

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**ALLOJENİK KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU
YAPILAN ÇOCUKLARDA KİMERİZM ANALİZİ
VE HASTALIKSIZ SAĞKALIMA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hakan TEKGÜÇ

DANIŞMAN:

Doç. Dr. Serap AKSOYLAR

İZMİR- 2010

ÖNSÖZ

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları eğitimim boyunca; kıymetli bilgi, beceri ve tecrübelerini benden esirgemeyen tüm hocalarıma ve uzmanlarıma, mesai ve nöbet arkadaşım asistanlara, yardım ve anlayışlarıyla bana her zaman destek olan hemşire ve hastane görevlilerine sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca tezim boyunca; bir asistanın hevesini asla kırmadan, enerjisini kendi bilgi ve birikimi ile doğru yöne yönlendiren, yardımları ile bu tezin yazılmasında asıl rolü oynayan tez danışmanım Doç. Dr. Serap AKSOYLAR'a, dosya taramalarım sırasında anlayışla bana yardım eden Kök Hücre Transplantasyonu Ünite ve Poliklinik hemşirelerine, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda kimerizm çalışmalarını gerçekleştiren ve bunları benimle paylaşan tüm doktora ve teknik ekibe, aileme, tezimin tüm istatistik çalışmalarının yapan abime ve biricik eşim Doğa'ya hayat boyu minnettarlığımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
HASTALAR VE YÖNTEM.....	16
BULGULAR	20
TARTIŞMA.....	27
ÖZET.....	32
ABSTRACT.....	33
KAYNAKLAR.....	34
EKLER.....	38

TABLolar

Tablo 1: Çocukluk çağında KHT endikasyonları.....	3
Tablo 2: Akut Graft versus Host Hastlığı klinik olarak evrelendirilmesi.....	7
Tablo 3: Kronik GVHH'de Klinikopatolojik Sınıflandırma.....	8
Tablo 4: Hastaların demografik özellikleri.....	20
Tablo 5: Transplantasyon Özellikleri.....	22
Tablo 6: İlk 100 gün kimerizm başarısı sonuçları.....	24
Tablo 7: İlk 100 gün kimerizm başarısı üzerine etkili nedenler.	25
Tablo 8: Olgularda hastalısız sağkalımı (EFS) etkileyen faktörler. MSD: Tam uygun Kardeş Donor, MUD: Tam uygun Akraba dışı Donor, MRD: Tam uygun Akraba Donor, MMRD: Tam uygun olmayan Akraba Donor,E: Erkek, K: Kız, CSA: Siklosporin, Mtx: Metotreksat.CMV: Sitomegalovirüs GvHH: graft versus Host Hastlığı. BK: Nötrofil.....	26
Tablo 9: Çok değişkenli hastalısız sağkalım analizi sonuçları. Hazard oranı için 1'den küçük olması sağkalım üzerine pozitif etkiyi göstermektedir.	27
Tablo 10: 100. gün kimerizm başarısı sağlanamayan hastalar.....	38

GRAFİKLER

Grafik 1: İlk 100 gün kimerizm başarısı ile ilişkili hastalısız sağkalım (EFS).....	39
Grafik 2: Lökosit engraftmanı ile ilişkili sağkalım.....	39
Grafik 3: Alıcı-Verici cinsiyet ile ilişkili hastalısız sağkalım.....	40
Grafik 4: HLA uyumu ile ilişkili hastalısız sağkalım.....	40
Grafik 5: Verilen CD34+ sayısı ile ilişkili hastalısız sağkalım (median: 5×10^6 hücre).....	41
Grafik 6: Tanı grupları ile ilişkili hastalısız sağkalım.....	41
Grafik 7: Donor Çeşidi ile ilişkili hastalısız sağkalım.....	42
Grafik 8: Kr. GvHH profilaksisi ile ilişkili hastalısız sağ kalım.....	42

KISALTMALAR

Kİ	: Kemik iliği
KT	: Kemoterapi
KHN, KHT	: Kök hücre Nakli, transplantasyonu
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi,
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
HL	: Hodgkin Lenfoma
NHL	: Nonhodgkin Lenfoma
MDS	: Myelodisplastik Sendrom
SCID	: Ağır kombine immün yetmezlik
AAA	: Akkiz Aplastik Anemi
KAA	: Konjenital Aplastik anemi
ALD	: Adrenolökodistrofi
TBI	: Tüm vücut ışınlaması
ATG	: Anti-timosit globulin
MTX	: Metotreksat
aGvHH	: Akut Graft versus Host Hastalığı
KrGvHH	: Kronik Graft versus Host Hastalığı
GvL	: Graft versus Lösemi
HLA	: Human Lokosit Antijen
VOD	: Venooklusif hastalık
MSD	: Tam uygun Kardeş Donor
MUD	: Tam uygun Akraba dışı Donor
MRD	: Tam uygun Akraba Donor
MMRD	: Tam uygun olmayan Akraba Donor
STR	: (Short tandem repeat) Kısa ardışık tekrar

GİRİŞ ve AMAÇ

Allojenik kök hücre transplantasyonu (KHT) çocukluk çağının birçok doğumsal ya da edinsel hastalığında tek küratif tedavi yöntemidir. Bu hastalıklar arasında akut lösemiler, kemik iliği yetmezlikleri, hemogloblin sentez defektleri, immun yetersizlikler ve bazı metabolik hastalıklar ön planda yer almaktadır. Günümüz genel pediatri pratiğinde her geçen gün daha fazla yer alan ve neredeyse tüm yan dal uzmanlıklarını gerek sağladığı tedavi şansı gerekse komplikasyonları açısından ilgilendiren KHT'u, hastanemiz bünyesinde de yaklaşık yılda 30 hastada uygulanmakta ve her geçen gün daha fazla çocuk post transplant izleme girmektedir. Bu konuda bilimsel açıklık ve cevaplanması gereken sorular arttıkça KHT üzerine yapılan çalışmalar ve dünya literatürüne katkı giderek artmaktadır. 2005 yılından itibaren hastanemizde Nükleer DNA'da STR tekniği ile kimerizm çalışması yapılabilmektedir. Hem kliniğimizde yapılan KHT sonuçlarının değerlendirilmesi hem de dünya literatürüne katkıda bulunmak için kliniğimizde son 5 yıl içerisinde allojenik kemik iliği nakli olan olguların sağkalımı ve kimerizm başarısı üzerine etkili nedenlerin araştırılmasına karar verildi. Bu çalışmada; 2005-2010 yılları arasında allojenik KHT olmuş, post-transplantasyon ilk 100 gün izlenmiş ve kimerizm analizi yapılmış olan hastalarda:

1. Post-transplant kimerizm oranlarının belirlenmesi,
2. İlk 100 gündeki kimerizm başarısı ile sağkalım arasında ilişki aranması,
3. İlk 100 gündeki kimerizm başarısını etkileyen faktörlerin araştırılması,
4. Hastalısız sağkalımı etkileyen diğer klinik ve laboratuvar faktörlerin değerlendirilmesi ve kimerizm başarısı ile ilişkisinin ortaya koyulması amaçlandı.

Çalışmanın sonucunda

1. Kliniğimizde yapılan allojenik KHT'nun sonucunu etkileyen faktörlerin daha iyi anlaşılması ve daha başarılı işlem gerçekleştirilmesi,
2. Kimerizm oranlarının farklı hasta gruplarında KHT'nun başarısı üzerine etkilerinin daha iyi aydınlatılması,
3. Dünya literatürüne katkıda bulunulması hedeflendi.

GENEL BİLGİLER

Kök Hücre Transplantasyonu Nedir?

Kemik iliği (Kİ) transplantasyonu son yıllarda birçok maliyn ve maliyn olmayan hastalıkta başarı ile uygulanabilen bir tedavi seçeneğidir. Günümüzde Kİ dışındaki kaynaklardan da kök hücre elde edilebildiği için kemik iliği transplantasyonu terimi yerini kök hücre transplantasyonu (KHT) terimine bırakmaktadır.

Hematopietik kök hücre, pluripotent (çok yönlü farklılaşma) özelliğine sahip olup vücutta tüm hematopoezin ve immun sistemi oluşturan hücrelerin ana kaynağıdır. KHT; bir donörden alınan hematopietik kök hücrelerin verildiği hastada yerleşip çoğalarak alıcının hematopietik sisteminin tamamını veya bir kısmını oluşturması amaçlanarak yapılan bir uygulamadır. Eğer alınan kök hücre hastanın kendisine aitse “otolog”, başka bir bireye aitse “allojenik” KHT adı verilmektedir.

Nakil fikri ilk olarak letal dozda ışına maruz kalan farelere, sağlıklı farelerden verilen Kİ hücrelerinin alıcıda yaşayabildiğinin gösterilmesi ile başladı (1,2) ve ilk KHT uygulaması, 1891’de Brown-Sequard ve d’Arsonaval tarafından, kemik iliği yetersizliği olan bir hastaya oral yolla Kİ verilerek yapıldı. 1937’de Schretzenmayr paraziter infeksiyonların tedavisinde otolog/allojenik kemik iliğini intramüsküler yolla vererek KHT’nu denemiş ve bazı başarılı sonuçlar bildirmiştir. 1939’da Osgood Kİ’ni intravenöz, 1944’de Bernard intramedüller yolla uyguladılar. 1964 yılında Bach’ın “major histokompatibilite” sistemini, 1965’de Dausset’in insan lökosit antijen sistemini ve doku gruplarını tarif etmesiyle allojenik KHT’nda yeni bir dönem açılmış ve ED Thomas 1968 yılında insanda ilk başarılı KHT’nunu doğumsal immun yetmezliği olan 3 çocukta yayınladı ve bu başarısı ile de Nobel Tıp ödülünü aldı (2).

Kök Hücre Transplantasyonu Kimlere Yapılır? :

Çocukluk çağında allojenik KHT doğumsal ya da edinsel, birçok maliyn ya da non-maliyn hastalıkta uygulanmakta ve geniş bir hasta grubunda tek küratif tedavi seçeneğini oluşturmaktadır (Tablo 1).

Kanser dışı hastalıklarda amaç; yapılamayan, eksik olan bir hücre grubunu yerine koymak (örneğin aplastik anemide çalışmayan Kİ yerine çalışan bir Kİ yerleştirmek), olmayan immun sistemi oluşturmak (doğumsal immun yetmezlikler) ya da Kİ'nde hatalı üretim yapan bir hücre topluluğunu (hemoglobinopatiler, metabolik hastalıklar) ortadan kaldırarak yerine sağlıklıasını yerleştirmektir.

Kanser türü hastalıklarda ise amaç; maliyn hücreyi tamamen ortadan kaldırmak olup allojenik KHT bunu, hastanın vücudunda üretilen donöre ait sağlıklı T-lenfositlerinin ve NK (doğal öldürücü) hücrelerinin, kanser hücrelerine karşı savaşması yoluyla, yani "immunoterapi" yoluyla başarmaktadır. Donore ait immun olarak güçlü T hücreleri maksimal doz kemoterapiye (KT) bile dayanıklı olan tümör hücrelerini ortadan kaldırabilir. Bu etkiye "graft versus lösemi (GVL)" etkisi denir.

Tablo 1: Çocukluk çağında KHT endikasyonları

<p>a. Kanser Türü Hastalıklar</p> <ol style="list-style-type: none">1. Lösemiler : Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Akut Miyeloid Lösemi (AML), Kronik Miyeloid Lösemi (KML), Juvenil myelomonositik lösemi (JMML), Myelodisplastik Sendrom (MDS)2. Lenfomalar : Nüks eden Hodgkin Lenfoma(HL) veya Non-Hodgkin Lenfoma (NHL)3. Histiositozlar : Ailevi Hemofagositik Lenfhistiositoz (FEL) veya dirençli Langerhans Hücreli Histiositoz (LCH)4. Solid Tümörler: Nöroblastoma, Ewing sarkomu, beyin tümörleri (daha çok otolog KHT endikedir). <p>b. Kanser Dışı Hastalıklar</p> <p>Doğumsal:</p> <ol style="list-style-type: none">1. İmmun Yetmezlik Sendromları : Ağır kombine immün yetmezlik (SCID), Wiskott-Aldrich sendromu2. Hemoglobinopatiler: Talasemi major, orak hücreli anemi, Griscelli Sendromu, Chediak-Higachi sendromu3. Kİ yetmezlikleri: Fankoni anemisi, Diamond-Blackfan anemisi4. Metabolik hastalıklar: Osteopetrozis, Depo Hastalıkları / Mukopolisakkaridozlar, Lizozomal hastalıklar, ALD <p>Edinsel:</p> <p>Kİ yetmezlikleri: Ağır Aplastik Anemi, Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri, Myelofibrozis</p>

Ayrıca literatürde başarılı uygulanmış Kostmann sendromu, Aktin disfonksiyonu, Adenozin deaminaz yetersizliği, Pürin nukleosid fosforilaz eksikliği, Bare lenfosit sendromu, Disproporsiyonel büyüme gelişme geriliği ile birlikte giden immün defektler, Aspartilglukozaminüri, Gaucher tip I/III, Krabbe hastalığı, Niemann-

Pick tip B, Wolman hastalığı, Mukopolisakkaridoz tip I, VI, VII, Nöronal seroid lipofusinoz, Fukosidoz, Mannosidoz, Lesh-Nyhan sendromu ve Farber hastalığı olguları vardır.(3)

Kök Hücre Transplantasyonu Nasıl Yapılır?

KHT işlemi 3 aşamada uygulanır.

