

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**Allogeneik Kök Hücre Nakli Yapılmış Kişilerde,
Kan ve Doku Kimerizm Sonuçlarının Karşılaştırılması**

İç Hastalıkları
Uzmanlık Tezi

Dr. Ezgi PINAR ÖZBALAK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sevgi KALAYOĞLU BEŞİŞİK

İSTANBUL 2021

ÖNSÖZ

İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nın bir parçası olmaktan her zaman onur duydum.

Yetişmemde emeği olan, bilgi birikimlerini ve deneyimlerini bana aktaran, gelişimimde katkıları yadsınamayacak tüm hocalarımı saygı ile anıyorum, minnetlerimi sunuyorum.

Hayata karşı duruşu, hastalar ve meslektaşları ile ilişkisi, çalışma disiplini ile bana örnek olan, bu çalışmasını gerçekleştirme fırsatı veren tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Sevgi Kalayoğlu-Beşışık'a,

Her zaman uyum içinde çalıştığım uzmanlarıma, beraber çalışmaktan keyif aldığım asistan, hemşire ve personel arkadaşlarıma,

Öğrencilik yaşantımdan beri hayatımda olan, sadece eğitim ya da iş yaşantımda değil, sosyal yaşantımda da beni cesaretlendiren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim canım eşim Murat'a,

Belki de uzmanlık eğitimi aldığım esnada en büyük fedakarlığı yapan, karnımda iken beraber hasta bakıp nöbet tuttuğum, birlikte çalışmalar yaptığım, nöbet gecelerinde sabırla bekleyen, artık 3 yaşına gelmekte olan ve şimdi de ders çalışabilmem için bana fırsat tanıyan biricik kızım Gökçe'ye,

Ve bugünlere gelmemdeki emeklerini asla ödeyemeyeceğim, maddi ve manevi arkamda olduklarını bildiğim annem, babam ve bir tanecik kardeşime,

En içten şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLolar DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	3
I. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
II. GENEL BİLGİLER.....	7
A. Hematopoietik Kök Hücre Nakli ve Alt Grupları.....	7
B. HKHN Öncesi Hazırlama Rejimleri.....	9
C. HLA Doku Gruplarının Verici Seçiminde Önemi.....	11
D. Kimerizm ve Kimerizmi Belirlemede Rol Oynayan Faktörler	12
E. Kimerizm Bakılma Yöntemleri.....	13
F. HKHN’de Kimerizmin klinik uygulamaları.....	14
1. Graft başarısızlığı için riskli olan hastada kimerizm testleri.....	15
2. Malign olmayan hastalıklarda kimerizm.....	15
3. Malign hastalıklarda kimerizm.....	16
G. Graft Versus Host Hastalığı; Profilaksisi.....	16
III. HASTALAR ve YÖNTEM.....	18
A. Olgular.....	18
B. Yöntem.....	18
IV. BULGULAR.....	22
A. Demografik Veriler ve Allogeneik HKHN Anındaki Özellikleri.....	22
B. Alıcı ve Vericiler Arasındaki Uyum Değerlendirmesi.....	23
C. Hazırlama Rejimlerinin Özellikleri ve GVHH Profilaksisi.....	23
D. Kök Hücre Ürün Özellikleri ve Yamanma.....	24
E. +28.Gün Çevre Kanı ve Doku Kimerizmi Sonuçları.....	25
1. Çevre kanı kimerizmi.....	25
2. Doku kimerizmi.....	25
3. Kimerizm seyri.....	25

F. Kimerizm Sonuçlarının Hasta Sağkalımı ile İlişkisi.....	26
1. Progresyonsuz Sağkalım.....	27
2. Genel Sağkalım.....	27
G. Kimerizmin Diğer Değişkenler ile İlişkisi.....	28
H. Hastalık Tipine Göre Verilerin Değerlendirilmesi.....	28
1. Akut Myeloid Lösemi.....	28
2. Myelodisplastik Sendrom.....	29
3. Akut Lenfoblastik Lösemi.....	29
4. Hodgkin ve Hodgkin dışı Lenfomalar.....	30
5. Diğer Hastalıklar.....	30
V. TARTIŞMA.....	31
VI. SONUÇ.....	34
VII. KAYNAKÇA.....	35
VIII. EKLER:.....	40
A. Etik Kurul Onayı.....	--
B. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	42
C. Özgeçmiş.....	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: HKHN Endikasyonları.....	7
Tablo 2: Kök Hücre Kaynağına Göre Hücre Sayıları.....	8
Tablo 3: HKHN’de Kimerizm Testlerinin Klinik Uygulaması.....	14
Tablo 4: Hastaların Demografik Verileri.....	22
Tablo 5: Kan grubu, cinsiyet uyum analizi.....	23
Tablo 6: Kök hücre ürününün özellikleri.....	24
Tablo 7: Kök hücre kaynağına göre ortalama yamanma günleri.....	24
Tablo 8: Çevre kan kimerizm kaybı ile 28. gün doku kimerizmi arasındaki ilişki.....	25
Tablo 9: MAC ve RIC hazırlama rejimine göre doku kimerizmi.....	26
Tablo 10: Post-transplant 28. günde GvHH ile doku kimerizminin ilişkisi.....	26
Tablo 11: Post-transplant 28. günde doku kimerizminin takipte GvHH ile ilişkisi.....	26
Tablo 12: Post-transplant 28. günde doku kimerizminin ölüm ile ilişkisi.....	27
Tablo 13: Post-transplant 28. günde doku kimerizminin diğer değişkenler ile ilişkisi.....	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Verici seçimi algoritması.....	12
Şekil 2: Mutlak CD3 sayısı ve 28. gün doku kimerizmi ilişkisi.....	25
Şekil 3: Doku kimerizmine göre progresyonsuz sağkalım.....	27
Şekil 4: Doku kimerizmine göre genel sağkalım.....	27
Şekil 5: AML hastalarında progresyonsuz ve genel sağkalım.....	29
Şekil 6: MDS hastalarında genel sağkalım.....	29
Şekil 7: Lenfoma hastalarında progresyonsuz ve genel sağkalım.....	30



KISALTMALAR

HKHN	Hematopoietik kök hücre nakli
HKH	Hematopoietik kök hücre
HLA	İnsan lökosit antijenleri
TBI	Total vücut ışınlaması
MAC	Myeloablatif hazırlama rejimi
AML	Akut myeloid lösemi
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
NMA	Myeloablatif olmayan hazırlama rejimi
RIC	Azaltılmış dozda hazırlama rejimi
RTC	Düşük toksisiteli hazırlama rejimi
MMUD	HLA uyumsuz akrada dışı verici
GvHH	Graft versus host hastalığı
MHC	Majör histokompatibilite kompleks
CMV	Sitomegalovirüs
FISH	Flöresan in situ hibridizasyon
RFLP	Sınırlayıcı enzim parça uzunluğu çeşitliliği
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
STR	Kısa ardışık tekrarlar
rPZR	Gerçek zamanlı PZR
dPZR	Dijital PZR
DLI	Donör lenfosit infüzyonu
NK	Doğal katil
MMF	Mikomofetil fenolat
ATG	Antitimosit globülin
Treg	T regülatör hücreler
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
CNI	Kalsinörin inhibitörü
MDS	Myelodisplastik sendrom
HL	Hodgkin lenfoma
NHL	Non-Hodgkin lenfoma
KLL	Kronik lenfositik lösemi
AA	Aplastik anemi
MM	Multipl myelom
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz

ÖZET

Giriş ve Amaç: Tıbbi terminolojide kimerizm, farklı DNA'ya sahip hücrelerin veya doku kısımlarının tek canlıda barınmasını tanımlamada kullanılmaktadır. Hematoloji uygulamalarında ise kimerizm allogeneik hematopoietik kök hücre nakli sonrası hasta bedeninde vericiye ait hematopoiezin gelişmesi olarak tanımlanmıştır. Nakil sonrası nakil endikasyonu hastalık durumunun, donör hematopezinin durumunun belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı'nda allogeneik HKHN yapılan hastaların nakil sonrası 28. gündeki doku kimerizmi ile periferik kan kimerizmini karşılaştırdık ve nakil seyrine etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Hastalar ve Yöntemler: İ.Ü. İTF İç Hastalıkları Hematoloji BD kliniğinde Ocak 2019 ile Ekim 2020 tarihleri arasında allogeneik HKHN yapılan ve 18 yaşından büyük, post-transplant 28. güne ulaşabilen ve doku biyopsisi yapılmasına onam veren 41 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamızda nakil öncesinde hasta ve vericilerinden alınan kanın total lökositlerinden ayrılan DNA ile nakil sonrasında 28. günde hastadan alınan cilt biyopsisinden elde edilen DNA'lar STR-PZR kimerizm yöntemiyle çalışılmıştır.

Bulgular: Hastaların ortalama yaşı 40 idi. 21 hasta kadın, 20 hasta erkekti. 38 hastaya periferik kök hücre, 3 aplastik anemi tanılı hastamıza ise kemik iliği kaynaklı kök hücre nakli yapıldı. Hastalarımızın çoğunda akraba vericiden tam uyumlu nakil yapılmış olup (n=17), geri kalan hastaların 13'ünde akraba dışı tam uyumlu, 6'sında haploidentik, 5'inde akraba dışı 9/10 uyumlu HKHN yapılmıştır. Hastalık dağılımı AML (13 AML, 1 granülositik sarkom ve 1 T-ALL-ikincil AML olgusu), MDS (7 MDS ve 1 GATA-2 mutasyonu olgusu), lenfoma (4 HL, 3 HDL, 1 KLL Richter transformasyonu), ALL (3 B-ALL, 1 T-ALL), aplastik anemi (n=3), ikincil myelofibroz (n=2) ve multipl myelom (n=1) olarak sınıflandırıldı.

Post-transplant 28. günde 40 hastada çevre kanı kimerizmi tam kimerik ikincil myelofibroz tanılı bir hastada karışık kimerik olarak rapor edildi.

Doku kimerizmi bir hastada doku DNA'sı elde edilemediğinden, hastaların 40'ında çalışılabildi. Bu 40 hastanın 21'inde dokuda hastaya ait DNA, 19'unda hem hasta hem de vericinin DNA'sı gözlemlendi.

Doku kimerizminde kendi DNA'sı saptanan 21 hastanın 9'unda (%43), ortalama 14 aylık takipte (2-37 ay), karışık kimerik saptanan 19 hastanın 3'ünde (%16), (ortalama 14 aylık takip;

3-34 ay) kan kimerizm kaybı gözlemlendi ($p=0.062$). Kan kimerizm kaybı saptanan 12 hastanın tümünde hastalık progresyonu gözlemlendi.

Hastalarımızın ortanca 14 aylık takibinde toplam 19 hastada GvHH geliştiği saptandı. Doku kimerizmi karışık olan grup ile alıcı DNA'sı saptanan grup arasında istatistiki anlamlı fark saptanmadı ($p=0.516$).

Doku kimerizminde kendi DNA'sı saptanan 21 hastanın 9'u (%43) kaybedilirken, karışık kimerizm saptanan 19 hastanın 3'ü (%16) kaybedildi ($p=0.062$).

Bir yıllık progresyonsuz sağkalım dokuda kendi DNA'sı saptanan grupta %27.27 (%95 CI: 0.06-0.53) iken, karışık kimerizm saptanan grupta %75 (%95 CI: 0.12-0.96) olarak tespit edildi; ancak istatistiki olarak anlamlı saptanmadı ($p=0.25$). Bir yıllık genel sağkalım dokuda kendi DNA'sı saptanan grupta %61.54 (%95 CI: 0.37-0.78) iken, karışık kimerizm saptanan grupta %87.84 (%95 CI: 0.59-0.96) olarak tespit edilmiş; ancak istatistiki olarak anlamlı saptanmamıştır ($p=0.095$).

AML'de karışık kimerizm saptanan hastalarda nüks gelişiminin daha az olduğu ($p=0.038$) ve genel sağkalımın daha iyi olduğu ($p=0.05$) gözlemlendi.

Sonuçlar: Ortanca 14 aylık takibimizde graft-versus-hastalık etkisinin yüksek olduğu AML'de, progresyonun ve ölümün, dokuda karışık kimerizm saptanan olgularda anlamlı ölçüde daha nadir olduğunu ve genel sağkalımı olumlu etkilediğini tespit ettik. Post-transplant 28. günde dokuda karışık kimerizm saptanan olgularda, kimerizm kaybının, hastalık nüksünün ve ölümün daha az sıklıkta görüldüğünü ancak istatistiki anlam taşımadığını belirledik. Yine bu grupta progresyonsuz sağkalımın ve genel sağkalımın daha iyi olduğunu, ancak istatistiki fark oluşmadığını gözlemledik. Çalışmamızda hastaların takip süresi uzadıkça kimi değişkenlerin, sağkalımı ve sonlanım noktalarını etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

SUMMARY

Objectives: Chimerism means the presence of cells or tissues containing different DNAs from one another, in an organism. In hematological practices, chimerism used not only in terms of looking for donors' hematopoiesis in patients' bodies following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), but also to express the investigation of post-transplant response to treatment and the status of donors' hematopoiesis.

In our study, we aimed to compare the peripheral blood and tissue chimerisms on post-transplant day 28 and to analyze its effect on post-transplant disease outcome in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Istanbul University, Istanbul Medical Faculty.

Patients and methods: Forty-one patients older than 18 years-old, who underwent allogeneic HSCT between January 2019 and September 2020 in IU, Istanbul Medical Faculty Hematology Department and succeeded to achieve post-transplant day 28 were included in our study.

Pre-transplant DNA purified from both patients' and donors' white blood cells, and DNA extracted from tissues' of patients on post-transplant day 28 were studied by STR-PCR chimerism methods.

