıklı iken, relaps yapmayan 57 hastanın %82'si yaşamaktadır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0.0297$ )(Grafik 4).

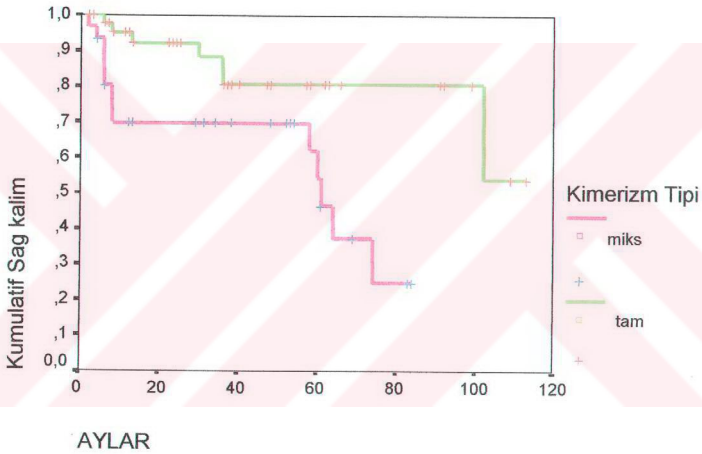


**Grafik 4 : Relaps gelişen hastalar ile relaps gelişmeyen hastalarda sağ kalım**

- Tam kimerizm saptanan 47 hastanın 7 sinde (%14.9) relaps gözlenirken miks kimerizm gözlenen 31 hastanın 14'ünde (%45.2) sinde relaps gözlenmiştir. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.003). Relaps saptanan hastaların %33.3'ünü tam kimerizmliler oluştururken, %66.6'yı miks kimerizmliler oluşturmektedir. Tam kimerizmlilerde relaps sonrası sağ kalım %24 iken miks kimerizmlilerde %55 olarak bulunmuştur (Grafik 5). Aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır (p = 0.711).

## RELAPS SONRASI

### SAG KALIM

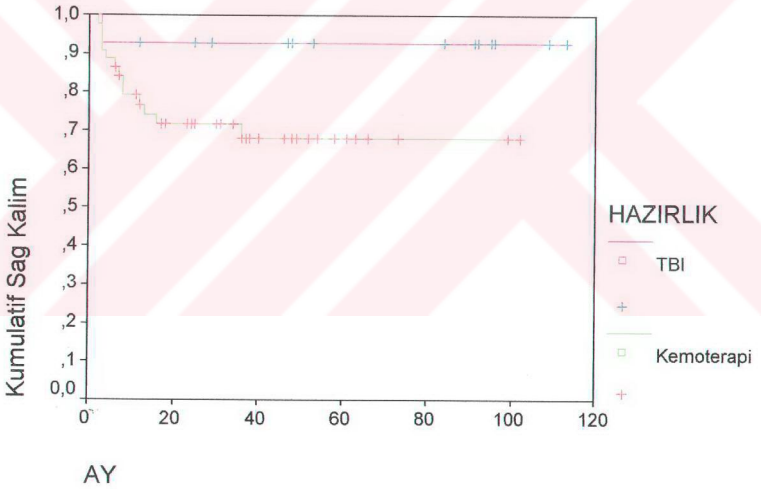


**Grafik 5 : Tam kimerizm saptanan hastalar ile miks kimerizm saptanan hastalarda relaps sonrası sağ kalım**

- Kemik iliği nakli öncesi uygulanan hazırlık rejimine göre değerlendirildiğinde TBI içeren rejimlerin kemoterapi içeren rejimlere oranla tam kimerizm geliştirmesinde daha avantajlı olduğu gözlemlendi ( $p= 0.056$ ). Sağ kalım yönünden incelendiğinde TBI alan hastaların %92'si yaşarken, yalnızca kemoterapi alan hastaların % 67'si yaşamaktadır(5 yıllık).Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Grafik 6) ( $p=.047$ ).

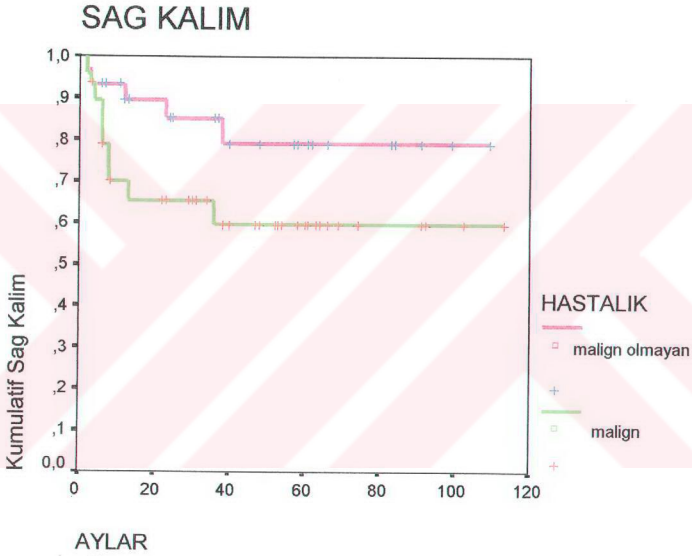
## SAG KALIM

### Tam Kimerizm



**Grafik 6 : Hazırlık rejimine göre tam kimerizm gelişenlerde sağ kalım**

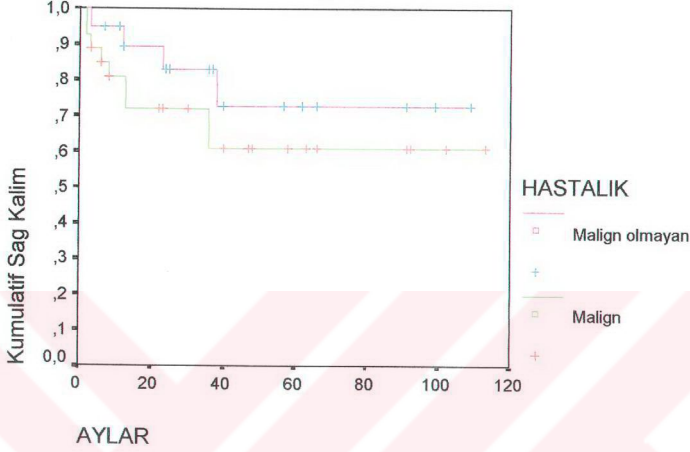
- Altta yatan hastalık ile kimerizm geliştirme tipi arasında ilişki anlamsız bulunmuştur ( $p=0.360$ ) Malign hastalık grubunun %56.3'ü tam kimerizm geliştirirken malign olmayan grupta bu oran %66.7 dir.
- Hastalık ve sağ kalım arasındaki ilişkiye bakıldığında malign hastalık grubunun (n:48) %62.5'i yaşarken, malign olmayan grubun %83.3'ü yaşamaktadır. Kaybedilen hastaların %21.7'si malign olmayan grupta, %78.3'ü ise malign gruptadır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0.05$ ) (Grafik 7).



**Grafik 7 : Hastalık grubuna göre sağ kalım**

## SAG KALIM

### Tam Kimerizm

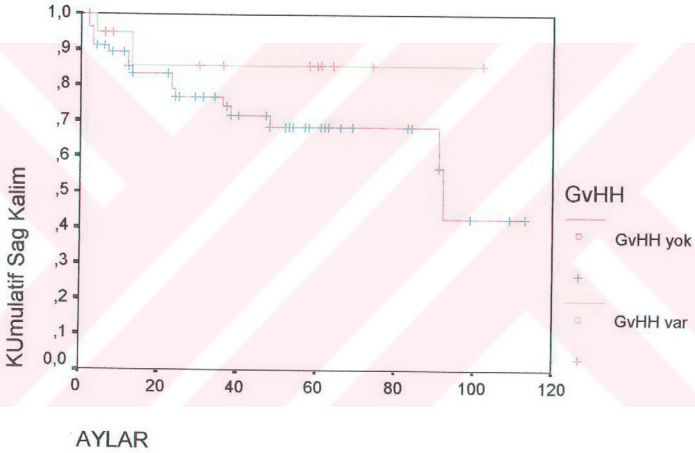


**Grafik 8 : Tam kimerizm gelişen hastalarda hastalık grubuna göre sağ kalım**

- Tam kimerizm saptanan hastalarda hastalık grubuna göre sağ kalım arasında fark yoktur (Grafik 8).
- GvHH gelişmesi sağkalım üzerine etkilidir ( $p= 0.011$ ). GvHH gözlenmeyen hastaların %22'si kaybedilmiş, GvHH gözlenenlerin ise %52.6'sı kaybedilmiştir
- Relaps gelişen 21 hastanın 19'unda GvHH (%90.5) yok iken, 2 hastada (%9.5) relaps saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamsız olarak bulunmuş, fakat GvHH'nin relapstan koruma yönünde anlamlı bir eğilim saptanmıştır ( $p=0.064$ ).