1. *KHT öncesi hastanın hazırlanması*: Gerek primer hastalığının durumu gerekse organlarda oluşturduğu sekel ve disfonksiyonlar araştırılır ve ayrıca posttransplant gelişebilecek enfeksiyonlar açısından hasta ve donörün mikrobiyolojik incelemeleri yapılır. Ardından hastaya **hazırlama rejimi** denilen myeloablatif (hastanın kendi Kİ'ni ortadan kaldıran) ya da non-myeloablatif ancak mutlaka güçlü immun supresif özelliğe sahip 8-10 gün süren bir ilaç tedavisi – kemoterapi veya radyoterapi (TBI)- uygulanır. Hazırlama rejimi ile amaç; maliyn hastalıklarda, vücutta kalmış olabilecek tüm anormal ve defektif hücrelerin yok edilmesi ve birlikte donore ait kök hücrelerin alıcı tarafından reddinin önlenmesi amacıyla alıcının immunitésinin baskılanmasıdır. Eskiden inanıldığı gibi hazırlama rejimi ile yeni K.İ'ne yer açma düşüncesi ve gerekliliği artık geçerliliğini yitirdi. Donör hücrelerinin yerleşmek ve çoğalmak için gerekli yeri kendilerinin yarattıklarını gösterir güvenilir kanıtlar bulunmaktadır. Hazırlama rejiminde; siklofosamid, busulfan gibi kemoterapotikler ile Anti-timosit globulin (ATG) ve Fludarabin gibi güçlü immunsupresif ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır.

2. *Kök Hücrenin verilmesi* : Vericiden kök hücre 3 farklı yolla toplanabilir : a) Kemik iliği : Ameliyathanede genel anestezi altında Kİ ürünü toplanır. b) Periferik kök hücre: Normalde periferik dolaşan kandaki kök hücre sayısı çok düşüktür. Ancak donöre hematopoetik büyüme faktörü verildiğinde periferik kanda dolaşan kök hücre sayısı artar. Dört-beş günlük (granulosit) büyüme faktörü (G-CSF) uygulaması sonrası bir yada birkaç seansda aferez yöntemi ile kök hücreden zengin mononükleer hücre ürünü toplanır. c) Kordon kanı: Doğumda toplanıp saklanan kordon kanı kök hücreden zengindir. Her 3 kaynaktan toplanan kök hücre sayısı belirlenen minimum sayıyı aştığında intravenöz yolla hastaya verilir. Gerekirse ürün

çeşitli ayıklama işlemlerine tabi tutulur (T-hücrelerin ayıklanması, otolog KHT'da tümör hücrelerinin ayıklanması vb).

3. *Nakil sonrası dönem:* Kök hücre kaynağı, nakil edilen hücre sayısı, uygulanan ayrıştırma işlemlerine bağlı olarak değişmekle birlikte allojenik nakil sonrası granülopoez ve eritropoezin başlaması 2-4 hafta sürer. ABO major uygunsuzluğu olan durumlarda eritropoez daha da gecikebilir. Trombopoezin yeterli hale gelmesi ise genellikle daha uzun sürer ve birkaç ayı bulabilir. Bu dönemde hasta çok yönlü yoğun destek bakım gereksinimi gösterir. Hematopoezin başlaması ile ağır nötropeni ve transfüzyon gereksinimi gibi bazı sorunlar ortadan kalksa da bir allojenik transplantasyonda immunitenin düzelmesi aylar sürer ve bu sürede değişen enfeksiyon spektrumuna rağmen (bakteriyel-mantar enfeksiyonları azalır-viral enfeksiyonlar artar) enfeksiyonlara yatkınlık devam eder. Aktif T hücre rekonstitüsyonu en az 3 ay, B hücre rekonstitüsyonu ise 6 ay sürer. Araya giren enfeksiyonlar (özellikle virüsler), kullanılan ilaçlar (özellikle antivirüs ilaçları), graft versus Host hastalığı (GvHH) ve tedavisinde kullanılan immunsupresyon gibi nedenler immun düzelmeyi olumsuz yönde etkiler.

Donör Seçimi:

Allojenik KHT'da ideal verici HLA genotipik olarak benzer olan kardeşdir. Ancak böyle bir vericinin bulunma olasılığı yaklaşık % 50 civarındadır(3,4). HLA identik kardeşin olmadığı durumlarda, HLA tam veya kısmen uygun akrabalar veya dünyadaki kemik iliği verici bankalarından HLA uygun ya da kısmi uygun gönüllü verici bulunabilir. Genel olarak verici bankalarından uygun verici bulma olasılığı yaklaşık %50-80 civarındadır.

HLA antijenleri vücudun hemen hemen her hücresinde bulunmaktadır, bu antijenler donör T lenfositleri tarafından tanınır. Bu nedenle verici ile HLA uygunsuzluğu arttıkça ve/veya akrabalık azaldıkça (kardeş dışına çıkıldıkça) GVHH, rejeksiyon riskleri artacak dolayısıyla hem kullanılan immun supresyon, hem enfeksiyon riski, hem de mortalite artacaktır(2). Günümüzde altta yatan hastalık, hastanın yaşı, KHT'nun aciliyeti, eşlik eden komorbidite göz önüne alınarak donör seçimi yapılmakta; aciliyeti olmayan nakillerde en güvenli donör aranırken hastalık

riskinin fazla olduğu olgularda daha az uyumlu donörler ile KHT'nin riski göze alınabilmektedir. Yani primer hastalığın riski arttıkça daha riskli transplantlar da artmaktadır(5 ,6). Bu durum riskli nakilleri yapan merkezlerin altyapısının- özellikle mikrobiyolojik inceleme olanaklarının da daha iyi olması gerekliliğini doğurmaktadır.

Kök Hücre Nakli Sonrası Gelişen Komplikasyonlar:

Kök hücre transplantasyonu gerek nakil sonrası erken dönemde, gerekse de yıllar sonra ortaya çıkabilecek komplikasyon riskine sahip bir tedavi yöntemidir. İlk 100 gün dediğimiz nakil sonrası erken dönemde ortaya çıkabilecek komplikasyonlar tablo 2. de görülmektedir. Bunlar arasında “graft versus host hastalığı” (GVHH) ve enfeksiyonlar ilk sıralardadır.

KHT sonrası erken dönemde görülen komplikasyonlar

- Graft versus Host Hastalığı
- Enfeksiyonlar
- Relaps
- Rejeksiyon
- Karaciğerin veno-oklusiv hastalığı (VOD)
- Psikososyal Sorunlar
- Beslenme Sorunları
- Gastrointestinal Sorunları
- Bulantı, kusma
- Mukozit
- Diyare
- Kardiovasküler sorunlar
- Renal /Üriner sistem sorunları (HC)
- Hemorajik sistit
- MSS / Nörolojik sorunlar

1- Graft versus Host Hastalığı: KHT'nun en sık görülen komplikasyonudur. Alıcı ile verici arasındaki genetik farklılık nedeniyle vericiye ait T-lenfositlerin alıcıda, yani hastada oluşturduğu ölümcül olabilen bir immun reaksiyondur. GVHH HLA doku grubu tam uygun kardeşten yapılan transplantasyonlarda bile %10-50 oranında görülebilirken akraba dışı vericilerde bu oran %50-90'ları bulmaktadır. Doku grupları

ya da genetik yapısı ne kadar farklı olan donör kullanılıyorsa ciddi-ağır GVHH riski de o kadar artacaktır. Akut GvHH sıklıkla transplantasyonu takip eden ilk 1 ay (<100 gün) içinde ortaya çıkar. GvHH hedef organları sıklıkla cilt, karaciğer ve barsaklardır. Araya giren viral ve bakteriyel enfeksiyonlar; T hücre aktivasyonu ve sitokin salınımı yolu ile akut GvHH' nı başlatabilir veya mevcut GvHH'nı arttırabilirler. Allojeneik nakillerden sonra tüm hastalar değişik oranlar da GvHH yaşarlar. GvHH'nı kontrol altına almak için yine immunsupresif tedavi uygulandığından enfeksiyon riski artar ya da enfeksiyonların kontrol altına alınması güçleşir. Bu durum hasta izleminde bir kısır döngüye yol açıp hastanın yönetimini güçleştirmektedir. GvHH uzun dönem sağkalımı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Tablo 3'de GvHH'nın klinik evrelemesi, tablo 4'de kronik GvHH'nın klinikopatolojik sınıflandırılması görülmektedir.

Tablo 2: Akut Graft versus Host Hastlığı klinik olarak evrelendirilmesi

Evre	Cilt Bulguları	(Bilirubindüzeyi, mg/dL)	Gİ Bulguları
+	Vücut yüzeyinin <%25 makülopapüler döküntü	2-3	Diare 500-1000 mL/d veya sürekli bulantı
++	Vücut yüzeyinin %25-50 sinde makülopapüler döküntü	3-6	Diare 1000-1500 mL/d
+++	Yaygın eritrodermi	6-15	Diare >1500 mL/d
++++	Deskuamasyon ve büller	>15	Ağrı +/- ileus

Toplam Düzey	Evre			
	Cilt	KC	Gİ	Fonksiyon kaybı
0 (Yok)	0	0	0	0
I (Hafif)	+ - ++	0	0	0
II (Orta)	+ - +++	+	+	+
III (Ağır)	++ - +++	++ - +++	++ - +++	++
IV (Hayatı tehdit edici)	+++ - ++++	+++ - ++++	+++ - ++++	+++

Tablo 3: Kronik GvHH'de Klinikopatolojik Sınıflandırma

Sınıflandırma	Klinikopatoloji
Sınırlı	Kronik GvHH'a bağlı lokal cilt tutulumu ve/veya karaciğer fonksiyon bozukluğu
Yaygın	Yaygın cilt tutulumu veya lokal cilt tutulumu ve/veya karaciğer fonksiyon bozukluğu beraberinde aşağıdakilerden en az biri: - Karaciğer biyopsisinde kronik agresif hepatit, köprüleşme nekrozu veya siroz - Göz tutulumu (Schirmer testinde <5-mm) - Minör tükrük bezlerinin tutulumu ya da biyopsi ile gösterilmiş oral mukoza tutulumu - Diğer hedef organ tutulumu

2- Enfeksiyonlar : Transplantasyona bağlı morbidite ve mortalitenin en büyük nedeni enfeksiyonlardır. Özellikle transplantasyonu takip eden ilk 2–4 haftada, bakteriyel enfeksiyonların sıklığı artmaktadır. Nötropeni, yetersiz fagositoz, sitotoksik ajanlara bağlı mukoza bütünlüğünün bozulması gibi nedenlerden dolayı kök hücre tutunması (engraftman) öncesindeki dönemde bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar daha sıklıkla görülmektedir. Nötropeni süresinin uzaması ve GvHH, bakteriyel ve mantar enfeksiyonu riskini belirgin olarak arttırmaktadır. Engraftman sonrası dönemde ise, nötropeni sorunu düzelmesine karşın, GVHH profilaksisinde kullanılan immünsüpresif ajanların da katkısıyla humoral ve hücrel immünite yetersizdir. Bu dönemde viral enfeksiyonların sıklığı artar. Allojenik KHT yapılan hastalarda Herpes-Simpleks virüs (HSV), varisella-zoster virüs (VZV), sitomegalovirüs (CMV), Epstein-Bar virüs (EBV), adenovirüs, BK-virüs (BKV), respiratuvar-sinsisyal virüs (RSV) ve Human herpes virüs-6 (HHV-6) virüsleri ile yeni enfeksiyon veya reaktivasyon çok ciddi sorun oluşturmaktadır. Reaktivasyon daha sık gözlenen bir durumdur. Özellikle alıcının virüs yükü yokken (o virüs ile karşılaşmamış) verici de virüs yükü bulunması en tehlikeli kombinasyonlardan biridir. Viremiye bağlı mortalite ve morbidite altta yatan hastalığa, nakil şekline (T hücre depleksyonu yapılmış nakillerde ve kordon kanı nakillerinde daha fazla), akut GvHH varlığı ve derecesine, GvHH tedavisinin yoğunluğuna, hastanın yaşına ve nakil öncesi alıcı-verici virüs yüküne bağlı olarak değişir. Çocuk hastaların sadece %25'i posttransplant dönemde viral problemlere bağlı sorun yaşamazlar(1.). Geri kalan hastalarda bir veya birden çok virüsle ilişkili klinik tablo veya viremi gözlenir. Viremi çok hızlı bir şekilde çoklu organ yetersizliği yapabileceği gibi inflamatuvar süreci başlatarak ve T hücrelerini aktive ederek ağır

GvHH tablolarına neden olabileceği için daha klinik bulgular olmadan surveyans takibine göre erken dönemde pre-emptive viral tedavi günümüzde de bir çok nakil merkezinde rutin hale gelmiştir.

Kök Hücre Transplantasyonu ve Mortalite:

En uygun donörle ve en ideal koşullarda yapılmış bir allojenik KHT bile yaklaşık %10 transplantla ilgili mortalite (TRM) riski taşımaktadır(7). Donörün HLA uygunluğu (kim olduğu), primer hastalığın ne olduğu ve hangi durumda olduğu (primer hastalığın maliyn olduğu durumlarda hastalığın evresi ve remisyonda olup olmadığı, non-maliyn hastalıklarda ise primer hastalığın ne kadar organ hasarına yol açtığı), hastadaki komorbid durumların varlığı, kullanılan hazırlama rejimi, nakli yapan merkezin tecrübesi, merkezin alt yapısı ve mikrobiyolojik inceleme olanakları bu riski %50-70'lere kadar çıkarabilmektedir.

Allojenik KHT yapılan olgularda gelişen mortalitenin sebebi %30 olguda primer hastalıkken, %70 olguda transplantla ilişkilidir. TRM sebepleri arasında ise enfeksiyonlar önemli bir yere sahiptir. TRM'yi oluşturan sebeplerin %20'si enfeksiyonlar, %20'si organ toksitesi, %15'i GvHH'ı ve %20 diğere nedenlerdir (.6).

Dünyada ve Türkiye'de KHT:

Halen dünyada çocuklar ve erişkinlerde yılda yaklaşık 45.000 nakil (15.000'i allojenik, 30.000'i otolog) yapılmaktadır. Tüm dünyada kayıtlı yaklaşık 10 milyonun üstünde gönüllü kök hücre vericisi bulunmaktadır (Almanya'da her yıl 400'ü çocuk olmak üzere yaklaşık 3500 nakil yapılmaktadır) Türkiye'de çocuklarda, 1988-2010 yılları arasında 13 farklı merkezde, yaklaşık %83'ü allojenik olmak üzere toplam 1438 KHT yapıldı (3). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediyatrik Kİ-Kök hücre Transplantasyon merkezi ilk kez 1998'de Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı içerisinde allojenik KHT'a başlamış, 2004 yılından bu yana kendi ünitesinde olmak üzere toplam 154 olguya KHT yapıldı.

