

RETİKÜLOSİT OLGUNLAŞMA İNDEKSİNİN ALLOGENETİK PERİFERİK KÖK HÜCRE NAKLİNDE KEMİK İLİĞİ YAMANMASININ ERKEN HABERCİSİ OLARAK DEĞERİ

Mustafa N. YENEREL, Sevgi KALAYOĞLU BEŞİŞİK,
Tülin BUDAK ALPDOĞAN, Deniz SARGIN*

ÖZET

Çevre kanında retikülosit sayımı kemik iliğinin eritropoietik aktivitesini belirlemede sık kullanılan bir tanı yöntemidir. Bu çalışmada allogeneik periferik kök hücre trasplantasyonu (allo-PKHN) yapılan hastalarda eritroid dizi yamanması flow sitometrik retikülosit analizleriyle değerlendirildi. Doku grubu uygun kardeşlerden yapılan 11 allo-PKHN vakası çalışmaya alındı. Kemik iliği yamanması mutlak nötrofil sayısı (MNS), retikülosit sayısı, trombosit sayısı ile birlikte retikülosit olgunlaşma indeksi (ROI) kriterleri kullanılarak değerlendirildi ve hastaların hepsinde yamanma gerçekleşti. Kemik iliği yamanmasının değerlendirilmesinde genellikle mutlak nötrofil sayısı kullanılmaktadır. Çalışmamızda allo-PKHN vakalarında kemik iliği yamanmasının ROI kriteri kullanılarak MNS ye göre daha erken belirlenebildiği gözlemlendi. Bu çalışma sonucunda ROI nin kemik iliği trasplantasyon vakalarının kemik iliği yamanmasının değerlendirilmesinde ek bilgiler sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Periferik kök hücre trasplantasyonu, Kemik iliği yamanması, flow sitometri, retikülosit olgunlaşma indeksi.

SUMMARY

The value of reticulocyte maturity index (RMI) as a predictor of engraftment in allogeneic peripheral blood stem celi transplantation (ALLO-PBSCT). Reticulocyte quantification in peripheral blood samples is a commonly used diagnostic indicator of bone marrow erythropoietic activity. We present here a prospectively study which carried out to evaluate the erythroid engraftment after allogeneic Peripheral Blood Celi Transplantation by Flow Cytometric reticulocyte analysis. Twenty-one patients undergoing related allogeneic PBSCT were studied. All the patients were engrafted succesfully, as determined by rise in absolute neutrophil count (ANC), reticulocyte count (RC) or platelet count, as well as by reticulocyte maturation index (RMI). Although the ANC is generally as an indicator of marrow engraftment, our study shows that the RMI value could predict the engraftment earlier than the ANC in PBSCT and we conclude that RMI measurement provides an additional information about the engraftment kinetics.

Key Words: Peripheral Blood Stem Celi Transplantation, Engraftment, Reticulocyte Maturity Index, flow cytometry.

GİRİŞ

Periferik kanda retikülosit sayımı kemik iliğinin eritropoietik aktivitesini belirlemede sık kullanılan bir tanı yöntemidir (5,6). Standart yöntemde metilen mavisi ile vital boyama yapılarak hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirilir. Son yıllarda flow sitometrinin hematoloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlanmasıyla birlikte retikülosit sayımları da bu yöntemle yapıl-

maya başlanmıştır. Flow sitometri (FS) ile retikülosit sayımı ışık mikroskobu ile sayıma göre çok daha güvenilir ve hızlı bir yöntemdir (5). Hücrelerin floresans yoğunluğu direkt olarak hücre RNA içeriğine bağlı olduğundan bu yöntemle eritrositlerin olgunluk durumu hakkında da objektif bilgiler sağlanır. Bu yöntemle daha genç olan hücreler daha fazla RNA içerdiği için daha yoğun floresans vermekte ve retikülosit olgunlaşma

indeksi (ROI) de o derece yüksek çıkmaktadır. Bu çalışmada allogeneik periferik kök hücre nakli (allo-PKHN) yapılan 11 hastanın eritroid dizi yamanması flow sitometrik analizi ile prospektif olarak değerlendirildi.

