

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI  
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**KEMİK İLİĞİNDE FİBROZİS VE  
ANJİYOGENEZİN ENGRAFTMAN ÜZERİNE  
ETKİSİ**

NURHİLAL TURGUT

TEZ DANIŞMANI:  
PROF. DR. GÜNER HAYRİ ÖZSAN

HEMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2009

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI  
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

# **KEMİK İLİĞİNDE FİBROZİS VE ANJİYOGENEZİN ENGRAFTMAN ÜZERİNE ETKİSİ**

ERİŞKİN HEMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

NURHİLAL TURGUT

Bu araştırma İzmir Kan Hastalıkları ve Kanser Araştırma Yardımlaşma Derneği tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

1. Türkçe özet.....	1
2. İngilizce özet.....	3
3. Giriş ve amaç.....	5
4. Genel bilgiler.....	7
A) Hematopoetik Kök Hücre biyolojisi, plastisitesi ve Transplantasyon.....	7
B) Hematopoetik Kök Hücre Engraftmanının tanımlanması.....	12
C) Kemik İliğinde Mikroçevrenin Tanımlanması Ve Etkileşimleri.....	14
D) Engraftmanı Etkileyen Kinetikler.....	17
5. Materyal-metod.....	19
6. İstatistiksel analizler.....	22
7. Bulgular.....	23
8. Tartışma.....	34
9. Kaynaklar.....	38

## **TABLO LİSTESİ**

**Tablo 1:** Hastaların karakteristik özellikleri

**Tablo 2:** Myelofibrozis sınıflandırması

**Tablo 3:** Myelom, amiloidoz ve plazmasitom hastalarının tedavileri

**Tablo 4:** Hodgkin Lenfoma tedavi şemaları

**Tablo 5:** Non-Hodgkin Lenfoma tedavi şemaları

**Tablo 6:** Anjiyogenezis ile nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasındaki Spearman korelasyon analizi sonuçları.

## SEKİL LİSTESİ

**Şekil 1:** Kök hücreler; totipotent, pluripotent ve unipotent

**Şekil 2:** Pluripotent ve unipotent Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşma ve maturasyonu.

**Şekil 3:** Hematopoetik kök hücre engraftmanının hücre yüzey reseptörleriyle ilişkide olduğu 3 fazı.

**Şekil 4:** Hematopoetik kök hücre nişinin basit bir modeli.

## **GRAFİK LİSTESİ**

**Grafik1:** Hastalık dağılımı.

**Grafik 2:** Transplantasyon öncesi hastalık durumu.

**Grafik 3:** CD 34<sup>+</sup> hücre düzeyine göre hasta gruplarının nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasında karşılaştırma

**Grafik 4:** CD34<sup>+</sup> hücre düzeyleri ile nötrofil engraftman günleri arasındaki korelasyon.

**Grafik 5:** CD34<sup>+</sup> hücre düzeyleri ile trombosit engraftman günleri arasındaki korelasyon

**Grafik 6:** Fibrozis gruplarının nötrofil ve trombosit engraftman günlerinin karşılaştırması.

**Grafik 7:** Fibrozisi olmayan ve derece 2 fibrozisi olan hasta gruplarında trombosit engraftman günleri arasındaki varyans analizi.

**Grafik 8:**VSD alt gruplarında nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasındaki varyans analizleri.

**Grafik 9:** NVES alt gruplarında nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasındaki varyans analizleri.

**Grafik 10:** Fibrozisin transplantasyon sonrası sağkalıma etkisi.

**Grafik 11:** VSD'nin transplantasyon sonrası sağkalıma etkisi.

**Grafik 12:** NVES'in transplantasyon sonrası sağkalıma etkisi.

## KISALTMALAR

VSD	: Vasküler yüzey dansitesi
NVES	: Mikrodamar sayısı
CD	: Lökosit diferansiyasyon antijeni
GvHH	: Graft versus host hastalığı
HKH	: Hematopoetik kök hücre
CXCR-4	: C-X-C kemokin reseptörü 4
SDF-1	: Stromal kökenli faktör ( stromal derivated factor)
PF4	: Trombosit faktörü 4 ( platelet factor 4)
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü ( platelet derivated growth factor)
bFGF	: Ana fibroblast büyüme faktörü ( basic fibroblast growth factor)
TGF- $\beta$	: Transforme edici büyüme faktörü- beta (transforming growth factor- $\beta$ )
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü ( vasculer endothelial growth factor)
G-CSF	: Granülosit koloni sitümülan faktör
CFU-GM	: Granülosit-makrofaj koloni forming unit
MMF	: Myeloid metaplazili myelofibrozis
KMPN	: Kronik myeloprolifertif neoplazi

## **TEŞEKKÜR**

Aslında hematoloji yan dal ihtisası hayatımdaki en önemli dönüm noktası oldu. Başlama kararını vermek zordu ama bırakmak çok daha zor geldi. Bu zor ve zahmetli süreci benimle paylaşan, bana katlanmak zorunda kalan, karşılaştığım streslerle başa çıkamadığımda beni kompanse eden ve desteklerini her konuda hiç esirgemeyen hematoloji bilim dalının değerli öğretim üyelerine, poliklinik ve bilim dalı sekreterleri Seher ve Süheyla hanımlara, hematoloji laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Bu bölümde sıcak bir aile ortamı yaratılarak çalışılabileceğini öğrendim.

Geçen yıllar içinde ailem gibi olan benim tüm kapisimi, üzüntümü çeken, mutluluklarımı paylaşan dostlarım Betül ve Burak Paköz'e, Dilek Solmaz'a çok teşekkür ederim. Hematolojiye başladıktan sonra tam anlamıyla tanıdığım, giderek derinleşen dostluklarımı hissettiğim sevgili Ahmet ve İnci Alacacıoğlu'na çok teşekkür ederim.

Son bir yıldır aynı süreçten geçmekte olan sevgili Selda Kahraman'a teşekkür ederim ve başarılar dilerim.

Bu güne kadar her zaman yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.



**KEMİK İLİĞİNDE FİBROZİS VE ANJİYOGENEZİN ENGRAFTMAN ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**Dr. Nurhilal Turgut**

**Bölüm: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı,  
Hematoloji Bilim Dalı**

**Adres: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı,  
Hematoloji Bilim Dalı, PK 35340, İnciraltı, İzmir, Türkiye**

**Telefon: 00905055250506**

**E-mail: nurhilal.turgut@deu.edu.tr**

## ÖZET

### **KEMİK İLİĞİNDE FİBROZİS VE ANJİYOGENEZİSİN ENGRAFTMAN ÜZERİNE ETKİSİ**

**AMAÇ VE HİPOTEZ:** Bu çalışmada hematolojik malignitelerde kemik iliğindeki fibrozis ve anjiyogenezisin engraftman sürecisine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**YÖNTEM:** Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) hematoloji bilim dalında 2003-2008 yıllarında otolog (n=37) ve allogeneik (n=3) periferik kök hücre nakli yapılan multipl myelom (n=26), amiloidoz (n=1), plazmasitom(n=1), hodgkin (n=6)-hodgkin dışı (n=6) lenfoma tanılı 40 hasta (yaş ortalaması 48,50±14,31 yıl, 23 erkek, 17 kadın) alınmıştır. Hastaların transplantasyondan önceki son kemik iliklerinde myelofibrozis derecesi 0-3 arasında skorlanmış, anjiyogenezis için birim tümör dokuya düşen damar yoğunluğu (VSD) ve birim alana düşen mikrodamar sayısı (NVES) olarak hesaplanmıştır. CD 34<sup>+</sup> hücre miktarı, fibrozis ve anjiyogenezis için oluşturulan alt grupların nötrofil ve trombosit engraftman süreleri açısından varyans analizleri, korelasyon analizleri ve fibrozis ve anjiyogenezisin sağ kalım analizleri değerlendirilmiştir.

**BULGULAR:** Çalışmaya alınan hastaların hepsinde nötrofil engraftmanının olduğu, trombosit engraftmanının ise 37 hastada olduğu saptanmıştır. Reinfüze edilen ürünün CD 34<sup>+</sup> hücre düzeyine göre yapılan alt grup analizinde; grup 1 (2,5-5x 10<sup>6</sup>/kg) ve grup 3 (>10x10<sup>6</sup>/kg) arasında nötrofil ve trombosit engraftman günleri açısından anlamlı farklılık saptanmıştır ( sırasıyla p=0,02 ve 0,03). Korelasyon analizinde de nötrofil ve trombosit engraftman günleri ile CD 34<sup>+</sup> hücre düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon bulunmuştur (sırasıyla p=0,030, r=-0,34 ve p=0,027, r=-0,36). Hastaların 20'sinde (%50) fibrozisin olmadığı, 14 (%35) hastada derece 1, 6 (%15) hastada derece 2 fibrozis olduğu saptanmıştır. Fibrozis ile nötrofil, trombosit ve eritrosit engraftman süreleri arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır (sırasıyla r<sub>s</sub>=0,09 p=0,57, r<sub>s</sub>=0,22 p=0,18, r<sub>s</sub>=0,25 p=0,14). Alt grup analizinde ise derece 0 (n=20) ve derece 2 (n=6) fibrozisi olan grupların trombosit engraftman günleri açısından varyans analizinde p=0,059 saptanmıştır. Anjiyogenezis için stereolojik yöntemle hesaplanan VSD ve NVES ile yapılan değerlendirmede oluşturulan alt gruplarda nötrofil ve trombosit engraftmanı açısından varyans analizlerinde anlamlı farklılık, korelasyon analizlerinde de anlamlı korelasyon bulunamamıştır. Ancak fibrozis ile VSD ve NVES arasında anlamlı pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. Sağ kalım analizlerinde fibrozis ve anjiyogenezisin alt grupları arasında sağ kalım üzerine anlamlı fark gözlenmemiştir.

**SONUÇ:** Fibrozisin nötrofil engraftmanı üzerine negatif etkisi yoktur. Bunun fibrozis artışına eşlik eden artmış anjiyogenezis ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. İleri derece fibrozisi olan olgularda trombosit engraftman süresinde uzama görülebilir. Bu grup hastalara verilecek CD 34<sup>+</sup> hücre miktarının eşik değeri daha yüksek tutulmalıdır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Engraftman, fibrozis, anjiyogenezis

## SUMMARY

### **THE EFFECT OF BONE MARROW FIBROSIS AND ANGIOGENESIS ON ENGRAFTMENT**

**PURPOSE AND HYPOTHESIS:** The purpose of this study was to investigate the effect of bone marrow fibrosis and angiogenesis on engraftment process in the hematological malignancies.

**METHOD:** Forty patients (mean age 48, 50±14,31 years, 23 male, 17 female) who had been transplanted with autologous and allogeneic peripheral stem cell between the years 2003-2008 in the hematology department of Dokuz Eylul University Medical School were enrolled in this study. The diagnoses of patients were multiple myeloma (n=26), amiloidosis (n=1), plasmocytoma (n=1), hodgkin's lymphoma (n=6) and non-hodgkin's lymphoma (n=6). Patients' bone marrow myelofibrosis was graded from 0 to 3, angiogenesis was quantified by stereological method and calculated as an equivalent to the vascular surface area (VSD) per unit tumor volume and number of vessels per unit of stroma (NVES) at the recent bone marrow before transplantation. The variance, correlation analysis for neutrophil and platelet engraftment durations of subgroups formed for CD 34<sup>+</sup> cell amount, fibrosis and angiogenesis were performed and examined. Also the survival analysis was performed and examined for fibrosis and angiogenesis.

**FINDINGS:** It was determined that all the patients enrolled in this study had neutrophil engraftment while 37 of them also had platelet engraftment. The results of subgroup analysis performed according to the CD 34<sup>+</sup> cell level of reinfused graft showed that statistically significant differences existed between grup 1 (2,5-5x 10<sup>6</sup>/kg) and grup 3 (>10x10<sup>6</sup>/kg) in terms of neutrophil and platelet engraftment days. Also a statistically significant negative correlation was found between the CD 34<sup>+</sup> cell amount and neutrophil, platelet engraftment days (p=0,030, r=-0,34 ve p=0,027, r=-0,36 respectively). It was seen that twenty patients (%50) had grade 0, 14 (%35) patients had grade 1 and 6 (%15) patients had grade 2 fibrosis in their bone marrow. Any significant correlations between fibrosis and neutrophil, platelet, erythrocyte engraftment days (r<sub>s</sub>=0,09 p=0,57, r<sub>s</sub>=0,22 p=0,18, r<sub>s</sub>=0,25 p=0,14 respectively) were not found. In the subgroup analysis, the p value for platelet engraftment days in the variance analysis was found to be 0,059 (Man Whitney U) for groups with grade 0 (n=20) and grade 2 (n=6) fibrosis. For subgroups established according to the evaluation performed

by VSD and NVES calculated with stereological method for angiogenesis any significant differences in variance analysis and any significant correlation in correlation analysis were not found for neutrophil and platelet engraftment. However significantly positive correlations between fibrosis and VSD, NVES were found. Any significant differences between fibrosis and angiogenesis subgroups in the survival analysis in terms of survival were not found. .

**RESULTS:** There was not any negative influence of fibrosis on the neutrophil engraftment. The increased angiogenesis with the increase of fibrosis was thought to be in relation with this. Some delays in platelet engraftment durations may be seen for the patients who have advanced fibrosis. It was suggested that the cut off value of CD 34<sup>+</sup> cell amount for that group of patients should be higher.

**KEY WORDS:** Engraftment, fibrosis, angiogenesis

## GİRİŞ VE AMAC

Hematopoetik kök hücre (HKH) nakli, hematolojik malignitelerde uzun sağ kalım ve kür şansı sağlaması bakımından çok önemli bir tedavi seçeneğidir. Kök hücre transplantasyonunda başarının önemli kriterlerinden biri de kök hücre reinfüzyonu öncesi verilen hazırlık kemoterapisi sonrası kemik iliğinde gelişen aplazinin, kök hücrenin engraftmanı ile ortadan kalkmasıdır.

Üç gün süreyle nötrofil sayısının  $>0,5 \times 10^9/L$  seyrettiği günlerden ilk gün nötrofil engraftmanı olarak kabul edilmektedir. Trombosit engraftmanı 7 gün boyunca transfüzyonsuz  $>20 \times 10^9/L$  trombosit sayının sağlanması durumunda bu 7 günün ilk günü olarak bildirilmiştir. Eritrosit süspansiyonu transfüzyonu gerekmeyen üç haftalık periyodun ilk günü de eritrosit engraftmanı olarak kabul edilmiştir [1].

Nakil sonrası engraftmanın beklendiği süre 7-21 gündür. Bu süre  $>21$  gün olunca engraftman gecikmesi,  $>42$  günde ise engraftman başarısızlığından söz edilmektedir

Engraftmana etki eden bazı faktörler belirlenmiştir. Bunlar kullanılan hazırlık rejimleri ki; myeloablatif olanlarda diğerlerine göre engraftman süresi uzamaktadır, graft versus host hastalığı (GvHH) profilaksisinde metotreksatin uzun süreli kullanımı, antimikrobiyal profilakside kullanılan ajanlar, kemik iliğinin stromal yapısı, kullanılan kök hücre kaynağı, kök hücre içeriğinin CD34+ hücre miktarı, reinfüzyon sonrası büyüme faktörü kullanımı, hipersplenizm başlıkları altında toplanabilir [2-6]. Engraftman yetersizliği için, yetersiz sayıda kök hücre infüzyonu, yetersiz hazırlama rejimi, kemik iliği mikroçevresinin yapısal/fonksiyonel bozukluğu, ilaç toksisitesi ve ağır infeksiyonlar, allogeneik nakiller için ayrıca T hücre depleksiyonu, HLA doku grubu uyumsuzluğu, GvHH, ABO uyumsuzluğu risk faktörleri olarak görülmektedir.