Kimerizm:

Spontan ya da insan müdahalesi ile aynı ya da farklı cinsten iki farklı canlıya ait hücre bulunduran organizmalar için “kimera” terimi kullanılır. Dizigotik ikizler arasında gelişen karşılıklı transfüzyon sonrasında bebeklerin hem kendilerine hem de ikizlerine ait hücreleri taşıması iyi bir spontan kimera örneğidir. (8). 1966’da Ford ve arkadaşları (9) farelerde total vücut ışınlaması ile yarattıkları kemik iliği aplazisini,, aynı batında doğan kardeşinden verilen kök hücre ile düzelterek hematopoetik sistemin yeniden oluşmasını sağladılar. Bu bulgu “radyasyon kimerası” teriminin gelişmesine sebep olmuştur (8). Günümüzde “kimerizm” terimi, hızla kök hücre transplantasyonu klinik kullanımına girdi ve allojenik KHT alıcısında gelişen hematopoezin, alıcı ve vericinin hücrelerini bir arada içermesini ifade etmektedir.

Kimerizm; allojenik KHT sonrası alıcının kan ya da Kİ’de donör ve alıcıya ait hücrelerin oranının belirlenmesidir. Hastada (alıcıda) yapılan kimerizm analizi, tam donör hematopoezini ve/veya alıcı hücre varlığının devamını göstermesi açısından önemlidir(10,11).

KHT yapılırken amaç, hastanın altta yatan primer hastalığına bağlı olarak değişmekle birlikte öncelikle alıcıda hematopoezin tümünü donör kökenli olarak değiştirmek yani tam donör kimerizmine ulaşmaktır. Hematopoezin tam donör kökenli olması; özellikle akut lösemilerde önemlidir. Bu olgulardaki rezidüel alıcı hücrelerinin hastalık relapsına yol açma riski vardır (12). KML gibi kronik lösemilerde ise, başlangıçta nispeten düşük bulunan donör hücreleri graft versus lösemi etkisiyle minimal rezidüel hastalığı kontrol edebilmekte ve hastalık relapsına engel olabilmektedir(13). Non-maliyn hastalıklarda ise hangi orandaki donör hücresinin hastalık bulgularını ortadan kaldıracığı tam bilinmemekte ve bu konudaki çalışmalar devam etmektedir. Örneğin talasemi majorda kalıcı-azalmayan %20 oranındaki donör hücresi bile hastalığı kontrol edebilmekte ve transfüzyonsuz yaşam sağlayabilmektedir (14).

Kimerizm incelemesi klinik uygulamada aşağıdaki alanlarda bize bilgi sağlamaktadır:

1. Hasta engrafman oldu mu? (ne oranda olursa olsun donör hematopoezi sağlanabildi mi? Kİ tuttu mu?)
2. Engrafman sonrası rejeksiyon oluyor mu? İzlemede donör kökenli hücrelerin oranının giderek azalıyor olması donör kemik iliğinin reddinin işaretidir.
3. İyi bir GvL etkisi var mı? Relaps olasılığı artıyor mu? Maliyn hastalıklarda donör kökenli hücrelerin oranının giderek azalıyor olması GvL etkisinin de azaldığının ve ayrıca rezidüel tümör hücrelerinin de artışının habercisidir.
4. Alıcıda donör hücrelerini arttırmak için tedavi gerekli midir?

Alıcıda KHT sonrası belli aralıklarla yapılan kimerizm analizi sonucu aşağıdaki tanımlamalar kullanılmaktadır:

Komplet (Tam) Donor Kimerizmi: İncelenen hücrelerin tamamı verici kökenlidir. Sıklıkla %95 ve üzeri donör hematopoetik hücre saptanması olarak kabul edilir.

Mikst (Karma) Kimerizm (KK): İncelenen örnekte alıcı kökenli hücrelere rastlanmasıdır. Genelde en az % 5-10 verici hücre olması gereği vurgulanmaktadır. Fakat değerlendirme için kullanılan yöntemin duyarlılığı ve değerlendirilen komponent ve altta yatan hastalık önemlidir. Bu nedenle güvenilir bir yöntemle her türlü alıcı kökenli hücre saptanması "karma kimerizm" olarak değerlendirilmelidir. Bu durum üç alt biçimde karşımıza çıkmaktadır.

1. **Azalan KK:** Ardışık ölçümlerde konakçı hücrelerinin azalması ve verici tipi hücrelerin artışı. Kullanılan yöntemle göre ardışık ölçümlerde % 5 veya %10'dan fazla azalma anlamlı olarak değerlendirilir (15). Olumlu bir göstergedir.
2. **Artan KK:** Ardışık ölçümlerde konakçı hücrelerinin artması ve verici tipi hücrelerin azalışı, graft kaybı ile sonuçlanabilir. Kullanılan yöntemle göre ardışık ölçümlerde % 5 veya %10'dan daha fazla artma anlamlı olarak değerlendirilir (15). Olumsuz bir göstergedir, graft kaybını yansıtır.
3. **Sabit (stabil) KK:** Ardışık ölçümlerde alıcı ve verici tipi hücrelerin oranının

belirgin değişkenlik göstermeyip sabit dengeli kalması durumudur. Bu tipin de kalıcı (persistan) hastalık kontrolünü sağlayan ve immünoterapi gereksinimi olmaksızın devamlılık gösteren tipi ile, bir süre sonra artan KK ile gelişen ve nüksle sonuçlanan formları mevcuttur. Kalıtsal metabolik ve hematolojik hastalıklarda ve konjenital immün yetmezliklerde sağaltım için yeterlidir.

Kimerizm analizini sağlıklı değerlendirebilmek için longidütinal (uzun süreli) izlemi gereklidir. Bu izlemin ne sıklıkla olacağı altta yatan primer hastalığa ve hastanın bir önceki analiz sonuçlarına bağlıdır. Genel olarak nonmaliyn hastalıklarda 1.,2.,3.,6.,9.,12., 18., 24.ay ve daha sonra yılda bir izlem önerilirken maliyn hastalıklarda ilk 200 gün haftalık izlemler önerilmektedir. Hastanın sonuçlarına göre izlem kararında ise ilk analizlerde KK varsa rutin izlem şeması kullanılırken, MK varsa daha sık izlem yapılır. MK'in stabil olduğuna karar verilirse tekrar izlem sıklığı rutin uygulamadakine uygun seyreltilir (11).

MK'in tedavisinde, donör kökenli hücrelerin artırılması amacıyla ilk yapılacak şey hastanın immunsupresif tedavisinin kesilmesidir. Yakın izlemde bu uygulama yeterli olmazsa donörden alınan lenfositler hastaya IV yolla verilir. Donör Lenfosit İnfüzyonu (DLI)'nun gerekirse tekrarlanması gerekir. Böylece hem rejeksiyona engel olunabilirken aynı zamanda GvL etkisi arttırılmış olur (16).

KHT sonrası kimerizm oranlarını çeşitli faktörler etkilemektedir. Alıcının primer hastalığı, uygulanan hazırlama rejimi, graft versus host hastalığı (GVHH) profilaksisi, KHT takiben gelişen kimerizmi etkilemektedir (17). Maliyn hematopoetik hastalıklarda klasik myeloablatif hazırlama rejiminde istenen sonuç tam donor kimerizmidir, ancak diğer sonuçlar da mümkündür. Myeloablasyonun uygulanmadığı durumlarda (nonmyeloablatif hazırlama rejimi) MK sıktır. Örneğin ağır aplastik anemilerde kullanılan siklofosamid içeren standart hazırlama rejimi non-miyeloablatifdir ve bu sebepten dolayı farklı düzeylerde miks-kimerizm ile sonuçlanabilir (18). Azaltılmış-yoğunlukta hazırlama rejimlerin (RIC= myelo-ablatif) kullanıldığında hematopoetik kimerizm daha dikkatli incelenmeli, gereğinde donor lenfosit infüzyonu (DLI) ile müdahale edilmelidir.

Hematopoetik kimerizm ölçümünde kullanılan teknikler:

İlk başlarda, cinsiyet uyumsuzluğu bulunan nakillerde kimerizm ölçümü için

karyotiplendirme kullanıldı (10), daha sonra farklı sensitivitede birçok test denendi. Bugün en geniş kullanıma sahip yöntem; KHN sonrası konak ve verici profilleri arasında polimorfik DNA markerlarının analizi ile araştırılabilir. Nükleer DNA'nın protein sentezi yapılmayan bölümlerinde kısa ardışık tekrarlar (Short Tandem Repeats-STR) olarak tanımlanan yüksek polimorfik özelliğe sahip gen bölgeleri bulunmaktadır. Günümüzde dünyada en sık kullanılan yöntem olan ve kliniğimizde kullanılan STR-PCR tekniği yüksek sensitiviteye sahip olup tüm hasta ve verici gruplarında kullanılabilir. Değişken sayıda tandem tekrarlar (VNTR-PCR) yöntemi STR-PCR yöntemine benzer bir teknik kullanmasına rağmen sensitivitesinin daha düşük olması ve her zaman kantitatif sonuç verememesi nedeniyle daha az sıklıkla tercih edilmektedir. Diğer kimerizm ölçüm metodları arasında olan sekans-spesifik primer (SSP) metodunda Human-leucocyte Antigen (HLA) kullanılması nedeniyle tam uygun verici ve alıcı arasında kullanılamamakta, ayrıca sensitivitesi düşük olmasının yanında kantitatif sonuç verilememektedir. Fluorescence in situ hybridization (FISH) tekniği ile cinsiyet üzerinden bakılan teknik, STR-PCR tekniğine yakın sensitiviteye sahip olmasına rağmen alıcı verici arasında cinsiyet uyumu olduğunda kullanılamamaktadır. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP-PCR) yeni kullanılmaya başlanan bir teknoloji olup STR-PCR'dan daha yüksek sensitivitesinin olması beklenmektedir. Ancak şu ana kadar üstünlüğü kanıtlanamadı(10).

Farklı hasta gruplarında allojenik KHN sonrasında kimerizm analizinin önemi

1- Lösemiler:

Akut lösemi tedavisinde uygulanan allojenik KHT'da ilk yıllarda hedeflenen, alıcı hematopoetik dokusunu tamamen yok etmek (myeloablatif hazırlama rejimi kullanarak) ve ardından donör kökenli hematopoezi yerleştirmekti. Ancak lösemilerde KHT asıl faydasını GVL etkisiyle minimal reziduel hastalığı kontrol altında tutarak (immunoterapi) göstermektedir ve bu durumun anlaşılması, alıcı hematopoezinin tamamen ortadan kaldırılması gerektiği anlayışını değiştirdi, nonmyeloablatif hazırlama rejimlerini de gündeme getirdi. Kimerizm analizi için daha sensitif tekniklerin gelişmesi ile birlikte mevcut lösemilerin relapsı olmadan da mik

kimerizmin olabileceği anlaşıldı. Örneğin doku grubu uygun akraba dışı vericiden yapılan nakillerden sonraki 6-9 ay arasında geçici miks kimerizm görülebilir ve bu olgularda GvHH riskinin de daha düşük olduğu gözlemlendi (immün tolerans). Eğer miks kimerizm stabil devam ediyorsa, bulunan donör T hücreleri GVL yoluyla hastalığı kontrol edebilir. Ancak ardışık izlemde artan MK geliyorsa bu durum relapsı işaret edebilir ve bu olgulara hızla donör hematopoezini artıracak tedaviler (immüsupresif tedavinin kesilmesi ve DLI) uygulamak gerekir (12).

KML'de KHT sonrası hastanın izleminde kimerizm analizi ile birlikte Bcr/Abl kopya sayısı da kullanılır. Genellikle kimerizde donör hücre oranının azalması (artan MK) Bcr/Abl kopya sayısının azalmasına paraleldir. Bu durumda uygulanacak DLI relapsa engel olabilir.

Non-myeloablatif rejimlerin kullanılması (hazırlama rejiminin yoğunluğunun azaltılması) ve immün supresyonun artırılması ile donör hücrelerinin verilmesi sonrası bir süre hematopoetik miks kimerizm gözlenir. Prensipite verici hücreleri zaman içerisinde üstünlük sağlayarak Graft versus Lösemi (GVL) etkisini gösterecektir. Bu durumu kolaylaştırmak için stabil MK veya artan MK durumunda GVHH riski göze alınarak DLI uygulanır.

2- Ağır Aplastik Anemi:

Ağır aplastik anemi (AAA)'nin tedavisinde son derece başarılı olmasına rağmen KHT bu hasta grubunda akut ve kronik lösemilerden son derece farklıdır. Bugünkü hazırlama rejimleri (ATG'li veya ATG'siz, siklofosfamid içeren) miyeloablatif değildir. Bu nedenle miks kimerizm sık görülmektedir ve stabil miks kimerizm iyi sonuç ve düşük GvHH riski ile birlikte. Artan miks kimerizmin ortaya çıkması ise genellikle relaps/graft rejeksiyonunun öncül bulgusudur. Rejeksiyon donör engraftmanı kanıtlanmadan erken olabilir ya da geçici miks kimerizm sonrasında konak hücrelerinin artması ile birlikte geç olabilir. AAA'de stabil miks kimerizm hastalığın ortadan kalkmasını (sağlıklı hematopoezi) sağlarken aynı zamanda immün tolerans etkisiyle GVHH riskinin de azalmasına neden olabilir. Tam donör kimerizminde ise GVHH eşlik etmesi riski daha fazladır. Bu durumda aplastik anemide amaç tam donör hematopoezini sağlamak değil, GVHH olmaksızın hastalığı ortadan kaldırmaktır. Bu sonucu oluşturacak donör hücre oranı

yeterlidir(19-21).