Results: The median age was 40 years in our cohort. Twenty-one patients were female and 20 were male. According to stem cell origin, 38 patients had undergone peripheral blood HSCT and 3 patients, all diagnosed with aplastic anemia, had undergone bone marrow HSCT. Most of our patients underwent related full-match HSCT (n=17). Among them, 13 had unrelated full match, 6 had haploidentical, and 5 had mis-matched unrelated (9/10 matched) HSCT. The classification of diseases based on frequency, were in turn AML (13 AML, 1 granulocytic sarcoma and 1 T-ALL (in lymph node)-secondary AML (in bone marrow)), MDS (7MDS and 1 case with GATA-2 mutation), lymphoma (4 HL, 3 NHL, 1 CLL-Richter transformation), ALL (3 B-ALL, 1 T-ALL), aplastic anemia (n=3), secondary myelofibrosis (n=2) and multiple myeloma (n=1).

On post-transplant day 28, peripheral blood chimerism was reported full chimeric in 40 patients, and 1 patient was mixed chimeric.

DNA from tissue could not be isolated in one patient. In the remaining 40 patients, recipients' DNA was found in 21 patients, and mixed chimerism, which means both recipients' and donors' DNA was founded in tissue at the same time, was detected in 19 patients.

Among 21 patients who had self DNA in tissue, 9 (%43) lost peripheral blood chimerism at a median follow-up of 14 months (2-37 months). However, 3 of 19 patients (%16) with mixed chimerism in tissue lost peripheral blood chimerism ($p=0.062$). All 12 patients who lost peripheral blood chimerism, had progressive diseases.

Nineteen patients developed graft-versus-host disease (GvHD). There was no statistical significance, between the groups of self DNA and mixed chimerism ($p=0.516$).

Nine of 21 patients (%43) with self DNA and three of 19 patients with mixed chimerism in tissue were passed away ($p=0.062$).

One-year progression-free-survival was %27,27 (%95 CI: 0.06-0.53) and %75 (%95 CI: 0.12-0.96), in self DNA and mixed chimerism in tissue, respectively ($p=0.25$). One-year overall survival was %61.54 (%95 CI: 0.37-0.78) and %87.84 (%95 CI: 0.59-0.96), in self DNA and mixed chimerism in tissue, respectively ($p=0.095$).

In AML, progressive disease was less prevalent ($p=0.038$) and overall survival was better ($p=0.05$) in patients with mixed chimerism in tissues.

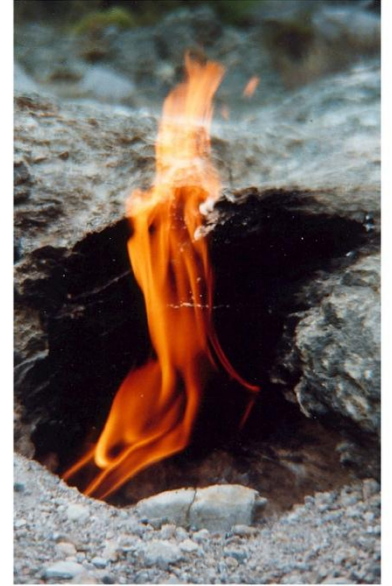
Conclusion: At a median 14 months of follow-up, we found that progressive disease and death was less prevalent in AML patients with mixt chimerism in tissue (with strong effect of graft-versus-leukemia), and overall survival was better. In patients with mixed chimerism on post-transplant day 28, we revealed that, progressive disease, loss of chimerism, and death was less frequent. However, there was no statistical significance. In this group of patients, progression-free and overall survival was better, but statistical difference was not shown. In our study, we consider that some of the variables might affect survival and end-points with the extension of our follow-up time.

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Yunan mitolojisine göre birden fazla organizmaya ait uzvun tek canlıda bulunduğu -ağzından ateş püskürten aslan başlı ve gövdeli, sırtında yükselen bir keçi kafası ile keçi memeleri olan ve kuyruğu ise yılan olarak betimlenen yaratık- Kimera'nın (Chimera) Likya'da yaşamış olduğu söylenmektedir.

Yunan mitolojisine göre kahraman Bellerophontes tarafından Kimera toprağın yedi kat altına gömülmüş olup ağzından çıkan alevler düşünülerek, Antalya'da Yanartaş adıyla bilinen ve hiç sönmeden taşlar arasında ateşlerin çıktığı Kemer-Çıralı Köyü yakınlarına ismini vermiştir. Olimpos'un sönmeyen ateşi olarak Olimpiyat Meşalesi'ne de ilham kaynağı olmuştur.

Tarihte ilk kez Kimera'da can bulmuş ve genetik olarak farklı dokulara sahip olduğu tanımlanan Kimera'nın bronzdan yapılmış bir örneği Floransa'da bir arkeoloji müzesinde sergilenmektedir.



Kimera heykeli: By I, Sailko, CC BY-SA

3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=20060005>

Yanartaş fotoğrafı: Alexander Buschorn (1991) - de.wikipedia üzerinden Commons'a transfer edildi., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6006604>

Tıpta Kimera (Chimera) ya da kimerizm, farklı DNA'lı hücrelerin veya doku kısımlarının tek canlıda barınmasını tanımlamada kullanılır olmuştur.

Hematolojide kimera ise allogeneik hematopoietik kök hücre nakli (HKHN) sonrası hasta bedeninde vericiye ait hematopoiezin gelişmesi olarak tanımlanmıştır. Nakil sonrası nakil endikasyonu hastalık durumu, donör hematopezinin durumu (engrafman) belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilimdalı'nda allogeneik HKHN yapılan hastaların nakil sonrası 28. gündeki doku kimerizmi ile periferik kan kimerizmini karşılaştırdık ve nakil seyrine etkisini değerlendirmeyi amaçladık.



II. GENEL BİLGİLER

A. Hematopoietik Kök Hücre Nakli ve Alt Grupları

Hematopoiez; Yunanca ‘kan üretimi’ demek olup olgun ve işlevsel kan hücrelerinin kemik iliğinde ömür boyu üretilmesidir. Çevresel kanda, kan hücrelerinin sayıları belirli mutlak değerler arasındadır.

Kemik iliğinin ihtiyaç halinde üretimini artırma kapasitesi oldukça fazladır. Günde ortalama 300 milyardan fazla eritrosit, trombosit ve nötrofil üretilmektedir(1).

Hematopoietik kök hücreler (HKH) multipotenttir, kendilerini yenileyebilme ve tüm kan hücre serilerine dönüşebilme kapasitesindedir. Uygulamada, insan HKH’nin belirteci olarak CD34 pozitifliği kullanılmaktadır (2).

İnsanda, HKH; doğrudan kemik iliğinden, kemoterapi ve/veya granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF) verilmesini takiben çevresel kandan ya da kordon kanından elde edilebilmektedir. HKH, bazı immünolojik, hematolojik, tek gen hastalıkları ve bazı solid tümörlerde tedavi etme ve semptomları hafifletme amacıyla kullanılmaktadır (3) (Tablo-1).

Tablo 1: HKHN Endikasyonları	
Otolog HKHN	Allogeneik HKHN
Kanser	Kanser
Multipl Myelom	Akut Myeloid Lösemi
Hodgkin dışı Lenfoma	Akut Lenfoblastik Lösemi
Hodgkin Lenfoma	Kronik Myeloid Lösemi
Akut Myeloid Lösemi	Myelodisplastik Sendrom
Nöroblastoma	Hodgkin Hastalığı
Over Kanseri	Hodgkin dışı Lenfoma
Germ Hücreli Tümör	Myeloproliferatif Hastalıklar
Diğer Hastalıklar	Kronik Lenfositik Lösemi
Otoimmün Hastalıklar	Multipl Myelom
	Juvenil Kronik Myeloid Lösemi
	Diğer Hastalıklar
	Aplastik Anemi
	Talasemi Majör
	Orak Hücreli Anemi
	Ciddi Kombine İmmün Yetersizlik
	Wiscott-Aldrich Sendromu
	Fanconi Anemisi
	Blackfan-Diamond Anemisi
	Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri
	Doğumsal Metabolik Hastalıklar

HKHN, kök hücre kaynağına göre üç gruba ayrılır;

1. *Kemik iliği kaynaklı:* Genel anestezi altında crista iliaca posterior veya nadiren anteriordan alıcının kilosuna göre 10-15 ml/kg kemik iliği aspire edilir. Maksimum doz vericinin kilosuna göre 20 ml/kg'dır.
2. *Çevre kanı kaynaklı:* Kök hücreler dolaşıma çıkıp yeniden kemik iliğine dönerler. Dolaşımdaki kök hücre sayısı oldukça azdır. G-CSF, GM-CSF ya da plerixafor (CXCR4 inhibitörü) gibi ajanlarla kemik iliğinden dolaşıma kök hücre geçişi artırılabilir. Bu işleme *kan kök hücre mobilizasyonu* denilmektedir. Dolaşımda sayısı artırılan kan kök hücreleri aferez yöntemiyle kandan toplanır. Mobilizasyon, allogeneik HKHN'de sağlıklı vericiye G-CSF verilerek, otolog HKHN'de ise altta yatan hastalık ve hastalık durumuna göre değişmekle birlikte tek başına G-CSF, kemoterapi ve G-CSF veya G-CSF ve plerixafor kombinasyonu ile gerçekleştirilmektedir.
3. *Kordon kanı kaynaklı:* Doğumu izleyerek bebek dışarı alındıktan sonra göbek kordonunun bağlanır ve geride kalan kordon kanı bölümünden kan kök hücreleri enjektörle alınarak dondurulup saklanabilmektedir. Bu amaçla allogeneik ve otolog kordon kanı bankaları kurulmuştur. Az sayıda kök hücre içeriği nedeniyle kullanımı kısıtlıdır(4).

Tablo 2: Kök Hücre Kaynağına Göre Hücre Sayıları (5)

	Hacim	Ortanca CD3	Hedef hücre dozu
Kemik İliği	10-20 mL/hasta kg	$25 \times 10^6/\text{kg}$	$>2 \times 10^8$ TÇH*/hasta kg
Çevresel Kan	150-400 mL/ürün	$250 \times 10^6/\text{kg}$	$5-10 \times 10^6$ CD34+/hasta kg
Umbilikal Kord Kanı	80-160 mL	$2.5 \times 10^6/\text{kg}$	$>3 \times 10^7$ TÇH/hasta kg
TÇH: Total çekirdekli hücre.			

HKHN, verici kaynağına göre sınıflandırıldığında 'singeneik', 'otolog', 'allogeneik' olmak üzere üç gruba ayrılır:

1. *Singeneik HKHN*, alıcı ile vericinin tek yumurta ikizi olup tamamıyla aynı doku gruplarını paylaştıkları nakil türüdür. Aynı immünolojik sisteme sahip oldukları için graft versus hastalık etkisi yoktur. Graft versus host hastalığı (GvHH) riski azdır. Ancak GvHH gelişen olgular literatürde bildirilmiştir(6-8).
2. *Otolog HKHN*, hasta kişinin kemik iliğinden ya da çevre kanından lökoferez yöntemiyle toplanan CD34+ kök hücrelerin, myeloablatif hazırlama rejimini (yüksek doz kemoterapi

ya da radyoterapi) takiben santral venöz damar yoluyla kişiye verilmesi ile gerçekleşir (9). Graft versus hastalık etkisi yoktur; GvHH otolog HKHN sonrasında nadir bir durumdur. Otolog HKHN günümüzde çoğunlukla multipl myelom ve lenfomaların tedavisinde kullanılmaktadır(10).

3. *Allogeneik HKHN*, hastaya başka bir kişinin HKH'lerinin myeloablatif ya da myeloablatif olmayan kemoterapi sonrası nakledilmesi işlemidir. Alıcı ile vericinin arasındaki insan lökosit antijenlerinin (HLA) uyumuna ve akrabalık durumuna göre 4'e ayrılmaktadır;
 - a. HLA tam uyumlu (akraba) kardeş verici,
 - b. HLA tam uyumlu akraba dışı verici,
 - c. Kordon kanı nakli,
 - d. Yarı uyumsuz akraba verici (haploidentik nakil).

B. HKHN Öncesi Hazırlama Rejimleri

Hazırlama rejimi, kök hücre infüzyonu öncesi hastaya uygulanan kemo-bazen birlikte radyoterapidir. Üç ana amaçla yapılır;

1. Altta yatan hastalık malign ise kalıntı malign hastalıktan arındırmak
2. Konak kemik iliğini gelecek vericiye ait HKH'e hazır hale getirmek
3. HKH'in kemik iliğine yuvalanması ve çoğalmasını (engrafmanı) sağlamaya yönelik hem rejeksiyonu hem de GvHH'yi önlemek amacıyla immüsupresyon sağlamak,

Hazırlama rejimi ile myelodeplezyon ve lenfodeplezyon yaparak konak HKHN için uygun hale getirilir.

Hazırlama rejimleri:

- a. *Total vücut ışınlaması (TBI)*: Myeloablatif rejimlerde (MAC): çoğunlukla 12 Gy dozunda verilir (3 gün boyunca, günde iki kere, 2 Gy dozunda), doz arttırıldıkça antilösemik etkisi artmakla birlikte transplant ilişkili mortalite de artar (11).
Akut myeloid lösemilerde (AML) TBI-siklofosfamid ile busulfan-siklofosfamid seçeneklerinin etkinliğinin benzer olduğu gösterilmiştir (12). Akut lenfoblastik lösemilerde (ALL) ise hazırlama rejimlerinde TBI her zaman ilk seçenekte yer almaktadır (13).
- b. *Myeloablatif TBI dışı hazırlama rejimi*: Çoğunlukla alkilleyici ajan temelli rejimlerden

oluşan yüksek doz kemoterapidir. Tarihsel olarak busulfan-siklofosfamid MAC'in temelini oluşturmaktadır. 1980'lerin ortalarında, TBI ilişkili oluşabilecek toksisiteyi azaltabilmek amacıyla Johns Hopkins grubu tarafından geliştirilmiştir (14).