- GvHH ile relaps arasındaki ilişki araştırıldığında, GvHH olan sadece 2 kişide (%10.5) relaps gelişmişken, GvHH olan 20 kişide (%89.5) hastada relaps saptanmamıştır. Relaps gelişen hastalarda GvHH var ise sağ kalım %85 iken, GvHH yok ise sağ kalım %45 tir ( Grafik 9). Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

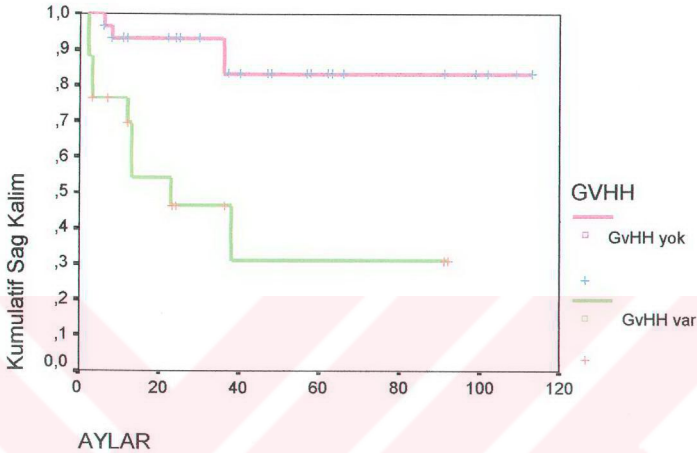
## RELAPS GELİSEN HASTALARDA SAG KALIM



**Grafik 9 :GvHH etkisi : Relaps olup ta GvHH olanların relaps olmayarak GvHH olması arasındaki etkileşim**

## SAG KALIM

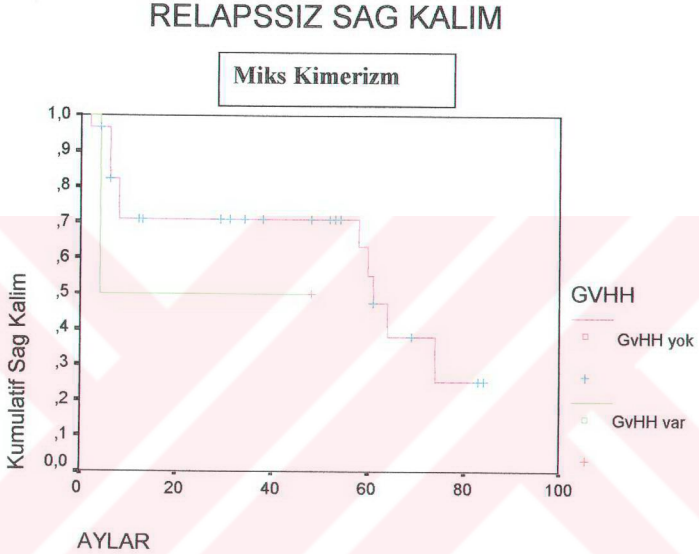
### Tam Kimerizm



**Grafik 10 : Tam kimerizm gelişen hastalarda GvHH varlığı ya da yokluğuna göre sağ kalım**

- Tam kimerizm gelişen hastalarda GvHH 20 / 47 (%42.5) oranında gözlenmiş ve %64 GvHH dan kayıp vardır. Tam kimerizm gelişen fakat GvHH (Akut veya kronik) gözlenmeyen 27 / 47 (%57.5) hastada ise sağ kalım %88 bulunmuştur. Fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p= 0.0716$ ) (Grafik 10) .
- Tam kimerizm gelişen hastalarda GvHH görülme oranı % 42.5 iken miks kimerizm gelişenlerde %39.7 dir. GvHH gözlenmeyen hastaların %93.5'i miks kimerizimli hastalardır. GvHH kimerizm arasındaki ilişki anlamlıdır ( $p=0.003$ ).

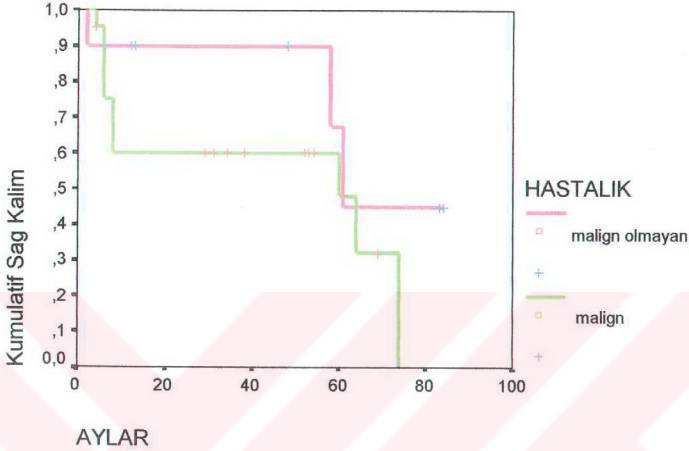
- Relaps gelişen miks kimerizimli hastalarda eğer GvHH var ise sağ kalm % 50 iken, GvHH yok ise sağ kalm %25 tir (Grafik 11).



**Grafik 11 : Miks kimerizm gözlenen hastalarda GvHH olanlar ile olmayanların sağ kalımları**

## RELAPSSIZ SAĞ KALIM

### Miks Kimerizm

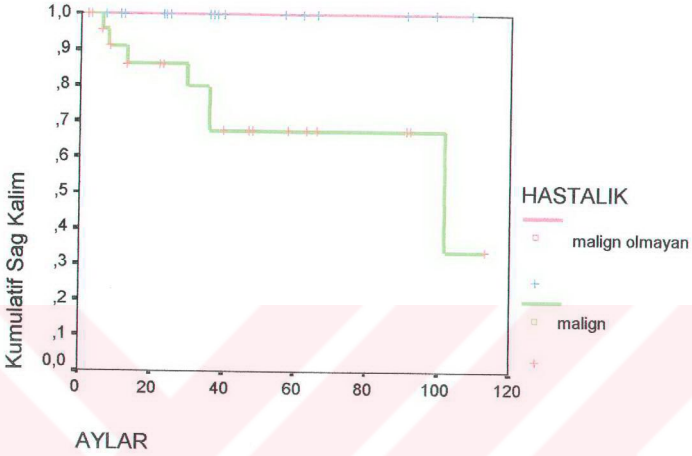


**Grafik 12 :Miks kimerizm gözlenen hastalarda malign hastalık ya da non-malign oluşuna göre sağ kalım**

- Hastalık ve relaps arası ilişkiye bakıldığında relaps gelişen 21 hastanın 3'ü (%14.3) malign olmayan grupta 18'i (%85.7) si malign gruptadır. Malign hastalıkların %37.5'inde relaps saptanmıştır.
- Miks kimerizm gözlenen hastalarda malign olmayan grupta sağ kalım %47 iken malign grupta %0 dır. Miks kimerizm gözlenen hastalar non-malign grupta ise relaps yapmadan yaşama şansı varken malign hastalık grubu relaps yapmaktadır (Grafik 12). Aradaki fark anlamlıdır ( $p=0.008$ ).

## RELAPSSIZ SAG KALIM

### Tam Kimerizm



**Grafik 13 : Tam kimerizm elişen hastalarda hastalık grubun göre relapsız sağ kalım**

- Tam kimerizm gelişen malign olmayan gruptaki hastalarda relaps gözlenmezken, malign grupta relaps gözlenmektedir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Grafik 13).