MATERYAL ve METOD

Ünitemizde allo-PKHN yapılan 11 hasta değerlendirilmeye alındı. Hastaların 2'si kadın 9'u erkek idi ve yaşları 18 ile 31 arasında değişmekteydi (ortanca 30). Hastalar, 6'sı KML, 4'ü AML ve 1'i ALL tanıları ile sevk edilmişti. Hastaların kemik iliği nakli öncesi -7.gün ve nakil sonrası 0.günden başlanarak engrafman sağlanana kadar her gün kan sayımı, haftada 3 gün flow sitometrik yöntemle retikülosit analizi ve haftada bir standart metod ile retikülosit sayımı yapıldı. Bu amaçla CellDyne 1600 otomatik kan sayımı cihazı, Fasc-Calibur (Becton Dickinson) flow sitometri cihazı ve RNA boyası olarak thiazole orange'in kullanıldığı ReticCount (Becton Dickinson) kit'i kullanıldı.

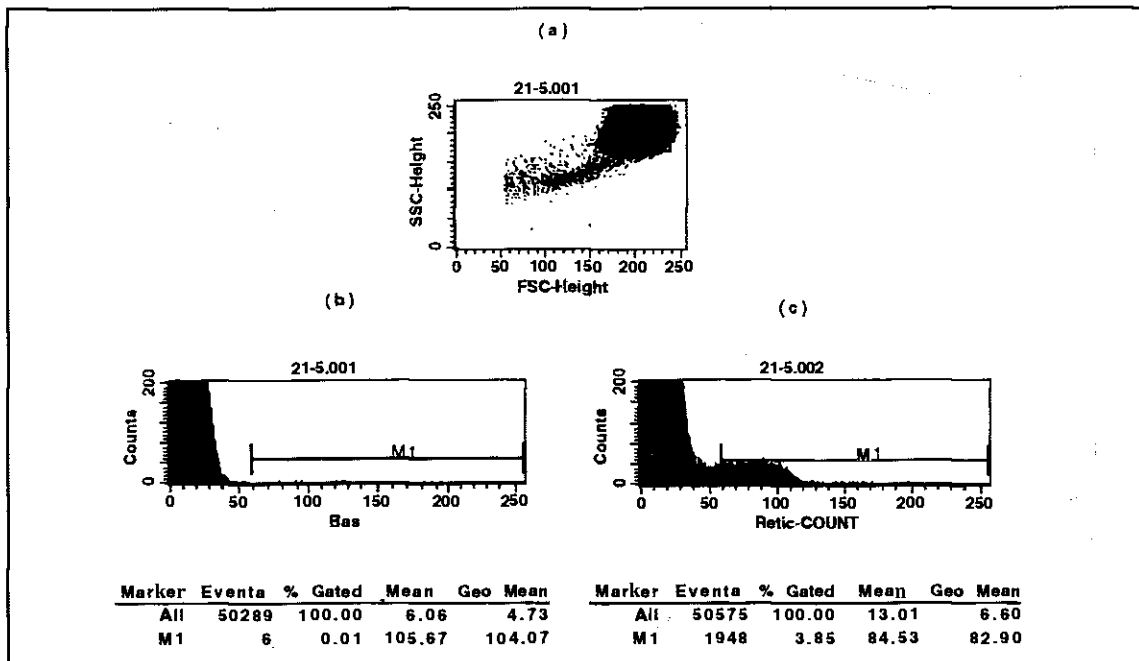
Örnekleme ve boyama işlemi

EDTA'lı çevre kanı örnekleri +4 °C saklanarak en çok 48 saat içinde çalışıldı. Örnekler Davies ve arkadaşlarının belirttiği şekilde de hazırlanıp flow sitometride analiz edildi (2). Örnekler iki tüp olarak hazırlandı. İlk tüpe 1ml fosfatlı tuz tamponu, ikinci tübe 1mL ReticCOUNT solüsyonu konuldu ve her iki tüpe de 5µl tam kan örneği katıldı. Örneklerin karışımı sağlandıktan sonra 30 dakika süreyle, karanlıkta, oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bekletilmeden çalışıldı.