AML'de busulfan ve fludarabin kombinasyonunun aynı etkiyi, daha tolere edilebilir toksisite profiliyle oluşturduğu görülmüştür. Bir çalışmada busulfan-siklofosfamid ile busulfan-fludarabin (BU/FLU) hazırlama rejimi verilen hasta grupları kıyaslandığında aynı antilösemik etkiyle, BU/FLU kolunda daha az transplant ilişkili mortalite görüldüğü bildirilmiştir (15).

- c. *Myeloablatif olmayan hazırlama rejimleri (NMA), azaltılmış dozda hazırlama rejimleri (RIC) ve düşük toksisiteli (RTC) hazırlama rejimleri:* Son 20 yılda, standart MAC rejimlerini alamayacak yaşlı, düşük performansı olan kişilerde, transplant ilişkili mortaliteyi ve organ toksisitesini azaltmak amacıyla NMA, RIC ve RTC rejimleri kullanılmaya başlanmıştır.

MAC, KHK verilmesini gerektirecek geri dönüşümsüz sitopeni yapan hazırlama rejimi olarak tanımlanmıştır. NMA rejimleri sitopeni yapabilir ancak sitopeni beraberinde HKH verilmesini şart koşacak derecede değildir. RIC ise; takibinde kök hücre verilmesine ihtiyaç duyulacak derecede sitopeni yapabilen ancak bu durumun geri dönüşümlü de olabileceği bir rejimdir (16).

BU/Flu hazırlama rejimi oldukça sık kullanılmaktadır. NMA, RIC/RTC ya da MAC intravenöz busulfan dozunun sırasıyla 2, 3 ve 4 gün olmasına göre belirlenir (17). Doz yoğunluğu ile nakil sonrası nüks sıklığı arasında ters; ancak nüks dışı mortalite oranları arasında ise doğru orantı olduğu ortaya konulmuştur. BU/Flu RIC rejimi, Fludarabin/melfalan (FLU/MEL'in) RIC rejimi ile kıyaslandığında FLU/MEL'in daha yoğun bir tedavi olduğu ve nüks sıklığını azalttığı ancak tedavi ilişkili toksisitenin FLU/BU'ya kıyasla daha fazla geliştiği bildirilmiştir(18).

- d. *Allogeneik HKHN'de HLA uyumsuz akraba dışı verici (MMUD), haploidentik vericide hazırlama rejimleri:* Önceleri transplant ilişkili mortalite ve yamanma sorunlarının en çok yaşandığı hastaları bu grup oluştururken, günümüzde hazırlama rejimlerindeki yeni gelişmeler dikkati çekmektedir.

Akraba dışı vericiden nakil olgularında hazırlama rejimi ile ATG verilmesinin GvHH ve transplant ilişkili mortaliteyi azalttığı, bununla birlikte graft-versus-hastalık etkisini

azaltmadığı, dolayısıyla nüks sıklığını arttırmadığı gösterilmiştir (19).

Avrupa’da haploidentik HKHN’de MAC hazırlama rejimi olarak TBF (thiotepa ve BU/Flu) kullanılmaktadır ve GvHH’yi önlemek amacıyla ise post-transplant siklofosfamid verilmektedir.

GvHH korumasında haploidentik HKHN yanı sıra HLA uyumlu kardeş vericiden veya HLA uyumsuz akraba dışı vericiden nakil olgularında da post-transplant siklofosfamid kullanılmış çalışmalar vardır (20).

Otolog HKHN’de hazırlama rejimleri: Otolog HKHN çoğunlukla lenfoma ve multipl myelom için uygulanmaktadır. Multipl miyelomda yüksek doz melfalan, lenfomada sıklıkla BEAM, veya BEAC kullanılmakta olup, özgül monoklonal antikorlar da rejime eklenebilmektedir.

AML’de alternatif vericiye ulaşma şansının artması, HKHN’de yeni gelişmelerin olması ve RIC rejimlerin ortaya çıkışıyla otolog nakilden uzaklaşmıştır. Ancak otolog HKHN yapıldığı dönemde en popüler hazırlama rejimi busulfan-siklofosfamid olmuştur. ‘Busulfan-melfalan’ın ‘busulfan-siklofosfamid’e göre nüks sıklığını azalttığı, daha iyi genel sağkalım sağladığı ve transplant ilişkili mortaliteyi arttırmadığı gösterilmiş olup daha fazla tercih edilebileceği belirtilmiştir. Nakil öncesinde hastalığı remisyonda olan, minimal kalıntı hastalığı saptanmayan olgularda daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir(21).

C. HLA Doku Gruplarının Verici Seçiminde Önemi

HKHN’nin başarısı pek çok değişkene bağlı olup büyük oranda hasta ile verici arasındaki HLA uyumu etkilidir.

HLA, 6. kromozomda kodlanan bir grup genin ürünüdür ve bu ürünler birleşerek majör histokompatibilite kompleksini (MHC) oluşturur.

HLA allelleri, biri anneden biri babadan gelen 2 set haplotipten oluşmaktadır. Dolayısıyla iki kardeş arasında HLA tam uyumun saptanma olasılığı %25’tir. Eğer varsa, HLA tam uyumlu kardeş verici en uygun verici olarak kabul edilir. Ancak hastaların sadece üçte birinde bu olasılık mevcuttur.

Verici ile doku uyumu araştırılırken, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 kapsayan 10 allel için yüksek çözünürlüklü tiplendirme yapılır (22). Akraba-dışı tam uyumlu verici (8/8 ya da 10/10) bulma ihtimali %16 ile %75 arasında değişmektedir (23).

Tam uyumlu kardeş ya da akraba dışı verici bulunamaz ise haploidentik HKHN seçeneği

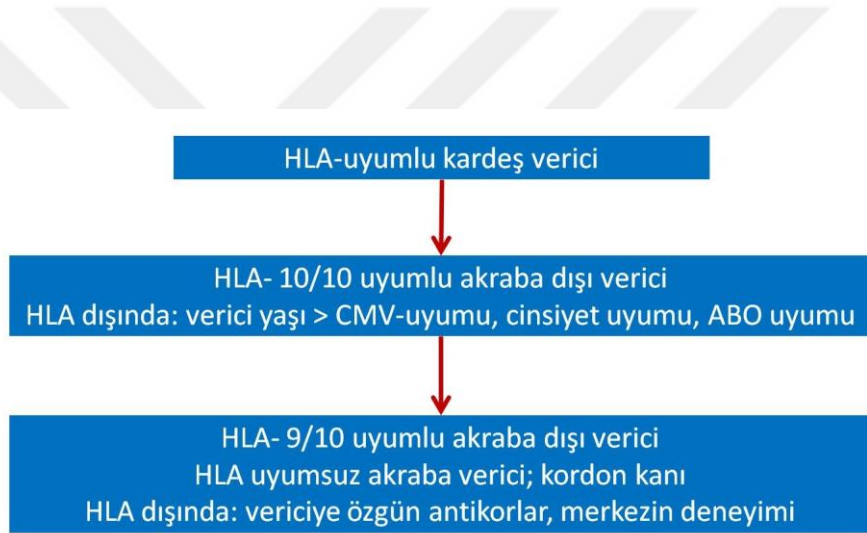
değerlendirilir.

Mümkünse ABO kan grubu uyumu aranmalıdır. Bu durum mümkün değilse öncelik minör uyumsuzluğa verilmelidir, majör uyumsuzluk en sona bırakılmalıdır.

Sitomegalovirüs (CMV) serolojisi açısından hasta ve verici arasında uyum aranmalıdır.

Verici seçim sıralaması aşağıdaki gibi önerilir;

1. Çocuk,
2. En genç erkek kardeş
3. En yaşlı kız kardeş
4. Baba
5. Anne



Şekil 1: Verici seçimi algoritması(5)

D. Kimerizm ve Kimerizmi Belirlemede Rol Oynayan Faktörler

Hastaya verilen HKH'ler kemik iliği fonksiyonunun geri kazanılmasında önem taşımaktadır. Bu hücrelerin üzerinde bulunan belirteçler sayesinde, kök hücrelerin canlılığı, dağılımı ve dönüşümü, konağın tüm ömrü boyunca takip edilebilmektedir.

Singeneik HKHN'de elimizdeki tek belirteç konağın hastalığına ait belirteçlerdir. *Otolog nakillerde*, graft verilmeden önce grafta belirteç aktarımı yapılabilmekte ve bu şekilde hastalık nüksü durumunda, malign hücrelerin kaynağının konak veya verilen kök hücreler olduğu konusunda yorum yapılabilmektedir. *Allogeneik HKHN'de*, genetik belirteçlerle bu ayırım sağlanabilmektedir. Nakil öncesi belli lokuslardaki alleller incelenir ve konak ile verici arasında farklı olduğu bilinen alleller belirteç olarak kullanılır. Bu belirteçleri tanımlamak

akraba dışı verici durumlarında kolayken akraba vericilerde daha zordur; ancak günümüz teknolojisinde singeneik HKHN dışındaki nakillerde kolayca belirlenebilmektedir.

Kimerizm, günümüzde allogeneik HKHN yapılan kişilerde hematopoietik hücrelerin konaktan mı, vericiden mi köken aldığını ifade ederken kullanılır. *Tam kimerik* dediğimizde, tüm hematopoietik hücrelerin verici kökenli olduğunu, *parsiyel ya da karışık kimerik* ifadesiyle de hem konak hem vericiye ait hücrelerin bir arada bulunduğunu anlamaktayız. *Split kimerizm*, dendiğindeyse bazı hücre serilerinin verici bazılarının konak kökenli olduğu ifade edilmektedir.

E. Kimerizm Bakılma Yöntemleri

Tarihsel süreçte, konaktaki kimerizmi ve verici yamanmasını anlayabilmek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır.

Kimerizm belirlenmesinde ilk yöntem eritrosit antijen farklılığının belirlenmesidir. ABO, Rh ve MN sistemi bu amaçla kullanılmıştır. Ancak eritrositlerin yarı ömürlerinin uzun olması ve HKHN’de sık transfüzyon yapıldığı düşünüldüğünde vericiye özgül eritrosit antijeni belirleyicilik zordur. Ayrıca ABO uyumsuzluğu olan olgularda eritrosit yamanmasının süresi uzamaktadır ve sonuçlar yanıltıcı olabilmektedir.

Cinsiyet uyumsuz olgularda ve sitogenetik anormallik saptanan olgularda sitogenetik inceleme kullanılabilmektedir (24). Ancak bu yöntemin dezavantajları alıcı ve verici arasında cinsiyet uyumsuzluğu olması ve metafaz elde etme gerekliliği ile metafazdaki hücrelerin sadece bir kısmının değerlendirilebilmesidir. Kimerizm analizleri olarak Flöresan in situ hibridizasyon (FISH) ve sınırlayıcı enzim parça uzunluğu çeşitliliği (RFLP) de kullanılmıştır.

1980’lerin sonlarında, moleküler biyoloji yöntemlerinde elde edilen gelişmeler sonrasında polimeraz zincir reaksiyonlarının (PZR) geliştirilmesiyle yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Kısa ardışık tekrarlar (STR)’in 1990’ların sonunda PZR yöntemiyle kullanılmasıyla hem hızlı hem de kesin sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır.

Günümüzde, tek nükleotid polimorfizminin gerçek zamanlı PZR (rPZR) ile kullanılmasının kimerizm analizlerinde STR-PZR yöntemine göre duyarlılığı daha da arttırdığı bilinmektedir. Ancak kantitatif doğruluk, STR-PZR’ye göre (varyasyon katsayısı %1-5), rPZR ile (varyasyon katsayısı %30-50) daha düşüktür.

Bu alandaki en yeni gelişme ise, dijital PZR(dPZR) ile DNA’nın kesin ve doğru bir şekilde kantitifiye edilmesine dayanır.

Tüm bu yöntemler incelendiğinde; post-transplant kimerizm tayininde günümüzde altın standart yöntem olarak halen fluoresan işaretli primerlerin ve kapiller elektroforez ile fragman çözünürlüğünün kullanıldığı STR-PZR yöntemi kabul edilmektedir (25).

F. HKHN’de Kimerizmin klinik uygulamaları;

Nakil öncesi hasta ve vericiden örnekler alınır, analiz edilir ve sonuçlar hastanın takip sürecinde de kullanılmak üzere saklanır. Örnekler çoğu zaman kan örneğidir, ancak kan saklanamadan nakil yapıldıysa bukkal mukoza, deri, saç gibi doku örnekleri de kullanılabilir.

Kimerizm nakil sonrası pek çok amaçla kullanılmaktadır (26) (Tablo 3).

Tablo 3: HKHN’de Kimerizm Testlerinin Klinik Uygulaması
1. Verici hücre yamanmasının belgelenmesi
2. Verici hücrelerinin aşağıdaki durumlarda varlığının gösterilmesi
Yetersiz ilik fonksiyonu olan hastalar
DLI adayı hastalar
İkinci allogeneik HKHN adayı hastalar
Rejeksiyon için artmış riskli hastaların uzun dönem takibi
3. GvHH, rejeksiyon ya da nüksün prognostik riskinin anlaşılması
4. Nüks malignitenin ya da gelişecek lenfoproliferatif hastalığın kökeninin verici ya da hasta hücrelerinden olması
5. Ciddi kombine immün yetersizliğinde nakil öncesinde maternal hücre varlığının tanımlanması
6. Ciddi kombine immün yetersizliğinde nakil sonrası immün yeniden yapılanmanın değerlendirilmesi
7. Transfüzyon ile gelen hücrelerin GvHH’ye sebep olup olmadığının anlaşılması
8. İkizlerin genetik olarak aynı olduklarının doğrulanması
9. Multipl umbilikal kord nakli sonrası yamanmanın kökeninin belirlenmesi

Günümüzde yeterince hassas yöntemler kullanıldığında, konakta kendi hücrelerinin MAC rejimini takiben post-transplant ikinci yılda bile olduğu gösterilmiştir. Genel olarak, önceden alınan yoğun kemoterapiler ve daha yoğun hazırlama rejimlerinden sonra yapılan HKHN sonrasında, konağa ait hücrelerin varlığının azalması ve nakledilen hücrelerin akut GvHH’yi tetiklemesi ve yamanmayı hızlandırması beklenmektedir (27). Hastaya verilen hücrelerin içerisinde bulunan T hücreleri konağa ait hematopoietik hücrelere saldırarak yok etmeyi hedefler; ancak verilen üründe T hücreler azaltılmışsa, bu kişilerin karışık kimerik saptanması

olasılığı daha fazladır (28). Literatürde, MAC rejimi sonrası HKHN’de ilk 100 günde konak hücrelerinin görülmemesi, artmış akut ve kronik GvHH(29), 2-6. aylar arasında halen tespit edilebilir olması artmış nüks sıklığı (30) ve düşük kronik GvHH ile ilişkilendirilmiştir(31).