## 5. TARTIŞMA

Hematopoetik yamanmanın değerlendirilmesinde eritrosit antijen fenotiplenmesi, immunglobulin allotiplenmesi, sitogenetik analiz, FISH, RFLP, PCR teknikleri gibi çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Ripaldi ve arkadaşları, transplantasyon sonrası miks kimerizm sıklığının, uygulanan sitogenetik analizin duyarlılığına bağlı olarak değiştiğini göstermişler ve sitogenetik analizin sadece çok sayıda bölünen hücreler üzerinde uygulanabilmesinden dolayı çok duyarlı olmadığını da bildirmişlerdir (91). KİT sonrası kimerizm değerlendirilmesinde DNA tiplemesi geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Çoğu DNA tiplendirilme işlemleri, allojenik kimerizmi DNA uzunluk polimorfizmleri ya da VNTR lokusu ya da Y-kromozomu spesifik DNA problemlerini kimerizmi değerlendirmede kullanılmaktadır (79,118). Bu metodların değişik duyarlılıkları vardır (5). Miks hematopoetik kimerizm %2.5 - 97.5 arası donör orijinli hücrenin alıcıda bulunmasıdır (5,78). Biz de çalışmamızda bu oranı kullandık.

FISH yöntemi, oldukça kısa bir sürede KİT sonrası minimal rezidüel hastalığın, relaps ve kimerizmin saptanmasında kullanılan bir yöntemdir (3,57, 86). Örneğin, Lian ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, FISH'in relaps tanısında, klasik G-bantlama yöntemine göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir (61). Bir başka çalışmada ise, John Anastasi ve arkadaşları, minimal residuel hastalığı tespit etmek için, KİT yapılmış ALL hastaların interfaz hücrelerinde, FISH ve sitogenetik analiz yöntemlerini kıyaslayarak 1000 interfaz hücresinden 16'sında minimal residuel hastalık tespit etmişler ve bunların hiçbirini sitogenetik analizde saptayamadıklarını bildirmişlerdir (3). KML'li hastanın hücre örneklerinde Ph-kromozomu pozitif hücrelerin oranı tespit edilerek, minimal residüel hastalık saptanabilmekte yine FISH yöntemi ile residüel lösemik hücreler araştırılabilmektedir (39,56,65). FISH, erken relapsı tespit etmede de kullanılabilir. Örneğin ALL'li hastanın kemik iliği analiz edilerek, bu hastada hastalığın tekrarını düşündüren küçük sayıdaki lösemik hücreler, relaps tanısı koydurabilmektedir (105). Ayrıca KİT sonrası hastanın periferik kanında ya da kemik iliğinde, vericinin sağlam hücresi mi, yoksa alıcının hastalık hücresi mi çoğalmakta olduğu, yine FISH yöntemi ile tespit edilebilmektedir. FISH yöntemi ile akut promyelositik lösemi hastalarda, residüel lösemik hücrelerin tespiti, yani potansiyel

relaps tespiti, Bader ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur (11). M.Suthorp ve arkadaşları, farklı cinsten KİT yapılmış olan hastalarda “Y” probu kullanılarak PCR tekniği ile alıcı ve verici hücre popülasyonlarının incelenmesinin, relaps saptanmasında oldukça yararlı olduğunu bildirmişlerdir (104). FISH ile X ve Y problemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda allojenik kemik iliği naklinden en erken 24 saat sonra donör nötrofillerine rastlanmıştır ve 48 saat sonra anlamlı artış gözlenmiştir. Ortalama 96 saat sonra donör nötrofilleri %90 oranındadır. Bu lenfositlerin büyük oranı alıcı orijindir. Transplant sonrası +5.günden itibaren donör lenfosit sayıları anlamlı derecede artmaya başlar ve tam kimerizm yakın bir oranda myeloid ve lenfoid seri +10 ile +25.günler arasında gelişir. HLA uygun aile bireyi nakillerinden sonra myeloid ve lenfoid yamanmada bifazik görünüm vardır (4). PCR kullanılarak Frankel ve arkadaşları allojenik periferik kök hücre alıcılarında 9-14 günler arasında, kemik iliği alıcılarında ise 14-16.günler arasında tam donör kimerizmi saptadılar (36). Tam kimerizm gelişmesini takiben 3 gün içinde lökosit sayısında artış gözlemlendi. Ramirez ve arkadaşları KİT sonrası +7.günden başlayarak XY kromozom problemleri ile FISH ve CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, CD<sub>8</sub>, CD<sub>20</sub>, CD<sub>34</sub> ve CD<sub>10</sub><sup>+</sup> hücrelerin aynı anda immunfenotipik analizleri ile T hücre popülasyonlarında ve myelomonositik hücre popülasyonda miks kimerizm saptadılar . KİT sonrası +14-18.günler arasında T hücrelerinde miks kimerizm %36’dan %18 ve monositik hücrelerde %16 dan %7’ ye düştü. 21.günden sonra stabil donör kimerizmi gözlenirken 100 gün sonrasında alıcı hücre oranı %1’lere düştüğünü saptadılar (87).

Kantitatif nonisotipik metodlar (VNTR ve STR işaretleyicileri) ile 7/32 miks kimerizm saptandı ve miks kimerizm relapsı belirlemede önemli bulundu (69). Kantitatif ölçüm alıcı ile verici arasında değişen genetik işaretleyicilere dayanır. FISH X ve Y kromozomuna spesifik problemleri ile tüm çoğalan ya da dinlenen hücreleri inceler. PCR’a dayalı incelemelerde mini ya da mikrosatellit belirleyicileri ile kimerizm incelenebilir. Malign hastalıklarda tümöre özgü işaretler de kimerizm tayininde alıcı hücrelerin varlığını belirtmeleri açısından önemlidir. Transplant sonrası kimerizmi değişik hücre popülasyonlarında incelemek klinikle ilişkili prognoz belirlemede yararlıdır (5). Buna karşın FISH ile yapılan başka bir çalışmada ise lösemili hastaların bir grubunda alıcı hücrelerin varlığı tahmin edilen aksine yaşam açısından avantajlı olarak değerlendirildi (105). Moleküler teknoloji kullanılarak yapılan ilk kimerizm

çalışmalarından birinde flow sitometri ve PCR ile VNTR amplifikasyonları kullanarak 46 alıcının 30'unda tam kimerizm, 14'ünde sabit miks kimerizm ve bunların 9'unda geçici T lenfosit kimerizmi saptanmışlardır. İki alıcıda kimerizm analizi bilgi verici bulunmamıştır. Bu çalışmada alıcı kaynaklı hemapoez, alıcının yaşı, hazırlık rejimi ve GvHH için CSA kullanımı ile ilişkili bulundu. Stabil miks kimerizm ve ısrar edici alıcı kaynaklı hematopoezde lösemiden sağkalım arasında ilişki saptanamadı ve yazarlar yaşam için tüm kemik iliğinin yamanmasının gereksiz olduğunu vurguladılar (19).

Bizim çalışmamızda kimerizm analizi için FISH ve PCR kullanıldı. FISH ile 49 hastanın 25'inde miks kimerizm, 24 'ünde ise tam kimerizm saptandı. PCR ile 29 hastanın 6'sında miks kimerizm, 23'ünde tam kimerizm saptandı. İki grup arasında hastalık tanısı, hazırlayıcı rejim, yaş, takip arasında fark yoktu. FISH ile 10/49 (%20) hastada relaps saptanırken, PCR ile 11/29 (%38) hastada relaps gözlemlendi. Bu durum iki grup arasındaki GvHH insidansı farklılığından kaynaklanmış olabilir. GvHH olan grupta relaps insidansı azdır. Miks kimerizm gözlenen PCR ile kimerizm tayini yapılan 6 hastanın 5 'inde (%83) relaps saptanırken FISH ile miks kimerizm gözlenen 25 hastanın 9'unda (%36) relaps vardı. PCR ile miks kimerizm saptanması relaps açısından daha spesifikti. Bu durum hasta sayısının azlığından kaynaklanabilir.