3- Hemoglobinopatiler

Talasemi major KHT sonrası engraftman yetmezliği ve rejeksiyon riskinin en fazla olduğu hastalık gruplarından biridir. Bu nedenle posttransplant kimerizm izlemi rejeksiyonun öngörülmesi ve erken tedavinin (immunsupresyonun kesilmesi ve DLI) açısından önemlidir. Bu hasta grubunda posttransplant 2. aydaki erken MK greft reddi için bir risk faktörüdür ve hastanın hücre kalıntısının oranı rejeksiyon riski ile orantılıdır (14) B nedenle erken saptanan MK durumunda hızla tedavi planlanmalıdır. Uzun dönemde stabil MK sağlanabilirse % 20 donör hücresi ile bile hemoglobin yeterli düzeyde tutulabilir, transfüzyonsuz yaşam mümkün olabilir ve dolayısıyla talasemi klinik olarak kontrol edilebilir (22).

Sonuç olarak; beniyin ve maliyn hematopoetik bozukluklarda KHT sonrasında engraftmanın saptanması için kimerizm çalışılmaları şarttır, azaltılmış yoğunlukta hazırlama rejimi kullanılan KHT hastalarında DLI gereksinimi belirlemek için kimerizm durumunun bilinmesi gerekmektedir, kimerik analiz olmadan otolog rekonstitüsyon (KHT sonrası hastanın kendi hematopoezinin geri dönmesi) ve verici lösemisi gibi tanılar konamaz. Ayrıca beniyin hematopoetik bozukluklarda tam verici kimerizmi gerekli değildir.

HASTALAR VE YÖNTEM

Hastalar:

Bu çalışma Mart 2005- Nisan 2010 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Pediatrik Kök Hücre Transplantasyon Ünitesinde allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu yapılmış ve ilk bir yıl içerisinde en az bir kez kimerizm analizi yapılmış hastaların, kayıtlarının geriye dönük olarak incelenmesi ile yapıldı. Bu standartlara uyan toplam 95 transplantasyonun verileri toplandı. Veriler toplanırken ve yorumlanırken aşağıdaki yol izlendi:

- Hasta ve donör verileri, uygulanan KHT'nun özellikleri, KHT sonrası gelişen komplikasyonlar, KHT'nun sonucu ile ilgili verilerin toplanması,
- Hastaların bakılan tüm hematopoetik kimerizm sonuçlarının kaydedilmesi ve yorumlanması
- Kimerizm başarısını etkileyen klinik ve laboratuvar faktörlerin araştırılması
- Tüm olgularda sağkalımı etkileyen faktörlerin belirlenmesi
- Kimerizm sonuçları ile sağkalım arasındaki ilişkinin araştırılması

Bu çerçevede kullanılan veriler:

- 1- *Hasta ve donör verileri:* Hastanın yaşı, cinsi, primer tanısı, primer hastalığın KHT sırasındaki durumu, pre-transplant CMV durumu, donörün yaş ve cinsiyeti, CMV durumu, haysa yakınlığı (kardeş, akraba, akraba dışı), hastayla HLA uyumu
- 2- *Uygulanan KHT'nun özellikleri:* Uygulanan hazırlama rejimi (myeloablatif-nonmyeloablatif), hazırlama rejiminde kimerizme etkili olabilecek ATG, TBI, Fludarabin ve busulfan kullanımı, busulfan'ın dozu ve verilme yolu. Her transplantasyon için kök hücre kaynağı (kemik iliği, periferal kan, kordon kanı), verilen çekirdekli hücre ve CD34+ hücre sayısı, nakil sonrasında G-CSF kullanımı ve GvHH profilaksisi için kullanılan tedaviler, Donor Lenfosit İnfüzyonu uygulamaları
- 3- *KHT sonrası gelişen komplikasyonlar:* Karaciğerin veno-oklusif hastalığı (VOD), akut ve kronik GvHH gibi komplikasyonların varlığı, başlama zamanları (KHT sonrası gün olarak) ve ciddiyeti.

- 4- *KHT'nun sonucu (outcome)*: Ölüm ve primer hastalığın nüksü, zamanlaması, ölüm nedeni not edildi. Her hasta için genel sağkalım (KHT'dan son görüldüğü tarihe kadar geçen süre) ve hastaliksız sağkalım (KHT'dan ölüm veya hastalık nüksüne kadar geçen süre) hesaplandı.
- 5- *Kimerizm analizi ve yorumlanması*: Hastalarda rutin kimerizm analizi çalışma takvimi 1., 2., 3., 6., 9. ve 12., 18., 24. Ay ve sonra yıllık olarak planlanmıştır. KK saptanan hastalarda bu takvime uyulurken herhangi bir örnekte MK saptananlarda daha sık aralarla analize devam edildi (rejeksiyon yada KK sağlanıncaya kadar). Bu çalışmada; ilk bir yıl içerisindeki aylara ait kimerizm sonuçları değerlendirildi. Buna göre tam donör kimerizmi ve miks kimerizm oranı belirlendi. Longitudinal izlemde, artan ve azalan MK oranı, bu durumu gösteren hastanın hasta sayısının yetersizliği nedeniyle sağlıklı değerlendirilemedi.
- 6- *Kimerizm başarısı*: İlk 100 gün içerisinde yapılan hematopoetik kimerizm analiz sonuçları temel alındı. Bunun için ilk olarak hastanemizde bu analizin düzenli olarak yapılmaya başlandığı 2005 yılı ile 2010 yılı arasında ilk 100 gün içerisinde en az bir kimerizm sonucu olan tüm olgular değerlendirmeye alınması planlandı. 100 günden uzun süre izlenen (transplantasyon tarihi üzerinden 100 günden fazla geçen ve 100 günden daha uzun yaşamış) hastaların tamamı bu açıdan değerlendirmeye alındı. İlk 100 gün içerisinde hastalığın nüksüne bağlı veya transplantasyon ilişkili bir nedenle ölmüş olan hastalar da o güne kadar alınan kimerizm sonuçları ile kimerizm başarısı analizine alındı. Ancak transplantasyondan sonra 100 günlük süreyi doldurmayan hastalar çalışmaya alınmadı, Bu nedenle 95 hastadan dördü (%4) çalışmaya dahil edilmedi. Bunlardan birine (primer akkiz aplastik anemi) birinci ay hematopoetik kimerizm değeri %71 olmasına rağmen yeniden aplazi izlenmesi üzerine kimerizm analizi yapılmadan rejeksiyon kabul edilip 100. gün dolmadan tekrar allojenik kök hücre nakli yapıldı. Diğer 3 hasta (Talasemi Majör, AAA ve ALL) henüz ilk 100 güne ait kimerizm sonuçlarının elde edilememesi nedeniyle çalışmaya alınmadı.

Kimerizm Başarısının değerlendirilmesi:

i. Maliyn hastalıklarda kimerizm başarısı : \geq %95 ve üzerinde donör hematopoetik hücre kimerizmi (23,24).

ii. Non-maliyn hastalıklarda kimerizm başarısı : \geq %70 donör hematopoetik hücre kimerizmi. Non-maliyn hastalıklarda Miks Kimerizm de sağaltım için yeterli olduğundan, eğer hastalık bulgusu yoksa %70 ve üzeri donör hematopoetik hücresi kimerizm değeri yeterli olarak kabul edild (25-27).

Kimerizm çalışma yöntemi :

Kimerizm analizleri için örnekler, pretransplant hasta ve donörde periferik kan örneklerinden, KHT sonrası hastadan 30. günde kemik iliğinden, diğer zamanlarda periferik kandan alındı. EDTA'lı alınan örneklerde tüm kimerizm analizleri "Tıbbi Genetik Anabilim Dalı" tarafından AmpF/STR® Identifiler® PCR Amplification Kiti kullanılarak yapıldı. Applied Biosystem tarafından üretilen STR bazlı bu tanımlayıcı kit, insan tanımlama uygulamalarında en yüksek ayırım yeteneğine sahip olup en geniş çaplı kullanılan kittir. 15 lokusu ve bir de Amelogenin tek tüp içerisinde çoğaltıp dünya çapında kullanılan STR veritabanı standartlarına uygun lokuslar sağlar.

DNA izolasyonu yapılan örneklerden Amelogenin, D8S, D21S, D7S, CSF, D3S, THO1, D13S, D16S, D2S, D19S, VWA, TPOX, D18S, D5S ve FGA gen bölgeleri PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile çoğaltılmış ve ardından ABI Prism™ 310 genetik analizatöründe Gene Scan programı kullanılarak bu gen bölgeleri açısından tiplendirildiler. Verici ve alıcıdan alınan kan örneklerinden Chelex yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış, izole edilen DNA'nın çoğaltılması amacıyla uygulanan PCR aşamasından sonra temeli elektroforez sistemine dayanan genetik analiz cihazı ile genetik tiplendirme yapıldı; ilk başlarda radyoaktif işaretli primerler kullanılırken günümüzde ise floresant primerleri kullanılmaktadır. 15 adet STR ve bir adet cinsiyet primeri içeren panel üç florofordan bir tanesi ile işaretlenir. Amplifiye edilecek ürünün büyüklüğü ve florofor seçimi ile primerlerin, jel veya kapiller elektroforez bazlı DNA sekans tanıma sisteminde ayırt edilmesi sağlanır. Elektroforez sırasında floroforların lazer ışını ile uyarılması florosan amplikasyon ürünlerinin farkedilmesini sağlar, bu sayede Gene Scan ve benzeri programlarla verici ve alıcı profillerinin tayinine izin verir. Florosan-PCR analizi ile hastanın KHT sonrası kimerizm durumu ortaya kondu. Hücre gruplarına spesifik kimerizm analizi

yapılmadı.

Posttransplant alınan sonuçlar hastanın ve donörün pretransplant sonuçları ile karşılaştırılarak hangisine ne oranda benzerlik gösterdiği belirlendi.

İstatistiksel yöntem :

Toplanan bu nominal değişkenler için tek değişkenli sağkalım analizleri Kaplan-Meier yöntemine göre yapıp, istatistiksel olarak anlamlı farkların saptanması için iki-kuyruklu log-rank analizi kullanıldı (28). Bu testlerin sonunda p değeri <0.1 olan parametreler çok değişkenli sağkalım analizine alındı. Hem kesintisiz parametreler için tek değişkenli sağkalım analizi yapılabilmesi hem de çok değişkenli sağkalım analizi için Cox orantılı risk modeli (Cox proportional hazards modeli) uygulandı. Kimerizm başarısı üzerine etkili nedenlerin araştırılmasında ise probit regresyon analizi kullanıldı. Çalışmadaki tüm bağımsız parametreler dahil edilerek yapılan değerlendirme sonucunda istatistiksel olarak anlamsız parametreler ayıklanarak probit modeli tekrarlandı (29). Tüm bu değerlendirilmeler için STATA programı kullanıldı.

BULGULAR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde 2005-2010 yılları arasında allojenik KHT yapılmış ve ilk 100 gün içerisinde kimerizm analizi yapılmış toplam 95 hastanın 58'i erkek, 37'si kız olup (E/K:1.56) yaş ortalaması 102 ay (8.5 yıl) \pm 102 ay, (minimum 1.5 ay-maksimum 18.5 yaş) idi. Primer hastalık 33 olguda maliyn, 62 olguda non-maliyn özellikte olup 3 ana grup öne çıkmaktaydı [Kemik iliği yetmezlikleri (%25), Talasemi major (%24), Lösemiler(%28)].

Primer hastalık tanıları; akut ve kronik lösemiler 27 olgu (%28), ağır akkiz aplastik anemi 15 olgu (%16), konjenital Kİ yetmezlikleri (Fankoni aplastik anemisi, Diamond Blackfan anemisi ve Wiscott-Aldrich) 9 olgu (%10), talasemi major 23 olgu(%24), doğumsal immun yetmezlikler (SCID, Kronik granuloz hastalık, ve OMEN Sendromu) 9 olgu (%10), histiositoz [Langerhans hücreli histiositoz (LCH) ve hemogagositik lenfositosis(HLH)] 3 olgu (%3), Hodgkin ve Non-Hodgkin Lenfoma 3 olgu (%3) idi. Konjenital Metabolik hastalıklar (Adrenolökodistrofi, Osteopetrozis) 9 ise Tablo 4`de olguların demografik özellikleri ve primer tanıları özetlendi.

Tablo 4: Hastaların demografik özellikleri

		Hasta sayısı (n)	%
Cinsiyet		95	100
	Kız	58	61
	Erkek	37	39
Yaş(ortalama)(ay \pm SD)		102 \pm 102	
Primer Hastalık	Maliyn	33	35
	ALL	15	16
	AML	10	11
	KML	2	2
	Histiyotisoz	3	3
	Lenfoma	3	3
	Non-Maliyn	62	65
	Talasemi Major	23	24
	Ağır Aplastik Anemi	15	16
	Fankoni anemisi	6	6
	Diamond Blackfan An.	2	2
	Wiscott-Aldrich	1	1
	Doğumsal Immun Yetm.	9	10

	Metabolik Hastalıklar	6	6
--	-----------------------	---	---

Donör olarak 75 olguda kardeş, 14 olguda anne veya baba ve 6 olguda akraba dışı verici kullanıldı. Donör 75 olguda (%79) HLA tam uygun kardeş (MSD), 9 olguda (%10) tam uygun veya 1 antijen uygunsuz anne ya da baba (MRD), 6 olguda (%6) tam uygun veya 1 antijen uygunsuz akraba dışı verici (MUD), 5 olguda (%5) haploidentik anne ya da baba idi. Olguların 33'ünde (%35) verici kız, alıcı erkekti. Kök hücre kaynağı 55 (%58) olguda periferik kan, 31 (%33) olguda kemik iliği, 1 olguda (%1) kordon kanı, 8 olguda (%8) ise kemik iliği ve kordon kanı birlikteydi. SCID tanılı 3 olguda hazırlama rejimi kullanılmazken, 65 olguda myeloablative, 27 olguda ise nonmyeloablative (akiz aplastik anemi, fankoni anemisi, ağır komorbidite) hazırlama rejimi uygulandı. Olguların %94'ünde alıcı, %88'inde ise verici CMV IgG (+) idi. Olgulara median 4.5×10^8 /kg çekirdekli hücre (minimum: 1.22×10^8 /kg, maksimum: 43.4×10^8 /kg) ve yine median 5×10^6 /kg CD34 (+) hücre (minimum: 0.27×10^6 /kg, maksimum: 44.4×10^6 /kg) verildi. GVHH profilaksisinde 30 (%32) olguda tek başına siklosporin (CSA) verilirken 57(%60) olguda CSA'a metotreksat, ve 1 olguda da MMF eklendi (Tablo 5).