1. Graft başarısızlığı için riskli olan hastada kimerizm testleri:

HKHN sonrası yetersiz kemik iliği fonksiyonu gösteren veya donör lenfosit infüzyonu (DLI) adayı ya da ikinci nakil adayı alıcılarda kimerizm durum değerlendirilmesinde kullanılır.

Graft rejeksiyonu HKHN sonrası pansitopenik hastada, kemik iliğinin hiposelüler olması ve vericiye ait hiç hücre saptanamamasıyla yani kimerizm gelişmemesi veya kaybı ile tanınır.

Nüks: Kimerizmin sürmesi durumunda DLI ve/veya aynı vericiden ikinci HKHN planına yönlendirir. Giderek azalan kimerizimli olgularda, DLI ile rejeksiyonun önlendiğini bildiren yayınlar mevcuttur(32). DLI sonrası karışık kimerizmden tam kimerik hale dönüşüm olabilmektedir. Ancak GvHH de gelişebileceği de akılda tutulmalıdır.

Aplastik anemi veya talaseminin tedavisinde ilk yamanmayı gösterebilmek için seri kimerizm incelemeleri yapılır. Talasemide karışık kimerizmin $>30\%$ otolog hücre olduğunda(33) ve diğer selim kan hastalıklarında (34) karışık kimerizmin artışı rejeksiyon ihtimalinin artmış olması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2. Malign olmayan hastalıklarda kimerizm;

İmmün yetersizlik sendromları, depo hastalıkları, osteopetrosis, talasemi, orak hücreli anemi, ağır aplastik anemi gibi bazı malign olmayan hastalıkların tek küratif tedavisi allogeneik HKHN’dir. Bu hasta grubunda HKHN ile hematopoietik fonksiyonu iyileşmesi, veya immün yetersizliğin düzelmesi ya da sorumlu enzim üretimi ile düzey artışı normalleşmesi devamlı ya da stabil yamanma sağlanması amaçlanır. O nedenle, hematopoiezin tamamen verici kökenli olması gerekmeden karışık kimerizm sağlanması çoğu zaman yeterlidir. Ancak erken dönemde verici kökenli kimerizmin daha yüksek oranda olmasının daha iyi genel ve hastalıksız sağkalım sağladığı bildirilmiştir. RIC rejimi sonrası, verici kaynaklı T hücrelerin ve doğal katil (NK) hücrelerin yamanmasının düşük seviyede olması, artmış rejeksiyon ve antitümör etkinliğin olmamasıyla ilişkilendirilmişken; artmış verici yamanması, GvHH riskinde artma, progresyonsuz sağkalımda artma ile ilişkilendirilmiştir(35). Bu hastalarda toksik yan etkileri azaltmak için hazırlama rejiminin yoğunluğu çoğu zaman azaltılır, myeloablatif tercih edilmez.

3. Malign hastalıklarda kimerizm;

Malign hastalık sebebiyle allogeneik HKHN yapıldıktan sonra kimerizm bakıldığında, alıcıya ait saptanan hücreler malign hücre veya normal hematopoietik sistemine ait veya her ikisi de olabilir (36, 37). 1990’larda karışık kimerik olan lösemili hastalarda, graft-versus hastalık etkisinin düşük olduğu ve nükslerin olduğu bildirilmiştir.

Post-transplant kimerizm izlemleri, dinamik bir süreçtir. Eğer olası nüks yakalanmak isteniyorsa kısa zaman aralıklarıyla kimerizm takibi yapılmalıdır(38). Hasta tam kimerik durumdan karışık kimerik hale geldiğindeyse nüks saptanabilmektedir. Artan karışık kimerizm tespit edilen hastalarda immünsupresif ilaçları kesmek ya da DLI uygulamak nüksü önlemede kullanılmaktadır(39). Minimal kalıntı hastalık saptanırken; kimerizm bakmak dışında, örneğin AML veya MDS’de CD34, ALL’de alt tipine göre CD10, CD19, CD3, CD4, CD5, CD8 gibi belirteçler de nüks belirleme duyarlılığını artırır(40).

G. Graft Versus Host Hastalığı; Profilaksisi

Allogeneik HKHN sonrasında yaşamı tehdit eden komplikasyonlardan biri GvHH gelişmesidir. Vericinin T hücrelerinin konağı yabancı olarak algılaması sonucunda görülür.

Hastaların % 30-50’sinde GvHH gelişirken bunların %15’i ciddi (evde III-IV) GvHH geliştirir.

MAC rejimi sonrası GvHH profilaksisi; 1980’lerin ortasında siklosporin-metotreksat kombinasyonunun üstünlüğü gösterilmiştir ve günümüzde halen bu rejim altın standart olarak kullanılmaktadır(41). Amerika altın standartlarını ise siklosporin gibi kalsinörin inhibitörü (CNI) olan takrolimus ile metotreksat kombinasyonu oluşturmaktadır. Hem takrolimus hem de siklosporin GvHH’yi, aktive T hücrelerin nükleer faktörlerinin aktivasyonu önleyip interlökin-2 salınımını azaltarak, bu sayede de efektör T hücrelerin aktivasyonunu inhibe ederek önlerler. Bu sırada anti-inflamatuvar özelliği olan ve IL-2 bağımlı Treg hücreleri de azalır.

RIC rejimi sonrası GvHH profilaksisi; siklosporin ya da takrolimusun mikomofetil fenolat (MMF) ile kombinasyonu oluşturur. Kalsinörin inhibitörleri, MAC rejimindeki ile aynı dozda verilir. MMF’in hematolojik yan etki yapabileceği akılda tutulmalıdır.

Haploidentik HKHN sonrası GvHH profilaksisi; post-transplant +3 ve +4. günde 50 mg/kg dozunda siklofosfamid verilmesini takiben takrolimus/MMF kombinasyonu verilmesi

oluşturur. Siklofosfamidin hemorajik sistit ve erken dönemde kardiyak disfonksiyon yapabileceği akılda tutulmalıdır. Post-transplant siklofosfamidin kronik GvHH gelişimini azalttığı yönünde çalışmalar bildirilmiştir(42). Akraba dışı vericilerde ATG ile post-transplant siklofosfamidi kıyaslayan faz 3 çalışmalar süregelmektedir. Siklofosfamid alloreaktif T hücreleri azaltırken Treg hücrelere zarar vermemektedir.

ATG; özellikle akraba dışı vericiden HKHN yapıldığında kullanılır. Literatürde akut ve kronik GvHH'yi azalttığı farklı çalışmalarla bildirilmiştir(43, 44).

GvHH profilaksisinde verilebilecek yeni immünsupresif ilaçlar; bir mTOR inhibitörü olan sirolimus bu grup ilaçlar arasında sayılabilir. CNI'nin aksine Treg hücrelerine kıyasla konvansiyonel T hücreleri baskılar. Bunu, mTOR-protein kinaz B yolağı üzerinden yapar. Dana-Farber Kanseri Enstitüsü grubu tarafından evre II-IV akut GvHH'yi %20.5'a ve evre III-IV'ü %5'in altına düşürdüğü gösterilmiştir. Bu, daha büyük çalışmalar yapılmasına ön ayak olmuştur. Takrolimus/sirolimus ile takrolimus/metotreksat'ın kıyaslandığı çalışmada GvHH gelişmeyen süre ve akut evre II-IV GvHH gelişme oranları kıyaslandığında iki kolda anlamlı bir fark bulunamamıştır(45).

Bortezomib ve maraviroc'un da GvHH profilaksisinde kullanılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur.

Hayvan modellerinde, vorinostat (histon deasetilaz inhibiötü, düşük dozda antiinflamatuvar ve immünregülatör) ve tosiluzumab çalışmaları bulunmaktadır. Vorinostatın insan üzerindeki çalışmasında, standart profilaksiye eklendiğinde GvHH gelişme sıklığında değişiklik olmadığı görülmüştür. Tosilizumab ise; anti IL-6 reseptör monoklonal antikorudur. IL-6 seviyesi, GvHH geliştiğinde mikroçevrede artmaktadır ve tosiluzumab'ın klasik CNI+metotreksat profilaksisine eklenerek test edildiği çalışmalarda GvHH şiddetini azaltarak sağkalımı uzatabileceği öne sürülmüştür(46).

III. HASTALAR ve YÖNTEM

A. Olgular

İ.Ü. İTF İç Hastalıkları Hematoloji BD kliniğinde Ocak 2019 ile Ekim 2020 tarihleri arasında Allogeneik HKHN yapılan 41 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınma kriterleri:

1. Çalışmaya alındığında 18 veya 18 yaşından büyük olan hastalar
2. Biyopsi yapılmasına izin veren dolayısıyla çalışmaya katılmak için onam formunu imzalayan hastalar
3. Allogeneik kök hücre nakli olmuş ve post-transplant 28. güne ulaşmış olmak

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

1. 18 yaşından küçük hastalar
2. Çalışmaya katılmak için onam vermeyen hastalar
3. Örnek vermeyi reddeden hastalar

B. Yöntem

Çalışmamızda allogeneik HKHN olan hastalardan alınan cilt biyopsisinden elde edilen DNA'lar STR-PZR kimerizm yöntemiyle çalışılmıştır. Nakil öncesinde hasta ve vericilerinden alınan kanın total lökositlerinden ayrılan DNA, nakil sonrasında 28. günde hastadan alınan cilt biyopsisinden elde edilen DNA'lar STR-PZR kimerizm yöntemiyle çalışılmıştır.

Hastalar; aldığı tanı, yaş, cinsiyet, ilaç rejimi, kan grubu, engraftman gelişimine ek olarak donörlerinin yaşı, cinsiyeti, kan gruplarına göre yapılan testler sonucunda elde edilen analizlerle değerlendirilmiştir.

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 04.02.2019 tarih, 144 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunmuştur. Çalışma Helsinki kriterlerine dayanılarak IKU/İLU çalışma prensiplerine uygun olarak yapılmıştır.

İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Allojenik Kemik İliği Ünitesi'nde nakil planlanan hastaların demografik ve klinik özellikleri, hazırlık sırasında uygulanan protokolleri kaydedilmiştir.

EDTA'lı tüplere nakil öncesi hasta ve donörden kan alınmış, nakil sonrası 28. günde ise hastadan cilt biyopsi materyali örnekleri alınmıştır.

Her hastadan elde edilen doku örneklerinden tuz çöktürme metodu ile izole edilen hücrelerden DNA'lar elde edilmiştir.

Test için gerekli olan DNA konsantrasyonu 1-2 ng/μl olarak belirlenmiştir.

DNA İzolasyonu

Etil trimetil bromid tuzları ile denatürasyon ve presipitasyonuna dayanan tuz çöktürme yöntemi ile DNA elde edilmiştir. Santrifüj ve sıcaklık ayarlı su banyosu, vortex uygulanmıştır.

Her bir DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu, NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazıyla ölçülmüştür.

1. Doku örnekleri -80 de dondurulmuş ve daha sonra iyice ezilerek DTAB deterjanı ile parçalanması sağlanmıştır.
2. Parçalanmış doku 10 dakika 65°C de su banyosunda inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyonun ardından doku örneği iyice vortexlenir ve üzerine 900 μl klorofm ilave edilmiş ve 14000 devirde 2 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonrasında üst sıvı, içerisinde 100 μl CTAB+900 μl distile su bulunan ependorfa aktarılmıştır. Sonrasında tüp altüst edilerek DNA nın gözüklüp toparlanması sağlanmıştır.
5. 14000 devirde 2 dakika santrifüj edilen örnek süpernatantı atılmıştır ve üzerine 300 μl NaCl + 700 μl absolü alkol ilave edilerek vortexlenmiştir.
6. 14000 devirde 2 dakika santrifüjün ardından süpernatant atılmış ve peletin üzerine 1000 μl %70 lik alkol ilave edilip yine 14000 devirde 2 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatant atılmış ve dipte görünen DNA aplikatör ile dikkatlice kurutulmuş ve isteğe uygun amaca göre sulandırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Kimerizm analizi

STR-PZR Kimerizm Metodunda Qiagen ID Plex Plus kiti kullanılmıştır.

İzole edilmiş hücrelerden elde edilen DNA; kitin sahip olmuş olduğu STR bölgelerine ait primerler sayesinde Multipleks PCR yöntemiyle amplifiye edilmiştir. 96 kuyucuklu plate'lere Hi-Di formamid ve Size Standartı olan Liz buffer eklenmek koşuluyla, Multiplex PCR ile

çoğaltılan amplifiye edilmiş ürünler eklenmiş ve denatürasyonu sağlanmıştır. Ardından kapiller elektroforez cihazına (ABI 3130) konarak yürütülmüştür. GeneMapper programıyla kimerizm sonuçları değerlendirilmiştir.