Engraftman kinetiğini etkileyen yukarıda bahsedilen faktörlerle ilgili yapılan çalışmalarda tek ve çoklu değişkenli analizlerde tek önemli belirleyicinin reinfüze edilen CD 34<sup>+</sup> hücre miktarı olduğu saptanmıştır [7].

Faktörler arasında sayılan kemik iliği mikroçevresinin yapısal ve fonksiyonel durumu hakkında az sayıda çalışma mevcuttur. Kemik iliğinde fibrozisinin patobiyolojik açıdan engraftmana negatif etkili olacağı düşünülse de yapılan bazı çalışmalarda bu gösterilememiştir. E. Soll ve ark.'ı transplantasyon yapılan değişik hastalık gruplarındaki hastaların, transplantasyon öncesi yapılan kemik iliğinde miyelofibrozisi derecelendirerek

yaptıkları retrospektif analizlerinde trombosit ve eritrosit engraftmanında uzamalar olduğunu ancak istatistik anlamlılığa ulaşmadığını saptamışlardır [1].

Kemik iliği hematopoietik kompartman ve stroma olarak iki yapısal bölümden oluşmaktadır. Stromayı, fibroblastlar, adipositler, sinirler ve kemik iliği vasküler sistemi oluşturur[8]. Hematopoietik kök hücre nişi anlayışı ilk olarak 1978’de Schofield tarafından ortaya atılmıştır. Araştırmacı “niche” anlayışını kök hücrelerin durağan olarak bulunduğu, farklılaşma ve kendi kendilerini kök hücre olarak çoğaltma yetisinin engellendiği, stromal hücrelerle komşu ve onlar tarafından yönlendirildikleri, desteklendikleri bir mikroanatomik bölge olarak tanımlamıştır. Daha sonra yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtların büyük çoğunluğuna göre HKH ve hematopoetik öncül hücrelerin kemik iliğinde rastgele dağılmadığı, aksine kemik endosteumu ile sıkı ilişkide olacak şekilde yerleştikleri [8-10], daha yeni olarak da kan damarları çevresinde [11, 12] toplandıkları saptanmıştır. Kemik iliği sinüzoid yapısı kendine özgü olup normal venöz sistemden farklıdır. Sinüzoid duvarları tek sıra endotelyal hücrelerden oluşur ve destekleyici dokudan yoksundur [13]. Bu yapı özellikle KI’nden HKH mobilizasyonu ve transplant sonrası homing ve migrasyon aşamaları için çok önemlidir.

Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda otolog ve allogeneik periferik kök hücre transplantasyonunda engraftman kinetiğini etkileyen birçok faktör incelenmiş, ancak halen tartışmalar devam etmektedir. Biz de bu çalışmamızda periferik kök hücre transplantasyonu öncesi alınan kemik iliği örneklerindeki fibrozis ve anjiyogenezisin engraftman üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

## **GENEL BİLGİLER**

### **A) HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU**

Kök hücre araştırmaları konusunda bugüne kadar ulaşılan başarılı ve etkin veriler birçok malign ve malign olmayan, kür elde etme şansı bulunmayan hastalıklar için büyük umutlar vaad etmektedir. Organ ve doku transplantasyonunun tek tedavi seçeneği olduğu hastalıklarda uygun verici temininde karşılaşılan güçlükler tedavi şansını engelleyen en önemli etmendir. Kök hücre çalışmalarında kat edilen mesafeler istenildiği doğrultuda devam ederse günümüzdeki bilimsel gündemin önemli bir kısmını kaplayan, değişik kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin kendini yenileme yeteneği zayıf olan doku ve organların yenilenmesi amacıyla kullanımı büyük bir çığır açacaktır.

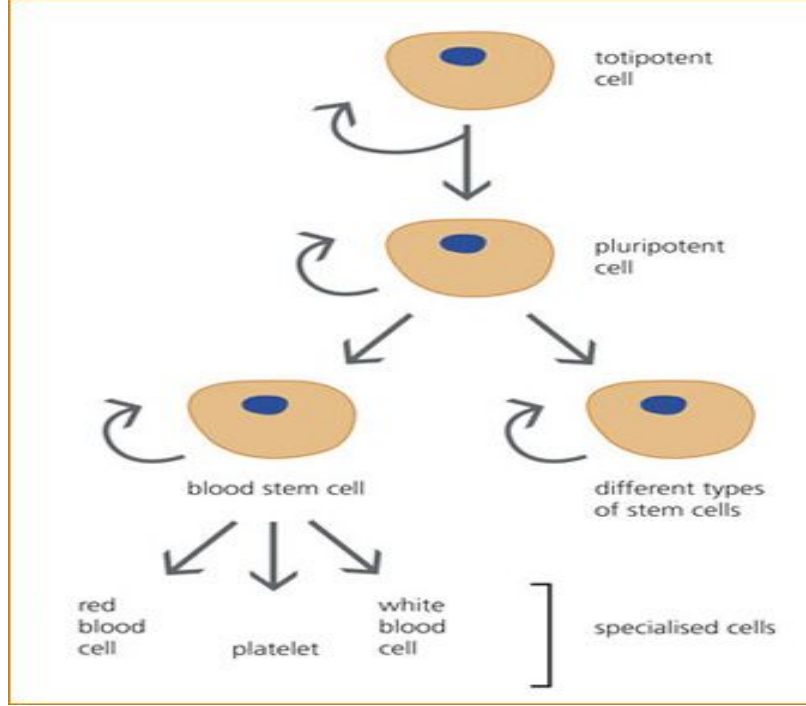
Kök hücreler asimetrik bölünmeyle kendini yenileyerek (self-renewal) sayılarını devamlı sabit tutan, daha sonra olgun bir hücre serisini ve kan, karaciğer ve kas gibi özelleşmiş görev yapan organları oluşturacak ‘daughter; kız’ hücrelerine farklılaşma yeteneğinde olan primitif nitelikteki hücrelerdir. Üç başlık altında toplanabilirler;

a) Totipotent kök hücreler: Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğindedirler. Bu hücreler embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanmışlardır (şekil 1).

b) Pluripotent kök hücre: Organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücrelerdir (şekil 1).

c) Unipotent kök hücreler: Multi potensiyel kök hücresi ve bu hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış bulunan hücrelerdir ( şekil 1).

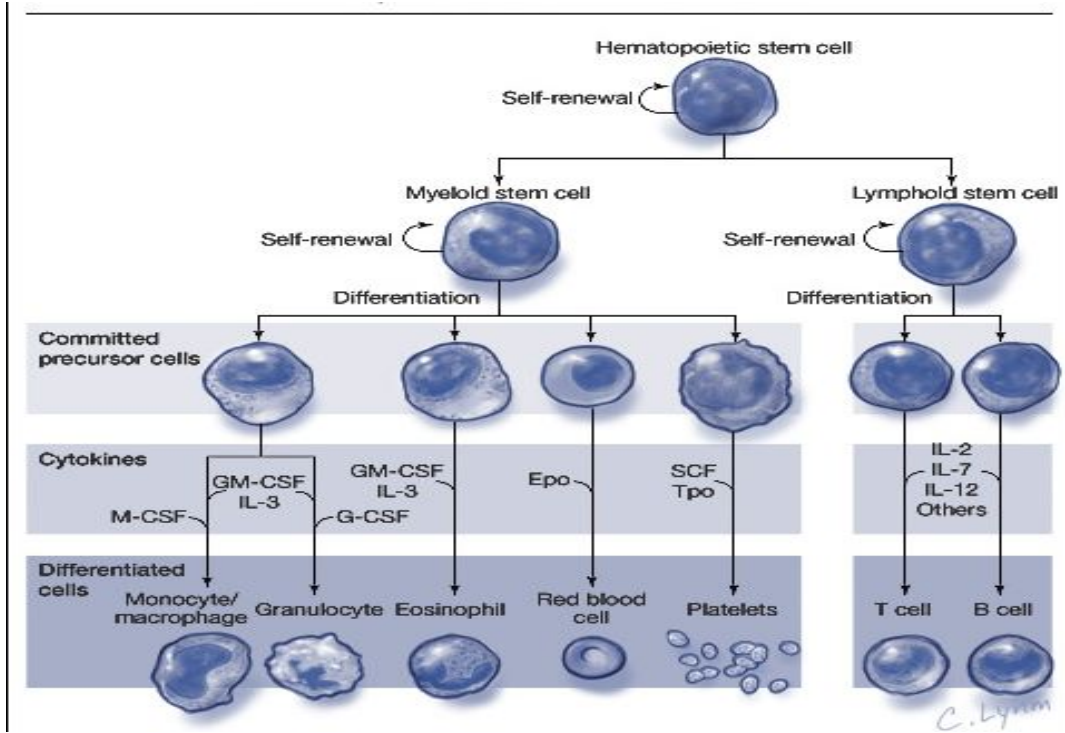




Şekil 1: Kök hücreler; totipotent, pluripotent ve unipotent

Kök hücreler elde edikleri kaynaklara göre de sınıflandırılmışlardır.

- i) Erişkin kök hücresi, erişkin dokularda bulunan ve birçok hücreye dönüşebilen kök hücrelerdir.
- ii) Hematopoetik kök hücre, kemik iliğinde, bebek göbek kordon kanında bulunan ve özel yöntemlerle erişkinde belli büyüme faktörleri yardımıyla üretilen ve kan hücrelerine dönüşebilen kök hücrelerdir (Şekil 2).
- iii) Embriyonik kök hücre, embriyoda erken evrede bulunan totipotent kök hücreler olarak tanımlanmıştır. Embriyonik kök hücreler, in-vitro döllenmiş ve ihtiyaç fazlası embriyolardan veya istemli solandırılan gebeliklerden elde edilmektedir.



IL: İnterlökin EPO: Eritropoetin SCF:Stem cell faktör TPO:Trombopoietin  
 GM-CSF:Granülosit/makrofaj koloni situmulan faktör  
 G-CSF:Granülosit koloni situmulan faktör  
 M-CSF:Monosit koloni situmulan faktör

Şekil 2: Pluripotent ve unipotent Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşma ve maturasyonu.

Hematopoetik kök hücreler (HKH) 1961 yılında Till ve McCulloch tarafından tanımlanmış ve bu tarihten itibaren üzerinde en fazla çalışılan kök hücreler olmuştur [14, 15]. Till ve McCulloch; farelerde letal doz radyasyon çalışmaları ile fareleri ölümden kurtarmak için sağlıklı donör hayvanlardan elde edilen kemik iliği hücre ekstratlerini kullanarak kanın kendini yenilemesinde görevli olan bileşenleri ortaya çıkardılar. Böylece HKH'deki iki önemli özellik olan kendini yenileyebilme (proliferasyon) ve kan hücrelerinin bütün farklı tiplerini üretebilme (diferansiyasyon) kabiliyetini tanımladılar.

HKH, kan ya da kemik iliğinden izole edilen, kendini yenileyebilen, özel hücrelerden ayırt edilebilen ve kemik iliğinden çıkarılıp dolaşan kana mobilize edilebilen özel hücrelerdir. Ayrıca programlı hücre ölümü olarak tanımlanmış olan apoptoza maruz kalırlar. Her 10000-15000 kemik iliği hücresinin ve dolaşan kan hücrelerinin 1/100000'inin hematopoetik kök hücre olduğu düşünülmektedir.

İlerleyen çalışmalarda iki tür HKH olabileceği kanısına varılmıştır. Eğer transplantasyon yapılmış bir fareden elde edilen kök hücreler, letal dozda radyasyona maruz bırakılmış başka bir fareye nakledildiğinde hematopoetik sistemi oluşturup idame ettirebiliyorsa, bu hücreler

kendisini yenileyebilen (self-renewal) uzun dönem- HKH (UD-HKH) olarak tanımlanmışlardır. Kemik iliğinden alınan diğer bir kısım hücreler ise nakil sonrası kan hücrelerinin bütün farklı tiplerini hızla oluştururlar ancak normal koşullar altında uzun dönem kendilerini yenileyemezler, bunlar da kısa dönem-HKH (KD-HKH) olarak tanımlanmıştır. Bu hücreler aynı zamanda projenitör ya da prekürsör hücrelerdir. Multipotent projenitör hücreler, nispeten olgunlaşmamış hücrelerdir ve alınmış olduğu dokuyu kısıtlı yenileyebilme kabiliyetindedir, dokunun tamamının yapılanmasını sağlasa bile idame edemezler [16-19].

İrving Weisman ve ekibi 1988'de ilk kez fare HKH'lerini izole edip ayrıca uzun ve kısa dönem HKH ile birlikte olgunlaşma basamaklarının sonraki süreçlerinde rol alan, kendini yenileyebilme yeteneği çok az olan bir grup erken ve geç multipotent projenitör hücrelerin yüzeylerindeki antijenik belirteçlerini tanımlamışlardır [20]. Bunlar;

UD-HKH: CD34<sup>-</sup>, SCA-1<sup>+</sup>, Thy1.1 <sup>+/lo</sup>, C-kit<sup>+</sup>, lin- CD135<sup>-</sup>, Slamf1/CD150<sup>+</sup>

KD-HKH: CD34<sup>+</sup>, SCA-1<sup>+</sup>, Thy1.1 <sup>+/lo</sup>, C-kit<sup>+</sup>, lin- CD135<sup>-</sup>, Slamf1/CD150<sup>+</sup>, Mac-1 <sup>lo</sup>

HKH'ler fenotipik olarak küçük hücreler olup; vital boyalar ile soluk boyanır ve yüzeylerinde çeşitli sıra tanımlama grup serilerini (cluster of differentiation: CD) gösteren antijenik belirteçleri ve C-kit kök hücre faktör reseptörü taşırlar.

İnsan HKH leri; CD34<sup>+</sup>, CD59<sup>+</sup>, Thy1/CD90<sup>+</sup>, CD38 <sup>lo/-</sup>, C-kit <sup>-/lo</sup>, lin- olarak tanımlanmıştır [21-23].

Diğer taraftan hematopoetik kök hücre belirleyicilerini (CD14, CD34 gibi) bulundurmayan buna karşılık CD73 ve CD105 gibi stromal belirleyicileri taşıyan, plastik yüzeylere yapışma yeteneğinde ve fibroblasta benzeyen görünüme sahip hücreler multipotent mezankimal stromal hücreler olarak tanımlanmıştır [24]. Bu hücreler aynı zamanda kemik iliği mikroçevresini oluşturan öncü hücrelerdir.

Çeşitli kök hücre çalışmalarında kök hücre biyolojisi ile ilgili veriler arttıkça kök hücre plastisitesi kavramı ortaya çıkmıştır. Kök hücre plastisitesi; bir hücrenin köken aldığı doku dışındaki dokulara diferansiye olabilme özelliğini tanımlamaktadır. Bunlara örnek olarak endotel, kalp kası ve hepatositlere dönüşebilen kemik iliği kökenli ve hatta purifiye edilmiş hematopoetik kök hücreler gösterilebilir. Hematopoetik kök hücrelerin iyi bilinen diferansiyasyon şemasında en üstte "hematopoetik kök hücre", ortada bir hücre dizisi oluşturmak üzere yolu çizilen "transit hücreler" ve en sonda "terminal diferansiyasyonu olan hücreler" bulunur.