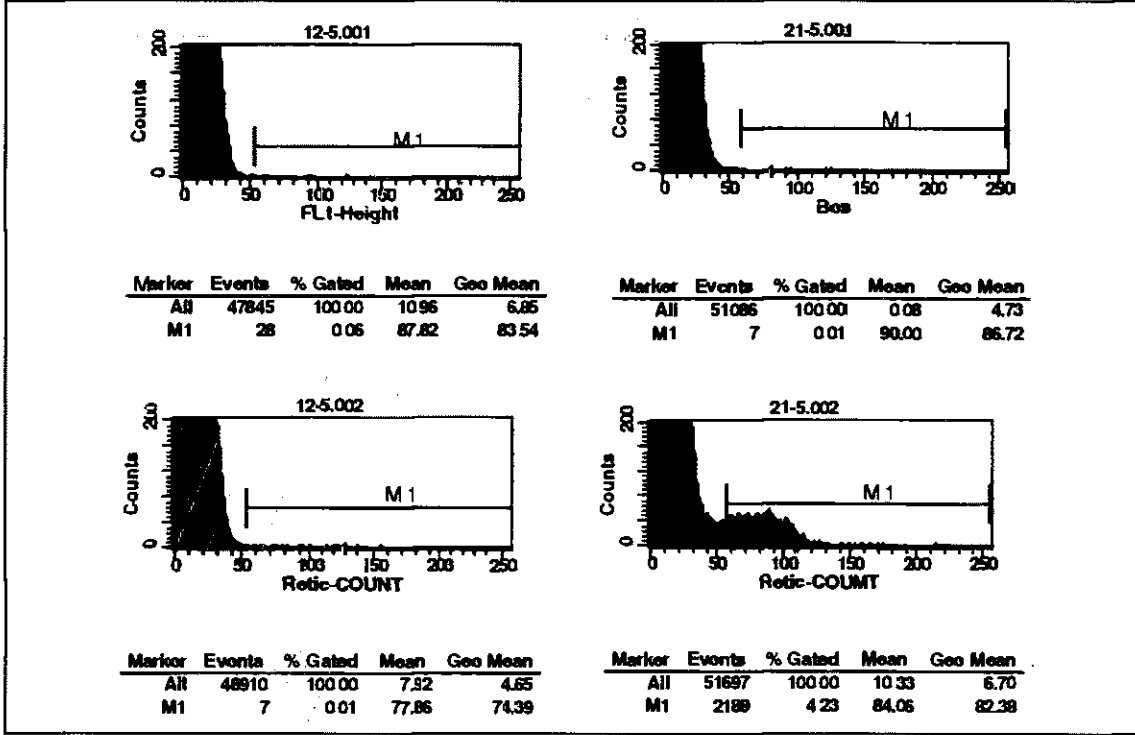
Flow sitometrik analiz

Flow sitometrinin kalibrasyonu FacsCOMP software'i kullanılarak standart "CaliBRITE-bead" ler ile yapıldı. Verilerin sağlanması ve değerlendirilmesi sırasında CellQuest software'i kullanıldı. Floresans sinyalleri logaritmik olarak güçlendirildi. Dar açıda (forward side scatter (FSC)) ve dik açıda (side scatter (SSC)) ışık saçılımının ölçüldüğü nokta grafikleri kullanılarak önce eritrositler çerçeve içine alındı, trombosit ve artık hücre partiküllerinden ayrıldı. Bu alanda 50.000 sinyal sayıldı ve değerlendirilmeye alındı (Şekil 1a).

Şekil 1. Periferik kan örneklerinde flow sitometri ile retikülosit analizi. (a) Eritrosit topluluğunun çerçeve içine alınarak işaretlendiği SSC'ye karşı FSC nokta grafiği (b) boyasız tüp, (c) boyalı tüp



Şekil 2. Bir vakanın düşük ve normal retikülosit oranlarını gösteren histogram eğrileri



Analiz için tek floresansın kullanıldığı histogram eğrileri tercih edildi. Önce boyasız "boş" olarak hazırlanan örnek tüpünün verileri kullanılarak eritrositlerin otofloresansı belirlendi (Şekil 1b). Belirteçle zemin boyanmasının %0.03'den az olduğu alan belirlendi. Boyalı tüpün verileriyle elde edilen histogram grafiği üzerine aynı alan işaretlenerek alman floresans yoğunluk retikülosit oranı olarak kaydedildi (Şekil 1c).

Şekil 2. de aynı hastanın 9 gün arayla yapılmış iki retikülosit sayımına ait analizler sunuldu. Analiz sırasında retikülosit olgunlaşma indeksi (ROI), retikülosit pozitif olarak değerlendirilen topluluğun verdiği floresans yoğunluğunun kanal numaralarının geometrik ortalaması olarak belirtildi.

Kan sayım sonuçları CellDyne 1600 otomatik sayım cihazıyla günlük olarak değerlendirildi. Kök hücre nakli sonrası dönemde retikülosit sayısının %1'i aştığı gün ve ROI değerinin en düşük değerinden %20 artış gösterdiği gün eritroid seri için engrafman günü

olarak kabul edildi. Nötrofil ve trombosit yamanması için ise nötrofil ve trombosit sayısının 3 gün üst üste sırasıyla $>0.5 \times 10^9/l$ ve $>50 \times 10^9/\mu l$ olduğu dönemin ilk günü kabul edildi.