Short Tandem Repeat PZR Protokolü

1. Konsantrasyonları ölçülmüş olan hastaların nakil öncesi, nakil sonrası ve donörlerinin DNA'sı ayrı ayrı ependorflara isimleri yazılarak 1 ng olabilecek şekilde sulandırma yapılmıştır.
2. Hasta nakil öncesi, sonrası ve donörü için hazırlanmış 0.2 mL'lik ependorfların her birine;
Reaksiyon mix: 10.5µL
Primer mix: 5.5µL
Taq Polimeraz: 0.5µL konulmuştur (Taq Polimeraz eklemesi yapmadan önce, hepsi vortexlenmiştir).
3. Konsantrasyonu istenen yoğunlukta olan DNA'lar vortexlenmiş ve nakil öncesi, nakil sonrası ve donör için her bir ependorfa 10 µL DNA'dan eklenip Thermal cycler cihazında multiplex PZR yöntemiyle amplifikasyon sağlanmıştır.
4. 96 well plate'de hastanın nakil öncesi, nakil sonrası ve donörünün amplifiye olmuş ürünleri ayrı ayrı 3 kuyucuğa aktarılmıştır. Her bir kuyuya 0.5µL GeneScan 500 Liz Size Standard ve 15 µL Hi-Di Formamid eklenmiştir.
5. GeneMapper Programında oluşturulan haritaya göre kapiler elektroforezde yürütülme işlemine hazırlanmış plate denatürasyonun ardından ABI 3130 cihazında yerleştirilmiş ve yürütülmüştür.

Değerlendirmede analiz için GeneMapper Software'i kullanılmıştır. PZR şartları şu şekildedir; Denatürasyon için 95 °C'de 11 dakika, bağlanma ve uzama reaksiyonu için 28 döngü; 94°C'de 1 dakika, 59°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika ve 60°C'de 1 saat.

Yapılan değerlendirmede tüm hücre gruplarında nakil sonrası donör(verici) yüzdesinin %95 üzerinde olmasına tam kimerizm olarak değerlendirilmiştir. Nakil sonrası hasta (alıcı) hücre yüzdesinin %5-95 arasında olması durumuna da karışık kimerizm olarak değerlendirilip bu kriterlere göre sınıflandırılmıştır.

Veriler STATA 13 paket programına kaydedilmiş ve analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı analizler ortalama $\pm$ standart sapma ve kategorik değişkenler sayı (yüzde)

olarak verilmiştir. Bağımlı grup karşılaştırmalarında, parametrik test varsayımları sağlandığında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi (Student T test); parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Wilcoxon testi kullanılmıştır. Klinik ve alt gruplar arası kimerizm düzeyi ilişkisi değerlendirilmek için korelasyon ve regresyon analizi kullanılmıştır. Tüm analizler için %95 güven aralığında $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



IV. BULGULAR

A. Hastaların Demografik Verileri ve Allojeneik HKHN Anındaki Özellikleri

Çalışmamıza toplam 41 hasta dahil edildi. Hastaların ortalama yaşı 40 idi. 21 hasta kadın iken, 20 hasta erkekti ve cinsiyet dağılımı birbirine benzerdi. 38 hastaya periferik kök hücre nakli yapılırken, 3 aplastik anemi tanılı hastamıza ise kemik iliği kaynaklı kök hücre nakli yapıldı. Hastalarımızın çoğunluğunda akraba vericiden tam uyumlu nakil yapılmış olup (n=17), geri kalan hastaların 13'ünde akraba dışı tam uyumlu, 6'sında haploidentik, 5'inde akraba dışı 9/10 uyumlu HKHN yapılmıştır. HKHN endikasyonu dahil hastaların özellikleri Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Hastaların Demografik Verileri		n=41
Ortanca yaş (aralık)		40 (19 – 60)
Cinsiyet (Kadın : Erkek)		21 : 20
Takip süresi		14 ay (2 – 37)
Hastalık (n)		
	AML	13
	Granülositik Sarkom	1
	Myelodisplastik Sendrom	7
	GATA 2 mutasyonu	1
	B hücreli ALL	3
	T hücreli ALL	1
	T hücreli ALL (LN) ve ikincil AML(Kİ)	1
	Aplastik Anemi	3
	İkincil Myelofibroz	2
	Hodgkin Lenfoma	4
	Agresif Hodgkin dışı Lenfoma	3
	KLL Richter transformasyonu	1
	Multipl Myelom	1
Kök hücre kaynağı		
	Çevre kanı	38
	Kemik iliği	3
HKHN türü		
	Akraba tam uyumlu	17
	Akraba dışı tam uyumlu	13
	Akraba dışı 9/10 uyumlu	5
	Haploidentik	6

Kİ: kemik iliği, LN: lenf nodu.

Hastalık dağılımı AML (13 AML, 1 granülositik sarkom ve 1 T-ALL-ikincil AML olgusu), MDS (7 MDS ve 1 GATA-2 mutasyonu olgusu), lenfoma (4 HL, 3 HDL, 1 KLL Richter transformasyonu), ALL (3 B-ALL, 1 T-ALL), aplastik anemi (n=3), ikincil myelofibroz (n=2) ve multipl myelom (n=1) olarak sınıflandırıldı. MDS tanısı ile HKHN yapılan hastalarımızın biri, daha öncesinde ALK- Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma nedeniyle otolog nakil yapılmış ve ikincil MDS gelişmiş bir hastaydı.

KML tanısı ile takibimizde olan bir hastamızda ise kemik iliğinde blastik faza dönüşüm ile eş zamanlı periferik lenf düğümünde de T hücreli ALL saptandı.

İkincil myelofibroz gelişen hastalarımızın birinde ilk tanı polisitemia vera, diğerinde esansiyel trombositoz idi.

B. Alıcı ve Vericiler Arasındaki Uyum Değerlendirmesi

Vericilerin ortanca yaşı 34 (aralık: 16 – 63) olup 14’ü kadın, 27’si erkekti. Cinsiyet uyumu ve kan grubu uyumu ile ilgili veriler Tablo 5’te özetlenmiştir.

Tablo 5: Kan grubu, cinsiyet uyum analizi n=41	
Cinsiyet uyumu (var/yok)	20/21
Kan grubu uyumu	
Uyumlu	20
Minör uyumsuz	7
Majör uyumsuz	10
Karşılıklı uyumsuz	4

C. Hazırlama Rejimlerinin Özellikleri ve GVHH Profilaksisi

Miyeloablatif hazırlama rejimi 28 hastada, düşük yoğunluklu hazırlama rejimi 11 hastada tercih edildi. Toksisitesi azaltılmış myeloablatif rejim ise 2 hastada kullanıldı.

Düşük yoğunluklu hazırlama rejimleri aplastik anemi (n=3), Hodgkin lenfoma (n=4) ve ikincil myelofibroz (n=2) hastalarında kullanıldı.

GvHH profilaksisi:

Standart olarak siklosporin ve metotreksat verildi (n=35).

Antitimosit globülin (ATG) akraba dışı vericiden nakil yapılan tüm hastalara (n=18) verildi. Ayrıca 2 olguda, B hücreli ALL tanılı 20 yaşındaki erkek ve ikincil myelofibroz tanılı 51 yaşındaki kadın hastada, vericileri akraba olmasına rağmen GVHH riski yüksek olgular olmaları nedeni ile ve 47 yaşındaki Hodgkin lenfoma tanılı hastada, eşlik eden hastalıkları

nedeniyle düşük yoğunluklu hazırlama rejimi ve GvHH gelişmesi durumunda mortal seyredebileceği düşünülerek ATG verildi. Akraba tam uyumlu vericiden nakil yapılan 32 yaşındaki aplastik anemi tanılı hastaya da uygulanan protokol gereği ATG verildi.

Takrolimus ve mofetil mikofenolat post-transplant siklofosamid ile haploidentik HKHN yapılan hastalara uygulandı (n=6).

D. Kök Hücre Ürün Özellikleri ve Yamanma

Hematopoietik kök hücre kaynağı çevre kanı olan hastalarda ortalama CD34+ hücre sayısı $5,49 \times 10^6/\text{kg}$, kaynağı kemik iliği olan hastalarda $2,15 \times 10^6/\text{kg}$ idi. CD3+ hücre mutlak sayısı, beklendiği üzere kemik iliği kaynaklı nakillerde daha azdı (Tablo 6).

Tablo 6: Kök hücre ürününün özellikleri			
Graft tipi	CD34 ($10^6/\text{kg}$)	TÇH ($10^6/\text{kg}$)	CD3 ($10^6/\text{kg}$)
Çevre kanı (n=38)	5,49 (2,22-12,14)	965 (456-1905)	230 (93-423)
Kemik iliği (n=3)	2,15 (1,94-2,98)	340 (227-635)	37 (21-38)

Aplastik anemi tanılı, 33 yaşındaki erkek hastaya, vericinin seçimi doğrultusunda çevre kanı kaynaklı HKHN uygulandı. Bu hastada nötrofil yamanması post-transplant 19. Günde gelişti; trombosit yamanması gelişmedi. Kemik iliği kaynaklı HKHN uygulanan 3 hastamızın 2'si aplastik anemi, 1'i AML tanıları ile takip edilmekteydi. Kök hücre ürün kaynağına göre yamanma günleri Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7: Kök hücre kaynağına göre ortalama yamanma günleri		
Kök hücre kaynağı	Nötrofil yamanması	Trombosit yamanması
Çevre kanı kaynaklı (n=38)	15 (10-39)	13 (6-155)
Kemik iliği kaynaklı (n=3)	19 (15-21)	23 (15-44)

E. Allo-HKHN Sonrası +28. Günde Çevre Kanı ve Doku Kimerizmi Sonuçları

1. Çevre kanı kimerizmi

Post-transplant 28. günde 40 hastada çevre kanı kimerizmi tam kimerik ikincil myelofibroz tanılı bir hastada karışık kimerik olarak rapor edildi. Hastanın izlenimde HKHN birinci senesinde tam kimerizm geliştiği gözlemlendi.

2. Doku kimerizmi

Hastaların 40'ında çalışılabilirdi. Bir hastada doku DNA'sı elde edilemedi. Geri kalan 40 hastanın 21'inde dokuda hastaya ait DNA, 19'unda hem hasta hem de vericinin DNA'sı gözlemlendi.

3. Kimerizm seyri

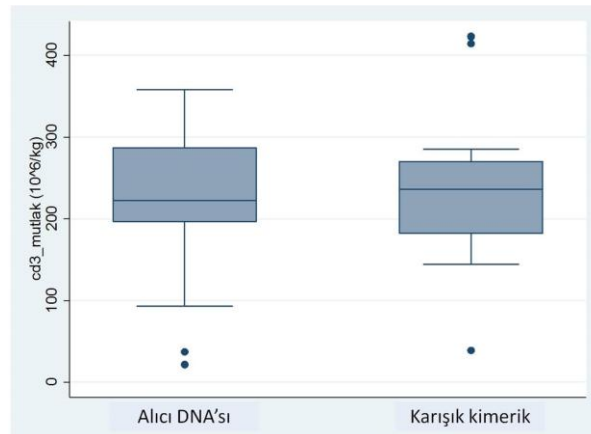
Doku kimerizmi kendi DNA'sı olarak sonuçlanan 21 hastanın 9'unda (%43), ortalanca 14 aylık takipte (2-37 ay), karışık kimerik saptanan 19 hastanın 3'ünde (%16), (ortalanca 14 aylık takip; 3-34 ay) kan kimerizm kaybı gözlemlendi ($p=0.062$, Tablo 8).

Kan kimerizm kaybı saptanan 12 hastanın tümünde hastalık progresyonu gözlemlendi.

Tablo 8: Çevre kan kimerizm kaybı ile 28. gün doku kimerizmi arasındaki ilişki

28'de Doku kimerizm	Çevre kanı kimerizm kaybı		p
	YOK	VAR	
Kendi DNA'sı (n=21)	12	9	0.062
Karışık kimerik (n=19)	16	3	

Analizimizde kök hücre ürününün mutlak CD3 içeriğinin doku kimerizmi alıcı ya da karışık kimerik saptanan grupta benzer olduğu görüldü (Şekil 2).



Şekil 2: Mutlak CD3 sayısı ve 28. gün doku kimerizmi ilişkisi.

Myeloablatif hazırlama rejimi uygulanan 28 hastanın 10'unda (%36) dokuda karışık kimerizm mevcutken, düşük yoğunluklu hazırlama rejimi alan 10 hastanın 8'inde (%80) karışık kimerizm saptandı ($p=0.016$, Tablo 9).

Tablo 9: MAC ve RIC hazırlama rejimine göre doku kimerizmi

	Kendi DNA'sı	Karışık kimerik	<i>p</i>
MAC (n=28)	18	10	0.016
RIC (n=10)	2	8	

Post-transplant 28. günde dokuda karışık kimerizm tespit edilen 19 hastanın 2'sinde eş zamanlı GvHH mevcut iken, kendi DNA'sı bulunan 21 hastanın 2'sinde GvHH gözlemlendi ($p=0.916$, Tablo 10).

Tablo 10: Post-transplant 28. günde GvHH ile doku kimerizminin ilişkisi

	Kendi DNA'sı	Karışık kimerik	<i>p</i>
GvHH var	2	2	0.916
GvHH yok	19	17	

Hastalarımızın ortalama 14 aylık takibinde toplam 19 hastada GvHH geliştiği saptandı. Doku kimerizmi karışık olan grup ile alıcı DNA'sı saptanan grup arasından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.516$, Tablo 11).

Tablo 11: Post-transplant 28. günde doku kimerizminin takipte GvHH ile ilişkisi

	Kendi DNA'sı	Karışık kimerik	<i>p</i>
GvHH var	11	8	0.516
GvHH yok	10	11	

F. Kimerizm Sonuçlarının Hasta Sağkalımı ile İlişkisi

Çalışma sürecinde 12 hasta vefat etti. Ölüm nedeni gram negatif septisemi ($n=4$), pnömoni ve solunum yetersizliği ($n=2$), invazif fungal enfeksiyon ($n=2$), ilerleyici hastalık ($n=2$), CMV viremi ve akciğer ödemi ($n=1$) ve COVID-19 pnömonisi ($n=1$) idi.