Nötrofil engrafmanı (absolü nötrofil sayısı $\geq 500/\text{mm}^3$) 88 (%93) olguda ortalama 17. günde (9-36. gün) sağlandı. Grade II-IV akut GVHH 23 (%24) olguda ortalama 24. günde (aralık: 7-72) gelişti. Kronik GVHH 23 (%24) olguda izlendi (Ortalama 194. günde) . Sekiz olguda (%8) karaciğerin veno-oklusif hastalığı (VOD) gelişti. Toplam 28 hastada, ortalama 4 ayda (aralık: 1-18 ay) hastalık nüksü veya ölüm gerçekleşti, bunların 8 (%9) tanesinde nüks gelişmeden hasta kaybedildi. Yirmibirinde tanesi (%23) hastalık nüksü gelişti ancak bunların sadece yedisi kaybedildi. Ortalama 22 aylık izlemin sonunda yaşam oranı (OS) %84 bulunurken, hastaliksız yaşam oranı % 70 olarak saptandı (Tablo 5).

Tablo 5: Transplantasyon Özellikleri

		Hasta sayısı (N)	%	No	Aralık
Donör	Kardeş	75	79		
	Anne-Baba	14	15		
	Akraba Dışı	6	6		
Donör ve HLA uyumu(*)	MSD	75	79		
	MRD	9	10		
	MMRD	5	5		
	MUD	6	6		
HLA-uyumu	6/6 veya 10/10 ag uyumu	84	88		
	Tek ag. uyumsuzluğu	6	6		
	Haploidantik	5	5		
Alıcı ve verici cinsiyet farkı	E E	25	26		
	K K	19	20		
	E K	17	18		
	K E	33	35		
Kök hücre Kaynağı	Periferik Kan	55	58		
	Kemik iliği	30	42		
	Kordon Kanı	1	1		
	Kemik iliği+Kordon kanı	8	8		
Hazırlama Rejimi	Yok	3	3		
	Myeloablatif	65	68		
	Nonmyeloablatif	27	28		
	Fludarabine var	19	20		
	ATG var	30	32		
CMV durumu	Alıcı CMV pozitif	89	94		
	Verici CMV pozitif	84	88		
	Çekirdekli hücre (NC) (x 10⁸/kg) Median			4.5	1.2-43.4
	CD34(+) hücre sayısı (x10⁶/kg) Median			5	0.2-44.4
GVHH profilaksisi	CSA	30	32		
	CSA+MTX	57	60		
	CSA+MMF	1	1		
	Profilaksi almadı	7	7		
	Posttrans. rutin G-CSF kullanımı	31	33		
	BK engraftmanı (ANS≥500/mm ³) var Ortalama gün	88	93	17	(9-36)
AGVHH	Evre 0-1	72	76		
	Evre 2-4	23	24		
Kr GvHH	Yok	72	76		
	Sınırlı	13	14		
	Yaygın	10	11		
	VOD	8	8		
Hastalık nüksü	Var	22	23		
	Yok	73	77		
Son durum	Yaşıyor	80	84		

	Öldü	15	16		
	Hastalısız sağkalım (EFS)			20	(1-58)
	Tüm Sağkalım (OS)			22	(1-59)

Kimerizm :

En az 1 kez kimerizm sonucu olan 95 hastanın 67'sinde tam kimerizm (KK: \geq %95 donör kimerizmi), 20 tanesinde maksimum 12 aylık izlem sırasında en az bir kez miks kimerizm (MK: $<$ %95 donör kimerizmi) saptandı. MK saptanan ve en az 2 kimerizm sonucu olan 20 hastanın 3'ünde artan MK, 12'sinde azalan MK ve 5'inde stabil MK saptandı.

Hematopoetik kimerizm başarısı (donör hücre oranı : maliyn hastalık \geq %95, non-maliyn hastalık \geq %70) ilk 100 gün içerisinde kimerizm sonucu olan ve KHT sonrası en az 100 gün izlenen 91 hastada değerlendirildi. Kimerizm başarısı değerlendirmesine alınmayan 4 hastanın 3'ünde alınmama nedeni nakilden sonraki 100 günlük izlemi tamamlamamasıydı. Bir olguda ise (Primer tanı: akkiz aplastik anemi) posttransplant 1. ayda hematopoetik kimerizm değeri %71 olmasına rağmen kan değerlerinde tekrar aplazi saptanması üzerine kimerizm analizi tekrarlanmadan rejeksiyon olarak kabul edilerek 100 gün dolmadan tekrar KHT yapıldı.

Kimerizm başarısı değerlendirilen 91 hastanın 4 tanesi (primer tanıları KML, ALL, Konjenital İmmun Yetmezlik ve Histiyoitoz) ilk 100 günde transplantasyon ile ilişkili nedenlerle kaybedildi. Bu hastaların verileri dışlandığında da istatistiksel olarak sonuçların değişmemesi nedeniyle çalışmaya hastaların ex olduğu tarihe kadarki kimerizm değerleri ile dahil edilerek sonuçlar değerlendirildi.

KHT sonrası ilk 100 günde kimerizm başarısı değerlendirilen 91 olgunun 77'sinde (%85), maliyn hastalık grubunda olan 32 olgunun 27'sinde (%84) ve nonmaliyn hastalık tanısı olan 59 hastanın 50'sinde (%86) başarılı kimerizm saptandı. Tablo 6'da olguların kimerizm sonuçları ve kimerizm başarı oranları izlenmektedir.

Tablo 6: ilk 100 gün kimerizm başarısı sonuçları

	Hasta sayısı N	Kimerizm başarısı	%
Kimerizm sonuçları	95		100
Tam kimerizm (KK)	67		70
Miks kimerizm (MK)	28		30
<i>En az 2 analizi olan ve MK saptanan</i>	20		
<i>Artan MK</i>	3		
<i>Azalan MK</i>	12		
<i>Stabil MK</i>	5		
Kimerizm başarısı için değerlendirilmeye alınan hasta sayısı (ilk 100 gün)	91	77	85
Maliyn hastalık grubu	32	27	84
Nonmaliyn hastalık grubu	59	50	86

Longitudinal izlemde saptanan MK olgularındaki değişimleri (artan, azalan, stabil MK) etkileyen faktörler bu gruptaki hasta sayısının azlığı nedeniyle analiz edilemedi. Posttransplant hematopoetik kimerizmi (hastadaki donör kökenli hematopoetik hücre oranını) etkileyen faktörleri ve sağkalımla ilişkisini araştırırken, olgularda KHT sonrası ilk 100 gün içindeki kimerizm başarısı temel alındı.

Kimerizm Başarısı Üzerine Etkili Nedenler:

Kök hücre transplantasyonu sonrası ilk 100 içerisinde saptanan kimerizm başarısını etkileyen faktörler (diğer bağımsız parametreler) probit regresyon analizi ile değerlendirildi. Bunlar arasında hastanın yaşı, tanının maliyn ya da nonmaliyn olması, hasta ve donör arasındaki cinsiyet farkı, hazırlama rejiminin myeloablatif ya da nonmyeloablatif olması, hazırlama rejiminde ATG ya da Fludarabin kullanımı ve kullanılan kök hücre kaynağı, posttransplant rutin G-CSF kullanımı ile kimerizm başarısı arasında ilişki bulunmadı (Tablo 7). Donörün HLA tam uyumlu kardeş olması [risk ratio (RR) 0.15, 95% CI 0.10–0.20], GvHH profilaksisinde CSA + MTX kullanımı (RR 0.18, 95% CI 0.15–0.20), verilen CD 34 (+) hücre sayısının kendi datamızın median değerinin üzerinde ($\geq 5 \times 10^6/\text{kg}$) olması (RR 0.59, 95% CI 0.52–0.66) kimerizm başarısını anlamlı olarak olumlu yönde etkilediği bulundu (Tablo 7).

Tablo 7: İlk 100 gün kimerizm başarısı üzerine etkili nedenler.

Bağımsız parametreler	Risk Ratio	CI (Güven aralığı) %95
Yaş (Devamlı parametre)	0	(0.0000 - 0.0000)
Primer Tanı Non-maliyn Maliyn	0.0000	(-0.0000 - 0.0000)
Donor MRD MSD MUD	0.0000 0.1525 0.0000	(0.0000 - 0.0000) (0.1039 - 0.2011) (0.0000 - 0.0000)
Hasta donör cinsiyet farklılığı E K K E	0.0000 0.0000	(-0.0000 - 0.0000) (-0.0000 - 0.0000)
Hazırlama rejimi Myeloablatif Nonmyeloablatif ATG kullanımı Fludara kullanımı	0.0039 0.0000 0.0000 0.0000	(0.0021 - 0.0057) (0.0000 - 0.0000) (0.0000 - 0.0000) (-0.0000 - 0.0000)
Kök Hücre Kaynağı Kemik iliği Periferik kan	0.0000 0.0000	(-0.0000 - 0.0000) (-0.0000 - 0.0000)
CD34(+) > median= 5 x10⁶/kg	0.5952	(0.5225 - 0.6679)
G-CSF kullanımı	0	(-0.0000 - -0.0000)
akutGvHH profilaksisi CSA CSA+MTX	0.0004 0.1804	(0.0003 - 0.0004) (0.1573 - 0.2035)

Sağkalım Üzerine Etkili Nedenler

Olgularda tüm sağkalım (OS), hastalısız sağkalım (EFS) değerleri saptandı. Hastalısız sağkalımı etkileyen faktörler tek değişkenli (uni-variate) analiz ile değerlendirildiğinde: İlk 100 gün kimerizminin başarılı olması, donör HLA'sının alıcı ile tam uyumlu olması (MSD, MRD veya MUD), verilen CD34+ hücre sayısının ortanca değer (5x10⁶/kg) üzerinde olması, akut GvHH profilaksisi uygulanması, nötrofil engrafmanının olmasının istatistiksel olarak anlamlı olarak hastalısız sağkalımı arttırdığı bulunurken, hastanın cinsi, tanısı, yaşı, kullanılan hazırlama rejiminin myeloablatif ya da non-myeloablatif olması, kök hücre kaynağı, alıcı-vericinin CMV durumu, akut GvHH, VOD gelişme durumu ile hastalısız sağkalım arasında ilişki bulunmadı. Tablo 8'de tek değişkenli sağkalım analizi uygulanan parametreler ve bunların istatistiksel sonuçları verilmektedir.

Tablo 8: Olgularda hastaliksız sağkalımı (EFS) etkileyen faktörler. MSD: Tam uygun Kardeş Donör, MUD: Tam uygun Akraba dışı Donör, MRD: Tam uygun Akraba Donör, MMRD: Tam uygun olmayan Akraba Donör, E: Erkek, K: Kız, CSA: Siklosporin, Mtx: Metotreksat. CMV: Sitomegalovirüs GvHH: graft versus Host Hastalığı. BK: Nötrofil

Hasta karakteristiği	p-value
Cins Erkek/Kız	0.86
Yaş (Devamlı parametre)	0.16
Primer Hastalık Maliyn/Non-Maliyn	0.24
Donör Kardeş/Anne-Baba/Akraba Dışı	0.2
Donör ve HLA uyumu MSD/MRD/MMRD/MUD	0.01
HLA-uyumu Tam uygun/Tek ag. Uyumsuzluğu/Haploidantik	0.01
Alıcı ve verici cinsiyet farkı E E/ K K/ E K/ K E	0.06
Kök hücre Kaynağı Periferik Kan/Kemik iliği/Kordon Kanı/Kemik iliği+Kordon kanı	0.94
CMV durumu Alıcı CMV/Verici CMV :+/, +/-, -/+, -/-	0.58
Hazırlama rejimi Myeloablatif/ Non-myeloablatif-Hazırlık rejimi yok ATG : aldı/almadı Fludarabin : aldı/almadı Busulphan verilme yolu : IV/PO	0.32 0.64 0.73 0.97
Çekirdekli hücre sayısı (10^8)(Devamlı parametre)	0.49
CD 34 hücre sayısı (10^6)(Devamlı parametre)	0.91
CD34(+) hücre sayısı (median $\times 10^6$ /kg) ≥ 5 / < 5	0.05
GVHH profilaksisi CSA/ CSA+MTX/CSA+MMF/ Profilaksi almadı	0.004
BK engraftmanı Var/Yok	0.0001
BK engraftman gunu (Devamlı parametre)	0.08
Akut GVHH Var /Yok	0.27
Kronik GVHH Var/Yok	0.2
VOD Var/Yok	0.32
+ 100. gün kimerizm başarısı Var/Yok	0.00001

Tek-değişkenli sağkalım analizinde $p < 0.1$ olan değişkenler çok değişkenli sağkalım analizine alındı. Ancak hazard oranı ve çok değişkenli sağkalım analizi yapılırken “multicollinearity” problemleri nedeniyle akut GvHH profilaksisi P değeri 0.004 olmasına rağmen değerlendirilmeye alınamadı. Tablo 9.’de çok değişkenli sağkalım analizi sonuçları görülmektedir.

Tablo 9: Çok değişkenli hastalısız sağkalım analizi sonuçları. (Hazard oranı için 1’den küçük olması sağkalım üzerine pozitif etkiyi göstermektedir.)