Alıcı hücrelerinin varlığının prognostik önemi de çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır (41). Artan oranda alıcı hücre varlığı malign hastalıklarda relaps ile sonuçlanırken malign olmayan hastalarda rejeksiyon ile sonuçlanmamıştır. Bizim bulgularımız Ortega ve arkadaşları (78), Bernasconi ve arkadaşları (17) ve Palka ve arkadaşlarının (80) çalışmaları ile uyumludur. Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi alıcı hücrelerinin progressif artışı klinik ve hematolojik relapsa neden olmuştur. Bu artışın gözlenmesi ve takibi, yapılacak DLI gibi modifikasyonlar ile hastayı relapstan kurtarabilir (9,10) . Bader ve arkadaşları haftalık olarak izledikleri kimerizm durumu ile artan oranda alıcı hücrelerinin saptandığı durumda immun baskılanmayı siklosporini keserek azaltıp sonrasında DLI uygulayarak iki hastada relapsı önlediklerini bildirmişlerdir (9). Bizim çalışmamızda da miks kimerizm saptanan 2 AML olgusu kemoterapi + DLI ları ile sağlığına tekrar kavuşmuştur.

Genel olarak, önce donör yamanmasının olup olmadığı ve ikinci olarak da miks kimerizm olup olmadığına saptaması istenir. Eğer miks kimerizm mevcutsa, hangi dizilerin miks olduğunu bilmek önemli olabilir. Son zamanlarda nonmyeloablatif hazırlama rejimlerinin kullanıma girmesiyle, hem miyeloid hem de lenfoid kimerizmi incelemek önemli hale geldi. Kan spesifik dizilere değişik tekniklerle ayrılabilir(5). Örneğin, T-hücreleri periferik kandaki lökositlerin yalnızca %10'unu, kemik iliğindeki de %3'ünü oluşturabilir. Yöntemin kimerizm durumunu saptamak için duyarlılığı %1 ise ve T-hücrelerinin %20'si alıcı kökenli ise ve tüm diğer diziler %100 donör ise yanlış yorum yapılabilir. Dizilere ayrılmamış periferik kanın analizi sahte bir tam donör kimerizmi olarak değerlendirilebilir. Bu yüzden, diziye-spesifik analizlerin kullanımı yöntemin duyarlılığını artıracak ve değişik hazırlama rejimlerinin myeloblastif ve immünoablatif etkinliğinin doğru değerlendirilmesine olanak tanıyacaktır (8,69). Wang ve arkadaşları VNTR analizi ile lösemili hastalarda KİT sonrası yaptıkları çalışmada, periferik kanın kemik iliği analizi ile aynı sonuç vermediğini, miks kimerizmin de normal hematopoezden çok blast sayısı ile ilişkili olduğunu gösterdiler (118). T hücre kimerizmi, T hücreler hem HvG ve GvH reaksiyonlarında önemli olduğundan daha anlamlı prognoz bildirebilmektedir. T hücre kimerizmini monitorize etmek hastanın immun durumu ile ilişkili bilgi verir. Yapılan çalışmalarda tüm hücrelerde %15 donör gözlendiği sırada T hücrelerin %98-99'unda donör kaynaklı olduğu, hastanın relaps yapmadığı bildirilmiştir (3,114). Karışık B-hücreli kimerizm hakkında az şey bilinmektedir. Bir myeloablatif hazırlama rejimi uygulanmazsa ağır kombine immün yetmezliğin bazı türleri için transplantasyondan sonra oluştuğu bilinmektedir. Karışık B-hücreli kimerizmin mevcudiyeti immünoglobülin allotipleme ile tahmin edilebilir. CD132 gibi antijenler, (ortak sitokin reseptörü  $\gamma$  zinciri) ya da intrasellüler Wiscott-Aldrich sendromu proteini + CD19 için renkli akım sitometrisi kullanarak yapılan analizler gelecekteki çalışmalarda yararlı olabilir. Çalışmamızda alt grup kimerizmini çalışmadık. Tüm hücre popülasyonundaki kimerizmi saptadık.

Relaps nakil sonrası başarıda önemli kısıtlayıcı faktörlerdendir. Relaps riski olanları belirlemek ve tedavi etmek önemlidir. Miks kimerizm ile lösemi relapsı arasındaki ilişki çelişkilidir. Molloy ve arkadaşları HLA uygun akraba olmayan

vericiden nakil uygulanan 23 hastanın 13 'ünde miks kimerizm saptamışlar ve bunlardan sadece 5'inde relaps gözlenmiştir (69). Miks kimerizmin neden olduğu tolerans her zaman relaps ile sonuçlanmamaktadır. Bu da özellikle lösemi hastalığının heterojen hastalık olmasından kaynaklanmaktadır. Herşeyden önce alıcı hücrelerinin varlığında bu hücrelerin malign ya da non-malign ayırımı yapılmalı, olgun alıcı lenfositler ve alıcı tipi hematopoez ayırımı yapılmalı ve GvHH, hazırlama rejimi ve T hücre deplesyonu varlığı da göz önüne alınarak bir tahminde bulunulmalıdır (18). Choi ve arkadaşları aylık olarak periferik kanda PR ile STR analizleri ile 30 lösemili hastada %47 oranında miks kimerizm saptamışlar ve miks kimerizm ile tam kimerizm gösteren hastalar arasında relaps açısından fark olmadığını bulmuşlardır (27). Bader ise yaptığı 55 hastalık çalışmada haftalık analizler ile relaps ile miks kimerizm arasında doğru orantı bulmuştur (9). Bizim çalışmamızda tam kimerizm saptanan hastaların %14.9'unda relaps gözlenirken (ki bu hastalardan birinde donör orijinli relaps saptanmıştır), miks kimerizm gösteren hastaların %45.5'inde relaps saptanmıştır. Relaps yapmayan miks kimerizimli hastaların çoğunu malign olmayan hastalık grubu oluşturmaktadır. Malign olmayan hastalıklarda miks kimerizm kemik iliği fonksiyonlarının devamı için yeterlidir. Çoğu malign olmayan hastalığın iyileştirilmesini ya da fonksiyonel dönüşümünü sağlamak için tam hematopoetik kimerizm gerekli değildir. Böylece, tüm vücut ışınlaması içerenerden daha az miyeloablatif olduğu düşünülen hazırlama protokolleri böyle hastalıkların tedavisi için transplantasyonla beraber sıklıkla kullanılır (46).

Hastalıklara göre değerlendirildiğinde, stabil miks kimerizmi sağlayıcı olarak MMF / CSA immunosuppressifleri ile talasemi majör da %20-30 donör hücresi yeterli iken malign hastalıklarda miks kimerizm yeterli olmayabilir. Andreani ve arkadaşları çalışmalarında Talassemili hastalarda miks kimerizm devamının tedavide yeterli olduğunu göstermişlerdir (4). Nonlenfoid hematolojik dizilerin konjenital defektleri (örneğin, kronik granüloamatöz hastalık, lökosit adhezyon yetersizliği, ve orak hücreli hastalık) için bir miktar donör-tipi nötrofil ya da eritrositlerin sürekli üretildiğini varsayarak, sürekliliği olan düşük donör tipi hematopoez düzeyleri doğuştan gelen hataların klinik sonuçlarını tersine çevirmek için yeterli olabileceğini ve %3 ile %10 aralığında donör yamanmasının klinik açıdan yararlı olduğunu bildirmişlerdir (5).

Nörolojik hastalığın tedavisinde düzeltici enzimin yeterli konsantrasyonlarda dolaşımında bulunması gereklidir. Nörolojik hastalarda KİT sonrası iyileşme bu enzimlerin dokuya-spesifik donörden-elde edilmiş hematopoetik hücreler yoluyla nöral dokulara mümkün olan en erken dönemde ulaştırılmasına dayanmaktadır. Bu yüzden , homozigot normal bir donörden transplantasyonu takip eden tam hemapoetik kimerizm tercih edilir (5). Bizim çalışmamızda da ALD tanısı ile nakil yapılan hastada tam kimerizm sağlanmış ve hasta sağ ve sağlıklıdır. Aplastik anemi için transplantasyon sonrasında kimerizmin izlenmesi graft kaybı ve relapsın değerlendirilmesinde yararlı olabilir, fakat hematopoez devam ettiği sürece, miks kimerizmin varlığı klinik olarak önemli olmayabilir (48). Bizim de aplastik anemili olgularımızda tam kimerizm geliştiğinden miks kimerizmin nasıl bir sonuç yaratabileceği bilinmemektedir. Bununla beraber, Fanconi anemili bir olgumuz %38 donör hücre oranı ile sağlıklı olarak yaşamını sorunsuz sürdürmektedir.