SONUÇLAR

Çalışmamızda iki şekilde saptanan eritroid seri engrafman günleri, nötrofil ve trombosit engrafman günleri Tablo 1'de gösterildi. Vakaların nötrofil engrafmanı (mutlak nötrofil sayısı $>0.5 \times 10^9/\mu l$) ortalama 15 ± 3 günde, trombosit engrafmanı ($>50 \times 10^9/\mu l$) ortalama 17 ± 4 günde, retikülosit oranına göre saptanan eritroid seri engrafmanı ise ortalama 16 ± 3 günde gerçekleşti. Bu üç parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ROI'ndeki artış ortalama 10 ± 2 günde gerçekleşti ve bu kriter dikkate alındığında 11 hastanın 10unda ROI'ndeki artışın nötrofil ve trombosit engrafmanından daha erken olduğu görüldü. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı idi ($p < 0.007$).

Tablo 1. Vakaların KİT sonrası engrafman günleri

Vaka no	Yaş-Cinsiyet	Tam	Retikülozif >%1	ROİ	ANC >500/mm ³	Trombosit >50.000/mm ³
1	30,E	KML	17	10	12	16
2	21,K	KML	17	10	13	17
3	19,E	AML		12	18	
4	30,E	KML	17	11	11	13
5	25,K	AML	15	10	12	15
6	30,E	AML	19	12	14	20
7	30,E	KML	20	20	13	13
8	30,E	KML	10	10	16	
9	18,E	ALL	14	14	17	15
10	31,E	AML	16	16	17	25
11	30,E	KML	13	13	21	16

TARTIŞMA

Hücrelerin floresans yoğunluğu direkt olarak hücre RNA içeriğine bağlı olduğundan bu yöntemle eritrositlerin olgunluk durumu hakkında da objektif bilgiler sağlanır⁽³⁾. Bu yöntemde daha genç olan hücreler daha fazla RNA içerdiği için daha yoğun floresans vermekte ve ROİ mde o derece yüksek çıkmaktadır. Son zamanlarda ROİ'nin kök hücre nakli (KHN) yapılmış hastaların takibinde kullanıldığı çalışmalar da yayınlanmıştır (1,2,4,5,6). Kemik iliği yamanmasının göstergesi olarak genellikle mutlak nötrofil sayısı dikkate alınsa da bu çalışmada ROİ takibinin engrafmanı mutlak nötrofil sayısından daha erken belirlediğini gördük. Dalal ve arkadaşları da ROİ ve mutlak nötrofil sayısının birlikte değerlendirilmesiyle kemik iliği yamanması hakkında daha erken bilgi sahibi olunacağını tespit etmiştir (1). Çok sayıda retikülozif'in doğru ve hızlı bir şekilde sayılabildiği bu yöntem ile ROİ'nin belirlenebilmesi, bu yöntemin KHN sonrası kemik iliği yamanmasının takibinde güvenilir ve

duyarlı bir belirteç olarak kullanılmasına olanak vermiştir (1,2,4). Biz de nakil sonrası ROİ'nin takibiyle kemik iliğinin yamanması objektif bilgiler sağlanacağı sonucuna vardık.

KAYNAKLAR

1. Dalal BI, Stockford GR, Naiman SC, Spinelli JJ, Phillips GL: Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. Bone Marrow Transplantation 17:91 (1996).
2. Davis BH, Bigelow N, Ball ED, Mills L, Cormvill GG: Utility of flow cytometric reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. Am J Hematol Oct; 32:81 (1989).
3. Davis BH, Bigelow NC: Flow cytometric reticulocyte quantitation using thiazole orange provides clinically useful reticulocyte maturity index. Arch Pathol Lab Med 113:684 (1989).
4. Davis BH, Ornvold K, Bigelow NC: Flow cytometric reticulocyte maturity index: a useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia. Cytometry 15:35 (1995).
5. D'Onofrio G, Tichelli A, Foures C, Theodorsen L: Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. Clin Lab Haematol Dec; 18 Suppl 1:45(1996).
6. Lazarus HM, Chahine A, Lacerna K, Wamble A, Laffaldano C, Straight M, Rabinovitch A, Schimenti KJ, Jacobberger J: Kinetics of erythropoiesis after bone marrow transplantation. Am J Clin Pathol Apr;97:574 (1992).