Bu dönüşümün gerçekleştiğini kanıtlamak için yani plastisiteden bahsedebilmek için 3 koşul gerçekleşmelidir:

- Birincisi, değişen hücrenin orijini hücre yüzey belirteçleri ile belirlenmelidir.
- İkincisi, değişen hücrenin bulunduğu dokunun morfolojik parçası olduğu gösterilmelidir.
- Üçüncüsü, değişen hücre bulunduğu dokunun ya da organın fonksiyonlarını edinmelidir.

Erişkin kök hücre plastisitesini bildiren çalışmaların %80'den fazlası bugüne dek kemik iliği (Kİ) ya da hematopoetik kök hücrelerden zenginleştirilmiş olan Kİ veya periferik kan kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların tümünde taze Kİ veya periferik kan hücreleri önceden in vivo kültürleri yapılmadan transplante edilmişlerdir. Bu nedenle plastisite özelliği olan hücrelerin kendini yenilemeye uğrayıp uğramadığı sorusu değerlendirilememiştir. Üstelik, greftlenen hücrelerin sekonder alıcılara yeniden transplante edilmemiş olması da in vivo olarak plastisite özelliğine sahip olan hücrenin self-renewal özelliğinin değerlendirilmesini engellemiştir. Bu süreçte yapılan diğer bazı çalışmalar ise; tek hücrenin hematopoezi yeniden başlattığı ve bu şekilde in vivo olarak HKH selfrenewal'ını düşündürdüğü Krause ve arkadaşları [25] ile Grant ve arkadaşları [26] tarafından gerçekleştirilen çalışmalardır ve plastisite kavramı açısından önemli veriler elde edilmiştir. Lagasse ve ark. tarafından yapılan çalışmada HKH'den zenginleştirilmiş fare Kİ hücrelerinin sistemik enjeksiyonunun ardından hepatositlerin fonksiyonel olarak replase oldukları gösterilmiştir ve bu alana ışık tutan bir çalışma olmuştur [27]. Orlic ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer önemli çalışmada araştırmacılar, bir fare myokard iskemisi modelinde infarktüse uğramış olan alanda HKH'den zenginleştirilmiş greftlemenin, Kİ'nden köken alan ve immatür kardiomyositlerin karakterlerini taşıyan hücrelerin greftlenmesine yol açtığını göstermişlerdir. Ayrıca, kardiyak fonksiyonlarda belirgin bir iyileşme gözlenmiştir [28].

## **B) HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE ENGRAFTMANININ TANIMLANMASI**

Kök hücre transplantasyonunda başarının önemli kriterlerinden biri de kök hücrenin engraftmanının gerçekleşmesi ve devamlılığıdır. Engraftman sağlanması erken graft değerlendirilmesinde ilk parametre olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Hazırlık rejimi ( myeloablative-nonmyeloablative) ile gelişen aplazi sonrası hücre serilerinin tekrar ortaya çıkarak tam kan tablosunun düzelmesi 'engraftman' yani nakledilen lenföhematopoetik hücrelerin konakçıda yerleşerek yeniden yapılanması olarak tanımlanmıştır. Klinik çalışmalarda standardizasyon sağlanması amacıyla engraftman için bazı kriterler kabul edilmiştir.

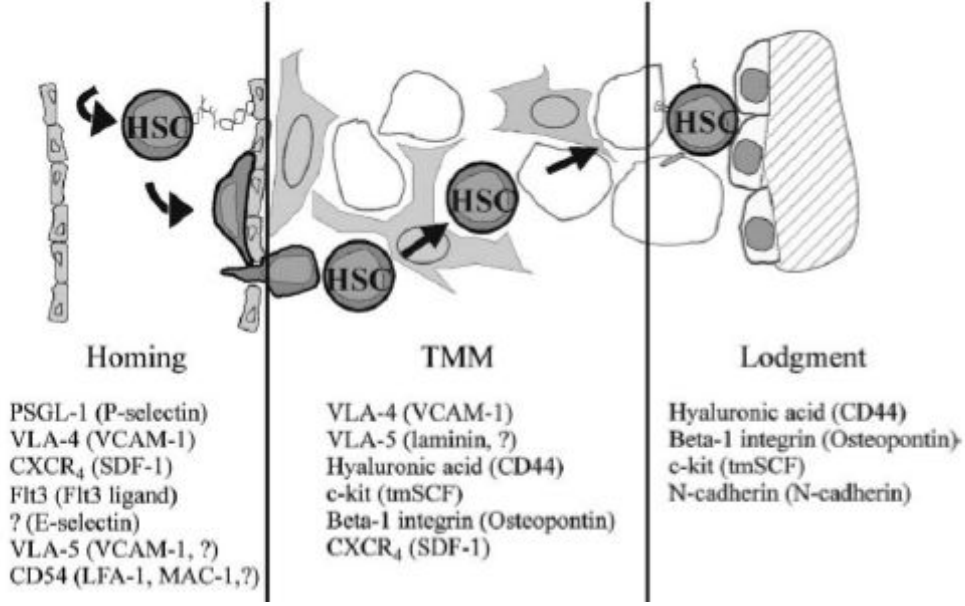
Desteksiz üç gün süreyle nötrofil sayısının  $>0,5 \times 10^9/L$  seyrettiği günlerden ilk gün nötrofil engraftmanı olarak kabul edilmektedir. Trombosit engraftmanı  $>20 \times 10^9/L$  trombosit sayısının 7 gün boyunca transfüzyonsuz sağlanması durumunda bu 7 günün ilk günü olarak bildirilmiştir. Eritrosit süspanasyonu transfüzyonu gerekmeyen üç haftalık periyodun ilk günü de eritrosit engraftmanı olarak kabul edilmiştir [1].

Nakil sonrası engraftmanın beklendiği süre 7-21 gündür. Bu süre  $>21$  gün olunca engraftman gecikmesi,  $>42$  günde ise engraftman başarısızlığından söz edilmektedir

Engraftman biyolojisine göre; G1 fazındaki kök hücreler tarafından engraftman sağlanır. Sitokinler aracılığı ile S1 ve G2 fazına itilen kök hücreler homing ve engraftman özelliklerini kaybederler.

Bununla birlikte HKH'in engraftmanından sorumlu moleküler mekanizmalar ile kemik iliğinde çoğalma ve olgun, fonksiyonel hematopoetik hücrelere dönüşüm başlangıcı hakkında halen az miktarda bilgiye sahip bulunmaktayız.

HKH engraftmanı bir takım kompleks olaylar zinciri olarak düşünülmektedir. Bu süreç; dolaşan HKH'nin kemik iliği mikrovasküler yapıları aracılığıyla toplanmasını ve bunu takiben kemik iliğinin hemopoetik kordlarına transendotelial göçünü kapsamaktadır. Bu olaylar HKH'nin "homing" yani güdümlenerek yönelmesi olarak adlandırılmaktadır. Bu süreci takiben, kök hücrelerin kemik iliği içinde spesifik anatomik bölgeler olarak bilinen 'niş'lere yerleşmesi de "lodgment" olarak adlandırılmaktadır (Şekil 3) [29]. Nişte HKH'nin proliferasyon ve diferansiyasyonu hücreler, büyüme faktörleri, adhesyon molekülleri, ekstrasellüler matriks proteinleri gibi diğer birçok molekül arasındaki kompleks bir etkileşim ile gerçekleşmektedir



Şekil 3: Hematopoetik kök hücre engraftmanının hücre yüzey reseptörleriyle ilişkide olduğu 3 fazı. TMM= kemik iliğine migrasyon; CXCR=C-X-C kemokin reseptörü; HSC= hematopoetik kök hücre; LFA-1=lenfosit fonksiyon asosiyasyon antijen 1; PSGL-1= P selektin glikoprotein ligand 1; SDF-1= stromal derivatif faktör 1; tmSCF= kök hücre transmembran izoformu; VCAM-1= vasküler hücre adezyon molekülü 1.

Stromal derivatif faktör (SDF-1) ve reseptörü C-X-C kemokin reseptörü-4 (CXCR4) ile ilgili in vitro çalışmalardan elde edilen verilere göre; SDF-1, HKH'yi de içeren primitif kemik iliği kökenli CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> hücrelerin ekspres ettiği CXCR4 reseptörü için güçlü bir kemoatraktan olarak belirlenmiştir [30-32]. Kemik iliği stroması ve kemik dokusuna üretilen SDF-1, kemik iliğindeki ekstravasküler kompartmandan damar lümenine doğru azalan bir gradyent oluşturmaktadır. Bu SDF-1 gradyantının transplante edilen HKH'nin kemik iliğine "homing" ve sonrasında hematopoetik yeniden yapılanma süreci için gerekli olduğu gösterilmiştir [33]. CXCR-4 için güçlü bir kemotaktik rolü olan SDF-1, reseptörüne bağlandığında integrin aracılıklı sıkı ve kararlı bir bağ oluşturup transendotelial migrasyonu sağlamaktadır [30, 31]. CXCR-4 kemik hücrelerinde olduğu gibi ilik ve vasküler endotelial hücrelerince de sentezlenip ekspres edilmektedir. HKH tedavisinde, CXCR-4'ün antikörlerle bloke edilmesi homing sürecinin aksamasıyla sonuçlanır [33].

### C) KEMİK İLİĞİNDE MİKROÇEVRENİN TANIMLANMASI VE ETKİLEŞİMLERİ

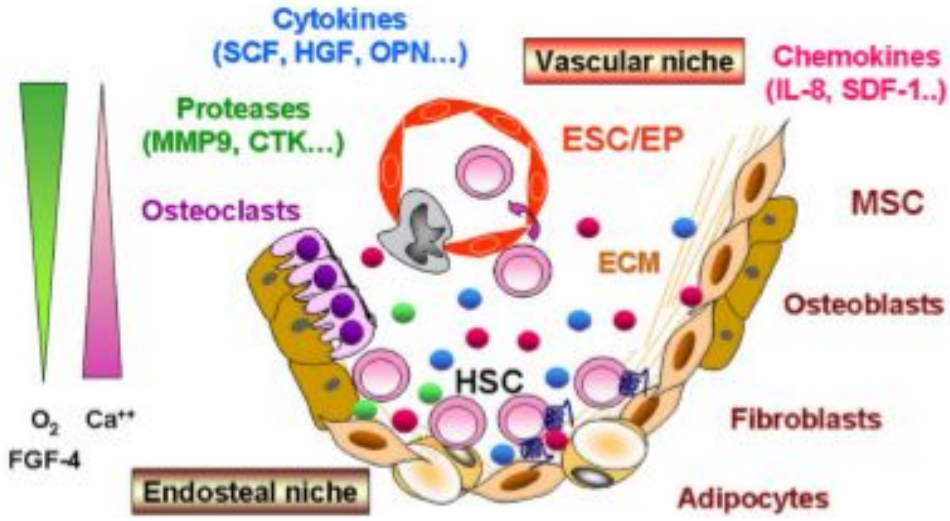
Organizmanın gelişimi sırasındaki hemotopoitik sistemin oluşumu sürecinde, HKH'nin birbiri ardına bir destekleyici mikroçevreden diğerine kan yoluyla taşınarak migrasyonu gösterilmiştir. İlkel HKH'nin düzenli bir modelde migrasyonunun yönetim mekanizması kısmi olarak anlaşılmıştır ancak eninde sonunda HKH'nin kemik iliğine yerleşimi ile sonuçlandığı görülmüştür. Normalde erişkin HKH'nin büyük bir kısmı kemik iliğinde bulunmasına rağmen, periferik kanla da dolaşır. Aslında parabiyotik fare kullanılarak yapılan çalışmalarda sirkülasyondaki HKH'nin, bu sirkülasyon boyunca hızla migrasyonunu yapıp ablasyon uygulanmamış kemik iliğine engraftman sürecinde fonksiyonel bir rol oynadığı gösterilmiştir [34]. HKH, kemik iliğinde gelişim sırasında en yakın öncüllerle birlikte heterojen bir popülasyon olan ilik stromal hücreleri ile ilişki geliştirir [35, 36].

Kemik iliği, hematopoetik kompartman ve stroma olarak iki yapısal bölümden oluşmaktadır. Anatomik olarak kemik iliği stromal hücreleri; retiküler hücreler, adipositler, kemik yüzeyine yakın osteogenik hücreler, vasküler endotelial hücreler, damar duvarında düz kas hücreleri ve makrofajlarca oluşturulur [37, 38]. Kemik iliği vasküler sisteminde; arterioller kemik iliğine foramina nutrisyadan geçerek girerler ve birkaç dala ayrılırlar. Bu damarlardan oluşan küçük arterioller ve kapillerler kemik iliği boyunca köprü oluşturup intersinüzoidal kapillerle bağlantılı olan sinüzoidleri oluştururlar. Kemik iliği sinüzoid yapısı kendine özgü olup, normal venöz sistemden farklıdır. Sinüzoid duvarları tek sıra endotelial hücrelerden oluşur ve destekleyici dokudan yoksundur [13]. Bu kompleks doku ekstrasellüler matriks komponenti, hematopoetik büyüme faktörleri gibi ilişkili olduğu biyosentetik ürünleri ile birlikte kemik iliğinde kendine özgü hematopoetik mikroçevreyi oluşturur [39]. Stromal doku tarafından üretilen ekstrasellüler matriks proteinleri; fibronektin, kollojen tip I, III ve IV, laminin, thrombospondin, vitronektin, hemonektin, hyaluronan ve çeşitli proteoglikanlardır. Bunların birçoğu hemopoietik mikroçevrenin farklı lokalizasyonlarında eksprese edilir [40].

Basit bir ifadeyle hematopoetik kök hücreyi çevreleyen sınırlı fizyolojik bir mikroçevre olarak niş anlayışı ilk olarak 1978'de Schofield tarafından ortaya atılmıştır [41]. Araştırmacı "niche" anlayışını kök hücrelerin durağan olarak bulunduğu, farklılaşma ve kendi kendilerini kök hücre olarak çoğaltma yetisinin engellendiği, stromal hücrelerle komşu ve onlar tarafından yönlendirildikleri, desteklendikleri bir mikroanatomik bölge olarak tanımlamıştır. Daha sonra yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtların büyük çoğunluğuna göre HKH ve hematopoetik öncül hücrelerin kemik iliğinde rastgele dağılmadığı, aksine kemik endosteumu

ile sıkı ilişkide olacak şekilde yerleştikleri [8-10], daha yeni olarak da kan damarları çevresinde [11, 12] toplandıkları saptanmıştır. 1975'e gelindiğinde ise Shackney kemik iliğinde hücre gelişim eğiliminin; endosteum boyunca farklılaşmamış olan hücrelerin yerleşimi, farklılaşma ve maturasyonun ise merkeze daha yakın ve vaskülarizasyonun daha fazla olduğu alanlarda başladığı şeklinde tarif etmiştir [42]. Birkaç yıl sonra da hematopoezin kalitesinin stromal çevre tarafından belirleniyor olabileceği görüşü ortaya çıkmıştır[43]. Kök hücrenin spesifik niş bölgelerinde yerleşimi anlayışını, dönüm noktası olan iki çalışma başlatmıştır. Örneğin yapılan çalışmalarda kemik iliğinde osteoblastik nişin dinamik bir sürecinin olduğu, kök hücrelerin durağan kabul edilen bir mikroçevreden farklılaşma için vasküler bir bölgeye taşınabildiği gösterilmiştir [41, 44]. Sonraki çalışmalar da bunu destekler niteliktedir. Çalışmalarda osteoblastik nişin kök hücrelerin farklılaşmamış haldeki devamlılığı için gerekli koşulları sağladığı gösterilmiştir [9, 45]. Kemik iliği sinüzoidal ağının endosteal zondan farklı bir anatomik ve fonksiyonel yapı olduğunu tanımlamak için "vasküler niş" kavramı kabul edilmiştir. Ultrastrüktürel çalışmalarda immatür hücrelerden çok farklılaşmış hematopoetik hücrelerin kemik iliği mikrovasküler yapılarıyla yakın ilişkide olduğunu göstermiştir [46, 47]. Dikkat çekici şekilde neredeyse tüm matür megakaryositlerin ince duvarlı sinüzoidlere bitişik lokalizasyonda olduğu, tüm megakaryositlerin sağlam endotelial hücreler aracılığı ile göç edebilme yetenekleri gösterilmiştir. Bu gözlem sadece trombopoez ile sınırlandırılmış olmayıp, eritroid ve B lenfoid öncül hücrelerin de tanımlanan nişlerde yerleştikleri gösterilmiştir [9]. Bu bulgular maturasyon sürecinde öncül hücre-stromal hücre etkileşiminin kritik bir belirleyici faktör olduğuna işaret etmektedir.