Her ne kadar malign olmayan hastalıklarda miks kimerizm kabul edilebilir bir durum olsa da ısrar eden miks kimerizmle ilgili bazı sorunlar görülmüştür. Bunlar şöyle sıralanabilir: kompartmantal yamanma ya da split kimerizm, örneğin, Wiskott-Aldrich sendromunda donör lenfoid yamanması mevcut iken sorunlu konak trombopoezinin devam etmesi; alloimmünizasyon-antikora bağlı konak karşıtı sitopenilerle donör lenfosit yamanması ve transplantasyon işlemi sırasında kemoterapilere maruz kalmış olan ve en sonunda hematolojik malignitelere yol açan konak kök hücrelerinin varlığı. Tüm bu komplikasyonlar transplantasyon işlemlerinin geçici ya da uzun-dönemli başarısızlıklarına neden olur (5).

Donckier ve arkadaşları miks kimerizmin toleransa neden olduğunu belirtmişler ve bunun alloreaktif T hücrelerinin klonal olarak ayıklanmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Tam kimerizm gelişmesinin hazırlama rejimi ile ilişkili olduğunu, alloreaktif periferik T hücrelerinin tümüyle yok edilmesi ve yer açılması amaçlı myeloablative olması gerektiğini burada yaşam üzerine kritik noktanın GvHH olduğunu belirtmişlerdir (33). Biz de çalışmamızda GvHH gösteren hastaların %89.5'inin tam kimerizm gelişen hastalar olduğunu saptadık. Relapstan korunmada bunun etkili olmuş

olabileceği dūřündük. Hill ve arkadaşları bizim çalışmamızdaki gibi miks kimerizimli hastalarda GvHH daha az oranda bulmuşlar ve bunu toleransa yakınlık ile ilişkilendirmişlerdir (48).

Cinsiyetle kimerizmin ilişkisine bakıldığında, bizim alışmamızda Ortega ve arkadaşlarının aksine cins ile kimerizm tipi arasında ilişki bulunamamıştır. Ortega ve arkadaşları 36 hasta ile yaptıkları çalışmada kızların %80'inde, erkeklerin %20'sinde miks kimerizm saptamışlardır (79).

Hazırlama rejimi ile kimerizm arasınadaki ilişkiye bakıldığında Ortega ve arkadaşları (78), Van Leeuwen ve arkadaşları (113) bizim çalışmamızda olduğu gibi TBI içeren daha yoğun hazırlama rejimlerini tam kimerizm gelişmesi açısından daha avantajlı bulmuşlardır. Çalışmamızda tam kimerizm ile miks kimerizimli hastalarda sağ kalım açısından fark olmadığı saptanmıştır. Bu durum tam kimerizimli hastalarda GvHH'dan kayıpların fazlalığı ile açıklanabilir.

Moleküler tekniklerin etkili ve artan oranlarda KİT sonrası kullanımı, KİT başarısını prognozu önceden belirleyerek arttırmaya yardımcı olacaktır. Çalışmamızın sonucunda karşı cinsten KİT yapılan hastaların kimerizm açısından izlenmesinde FISH yönteminin son derece hassas ve yararlı olacağını dūřünüyoruz. PCR ile VNTR analizi kullanılarak yapılacak kimerizm relapsı daha spesifik belirleyebilmektedir. Sonuç olarak kimerizm takibi KİT sonrası prognozda tayin edilmesi gereken önemli bir testtir ve bu çalışma ile çocuklarda kimerizm tayininin başarı ile uygulanabileceği gösterilmiştir. İleri alışmalar ile desteklendiğinde, daha sık analizlerle kimerizm tayininin KİT sonrası takipte vazgeçilmez olacağı dūřüncesindeyiz.

## 5. ÖZET

Allojenik kemik iliği nakli uygulanan yaş ortalaması  $9.5 \pm 4.02$  olan 78 hastanın ( 49 erkek / 29 kız ) periferik kan örnekleri cinsiyet farkı olanlarda FISH tekniği ile X ve Y problrı kullanarak aynı cinsten olanlarda PCR tekniği ile VNTR gen polimorfizm analizleri ile kimerizm durumunu belirleme açısından incelendi.FISH uygulanan grupta 49 çocuk, PCR uygulanan grupta ise 29 çocuk vardı. Her iki grup arasında cins,yaş,alta yatan hastalık ve hazırlık rejimi açısından fark yoktu. Ortalama takip süresi  $76.71 + 6.2$  ay idi. Tam kimerizm 47 hastada (%60.3) saptanırken 31 hastada (% 39.7) miks kimerizm gözlendi. Tüm grupta sağ kalım (5 yıllık) %67.7 bulundu. Tam kimerizm ve miks kimerizm gözlenen gruplar arasında sağ kalım açısında fark bulunmadı (%72 v %68). Tam kimerizm gözlenen hastaların %14.9 'unda relaps gözlenirken miks kimerizimli hastaların %45.2 'sinde relaps saptandı. Fark anlamlı bulundu(  $p = 0.003$ ). GvHH relaps gelişmesi üzerine etkili bulundu. GvHH gözlenenlerin sadece 2 'sinde (%10.5) relaps var iken,relaps gelişen hastaların %90.5 'inde GvHH yoktu. TBI kemoterapiye göre tam kimerizm açısından avantajlı bulundu ( $p= 0.056$ ). Sonuç olarak kimerizm takibi KİT sonrası prognozda tayin edilmesi gereken önemli bir testtir ve Türkiye'de çocuklarda ilk kez yapılan bu çalışma ile çocuklarda kimerizm tayininin başarı ile uygulanabileceği gösterilmiştir. İleri çalışmalar ile desteklendiğinde, daha sık analizlerle kimerizm tayininin KİT sonrası takipte vazgeçilmez olacaktır.

## 7.SUMMARY

### CHIMERISM ANALYSIS USING FISH AND PCR IN PEDIATRIC ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION AND ITS ROLE IN PROGNOSIS

Peripheral blood samples of 78 (49 boys/ 29 girls) children with a mean age of 9.5 +4.02 were studied for chimerism status using fluorescence in situ hybridization(FISH) with an X and Y chromosome probe in children who received sex-mismatched allogeneic BMT and using PCR technique with VNTR gene polymorphisms in sex-matched allogeneic BMT. There were 49 children in FISH group and 29 children in PCR group. There were no major differences in sex, age, underlying diseases, conditioning regimens in both groups. The mean duration of follow up was  $76.71 \pm 6.2$  months. Complete chimerism was seen in 47(60.3%) of the patients and 31 patients (39.7%) showed mixed chimerism. GvHD was found in 19 (24.4%) of the patients. The overall survival was 67.7% (5 years) in the study group. There was no significant difference in overall survival of the complete chimerism and the mixed chimerism groups (72% vs 68%). The relapse were seen in 14.9% of the patients of the complete chimerism group and 45.2% of the patients in the mixed chimerism status relapsed. The difference is significant ( $p=0.003$ ). GvHD has an impact on relapse. Only 2 (10.5%) patients who had GvHD had relapsed and 90.5% of the patients who had relapsed had no GvHD. There was a trend to meaningful difference ( $p=0.06$ ). The TBI was superior to other chemotherapy containing conditioning regimens in terms of obtaining complete chimerism ( $p=0.056$ )

As a result, analysis of chimerism using FISH and PCR are important methods which give information about prognosis and allows for modification to prevent relapse.