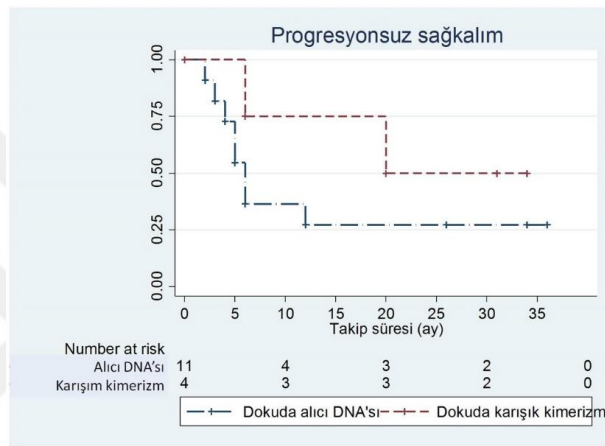
Doku kimerizminde kendi DNA'sı saptanan 21 hastanın 9'u (%43) kaybedilirken, karışık kimerizm saptanan 19 hastanın 3'ü (%16) kaybedildi ($p=0.062$, Tablo 12).

Tablo 12: Post-transplant 28. günde doku kimerizminin ölüm ile ilişkisi

	Kendi DNA'sı	Karışık kimerik	P
Ölüm	9	3	0.062
Sağ	12	16	

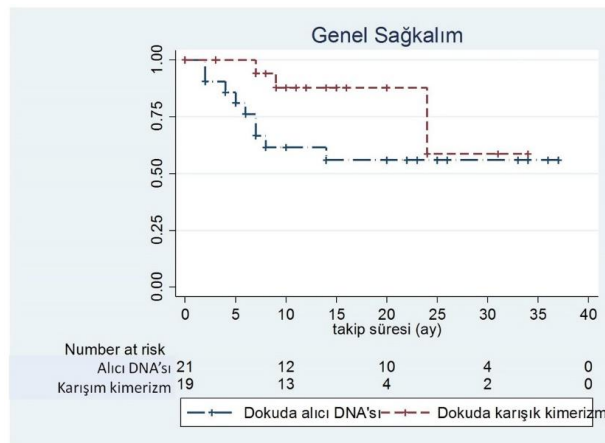
1. Progresyonsuz Sağkalım

Ortanca 14 aylık takip sürecinde 1 yıllık progresyonsuz sağkalım dokuda kendi DNA'sı saptanan grupta %27.27 (%95 CI: 0.06-0.53) iken, karışık kimerizm saptanan grupta %75 (%95 CI: 0.12-0.96) olarak tespit edilmiş; ancak istatistiki olarak anlamlı saptanmamıştır ($p=0.25$, Şekil 3).

**Şekil 3:** Doku kimerizmine göre progresyonsuz sağkalım.

2. Genel Sağkalım

Ortanca 14 aylık takibimizde, 1 yıllık genel sağkalım dokuda kendi DNA'sı saptanan grupta %61.54 (%95 CI: 0.37-0.78) iken, karışık kimerizm saptanan grupta %87.84 (%95 CI: 0.59-0.96) olarak tespit edilmiş; ancak istatistiki olarak anlamlı saptanmamıştır ($p=0.095$, Şekil 4).

**Şekil 4:** Doku kimerizmine göre genel sağkalım.

G. Kimerizmin Diğer Değişkenler ile İlişkisi

Post-transplant 28. gün doku kimerizmi ile vericinin akraba/akraba dışı ($p=0.491$) olması, ATG kullanılmış olması ($p=0.516$), alıcı verici arasındaki kan grubu uyumu/uyumsuzluğu ($p=0.681$) veya cinsiyet ($p=0.516$) uyumu/uyumsuzluğu arasında herhangi bir ilişkisi tespit edilmemiştir (Tablo 13).

Tablo 13: Post-transplant 28. günde doku kimerizminin diğer değişkenler ile ilişkisi				
		Kendi DNA'sı	Karışık kimerik	p
Cinsiyet uyumsuzluğu	Var	10	11	0.516
	Yok	11	8	
Kan grubu uyumsuzluğu	Uyumlu	11	9	0.681
	Minör uyumsuz	4	6	
	Majör uyumsuz	3	3	
	Karşılıklı uyumsuz	3	1	
Verici tipi	Akraba	11	12	0.491
	Akraba dışı	10	7	
ATG kullanımı	Aldı	10	11	0.516
	Almadı	11	8	

H. Hastalık Tipine Göre Verilerin Değerlendirilmesi

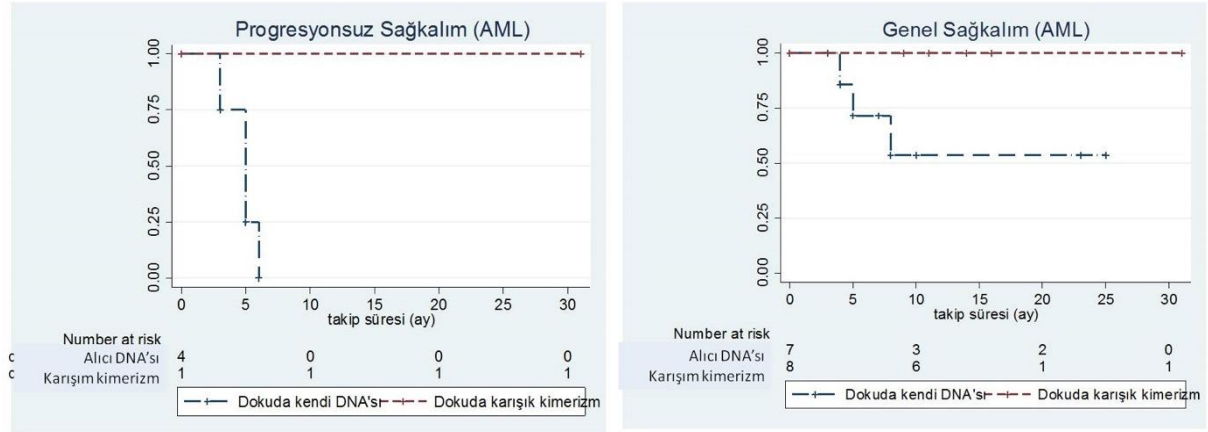
1. Akut Myeloid Lösemi

Doku kimerizmi 15 hastanın 7'sinde kendi DNA'sı olarak sonuçlanırken, 8'inde karışık kimerizmi göstermekte idi. İzlem sürecinde kendi DNA'sı saptanan 7 hastanın 3'ünde hastalık nüksü gelişti. Karışık kimerizm tespit edilen 8 hastada izlem sürecinde nüks gelişmedi ($p=0.038$).

İzlem sürecinde doku kimerizmi kendi DNA'sı olarak sonuçlanmış ve nüks gelişmiş 3 hastanın 2'si ve remisyonda olan 1 hasta kaybedildi.

İzlem sürecinde karışık kimerizm saptanan olgularda izlem sürecinde ölüm gözlenmedi ($p=0.038$).

Doku kimerizm durumu ile progresyonsuz sağkalım ilişkisinde istatistiki anlamlı fark saptanmadı ($p=0.1396$). Doku kimerizm durumu karışık kimerik olan hasta grubunda genel sağkalımda üstünlük dikkati çekti ($p=0.05$).

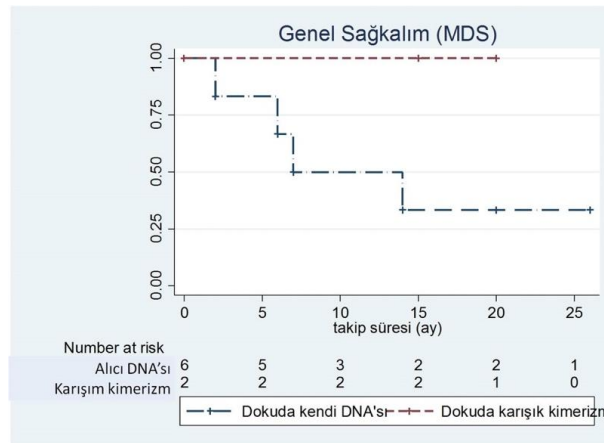


Şekil 5: AML hastalarında progresyonsuz ve genel sağkalım.

2. Myelodisplastik Sendrom

Doku kimerizm durumu 8 hastanın 6'sında kendi DNA'sı, 2'sinde ise karışık kimerizm olarak belirlendi. Kendi DNA'sı saptanan 6 hastamızın 4'ünde refrakter hastalık, 2'de remisyon hali mevcuttu ($p=0.102$). Bu grupta 4 hasta 2'si refrakter hastalık 2'si remisyonunda, fırsatçı enfeksiyon ilişkili vefat etti. Vefat eden 4 hastanın tümünde doku kimerizmi hasta DNA'sı olarak sonuçlanmıştı ($p=0.102$).

Hasta sayısının az olması sebebiyle progresyonsuz sağkalım eğrisi teknik olarak yapılamamıştır. Bu grupta hem progresyonsuz sağkalımda ($p=0.1266$) hem de genel sağkalımda ($p=0.1696$) istatistiki anlamlı fark saptanmadı.



Şekil 6: MDS hastalarında genel sağkalım.

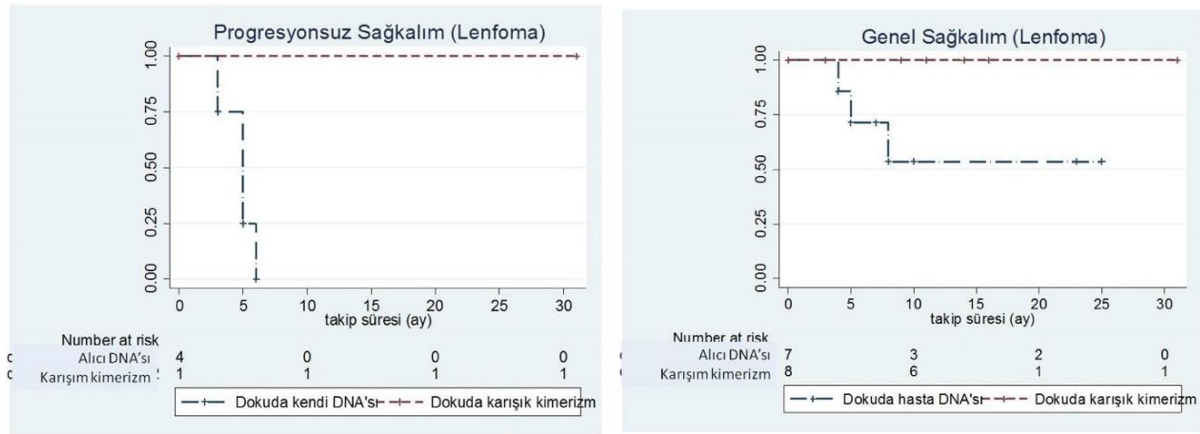
3. Akut Lenfoblastik Lösemi

ALL tanılı 4 hastanın 3'ünde dokuda kendi DNA'sı, birinde ise karışık kimerizm saptandı. Nüks 2 hastada gelişti; birinde kendi DNA'sı, birinde ise karışık doku kimerizmi mevcuttu. Karışık kimerizm saptanan tek B-ALL tanılı olgu, hastalık progresyonu nedeniyle kaybedildi.

4. Hodgkin ve Hodgkin dışı Lenfomalar

Lenfoma tanısı ile takip edilen 8 hastanın 1'inde doku kimerizmi DNA elde edilemediğinden çalışılmadı. Geri kalan 7 hastanın 3'ünde dokuda kendi DNA'sı, 4'ünde ise karışık kimerizm tespit edildi. Kendi DNA'sı saptanan 3 hastanın tümü nüksederken, karışık kimerizm saptanan olgularda progresif hastalık gözlenmedi ($p=0.008$). Takipte 3 hasta kaybedildi. Bu 3 hastanın 1'inde dokuda karışık kimerizm mevcuttu.

Bu grupta hem progresyonsuz sağkalımda ($p=0.0896$) hem de genel sağkalımda ($p=0.2758$) istatistiki anlamlı fark saptanmadı.



Şekil 7: Lenfoma hastalarında progresyonsuz ve genel sağkalım.

5. Diğer Hastalıklar

Bu grupta aplastik anemi ($n=3$), ikincil myelofibroz ($n=2$) ve multipl myelom ($n=1$) tanılı hastalar değerlendirildi.

Aplastik anemi tanılı 3 olgunun 2'sinde dokuda karışık kimerizm saptanmış, bu olgulardan biri refrakter hastalık nedeniyle kaybedilmiştir.

İkincil myelofibroz tanılı 2 olgunun her ikisinde de dokuda karışık kimerizm tespit edilmiş olup remisyonda olarak izlemleri devam etmektedir.

Multipl myelom tanılı tek olguda ise dokuda kendi DNA'sı saptandı. Hastalık progresyonu gözlenen hasta, sırasıyla lenalidomid ve pomalidomid altında da progresif seyretti ve DLI tedavisi planlandı.

V. TARTIŞMA

Hematopoietik kök hücre naklinde, hastaya verilen hücreler, kemik iliği fonksiyonunun geri kazanılmasında hayati öneme sahiptir. Kimerizm; allogeneik kök hücre naklinde, hematopoietik hücrelerin kökeni hakkında bilgi vermektedir. Çoğu zaman kan örneğinde çalışılmakla birlikte, bukkal mukoza, deri, saç gibi doku örneklerinde de araştırılabilmektedir(26).