Şekil 4: Hematopoetik kök hücre nişinin basit bir modeli. Niş; 1) mezenkimal kök hücreden (MSCs) köken alan ve fibroblast, osteoblast/osteosit ve adipositleri oluşturabilen stromal hücrelerden, 2) hematopoetik kök hücreden (HSCs) köken alan osteoklastlardan, 3) endotelial kök hücreden (ESCs) köken alan endotel hücrelerinden oluşturulmaktadır. Nişteki düzenleyici sinyalizasyon; hücre içi düzenleyici mekanizmalar, adezyon molekülleri arasındaki etkileşim, ekstrasellüler matriks, kalsiyum ve oksijen konsantrasyonu gibi çevresel komponentler, proteazlar ve sitokinler ve kemokinleri içeren humoral faktörlerle yürütülmektedir.

## D) ENGRAFTMANI ETKİLEYEN KİNETİKLER

Engraftmana etki eden bazı faktörler belirlenmiştir. Bunlar kullanılan hazırlık rejimleri ki; myeloablative olanlarda diğerlerine göre engraftman süresi uzamaktadır, graft versus host hastalığı ( GvHH) profilaksisinde metotreksatin uzun süreli kullanımı, antimikrobiyal profilakside kullanılan ajanlar, kemik iliğinin stromal yapısı, kullanılan kök hücre kaynağı, kök hücre içeriğinin CD34<sup>+</sup> hücre miktarı, reinfüzyon sonrası büyüme faktörü kullanımı, hipersplenizm başlıkları altında toplanabilir [4-8].

Engraftman yetersizliği için, yetersiz miktarda kök hücre infüzyonu, yetersiz hazırlama rejimi, kemik iliği mikroçevresinin yapısal ve fonksiyonel bozukluğu, ilaç toksisitesi ve ağır infeksiyonlar, allogeneik nakiller için ayrıca T hücre azaltımı, HLA doku grubu uyumsuzluğu, GvHH, ABO uyumsuzluğu risk faktörleri olarak görülmektedir.

Engraftman biyolojisine göre; G1 fazındaki kök hücreler tarafından engraftman sağlanır. Sitokinler aracılığı ile S1 ve G2 fazına itilen kök hücreler homing ve engraftman özelliklerini kaybederler. Steroidlerin 0. günde verilmesi de allogeneik engraftmanı engeller.

Stromal yapı ile ilgili olarak fibrozisli olgularda teorik olarak uzamış engraftman beklenirken yapılan çalışmalarda bu durum kanıtlanmamıştır [3].

Nakil sonrası büyüme faktörü kullanımı ile hematopoetik yeniden yapılanma hızlanmaktadır [8].

Kronik myeloproliferatif neoplazisi olan hastalardan masif splenomegalisi olan vakalar için hipersplenizm açısından ilk dönemlerde splenektomi yapılmış ancak sağ kalıma anlamlı katkı sağlamadığından vazgeçilmiştir [3].

Kök hücre kaynağı olarak periferik kök hücre kullanımı ile Kİ'ne göre belirgin olarak daha hızlı nötrofil (2-6 gün daha erken) ve trombosit (5-8 gün daha erken) engraftmanı sağlanmaktadır [4].

Bir çok araştırmacı kök hücre ürününün uygunluk ve yeterliliğini belirlemede en uygun kriter olarak CD34<sup>+</sup> hücre içeriği olduğu konusunda hemfikirdir. Hızlı nötrofil ve trombosit engraftmanı için en sık kabul edilen eşik değer 2-2,5x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg olarak belirtilmektedir. Bu konudaki bazı araştırmacılara göre de optimal kısa dönem yeniden yapılanmada gerekli olan HKH miktarı 2,5-5x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg olarak kabul edilmiştir [3, 48-50]. Daha fazla HKH infüzyonunun daha hızlı bir engraftman sağlamadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte Nieboer ve ark. uzun dönem yeniden yapılanma açısından yaptıkları transplant sonrası 1 yıllık analizlerinde bahsedilen miktarların uygun olmadığını belirtmişlerdir. Eşik değer olarak

$>5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg miktarını önermişlerdir ve  $>10 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg miktardaki infüzyonların uzun dönem yeniden yapılanmayı hala hızlandırdığı görüşünü öne sürmüşlerdir ( multivariate analizlerinde verilen CD34<sup>+</sup> miktarı açısından  $<5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg ile  $>10 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg log-rank  $p=0,01$ ). Bu durumu olasılıkla elde edilen üründeki progenitor hücrelerin tipi ve fonksiyonlarından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Buna göre CD34<sup>+</sup> hücrelerin kısa dönem engraftmanında kritik rol alan progenitör HKH' yi yansıttığını [51], uzun dönem engraftmanın ise daha immatür HKH' ce sağlandığını ileri sürmektedirler. Bu nedenle de daha önce belirtilen eşik değerlerin kısa dönem engraftmanı için yeterli HKH içerdiğini ancak uzun dönem engraftman devamı ve bunun hızla tamamlanması için yeterli immatür kök hücre içermediğini belirtmişlerdir. Yakın dönemde yapılan otolog kök hücre nakli sonrası uzun dönem hematolojik yeniden yapılanmada elde edilen ürünün dondurulma öncesi ve eritildiğinde içeriğindeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarlarının etkisini araştıran bir çalışmada Maunier ve ark. optimal düzeyi en az  $5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg olarak saptamışlardır [52].

Engraftmanda önemli bir faktör olarak kemik iliği mikroçevresinin yapısal ve fonksiyonel bozukluğu açısından pimer myelofibrozisin patobiyolojisi iyi bir örnek teşkil etmektedir. Bu kompleks süreçte fibroblastlardaki değişikliklerle ekstrasellüler matriks komponentlerinde artan bir depolanma gelişmektedir. Bu süreçten kemik iliğindeki patolojik hematopoetik klon ve özellikle nekrotik megakaryositlerden kaynaklanan artmış büyüme faktörleri sorumlu tutulmaktadır [53-56]. Bunlar arasında trombosit faktörü 4 (PF4), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), ana fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- $\beta$ ) [57] ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) [58, 59]'nün mezenkimal hücreleri aktive ederek myelofibrozisi gelişimine ve endotelial hücreleri etkileyerek anjiyogenezis gelişimine yol açtığı düşünülmektedir. Aynı zamanda stromal ve endotelial hücrelerde artmış osteoprotegerin üretiminin osteoblast oluşumundaki dengeyi bozarak hastalarda sıklıkla myelofibrozisle ilişkili [60, 61] sürecin osteosklerozis ile sonuçlanmasına sebep olduğu ileri sürülmüştür.

## **MATERYAL-METOD**

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) hematoloji bilim dalında multipl myelom (MM), amiloidoz, plazmasitom, hodgkin (HL)-hodgkin dışı lenfoma (NHL) tanılarıyla 2003-2008 yıllarında otolog ve allogeneik periferik kök hücre nakli yapılan hastalar dahil edildi. Hastalar retrospektif olarak değerlendirildi ve kök hücre nakli öncesi son 2 ay içinde yapılmış kemik iliği biyopsisi olan 40 hasta çalışmaya alındı. DEÜTF patoloji ana bilim dalı arşivinde saklanmakta olan preparatların parafin bloklarından poly-L-lizinli lamlara kesitler alınarak hematopatolog tarafından değerlendirildi.

Tablo 1. Hastaların karakteristik özellikleri

Hasta sayısı	40
Cinsiyet(E/K)	23/17
Yaş(yıl)	49 (17-70)
Tanımlar	
Multipl myelom	27
Non-hodgkin lenfoma	5
Hodgkin lenfoma	6
Plazmositom	1
Amiloidoz	1
Transplantasyon	
Otolog	37
Allogeneik	3

Çalışma kapsamına alınan olgulara iat arşivdeki hemotoksilen & eozin (H& E) boyalı preparatlar tekrar değerlendirildi ve parafin bloklardan yeni preparatlar hazırlandı. Lizinli lama alınan kesitlere ise anjiyogenezi değerlendirmek için CD 34 (Neomarkers) antikorunu streptavidin-avidin immünoperoksidaz yöntemiyle çalışıldı. CD 34 ile görünür hale getirilen damar yoğunluğunun belirlenmesi için stereolojik ölçüm yapıldı. Birim alana düşen mikrodamar sayısı (NVES) ve birim tümör doku hacmine düşen vasküler yüzey yoğunluğu (VSD) hesaplandı. Bu kesitler ışık mikroskopisinde 100x'lik büyütmede sabitlendi, bununla bağlantılı kamera (Sony CCD, Japan) ile monitöre (Sony Trinitron, Japan) yansıtıldı ve böylece 525x'lik bir büyütme elde edildi. Daha sonra 11 yatay, 11 dikey test çizgilerinden oluşan 121 nokta içeren karelerden oluşan saydam monitöre yerleştirildi. Bu saydam sınırları

içinde kalan tümör dokusunda test çizgileriyle kesişen damarların kesişme nokta sayıları (In), bu alan içinde kesişsin veya kesişmesin toplam damar sayısı (N) olarak not edildi. Vv(str); test çizgisi üzerindeki stromanın volüm oranını göstermekte olup nokta sayma yöntemiyle belirlendi ( Vv(str); stromaya düşen nokta sayısının 121'e bölünmesiyle ) elde edildi. Aynı işlem tümörün rastgele seçilen 10 farklı alanında yinelendi. VSD, NVES aşağıdaki formüllere göre hesaplandı [62, 63].

$$VSD = \frac{\sum In.2.121}{Istr.Lr}, \quad NVES = \frac{N.121}{Istr},$$

Lr (sabit sayı) : 10,34.

Istr: stromaya düşen nokta sayısı,

In: test çizgileri ile kesişen damar sayısı

N:ölçüm yapılan alandaki damar sayısı

Myelofibrozisin (MF) değerlendirmesi için de hazırlanan preparatlardan bir tanesi retikülin bir tanesi de Mason Trikrom ile boyandı. Myelofibrozis derecesi 0-3 arasında skorlandı. Retikülin ve masson trikrom boyasıyla boyanan kesitlerde fibrozisin derecelendirilmesi; kemik iliği fibrozis derecelendirme Avrupa konsensus raporu temel alınarak yapıldı [64]. Bu derecelendirme aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Derece	Tanımlaması
MF-0	Kesişim olmadan lineer dağılmış retikülin lifleri ( normal KI'ne uyan)
MF-1	Özellikle perivasküler alanda olacak şekilde normal ağ yapısını bir çok kesişimle kaybeden retikülin lifleri
MF-2	Yaygın ve yoğun olarak kesişen artmış retikülin yapısı, seyrek olarak fokal alanlarda kollojen lifler ve/ veya osteoskleroz
MF-3	Yaygın ve yoğun olarak kesişen artmış retikülin yapısı ile kaba kollojen liflerin yoğun birlikteliği ve sıklıkla önemli derecede osteosklerozis

Tablo 2. Myelofibrozis sınıflandırması

Hastaların; tanısı, hastalığın evresi, aldığı tedaviler, tedavi yanıtları, toplanan CD 34<sup>+</sup> periferik kök hücre miktarı, mobilizasyon rejimleri, kök hücre nakli uygulama öncesi hastalık durumu ( hastalıklı, kısmi yanıtı, tam yanıtı olma durumu) ile hastaların nakil sonrası sürvi belirlemesi için son kontakt kurulan tarih veya ölüm tarihleri dosya bilgilerinden kaydedildi.

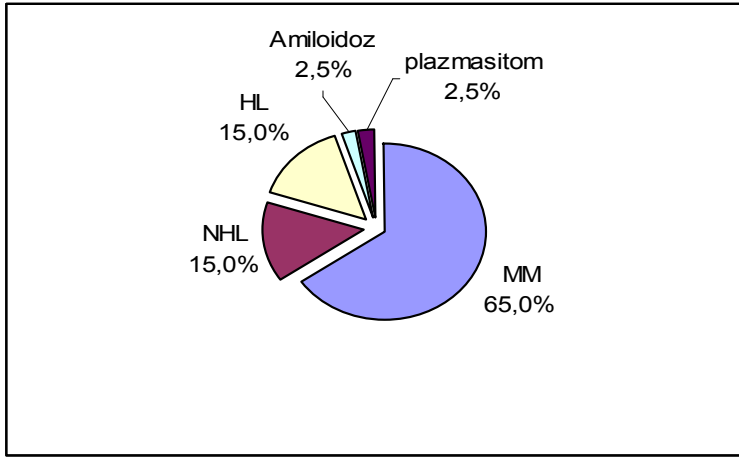
Çalışmaya başlamadan önce DEÜTF klinik araştırmalar etik kurulundan onay alındı. Patoloji ana bilim dalında yürütülecek değerlendirmeler için hizmet alımı ve anjiogenezis değerlendirilmesinde kullanılmak üzere alınan CD 34<sup>+</sup> monoklonal antikor için mali destek İzmir Kan Hastalıkları ve Kanser Araştırma Yardımlaşma Derneği'nden sağlandı.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

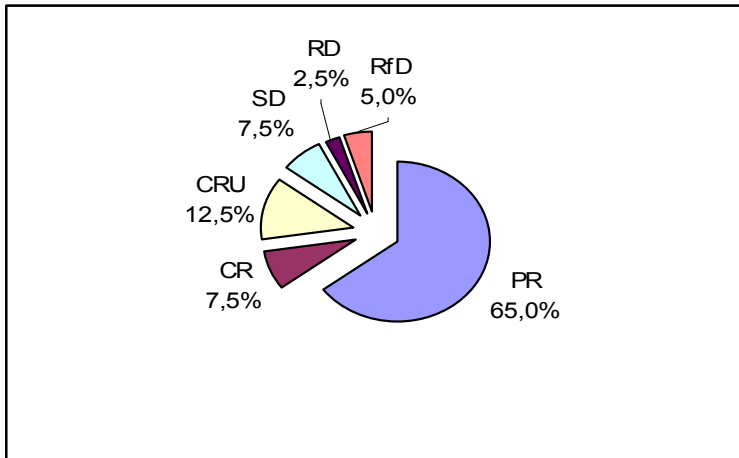
İstatistiksel veriler için SPSS 15.0 for Windows kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak verildi. Nötrofil, trombosit ve eritrosit engraftman süreleri ortanca ( minimum-maksimum) olarak belirtildi. CD 34<sup>+</sup>, fibrosis, anjiyogenezis açısından VSD ve NVES değerleri üzerinden yapılan gruplar arandaki varyans analizleri non-parametric Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testleri ile değerlendirildi. Fibrozis ile engraftman günleri, VSD ve NVES arasındaki bağıntı analizi Spearman korelasyon, anjiyogenezis ve CD 34<sup>+</sup> düzeyleri ile engraftman günleri arasındaki bağıntı analizi de Pearson korelasyon testleri ile değerlendirildi. Sağ kalım analizleri ise Kaplan-Meier yöntemiyle yapıldı. İstatistiksel anlamlılık için p değerinin <0,05 olması gözetildi.