## 8. DR.HÜLYA BİLGEN 'İN ÖZ GEÇMİŞİ

Adı : HÜLYA  
Soyadı : BİLGEN  
DoğumTarihi : 15/04/1964  
Doğum Yeri : ESKİŞEHİR  
Tabiyeti : Türkiye Cumhuriyeti  
Medeni Hali : Bekar  
Ünvanı : Dr.  
Görevi : -İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kan  
Merkezi  
Yabancı Dil : İngilizce (Çok iyi düzeyde) KPDS A  
Almanca (Orta düzeyde)

### EĞİTİM DURUMU

<u>Tarih</u>	<u>Yer</u>	<u>Sonuç</u>
1971-1976	Eskişehir İnkılap İlkokulu	İlkokul 1.si
1976-1982	Eskişehir Koleji(Anadolu Lisesi)	Lise Okul 3.sü
1982-1988	İstanbul Tıp Fakültesi	Tıp Doktoru (Sınıf 13.)
1988-	Bristol Üniversitesi Çocuk Onkoloji çalışma dönemi	
1989-2001...	İstanbul Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hast. A.B. Dalı Hem./Onk. B.Dalı Lösemili Çocuklar Vakfı Kemik İliği Nakil Ünitesi Koordinatörü ve Doktoru,	Görev (+ Mecburi Hizmet)

1994 ...	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı	Doktora. Öğrencisi
9-2002- 1-2003	İ.Ü Sağlık Kültür ve Spor Daire Başkanlığı	
1-2003.....	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kan Merkezi	

Üyesi Olduğu Kuruluşlar :

- Eskişehir Koleji Mezunlar Derneği
- Pediatrik Hematoloji Derneği  
(Aferez Çalışma Grubu sekreteri)
- Türk Tabipler Birliği İstanbul Şb.
- Türk Kan Transfüzyonları Derneği
- Hemaferrez Derneği
- Kemoterapi Derneği
- European BMT (EBMT)

## 9. KAYNAKLAR

1. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Daauriac C. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 1999; 4618-4625.
2. Anak S. Malin hastalığı olan çocuk hastalarda periferik kök hücre mobilizasyonu ve transplantasyonu. İstanbul Üniversitesi İst.Tıp Fak. Çocuk sağlığı ve hastalıkları anabilim dalı, Çocuk onkolojisi yan dal uzmanlık tezi, İstanbul, 2001.
3. Anastasi J, Tahngavelu M, Vardiman J, et al. Interphase cytogenetic analysis detects minimal residual disease in a case of acute lymphoblastic leukemia and resolves the question of origin of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1991 ; 77 : 1087-1091.
4. Andreani M, Manna M, Lucarelli G, Tanucci P, Agostinelli F, Ripalt M, et al. Persistence of mixed chimerism in patients transplanted for the treatment of thalassemia; *Blood* 1996;87:3494- 3499.
5. Antin J H, Childs R, et al. :Establishment of Complete and Mixed Donor Chimerism After Allogeneic Lymphohematopoetic Transplantation: Recommendations From a Workshop at the 2001 tandem meetings. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2001;7 :473-485.,
6. Armitage JO. Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330 (12) : 827 – 838.
7. Atkinson K. *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*, Cambridge University Press, U.K, 2000, 1119-1147.
8. Bader P, Holle W, Klingebiel T et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation; the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse or graft rejection in children . *Bone Marrow Transplant* 1997;19:697-702.
9. Bader P et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21:487-495.

10. Bader P, Beck J, et al. Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia : Is there an option to prevent relapse .*Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 79-81.
11. Bader P, Dücker G, et al . Characterization of haematopoietic chimerism and its impact for the prevention of subsequent relapse *Bone Marrow Transplant* 2002; Dec 28,( supp):84
12. Barrett AJ, Graft-Versus-Host Disease; Treleaven J, Barrett J (Ed.). *Bone Marrow Transplantation in Practice*, Churchill Livingstone, Edinburgh, U.K. 1992; 257 – 272.
13. Barrett AJ, Horowitz MM, Pollock BH, et al. Bone Marrow Transplants From HLA-Identical Siblings as compared with Chemotherapy for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Second Remission. *N Engl J Med* 1994; 331: 1253 – 1258.
14. Barth E, Molorgio C, Tamaro P. Allogeneic bone marrow transplantation in hematologic disorders of childhood : new trends and controversies *Haematologica* 2000, 85 (supp 11): 2-8.
15. Bartsch O, Schwinger E. A simplified protocol for fluorescence in situ hybridization with repetitive DNA probes and its use in clinical cytogenetics. *Clin Genet* 1991; 40(1): 47-56.
16. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001; 344 (3) : 175 – 181.
17. Bernasconi P, Cavigliano PM, Genin E et al. Assessment of chimerism in sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation (allo BMT) by in situ hybridization and cytogenetics. Is host cell percentage predictive of relapse? *Leukemia* 1997; (11):1989-1990.
18. Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, Maraninchi D: Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia . *Blood* 1991; 78: 3103.

19. Blazar BR, Orr HT, Arthur DC, et al. Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1985 ; 66 : 1436-1444.
20. Boerwinkle E, Xiong W, Fovrest E, Chan L. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B3 hyper variable region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 212-216.
21. Bondurant MC, Koury MJ, Origin and Development of Blood Cells; Lee R (Ed.), *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1999 : 145 – 168.
22. Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ ve ark., Reconstitution of Hematopoiesis after High-Dose Chemotherapy by Autologous Progenitor Cells Generated ex Vivo, *The New England Journal of Medicine* 1995; 333 (5) : 283 – 287.
23. Bruserud Ø, Tjønnfjord G, Gjertsen BT ve ark., New Strategies in the Treatment of Acute Myelogenous Leukemia: Mobilization and Transplantation of Autologous Peripheral Blood Stem Cells in Adult Patients. *Stem Cells*; 2000,18 (5) : 343 -351.
24. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, et al. Analysis of the VNTR locus D1580 by the PCR followed by high resolution PAGE. *AM J Hum Genet* 1991;48:137-144.
25. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz M, et al. Blood Stem Cells versus Bone Marrow as a Source of Hematopoietic Cells for Allogeneic Transplantation, *Blood* 2000; 95 : 3702 – 3709.
26. Chao NJ, Tierney DK, Bloom JR, et al. Dynamic Assessment of Quality of Life after Autologous BMT. *Blood* 1992; 80 (3) : 825 – 830.
27. Choi S-J, Lee K-H, Lee J-H et al , Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation : a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2000 ; 26 : 327-332.
28. Croop JM, Cooper R, Seshadri R , et al. Large-scale mobilization and isolation of CD34+ cells from normal donors. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26 (12) : 1271 – 1279.

29. Cufler C, Antin JH, Peripheral Blood Stem Cells for Allogeneic Transplantation: A Review. *Stem Cells* 2001; 19 (2) : 108 – 117.
30. Demirer T, Buckner CD, Bensinger WI, et al. Optimization of peripheral blood stem cell mobilization. *Stem Cells* 1996; 14 : 106 – 116.
31. Dini G, Cornish JM, Gardner H, et al. Bone Marrow Transplantation Indications for Childhood Leukemias : Achieving a Consensus. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 18 (Supp 2) : 4 – 7.
32. Dinndorf P, Bunin N . Bone Marrow Transplantation for Children with Acute Myelogenous Leukemia. *J.Pediatr Hematol Oncol* 1995; 17 (3): 211 – 24.
33. Donckier V, Toungouz M, Goldman M. Transplantation tolerance and mixed chimerism: at the frontier of clinical application. *Transpl Int* 2001; 14 : 1-5.
34. Erslev AJ, Lichtman MA. Structure and the Function of the Marrow. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ ,et al. (Ed.), *Hematology*, McGraw Hill, New York, 1991: 37 – 47.
35. Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft versus Host Disease. *N Engl J Med* 1991; 324 (10) : 667 – 674.
36. Frankel W, Chan A, Corringham RE, et al. Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation by short tandem repeats. *Am J Hematology* 1996; 52 : 281-287.
37. Gale RP, Butturini A, How do BMT Cure Leukemia. Champlin RE, Gale RP (Ed.), *New Strategies in BMT*, Wiley - Liss Inc, New York, 1991: 109 – 118.
38. Ginsburg D, Antin JH, Smith DR, et al. Origin of cell populations after bone marrow transplantataion .Analysis using DNA sequence polymorphisms. *J Clin Invest* 1985; 75 : 596-603.
39. Giralt S, Champlin R. Leukemia relapse after bone marrow transplantation;a review. *Blood* 1994; 84: 3603-3612.
40. Giralt S, Khouri I, Champlin R, *Non-myeloablative Conditioning: Induction of GVL Effect as a Therapeutic Modality in Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*, Cambridge University Press, Cambridge, 2000: 1182 – 1191.