Günümüzde yeterince hassas yöntemler kullanıldığında, konakta kendi hücrelerinin MAC rejimini takiben post-transplant ikinci yılda bile olduğu gösterilmiştir. Genel olarak, önceden alınan yoğun kemoterapiler ve daha yoğun hazırlama rejimlerinden sonra yapılan HKHN sonrasında, konağa ait hücrelerin varlığının azalması ve nakledilen kök hücrelerin akut GvHH'yi tetiklemesi ve engraftmanı hızlandırması beklenmektedir(27). Hastaya verilen kök hücrelerin içerisinde bulunan T hücreler konağa ait hematopoietik ve lenfoid hücrelere saldırarak yok etmeyi hedefler; ancak verilen üründe T hücreler azaltılmışsa, bu kişilerin karışık kimerik saptanması olasılığı daha fazladır(28). Literatürde, konak hücrelerinin ilk 100 günde görülmemesi, artmış akut ve kronik GvHH (29) ile ilişkilendirilmiş olup MAC rejimi sonrası yapılan HKHN'den 2-6. aylar arasında halen konak hücrelerinin tespit edilebilir olması artmış relaps insidansı(30) ve düşük kronik GvHH ile ilişkilendirilmiştir(31).

Post-transplant kimerizm izlemleri, dinamik bir süreçtir. Eğer olası relapsı yakalamak isteniyorsa kısa zaman aralıklarıyla kimerizm takibi yapılmalıdır(38). Hasta tam kimerikten karışık kimerik hale geldiğindeyse hızla nüks gelişebilmektedir. Artan karışık kimerizm tespit edilen hastalarda immünsupresif ilaçları kesmek ya da DLI uygulamak nüksü önlemede kullanılmaktadır(39).

Post-transplant dönemde kimerizm ve GvHH arasındaki ilişkiyi irdeleyen çalışmalar yapılmıştır.

Allogeneik HKHN'de doku kimerizmi, literatürde nadir çalışması yapılan bir konudur. Farklı dokularda kimerizm çalışmaları, ilgili organda GvHH gelişmesi durumunda sorgulanmış olup GvHH gelişmeyen olgulardaki durumu yansıtamamaktadır.

Auffermann-Gretzinger ve arkadaşlarının, 29 allogeneik HKHN yapılan hastada yaptığı incelemede transplant sonrası 15 hastada cilt biyopsisi alınmıştır. Dokudaki Langerhans ve dendritik hücre kimerizmi incelendiğinde hastalarda büyük oranda verici kimerizmi saptanmıştır(47). Murata ve arkadaşlarının, cilt GvHH gelişen 18 cinsiyet uyumsuz allogeneik HKHN hastasında flöresan in situ hibridizasyon (FISH) ile yaptığı çalışmada kimerik ve apoptotik epidermal ve endotelial hücre sayısı arasında ilişki bulunmuştur(48). Judet ve arkadaşlarının akciğerde GvHH gelişmesi halinde akciğer biyopsisi yapılan, cinsiyet uyumsuz

3 hastada FISH ile yaptıkları incelemede verici kaynaklı epitelyum hücrelerine rastlanmıştır(49). Bizim çalışmamızda, post-transplant 28. günde 4 hastamızda GvHH vardı. Bu olguların doku biyopsisinde 2'sinde kendi DNA'sı varken, diğer 2'sinde karışık kimerizm saptandı. Ortanca 14 aylık takibimizde, karışık kimerizm saptanmış 19 olgunun 8'inde (%42) GvHH geliştiği tespit edilirken, kendi DNA'sı saptanan 21 olgunun 11'inde (%52) GvHH saptanmış olup istatistiki anlam bulunamadı.

GvHH ile graft-versus-hastalık etkisi arasında paralel ilişki bulunmaktadır(50). Thus ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, allogeneik HKHN sonrası periferik kan T hücre kimerizmi %99'un üzerinde saptanan hastalarda GvHH sıklığının arttığı bildirilmiştir(51). Bu bilgi doğrultusunda, periferik kanda kimerizmi olan, bunun dokudaki karşılığı olarak çalışmamızda karışık kimerik olarak saptanan hastalarda hastalık progresyonunun sıklığının azalabileceğini varsaydık. Bu doğrultuda yaptığımız analizlerde, graft-versus-hastalık etkisinin yüksek olduğu AML'de, progresyonun ve ölümün, dokuda karışık kimerizm saptanan olgularda anlamlı ölçüde daha nadir olduğunu tespit ettik ($p=0.038$). Progresyonsuz sağkalımda, istatistiki fark oluşmamakla birlikte, genel sağkalım eğrileri arasında anlamlı fark mevcuttu ($p=0.05$). MDS'de, her ne kadar dokuda karışık kimerizm saptanan hasta sayısının azlığı nedeniyle istatistiki anlamlı fark saptanmamış olsa da, dokuda kendi DNA'sı olan hastalarda tedavi yanıtızlığının ve ölümün daha sık olduğunu gözlemledik. Lenfoma hastalarında da, karışık kimerizm saptanan olgularda, progresyon daha az tespit edilmekle birlikte ($p=0.008$), bu istatistiki fark sağkalım eğrilerine yansımamıştır. Ayrıca, takibimizde, post-transplant 28. günde kendi DNA'sı saptanan 21 olgunun 9'unda (%43) çevresel kan kimerizm kaybı gözlenmişken, karışık kimerizm saptanan 19 olgunun 3'ünde (%16) gözlenmiştir ($p=0.062$). Benzer olarak, karışık kimerizm saptanan olgularda ölüm oranı %16 iken, kendi DNA'sı saptananlarda %43 oranında hasta hayatını kaybetmiştir ($p=0.062$). Verici hücrelerini dokuya yamanabildiği ölçüde graft-versus-hastalık etkisinin ortaya çıktığı düşünülmüştür. Ortanca 14 aylık takibimizde, 1 yıllık progresyonsuz sağkalım dokuda kendi DNA'sı saptanan grupta %27.27 (%95 CI: 0.06-0.53) iken, karışık kimerizm saptanan grupta %75 (%95 CI: 0.12-0.96) olarak tespit edilmiş; ancak istatistiki olarak anlamlı saptanmamıştır ($p=0.25$). 1 yıllık genel sağkalım dokuda kendi DNA'sı saptanan grupta %61.54 (%95 CI: 0.37-0.78) iken, karışık kimerizm saptanan grupta %87.84 (%95 CI: 0.59-0.96) olarak tespit edilmiş; ancak istatistiki olarak anlamlı saptanmamıştır ($p=0.095$). İstatistiki olarak anlamlı fark saptanamamış olsa da, takip süresi uzadığında sonucun değişebileceği düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında, dokuda karışık kimerizm saptanan hastalara, alıcı DNA'sı saptananlara göre daha fazla CD3+ hücre nakledildiği düşünülmüş olsa da, verilerimizde iki grup arasında

fark olmadığını tespit ettik. Ayrıca myeloablatif rejimlerde, ciddi myelosupresyona bağı olarak dokuda verici hücrelerine daha sık saptanması beklense de, myeloablatif hazırlama rejimi verilen 28 olgunun 10'unda (%36) karışık kimerizm saptanırken, düşük yoğunluklu hazırlama rejim verilen 10 hastanın 8'inde (%80) karışık kimerizm tespit edilmiştir. Doku kimerizminin cinsiyet uyumsuzluğu, kan grubu uyumsuzluğu, verici tipi, ATG kullanımı gibi değişkenler ile ilişkisi tespit edilememiştir.



VI. SONUÇ

Ortanca 14 aylık takibimizde graft-versus-hastalık etkisinin yüksek olduğu AML’de, progresyonun ve ölümün, dokuda karışık kimerizm saptanan olgularda anlamlı ölçüde daha nadir olduğunu ve genel sağkalımı olumlu etkilediğini tespit ettik. MDS’de, her ne kadar dokuda karışık kimerizm saptanan hasta sayısının azlığı nedeniyle istatistiki anlamlı fark saptanmamış olsa da, dokuda kendi DNA’sı olan hastalarda tedavi yanıtsızlığının ve ölümün daha sık olduğunu gözlemledik. Lenfoma hastalarında da, karışık kimerizm saptanan olgularda, progresyon daha az gözlendiğini saptadık. Post-transplant 28. günde dokuda karışık kimerizm saptanan olgularda, kimerizm kaybının, hastalık nüksünün ve ölümün daha az sıklıkta görüldüğünü ancak istatistiki anlam taşımadığını belirledik. Yine bu grupta progresyonsuz sağkalımın ve genel sağkalımın daha iyi olduğunu, ancak istatistiki fark oluşmadığını gözlemledik. Myeloablatif hazırlık rejimi verilen hastalarda, dokuda karışık kimerizmin daha sık bulunduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda hastaların takibi devam etmektedir. Takip süresi uzadıkça kimi değişkenlerin, sağkalımı ve sonlanım noktalarını etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

VII. KAYNAKÇA

1. Aiuti A, Scala S, Chabannon C. Biological Properties of HSC: Scientific Basis for HSCT. In: th, Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kroger N, editors. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. Cham (CH)2019. p. 49-56.
2. Pei X. Who is hematopoietic stem cell: CD34+ or CD34-? Int J Hematol. 1999;70(4):213-5. Epub 2000/01/22. PubMed PMID: 10643145.
3. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. N Engl J Med. 2006;354(17):1813-26. Epub 2006/04/28. doi: 10.1056/NEJMra052638. PubMed PMID: 16641398.
4. Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. Haematologica. 2009;94(4):451-4. Epub 2009/04/02. doi: 10.3324/haematol.2009.005694. PubMed PMID: 19336748; PubMed Central PMCID: PMCPMC2663606.
5. Ayuk F, Balduzzi A. Donor Selection for Adults and Pediatrics. In: th, Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kroger N, editors. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. Cham (CH)2019. p. 87-97.
6. Gluckman E, Devergie A, Sohler J, Saurat JH. Graft-versus-host disease in recipients of syngeneic bone marrow. Lancet. 1980;1(8162):253-4. Epub 1980/02/02. PubMed PMID: 6101698.
7. Latif T, Pohlman B, Kalaycio M, Sobecks R, Hsi ED, Andresen S, et al. Syngeneic graft-versus-host disease: a report of two cases and literature review. Bone Marrow Transplant. 2003;32(5):535-9. Epub 2003/08/28. doi: 10.1038/sj.bmt.1704171. PubMed PMID: 12942102.
8. Patel SU, Yum K, Kim S, Isola LM, Scigliano E, Jakubowski R, et al. A case of syngeneic graft-versus-host disease. J Oncol Pharm Pract. 2019;25(7):1762-6. Epub 2018/10/16. doi: 10.1177/1078155218805541. PubMed PMID: 30319065.
9. Khaddour K, Hana CK, Mewawalla P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. StatPearls. Treasure Island (FL)2021.
10. Soysal T. Hematolojik Malinitelerde Kök Hücre Destekli Yüksek Doz Tedaviler. In: Etkinlikleri İÜCTFSTE, editor. Hematolog Olmayanlar İçin Hematolojik Maliniteler. 45: İstanbul Üniversitesi; 2005. p. 93-101.
11. Thomas ED, Clift RA, Hersman J, Sanders JE, Stewart P, Buckner CD, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemic in first remission using fractionated or single-dose irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1982;8(5):817-21. Epub 1982/05/01. doi: 10.1016/0360-3016(82)90083-9. PubMed PMID: 7050046.
12. Nagler A, Rocha V, Labopin M, Unal A, Ben Othman T, Campos A, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for acute myeloid leukemia in remission: comparison of intravenous busulfan plus cyclophosphamide (Cy) versus total-body irradiation plus Cy as conditioning regimen--a report from the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation. J Clin Oncol. 2013;31(28):3549-56. Epub 2013/08/28. doi: 10.1200/JCO.2013.48.8114. PubMed PMID: 23980086.
13. Cahu X, Labopin M, Giebel S, Aljurf M, Kyrz-Krzemien S, Socie G, et al. Impact of conditioning with TBI in adult patients with T-cell ALL who receive a myeloablative allogeneic stem cell transplantation: a report from the acute leukemia working party of EBMT. Bone Marrow Transplant. 2016;51(3):351-7. Epub 2015/12/01. doi: 10.1038/bmt.2015.278. PubMed PMID: 26618548.
14. Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. Blood. 1987;70(5):1382-8. Epub 1987/11/01. PubMed PMID: 3311203.

15. Rambaldi A, Grassi A, Masciulli A, Boschini C, Mico MC, Busca A, et al. Busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine as a preparative regimen for allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(15):1525-36. Epub 2015/10/03. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00200-4. PubMed PMID: 26429297.
16. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(12):1628-33. Epub 2009/11/10. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.07.004. PubMed PMID: 19896087; PubMed Central PMCID: PMC2861656.
17. Kharfan-Dabaja MA, Labopin M, Bazarbachi A, Hamladji RM, Blaise D, Socie G, et al. Comparing i.v. BU dose intensity between two regimens (FB2 vs FB4) for allogeneic HCT for AML in CR1: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(9):1170-5. Epub 2014/07/01. doi: 10.1038/bmt.2014.133. PubMed PMID: 24978140.
18. Shimoni A, Hardan I, Shem-Tov N, Rand A, Herscovici C, Yerushalmi R, et al. Comparison between two fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimens before allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation: fludarabine/melphalan is associated with higher incidence of acute graft-versus-host disease and non-relapse mortality and lower incidence of relapse than fludarabine/busulfan. *Leukemia.* 2007;21(10):2109-16. Epub 2007/08/11. doi: 10.1038/sj.leu.2404886. PubMed PMID: 17690701.
19. Baron F, Mohty M, Blaise D, Socie G, Labopin M, Esteve J, et al. Anti-thymocyte globulin as graft-versus-host disease prevention in the setting of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica.* 2017;102(2):224-34. Epub 2016/12/09. doi: 10.3324/haematol.2016.148510. PubMed PMID: 27927772; PubMed Central PMCID: PMC5286931.
20. Ruggeri A, Labopin M, Bacigalupo A, Afanasyev B, Cornelissen JJ, Elmaagacli A, et al. Post-transplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis in HLA matched sibling or matched unrelated donor transplant for patients with acute leukemia, on behalf of ALWP-EBMT. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):40. Epub 2018/03/17. doi: 10.1186/s13045-018-0586-4. PubMed PMID: 29544522; PubMed Central PMCID: PMC5855999.
21. Gorin NC, Labopin M, Czerw T, Pabst T, Blaise D, Dumas PY, et al. Autologous stem cell transplantation for adult acute myelocytic leukemia in first remission-Better outcomes after busulfan and melphalan compared with busulfan and cyclophosphamide: A retrospective study from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Cancer.* 2017;123(5):824-31. Epub 2016/12/03. doi: 10.1002/cncr.30400. PubMed PMID: 27906458.
22. Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood.* 2013;122(11):1863-72. Epub 2013/07/24. doi: 10.1182/blood-2013-05-355982. PubMed PMID: 23878143; PubMed Central PMCID: PMC3772496.
23. Buck K, Wadsworth K, Setterholm M, Maiers M, Confer D, Hartzman R, et al. High-Resolution Match Rate of 7/8 and 9/10 or Better for the Be The Match Unrelated Donor Registry. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(4):759-63. Epub 2016/01/03. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.12.012. PubMed PMID: 26724431.
24. Lawler SD, Baker MC, Harris H, Morgenstern GR. Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol.* 1984;56(3):431-43. Epub 1984/03/01. doi: 10.1111/j.1365-2141.1984.tb03973.x. PubMed PMID: 6365153.