## **BULGULAR**

Çalışmamızda retrospektif olarak toplam 40 hasta değerlendirildi. Hastalardan 23'ü erkek (%57,5) ve 17'si kadındı (%42,5). Yaş ortalaması  $48,50 \pm 14,31$  yıl (17-70) olarak saptandı. Hastalık dağılımları NHL 6 hasta (%15), HL 6 hasta (%15), MM 26 hasta (%65), 1'er hasta (%2,5) multipl osseoz plazmasitom ve amiloidoz şeklindeydi. Hastaların transplantasyona alınma aşamasındaki hastalık durumları değerlendirildiğinde; 26 hastanın kısmi yanıtı (PR) (%65), 8 hastanın tam yanıtı (CR) ve patolojik olarak komfirme edilmemiş tam yanıtı (CRu) (%19,5), 3 hastanın stabil hastalıklı (SD) (%7,5) olduğu görüldü. Hastalardan 1'inde rezidüel hastalıklı (RD) (%2,5) ve 2'sinde de refrakter hastalık (RfD) (%5) varken transplantasyon yapılmış. Hastalık dağılımları ve transplantasyon öncesi hastalık durumları grafik 1 ve 2 de gösterilmiştir.



Grafik1:Hastalık dağılımı.



Grafik 2: Transplantasyon öncesi hastalık durumu.



Hastaların tedavi şemalarına bakıldığında; 21 hastanın (%52,5) transplantasyon öncesi radyoterapi aldığı, 19'unun (%47,5) almadığı gözlemlendi. Transplantasyon öncesi uygulanan kemoterapiler hastalıklara göre aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 3. Myelom, amiloidoz ve plazmasitom hastalarının tedavileri

Protokoller	Hasta sayısı
VAD	17
VAD, Bortezomib+Dexametazon	6
VAD, PAD	1
VAD, MP, Talidomid+Dexametazon	1
Dexametazon	1
Direkt yüksek doz melfalan	1
Siklofosfamid+Dexametazon	1

Tablo 4. Hodgkin Lenfoma tedavi şemaları

Protokoller	Hasta sayısı
ABVD, ESHAP	3
ABVD, BEACOPP	1
ABVD, EVA, BEACOPP, ESHAP	1
ABVD, MOPP/ABVD, ESHAP	1

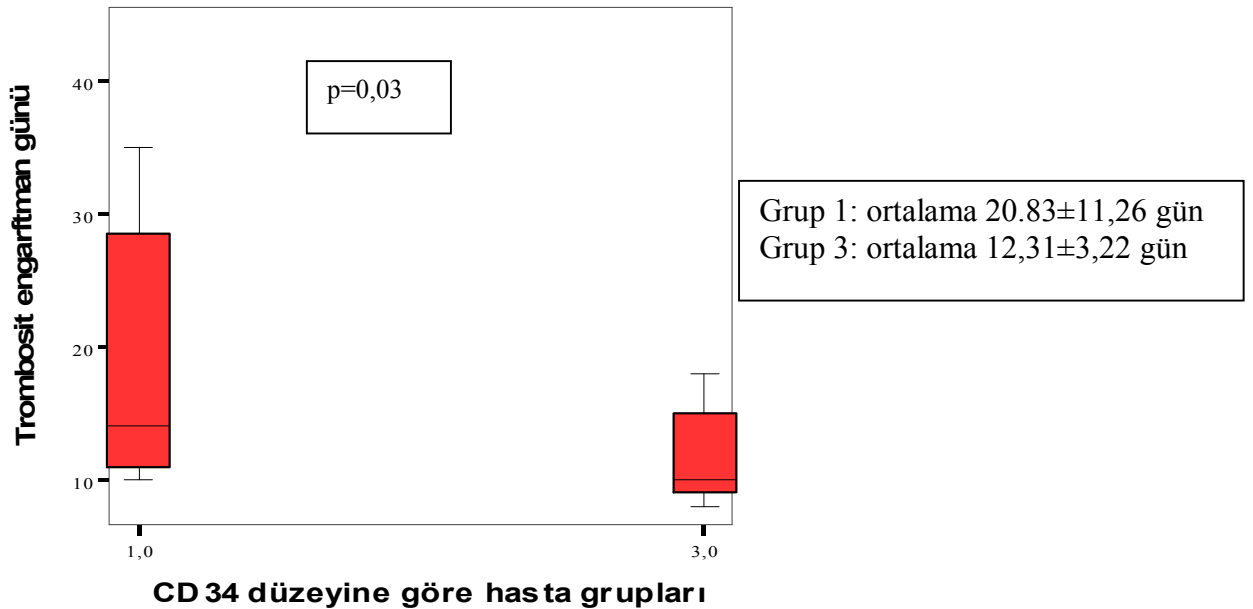
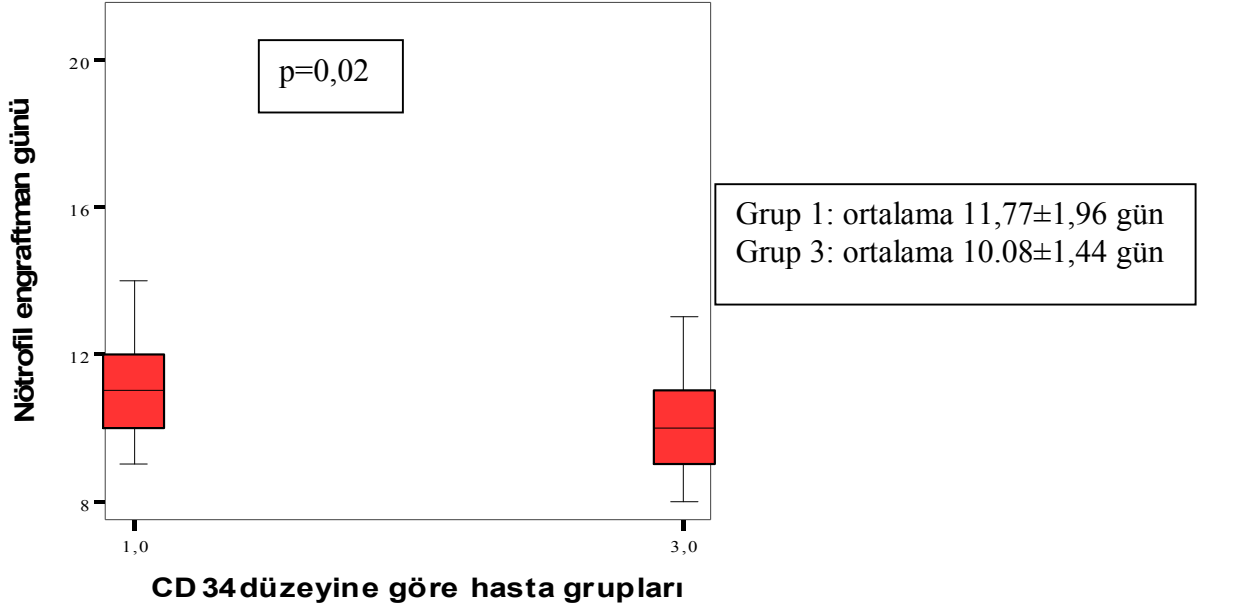
Tablo 5. Non-Hodgkin Lenfoma tedavi şemaları

Protokoller	Hasta sayısı
R-CHOP	2
R-CHOP, ESHAP	2
CVP, R-CHOP, İbritumomab tiuksetan, DHAP	1
HCVAD, CHOP 14	1

Çalışmaya dahil edilen hastaların 37'sine (%92,5) otolog, 3'üne (%7,5) allogeneik periferik kök hücre nakli yapılmıştı. Otolog periferik kök hücre nakli yapılan hastaların tamamında kök hücre mobilizasyonu için siklofosfamid 2,4 mg/m<sup>2</sup> (+) granülosit koloni stimülan faktör (G-CSF) protokolü uygulandı. Allogeneik nakillerde ise tam uyumlu akrabalarda, G-CSF mobilizasyon protokolü uygulandı.

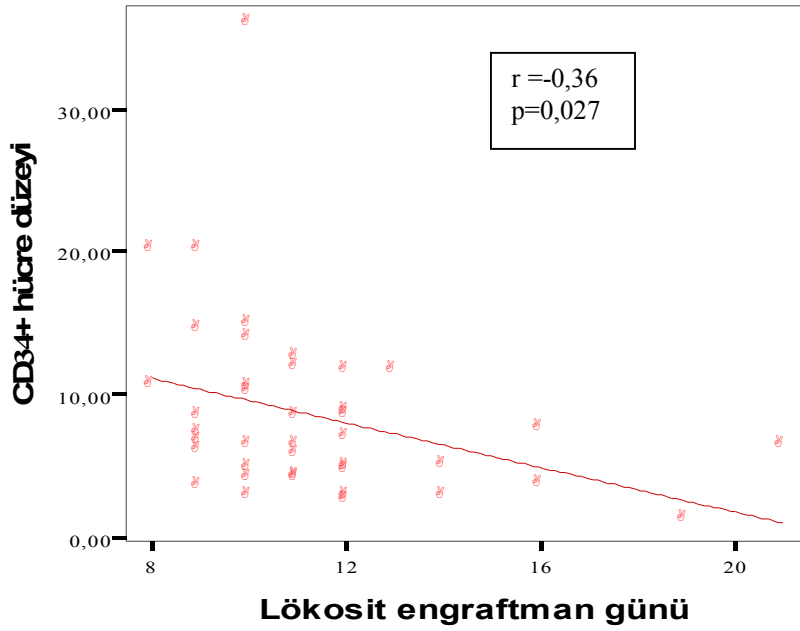
Otolog ve allogeneik elde edilen ürünlerdeki CD34<sup>+</sup> hücrelerin düzeyi ortanca 6,80 (1,18-35,90) x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg olarak saptandı. CD34<sup>+</sup> hücre düzeylerine göre hastalar 3 gruba ayrıldı (düzeyi <2,5x10<sup>6</sup> olan sadece 1 hasta grup dışı bırakıldı). Buna göre CD34<sup>+</sup> hücre düzeyi 2,5-5x10<sup>6</sup> olan 13 hasta grup 1, >5x10<sup>6</sup>-<10x10<sup>6</sup> olan 13 hasta grup 2 ve ≥10x10<sup>6</sup> olan 13 hasta grup 3 olarak belirlendi. Gruplar, nötrofil (40 hasta için) ve trombosit engraftmanı (37 hasta için) günleri açısından Mann-Whitney U tek yönlü varyans analiziyle değerlendirildi. Grup

1 ve 2 arasında istatistik anlamlı fark saptanmazken (sırasıyla  $p=0,41$  ve  $p=0,12$ ) grup 1 ve 3 arasında ise engraftman günleri arasında anlamlı fark saptandı (sırasıyla  $p=0,02$  ve  $p=0,03$ ).

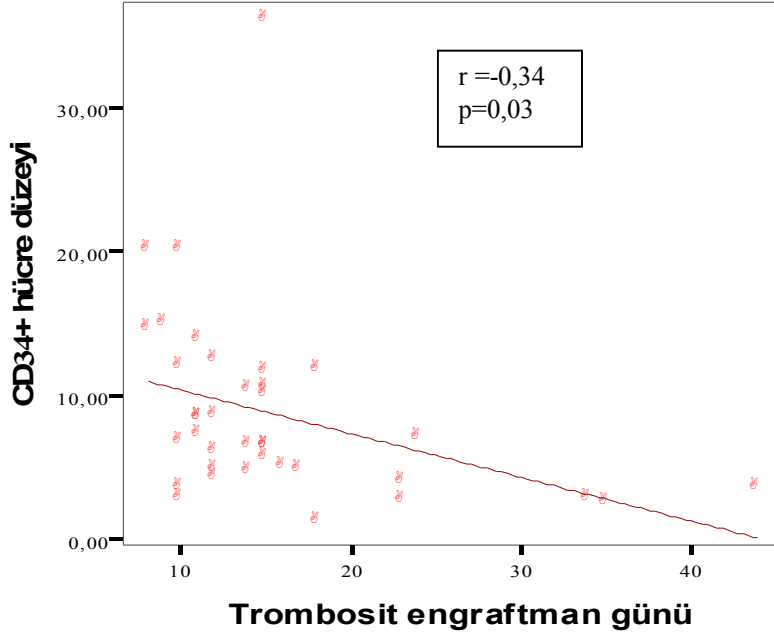


Grafik 3. CD 34<sup>+</sup> hücre düzeyine göre hasta gruplarının nötröfil ve trombosit engraftman günleri arasında karşılaştırma

Daha önce tanımlanan engraftman kriterlerine göre nötrofil engraftmanı ortalanca 11. gün (8-21) olup tüm hastalarda engraftmanın olduğu görülmüştür. Trombosit engraftmanı 37 hastada gerçekleşmiş olup ortalanca 14. gün (8-44), eritrosit engraftmanı ise 36 hastada gerçekleşmiş ve ortalanca 12. günde (3-47) gözlenmiştir. CD34<sup>+</sup> hücre düzeyleri ile lökosit, trombosit ve eritrosit engraftman günleri arasında yapılan Pearson korelasyon analizinde nötrofil ve trombosit engraftman günleri ile CD34<sup>+</sup> hücre düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon olduğu gözlemlendi (sırasıyla p=0,030, r=-0,34 ve p=0,027, r=-0,36).