Bağımsız Değişkenler	Risk Ratio	%95 Güven aralığı	Hazard Oranı	Hazard Oranı p-value
İlk 100 gün kimerizm başarısı sağlanması	-3.0432	(-4.0041 - -2.0824)	0.05	<0.001
Nötrofil engraftmanı olması	-0.8010.	(-1.5876 - -0.0143)	0.45	0.05
Kızdan kıza alıcı verici cinsiyeti	-2.1620	(-4.5000 - 0.1761)	0.12	0.07
HLA ‘nın tam uyumu	-0.41	(-1.2684 - 0.4442)	0.66	0.28
CD34+hücre sayısı $\geq 5 \times 10^6$ /kg olması	-0.12	(-1.1710 - 0.9216)	0.88	0.82

Negatif değerler, parametrenin hastalısız sağkalım olasılığını artırdığını yani sağkalım üzerine olumlu etkide bulunduğunu göstermektedir. Çok değişkenli analizde ilk 100 günde kimerizm başarısının sağlanması istatistiksel olarak son derece değerli olacak düzeyde hastalısız sağ kalım üzerine etkili bulundu ($p < 0.01$). Ayrıca verici-alıcı cinsiyetinde kızdan kıza nakillerin diğer tüm olasılıklara göre sağkalım üzerine olumlu etkili olduğu saptandı ($p < 0.1$). Tek değişkenli analizin aksine; alıcı-verici arasındaki HLA uyumunun (MSD,MRD,MUD,MMRD) hastalısız sağkalım üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunmadı.

Eklerde kimerizm başarısızlığı olan olguların özellikleri (Tablo 10) ve Kaplan-Meier tekniği ile tek değişkenli sağkalım analizine ait grafikler gösterilmiştir (Grafik 1-8).

TARTIŞMA

Allojenik kök hücre transplantasyonu (KHT), çocukluk çağının birçok doğumsal ya da edinsel hastalığında tek küratif tedavi yöntemidir(30). Bu hastalıklar arasında akut lösemiler, akraba evliliğinin yaygın olduğu ülkemizde de sık görülen doğumsal kemik iliği yetmezlikleri (Fankoni anemisi), hemoglobin sentez defektleri (Talasemi Major), konjenital immün yetmezlikler ve bazı metabolik hastalıklar (osteopetrozis) ön planda yer almaktadır. Yüksek bir mortalite riskine sahip bu tedavi metodu artan sayıda hasta için tek tedavi ümidi olmayı sürdürmektedir. Bugün dünyada yıllık yaklaşık 15000 allojenik KHT yapılmakta ve her yıl KHT yapılan hasta sayısı artmaktadır. Allojenik kök hücre naklinde bu artışın kısmi nedeni; uygun kardeş ya da akraba vericisi bulunmayan hastalarda, (dünyadaki HLA bilgisinin paylaşıldığı küresel ağ ile) akraba dışı HLA uygun vericilerin bulunabilmesidir.

Yaptığımız retrospektif çalışma ile allojenik kök hücre nakli olmuş olgularda kimerizm sonuçlarının değerlendirilmesi ile hastalıksız sağ kalım üzerine etkili nedenlerin saptanması hedeflendi. Çalışmaya alınan hastaların primer hastalıklarının son derece heterojen olması, primer hastalığı maliyn ve non-maliyn olması, miyeloablatif veya nonmiyeloablatif tedavi alan hastaların aynı havuzda bulunması değerlendirmeyi zorlaştırmıştır.

Bu çalışmada kimerizm takibi yapılan 95 hastanın sonuçları değerlendirildiğinde, olguların 67'sinde (%70) tam donör kimerizmi saptanırken, 28 olguda (%30) miks kimerizm bulunmuştur. Bu çalışmada benzer çalışmalara kıyasla izlem süresinin kısa olması nedeniyle, artan, azalan ve stabil miks kimerizm değerlendirilmesi (27,31) yerine Holtan ve arkalarının yaptığı gibi ilk 100 gün kimerizm başarısı değerlendirildi. Bu çalışmadaki 91 olgunun 77'sinde (%85) ilk 100 gün kimerizmi başarısı sağlandı. Bu oran maliyn hastalıklarda %84, non-maliyn hastalıklarda %86 idi. Bu oran literatürde primer hastalığın tipine (maliyn, non-maliyn) ve kullanılan hazırlama rejiminin türüne (miyeloablatif, non-miyeloablatif) göre değişmekle birlikte Holtan ve arkadaşlarının hematolojik maliyniteli olup non-miyeloablatif hazırlama rejimi alan hastalarda yaptığı çalışmada %64 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada ilk 100 gün kimerizm başarısını etkileyen faktörler değerlendirildiğinde CD34+ hücre sayısının medyan değerinde olması, donorün MSD olması ve GvHH profilaksisinde siklosporin ile metotreksatın birlikte kullanılmış olması istatistiksel olarak etkili bulunurken, hazırlama rejiminin tipi, primer hastalığın tanısı, kök hücre kaynağı, etkisiz olarak bulunmuştur. İlk 100 gün içerisinde kimerizm başarısına en yüksek etkiyi CD34+ hücre sayısının medyan değerinde olması sağlamaktadır (başarı şansını %62 artırmaktadır). Literatürde CD34+ hücre sayısının artmasıyla kimerizm başarısının da arttığı gösterilmiştir (32,33). Yine literatürde hücre sayısı dışında hazırlama rejiminin tipi (miyeloablative, non-miyeloablative), HLA tam uygun donör kullanılmasının kimerizm başarısını artırdığı gözlenmiştir (27,31). Svenberg ve arkadaşlarının non-maliyet hastalıklarda yaptığı çalışmada kök hücre kaynağının kemik iliği ya da periferik kök hücre olması kimerizm başarısını etkilememiş, kordon kanı ile daha fazla mikrokimerizm bulunmuştur (27). Hasta grubumuzda tek başında kordon kanı ile yapılan nakil bulunmamaktadır. Yine bizim çalışmamızda etkili bulunan GvHH profilaksisinde siklosporin ile metotreksatın birlikte kullanımına ait literatürde veri yoktur, ve daha fazla immünsüpresif ajan kullanımının donör kimerizmini azaltabilmesi beklenirken nasıl pozitif yönde etkilediği anlaşılamamıştır (başarı şansını %18 artırmaktadır). Bu konu yeni çalışmalara açıktır.

Çalışmamızda tek değişkenli analizde vericinin tam uyumlu olması, hastada nötrofil engraftmanının sağlanması, verici-alıcı cinsiyetinin kızdan kıza olması, GvHH profilaksisi alması ve kimerizm başarısı sağ kalımı etkileyen faktörler olarak bulundu. Çok değişkenli analizde ise sadece kimerizm başarısı ve nötrofil engraftmanı sağlanması anlamını korurken alıcı ve vericinin kız olması sağ kalım üzerine etkili bulunmuştur. Alıcı yaşı, kök hücre kaynağı, nonmiyeloablative hazırlık rejimi kullanılması, tedavide tercih edilen busulfan veriliş yolu, hazırlama rejiminde ATG ve fludarabin kullanımı ile post-transplant G-SCF kullanımı hastalıksız sağkalım üzerine etkisiz bulundu.

Klasik bilgi ve daha önceki çalışmalar ile benzer şekilde (2,26) çalışmamızda tek değişkenli analizde HLA tam uyumlu donör kullanımı (MSD, MRD ve MUD tip vericiler) ile uygunsuz verici kıyaslandığında, hastalıksız sağkalımın pozitif yönde etki gösterdiği saptanırken çok değişkenli analizde bu fark istatistiksel olarak anlamlı

bulunmadı. Yine çok değişkenli analizde vericinin HLA tam uyumlu kardeş olması ile diğer verici çeşitleri kıyaslandığında fark saptanmadı. Hasta grubumuzda akraba dışı vericiden yapılan nakil sayısının az olması ve bu hastaların uzun süreli izleminin olmaması nedeniyle çok değişkenli analizde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmedi. Ancak Holtan ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları çalışmada da benzer şekilde donör çeşidi ve HLA uyumu sağkalım üzerine etkisiz bulunduğu unutulmamalıdır(32). İzlem süresinin uzaması ve verici çeşitliliğinin artması ile daha sağlıklı verilerin elde edilmesini sağlayacaktır. Yine Holtan ve arkadaşları tarafından sağkalım üzerine etkili olduğu saptanan CD34+ hücre sayısının median değerin üzerinde oluşu çalışmamızda ise sağ kalım üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkide bulunmadı. Daha önce İlhan ve ark tarafından yapılan çalışmada granülosit engraftmanı ve engraftman süresinin kısalması üzerine etkili bulunan CD34+ hücre sayısındaki artış çalışmamızda da ilk 100 gün kimerizm başarısı üzerine son derece etkili bulundu(33,34).

Literatürdeki benzer çalışmalarda da değerlendirilen ancak anlamlı fark yaratmayan verici ve alıcı arasındaki cinsiyet ilişkisi çalışmamızda değerli bulgular verdi. Kızdan kıza nakillerin diğer gruplara (kızdan erkeğe, erkekten kıza ve erkekten erkeğe) göre sağkalım üzerine pozitif olarak etkili olduğu görüldü. (HR:0.12($p:0.07$)). Literatürde daha çok kadın vericinin alloimmunizasyon nedeniyle daha riskli olabileceği tartışılırken çalışmamızda aksi bulunmuştur. Diğer tüm parametrelerden bağımsız olarak alıcıda BK engraftmanının gerçekleşmesi hastalıksız sağkalımı (EFS) olumlu yönde etkilemektedir [HR: 0.45 ($p:0.05$)].

Hastalıksız sağkalımı etkileyen en önemli faktörün ilk 100 gün kimerizm başarısı olduğu görüldü. İlk 100 gün kimerizm başarısı ile nüks ve ölüm riski azalmaktadır [HR: 0.05 ($p<0.001$)]. Daha önce hematolojik maliynitelerde yapılan çalışmalarda %95 ve üzeri donör kimeriziminin EFS üzerine pozitif etkili olduğu gösterildi (32). Çalışmamızda maliyn hastalıklar yanında non-maliyn hastalıklarda da ilk 100 gün donör kimeriziminin %70 ve üzeri olmasının sağkalımı pozitif yönde etki edebileceğini düşündürmektedir. Hasta sayısının artması bu yönde bir değerlendirmeyi mümkün kılacaktır.

Sonuç olarak 91 allojenik kök hücre transplantasyonu yapılmış heterojen özelliklere sahip bu hasta grubunda kimerizm başarısı tatminkar bulunmuştur. HLA

uygun verici kullanımı ve CD34+ hücre sayısının artması kimerizm başarısını artırmaktadır. Kimerizm başarısı en önemli hastalısız sağkalım belirteçidir. Olguların izlem sürelerinin uzaması, KHT mortalitesi üzerine etkili nedenler ve kimerizm ile KHT başarısı arasındaki ilişki daha iyi aydınlatacaktır.

ÖZET

Allojenik kök hücre transplantasyonu (KHT) çocukluk çağının birçok doğumsal ya da edinsel, maliyn ya da maliyn olmayan hastalığında tek küratif tedavi yöntemidir. Bu hastalıklar arasında akut lösemiler, kemik iliği yetmezlikleri, hemoglobin sentez defektleri, immun yetersizlikler ve bazı metabolik hastalıklar ön planda yer almaktadır. Kliniğimizde yılda yaklaşık 30 allojenik kök hücre transplantasyonu yapılmaktadır. Önemli bir mortalite ve morbidite riskine sahiptir olan KHT'unda başarılı donör kimerizminin ve bunun sağkalım üzerine etkisinin daha iyi anlaşılması için 2005 ile 2010 yılları arasındaki KHT yapılmış toplam 95 hastanın verileri geriye dönük olarak incelendi. Amaç: KHT sonrası ilk 100 gün donör kimerizm oranlarının ve bunun hastalıksız sağkalım üzerine etkisinin anlaşılması planlandı. Sonuçlar: Diğer tüm etkenlerden bağımsız olarak ilk 100 gün kimerizm başarısı (maliyn hastalıklar için donör kimerizimi $>95\%$, non-maliyn hastalıklar için ise $>70\%$) KHT sonrasında hastalıksız sağkalımı artırdığı saptandı [-3.0432, (-4.0041 - -2.0824)], hazard oranı: 0.05 ($p<0.001$) İlk 100 gün kimerizm başarısı üzerine ise en etkili neden hastaya verilen CD34+ hücre sayısının median değerinin (5×10^6 hücre/mm³) üzerinde olması saptandı; probit analizi sonucu: 0.5952 (0.5225 - 0.6679) ($p<0.01$). İzlem süresinin artması ve farklı verici çeşitleri kullanılması ile ilerki yıllarda yapılacak benzer çalışma kliniğimizde yapılan KHT ve kimerizm çalışmaları üzerine daha ayrıntılı bilgiler sağlayacaktır.

ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an important clinical tool for treating patients with many hereditary metabolic diseases, immunologic and hematologic disorders, acquired malignancies (leukemias) and aplastic anemias. Every year almost 30 pediatric patients undergo this procedure in our clinic. HSCT has high mortality and morbidity rates. We collected data from 95 patients who have undergone transplants between 2005 and 2010 to better understand importance of successful donor chimerism and its effects on survival. Aim: The major goals of this study are to determine first 100 day donor chimerism ratios, to search for relationship between donor chimerism success and survival. Results: After controlling for all other factors, first 100 day chimerism success (for malignant diseases; hematopoietic donor chimerism >95%, for non-malignant diseases >70%) increases post-transplant event-free survival by -3.0432, (-4.00 - -2.08), [hazard ratio: 0.05 (p<0.001)]. Transplanting CD34+ cell over 5×10^6 cell/mm³ raises first 100 day donor Chimerism success chance by 62%, probit analysis results: 0.5952 (0.5225 - 0.6679) (p<0.01). A follow-up study done after several years can provide us more information about SCT and donor chimerism by increasing duration of follow-up and using different types of donors.