25. Bader P. Documentation of Engraftment and Chimerism After HSCT. In: th, Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kroger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH)2019. p. 143-7.
26. Martin P. **Documentation of Engraftment and Characterization of Chimerism after Hematopoietic Cell Transplantation**. In: Forman S, Negrin R, Antin J, Appelbaum F, editors. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*: Wiley Blackwell; 2016. p. 272-80.
27. Mohr B, Koch R, Thiede C, Kroschinsky F, Ehninger G, Bornhauser M. CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34(11):949-54. Epub 2004/10/19. doi: 10.1038/sj.bmt.1704710. PubMed PMID: 15489870.
28. Bretagne S, Vidaud M, Kuentz M, Cordonnier C, Henni T, Vinci G, et al. Mixed blood chimerism in T cell-depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms. *Blood*. 1987;70(5):1692-5. Epub 1987/11/01. PubMed PMID: 3311209.
29. Balon J, Halaburda K, Bieniaszewska M, Reichert M, Bieniaszewski L, Piekarska A, et al. Early complete donor hematopoietic chimerism in peripheral blood indicates the risk of extensive graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(11):1083-8. Epub 2005/04/12. doi: 10.1038/sj.bmt.1704962. PubMed PMID: 15821766.
30. Lamba R, Abella E, Kukuruga D, Klein J, Savasan S, Abidi MH, et al. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. *Leukemia*. 2004;18(10):1681-6. Epub 2004/08/20. doi: 10.1038/sj.leu.2403468. PubMed PMID: 15318247.
31. Mossallam GI, Kamel AM, Storer B, Martin PJ. Prognostic utility of routine chimerism testing at 2 to 6 months after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(3):352-9. Epub 2009/02/11. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.12.496. PubMed PMID: 19203726; PubMed Central PMCID: PMC2662135.
32. Hoelle W, Beck JF, Dueckers G, Kreyenberg H, Lang P, Gruhn B, et al. Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(2):219-23. Epub 2003/12/03. doi: 10.1038/sj.bmt.1704337. PubMed PMID: 14647253.
33. Andreani M, Testi M, Battarra M, Indigeno P, Guagnano A, Polchi P, et al. Relationship between mixed chimerism and rejection after bone marrow transplantation in thalassaemia. *Blood Transfus*. 2008;6(3):143-9. Epub 2008/08/19. doi: 10.2450/2008.0051-07. PubMed PMID: 18705238; PubMed Central PMCID: PMC2626861.
34. Ozyurek E, Cowan MJ, Koerper MA, Baxter-Lowe LA, Dvorak CC, Horn BN. Increasing mixed chimerism and the risk of graft loss in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant disorders. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(2):83-91. Epub 2008/04/09. doi: 10.1038/bmt.2008.89. PubMed PMID: 18391990.
35. Matthes-Martin S, Lion T, Haas OA, Frommlet F, Daxberger H, Konig M, et al. Lineage-specific chimaerism after stem cell transplantation in children following reduced intensity conditioning: potential predictive value of NK cell chimaerism for late graft rejection. *Leukemia*. 2003;17(10):1934-42. Epub 2003/09/27. doi: 10.1038/sj.leu.2403087. PubMed PMID: 14513041.
36. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, 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(5):487-95. Epub 1998/04/16. doi: 10.1038/sj.bmt.1701119. PubMed PMID: 9535041.
37. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, et al. 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? *J Clin Oncol.* 2004;22(9):1696-705. Epub 2004/05/01. doi: 10.1200/JCO.2004.05.198. PubMed PMID: 15117992.
38. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia.* 2001;15(2):293-302. Epub 2001/03/10. doi: 10.1038/sj.leu.2401953. PubMed PMID: 11236950.
39. Peggs KS, Kayani I, Edwards N, Kottaridis P, Goldstone AH, Linch DC, et al. Donor lymphocyte infusions modulate relapse risk in mixed chimeras and induce durable salvage in relapsed patients after T-cell-depleted allogeneic transplantation for Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(8):971-8. Epub 2011/02/02. doi: 10.1200/JCO.2010.32.1711. PubMed PMID: 21282545.
40. Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Nasman-Bjork I, Svenberg P, Tammik L, et al. Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25(8):843-51. Epub 2000/05/16. doi: 10.1038/sj.bmt.1702337. PubMed PMID: 10808205.
41. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med.* 1986;314(12):729-35. Epub 1986/03/20. doi: 10.1056/NEJM198603203141201. PubMed PMID: 3513012.
42. Fuchs EJ. Related haploidentical donors are a better choice than matched unrelated donors: Point. *Blood Adv.* 2017;1(6):397-400. Epub 2018/01/04. doi: 10.1182/bloodadvances.2016002196. PubMed PMID: 29296954; PubMed Central PMCID: PMC5738988 interests.
43. Walker I, Panzarella T, Couban S, Couture F, Devins G, Elemary M, et al. Pretreatment with anti-thymocyte globulin versus no anti-thymocyte globulin in patients with haematological malignancies undergoing haemopoietic cell transplantation from unrelated donors: a randomised, controlled, open-label, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(2):164-73. Epub 2016/01/03. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00462-3. PubMed PMID: 26723083.
44. Vitarana T, Colombage G, Bandaranayake V, Lee HW. Hantavirus disease in Sri Lanka. *Lancet.* 1988;2(8622):1263. Epub 1988/11/26. PubMed PMID: 2904003.
45. Cutler C, Logan B, Nakamura R, Johnston L, Choi S, Porter D, et al. Tacrolimus/sirolimus vs tacrolimus/methotrexate as GVHD prophylaxis after matched, related donor allogeneic HCT. *Blood.* 2014;124(8):1372-7. Epub 2014/07/02. doi: 10.1182/blood-2014-04-567164. PubMed PMID: 24982504; PubMed Central PMCID: PMC4141519.
46. Drobyski WR, Szabo A, Zhu F, Keever-Taylor C, Hebert KM, Dunn R, et al. Tocilizumab, tacrolimus and methotrexate for the prevention of acute graft-versus-host disease: low incidence of lower gastrointestinal tract disease. *Haematologica.* 2018;103(4):717-27. Epub 2018/01/21. doi: 10.3324/haematol.2017.183434. PubMed PMID: 29351985; PubMed Central PMCID: PMC5865423.

47. Auffermann-Gretzinger S, Eger L, Bornhauser M, Schakel K, Oelschlaegel U, Schaich M, et al. Fast appearance of donor dendritic cells in human skin: dynamics of skin and blood dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation*. 2006;81(6):866-73. Epub 2006/03/30. doi: 10.1097/01.tp.0000203318.16224.57. PubMed PMID: 16570010.
48. Murata H, Janin A, Leboeuf C, Soulier J, Gluckman E, Meignin V, et al. Donor-derived cells and human graft-versus-host disease of the skin. *Blood*. 2007;109(6):2663-5. Epub 2006/11/16. doi: 10.1182/blood-2006-07-033902. PubMed PMID: 17105815.
49. Judet A, Copie-Bergman C, Zemoura L, Catherinot E, Martin N, Rivaud E, et al. Epithelial chimerism in lung tissue after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(4):474-7. Epub 2017/12/23. doi: 10.1038/s41409-017-0050-z. PubMed PMID: 29269810.
50. Storb R. HSCT: Historical Perspective. In: th, Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kroger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham (CH)2019. p. 3-9.
51. Thus KA, de Weger RA, de Hoop TA, Boers Trilles VE, Kuball J, Spierings E. Complete donor chimerism is a prerequisite for the effect of Predicted Indirectly ReCognizable HLA Epitopes (PIRCHE) on acute graft-versus-host disease. *Chimerism*. 2014;5(3-4):94-8. Epub 2015/12/17. doi: 10.1080/19381956.2015.1097025. PubMed PMID: 26669207; PubMed Central PMCID: PMC5063064.

VIII. EKLER:

A. Etik Kurul Onayı:

KVVK GEREĞİ KALDIRILMIŞTIR



Etik Kurul Onayı:

KVVK GEREĞİ KALDIRILMIŞTIR



B. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(BGOF)

1. “Allogeneik Kök Hücre Nakli Yapılmış Kişilerde, Kanda ve Dokuda Bakılan Kimerizm Sonuçlarının Karşılaştırılması” konulu çalışma bir araştırma özelliğindedir.
2. Araştırmanın amacı kemik iliği nakli yapılan bireylerde, uyluk cilt biyopsisi yapılarak nakil sonrası verici hücrelerinin alıcı dokularına saldırması durumunu öngörmektir.
3. Size herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.
4. Sizden, uyluk önyüzden, 4 mm çapında, 2 mm derinliğinde cilt biyopsisi yapılacaktır. İşlem öncesi cilt lokal olarak uyuşturulacaktır. İşlem sırasında ufak bir acı hissedebilirsiniz.
5. Sizin hiçbir sorumluluğunuz yoktur.
6. Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak sizin açınızdan hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığına dair sizlere bilgi verilmiştir.
7. Size herhangi bir alternatif yöntem veya tedavi uygulanmayacaktır.
8. Size verilecek herhangi bir tazminat veya tedavi bulunmamaktadır.
9. Size ait herhangi bir ulaşım, yemek gibi masraf yapılmayacaktır. Size herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Ve sizden herhangi bir ücret alınmayacaktır. Bağlı olduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumunuzdan (SGK) herhangi bir ödeme alınmayacaktır.
10. Araştırmaya katılımınız isteğinize bağlı olup, istediğiniz zaman herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılımı rededebilirsiniz ve araştırmadan çekilebilirsiniz.
11. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoriteleri orijinal tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişebilirler, ancak bu bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamakla, söz konusu yasal erişime izin vermiş bulunmaktasınız.
12. İlgili mevzuat gereğince, kimliğinizi ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacaktır; araştırma sonuçlarının yayınlanması halinde dahi kimliğiniz gizli tutulacaktır.
13. Araştırma konusuyla ilgili ve araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edilebildiğinde siz veya yasal temsilciniz zamanında bilgilendirilecektir.

14. Araştırma hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmeyen etki, olay hakkında daha fazla bilgi temin edilebilmeniz için temasa geçebileceği ilgili kişilerin araştırmacıların 24 saat ulaşabileceği telefon numaraları size verilecektir.

15. Sizlerden alınacak olan cilt biyopsisi, ilgili parametrelerin bakılması amacıyla İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na, yine bu araştırmanın yardımcı araştırmacısı olan Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz ve Biyolog Yeliz Duvarcı Öğret (+90 212 414 20 00 - 32313) tarafınca değerlendirilecek ve laboratuvar işlemler yapılacaktır.

17. BGOF gönüllü veya yasal temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içermemektedir. Araştırmacıyı, kurumu destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlülüğten kurtaracak hüküm veya ifade taşımamaktadır.

“Allogeneik Kök Hücre Nakli Yapılmış Kişilerde, Kanda ve Dokuda Bakılan Kimerizm Sonuçlarının Karşılaştırılması” konulu çalışmada kullanılacak olan cilt biyopsisi örneğimin;

- a) Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- b) İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- c) Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Yukarıda belirtilen ‘Asgari Gönüllü Olur Formu’nu okumuş bulunmaktayım.

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum (veya bu metin bana okundu). Ayrıca, araştırma ve yapılacak işlem hakkında bana sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın tamamen kendi rızamla, katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜNÜN;
ADI- SOYADI:
İMZASI:
TARİH:
TELEFON:

DOKTORUN;
ADI-SOYADI: Dr. Ezgi PINAR ÖZBALAK
İMZA:
TARİH:
TELEFON: 0 530 440 01 35

Varsa gönüllünün yasal temsilcisinin
Adı:
Adresi:
Tel:
Tarih: İmzası:

C. Özgeçmiş

ADI SOYADI: Ezgi PINAR ÖZBALAK

1. GENEL

GÖREV YERİ	İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı
GÖREV UNVANI	Asistan Doktor
YAZIŞMA ADRESİ	İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Çapa/Fatih İstanbul

2. EĞİTİM

MEZUNİYET TARİHİ	ÜNİVERSİTE-FAKÜLTE-BÖLÜM/ANABİLİM DALI
1996 - 1999	Kandilli İlkokulu
1999 - 2004	Bizimkent İlköğretim Okulu
2004 - 2008	Bahçelievler Adnan Menderes Anadolu Lisesi
2008 - 2014	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İngilizce Tıp Bölümü
2016 - Halen	İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilimdalı Uzmanlığı

3. YAYINLARI

1. Ezgi Pinar-Ozbalak, Safak Mirioglu, Ezgi Sahin, Yasemin Ozluk, Ali Riza Ucar, Halil Yazici, Isin Kilicaslan, Sevgi Kalayoglu-Besisik: “Remembering the Basics: A Patient with Sickle Cell Disease and Proteinuria”, Turk J Nephrol 2019; 28(2): 154-6