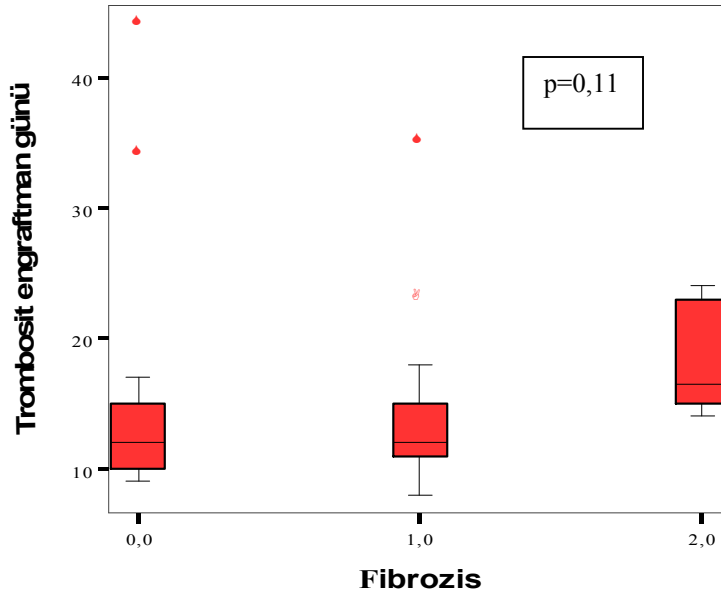
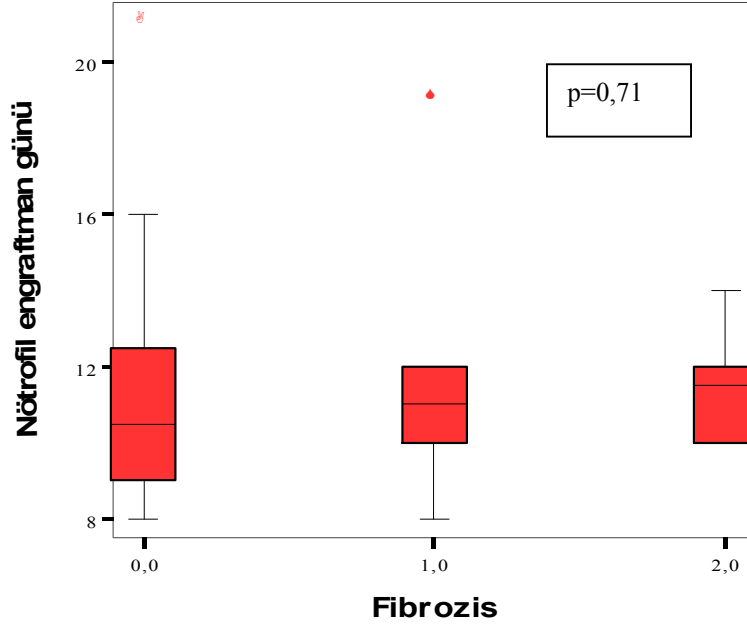


Grafik 4. CD34<sup>+</sup> hücre düzeyleri ile nötrofil engraftman günleri arasındaki korelasyon.

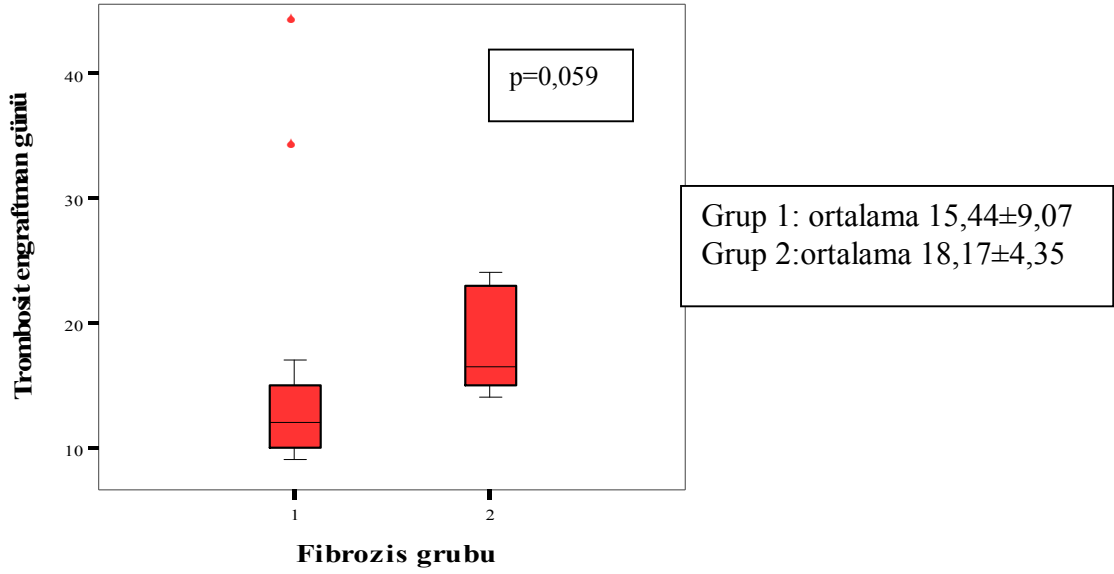


Grafik 5. CD34<sup>+</sup> hücre düzeyleri ile trombosit engraftman günleri arasındaki korelasyon.

Retrospektif olarak yapılan fibrozis değerlendirmesi sonucu 40 hastanın 20'sinde (%50) fibrozisin olmadığı, 14 (%35) hastada derece 1 fibrozis, 6 (%15) hastada derece 2 fibrozis olduğu saptandı. Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilen fibrozis ile nötrofil, trombosit ve eritrosit engraftman süreleri arasında korelasyon saptanmadı (sırasıyla  $r=0,09$   $p=0,57$ ,  $r=0,22$   $p=0,18$ ,  $r=0,25$   $p=0,14$ ). Fibrozis derecesine göre alt gruplarla yapılan Kruskal-Wallis testi ile grupların nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı (sırasıyla  $p=0,71$  ve  $p=0,11$ ).



Grafik 5. Fibrozis gruplarının nötrofil ve trombosit engraftman günlerinin karşılaştırması. Fibrozisi olmayanlarla (grup 1), derece 2 fibrozisi (grup 2) olanlar arasında Man-Whitney U ile yapılan varyans analizinde nötrofil engraftmanları arasında anlamlı farklılık saptanmazken ( $p=0,45$ ), trombosit engraftman günleri açısından ise  $p=0,059$  saptandı.



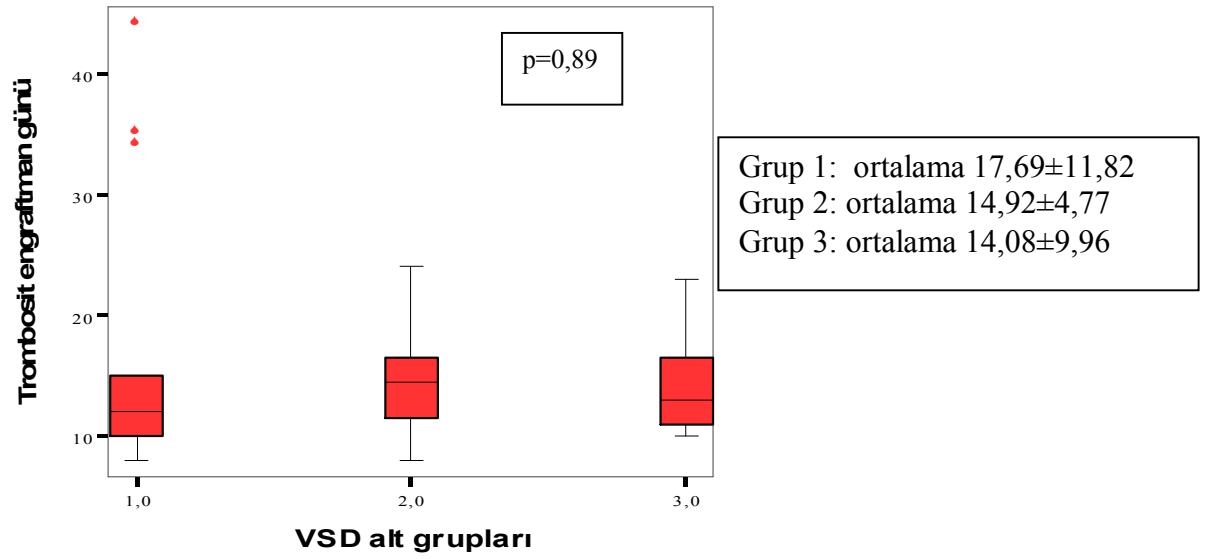
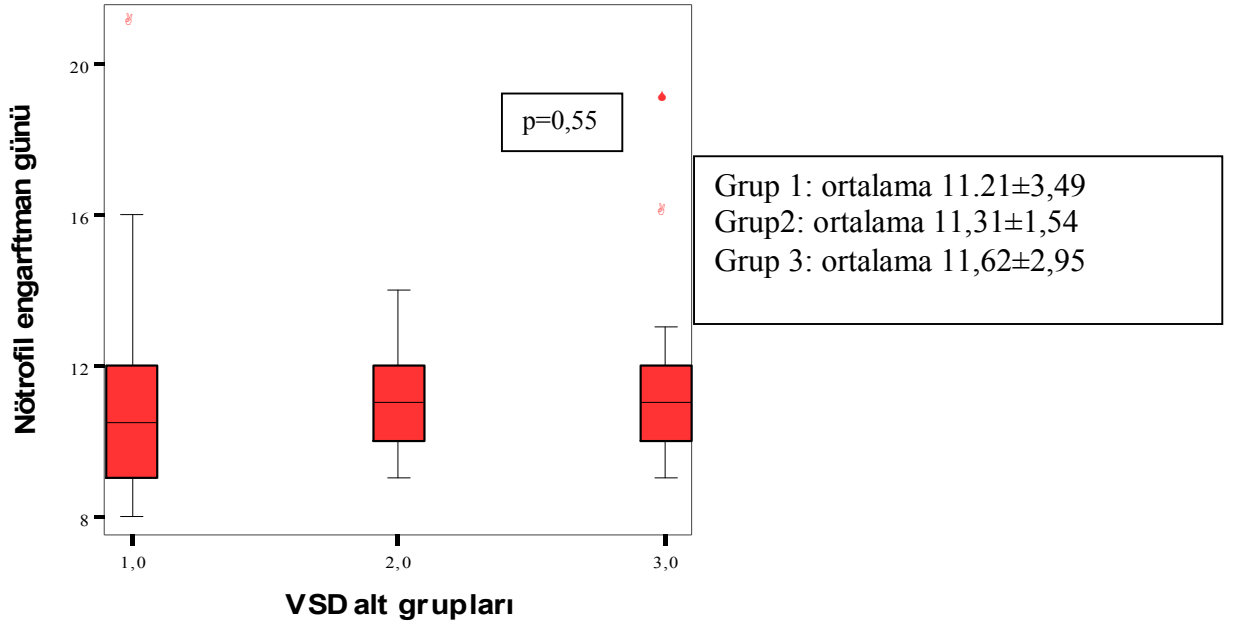
Grafik 6. Fibrozisi olmayan ve derece 2 fibrozisi olan hasta gruplarında trombosit engraftman günleri arasındaki varyans analizi.

Preparatlarda anjiyogenezis, birim alan başına düşen mikro damar sayısı (NVES) ve birim tümör doku hacmine düşen vasküler yüzey yoğunluğu (VSD) olarak değerlendirildi. VSD için ortanca  $33,80 \text{ mm}^{-2}$  ( $4,02-112,32 \text{ mm}^{-2}$ ), NVES için ise ortanca  $89,60 \text{ mm}^{-1}$  ( $10,25-325,65 \text{ mm}^{-1}$ ) saptandı. VSD ve NVES ile değerlendirilen anjiyogenezis ile nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasında korelasyon saptanmadı ( sonuçlar tablo 6'de gösterilmiştir).

Anjiyogenezis	Nötrofil engraftman günü	Trombosit engraftman günü
VSD	$r=0,029$ $p=0,85$	$r=-0,15$ $p=0,34$
NVES	$r=0,003$ $p=0,96$	$r=-0,14$ $p=0,39$

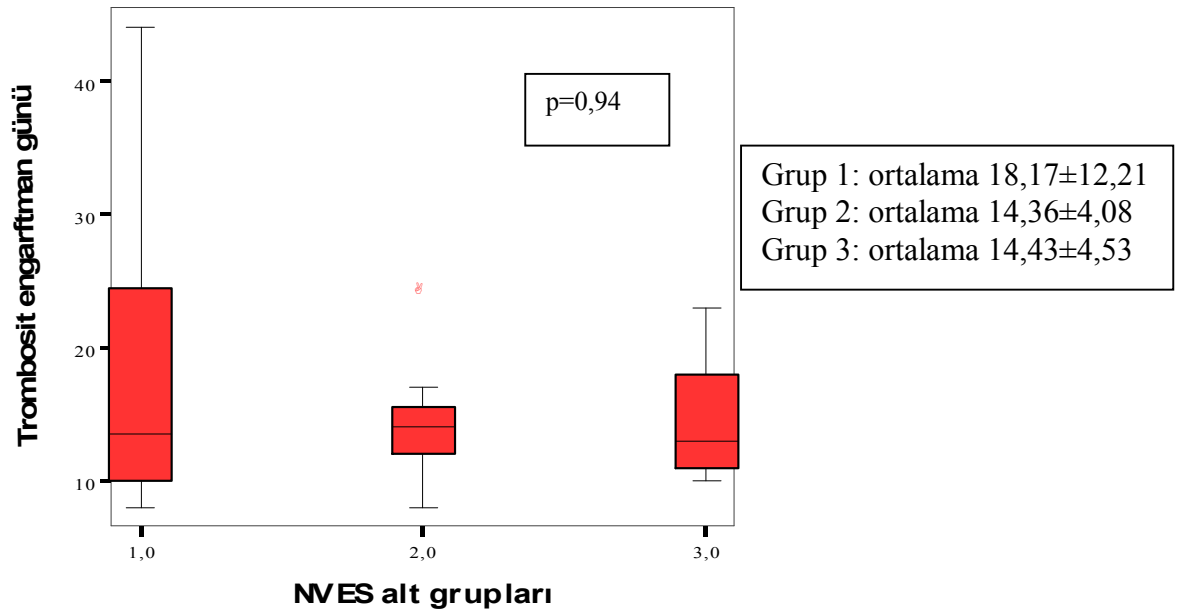
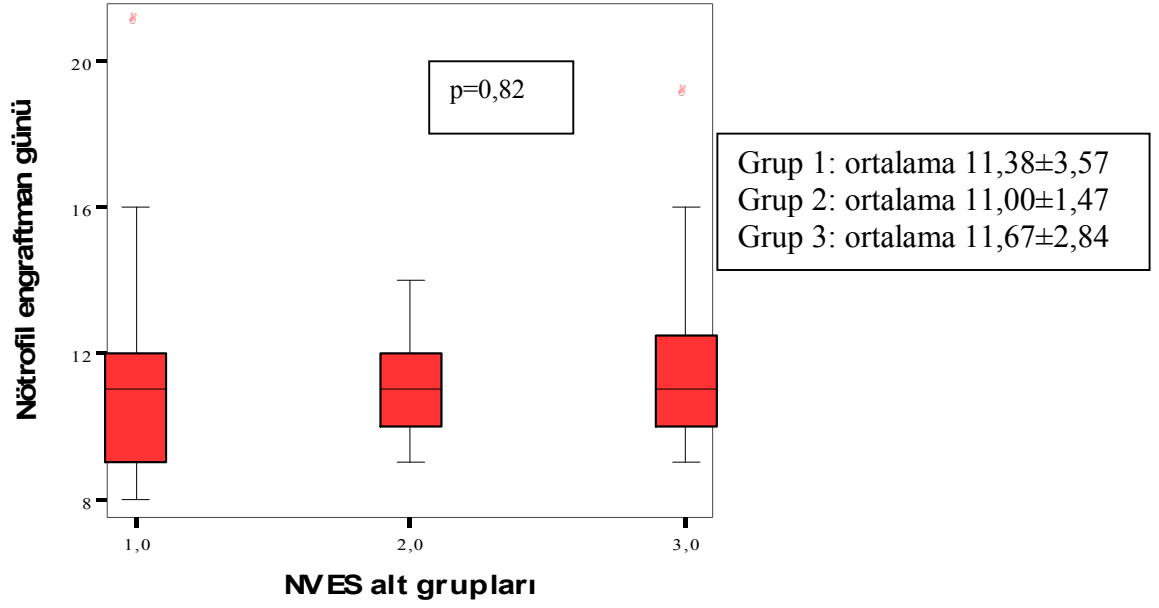
Tablo 6. Anjiyogenezis ile nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasındaki Spearman korelasyon analizi sonuçları.