41. Gleissner B, Blau I.W et al . Analysis of chimerism during the early period after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Clin Lab.Haem* 2001; 23: 401-406.
42. Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D ,et al. Indications for Stem Cell Transplantation; Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl A (Ed.), *Blood and Marrow Transplantation*, ESH, Paris, 2000, 56 – 67.
43. Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, et al. Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet* 1992;51:627-636.
44. Gordon MT, Riley GP, Watt SM ve ark., Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 1987; 326:, 403 – 405.
45. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H ve ark., *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Europe 1998*. *The Hematology Journal* 2000; 1 : 333 – 350
46. Gürman G, *Mini transplantasyon,VI.Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu eğitim kitabı*, Ankara, 2002:69-72.
47. Hessel H, Mittermuller J, Zitzelsberger H,et al . Combined immunophenotyping and FISH with sex chromosome specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex mismatched bone marrow transplantation. *Histochemistry and cell Biology* 1996; 106 : 481-485.
48. Hill RS, Petersen FB, Storb R et al. Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft – versus-host disease. *Blood*1986; 67: 811-816.
49. Hoffbrand AV, Pettit JE, *Acute Leukemias*; Hoffbrand AV, Pettit JE (Ed.), *Essential Haematology*, 3rd Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993: 209 – 231.
50. Kersey HJ. Fifty years of studies of the Biology and Therapy of Childhood Leukemia. *Blood* 1997; (90) : 4243-4260.

51. Kessinger A, Circulating Stem Cells – Waxing Hematopoietic, *The New England Journal of Medicine* 1995; 333 (5) : 315 – 316.
52. Klingebiel T, Pession A, Paolucci P ve ark., Autologous versus Allogeneic BMT in AML; the European Experience, Report of the EBMT - Pediatric Diseases Working Party., *Bone Marrow Transplant* 1996; 18 (Supp 2) :49-52.
53. Krance RA, Heslop H, Brenner M, Bone Marrow Transplantation for Pediatric Malignancy; Burt RK, Deeg HJ, Lothian ST, Santos GW (Ed.), *Bone Marrow Transplantation*, Chapman & Hall Publishers, New York, 1996 : 253 – 266.
54. Kronenwett R, Martin S, Haas R, The Role of Cytokines and Adhesion Molecules for Mobilization of Peripheral Blood Stem Cells. *Stem Cells*, 2000, 18 (5) : 320 – 330.
55. Ladenstein R, Hartmann O., Pinkerton R, et al. A progress report on 20 years of Megatherapy / SCT in Pediatric Solid Tumours. EBMT Solid Tumours Working Party and Registry Report 1998 :147.
56. Lanzkowsky P, Bone Marrow Transplantation; Lanzkowsky P (Ed.), *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, 2nd Edition, Churchill Livingstone, New York, 1995: 557 – 578.
57. Larsson LI, Hougard GM. Optimization of non-radioactive in situ hybridization: image analysis of vary pretreatment, hybridization and probe labelling conditions. *Histochemistry* 1990; 84: 221-230.
58. Lawler M, Humphries P, Mc Cann SR: Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991 ;77:2504 .
59. Lenarsky C, *Technique of Bone Marrow Transplantation*; Johnson FL, Pochedly C (Ed.), *Bone Marrow Transplantation in Children*, Raven Press, New York, 1990 : 53 – 68.
60. Li CK, Chik Wai Ki, et al . Mixed chimerism after bone marrow transplantation for thalassemia major. *Haematologica* 2002; 87 :781-782 .

61. Lian Z, Kun-Sang C, Elihu H, et al. Detection of residual leukemic cell in patients with acute promyelocytic leukemia by the FISH method : potential foe predicting relapse .*Blood* 1995 ; 85 : 495-499.
62. Lichtman MA, Packman CH, Constine LS, Molecular and cellular traffic across the marrow sinus wall; Tavassoli M (Ed.), *Blood Cell Formation: The Role of the Hemopoietic Microenvironment*, Humana Press, 1989: 87 – 140.
63. Ma DDF, Hematopoietic Reconstitution Following Bone Marrow Transplantation; Johnson FL, Pochedly C (Ed.), *Bone Marrow Transplantation in Children*, Raven Press, New York, 1990: 111 – 140.
64. Mandelli F, Meloni G, The Rationale of Autologous BMT, *Bone Marrow Transplantation* 1991;7 ( Supp 2) : 66 – 67.
65. McSweeney A P, Storb R. Mixed chimerism :preclinical studies and clinical applications. *Biol Blood and Marrow Transplantation* 1999; 5: 192-203.
66. Metcalf D. Cellular Hematopoiesis in the Twentieth Century. *Semin Hematol*, 1999; 36 (suppl 7): 5 – 12.
67. Michel G, Leverger G, Leblanc T ve ark., Allogeneic Bone Marrow Transplantation vs. Aggressive Post-remission Chemotherapy for Children with Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission. A Prospective Study From the French Society of Pediatric Hematology and Immunology (SHIP). *Bone Marrow Transplant* 1996; 17 : 191 – 196.
68. Mills KC, Gross TG, Varney ML, et al. Immunologic Phenotype and Function in Human Bone Marrow, Blood Stem Cells and Umbilical Cord Blood. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18 (1) : 53 – 61.
69. Molloy K, Goulden N, Lawler M et al. Patterns of hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia from volunteer unrelated donors. *Blood* 1996; 87: 3027-3031.
70. Mossad SB, Longworth DL, Goormastic M ,et al. Early Infectious Complications in Autologous Bone Marrow Transplantation : a Review of 219 Patients. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18 (2) : 265 – 272.
71. Moussqlem M, Esperon Bourdeau H, et al. Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Second

- Remission; Factors Predictive of Survival, Relapse and Graft versus Host Disease. *Bone Marrow Transplant*, 1995; 15(6) : 943-947 .
72. Nachman J, Sather HN, Gaynon PS ,et al. Augmented Berlin-Frankfurt-Munster Therapy Abrogates the Adverse Prognostic Significance of Slow Early Response to Induction Chemotherapy For Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia and Unfavorable Presenting Features; A Report From the Children's Cancer Group. *J.Clin Oncol* 1997; 15 : 2222-2230.
  73. Niethammer D. Why is a Working Party for Pediatric Diseases Necessary within EBMT ?, *Bone Marrow Transplant* 1996; 18 (Supp 2) : 1 – 3.
  74. Niethammer D, Klingebiel Th, Ebell W ,et al. Which Children do Benefit from Bone Marrow Transplant. *Bone Marrow Transplant* 1996;18 (Supp 2): 43 – 46 .
  75. Ogawa M.Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood* 1993; 81 : 2844 – 2853.
  76. Oguz R.fluoresan in situ hibridizasyon yöntemi ile kronik myeloid lösemi va farklı cinsten kemik iliği nakli olan hastaların minimal residual hastalık tanısı.İ.Ü sağlık Bilimleri Enstitüsü,Doktora Tezi,İstanbul, 2000.
  77. Ortega JJ, Olive T, Diaz de Heredia C ,et al. Allogeneic and Autologous Bone Marrow Transplantation; The Spanish Experience. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18 (Supp 2): 53-58.
  78. Ortega M, Escudero T, Caballin MR,et al. Follow-up of chimerism in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplants .*Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 81-7.
  79. Ozbek U,Vural B,Kalayoğlu S,et al . Evaluation of Chimerism with DNA Polymorphisms in Bone Marrow Transplantation, *Turk J Pediatr* 1997;39 : 303-311.
  80. Palka G, Stuppra L, Bartolomeo et al : FISH detection of mixed chimerism in 33 patients submitted to bone marrow transplantation.*Bone Marrow Transplant* 1996 ;17 : 231-236.
  81. Papayannopoulou T.Mechanisms of Stem- / Progenitor- Cell Mobilization : The Anti-VLA-4 Paradigm. *Semin Hematol* 2000; 37 (no 1, suppl 2): 11 – 18.