KAYNAKLAR

1. Akan H. Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Ankara, Bilimsel tıp Yayınevi, 2005.
2. Anak S, Sarıbeyoğlu ET. Çocuklarda kök hücre nakli. Klinik Gelişim 2007; 2: 164-176.
3. Arat M, Arpacı F, Ertem M, et al. Turkish Transplant Registry; a comparative analysis of national activity with the EBMT European Activity Survey. Bone Marrow Transplantation 2008; 42 Suppl 1: 142-145.
4. A. Gratwohl, H. Baldomero, K. Frauendorfer, V. Rocha, J.Apperley and D. Niederwieser *The EBMT activity survey 2006 on hematopoietic stem cell transplantation: focus on the use of cord blood products. Bone Marrow Transplantation 2008; 41: 687–705.*
5. Ausen BF, Heilmann C, Vindelov L, Jacobsen N. Outcome of acute lymphoblastic leukemia in Danish children after allogeneic bone marrow transplantation. Superior survival following transplantation with matched unrelated donor grafts. Bone Marrow Transplant 1998; 22: 325-330.
6. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann A ve ark. Long term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981-1995. Leukemia 2000; 14: 2205-2222.
7. Edward A. Copelan, M.D , Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. The New England Journal of Medicine 2006; 354: 1813-1826
8. Tippet P. Blood group chimeras. A review. Vox Sang 1983; 44: 333–359.
9. Ford CE, Hamerton JI, Garnes DWH, Loutit JF. Cytological identification of radiation chimeras. Nature 1956; 177: 452–454.

10. D Kristt, J Stein, I Yaniv and T Klein. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39: 255–268.
11. N Muller-Bé'rat and T Lion. Chimerism and transplant-related diagnostics. *Leukemia* 2006; 20: 1358–1360.
12. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R ve ark. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *JCO* 2004; 33: 22: 1696-1705.
13. Gardiner N, Lawler M, ORiordan J, DeArce M, McCann SR. Donor chimerism is a strong indicator of disease free survival following bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Leukaemia* 1997; 11: 512–515.
14. Lucarelli G, Andreani M, Angelucci E. The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Review* 2002 Jun: 16(2); 81-85.
15. P Bader, J Beck, A Frey, PG Schlegel, H Hebarth ve ark. 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 Transplantation* 1998; 21: 487–495.
16. Kristt, J Stein, I Yaniv and T Klein. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39: 255–268.
17. McCann SR, Lawler M. Mixed chimerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transpl* 1993; 11: 91–94.
18. McCann SR, Passweg JR, Storb R, Deeg HJ. HLA identical sibling bone marrow transplantation to treat severe aplastic anemia. In: Schrezenmeier H, Bacigalupo A, editors. *Aplastic anemia, pathophysiology and treatment*. Cambridge, UK: Cambridge University Press 2000: 230–257.
19. Guinan EC. Acquired aplastic anemia in childhood. *Hematology Oncology Clinincs North America*. 2009 Apr; 23(2): 171-191.

- 20.** Lipton JM, Ellis SR. Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematology Oncology Clinics North America*. 2009 Apr; 23(2): 261-282.
- 21.** Green AM, Kupfer Gm. Fanconi anemia. 2009 Apr; 23(2): 193-214.
- 22.** Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, Tonucci P, Rapa S Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Feb; 25(4): 401-404.
- 23.** KC Doney, MR Loken, EM Bryant, AG Smith and FR Appelbaum. Lack of utility of chimerism studies obtained 2–3 months after myeloablative hematopoietic cell transplantation for ALL *Bone Marrow Transplantation* 2008; 42: 271–274.
- 24.** DM Mickelson, L Sproat, R Dean, R Sobecks, L Rybicki ve ark. Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2010 March; 1–6.
- 25.** Daniela Lisini, Marco Zecca, Giovanna Giorgiani, Daniela Montagna, Rosaria Crisantielli ve ark. Donor/recipient mixed chimerism does not predict graft failure in children with b-thalassemia given an allogeneic cord blood transplant from an HLA-identical sibling. *Haematologica*. 2008 Dec; 93(12): 1859-1867.
- 26.** A Williasch, W Hoelle, H, Kreyenberg, D Niethammer, R Handgretinger ve ark. Outcome of allogenic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. *Hematologica* 2006; 91: 788-794.
- 27.** Svenberg P. Mattsson J. Ringden O. Uzunel M. Allogeneic hematopoietic SCT in patients with non-malignant diseases and importance of chimerism. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 757-763.
- 28.** Kaplan E. Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Stat. Assoc* 1958; 58: 457-481.
- 29.** Finney D. *Probit Analysis*. 3. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1971.

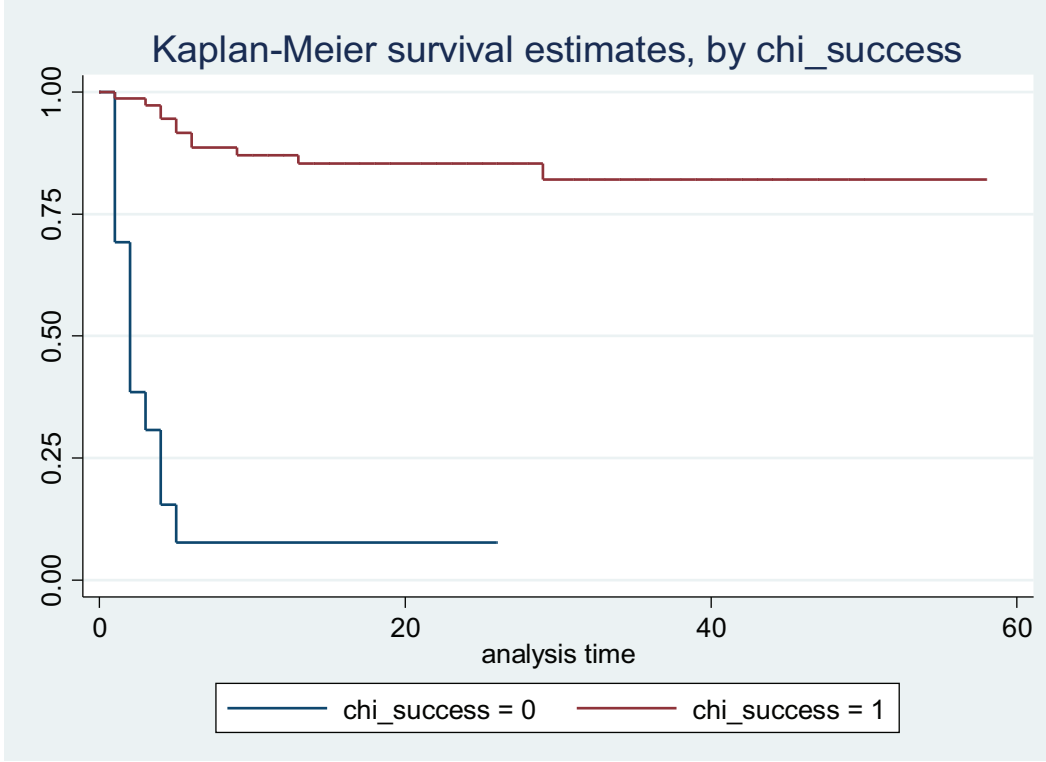
30. Thomas ED, Blume KG, Fomran SJ, Hematopoietic cell transplantation. Boston, MA, Blackwell Science 1999; 2nd edition.
31. P Bader, H Kreyenberg, W Hoelle, G Dueckers, R Handgretinger ve ark. Increasing Mixed Chimerism Is an Important Prognostic Factor for Unfavorable Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia After Allogeneic Stem-Cell Transplantation: Possible Role For Pre-Emptive Immunotherapy Journal of clinical oncology 2004; 22: 1696-1705
32. SG Holtan, WJ Hogan, MA Elliott, SM Ansell, DJ Inwards ve ark. CD34+ cell dose and establishment of full donor chimerism at day +100 are important factors for survival with reduced-intensity conditioning with fludarabine and melphalan before allogeneic hematopoietic SCT for hematologic malignancies. Bone marrow transplantation 2010 Mar 8. [Epub ahead of print]
33. Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Martino R, Sureda A, Caballero D, Canizo C ve ark. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Blood 2003; 102: 1108–1113.
34. İhan O, Arslan Ö, Arat M, ve ark. The impact of CD34+ cell dose on engraftment in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Transfusion Science 1999; 20: 69-71.

EKLER

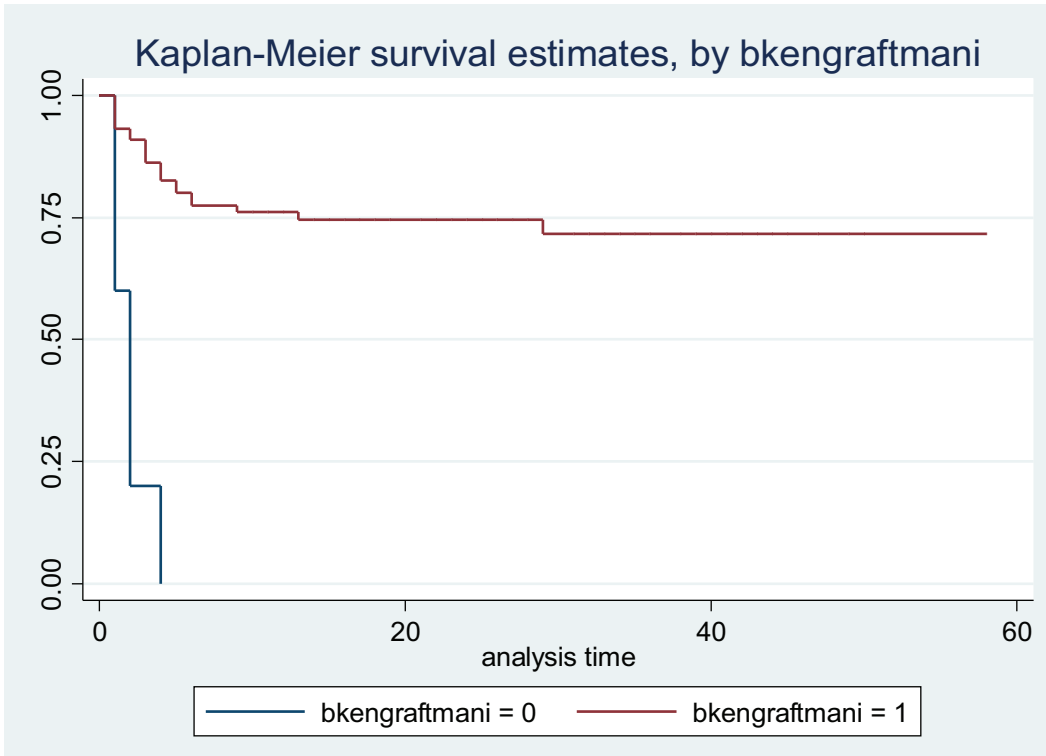
Tablo 10: 100. gün kimerizm başarısı sağlanamayan hastalar :

UPN	44	44	47	63	65	69	87	96	87	106	122	124	142
Cinsiyet	E	E	E	K	K	E	E	K	E	K	K	K	E
Tanı	T. Maj	T. Maj	Löse mi	KIY	KIY	T. Maj	KIY	T. Maj	KIY	KAA	Löse mi	Löse mi	Löse mi
Yaş	6.3	6.4	7	1	1	3.5	1.3	9.8	1.7	16.5	2.5	7.8	7
Donor Çeşidi	MSD	MSD	MMRD	MMRD	MRD	MSD	MMRD	MSD	MMRD	MSD	MUD	MSD	MSD
Hazırlık Rejimi	M	NM	NM	Yok	Yok	M	M	M	NM	NM	M	M	M
K. Hücre Kaynağı	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	KI+KK	PK	KI	KI	KI	KI
BK engraft.	0	0	0	0	-	1	1	1	0	1	1	1	1
Kimerizm	AzK	0	0	0	SK	AzK	0	AK	0	0	AzK	AzK	0
GvHH Profilaksi	CSA +Mtc	CSA +Mtx	0	0	0	CSA +Mtx	0	CSA +Mtx	0	CSA +Mtx	CSA	CSA +Mtx	CSA
aGvHH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Evrre 4	0	0
Kr.GvHH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DLI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EFS	1	1	4	2	5	3	4	26	2	1	2	2	1
Nüks / Ölüm	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Ölüm	0	0	1	1	1*	0	0	0	0	0	1	1	0

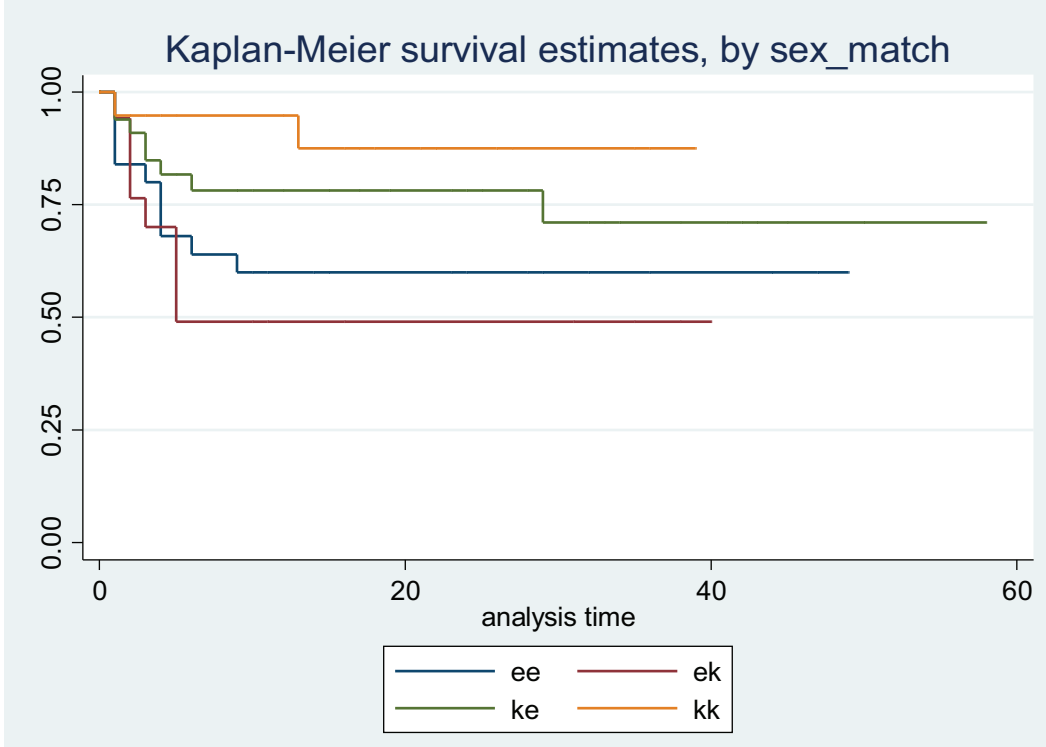
*: Evde ölü bulundu. Diğer tüm hastalar primer hastalığa bağlı kaybedildi. E: Erkek, K: Kız
 KIY:Konjenital Immün Yetmezlik, T. Maj: Talasemi Majör, KAA: Konjenital Aplastik Anemi
 KI:Kemik İliği, PK: Periferik kan, KK: Kordon Kanı, MSD: Tam Uyumlu Kardeş Donor, MRD: Tam Uyumlu Akraba Donor, MMRD: Tam uyumlu olmayan Akraba Donor, MUD: Akrabadışı tam uyumlu Donor, M: Miyeloablative, N: Non-miyeloablative. AK: Artan Kimerizm, SK: Stabil Kimerizm, AzK: Azalan Kimerizm, EFS: Hastaliksız Sağkalım süresi