VSD değerleri  $0-25 \text{ mm}^{-2}$  arası grup 1,  $>25-50 \text{ mm}^{-2}$  arası grup 2 ve  $>50 \text{ mm}^{-2}$  olanlar grup 3 olarak ayrılıp non parametrik Kruskal-Wallis alt grup varyans analizi yapıldığında da gruplar arasında nötrofil ve trombosit engraftman günleri açısından istatistiksel anlamlılık saptanmadı ( sırasıyla  $p=0,55$  ve  $p=0,89$ ).



Grafik 7. VSD alt gruplarında nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasındaki varyans analizleri.

NVES değerleri de  $0-55 \text{ mm}^{-1}$  grup 1,  $56-100 \text{ mm}^{-1}$  grup 2 ve  $>100 \text{ mm}^{-1}$  grup 3 olarak ayrılıp yine aynı yöntemle nötrofil ve trombosit engraftman günleri açısından varyans analizleri yapıldı, ancak istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla  $p=0,82$  ve  $p=0,94$ ).

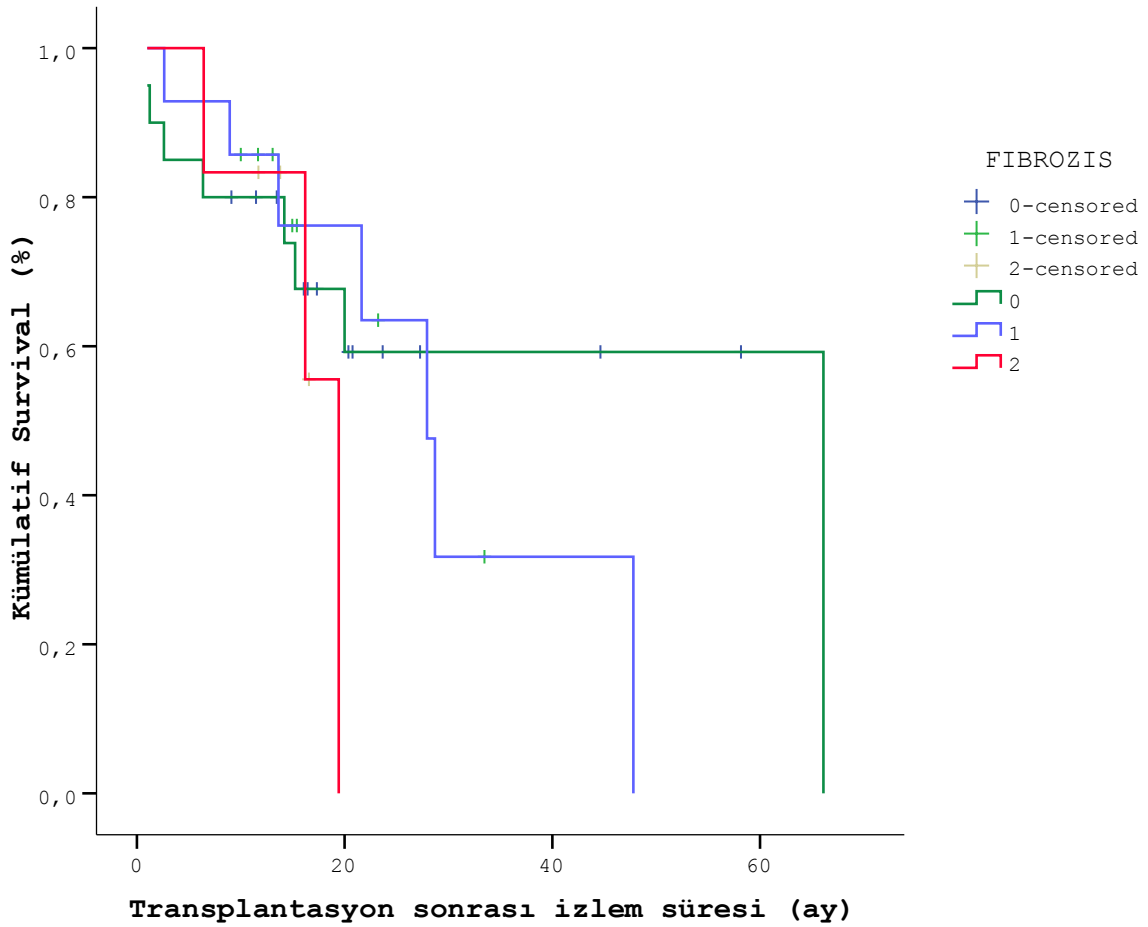


Grafik 8. NVES alt gruplarında nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasındaki varyans analizleri.



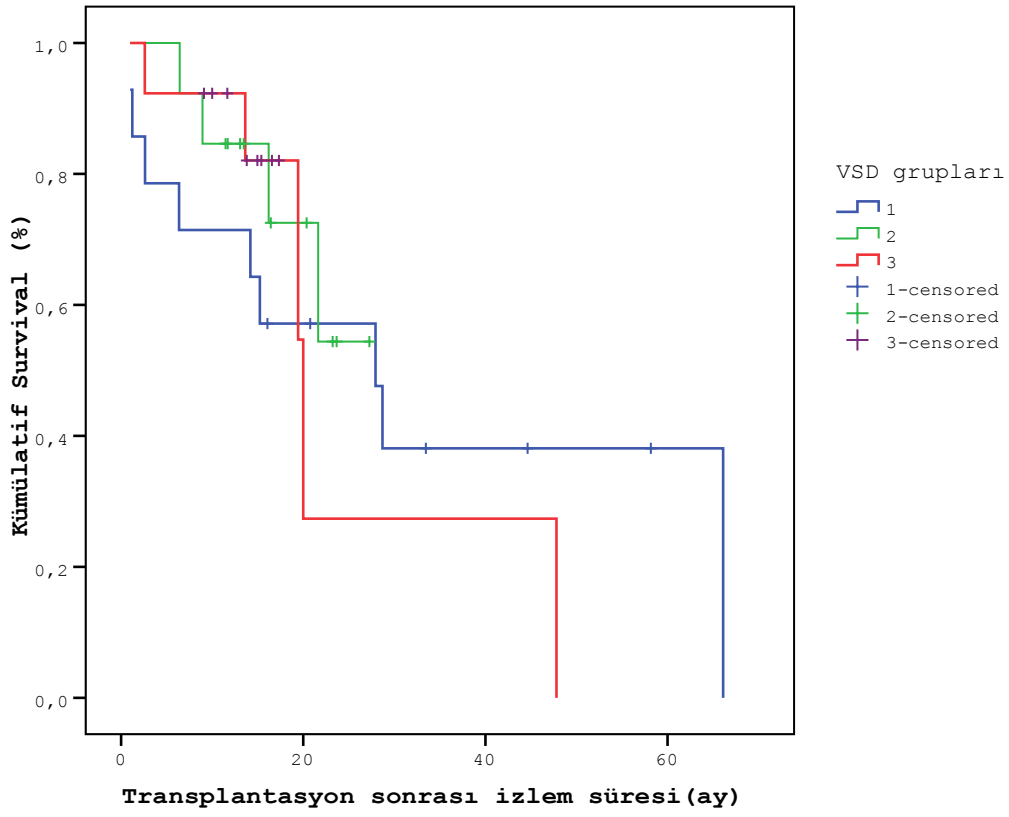
Çalışmaya dahil edilen hastaların Kaplan-Meier sağkalım analizlerinde; fibrozis derecesinin transplantasyon sonrası izlemdeki yaşam süresi üzerindeki etkisine bakıldığında sağ kalım eğrilerinin istatistiksel anlamlılık oluşturmadığı görüldü (logrank p=0,53).

Sağ kalım analizi için bahsedilen fibrozis, VSD, NVES gruplarındaki hastaların yaş, cinsiyet, hastalık, transplantasyon öncesi hastalık durumu ve verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı dağılımları açısından değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (tüm gruplarda p>0,05)

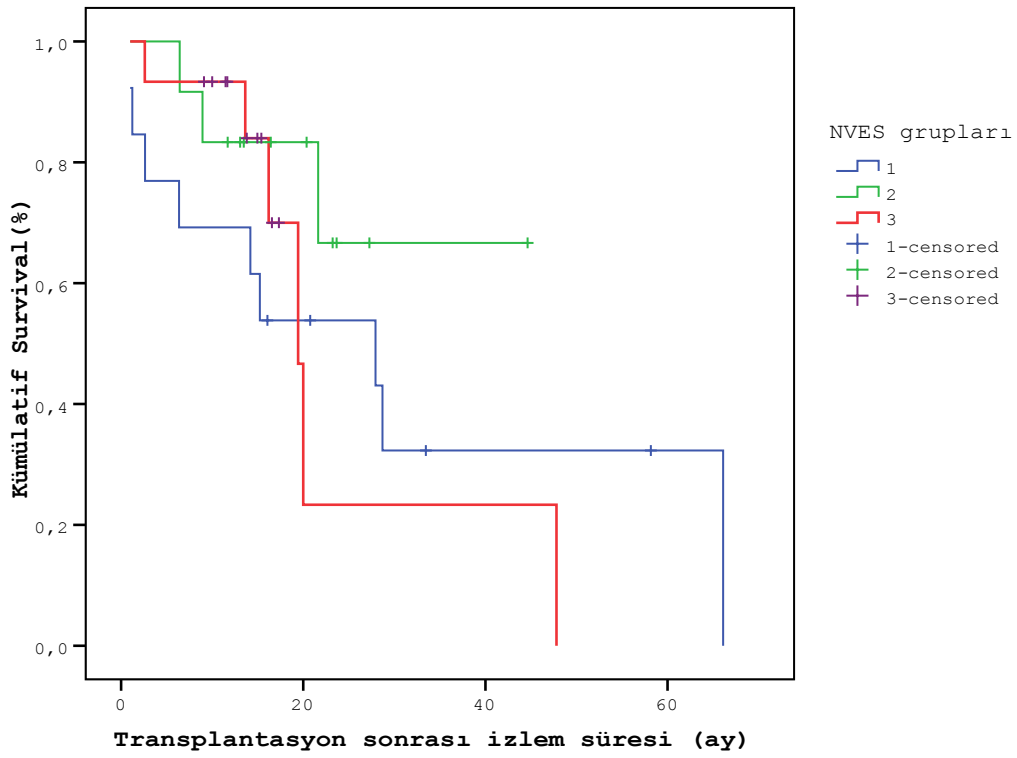


Grafik 9. Fibrozisin transplantasyon sonrası sağkalıma etkisi (logrank p=0,53).

Transplantasyon sonrası izlem süresi üzerine anjiyogenezisin etkisi açısından VSD ve NVES alt gruplarının Kaplan-Meier sağkalım analizlerinde de sağ kalım eğrileri arasında istatistiksel anlamlılık görülmedi (sırasıyla log rank p=0,91 ve p=0,52).



Grafik 10. VSD'nin transplantasyon sonrası sağkalıma etkisi ( log rank p=0,91).



Grafik 11. NVES'in transplantasyon sonrası sağkalıma etkisi (log rank p=0,52) .

## TARTIŞMA

Hematopoietik kök hücre transplantasyonu hematolojik- hematolojik olmayan maligniteler ile malign olmayan hastalıklarda yaygın olarak kullanılmakta olup, kür şansı sağlayan önemli bir tedavi seçeneği haline gelmiştir. Son yıllardaki iyileşmelerle birlikte halen önemli morbidite ve mortalite riski taşımaktadır ancak oldukça yüz güldürücü sonuçları olan bir tedavidir. Gelişmelerle birlikte 10 yıl öncesine kadar transplantasyon yaşı 45 ile sınırlandırılmışken, günümüzde yaş neredeyse bir sınırlandırıcı olmayıp otolog nakillerde 70'lere kadar yükselmiştir.

Periferik kök hücre transplantasyonu sonrasında hematopoietik engraftmanın hızı ve uzun dönem devamlılığını belirlemek oldukça önemlidir. Transplant sonrası mortalite ve morbidite riskleri, transfüzyon ve antibiyotik ihtiyaçları, hastanede kalış süresi ve sonucun ekonomik tablosunun engraftmana bağımlı olması bu durumu kritik bir süreç haline getirmektedir.

Engraftman sağlanması 70-90'lı yıllar arasında transplant hekimlerinin erken graft fonksiyonunu değerlendirilmesinde bir gösterge görevi üstlenmiştir. Bununla birlikte HKH'nin engraftmanından sorumlu moleküler mekanizmalar ile kemik iliğinde çoğalma ve olgun, fonksiyonel hematopoietik hücrelere dönüşüm başlangıcı ve devamlılığı hakkında halen yeterli miktarda bilgiye sahip bulunmamaktayız.

Transplant işleminin gerçekten geliştiği 1980'lerin ikinci yarısı ve 1990'ların başında engraftman ile ilgili öngörünün tek biyolojik parametresi granülosit-makrofaj koloni oluşturma ünitesi (CFU-GM) bazında in vitro koloni oluşturma deneyleri idi. Ancak uygulamada değerlendirme öncesinde 10-14 gün gerektiği için bir dezavantaj oluşturuyordu. 1990'ların başında CD34<sup>+</sup> hücrelerin mutlak sayılarının belirlenmesi önemli bir dönüm noktası oldu. Bir çok araştırmacı transplant sonrası nötrofil ve trombosit engraftman hızını belirlemedeki en uygun kriterin graftın CD34<sup>+</sup> hücre içeriği olduğunda ısrarlıdır. Birçok merkez tarafından bunun için eşik değer olarak kabul edilen düzey 2-2,5x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg olarak belirtilmektedir.

Merkezimizde de eşik değer olarak bu düzeyler kullanılmaktadır. Bu çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre çalışmaya dahil edilen hastalardan sadece 1 hastada reinfüze edilen ürünün CD34<sup>+</sup> hücre miktarı <2x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg ( 1,18x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg) idi. Hastanın tanısı relaps-refrakter multipl myelom idi ve transplantasyon öncesi 3 sıra kemoterapi almıştı, radyoterapi uygulanmamıştı. Periferik kök hücre mobilizasyonu için siklofosfamid ve G-CSF protokolü uygulanmış ve ancak 3 aferez uygulaması sonrası bu düzeyde kök hücre

toplanabilmişti. Hastanın nötrofil engraftman süresi 19. gün, trombosit engraftman süresi ise 18. gün olarak saptandı. Bu konuda bazı araştırmacılara göre de optimal kısa dönem yeniden yapılanmada gerekli olan HKH miktarı  $2,5-5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg olarak kabul edilmiştir [3, 48-50]. Daha fazla HKH infüzyonunun daha hızlı bir engraftman sağlamadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte Nieboer ve ark. uzun dönem yeniden yapılanma açısından yaptıkları transplant sonrası 1 yıllık analizlerinde bahsedilen miktarların uygun olmadığını belirtmişlerdir. Eşik değer olarak  $>5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg miktarını önermişlerdir ve  $>10 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg miktardaki infüzyonların uzun dönem yeniden yapılanmayı hala hızlandırdığı görüşünü öne sürmüşlerdir ( multivariate analizlerinde verilen CD34<sup>+</sup> miktarı açısından  $<5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg ile  $>10 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg log-rank p=0,01). Bu durumu olasılıkla elde edilen üründeki progenitor hücrelerin tipi ve fonksiyonlarından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Buna göre CD34<sup>+</sup> hücrelerin kısa dönem engraftmanında kritik rol alan progenitor HKH' yi yansıttığını [51], uzun dönem engraftmanın ise daha immatür HKH' ce sağlandığını ileri sürmektedirler. Yakın dönemde yapılan lenfoma hastalarında otolog kök hücre nakli sonrası uzun dönem hematolojik yeniden yapılanmada elde edilen ürünün dondurulma öncesi ve eritildiğinde içeriğindeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarlarının etkisini araştıran bir çalışmada Maunier ve ark. optimal düzeyi en az  $5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg olarak saptamışlardır[52]. Bu anlamda bizim yaptığımız analizlere göre hastaların aldıkları ürünlerdeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı açısından üç gruba ayrıldığında  $2,5-5 \times 10^6$  olan 13 hasta (grup 1),  $>5 \times 10^6$ - $<10 \times 10^6$  olan 13 hasta (grup 2) ve  $\geq 10 \times 10^6$  olan 13 hasta (grup 3) olduğu saptandı. Buna göre nötrofil ( 39 hasta için) ve trombosit engraftmanı (36 hasta için) günleri açısından varyans analiziyle her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç saptanmamışken ( sırasıyla p=0,08 ve p=0,07), grup 1 ve grup 3 arasında istatistiksel anlamlı farklılık görüldü ( sırasıyla p=0,02 ve p=0,03). Korelasyon analizlerinde ise CD34<sup>+</sup> hücre miktarı ile nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasında negatif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Bulgularımız literatür bulgularıyla benzerdir.