82. Parsons SK, Castellino SM, Lehmann LE ve ark., Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia; Similar Outcomes for Autologous and Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Selected Children, *Bone Marrow Transplant* 1996; 17 (5) : 763 –768.
83. Patterson K. Bone marrow Harvesting and Preparation of Harvested Marrow ; Treleaven J, Barrett J (Ed.), *Bone Marrow Transplantation in Practice*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992 :219 – 226.
84. Petz LD, Yam P, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, Knowlton RG, Brown VA, Donis-Keller H, Hill LR, Forman SJ, Blume KG. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 1987; 70: 1331.
85. Prentice HG. How do BMT's Cure Leukemia ? *New Directions. Bone Marrow Transplantation* 1991; 7 ( Supp 2) : 11 – 13.
86. Raap AK. Advanced in fluorescence in situ hybridizations. *Mutat Res.* 1998; 25:287-98.
87. Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F et al. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18:1161-1165.
88. Ravindranath Y, Yeager A, Krischer J ,et al. Intensive Consolidation Chemotherapy (ICC) vs. Purged Autologous Bone Marrow Transplantation (ABMT) Early in Remission for Treatment of Childhood Acute Myeloid Leukemia (AML), Preliminary Results of Pediatric Oncology Group (POG) : Study 8821. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1994; 13 A:1053.
89. Reiffers J, Bernard P, David B ve ark., Successful Autologous Transplantation with Peripheral Blood Hemopoietic Cells in a Patient with Acute Leukaemia. *Exp Hematol* 1986;14 : 312.
90. Rick O, Beyer J, Kingreen D ve ark., Successful Autologous Bone Marrow Rescue in Patients who Failed Peripheral Blood Stem Cell Mobilization, *Ann Hematol*, 2000, 79 (12) : 681 – 6
91. Ripalti M, Rapa S, Capponi D, Persini B, Rossi R. Analysis of mixed chimerism in leukaemic patients transplanted from haploidentical mother using cytogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization (FISH). 23rd

- Annual Meeting of the BMT and 13th Meeting of the Nurses Group 1997, Paris, France, vol.19, supp.1,
92. Rosti G, Ferrante P, Solid Tumors Working Party and Registry, 2000,2000 Report: 25 – 34.
  93. Roy DC, Tantravahi R, Murray C, et al. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6 depleted allogeneic marrow: A stable equilibrium. *Blood* 1990; 75: 296.
  94. Russell NH, Allogeneic PBPC : Lessons to be Learned from Prospective Randomised Trials, 27th Annual meeting European Group for Blood and Marrow Transplantation and 17th Meeting of the Nurses Group Educational Book 2001: 30 –33.
  95. Saarinen UM, Mellander L, Nysom K ve ark., Allogeneic Bone Marrow Transplantation in First Remission for Children with very High Risk Acute Lymphoblastic Leukemia; a Retrospective Case-control Study in the Nordic Countries. *Nordic Society For Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO).Bone Marrow Transplant* 1996;17 (3): 357 – 363.
  96. Schattenberg A, De Witte T, Saiden M, Vet J, Van Diyk B, Smeets D, Hoogenhout J, Itaanan C: Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse, *Blood*73:1367-1989.
  97. Schmidt GM, Niland JC, Forman SJ ve ark., Extended Follow - up in 212 Long-term Allogeneic BMT Survivors. *Transplantation* 1993; 55 (3) : 551 – 555
  98. Schmitz N, Gratwohl A, Goldman JM. Allogeneic and Autologous Transplantation for Haematological Diseases, Solid Tumours and Immune disorders, Current Practice in Europe in 1996 and Proposals for an Operational Classification. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17 (4) : 471 – 477.
  99. Schrappe M, Reiter A, Santer S ,et al. Concept and Interim Results of the ALL-BFM 90 Therapy Study in Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents, the Significance of Initial Therapy Response in Blood and Bone Marrow. *Klin Padiatr* 1994; 206 (4): 208-221.

100. Shaw PJ, Bergin ME, Burgerss MA ,et al. Childhood Acute Myeloid Leukemia Outcome in a Single Center Using Chemotherapy and Consolidation with Busulfan / Cyclophosphamide for Bone Marrow Transplantation. *J.Clin Oncol* 1994 ; 12(10): 2138 –2145.
101. Shizuru JA, Weissman IL. Isolation and Characterization of Hematopoietic Stem Cells; Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (Ed): *Hematopoietic Cell Transplantation*, 2nd Edition, Blackwell Science Inc., Malden, USA, 1999: 63 – 78
102. Spangrade GJ, Cooper DD. Paradigm Shifts in Stem-Cell Biology. *Semin Hemato* 2001 ; 37 (no 1, suppl 2): 3 – 10.
103. Sullivan MK, Parkman R, Walters MC. *American society of Hematology*, 2000, 319-338.
104. Suthorp M, Sprenger C, Dreger P,et al. Amplification of a Y chromosomal DNA sequence by the polymerase chain reaction for documentation of residual recipient cells in small samples from bone marrow,peripheral blood and cerebrospinal fluid after bone marrow transplantation. *Electrophoresis* 1993 ; 14(3) : 174-178.
105. Tamura S,Saheki K,Takatsuka.et al early detection of relapse and evaluation of treatment for mixed chimerism using fluorescence in situ hybridization following allogeneic hematopoetic cell transplant for hematological malignancies. *Annals of hematology* 2000, 79(11) : 622-626.
106. Thiede C, Florek M, Bornhauser M et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1055-1060.
107. To LB, Haylock DN, Dyson PG ,et al. An Unusual Pattern of Haemopoietic Reconstitution in patients with Acute Myeloid Leukaemia Transplanted with Autologous Recovery Phase Peripheral Blood. *Bone Marrow Transplant* 1990; 6 :109.
108. To LB, Haylock DN, Simmons PJ ,et al. The Biology and Clinical Uses of Blood Stem Cells. *Blood* 1997; 89 (7): 2233 –2258 .
109. Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization; application in cytogenetics and gene mapping .*Trends Genet* 1991;7(5):149-154.

110. Treleaven J, Barrett J. Introduction to Bone Marrow Transplantation; Treleaven J, Barrett J (Ed.), Bone Marrow Transplantation in Practice, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992: 3 – 10.
111. Uderzo C. Indications and role of allogeneic bone marrow transplantation in childhood very high risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission. *Haematologica* 2000 ; 85 (supp 11): 9-11.
112. Ugozzoli L., P Yam, LD Petz, et al. Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation .*Blood* 1999 ;77:1607-1615 .
113. Van Leeuwen JEM, van Tol MJD, Joosten AM, et al. Mixed T lymphoid chimerism following allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies of children is not correlated with relapse. *Blood* 1993; 82: 1921.
114. Van Leeuwen JEM, van Tol MJD, Joosten AM, et al .Persistence of host Type hematopiesis after allogeneic Bone Marrow transplantation for Leukemia is Significantly related to the recipient's Age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an Increased risk of relapse. *Blood* 1994 ; 83: 3059-3067.
115. Vogelsang GB, Hess AD. Graft-Versus-Host Disease : New Directions for a Persistent Problem. *Blood*. 1994 ; 84 (7) : 2061 – 2067.
116. Von Buehtzingsloewen A, Esperou Bourdeau H, Sonillet G ,et al. Allogeneic Bone Marrow Transplantation Following a Busulfan-based Conditioning Regimen in Young Children with Acute Lymphoblastic Leukemia; a Cooperative Study of the Societe Francaise de Greffe de Moelle. *Bone Marrow Transplant* 1995;16 (4): 521-527 .
117. Wachowiak J, Bettoni C, Lange A ,et al. Can Busulfan Replace Fractionated Total Body Irradiation as Conditioning Regimen for Allogeneic Bone Marrow in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Acta Haematol Pol* 1995; 26 (4): 377 – 384.