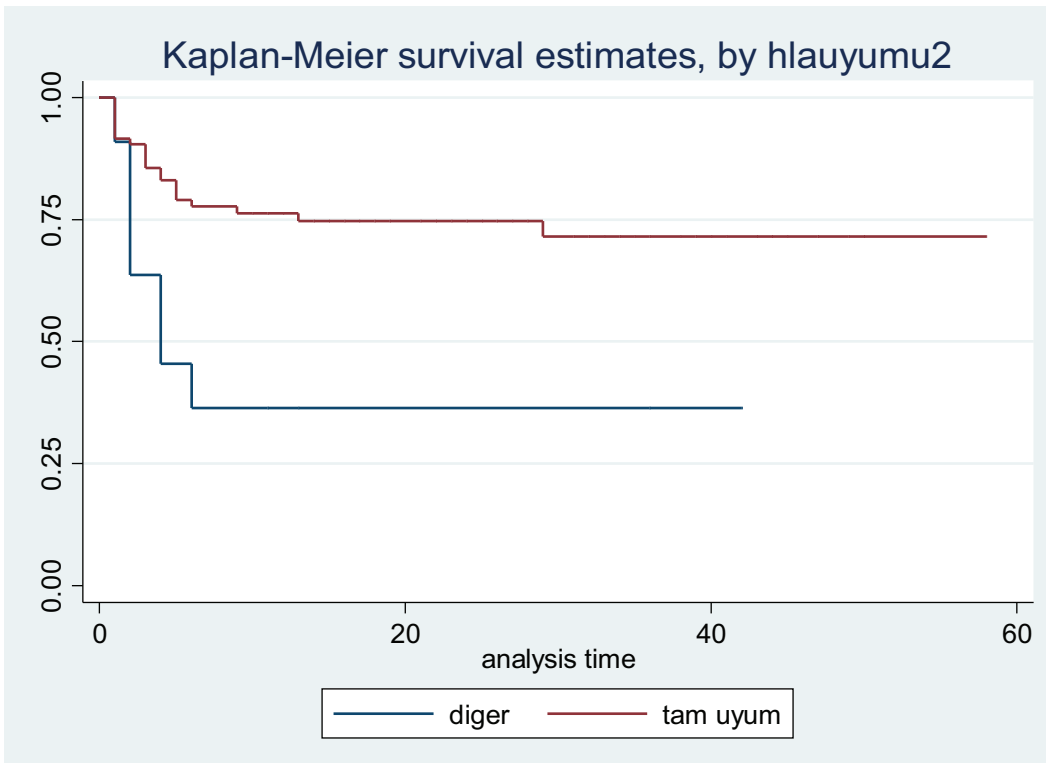
Grafik 1: İlk 100 gün kimerizm başarısı ile ilişkili hastalıksız sağkalım (EFS)



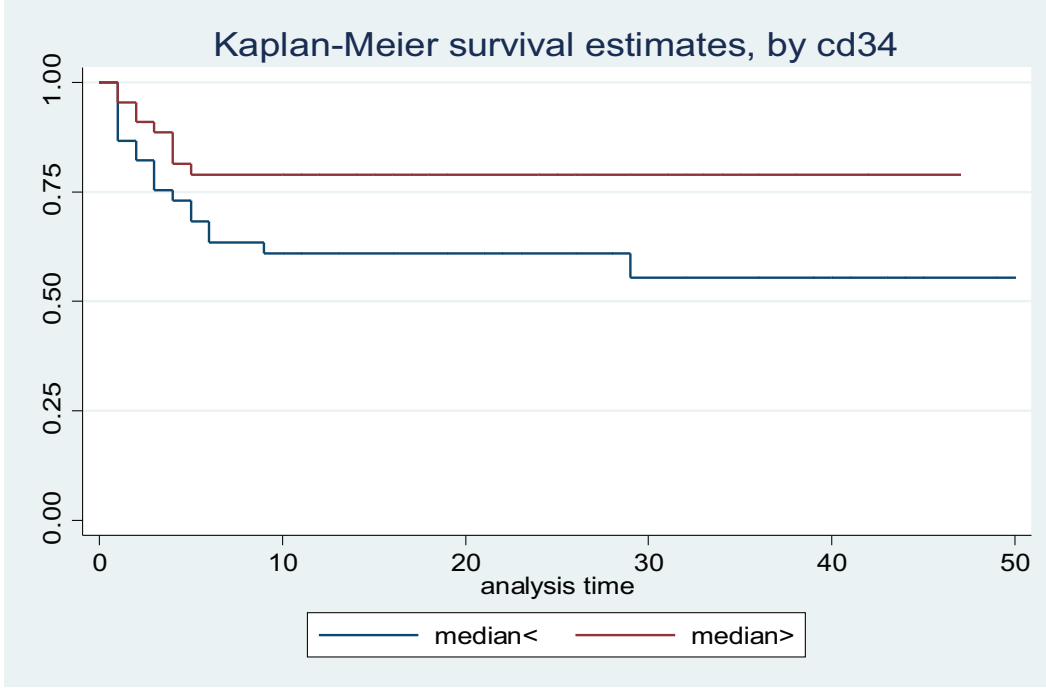
Grafik 2: Lökosit engraftmanı ile ilişkili sağkalım



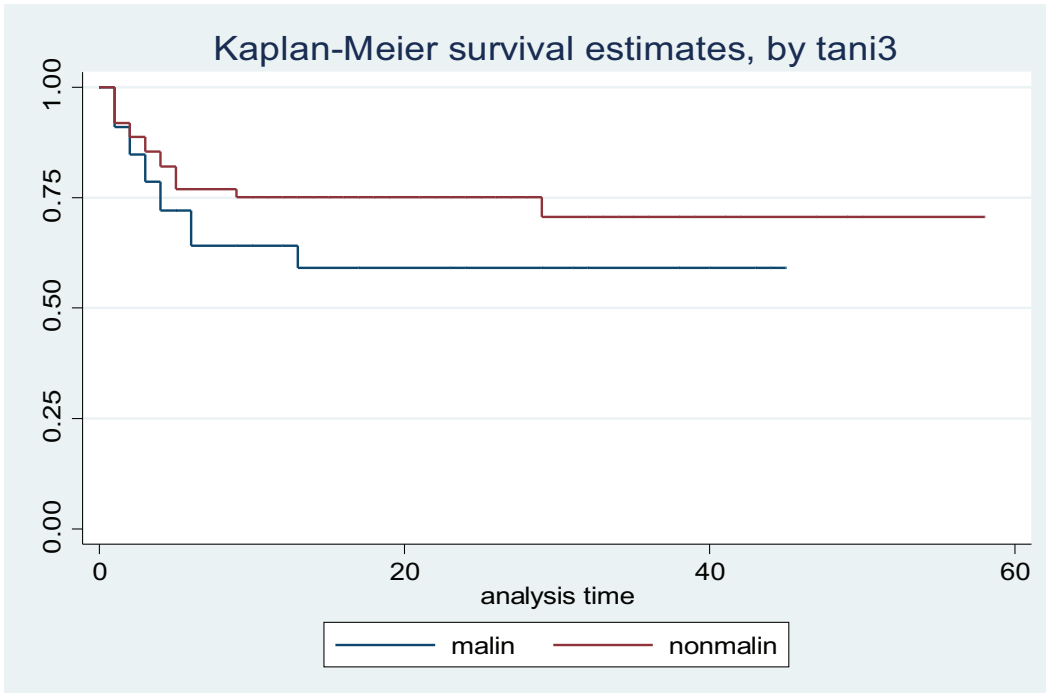
Grafik 3: Alıcı-Verici cinsiyet ile ilişkili hastalıksız sağkalım



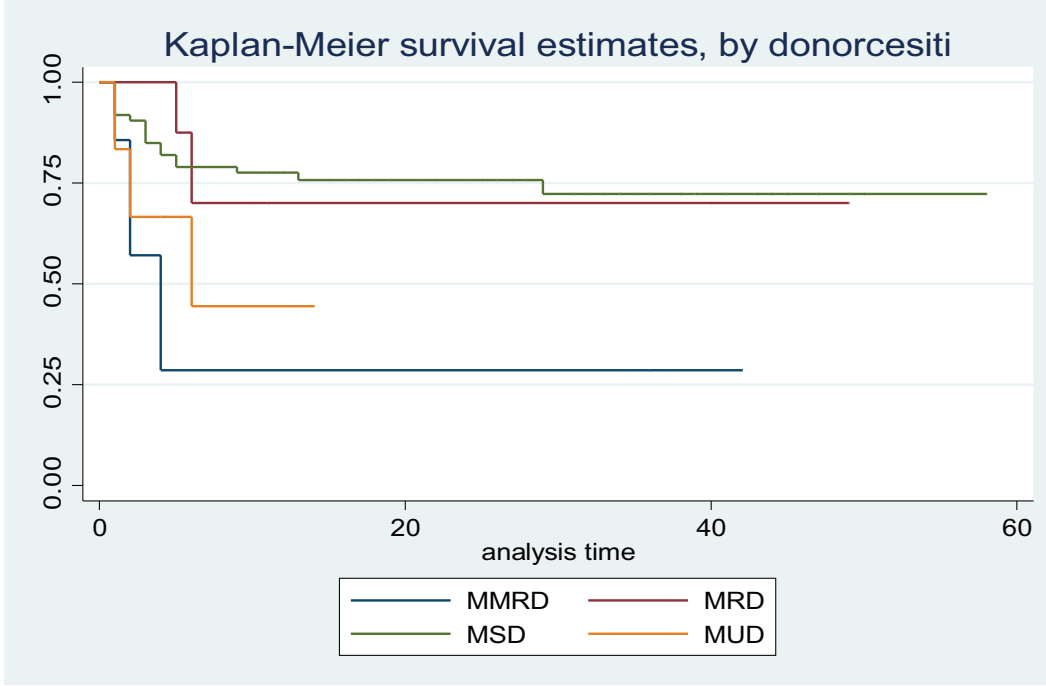
Grafik 4: HLA uyumu ile ilişkili hastalıksız sağkalım



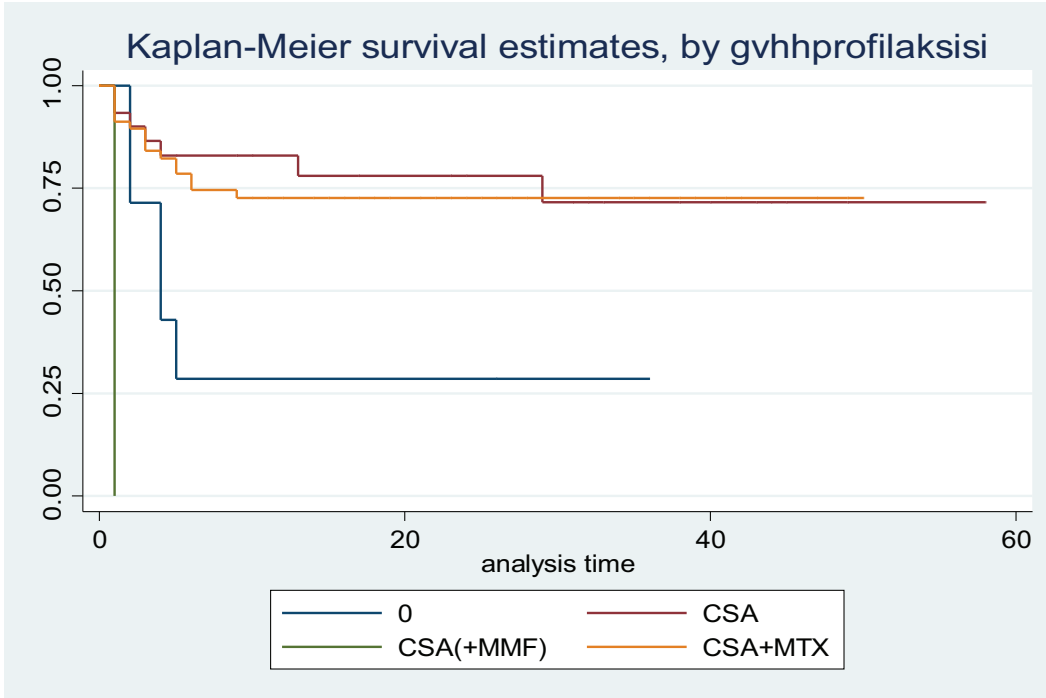
Grafik 5: Verilen CD34+ sayısı ile ilişkili hastalıksız sağkalım (median: 5×10^6 hücre)



Grafik 6: Tanı grupları ile ilişkili hastalıksız sağkalım



Grafik 7: Donor Çeşidi ile ilişkili hastalıksız sağkalım



Grafik 8: Kr. GvHH profilaksisi ile ilişkili hastalıksız sağ kalım