Çalışmamızın ana değerlendirme konusu olan fibrozis ve anjiyogenezise model olması bakımından primer myelofibrozis ve diğer KMPN'ler ilgili literatür bilgisine bakıldığında: Soll ve ark.'nın 203 myelofibrozisli ve 203 fibrozisi olmayan kontrol grubu ile yaptığı çalışma sonuçları itibariyle önemlidir. Engraftmanı olan hasta ve kontrol grupları arasında nötrofil engraftman günleri açısından istatistik açıdan anlamlı farklılık saptanmamış, trombosit engraftmanının ise MF'li grupta 3 gün geciktiği gözlenmiş. Fibrozisin derece 0-4

arasında sınıflandırıldığı bu çalışmada ciddi (derece 3-4) fibrozisi olan 33 hasta ile bunların kontrol grubu arasında yapılan analizlerde trombosit engraftmanının 7 gün uzadığı ve kontrol grubuna göre daha fazla trombosit tranfüzyonu gereksinimi olduğu gözlenmişken, eritrosit engraftmanında 2 gün gecikme olduğu ve transfüzyon ihtiyaçları arasında anlamlı fark olmadığı saptanmıştır [1]. Aksi sonuçlara sahip çalışmalar da mevcuttur. Bunlardan oldukça geniş hasta sayısına sahip bir çalışmada; ileri myelodisplastik sendrom ve multiligne displazi ile birlikte AML'li hastalar alınmış ( 471 hasta; MF'li 113 hasta ve 358 fibrozisi olmayan hasta). Hastaların %28'inde ileri derecede fibrozis saptanmış. 113 hastanın 98'inde nötrofil engraftmanı gözlenmiş ve bunların ortanca engraftman günleri 28.gün (10-80 gün) , fibrozisi olmayan grupta ise ortanca 17. gün(10-33) bulunmuştur. Fibrozisli grupta istatistik olarak anlamlı bir gecikme gözlenmiş ( $p < 0.0001$ ) [65].

Hastaların fibrozis derecesine göre 3 gruba ayrılarak analizlerinin yapıldığı çalışmamızda elde ettiğimiz verilerde nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (sırasıyla  $p=0,71$  ve  $p=0,11$ ). Fibrozisi olmayan ve derece 2 fibrozisli gruplar trombosit engraftman günleri açısından karşılaştırıldığında ise  $p=0,059$  saptanmıştır. Bu sonuca göre; hasta sayısının daha fazla olması durumunda (hasta grubumuzda ciddi fibrozisi olan hasta sayısı 6 idi) istatistiksel anlamlılığa ulaşacağı düşünülmektedir.

Anjigenezis bir çok hastalık grubunda, özellikle de solid tümörlerde metastatik süreçler açısından çalışılmış olmakla birlikte transplantasyon kinetiklerine olası etkisi henüz değerlendirilmemiştir. Malign hematolojik hastalıklarda diğer organ solid tümörlerinde olduğu gibi kemik iliğinde malign sürece vasküler destek olabileceği ile ilgili bazı kanıtlardan sonra [66, 67] ile ilgili yapılan bir çalışmada polisitemiya vera, kronik myeloid lösemi ve myelofibrozis hastalarının kemik iliğinde anjioyenezis değerlendirilmiş ve myeloproliferatif hastalıklarda normal Kİ' ne göre neovaskülarizasyonun arttığı gözlenmiştir. MF'li hastalarda elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (normal Kİ damar yoğunluğu= $5,9 \pm 2,1$ , MF'li Kİ = $14,4 \pm 5,5$  ve  $p < 0,001$ ). Myeloid metaplazili myelofibrozis (MMF) ile ilgili yeni bir patogenetik hipoteze göre bozulmuş Kİ stromal yapısınca salgılanan anormal sitokin aracılıklı megakaryosit veya monosit ( veya her ikisi birlikte) klonal bir artış göstermektedirler [68]. Bahsedilen sitokinler arasında TGF- $\beta$ , PDGF, bFGF suçlanmaktadır. Buna ikincil bir sonuç olarak kollojen fibrozis yeni kemik formasyonu oluşur.

Bununla birlikte ek olarak yeni kanıtlara göre bozulmuş stromal mikroçevre megakaryositler tarafında eksprese edilen VEGF artışında olduğu gibi anjiyogenik sitokinler için de kaynak teşkil eder [69]. Çalışmamızda anjiyogenezis ile nötrofil ve trombosit engraftman günleri arasında korelasyon saptanmamış, VSD ve NVES değerleri vasküler yoğunluğa göre alt gruplara ayrılıp varyans analizi yapıldığında da istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. Sürvi analizlerine bakıldığında da fibrozis ve anjiyogenezis alt gruplarında sağ kalım açısından anlamlı farklılık izlenmemiştir. Ancak korelasyon analizlerinde fibrozis ile anjiyogenezis arasında pozitif bir korelasyon gözlemlendi ( VSD için  $r=0,38$   $p=0,014$ , NVES için  $r=0,39$   $p=0,012$ ). Dolayısıyla engraftman süreci düşünüldüğünde fibrozisin olumsuz bir etki göstermesi beklenirken bunun sonuçlara yansımamasında çalışmamızdaki ciddi fibrozisi olan hasta sayısının az olması yanında daha önce bahsedildiği üzere HKH'nin homing ve lodgment aşamalarında önemli fonksiyona sahip olan vasküler nişin ana komponenti olan vasküler yapıların yoğunluğunun fibrozisle pozitif korelasyon göstermesinin de katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak engraftman sürecinde hematopoetik mikroçevrede önemli etkileşimleri olan stromal dokunun durumu ve vasküler niş ile ilgili bilgiler giderek artmaktadır. Bu çalışmada elde edilen veriler ise, hematolojik malignitelere eşlik eden fibrozisin nötrofil engraftmanı üzerine etkisinin olmadığı ancak özellikle ileri derecedeki fibrozisin trombosit engraftmanında negatif bir etkinliği olacağı sonucunu desteklemiştir.

## KAYNAKLAR

1. Soll, E., et al., *Relevance of marrow fibrosis in bone marrow transplantation: a retrospective analysis of engraftment*. Blood, 1995. **86**(12): p. 4667-73.
2. Bensinger, W.I., et al., *Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers*. N Engl J Med, 2001. **344**(3): p. 175-81.
3. Haas, R., et al., *Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support*. Blood, 1995. **85**(12): p. 3754-61.
4. Miflin, G., et al., *Comparative serial quantitative measurements of chimaerism following unmanipulated allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells and bone marrow*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 429-40.
5. Ilhan, O., et al., *The impact of the CD34+ cell dose on engraftment in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. Transfus Sci, 1999. **20**(1): p. 69-71.
6. Bishop, M.R., et al., *A randomized, double-blind trial of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) versus placebo following allogeneic blood stem cell transplantation*. Blood, 2000. **96**(1): p. 80-5.
7. Bensinger, W., et al., *Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells*. J Clin Oncol, 1995. **13**(10): p. 2547-55.
8. Fliedner, T.M., et al., *Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure*. Cancer Biother Radiopharm, 2002. **17**(4): p. 405-26.
9. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
10. Lord, B.I., N.G. Testa, and J.H. Hendry, *The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur*. Blood, 1975. **46**(1): p. 65-72.
11. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
12. Shen, Q., et al., *Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells*. Science, 2004. **304**(5675): p. 1338-40.
13. Tavassoli, M., *Structure and function of sinusoidal endothelium of bone marrow*. Prog Clin Biol Res, 1981. **59B**: p. 249-56.
14. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.
15. Kondo, M., et al., *Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 759-806.
16. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
17. Eaves, C., et al., *Hematopoietic stem cells: inferences from in vivo assays*. Stem Cells, 1997. **15 Suppl 1**: p. 1-5.
18. Sharkis, S.J., et al., *Phenotypic and functional characterization of the hematopoietic stem cell*. Stem Cells, 1997. **15 Suppl 1**: p. 41-4; discussion 44-5.
19. Harrison, D.E. and C.M. Astle, *Short- and long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: models for human umbilical cord blood*. Blood, 1997. **90**(1): p. 174-81.
20. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman, *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science, 1988. **241**(4861): p. 58-62.
21. Zhu, J. and S.G. Emerson, *Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3295-313.
22. Broxmeyer, H.E., *Regulation of hematopoiesis by chemokine family members*. Int J Hematol, 2001. **74**(1): p. 9-17.
23. Ivanova, N.B., et al., *A stem cell molecular signature*. Science, 2002. **298**(5593): p. 601-4.
24. Tyndall, A., et al., *Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(1): p. 301.
25. Krause, D.S., et al., *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. Cell, 2001. **105**(3): p. 369-77.
26. Grant, M.B., et al., *Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization*. Nat Med, 2002. **8**(6): p. 607-12.

27. Lagasse, E., et al., *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1229-34.
28. Orlic, D., et al., *Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **938**: p. 221-9; discussion 229-30.
29. Nilsson, S.K., P.J. Simmons, and I. Bertoncello, *Hemopoietic stem cell engraftment*. Exp Hematol, 2006. **34**(2): p. 123-9.
30. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
31. Jo, D.Y., et al., *Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 101-11.
32. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3289-96.
33. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. Science, 1999. **283**(5403): p. 845-8.
34. Wright, D.E., et al., *Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1933-6.
35. Dexter, T.M., *Stromal cell associated haemopoiesis*. J Cell Physiol Suppl, 1982. **1**: p. 87-94.
36. Simmons, P.J., et al., *Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma*. Leuk Lymphoma, 1994. **12**(5-6): p. 353-63.
37. Lichtman, M.A., *The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review*. Exp Hematol, 1981. **9**(4): p. 391-410.
38. Weiss, L., *The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats*. Anat Rec, 1976. **186**(2): p. 161-84.
39. Simmons, P.J., J.P. Levesque, and A.C. Zannettino, *Adhesion molecules in haemopoiesis*. Baillieres Clin Haematol, 1997. **10**(3): p. 485-505.
40. Nilsson, S.K., et al., *Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(3): p. 371-7.
41. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
42. Shackney, S.E., S.S. Ford, and A.B. Wittig, *Kinetic-microarchitectural correlations in the bone marrow of the mouse*. Cell Tissue Kinet, 1975. **8**(6): p. 505-16.
43. Patt, H.M., M.A. Maloney, and M.L. Flannery, *Hematopoietic microenvironment transfer by stromal fibroblasts derived from bone marrow varying in cellularity*. Exp Hematol, 1982. **10**(9): p. 738-42.
44. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. Cell, 2002. **109**(5): p. 625-37.
45. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
46. Shirota, T. and M. Tavassoli, *Cyclophosphamide-induced alterations of bone marrow endothelium: implications in homing of marrow cells after transplantation*. Exp Hematol, 1991. **19**(5): p. 369-73.
47. Tavassoli, M., *Hemopoietic endothelium, incognito*. Exp Hematol, 1992. **20**(4): p. 386-7.
48. Bensinger, W.I., et al., *Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation*. Br J Haematol, 1994. **87**(4): p. 825-31.
49. van der Wall, E., et al., *Bone marrow reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of graft size*. Ann Oncol, 1994. **5**(9): p. 795-802.
50. Weaver, C.H., et al., *An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy*. Blood, 1995. **86**(10): p. 3961-9.
51. Domenech, J., F. Roingeard, and C. Binet, *The mechanisms involved in the impairment of hematopoiesis after autologous bone marrow transplantation*. Leuk Lymphoma, 1997. **24**(3-4): p. 239-56.
52. Mounier, N., et al., *Long term hematologic recovery after autologous stem cell transplantation in lymphoma patients: impact of the number of prefreeze and post-thaw CD34+ cells*. Bull Cancer, 2005. **92**(3): p. E31-8.



53. Martyre, M.C., et al., *Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis*. Br J Haematol, 1994. **88**(1): p. 9-16.
54. Zauli, G., et al., *Reduced responsiveness of bone marrow megakaryocyte progenitors to platelet-derived transforming growth factor beta 1, produced in normal amount, in patients with essential thrombocythaemia*. Br J Haematol, 1993. **83**(1): p. 14-20.
55. Martyre, M.C., et al., *Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis*. Br J Haematol, 1997. **97**(2): p. 441-8.
56. Castro-Malaspina, H., et al., *Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts*. Blood, 1981. **57**(4): p. 781-7.
57. Le Bousse-Kerdiles, M.C. and M.C. Martyre, *Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis*. Pathol Biol (Paris), 2001. **49**(2): p. 153-7.
58. Steurer, M., et al., *Increased angiogenesis in chronic idiopathic myelofibrosis: vascular endothelial growth factor as a prominent angiogenic factor*. Hum Pathol, 2007. **38**(7): p. 1057-64.
59. Di Raimondo, F., et al., *Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis*. Leukemia, 2001. **15**(6): p. 976-80.
60. Bock, O., et al., *Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin*. Br J Haematol, 2005. **130**(1): p. 76-82.
61. Wang, J.C., et al., *Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG)*. Exp Hematol, 2004. **32**(10): p. 905-10.
62. Barth, P.J., et al., *Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation*. Hum Pathol, 1996. **27**(12): p. 1306-10.
63. Weibel, E.R., *Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs*. Lab Invest, 1963. **12**: p. 131-55.
64. Thiele, J., et al., *European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity*. Haematologica, 2005. **90**(8): p. 1128-32.
65. Scott, B.L., et al., *Marrow fibrosis as a risk factor for posttransplantation outcome in patients with advanced myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(3): p. 345-54.
66. Vacca, A., et al., *Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3064-73.
67. Perez-Atayde, A.R., et al., *Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia*. Am J Pathol, 1997. **150**(3): p. 815-21.
68. Reilly, J.T., *Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis, natural history and management*. Blood Rev, 1997. **11**(4): p. 233-42.
69. Pruneri, G., et al., *Angiogenesis in myelodysplastic syndromes*. Br J Cancer, 1999. **81**(8): p. 1398-401.